

逍遥散对大鼠阿尔茨海默病模型 前额叶皮质 PP-2A 和 GSK-3 β 的影响

李高申^{1*}, 刘建涛², 赵唯贤², 郭梅珍¹, 李宜培², 王保伟²

(1. 黄河科技学院, 郑州 450006; 2. 河南职工医学院, 郑州 451141)

[摘要] 目的:探讨逍遥散对阿尔茨海默病大鼠模型前额叶皮质相关指标的影响。方法:将清洁级 4~5 个月龄 SD 雄性大鼠随机分为 4 个组,模型组(B 组)、西药组(C 组)、中药组(D 组)分别采用 D-半乳糖腹腔注射和 A- β 1~42peptide 双侧海马注射联合造模[用药剂量:D-半乳糖 10 mL(100 mg·kg⁻¹),每日 1 次,连续注射 42 d;A- β 每侧海马组织 1 次性注射 2 μ L(10 μ g)],生理组(A 组)仅用等体积生理盐水做相同的造模处理。造模完成后,C、D 组每日分别用奥拉西坦溶液 0.75 g·kg⁻¹和逍遥散煎剂 10·g⁻¹ ig 干预,1 次/d,连续 28 d,用药体积均为 5 mL·kg⁻¹;A、B 组采用等体积的生理盐水 ig。ig 结束后,4 个组分别进行 Y 迷宫行为学检测,并对比分析。之后断头剥离前额叶皮质送检。结果:B、C、D 两组与 B 组比较,其尝试次数和行为正确率均占明显优势,差异具有统计学意义(尝试次数 $P < 0.05$;行为正确率 $P < 0.01$);B 组与 A 组比较,尝试次数和行为正确率降低,差异具有统计学意义(尝试次数 $P < 0.05$;行为正确率 $P < 0.01$);降低 C、D 组与 A 组比较差异无统计学意义。免疫组化染色显示,与 B 组比较,C 组和 D 组 PP-2A 阳性细胞数量表达均明显增加,而 GSK-3 β 阳性细胞数量表达均明显减少。结论:逍遥散能改善 AD 大鼠的空间记忆能力,与其能够上调 AD 大鼠前额叶的 PP-2A 的表达、抑制前额叶的 GSK-3 β 的表达有关。

[关键词] 逍遥散; 阿尔茨海默病; 糖原合成酶激酶-3 β ; 蛋白磷酸酶-2A; 前额叶皮质

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0244-04

[doi] 10.11653/syfy2013170244

Effect of Xiaoyao San on Prefrontal Cortex PP-2A and GSK-3 in Alzheimer's Disease Rat Model

LI Gao-shen^{1*}, LIU Jian-tao², ZHAO Wei-xian², GUO Mei-zhen¹, LI Yi-pei², WANG Bao-wei²

(1. Huanghe Science and Technology College, Zhengzhou 450006, China;

2. Henan Medical College for Staff and Workers, Zhengzhou 451141, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of Xiaoyao San on related indexes of the prefrontal cortex in rats model of Alzheimer's disease. **Method:** The male SD rats were randomly divided into 4 groups, model group (group B), western medicine group (C group), Chinese medicine group (D group) respectively by intraperitoneal injection of D-galactose and A- β ₁₋₄₂ peptide bilateral hippocampal injection molding (D-galactose 10 mL (100 mg·kg⁻¹), once a day, continuous injection for 42 d; A- β 2 μ L (10 μ g) once, normal group (group A) was given normal saline. After modeling, C and D groups were given oxiracetam solution and Xiaoyao San ig once for 28 days. **Result:** In C and D groups, compared with B group, the number of attempts and the correct behavior rate is obvious, the difference was statistically significant ($P < 0.05$ and $P < 0.01$); In B group, compared with A group, number of attempts and the correct behavior rate is poor, the difference was statistically significant ($P < 0.05$ and $P < 0.01$); there was no significant difference in C, and D groups compared with A groups. Immunohistochemical staining resultd showed that, compared with B group, C group and D group increased the

[收稿日期] 20130315(020)

[基金项目] 河南省 2012 年度科技计划项目(122102310410);河南省教育厅青年骨干教师资助项目(2011GGJS-220)

[通讯作者] *李高申,硕士,副教授,从事中医学教学与科研工作,Tel:13939069901,E-mail:hhgaoshen@163.com

expression of PP-2A positive cells significantly, while the number of GSK-3 positive cells were significantly reduced. **Conclusion:** Xiaoyao San can improve the spatial memory ability of AD rats, the expression is related to its up-regulating expression of PP-2A and inhibitory prefrontal GSK-3 β .

[**Key words**] Xiaoyao San; Alzheimer's disease; GSK-3 β ; PP-2A; prefrontal cortex

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD),是一种以进行性认知障碍和记忆能力损害为主的中枢神经系统退行性疾病。65岁以上老年人约5%患有AD,至85岁,每3~4位老年人中就有1名罹患者^[1]。预计2025年后全球将有2200万人患上AD,到2050年患此疾病的人数将达4500万^[2]。因此,防治AD疾病将成为当今老年疾病研究领域的最重要前沿课题之一,本研究通过观察逍遥散对AD大鼠模型前额叶皮质相关指标的影响,旨在为AD的治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级4~5个月SD雄性大鼠,体重(250±20)g,购自河南省实验动物中心,许可证号SCXX(豫)2010-0002。

1.2 干预药物

1.2.1 中药制备 逍遥散(柴胡、当归、白芍、茯苓、炙甘草、生姜、薄荷),各药间比例按10:10:10:10:5:1:1配比,由我院科研处严格按照中药煎剂制备流程自行制作。于每日7:00在药物干预治疗前,即时配备。浓缩药液为2g·mL⁻¹,备用。

1.2.2 西药制备 将奥拉西坦药粉(奥拉西坦胶囊,石药集团欧意药业有限公司提供,400mg/粒,批号05110703),每日8:30在药物干预治疗前,用常温蒸馏水稀释成为150g·L⁻¹的奥拉西坦溶液,备用。

1.3 试剂 D-半乳糖(D-gal, Genview公司产品,北京鼎国昌盛生物技术有限公司分装,批号22L10133);A- β_{1-42} peptide(北京博奥森生物技术有限公司提供,批号990901);PP2A-Antibody(abgent,编号AJ1644a);GSK-3 β antibody,(CST,编号9315s);冷冻包埋剂McCormick(USA);TritonX-100 Amresco(USA)。

1.4 仪器 蓝星B型脑立体定位仪2H-(安徽淮北正华生物仪器设备有限公司生产),Y型电迷宫(江苏三兴声电公司),洁净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),Image-pro Plus 5.0图像分析系统。

2 方法

2.1 动物分组 将大鼠适应性喂养3d,光照节律12L:12D(6:00~18:00),室温22~24℃,湿度30%~40%,喂普通鼠用颗粒饲料(河南省实验动

物中心提供),自由饮水。根据水迷宫实验结果,留用成绩最优者作为正式实验用大鼠,并随机分为生理组、模型组、奥拉西坦组、逍遥散组。

2.2 模型制作 采用D-gal ip和A- β 双侧海马注射联合造模^[3-4]。①将D-gal用无菌生理盐水稀释成10g·L⁻¹,B,C,D3组自造模第1天始每天上午9:00~10:00,大鼠ip10mL·kg⁻¹;A组同法ip等体积生理盐水,各组均连续注射6周。②将A- β 用无菌生理盐水事先稀释成5g·L⁻¹,震荡混匀,充分溶解,密封,在37℃温箱孵育1周后变成凝固态,放入4℃冰箱保存备用。自D-gal造模结束的次日,大鼠经6%水合氯醛麻醉(40mL·kg⁻¹),固定于脑立体定位仪上,常规消毒皮肤,以前囟为基准点,将微量注射器针头对准前囟中央,针头后移4mm,再左右各移2mm,分别确定左右侧海马注射点。将头骨刺穿,微量注射器针头进入大脑1.6mm到达海马组织,将孵育好的A- β 溶液分别缓慢注入双侧海马组织以至完全吸收,每侧10 μ g(2 μ L),然后以骨蜡封闭针孔,缝皮,消毒,20万单位青霉素ip以防感染。

2.3 药物干预 各组均自完成联合造模后的次日开始,连续ig干预28d,1次/d,ig体积均为5mL·kg⁻¹。A,B组分别采用生理盐水ig,C,D组分别采用奥拉西坦溶液0.75g·kg⁻¹和逍遥散煎剂10g·kg⁻¹ig。

2.4 Y迷宫检测 在ig干预结束后的次日进行,连续记录3d的观察数据。(1)方法:先将大鼠放入Y型电迷宫中适应3~5min,实验时以无规则次序变换安全区,大鼠受电击逃到安全区后,灯光刺激持续10~15s,熄灯后即完成1次测试,休息30s,然后再以大鼠所在支臂作为下1次测试起点,开始第2次测试,依次重复。每天训练20次,连续训练3d。(2)大鼠在足底通电后10s内1次性跑向安全区为正确反应,否则为错误反应。在连续10次电击中,9次为正确反应(即9/10)则达到学会标准。(3)观察指标:行为正确率(正确反应数占总测试数的百分比^[5-6])、尝试次数(指动物达到学会标准所需要的次数,训练20次后仍未达到学会标准则记录为20次)。

2.5 标本取材 在末次 Y 迷宫检测的次日, 每组随机取出 8 只大鼠, 用 10% 水合氯醛(0.4 mL/100 g) ip, 断头, 超净台内冰上完整剥离鼠脑, 放入 4 °C 的 4% 戊二醛固定液中后固定, 准备切片。

2.6 石蜡切片制备 根据大鼠解剖图谱所示前额叶皮质的定位进行修块、包埋和切片, 控制各组中每个指标的切片平面相近, 每个指标收集每只大鼠的两张脑片。

2.7 免疫组织化学染色程序(ABC 法) 将切片从 4 °C 冰箱中取出, 室温放置 20 min, 在 0.5% Triton X-100 溶液中 37 °C 孵育 10 min。10% 的正常羊血清原液封闭(用 0.5% TritonX-100 溶液稀释)室温轻摇 1 h, 吸掉封闭血清, 加入用 5% 羊血清和 0.5% TritonX-100 混合液稀释的一抗(PP2A 稀释度为 1:200, GSK-3 β 稀释度为 1:150), 室温孵育 3 h。加入生物素标记的二抗(用 5% 羊血清和 0.5% TritonX-100 混合液稀释, 稀释度为 1:500), 室温孵育 1 h; 加入配好的 ABC 反应液(1:100), 室温孵育 2 h。

2.8 数据及图像处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析采用 SPSS 11.5, 4 组间尝试次数及行为正确率的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。选取每批每组冠状切面相似的切片进行照像, 图像在 Image-pro Plus 5.0 图像分析系统进行图像分析。

3 结果

3.1 Y 迷宫行为学检测 模型组与生理组比较, 尝试次数增加和行为正确率降低, 差异具有统计学意义(尝试次数 $P < 0.05$; 行为正确率 $P < 0.01$)。奥拉西坦组和逍遥散组与模型组比较, 其尝试次数和行为正确率均占明显优势, 差异具有统计学意义(尝试次数 $P < 0.05$; 行为正确率 $P < 0.01$)见表 1。

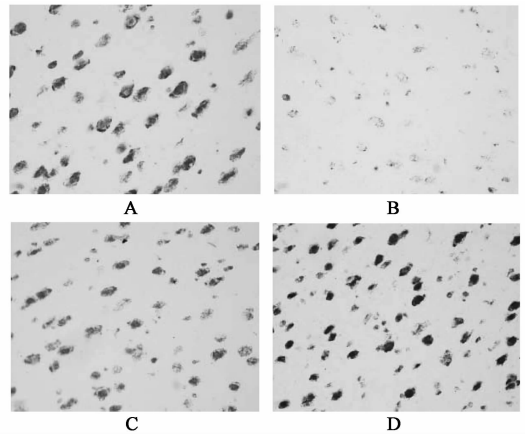
表 1 Y 迷宫行为学检测结果比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	尝试次数 /次	行为正确率 /%
生理	-	34.20 ± 12.01 ¹⁾	92.50 ± 5.89 ²⁾
模型	-	52.20 ± 9.46	74.00 ± 7.75
奥拉西坦	0.75	38.00 ± 17.11 ¹⁾	87.00 ± 4.22 ²⁾
逍遥散	10	32.40 ± 20.25 ¹⁾	90.50 ± 5.50 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 蛋白磷酸酶-2A(PP-2A)和糖原合成酶激酶-3 β 阳性细胞数量表达 在前额叶皮质, 蛋白磷酸酶-2A(PP-2A)和糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)的阳性反应物呈棕黄色颗粒, 主要表达于胞浆和细胞核。

①PP2A: 生理组阳性细胞数量的表达较多; 模型组与生理组比较, 阳性细胞数量减少, 西药组与模型组比较, 阳性细胞数量增加, 中药组与模型组比较, 阳性细胞数量增加明显(见图 1)。②GSK-3 β : 生理组 GSK-3 β 阳性细胞数量表达较少, 模型组与生理组比较, GSK-3 β 阳性细胞数量明显增多, 西药组与模型组比较, GSK-3 β 阳性细胞数量减少, 中药组与模型组比较, GSK-3 β 阳性细胞数量减少明显($P < 0.01$)(见图 2)。



A. 生理组; B. 模型组; C. 奥拉西坦 0.75 g·kg⁻¹组; D. 逍遥散 10 g·kg⁻¹组(图 2 同)

图 1 逍遥散对大鼠阿尔茨海默病前额叶 PP2A 表达的影响

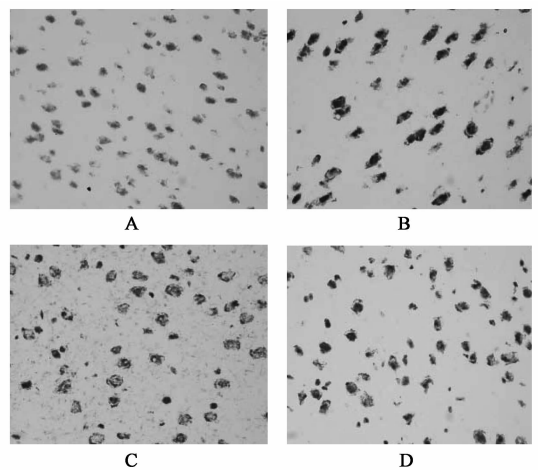


图 2 逍遥散对大鼠阿尔茨海默病前额叶 GSK-3 β 表达的影响

4 讨论

AD 是一种原发性灰质脑病, 以大脑皮质萎缩, 并伴有神经元纤维缠结及老年斑为特点, 起病潜隐, 病程呈进行性发展, 最后导致痴呆。GSK-3 是促使 tau 蛋白磷酸化的重要激酶, GSK-3 在大鼠脑组织中过量表达常导致动物出现 AD 样 tau 过度磷酸化, 引起空间记忆障碍。PP-2A 可调节 GSK-3 的活性, 使 GSK-3Ser9 去磷酸化, 激活 GSK-3^[7]; PP-2A 是促使

tau 蛋白去磷酸化的重要酯酶。磷酸酯酶活性降低,尤其是 PP-2A 活性降低,在 tau 蛋白的异常过度磷酸化中起关键性作用。本研究也证实在 AD 模型大脑的病变区域 PP-2A 的表达和活性均下调。

学习记忆过程涉及多个脑区的功能活动,在人类,前额叶皮质与情绪之间有着密切的关系,临床和神经成像研究结果显示:前额叶皮质损伤对情绪行为会造成一定的影响^[8]。前额叶皮质是大脑新皮质中起重要联络作用的一个区域,参与了学习和记忆的过程^[9]。有学者推测前额叶皮质在前瞻性记忆的编码、保持、提取和执行的过程中可能起着重要的作用^[10]。

本研究发现,逍遥散能改善 AD 大鼠空间学习与记忆能力。运用免疫组化染色技术进行检测,结果显示 PP-2A 在正常的生理对照组中阳性细胞数量的表达较多,而模型组阳性细胞数量的表达明显减少,通过对 AD 模型的药物干预治疗,西药组与中药组阳性细胞数量的表达均增加;相反,GSK-3 β 在正常生理对照组中阳性细胞数量表达较少,而模型组阳性细胞数量的表达明显增加,通过药物的干预,AD 模型 GSK-3 β 阳性细胞数量表达又趋减少。本研究表明,逍遥散能改善 AD 大鼠的空间记忆能力,与其能够上调 AD 大鼠前额叶的 PP-2A 的表达、抑制前额叶的 GSK-3 β 的表达有关。

AD 属中医的“呆病”、“郁证”范畴,中医对其病因有独特的理论认识,认为本病是一种全身性疾病,病位在脑,但与五脏具有关系,其中肾、脾、心、肝四脏关系最为密切。七情失调是本病形成的重要原因,当今社会中如精神创伤,情绪压抑;或独身居住、子女不孝;或离异丧偶、孤独寂寞等都是形成情志失调的重要因素。而肝主疏泄,调畅情志,对情志的调节作用至关重要。早期 AD 常表现为典型的抑郁症状和对日常活动的兴趣丧失。逍遥散是疏肝解郁,健脾和营的重要方剂,现代临床用于郁证的研究多有报道,有学者提出其疏肝健脾功效与抗抑郁的作用有关^[11-13]。本研究从疏肝立法干预 AD 模型,目的在于挖掘传统疏肝解郁方剂对防治 AD 的潜在药效。

AD 的发病率逐年上升,严重危害老年人的身心健康和生活质量,并给家庭和社会带来沉重的负

担,已成为严重的社会问题,应引起政府和医学界的高度关注,加强这方面的研究。

[参考文献]

- [1] 贾建平. 神经病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008:214.
- [2] 蔡如鹏. 世纪顽疾:老年痴呆症[N]. 中国新闻周刊, 2007(1):54.
- [3] 李林,茹立强. D-半乳糖-A β 复合造模致大鼠学习记忆功能障碍及丹参酮治疗作用的研究[J]. 江西医学院学报,2009,49(1):13.
- [4] 赵唯贤,李高申,范新六,等. 柴胡疏肝散对阿尔茨海默病大鼠记忆功能的相关研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):207.
- [5] 王跃春,王子栋. 动物学习、记忆能力的 Y 一型迷宫测试法(综述)[J]. 暨南大学学报:自然科学版, 2001,22(5):137.
- [6] 王福顺,岳文浩,段耀奎,等. 绞股蓝对大白鼠学习记忆的影响[J]. 泰山医学院学报,1997(4):251.
- [7] Planel E, Yasutake K, Ishiguro K, et al. Inhibition of protein phosphatase 2A overrides tau protein kinase I/ glycogen synthase kinase 3 beta and cyclin-dependent kinase 5 inhibition and results in tau hyperphosphorylation in the hippocampus of starved mouse[J]. J Biol Chem, 2001, 276 (36):34298.
- [8] 王一牛,罗跃嘉. 前额叶皮质损伤患者的情绪异常[J]. 心理科学进展, 2004,12(2):161.
- [9] 谢敏,徐波,王泽军. 游泳训练对大鼠空间学习记忆能力与海马、前额叶皮质环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷水平的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2009, 24 (11):1002.
- [10] 程怀东,汪凯,牛朝诗,等. 前额叶损伤患者基于事件和基于时间的前瞻性记忆损害[J]. 中华神经科杂志, 2006,39(12):818.
- [11] 王恺. 逍遥散合温胆汤加减治疗心脏神经官能症 60 例[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(4):194.
- [12] 熊静悦,曾南,张崇燕,等. 逍遥散抗抑郁作用研究[J]. 中药药理与临床, 2007,23(1):3.
- [13] 曹美群,陈德珩,张春虎,等. 抑郁模型大鼠海马内特异性 microRNAs 的筛选以及柴胡疏肝散的干预作用[J]. 中国中药杂志,2013,38(10):1585.

[责任编辑 聂淑琴]