

补阳还五汤对阿尔茨海默病小鼠海马凋亡因子及学习记忆能力的影响

于修芳¹, 雷霞², 曹玲¹, 刘海洋², 刘国良², 王加志², 耿放^{3*}, 张宁^{2,3*}

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040;

2. 黑龙江中医药大学佳木斯学院, 黑龙江佳木斯 154007; 3. 哈尔滨师范大学, 哈尔滨 150025;

4. 黑龙江中医药大学北药基础与应用研究省部共建教育部重点实验室, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:探讨补阳还五汤(BYHWT)对阿尔茨海默病小鼠海马组织凋亡因子及学习记忆能力的影响。方法:40只雄性APP/PS1双转基因小鼠随机分为模型组,多奈哌齐组(0.001 g·kg⁻¹),BYHWT高、中、低剂量组(分别为37.06,18.53,9.26 g·kg⁻¹)。C57小鼠作为空白组。连续灌胃BYHWT 30 d,进行水迷宫行为学测试后,取材。用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠海马中凋亡因子B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的变化。结果:与空白组比较,模型组小鼠学习记忆能力明显降低,海马组织中凋亡因子Bcl-2明显减少($P < 0.01$),Bax和Caspase-3明显增加($P < 0.01$)。与模型组比较,BYHWT高、中剂量组能明显改善小鼠学习记忆能力,凋亡因子Bcl-2明显增加($P < 0.01$),Bax和Caspase-3明显减少($P < 0.01$)。结论:补阳还五汤能够明显改善阿尔茨海默病小鼠的学习记忆能力,降低海马组织中Bax和Caspase-3的表达,增加Bcl-2的表达。

[关键词] 阿尔茨海默病;补阳还五汤;APP/PS1双转基因小鼠;凋亡因子;水迷宫

[中图分类号] R22;R24;R277.7;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0109-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2018030109

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171114.1136.024.html>

[网络出版时间] 2017-11-14 11:36

Effect of Buyang Huanwutang on Hippocampal Apoptosis Factors and Learning and Memory Abilities in Mice with Alzheimer's Disease

YU Xiu-fang¹, LEI Xia², CAO Ling¹, LIU Hai-yang², LIU Guo-liang², WANG Jia-zhi²,
GENG Fang^{3*}, ZHANG Ning^{2,3*}

(1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. College of Jiamusi, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi 154007, China;

3. College of Chemistry & Chemical Engineering, Harbin Normal University, Harbin 150025, China;

4. Key Laboratory of Chinese Materia Medica Co-sponsored by Province and Ministry, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Buyang Huanwutang (BYHWT) on the apoptosis factors in hippocampus and learning and memory abilities of Alzheimer's disease mice. **Method:** Totally 40 male APP/PS1

[收稿日期] 20170920(009)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81673581);哈尔滨市科技创新人才研究专项(2016RQYXJ012);黑龙江中医药大学新药研究基金项目(2015xy04)

[第一作者] 于修芳,硕士,从事中药药效物质基础及体内代谢研究,Tel:18246006286,E-mail:2587758519@qq.com

[通信作者] *张宁,博士,研究员,硕士生导师,从事中药药效物质基础及体内代谢研究,Tel:0454-6050350,E-mail:zhangning0454@163.com;

*耿放,博士,副教授,硕士生导师,从事天然药物活性成分研究,Tel:0451-82475863,E-mail:gengfang1980@163.com

double transgenic mice were randomly divided into 5 groups: model group, donepezil group ($0.001 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), high-dose, middle-dose and low-dose BYHWT groups (with the dosage of 37.06, 18.53, $9.26 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, representatively). Another 8 C57 mice were used as control group. After 30 days of administration, Morris water maze behavior test was conducted; and after the test, all mice were put to death. Western blot was used to detect the changes in apoptotic factors in hippocampus of the mice: B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) and cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3). **Result:** Compared with the control group, the learning and memory abilities of the model group were significantly lower ($P < 0.01$), Bcl-2 in hippocampus was obviously reduced ($P < 0.01$), and Bax and Caspase-3 increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, high-dose and middle-dose BYHWT groups could significantly improve the learning and memory abilities of the mice, Bcl-2 increased significantly ($P < 0.01$), and Bax and Caspase-3 decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** BYHWT can obviously improve the learning and memory abilities of Alzheimer's disease mice, reduce the expressions of Bax and Caspase-3 in hippocampus, and increase the expression of Bcl-2.

[Key words] Alzheimer's disease; Buyang Huanwutang; APP/PS1 double transgenic mice; apoptosis factor; Morris water maze

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年性疾病中最常见的一种,患者会出现记忆和认知能力的减退,给家庭和社会带来沉重的负担^[1]。随着世界人口老龄化的到来,阿尔茨海默病的防治已成为研究的热门。目前,临床上对于 AD 的治疗,多采用西药,如胆碱酯酶抑制剂,抗氧化剂等,由于 AD 发病机制复杂,西药难以从单一靶点进行治疗,且西药多有明显的副作用^[2-3],因此,中药及其复方制剂的研究成为目前迫切的任务。

研究表明,中药方剂补阳还五汤对脑缺血损伤具有明显的保护作用^[4-5],方中的补气药和活血药间有协同作用。关于补阳还五汤对 AD 的保护作用,多数研究集中注意力于 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, $A\beta$)沉积和 Tau 蛋白过度磷酸化,而海马中神经元的异常凋亡也是 AD 的一个重要病理学现象^[6]。因此,本实验采用 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠^[7],研究补阳还五汤对 AD 模型小鼠海马组织中凋亡因子 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的调节作用,及其对 AD 模型小鼠学习记忆能力的影响,以期为临床 AD 的治疗奠定基础。

1 材料

1.1 动物 清洁级 APP/PS1 双转基因小鼠,雄性,5 月龄,体重(30 ± 10)g,合格证号 SCXK(京)2015-0001 号;清洁级 C57BL/6J 小鼠,雄性,5 月龄,体重(25 ± 10)g,合格证号 SCXK(京)2015-0002 号,均购于北京维通利华实验动物技术有限公司。饲养环境温度控制在(21 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,相对湿度

(60 ± 10)%,保持 12 h 白天/12 h 黑夜的循环,动物自由饮食和进水。动物实验符合黑龙江中医药大学伦理委员会标准。

1.2 药物与试剂 补阳还五汤冻干粉剂制备:补阳还五汤由周忠光教授购买于黑龙江中医药大学附属第一医院,并由黑龙江中医药大学实验中心田明教授鉴定均符合 2015 年版《中国药典》规范,并将黄芪 120 g,当归尾 6 g,赤芍 4.5 g,川芎 3 g,地龙 3 g,桃仁 3 g,红花 3 g,这 7 味药制备成水煎剂(含生药 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),冷冻干燥成干粉,置于 4°C 冰箱中密封保存备用。盐酸多奈哌齐粉末(上海源叶生物科技有限公司,批号 S60449);兔抗 Bax 抗体,兔抗 Bcl-2 抗体,兔抗 Caspase-3 抗体,兔抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体,HRP 标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 bs-4564R, bs-0032R, bs-0061R, bs-0295G, bs-HRP);BCA 蛋白浓度测定试剂盒,彩色预染蛋白相对分子质量标准(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0011, P0069)。

1.3 仪器 ZH-Morris 型水迷宫设备(安徽正华生物仪器设备有限公司);043BR57823 型 mini PROTEAN Tetra Cell 电泳仪,221BR 53984 型 Trans-Blot SD Cell 半干转膜仪(美国 Bio-Rad 公司),Smart chemi II 一体式微型化学发光成像仪(北京赛智创业科技公司)。

2 方法

2.1 动物分组与处理 40 只清洁级 APP/PS1 双转基因小鼠随机分为 5 组,每组 8 只,分别为模型组,

多奈哌齐组, BYHWT 高、中、低剂量组, 8 只相同遗传背景的 C57 小鼠作为空白组。BYHWT 高、中、低剂量组每天分别以 37.06, 18.53, 9.26 g·kg⁻¹ 的剂量灌胃, 多奈哌齐组小鼠每天以盐酸多奈哌齐(0.001 g·kg⁻¹) 灌胃 0.5 mL, 模型组和空白组每天灌胃相同体积的生理盐水, 灌胃时间持续 30 d (给药剂量通过人用剂量体重法换算得到)^[5]。

2.2 水迷宫实验 灌胃结束后, 进行水迷宫行为学测试, 水迷宫实验分两部分进行, 第一部分为 4 d 的定位航行实验, 将平台放在第四象限处, 并没入水下 2 cm, 在实验过程中保持平台位置不动。于 1, 2, 3 象限规定的入水点, 面向池壁将小鼠置于水迷宫中。90 s 内, 能找到目标平台的小鼠, 使其在平台上停留 30 s, 未能找到平台的小鼠, 人为将其放置在平台上 30 s, 以加强记忆。小鼠第 1 次爬上平台的时间记为小鼠的逃避潜伏期。

水迷宫实验第二部分, 空间探索实验, 撤去平台, 于 1, 2, 3 象限入水点将小鼠置于水迷宫中, 记录其 90 s 内在目标象限的停留时间和有效区域(2 倍平台直径区域)穿过的次数。

2.3 样本采集 取材各组小鼠的新鲜海马组织样品, 把组织剪成细小的碎片。溶解在含有 1% PMSF 的 RIPA 裂解液中, 混匀海马组织。冰水中超声震荡 30 min。离心和保存。充分裂解后, 用离心机

14 000 r·min⁻¹ 离心, 4 ℃ 下离心 5 min, 取上清分装于 0.5 mL 离心管中, 标号并置于 -20 ℃ 冰箱保存各组样品。

2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测海马组织 Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白相对表达 取各组样品, 通过 BCA 法测定蛋白浓度。取预染蛋白 maker 和蛋白样品 40 μg 上样, 10% SDS-PAGE 电泳分离。电泳结束后, 用湿法转膜法将目的蛋白转移到 PVDF 膜上(80 V, 50 min)。膜在室温下用脱脂奶粉封闭 2 h, 加一抗(1:300)4 ℃ 孵育过夜。第 2 天, 用 TBST 洗 4 遍, 5 min/遍, 加入二抗(1:5 000), 在室温摇床上孵育 2 h, 然后, 用 TBST 洗 4 遍, ECL 成像。

2.5 数据处理 数据用 SPSS 18.0 统计学软件分析, 组间比较利用单因素方差分析(one-way ANOVA), 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 补阳还五汤对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠水迷宫行为学的影响 在 4 d 的定位航行实验中, 与空白组比较, 模型组小鼠的逃避潜伏期明显增加($P < 0.01$); 与模型组相比, BYHWT 高、中剂量组小鼠的逃避潜伏期明显减少($P < 0.01$); 且 BYHWT 高剂量组与多奈哌齐组比较没有明显差异。见表 1。

表 1 补阳还五汤对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠定位航行实验中逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Buyang Huanwutang on escape latency in APP/PS1 double transgenic AD model mice during localized navigation experiments($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
空白	-	43.626 ± 0.857	35.960 ± 1.590	28.896 ± 2.591	23.740 ± 0.918
模型	-	69.186 ± 2.152 ²⁾	63.703 ± 1.154 ²⁾	53.690 ± 1.552 ²⁾	44.903 ± 2.500 ²⁾
多奈哌齐	0.001	46.280 ± 2.580 ⁴⁾	3.460 ± 3.020 ⁴⁾	33.903 ± 1.600 ⁴⁾	25.576 ± 0.929 ⁴⁾
BYHWT	37.06	47.603 ± 1.552 ⁴⁾	40.946 ± 2.471 ⁴⁾	34.316 ± 1.757 ⁴⁾	27.153 ± 1.614 ⁴⁾
	18.53	54.593 ± 2.075 ^{4,6)}	47.920 ± 1.323 ^{4,6)}	39.506 ± 2.352 ^{4,6)}	33.633 ± 1.976 ^{4,6)}
	9.26	70.356 ± 2.776 ⁶⁾	62.453 ± 2.412 ⁶⁾	52.050 ± 1.612 ⁶⁾	42.530 ± 2.676 ⁶⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与多奈哌齐组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

在空间探索实验中, 与空白组比较, 模型组小鼠的平台穿越次数和靶象限停留时间明显减少($P < 0.01$); 与模型组比较, BYHWT 高、中剂量组小鼠的平台穿越次数和靶象限停留时间明显增加($P < 0.01$); 且 BYHWT 高剂量组与多奈哌齐组比较没有明显差异。见表 2。

3.2 补阳还五汤对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠

海马组织 Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达的影响 与空白组比较, 模型组海马组织中凋亡因子 Bcl-2 明显减少($P < 0.01$), Bax 和 Caspase-3 明显增加($P < 0.01$); 与模型组比较, BYHWT 高、中剂量组海马组织中凋亡因子 Bcl-2 明显增加($P < 0.01$), Bax 和 Caspase-3 明显减少($P < 0.01$); 且 BYHWT 高剂量组与多奈哌齐组没有明显差异。见图 1, 表 3。

表 2 补阳还五汤对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠空间探索实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Buyang Huanwutang on space exploration experiment of APP/PS1 double transgenic AD model mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	平台穿越数/次	靶象限停留时间/s
空白	-	2.430 ± 0.175	35.436 ± 0.760
模型	-	0.760 ± 0.110 ²⁾	19.183 ± 1.722 ²⁾
多奈哌齐	0.001	2.326 ± 0.090 ⁴⁾	34.213 ± 1.798 ⁴⁾
BYHWT	37.06	2.366 ± 0.095 ⁴⁾	33.110 ± 1.578 ⁴⁾
	18.53	1.660 ± 0.105 ^{4,6)}	27.443 ± 0.896 ^{4,6)}
	9.26	0.706 ± 0.130 ⁶⁾	21.253 ± 2.083 ⁶⁾

表 3 补阳还五汤对 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马组织 Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白相对表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Buyang Huanwutang to expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in APP/PS1 double transgenic mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

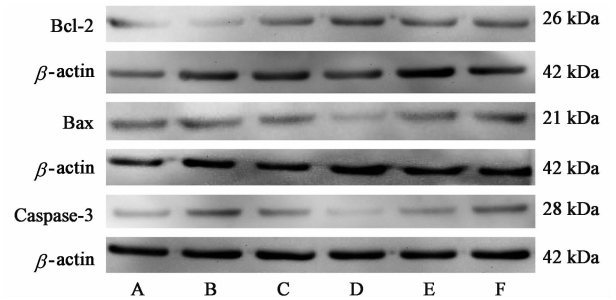
组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin	Caspase-3/ β -actin
空白	-	0.630 ± 0.012	0.576 ± 0.019	0.674 ± 0.020
模型	-	0.476 ± 0.007 ²⁾	0.751 ± 0.091 ²⁾	0.854 ± 0.008 ²⁾
多奈哌齐	0.001	0.616 ± 0.010 ⁴⁾	0.595 ± 0.012 ⁴⁾	0.695 ± 0.008 ⁴⁾
BYHWT	37.06	0.602 ± 0.012 ⁴⁾	0.604 ± 0.007 ⁴⁾	0.706 ± 0.008 ⁴⁾
	18.53	0.545 ± 0.009 ^{4,6)}	0.669 ± 0.014 ^{4,6)}	0.741 ± 0.007 ^{4,6)}
	9.26	0.485 ± 0.008 ⁶⁾	0.743 ± 0.004 ⁶⁾	0.843 ± 0.010 ⁶⁾

4 讨论

AD 的发病机制复杂,关于 AD 的发病假说主要有 A β 沉积, Tau 蛋白过度磷酸化及神经元凋亡等^[8]。本研究主要从神经细胞凋亡角度,研究补气活血中药补阳还五汤对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠的神经保护作用。

从 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠的行为学测试结果可知,补阳还五汤能够明显改善 AD 模型小鼠的学习记忆能力,补阳还五汤是通过什么的调节来提高 AD 模型小鼠的学习记忆能力的呢?

近年来有研究表明,细胞凋亡参与中枢神经系统的退行性病变^[9]。神经细胞的凋亡受多种因素的调控,如氧化应激,炎症反应, A β 过度沉积和 Tau 的过度磷酸化等^[10]。而对神经细胞凋亡起直接调控作用的是凋亡因子, Bcl-2 和 Caspase-3 家族是凋亡家族中的主要家族^[11-12]。研究表明,大鼠脑原代皮质神经元培养物中 Bcl-2 过表达能够产生抑制神经元凋亡的作用, Bax 为促凋亡因子,能够拮抗 Bcl-2 的抗凋亡作用,引发神经细胞凋亡^[13]。且通过抑制 Bax 的作用,能够明显降低 A β 诱导的神经细胞凋亡。本研究发现,补阳还五汤能够通过调节 APP/



A. 空白组; B. 模型组; C. 多奈哌齐组; D ~ F. BYHWT 高、中、低剂量组

图 1 补阳还五汤对 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马组织 Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达电泳

Fig. 1 Effect of Buyang Huanwutang to expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in APP/PS1 double transgenic mice

PS1 双转基因 AD 模型小鼠海马组织中 Bcl-2 和 Bax 的比值表达,可能以此减少海马组织中神经细胞的凋亡,发挥神经保护作用。

Caspase 家族在神经细胞凋亡过程中也发挥着重要作用,其中在凋亡过程中起关键作用的是 Caspase-3,它在凋亡信号转导的多种途径中发挥作用^[14]。研究表明, Caspase-3 的活化是痴呆大鼠脑匀浆中细胞凋亡的最终介质,它会导致 AD 模型大鼠的神经元丢失^[15]。本研究发现,补阳还五汤可以明显降低 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠海马组织中 Caspase-3 的表达,并可能通过此途径降低海马神经细胞的凋亡,发挥神经保护作用。

综上所述,中药补阳还五汤可以有效调节 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠海马组织中凋亡因子的表达,并可能通过此途径,减少海马神经细胞的凋亡,发挥神经保护作用,提高 AD 模型小鼠的学习记忆能力。由此可以指导临床上对于 AD 的治疗,可以从抑制神经元的异常凋亡着手。

[参考文献]

[1] 马晓玮, 李金泽, 张天泰, 等. 非甾体抗炎药抗阿尔茨

- 海默病神经炎症的研究进展[J]. 药学报, 2014, 49(9):1211-1217.
- [2] 李梦秋, 张文武, 陈涛, 等. 阿尔茨海默病药物治疗临床证据评价[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2014, 14(3):192-197.
- [3] 应侠, 吴振, 雷严, 等. 阿尔茨海默病的发病机制及治疗药物研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(33):3152-3155.
- [4] 周赛男, 蔺晓源, 易健, 等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠神经功能及细胞形态的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2):251-254.
- [5] 饶晓, 汤轶波, 潘彦舒, 等. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血损伤血脑屏障的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(6):49-52.
- [6] 孟艳, 王蓉, 刘梦霞, 等. 阿尔茨海默病患者脑神经元凋亡机制中相关因素的研究[J]. 中华老年医学杂志, 2006, 25(4):245-247.
- [7] 矫树生. 依达拉奉对阿尔茨海默病的防治作用及其机制研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2015.
- [8] 张静爽, 王蓉. 阿尔茨海默病发生机制的研究进展[J]. 首都医科大学学报, 2014, 35(6):721-724.
- [9] 吴文宝, 孔庆宏, 阚祥绪, 等. 凋亡通路及 Caspases 在阿尔茨海默病中作为治疗靶点的研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(11):1496-1501.
- [10] Rik O Y, Pijnenburg A L, Perry D C, et al. The behavioural/dysexecutive variant of Alzheimer's disease: clinical, neuroimaging and pathological features [J]. Brain, 2015, 138(9):2732-2749.
- [11] 陈博, 师蔚, 郭晓敏. 脑血疏对脑出血大鼠海马神经细胞凋亡因子表达影响研究[J]. 现代中药研究与实践, 2017, 31(1):31-34.
- [12] 柳成刚, 姜元辉, 石栏. 针刺百会、腰奇穴对癫痫大鼠血清 IL-1 β 、IL-6 表达及海马神经元凋亡因子的影响[J]. 针灸临床杂志, 2016, 32(6):78-81.
- [13] 陶陶, 周建, 徐坚, 等. 天麻对大鼠大脑皮质神经细胞缺氧后超微结构及 Bax 和 Bcl-2 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(4):946-951.
- [14] 刘敬霞, 李建生, 俞维, 等. 星蒺承气汤和补阳还五汤对脑缺血大鼠细胞凋亡 Fas/FasL 和 Caspase-3 调控的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23):187-191.
- [15] 李琴, 郭云良, 李震, 等. 胡黄连苷 II 对大鼠脑缺血/再灌注损伤 Caspase-3 和 PARP 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(3):342-345.

[责任编辑 邹晓翠]