

· 经典名方 ·

大补元煎通过上调BDNF/TrkB/CREB信号通路改善APP/PS1双转基因痴呆小鼠海马突触可塑性

何丽玲¹, 龙清华¹, 胡慧², 王平¹, 石和元^{1*}

(1. 湖北中医药大学基础医学院, 武汉 430065; 2. 湖北中医药大学护理学院, 武汉 430065)

[摘要] 目的:观察大补元煎对APP/PS1痴呆小鼠海马突触可塑性及脑源性神经营养因子(BDNF)/酪氨酸蛋白激酶受体B(TrkB)/环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)信号通路的作用,并探讨其改善突触可塑性的可能机制。方法:将APP/PS1小鼠36只分为模型组、多奈哌齐组($6.5 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和大补元煎组($13.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),野生鼠12只设为正常组,正常组和模型组给予等体积生理盐水,各组连续灌胃30 d。应用Morris水迷宫检测各组小鼠的学习记忆能力,应用尼氏染色和高尔基染色观察海马区神经元和突触的病理形态变化,应用免疫荧光(IF)观察海马突触后致密蛋白95(PSD95)及突触素(SYN)的蛋白表达水平,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马中BDNF, TrkB, CREB及磷酸化CREB(p-CREB)的蛋白表达水平。结果:与空白组比较,模型组小鼠平台潜伏期和游泳总路程增加($P < 0.01$),穿越平台次数和目标象限停留时间减少($P < 0.01$),小鼠海马CA3区神经元胞内尼氏体减少或消失,小鼠海马CA3区神经元及树突分支数量、树突棘密度减少($P < 0.01$),小鼠海马SYN, PSD95, BDNF, TrkB及p-CREB的蛋白表达水平减少($P < 0.01$)。与模型组比较,多奈哌齐组和大补元煎组小鼠平台潜伏期和游泳总路程减少($P < 0.05, P < 0.01$),穿越平台次数和目标象限停留时间增加($P < 0.05, P < 0.01$),小鼠海马CA3区神经元胞内尼氏体数量增多,小鼠海马CA3区神经元及树突分支数量,树突棘密度增加($P < 0.05, P < 0.01$),小鼠海马SYN, PSD95, BDNF, TrkB及p-CREB的蛋白表达水平增加($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:大补元煎改善APP/PS1双转基因小鼠突触可塑性的机制可能与其上调小鼠海马中BDNF/TrkB/CREB信号通路有关。

[关键词] 大补元煎; 阿尔茨海默病; 学习记忆能力; 突触可塑性; 脑源性神经营养因子(BDNF)/酪氨酸蛋白激酶受体B(TrkB)/环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)信号通路; 机制

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2020)21-0001-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201863

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200727.1001.001.html>

[网络出版日期] 2020-7-27 11:58

Dabuyuan Jian Improves Hippocampal Synaptic Plasticity of APP/PS1 Double Transgenic Mice by Regulating BDNF/TrkB/CREB Signal Pathway

HE Li-ling¹, LONG Qing-hua¹, HU Hui², WANG Ping¹, SHI He-yuan^{1*}

(1. School of Basic Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. School of Nursing, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Dabuyuan Jian on the synaptic plasticity of hippocampus and the brain derived neurotrophic factor (BDNF)/tyrosine kinase receptor (TrkB)/cyclic adenosine phosphate reactive element binding protein (CREB) signaling pathway in amyloid precursor protein/presenilin1 (APP/PS1) mice, and to explore its possible mechanism for improving synaptic plasticity. **Method:** Totally 36 APP/PS1 mice were divided into model group, donepezil group ($6.5 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and Dabuyuan Jian group ($13.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and another wild mice were set as control group. The mice in control group and

[收稿日期] 20200301(003)

[基金项目] 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2019YFC1708502)

[第一作者] 何丽玲,在读博士,从事中医药防治老年病研究, E-mail: 642755743@qq.com

[通信作者] * 石和元,博士,副教授,硕士生导师,从事中医衰老理论及老年病证治疗规律研究, E-mail: 84037493@qq.com

model group received an equal volume of saline, and the mice in each group received drugs by gavage for 30 days. The learning ability and memory of mice in each group were detected by Morris water maze. The pathological changes of neurons and synapses in the hippocampus of each group were observed by Nissl staining and Golgi staining. The expression levels of postsynaptic density protein 95 (PSD95) and synaptophysin (SYN) in hippocampus of each group were detected by immunofluorescence (IF). The protein expression levels of BDNF, TrkB, CREB and phosphorylated CREB (p-CREB) in hippocampus were detected by Western blot. **Result:** As compared with the control group, the platform latency and total swimming distance of the model group were increased in the model group ($P<0.01$), with decreased times of crossing the platform and staying time in the target quadrant ($P<0.01$), the intracellular Nissl bodies of neurons in hippocampal CA3 area decreased or disappeared in model group, with decreased number of neurons and dendritic branches and decreased density of dendritic spine in hippocampal CA3 area of the mice ($P<0.01$), and the protein expression levels of SYN, PSD95, BDNF, TrkB and p-CREB in hippocampus of mice were also decreased in model group ($P<0.05$, $P<0.01$). As compared with the model group, the platform latency and total swimming distance were decreased in the donepezil group and Dabuyuan Jian group ($P<0.05$, $P<0.01$), with increased times of crossing platform and staying time in target quadrant ($P<0.05$, $P<0.01$), the number of Nissl bodies of neurons in hippocampal CA3 area was increased in the donepezil group and Dabuyuan Jian group, with increased number of neurons and dendritic branches and increased density of dendritic spine in hippocampal CA3 area of the mice, and the protein expression levels of SYN, PSD95, BDNF, TrkB and p-CREB in hippocampus of mice were increased in the donepezil group and Dabuyuan Jian group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Dabuyuan Jian can improve the synaptic plasticity of APP/PS1 double transgenic mice, and its mechanism may be related to its up-regulation of BDNF/TrkB/CREB signal pathway in mouse hippocampus.

[Key words] Dabuyuan Jian; Alzheimer's disease; learning memory; synaptic plasticity; BDNF/TrkB/CREB signaling pathway; mechanism

随着全球人口老龄化的加剧,阿尔茨海默病(AD)等老年疾病患病率迅速增加,据统计2018年全球AD患者人数已突破5 000万人,即全球每3 s就产生1例AD患者^[1]。目前AD尚无有效治疗药物,但近年来研究者发现中医药防治AD具有多层次、多系统和整体调节的特点,且发现中医药主要是通过调节脑内 $A\beta$, Tau蛋白含量,抑制神经炎症,改善神经营养水平,促进神经再生和调节突触可塑性等途径改善AD认知功能障碍^[2-5]。近年来中药改善AD海马突触可塑性得到广泛认可,其中脑内神经营养关键信号通路脑源性神经营养因子(BDNF)/酪氨酸蛋白激酶受体B(TrkB)/环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)信号通路为其重要机制^[6]。中医学多将AD归为“健忘”“痴呆”和“呆证”等范畴,其发病主要与元气亏虚有关,因此培元固本为其重要治法^[7]。大补元煎源自《景岳全书·新方八阵》,由人参片、山药、熟地黄、杜仲、当归、山茱萸、枸杞子和炙甘草组成,被张景岳列为“补阵”第一方,为培元固本治法的代表方^[8]。前期研究发现大补元煎干预AD也具有多层次、多系统和整体调

节的特点,且主要通过抑制 $A\beta$ 生成和沉积、减轻 $A\beta$ 毒性及促进海马神经发生等途径改善APP/PS1双转基因痴呆小鼠的学习记忆力,但尚不确定其是否可通过调节BDNF/TrkB/CREB信号通路改善APP/PS1痴呆小鼠的突触可塑性^[9]。为进一步阐明大补元煎干预AD的作用靶点,本实验以APP/PS1痴呆小鼠作为AD模型小鼠,在给予模型小鼠大补元煎的基础上通过尼氏染色和高尔基染色观察其对小鼠海马突触可塑性的作用,同时应用免疫荧光检测小鼠海马突触素(SYN)和突触后致密蛋白95(PSD95)的蛋白表达水平,并利用蛋白免疫印迹法(Western bolt)检测海马中BDNF, TrkB, CREB及p-CREB的蛋白表达水平以明确大补元煎对APP/PS1痴呆小鼠海马突触可塑性的作用及作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性5月龄APP/PS1双转基因痴呆小鼠,36只,SPF级雄性5月龄正常小鼠,12只,二者均为B6/JNju-Tg/Nju品系和APP/PSN基因型小鼠,购自南京大学南京生物医药研究院,合格证号SCXK(苏)2015-0001。动物饲养于湖北中医药大

学老年医学研究所动物房,动物房相对温度控制为22~25℃,相对湿度控制为50%~60%,小鼠可自由摄食和饮水。本实验获得湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准,并严格执行《实验动物管理条例》。

1.2 药品及试剂 根据前期研究确定大补元煎药物剂量,即由人参片6g,山药6g,熟地黄9g,杜仲6g,当归9g,山茱萸3g,枸杞子9g和炙甘草6g组成^[10]。中药饮片购自湖北中医药大学黄家湖医院中药房,并经湖北中医药大学药学院游秋云教授鉴定符合药用标准。采用纯水煎煮药物2次,并最终制成含生药0.66g·mL⁻¹的水煎液,置4℃冰箱备用。盐酸多奈哌齐片(卫材(中国)药业有限公司,批号1706065);尼氏染色液、高尔基染色液(武汉Servicebio公司,批号分别为GP1043,G1069);突触素(SYN)兔抗鼠抗体(英国Abcam公司,批号ab32127);突触后致密蛋白95(PSD95)兔抗鼠抗体,脑源性神经营养因子(BDNF)兔抗鼠抗体,酪氨酸蛋白激酶受体B(TrkB)兔抗鼠抗体,环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)及其磷酸化兔抗鼠抗体(武汉Abclonal公司,批号分别为A10841,A1307,A2099,A10826,AP0019);内参β-肌动蛋白(β-actin),异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G荧光二抗,山羊抗小鼠IgG二抗(武汉Servicebio公司,批号分别为GB11001,GB22301,G1214)。

1.3 仪器 ZH-Morris型水迷宫(安徽正华公司);JM3-320A型多级闪蒸器(河南金鼎科技发展有限公司);YD-6D型组织包埋机和YD-335Ⅲ型组织切片机(金华市益迪医疗设备有限公司);CM3050S型冰冻切片机(德国Leica公司);CKX53型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);DYCZ-40K型电泳仪,DYCZ-24D型电泳槽,WD-9413C型凝胶成像分析系统(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 动物分组 将5月龄APP/PS1双转基因痴呆小鼠适应性饲养1周后随机分为模型组、多奈哌齐组和大补元煎组,每组12只。将5月龄正常小鼠设为正常组,12只。

2.2 动物给药 分组完成后开始给药,其中多奈哌齐组按0.65mg·kg⁻¹的剂量灌胃盐酸多奈哌齐片制成的药液,大补元煎组按13.2g·kg⁻¹的剂量灌胃大补元煎制成的水煎液,正常组和模型组按20mL·kg⁻¹的剂量灌胃纯水,各组给药容积均为

20mL·kg⁻¹,各组每日灌胃1次,连续给药30d。

2.3 指标检测

2.3.1 Morris水迷宫实验 灌胃结束后进行Morris水迷宫实验,共进行定位航行实验和空间探查实验,分别采用上平台潜伏期和穿越平台次数评价小鼠的学习能力和记忆能力。

2.3.2 尼氏染色观察小鼠海马病理形态变化

Morris水迷宫实验完成后,从每组小鼠中随机选取4只小鼠进行尼氏染色。先以3%水合氯醛溶液经腹腔注射麻醉(10mL·kg⁻¹)小鼠,麻醉后用眼科手术剪剪开胸腔,以4%多聚甲醛溶液经左心室灌注,待心肝发白后端头取脑,置4%多聚甲醛溶液固定24h后进行尼氏染色。取出脑组织进行石蜡包埋和切片,并使用二甲苯和梯度乙醇对切片进行脱蜡至水,蒸馏水冲洗后使用尼氏染色液染色10min,再次使用梯度乙醇和二甲苯脱水和透明,中性树脂胶封片。显微镜下观察切片,选取相同部位和相同视野的切片进行拍照,并用图像分析软件Image Pro Plus 6.0进行图像处理,计算各切片神经元数量以进行统计分析。

2.3.3 高尔基染色观察小鼠海马神经元树突分支及树突棘密度 从每组小鼠随机选取4只小鼠进行高尔基染色,不麻醉直接端头取脑,置4%多聚甲醛溶液固定24h。固定24h后将脑组织置高尔基染色液避光染色14d,浸泡48h后转移至新的高尔基染色液,之后每3d更换1次液体;取出脑组织,置15%蔗糖溶液中4℃避光脱水1d,取出脑组织并置30%蔗糖溶液中4℃避光脱水2d;取出脑组织,依次使用蒸馏水洗1min,浓氨水处理45min,蒸馏水洗1min,定影液处理45min和蒸馏水洗1min,并将脑组织置于30%蔗糖溶液中4℃避光脱水3d;脱水后使用冰冻切片机切取100μm厚度的切片,甘油明胶封片。油镜下观察切片,选取相同部位和相同视野的切片进行拍照,并用图像分析软件Image J进行图像处理,计算各切片树突分支及树突棘密度。

2.3.4 免疫荧光检测海马中SYN, PSD95蛋白表达水平 取上述尼氏染色石蜡包埋的脑组织进行免疫荧光实验。使用二甲苯和梯度乙醇对切片进行脱蜡至水,并用5%BSA封闭修复2h;磷酸盐缓冲液(PBS)洗片,向切片表面均匀滴加稀释后的一抗SYN(1:200)和一抗PSD95(1:200),置4℃冰箱孵育过夜;PBS洗片,向切片表面均匀滴加稀释后的荧光二抗(1:200),室温避光孵育1h;PBS洗片,向切片表面均匀滴加DAPI染色液复染细胞核,于室温

避光孵育 10 min。使用 PBS 洗片,向切片滴加抗荧光淬灭封片剂后封片。荧光倒置显微镜下观察切片,选取同部位和相同视野切片进行拍照。

2.3.5 Western bolt 检测海马中 BDNF, TrkB, CREB, p-CREB 蛋白表达水平 取海马 30 mg,置 1.5 mL 离心管,加 RIAP 裂解液 1.5 mL,匀浆后取上清液。将蛋白置 100 °C 沸水中煮沸 15 min,并用 BCA 蛋白试剂盒检测样本蛋白浓度;配置 10% SDS-PAGE 凝胶,每孔依次上样 40 μg 后依次电泳和转膜;将 PVDF 膜置 TBST 室温封闭 1 h,洗膜后将膜置于 BDNF(1:1 000),TrkB(1:1 000),CREB(1:1 000),p-CREB(1:1 000) 抗体稀释液中,并置 4 °C 冰箱孵育过夜;洗膜后将 PVDF 膜置稀释后的二抗(1:1 万),室温孵育 1 h;向膜上滴加适量 ECL 显色液,置凝胶成像仪曝光各组条带值;应用 Image J 计算各条带灰度值。

2.4 统计学方法 采用统计软件 SPSS 19.0 分析和处理所采集数据,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对痴呆小鼠学习记忆力的影响 与正常组比较,模型组小鼠平台潜伏期和游泳总路程显著增加 ($P < 0.01$),穿越平台次数和目标象限停留时间显著减少 ($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组和大补元煎组小鼠平台潜伏期和游泳总路程明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$),穿越平台次数和目标象限停留时间明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1,2。

表 1 大补元煎对痴呆小鼠定位航线实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 1 Effect of Dabuyuan Jian on navigation test in dementia mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	平台潜伏期/s	游泳总路程/cm
正常	-	14.03±5.21	229.51±33.46
模型	-	29.17±5.04 ¹⁾	377.34±42.04 ¹⁾
多奈哌齐	6.5×10 ⁻⁴	23.33±3.82 ³⁾	331.21±32.16 ²⁾
大补元煎	13.2	21.01±3.26 ²⁾	335.47±26.04 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

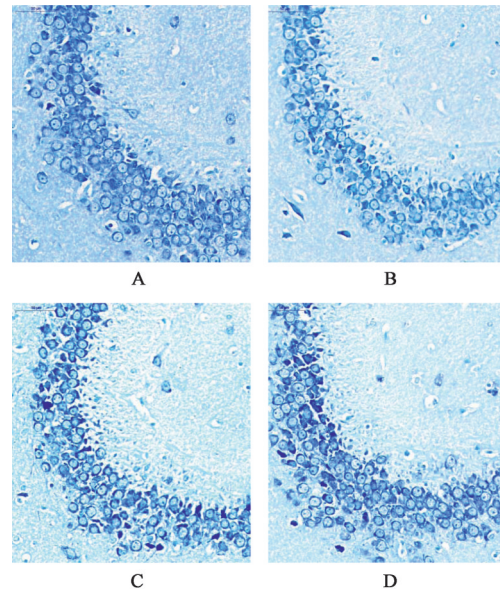
3.2 对痴呆小鼠海马病理形态的影响 正常组小鼠海马 CA3 区神经元层次清晰,排列紧密和整齐,未有明显的细胞丢失。神经元胞内尼氏体染色清晰,且数量较多。模型组小鼠海马 CA3 区神经元层次减少,排列疏松且有明显的细胞丢失,部分神经元胞内尼氏体减少或消失。多奈哌齐组和大补元

表 2 大补元煎对痴呆小鼠空间探查实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 2 Effect of Dabuyuan Jian on spatial exploration test in dementia mice ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	穿越平台数/次	目标象限时间/s
正常	-	9.11±2.47	17.21±3.68
模型	-	3.94±2.13 ¹⁾	8.26±4.11 ¹⁾
多奈哌齐	6.5×10 ⁻⁴	7.06±3.62 ²⁾	13.08±3.12 ³⁾
大补元煎	13.2	7.74±3.26 ²⁾	14.81±3.09 ²⁾

煎组小鼠海马 CA3 区神经元层次增多,细胞排列较紧凑,神经元及胞内尼氏体数量增多,见图 1。与正常组比较,模型组小鼠海马 CA3 区神经元数量显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组和大补元煎组小鼠海马 CA3 区神经元数量均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。



A. 正常组;B. 模型组;C. 多奈哌齐组;D. 大补元煎组(图 2~6 同)

图 1 大补元煎对痴呆小鼠海马 CA3 区病理形态的影响(尼氏染色,×400)

Fig. 1 Effect of Dabuyuan Jian on pathological morphology of CA3 region in hippocampus of dementia mice (Nissl staining, ×400)

表 3 大补元煎对痴呆小鼠海马 CA3 区神经元数目的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3 Effect of Dabuyuan Jian on number of neurons in CA3 region in hippocampus of dementia mice ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	神经元数目/个
正常	-	84.11±11.31
模型	-	57.69±15.11 ¹⁾
多奈哌齐	6.5×10 ⁻⁴	77.87±18.81 ³⁾
大补元煎	13.2	72.29±14.31 ²⁾

3.3 对痴呆小鼠海马神经元树突分支及树突棘密度的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马 CA3 区

神经元树突分支数量及树突棘密度显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组和大补元煎组小鼠海马CA3区神经元树突分支数量及树突棘密度均明显增加($P < 0.05, P < 0.01$)。见图2,3和表4。

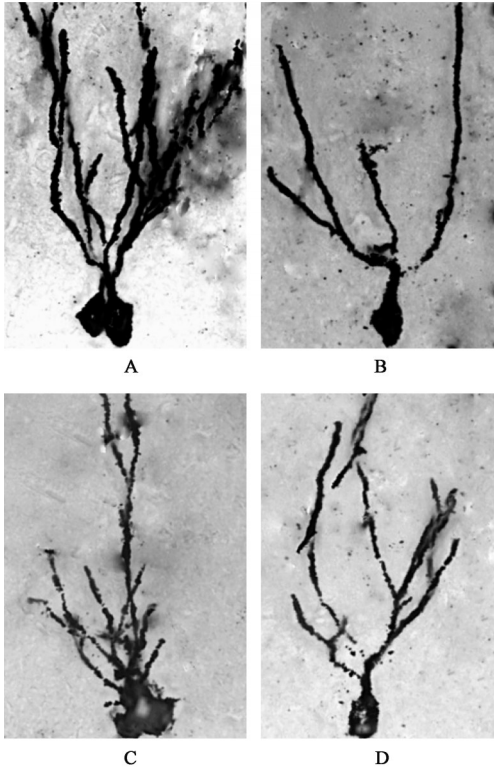


图2 大补元煎对痴呆小鼠海马CA3区树突分支的影响(高尔基染色,×600)

Fig. 2 Effect of Dabuyuan Jian on dendritic branches in CA3 region in hippocampus of dementia mice (Golgi, ×600)

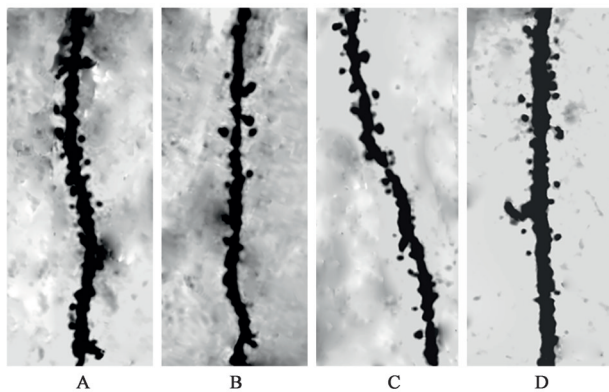


图3 大补元煎对痴呆小鼠海马CA3区树突棘密度的影响(高尔基染色,×1 000)

Fig. 3 Effect of Dabuyuan Jian on dendritic spine density in CA3 region in hippocampus of dementia mice (Golgi, ×1 000)

3.4 对痴呆小鼠SYN, PSD95标记荧光蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马CA3区中SYN, PSD95的蛋白表达量降低;与模型组比较,多奈哌齐组和大补元煎组小鼠海马CA3区中SYN,

表4 大补元煎对痴呆小鼠海马CA3区神经元树突分支及树突棘密度的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 4 Effect of Dabuyuan Jian on dendritic branches and dendritic spine density in CA3 region in hippocampus of dementia mice ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	树突分支/个	树突棘密度(个/10 μm)
正常	-	5.64±0.89	8.11±2.38
模型	-	3.86±0.96 ¹⁾	4.27±2.78 ¹⁾
多奈哌齐	6.5×10 ⁻⁴	4.78±0.92 ³⁾	6.51±1.92 ²⁾
大补元煎	13.2	5.12±1.06 ²⁾	6.34±1.68 ²⁾

PSD95的蛋白表达量有所增加。见图4,5。

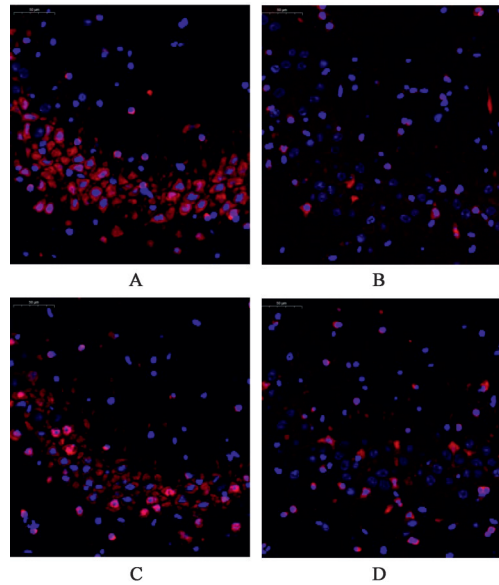


图4 大补元煎对痴呆小鼠海马CA3区SYN蛋白表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 4 Effect of Dabuyuan Jian on SYN expression in CA3 region in hippocampus of dementia mice (IF, ×400)

3.5 对痴呆小鼠BDNF, TrkB, CREB, p-CREB蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马中BDNF, TrkB, CREB, p-CREB的蛋白表达量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组和大补元煎组小鼠海马区中BDNF, TrkB, CREB, p-CREB的蛋白表达量明显升高($P < 0.01, P < 0.05$)。见图6,表5。

4 讨论

元气由肾中精气所化,为一身气之本,亦为“康复之气”和“向愈之气”。元气贯穿于生、长、壮、已各个生命周期,人至老年,肾精渐衰,元气化生不足,则致使机体出现衰老之象^[11]。因此,有效地延缓元气衰退则可延年益寿。《本草纲目·木部·辛夷》言“脑为元神之府”,脑部功能以元神为用,但元神又以元气为物质基础,因此元气亏虚可致元神失

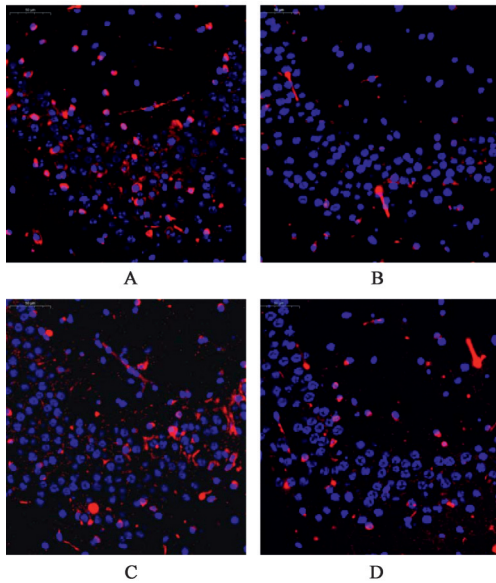


图5 大补元煎对痴呆小鼠海马CA3区PSD95蛋白表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 5 Effect of Dabuyuan Jian on PSD95 expression in CA3 region in hippocampus of dementia mice (IF, ×400)

养,进而导致健忘、失眠、眩晕等脑病^[12],正如《类证

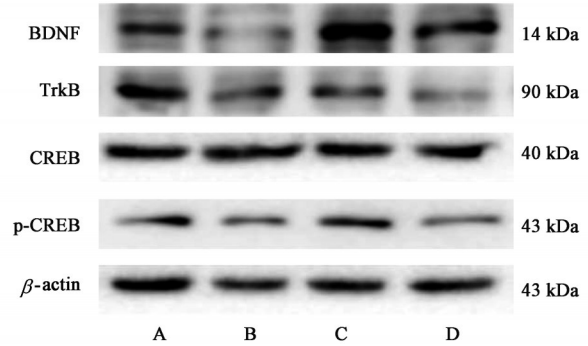


图6 小鼠海马BDNF,TrkB,CREB,p-CREB蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of BDNF, TrkB, CREB and p-CREB protein expression in hippocampus of mice

治裁》^[13]所言:“人之神宅于心,心之精依于肾,而脑为元神之府,精髓之海,实记性所凭也。”同时,元气又为后天脾胃所养,健脾益气则有助于化生元气,因此中医学对元气亏虚的治疗多着眼于调补脾肾二脏。大补元煎为培元固本治法的代表方,张景岳称其为“回天赞化、救本培元”第一要方^[14]。方中人参培元固本、大补气血,为君药。熟地黄、山茱萸补肾填精,山药健脾以养先天,共为臣药,当归补血生

表5 大补元煎对痴呆小鼠海马对BDNF,TrkB,CREB,p-CREB蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 5 Effect of Dabuyuan Jian on experssion of BDNF, TrkB, CREB, p-CREB protein in hippocampus of dementia mice ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BDNF/ β -actin	TrkB/ β -actin	CREB/ β -actin	CREB/ β -actin
正常	-	0.57±0.12	0.61±0.11	0.66±0.10	0.55±0.13
模型	-	0.34±0.11 ¹⁾	0.39±0.12 ¹⁾	0.71±0.12	0.33±0.12 ¹⁾
多奈哌齐	6.5×10 ⁻⁴	0.82±0.15 ³⁾	0.53±0.10 ³⁾	0.68±0.11	0.59±0.14 ³⁾
大补元煎	13.2	0.64±0.21 ²⁾	0.49±0.09 ²⁾	0.64±0.08	0.48±0.11 ²⁾

精、枸杞子和杜仲补肾填精,共为佐药。炙甘草调和诸药,为使药。全方共凑培元固本、大补气血之功。本研究发现,给予模型动物大补元煎后,小鼠上平台潜伏期减少和穿越平台次数增加,这说明大补元煎可以改善APP/PS1双转基因痴呆小鼠的学习记忆力。

突触是神经元之间相互连接的“桥梁”,亦是神经网络发挥生理功能的基础,神经元突触的形态结构及其联系强度是学习记忆的物质基础,因此神经元突触的增强或减弱则可引起学习记忆的增强或减弱^[15]。突触可塑性是指神经元之间的突触可随着神经元的活性的改变而改变,主要包括突触功能的可塑性和突触结构的可塑性^[16]。神经元-突触丢失为AD典型的病理特征,神经元突触丢失或损伤可引起突触可塑性的改变,因此有效地抑制神经元-突触丢失则有助于改善神经元突触的可塑性^[17]。神经元数量,神经元树突分支及树突棘密度都是衡

量突触可塑性的重要依据^[18]。本研究发现,给予模型动物大补元煎后,APP/PS1双转基因痴呆小鼠海马CA3区神经元丢失减轻,同时神经元树突分支和树突棘密度均有增加,这说明大补元煎具有增强APP/PS1双转基因痴呆小鼠海马突触可塑性的作用。

神经递质为神经信号传递的关键性物质,突触前神经元释放的谷氨酸可以与突触后谷氨酸受体结合,从而将突触前神经元信号传递至突触后神经元^[16]。SYN是主要存在于突触囊泡膜上的突触前膜囊泡蛋白,可以通过磷酸化调节神经递质的释放,常被作为突触前终末的特异性标记物,并用来表示突触的密度、分布及其数量,可以用来衡量突触结构和功能的可塑性^[17]。PSD95是分布于突触后膜的核心构架蛋白之一,可通过膜受体、离子通道相互作用调节并维持突触的连接,常被作为突触活性的标志性蛋白,因此也可以用来衡量突触可塑性。本研究发现,模型组小鼠海马CA3区中SYNP,

SD95的蛋白表达量降低,这说明APP/PS1双转基因痴呆小鼠的突触功能异常,而给予模型动物大补元煎后,小鼠海马CA3区中SYN, PSD95的蛋白表达量有所增加,这说明大补元煎可以改善APP/PS1双转基因痴呆小鼠的突触功能。

BDNF为脑源性神经营养因子家族的一员,常与其特异性配体TrkB结合后调节神经元分化和生长^[19]。BDNF与TrkB结合后常促进ras-MAPK激活继而促使CREB磷酸化从而发挥各种生理和病理作用,有研究发现AD模型小鼠BDNF/TrkB/CREB信号通路活性明显下降,同时伴有突触可塑性的改变^[20]。本研究发现模型小鼠海马中BDNF/TrkB/CREB信号通路活性明显下降,给与模型小鼠大补元煎后小鼠海马中BDNF/TrkB/CREB信号通路活性明显增加,结合尼氏染色和高尔基染色实验,这表明大补元煎可以通过上调BDNF/TrkB/CREB信号通路而改善突触可塑性。

综合上述分析,大补元煎可改善APP/PS1双转基因痴呆小鼠的调节突触可塑性,其机制可能与其上调BDNF/TrkB/CREB信号通路有关。

[参考文献]

[1] CAO K, XIANG J, DONG Y T, et al. Exposure to fluoride aggravates the impairment in learning and memory and neuropathological lesions in mice carrying the APP/PS1 double-transgenic mutation[J]. *Alzheimers Res Ther*, 2019, 11(1):35-51.

[2] 黄玉环,刘慧,洪芬芳,等. 中药治疗阿尔茨海默病机制的研究进展[J]. *南昌大学学报:医学版*, 2019, 59(1):100-104,106.

[3] 张运辉,杨梦琳,伍大华. 中药单体及其有效成分干预阿尔茨海默病的机制研究进展[J]. *中医药信息*, 2019, 36(3):118-122.

[4] 周笑莉. 中药单体及其有效成分防治阿尔茨海默病的研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(46):99-100.

[5] 侯文书,张力. 中药及其有效成分在治疗阿尔茨海默病作用靶点中的研究进展[J]. *神经药理学报*, 2018, 8(6):31-32.

[6] FANG W, LIAO W, ZHENG Y, et al. Neurotrophin reduces memory impairment and neuroinflammation via BDNF/NF- κ B in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(3):1541-1554.

[7] 潘怡宏. 培元固本法的理论探讨及其对老年性痴呆作用的研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2015.

[8] 郑桃云. 元气虚损证动物模型下丘脑-垂体-甲状腺轴的变化及大补元煎作用机制的探讨[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2018.

[9] 石和元. 中医元气理论与培元固本法治疗老年性痴呆作用的研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2014.

[10] 何丽玲,龙清华,胡慧,等. 基于Wnt/ β -catenin信号通路探讨大补元煎促进APP/PS1双转基因阿尔茨海默病小鼠海马神经发生的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(7):8-14.

[11] 王平,郭岚. 试论元气与养生长寿[J]. *中医杂志*, 2012, 53(8):715-717.

[12] 方丽媛. 培元固本治法的理论探讨及其对肾虚型AD大鼠新生神经元的作用研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2017.

[13] 林珮琴. 类证治裁[M]. 太原:山西科学技术出版社, 2010:154.

[14] 张介宾. 景岳全书[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007:112.

[15] STYR B, SLUTSKY I. Imbalance between firing homeostasis and synaptic plasticity drives early-phase Alzheimer's disease[J]. *Nat Neurosci*, 2018, 21(4):463-473.

[16] YI J H, BAEK S J, HEO S, et al. Direct pharmacological Akt activation rescues Alzheimer's disease like memory impairments and aberrant synaptic plasticity[J]. *Neuropharmacology*, 2017, 128(12):282-292.

[17] QI Y, KLYUBIN I, CLAUDIO CUELLO A, et al. NLRP3-dependent synaptic plasticity deficit in an Alzheimer's disease amyloidosis model *in vivo* [J]. *Neurobiol Dis*, 2018, 114(7):24-30.

[18] ZHANG J H, YU L J, YANG H, et al. Huatuo Zaizao pill ameliorates cognitive impairment of APP/PS1 transgenic mice by improving synaptic plasticity and reducing A β deposition[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1):167-181.

[19] YIN C, DENG Y, LIU Y, et al. Icariside II ameliorates cognitive impairments induced by chronic cerebral hypoperfusion by inhibiting the amyloidogenic pathway: involvement of BDNF/TrkB/CREB signaling and up-regulation of PPAR α and PPAR γ in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9(10):1211-1224.

[20] YOO J M, LEE B D, SOK D E, et al. Neuroprotective action of N-acetyl serotonin in oxidative stress-induced apoptosis through the activation of both TrkB/CREB/BDNF pathway and Akt/Nrf2/Antioxidant enzyme in neuronal cells[J]. *Redox Biol*, 2017, 11(1):592-599.

[责任编辑 周冰冰]