

脑还丹对快速老化小鼠 SAMP/8 学习记忆能力及 海马 APP、Pin1、HMGB1 mRNA 表达的影响

陶彦谷, 黄启辉*

(中山大学孙逸仙纪念医院, 广州 510120)

[摘要] 目的:观察脑还丹对快速老化(SAMP/8)小鼠学习记忆能力及海马 β -淀粉样蛋白前体蛋白(APP)、肽基脯氨酰顺反异构酶(Pin1)与高迁移率族蛋白BI(HMGB1)mRNA表达的影响,探讨脑还丹防治阿尔茨海默病(AD)的作用机制。方法:选用6月龄雄性SAMP/8小鼠共30只,随机分为脑还丹高、低剂量组和模型组,另选用6月龄SAMP/1小鼠10只为正常对照组。高、低剂量组分别给予脑还丹84, 21 g·kg⁻¹ig;模型组、空白组给予双蒸水10 mL·kg⁻¹, 1次/d,连续8周。用Morris水迷宫方法测试小鼠的定位航行和空间探索能力,测试后每组取8只小鼠断头处死,无菌条件下剥出全脑,小心分离海马组织,采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测海马组织中APP, Pin1, HMGB1 mRNA表达。结果:6月龄SAMP/8雄鼠的学习记忆能力明显低于同月龄SAMR/1雄鼠,表现为逃避潜伏期从第2天起显著延长,原平台象限停留时间缩短。脑还丹治疗8周后,SAMP/8小鼠逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$)。SAMR/1小鼠和用药各组小鼠的记忆保持能力比SAMP/8小鼠强,尤其以脑还丹高剂量组更明显($P < 0.05$)。与正常组比较,模型组APP mRNA相对表达量上调;与模型组比较,脑还丹高、低剂量组APP mRNA表达下调($P < 0.05$),高剂量组APP mRNA表达明显低于低剂量组($P < 0.05$)。与正常对照组比较,模型组Pin1 mRNA表达下调;与模型组比较,脑还丹高、低剂量组Pin1 mRNA表达上调($P < 0.05$),高剂量组Pin1 mRNA表达显著低于低剂量组($P < 0.05$);与正常组比较,模型组HMGB1 mRNA表达上调;与模型组比较,脑还丹高、低剂量组HMGB1 mRNA表达下调($P < 0.05$),高剂量组HMGB1 mRNA表达明显低于低剂量组($P < 0.05$)。结论:脑还丹治疗8周可改善SAMP/8小鼠的学习能力和记忆缺损。脑还丹可能通过下调SAMP/8小鼠APP, HMGB1 mRNA的表达,上调Pin1 mRNA表达,从源头上阻断老年斑及神经元纤维缠结的形成,这可能是脑还丹防治AD的主要作用点之一。

[关键词] 脑还丹; 阿尔茨海默病; 学习记忆能力; β -淀粉样蛋白前体蛋白; 肽基脯氨酰顺反异构酶; 高迁移率族蛋白BI

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0259-07

[doi] 10.11653/syfyj2013220259

Effect of Chinese Medicine Naohuan Dan on Behavior and the Expression of APP, Pin1, HMGB1 mRNA in the Hippocampus of Senescence Accelerated Mouse SAMP/8

TAO Yan-gu, HUANG Qi-hui*

(SUN YAT-SEN Memorial Hospital, SUN YAT-SEN University, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** Through researching the effect of Naohuan Dan (NHD) on behavior and the expression of β -amyloid precursor protein (APP), peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (Pin1) and high mobility group protein BI (HMGB1) mRNA in the hippocampus of Senescence Accelerated Mouse SAMP/8, this work

[收稿日期] 20130807(011)

[基金项目] 广东省科技计划项目(2006B36501004)

[第一作者] 陶彦谷, 硕士研究生, 住院医师, 从事中西医结合临床老年病学的临床与研究工作, Tel:020-81332463, E-mail: taoyangu007@163.com

[通讯作者] * 黄启辉, 硕士, 副主任医师, 从事中西医结合临床老年病学的临床与研究工作, Tel:020-81332463, E-mail: hqhui84181833@163.com

discusses partially the mechanism of traditional Chinese medicine NHD with respect to its effectiveness to treat Alzheimer's disease. **Method:** Sixty six-months old SAMP/8 mice were randomly divided into NHD low and high dose group and model group, 10 six-months old SAMR/1 were served as a normal control group. The mice were administered with NHD intragastrically at the dose of 84, 21 g·kg⁻¹ per day for 8 weeks respectively, while distilled water in the model group and normal control group at the dose of 10 mL·kg⁻¹. 8 each analyzed the parameter of place navigation test and spatial probe test by Morris water maze, then stripped out whole brain under sterile condition, the hippocampus were taken out to expression of APP, Pin1, HMGB1 mRNA by real time quantitative PCR (qRT-PCR). **Result:** 6 month old male SAMP/8 learning and memory ability was significantly lower than the same month-old SAMR/1 male, specific performance: the escape latency was significantly increased from the second day, the time of stopping on original platform quadrant was shortened. The SAMP/8's escape latency was significantly shortened ($P < 0.05$). The memory retention in SAMR/1 mice and mice after NHD treatment was stronger than SAMP/8, especially the high dose NHD group was obvious ($P < 0.05$). The relative expression of APP, Pin1, HMGB1 mRNA was statistical significant difference. In the model group, the level of APP mRNA increased compared with the normal control group ($P < 0.05$); the level of APP mRNA of NHD group decreased compared with the model group ($P < 0.05$). In the model group, the level of Pin1 mRNA decreased compared with the normal control group ($P < 0.05$); the level of Pin1 mRNA of NHD group increased compared with the model group ($P < 0.05$); In the model group, the level of HMGB1 mRNA increased compared with the normal control group ($P < 0.05$); the level of HMGB1 mRNA of NHD group decreased compared with the model group ($P < 0.05$); The effects in the NHD high dose group were all better than those in the low dose group for APP mRNA, Pin1 mRNA and HMGB1 mRNA. **Conclusion:** Naohua Dan treat SAMP/8 of the more recognized animal model of AD for 8 weeks. Behavior detection was found that Naohuan Dan can improve the learning ability, memory impairment of the SAMP/8. The increased level of APP and HMGB1 mRNA and the decreased level of Pin1 mRNA in the SAMP/8 mice, which probably is part of pathology of Alzheimer's disease. Naohuan Dan can block amyloid plaques and nerve fibers tangles from source through decreasing the APP and HMGB1 level and increasing the Pin1 level. This may be one of the major action points of the treatment of AD by Nanhuan Dan.

[**Key words**] Naohuan Dan; Alzheimer's disease; learning and memory ability; amyloid precursor protein, peptidyl-prolyl-cis-trans isomerases A; high mobility group box 1

目前阿尔茨海默病(AD)的实验研究中,快速老化小鼠是国内外公认的进行AD研究中较为标准的自然衰老痴呆模型^[1],包括快速老化的SAMP系和正常老化的SAMR系,其中SAMP/8亚系的特征是其学习、记忆能力随着增龄进行性快速衰退,具有典型的老年痴呆特征和脑部特征性病理变化,正常老化亚系SAMR/1表现为正常衰老而不具有AD特征,常作为SAMP系的正常对照。

国内外学者对于AD的病因及发病机制提出了很多的假说,但得到众多学者一致公认的是AD的特征性病理改变是以 β -淀粉样蛋白(A β)沉积为核心形成神经细胞外的老年斑(SP)及以过磷酸化的tau蛋白为核心形成神经细胞内的神经元纤维缠结(NFT)和选择性神经细胞丢失。随着对AD机制研究的深入,有文献报道^[2-3]肽基脯氨酰顺反异构酶(Pin1)和高迁移率族蛋白B1(HMGB1)在老年斑及

神经元纤维缠结的形成中发挥了重要作用。脑还丹是本院李庆明教授治疗老年痴呆的经验方,多年来本院中医药防治老年AD课题组对其进行大量的临床观察及基础研究,证明脑还丹是一个具有多靶点、多环节治疗作用的药物,能有效防治AD。本研究通过观察脑还丹干预对快速老化小鼠SAMP/8学习记忆能力及海马 β -淀粉样蛋白前体蛋白(APP)、Pin1、HMGB1 mRNA表达的影响,旨在从行为学及分子生物学的角度探讨脑还丹防治AD的作用机制。

1 材料

1.1 药物及配制方法 脑还丹由人参、熟地黄、骨碎朴、石菖蒲等组成,采用颗粒剂(广东一方制药有限公司提供,批号0910124,0910129,0910135,0910126等),按照所含生药量加双蒸水至67 mL配制成含生药量8.4,2.1 g·mL⁻¹水溶液,冷藏保存

备用。

1.2 动物 6月龄雄性清洁级快速老化 SAMP/8 小鼠 30 只,正常老化 SAMR/1 小鼠 10 只,体重 (20 ± 2) g,购自天津中医药大学第一附属医院,许可证号 SCXK(津)2008-0001。小鼠饲养于无菌清洁室内,室温维持 $20 \sim 22$ °C,湿度维持 55% ~ 60%,饮用水及所食饲料均经高温蒸气灭菌处理。

1.3 仪器 Morris 水迷宫(中国科学院研制),TGLL-1a 型冷冻变速离心机(上海医用分析仪器厂),SW-SJ-1D-超净工作台(苏州净化仪器厂);ABI Step-One Plus Real Time PCR System(美国 Applied Biosystems 公司),520UV/Vis 紫外分光光度计(Beckman Coulter)。

1.4 试剂 Trizol 提取液(美国 Invitrogen 公司,批号 1382739),SYBR Green PCR Master Mix(日本 Toyobo 公司,批号 75660M3)。

2 方法

2.1 分组及给药 6月龄 SAMP/8 小鼠 30 只,随机等分为模型组和脑还丹高、低剂量组,每组 10 只。以 10 只 SAMR/1 小鼠为对照组。脑还丹高、低剂量为 $84, 21 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig;空白组、模型组小鼠给双蒸水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig。均 1 次/d,连续 8 周。

2.2 Morris 水迷宫方法 测试各组小鼠的定位航行和空间探索能力

2.2.1 隐蔽平台实验 测试前,让小鼠在不含平台的水池中自由游泳 2 d,以熟悉迷宫环境。实验时平台置于东北象限中央且位置固定不变。在平台对侧选 2 个与之距离相等的点作为入水点,将小鼠面贴壁轻轻放入水中,记录小鼠找到平台的时间(逃避潜伏期),然后让小鼠在台上休息 20 s。如果小鼠 90 s 内找不到平台,则记为潜伏期 90 s,每天在 2 个人水点各进行 1 次测试,结果取 2 次逃避潜伏期的平均值。

2.2.2 空间探索试验 隐蔽平台实验后,撤除平台,让小鼠找寻记忆中的平台位置,在相同入水点将小鼠放入水池中,记录该鼠在 60 s 内游泳的路径。测试过程中,水池四周参照物位置保持不变。记录小鼠在原平台象限的停留时间。

2.3 qRT-PCR 方法检测 APP, Pin1, HMGB1 mRNA 表达

2.3.1 标本收集 给药 8 周后处死小鼠,无菌条件下剥出大脑,手术刀轻轻切开大脑皮质,小心分离出海马组织,置液氮保存。

2.3.2 总 RNA 抽提 ① 海马组织放入研磨器中,

边倒液氮边磨碎,加入 1 mL Trizol 溶液,匀浆移入 1.5 mL EP 管中(4 °C), $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 10 min,取上层水相室温放置 5 min;② 加入 200 μL 氯仿,剧烈振荡 30 s,室温静置 15 min, $10\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,可见分 3 层, RNA 在上层水相;③ 取上层移入另一 1.5 mL EP 管中,加入 0.5 mL 异丙醇轻柔充分混匀,室温下放置 10 min, 4 °C 下 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,见 RNA 沉淀物附着管壁或底部;④ 再加入 1 mL 的 75% 的乙醇,振荡混匀, 4 °C 下, $7\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min;⑤ 移除乙醇,超净台内风干 3 ~ 5 min,用 15 ~ 60 μL 的 DEPC 水溶解沉淀。取 1 μL 电泳分析 RNA 质量,取 1 μL 紫外分光光度测量纯度。余下的在 -70 °C 保存。

2.3.3 总 RNA 纯度和完整性检测 ① 纯度检测:取 1 μL RNA 样品 60 倍稀释,在紫外分光光度计上测定吸光度(A)。 $A_{260}/A_{280} > 1.8$,说明制备的 RNA 较纯,无蛋白质污染;② 总 RNA 完整性检测,取 RNA 样品 1 μL ,1% 琼脂糖凝胶电泳 $80 \text{ V} \times 20 \text{ min}$,用凝胶成像系统观察总 RNA 的 5.18.28 s rRNA 条带,3 条条带完整即可证明总 RNA 抽提比较完整。

2.3.4 cDNA 合成 按反转录试剂盒说明书进行,20 μL 体系中含 MgCl_2 (25 mmol) 2 μL ,10 \times RT Buffer 1 μL ,dNTP Mixture ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL ,RNase Inhibitor ($40 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.25 μL ,Oligo dT-Adaptor Primer 0.5 μL (2.5 pmol $\cdot \mu\text{L}^{-1}$),总 RNA 样本 1 μL ,RNase Free dH_2O 11 μL 。反应条件: 30 °C 10 min, 42 °C 60 min, 72 °C 10 min。

2.3.5 定量 PCR 20 μL 体系中含 cDNA (1:15) 5.0 μL ,上游引物 0.5 μL ,下游引物 0.5 μL 2 \times SYBR Green PCR Master Mix 10 μL , dH_2O 4.0 μL 。循环参数为 95 °C 15 s,退火温度 60 °C 15 s, 72 °C 延伸 1 min 进行 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min 后 4 °C 保存。

引物设计委托大连宝生物工程有限公司,由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列见表 1。

实时定量 PCR 结果分析是通过 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算相对 mRNA 表达水平。 $\Delta\text{Ct}_{\text{干预组}} = \text{Ct}_{\text{干预组 APP}} - \text{Ct}_{\text{干预组 GAPDH}}$, $\Delta\text{Ct}_{\text{空白组}} = \text{Ct}_{\text{空白组 APP}} - \text{Ct}_{\text{空白组 GAPDH}}$, $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\Delta\text{Ct}_{\text{干预组}} - \Delta\text{Ct}_{\text{空白组}}$, APP, Pin1, HMGB1, mRNA 表达差别倍数以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示。 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 越低,表示 mRNA 表达越高。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 11.0 统计学软件,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析,方差齐性时,两两间比较用 LSD 方法检验;方差不齐时,用秩

表 1 引物序列

引物名称	引物序列	片段长度
< APP	5'-GTGGACTCTGTGCCAGCCAATA-3' 5'-GTCTTGATGTTTGTGACGCCAGAA-3'	113
< Pin1	5'-GCCTCACAGTTCAAGTATTGCAG-3' 5'-GGATGATATGGATGCCCGAGTC-3'	160
< HMGB1	5'-TTTAGATAGCCCTGTCTCGTGGTA-3' 5'-GTGCACCAACAAGAACCTGCTTTA-3'	110
GAPDH	5'-TGTGTCGGTCGTGGATCTGA-3' 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'	150

和检验,用 Kruskal-Wallistest 方法进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

3 结果

3.1 对小鼠隐蔽平台实验逃避潜伏期的影响 实

表 2 脑还丹对小鼠隐蔽平台实验逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	逃避潜伏期 /s				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
空白对照	-	44.35 ± 10.56	17.45 ± 6.10 ³⁾	15.63 ± 6.40 ¹⁾	16.13 ± 6.62 ³⁾	12.15 ± 5.14 ³⁾
模型	-	59.12 ± 14.35	48.90 ± 13.37	46.99 ± 16.5	43.89 ± 10.8	42.21 ± 9.86
脑还丹	84	57.49 ± 15.03	34.48 ± 12.15 ¹⁾	29.17 ± 6.21 ²⁾	25.30 ± 5.8 ³⁾	21.86 ± 10.56 ³⁾
	21	52.69 ± 13.17	25.84 ± 6.97 ³⁾	22.49 ± 6.41 ³⁾	17.29 ± 6.44 ^{3,4)}	14.32 ± 5.13 ^{3,4)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$;与脑还丹低剂量组比较⁴⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

停留时间明显增加($P < 0.05 \sim 0.001$),说明用药后 SAMP/8 的记忆能力得到明显改善;脑还丹高剂量组原平台象限停留时间明显长于低剂量组($P < 0.05$),提示脑还丹对 SAMP/8 记忆能力的改善有随着剂量增加而疗效增强的趋势,见表 3。

表 3 脑还丹对小鼠空间探索实验的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	时间 /s	剂量 /cm·s ⁻¹
空白对照	-	26.61 ± 7.56 ³⁾	0.125 ± 0.027
模型	-	9.69 ± 3.16	0.126 ± 0.029
脑还丹	84	16.90 ± 7.47 ¹⁾	0.124 ± 0.018
	21	23.65 ± 5.36 ^{3,4)}	0.124 ± 0.025

3.3 对小鼠海马组织 APP mRNA 表达的影响 模型组 APP mRNA 表达上调($P < 0.05$);与模型组比较,脑还丹高、低剂量组 APP mRNA 表达下调($P < 0.05$)。脑还丹高剂量作用强于脑还丹低剂量组,且有随着剂量增加而疗效增强的趋势。见表 4。

3.4 对小鼠海马组织 Pin1 mRNA 表达的影响 模型组 Pin1 mRNA 表达下调($P < 0.05$);与模型组比较,脑还丹高、低剂量组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 显著下降,表明 Pin1 mRNA 表达上调($P < 0.05$)。与脑还丹低剂量组比

验从第 2 天至第 5 天,模型组逃避潜伏期均明显长于对照组($P < 0.001$),说明正常老化 SAMR/1 的学习能力强于快速老化 SAMP/8。与模型组比较,脑还丹高、低剂量组从第 2 天开始逃避潜伏期明显缩短,至第 4,5 天作用最明显($P < 0.001$),说明用药后能改善快速老化小鼠 SAMP/8 的学习能力。脑还丹高剂量组在第 4,5 天的成绩比低剂量组显著好($P < 0.05$),说明脑还丹对快速老化小鼠学习能力的改善有随着剂量增加而疗效增强的趋势,见表 2。

3.2 对小鼠空间探索能力的影响 4 组小鼠的运动能力无差别,4 组小鼠的游泳速度无统计学差异。与对照组相比,模型组在原平台象限停留时间明显减少($P < 0.001$),说明 SAMP/8 存在明显的记忆障碍;与模型组比较,脑还丹用药组小鼠在原平台象限

表 4 脑还丹对小鼠海马 APP mRNA 表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	GAPDH Ct	APP Ct	ΔCt	$-\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
空白对照	-	18.41 ± 0.12	21.13 ± 0.24	2.73	-2.37	5.19
模型	-	18.44 ± 0.08	23.55 ± 0.19	5.10	0.00	1.00 ^{1,2)}
脑还丹	84	18.38 ± 0.05	22.16 ± 0.18	3.78	-1.32	2.50 ^{2,3)}
	21	18.39 ± 0.09	21.91 ± 0.19	3.52	-1.58	2.98 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 4~5 同)。

较,脑还丹高剂量组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 显著下降($P < 0.05$),表明脑还丹高剂量作用强于脑还丹低剂量组,且有随着剂量增加而疗效增强的趋势。见表 5。

表 5 脑还丹对小鼠海马 (Pin1) APP mRNA 表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	GAPDH Ct	APP Ct	ΔCt	$-\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
空白对照	-	18.41 ± 0.12	24.24 ± 0.14	5.83	0.00	1.00
模型	-	18.44 ± 0.08	21.44 ± 0.14	2.99	-2.84	7.15 ²⁾
脑还丹	0.84	18.38 ± 0.05	23.33 ± 0.19	4.95	-0.88	1.84 ^{2,3)}
	0.21	18.39 ± 0.09	22.35 ± 0.21	3.96	-1.87	3.64 ¹⁾

3.5 对小鼠海马组织 HMGB1 mRNA 表达的影响

模型组 HMGB1 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 显著低于空白组 ($P < 0.05$),表明模型组 HMGB1 mRNA 表达上调;与模型组比较,脑还丹高、低剂量组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 显著增高,表明 HMGB1 mRNA 表达显著下调 ($P < 0.05$)。与脑还丹低剂量组比较,脑还丹高剂量组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 减少更明显 ($P < 0.05$),表明脑还丹高剂量作用强于脑还丹低剂量组,且有随着剂量增加而疗效增强的趋势。见表 6。

表 6 脑还丹对小鼠海马 HMGB1 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	GAPDH Ct	APP Ct	ΔCt	$-\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
空白对照	-	18.41 ± 0.12	21.20 ± 0.13	2.79	-2.11	4.31
模型	-	18.44 ± 0.08	23.35 ± 0.05	4.90	0.00	1.00 ²⁾
脑还丹	84	18.38 ± 0.05	22.35 ± 0.16	3.97	-0.93	1.90 ^{2,3)}
	21	18.39 ± 0.09	21.77 ± 0.12	3.38	-1.52	2.86 ¹⁾

4 讨论

阿尔茨海默病属中医“呆病”、“善忘”等范畴。其主要病因病机可归纳为肾虚精亏,髓海空虚,痰瘀交结,阻于脑络,络损神伤,发为呆病。脑还丹具有补肾填精、活血化痰通络、平衡阴阳、调和气血的功效,其中人参、熟地黄、骨碎补等有益肾填精、补益气血以治本,加之菖蒲等涤痰开窍、活血通络以治标,全方切合老年性痴呆的病因病机,具有标本同治之作用。

本实验结果显示,6月龄 SAMP/8 的学习和记忆保持能力均明显低于同月龄 SAMR/1,给予脑还丹治疗 8 周后的 SAMP/8 的学习、记忆能力有明显的改善,逃避潜伏期明显缩短;原平台象限停留时间明显延长,且有一定的量效关系,说明,脑还丹能显著改善动物方向辨别的学习能力及记忆巩固、再现能力。从行为学角度验证其疗效。

在 AD 发病机制中目前仍以淀粉样蛋白学说占主导地位,该学说认为 A β 沉积是 AD 发病的中心环节^[4]。A β 由 APP 水解产生。在正常生理条件下,多数 APP 由 α -分泌酶裂解成可溶性的 β -淀粉样前体蛋白(β -APP)释放到神经元外, β -APP 再进一步被 γ -分泌酶裂解。极少部分 β -APP 在胞质经溶酶体内的 β -分泌酶和 γ -分泌酶作用裂解为 A β ^[5]。研究发现, β -APP 过度产生、积聚可能是 A β 沉积形成及 AD 发病的主要致病机制之一^[6]。已有的研究结果表明,产生 A β 前体蛋白的 APP 基因突变和异常

表达,则 β -APP 主要经 β -分泌酶和 γ -分泌酶作用裂解为 A β 。所以 APP 基因突变和异常表达是 AD 发病的始发原因之一^[7-8]。

另有部分学者的研究表明,AD 的一些神经毒性归因于淀粉样前体蛋白的蛋白溶解片段^[9]。APP 的 C-末端裂解片段(CTFs)已经在 AD 的大脑中被发现,并且比 A β 具备更强的神经毒性。CTFs 能诱导强烈的炎症反应,促使 tau 蛋白异常磷酸化等导致神经元变性、死亡^[5]。APP mRNA → APP 分子 → β -APP 沉积 → A β 或 CTFs 的神经毒性是引发 AD 的基本规律。干预并打断其恶性循环中的任何一个环节是 AD 防治中的重要战略。本实验结果说明,脑还丹能通过下调 APP mRNA 表达而使 β -APP 生成减少,从源头上减少 A β 和 CTFs 的产生,从根本上阻止 AD 的发展。这可能是脑还丹治疗和改善 AD 了病理特征的机制之一。

肽基脯氨酰顺反异构酶(简称 Pin1)属于 PPIaseA 家族 Pin1 型亚家族,是微小菌素蛋白。Pin1 可通过特异性地识别并与底物蛋白的 pSer/Thr-Pro 基序结合,催化底物蛋白质发生顺反异构,从而通过改变底物蛋白构象,调节底物蛋白的磷酸化水平、活性、稳定性、亚细胞定位而影响磷酸化蛋白的功能。

蛋白质脯氨酸前的丝氨酸或苏氨酸磷酸化修饰在细胞的生命过程中起重要作用,参与多种细胞信号转导通路的调节。在 AD 的发生发展中起重要作用的特征性病理改变 β 淀粉样蛋白(A β)和神经纤维缠结(NFT)的蛋白质如微管相关蛋白 tau、淀粉样前体蛋白(APP)等都含有 pSer/Thr-Pro 基序,它们的活性和功能均受 Pin1 的调节^[2]。Pin1 能使异常磷酸化 tau 蛋白的反式构象转变成顺式构象,从而抑制 tau 的异常磷酸化,恢复 tau 与微管结合及促使微管组装能力^[10]而发挥保护作用,减少 NFT 形成和保护神经元。Pastorino 等^[11]在细胞培养的实验中,Pin1 过表达能减少 A β 的分泌,而 Pin1 去除或表达减少时则 A β 分泌增多。在 APP 基因突变鼠剔除 Pin1 的研究中发现了 APP 发生代谢异常并选择性地提高了不溶性 A β 42 水平,从而使 A β 在细胞外沉积形成老年斑^[2]。由此可见,Pin1 可能参与了 AD 发病过程,并与老年斑及神经纤维缠结的形成密切相关。有研究发现,在 AD 脑内的富含神经原纤维缠结的神经元内 Pin1 含量低,Pin1 在 AD 脑中的表达下调^[12-13]。Pin1 在 AD 的发生发展中起促进作用。因此,提高 Pin1 mRNA 水平可能成为治疗

AD 的一个措施。本实验提示脑还丹能通过上调 Pin1 mRNA 水平,从而减少老年斑、神经纤维缠结的形成,能保护神经元,这可能是脑还丹治疗和改善阿尔茨海默病病理特征的作用机制之一。

高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 是真核细胞内大量存在的一类非组蛋白染色体结合蛋白,由 A 区和 B 区及 C 端尾部 3 个结构域构成。B 区的 1~20 号氨基酸是诱导 TNF, IL-1, IL-6 等细胞因子产生的部位。研究发现, HMGB1 在急慢性炎症中均有表达,同时作为细胞因子介导炎症反应,在 AD 中发挥重要作用。AD 可能是一种慢性的中枢神经系统炎症反应,脑内持续存在慢性炎症反应可能是其重要的病理特征之一并可能是其他病理特征形成和发展的诱发因素^[14]。TNF- α , IL-1 β 等炎性因子可促使神经细胞合成 APP,使 APP 代谢异常而不断产生 β -淀粉样蛋白,沉积与脑组织而形成老年斑^[15]。同时老年斑周围存在大量小胶质细胞和星形细胞被激活,产生大量补体、炎性细胞因子、急性期反应物等导致神经细胞损伤、破坏和死亡^[16]。而 HMGB1 作为细胞因子介导炎症反应,它能够吸附、趋化和诱导中性粒细胞、单核/巨噬细胞和树突状细胞等合成并分泌 TNF- α , IL-1 β , IL-6 等炎症介质^[17-19]。同时这些介质又能与 HMGB1 相互诱导,加强 HMGB1 的旁分泌效应,不断放大炎症信号,造成炎症的失控迁延。有研究发现^[3,20]: HMGB1 有抑制小胶质细胞的活化及对 A β 1-42 的吞噬作用,也因在细胞外 A β 42 的稳态中起了重要作用而与 A β 发挥协同作用而形成新的老年斑,同时也使 A β 42 的低聚体持续存在,神经毒性明显加剧。由此可见, HMGB1 参与了 AD 脑中老年斑的形成过程,并加重了其病变。本实验结果说明“脑还丹”能够通过下调 HMGB1 mRNA 表达水平,从而加强了对 A β 的清除作用,减少其对 AD 的神经毒性作用,同时减轻炎症反应,这可能是脑还丹治疗和改善 AD 病理特征的作用机制之一。

综上,选用较为公认的 AD 动物模型 SAMP/8 小鼠,以脑还丹治疗 8 周,行为学检测发现脑还丹可以改善 SAMP/8 的学习能力、记忆缺损。与正常老化小鼠 SAMR/1 相比较, SAMP/8 小鼠海马出现 APP, HMGB1 mRNA 表达上调, Pin1 mRNA 表达下调,这可能是 AD 的两大病理特征老年斑及神经纤维缠结形成的重要因素。而脑还丹可能通过下调 SAMP/8 小鼠 APP, HMGB1 mRNA 的表达,上调 Pin1 mRNA 表达,从源头上阻断老年斑及神经元纤维缠

结的形成,这可能是脑还丹防治 AD 的主要作用点之一。

[参考文献]

- [1] 韩景献. 日本快速老化模型小鼠(SAM)老化诸特征[J]. 动物科学与管理, 1995, 12(4): 21.
- [2] Balastik M, Lim J, Pastorino L, et al. Pin1 in Alzheimer's disease: multiple substrates, one regulatory mechanism[J]. Bio-chin Biophys Acta, 2007, 1772(4): 422.
- [3] Takata K, Kitamura Y, Tsuchiya D, et al. High mobility group box protein-1 inhibits microglial A β clearance and enhances A β neurotoxicity[J]. Neurosci Res, 2004, 78(6): 880.
- [4] Odle T G. Alzheimer's disease and other dementias[J]. Radiol Technol, 2003, 75(2): 111.
- [5] 巴根, 汤隽, 张进. 阿尔茨海默病发病机制的相关研究进展[J]. 中国全科医学, 2006, 9(11): 937.
- [6] Gentleman S M, Nash M J, Sweeting C J, et al. β /A4 amyloid precursor protein (β -APP) as a marker for axonal injury after head injury[J]. Neurosci Lett, 1993, 160(2): 139.
- [7] Goat A, Chartier-Harlin M C, Mullan M, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease[J]. Nature, 1991, 349(6311): 704.
- [8] Sherrington R, Rogaev E I, Liang Y, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease[J]. Nature, 1995, 375(6534): 754.
- [9] Chang K A, Suh Y H. Pathophysiological roles of amyloidogenic carboxy-terminal fragments of the β -amyloid precursor protein in Alzheimer's disease[J]. J. pharmacol sci, 2005, 97(4): 461.
- [10] Ahljianian M K, Barreuzeta N X, Williams R D, et al. Hyperphosphorylated tau and neurofilament and cytoskeletal disruptions in mice overexpressing human p25, an activator of cdk5[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(6): 291.
- [11] Pastorino L, Sun A, Lu P J, et al. The prolyl isomerase Pin1 regulates amyloid precursor protein processing and amyloid-beta production[J]. Nature, 2006, 440(7083): 528.
- [12] Schonberger ST, Edgar PF, Kydd R, et al. Proteomic analysis of the brain in Alzheimer's disease: Molecular phenotype of a complex disease process[J]. Proteomics, 2001, 1(12): 1519.

半枝莲多糖对 S180 荷瘤小鼠红细胞功能的影响

张晶^{1,2}, 赵伟杰^{1,2}

(1. 台州职业技术学院生化制药研发中心, 浙江台州 318000;
2. 台州职业技术学院生物与化工学院, 浙江台州 318000)

[摘要] **目的:**探讨半枝莲多糖增强荷瘤小鼠红细胞膜流动性及其红细胞免疫调节机制。**方法:**健康雄性小鼠 48 只,按体重随机分为正常对照组、模型对照组、黄芪多糖对照组(100 mg·kg⁻¹)、半枝莲多糖低、中、高剂量组(50,100,200 mg·kg⁻¹)。用荧光分光光度计检测荷瘤小鼠红细胞膜流动性;用紫外分光光度计检测红细胞膜 Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶活力、唾液酸(SA)含量、抗氧化酶系的活力。**结果:**与模型对照组比较,半枝莲多糖各剂量组可明显提高 S180 荷瘤小鼠红细胞膜流动性($P < 0.01, P < 0.05$),可明显提高红细胞膜 Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶活力($P < 0.01, P < 0.05$)、及抗氧化酶系的活力($P < 0.01, P < 0.05$);低、中剂量组可增加红细胞膜表面唾液酸含量($P < 0.01$)。**结论:**半枝莲多糖可能通过改善 S180 荷瘤小鼠红细胞膜的功能状态,提高膜的流动性,增强红细胞的免疫功能,从而发挥其抗肿瘤作用。

[关键词] 半枝莲多糖; 抗肿瘤; 红细胞膜流动性; 抗氧化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)22-0265-04

[doi] 10.11653/syfj2013220265

Effect of *Scutellaria barbata* Polysaccharide on the Function of Erythrocyte Membrane in S180 Tumor-bearing Mice

ZHANG Jing^{1,2}, ZHAO Wei-jie^{1,2}

(1. R&D Centre of Biochemistry Pharmacy, Taizhou Vocational and Technical College, Taizhou 318000, China;
2. Department of Biological & Chemical Engineering, Taizhou Vocational and Technical College, Taizhou 318000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of *Scutellaria barbata* polysaccharide on the fluidity of

[收稿日期] 20130424 (017)

[第一作者] 张晶, 硕士, 助教, 从事药物有效成分和活性研究, Tel:15712693630, E-mail:zwjzj2000@126.com

- [13] 杨国锋, 王鲁宁, 纪建国, 等. Tau 蛋白病的蛋白质研究[J]. 中华内科杂志, 2005, 44(5):374.
- [14] 安明, 赵国君. 阿尔茨海默病与炎症[J]. 内蒙古医学院学报, 2008, 30(6):680.
- [15] Alvarez X A, Franco A, Fernandez-Novoa L, et al. Blood levels of histamine, IL-1beta, and TNF-alpha in patients with mild to moderate Alzheimer's disease [J]. Mol Chem Neuropathol. 1996;29(2/3):237.
- [16] 杜泽英, 李晓玉. 阿尔采末病与免疫炎症反应的相关性[J]. 生理科学进展, 1998, 29(3):253.
- [17] Andersson U, Wang H, Palmblad K, et al. High mobility group1 protein (HMGB1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes [J]. Exp Med, 2000, 192(4):565.
- [18] Park J S, Arcaroli J, Yum H K, et al. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box1 protein [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 284(4):C870.
- [19] Messmer D, Yang H, Telusma G, et al. High mobility group box protein1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and the polarization [J]. J Immunol, 2004, 173(1):307.
- [20] Takata K, Kitamura Y, Kakimura J, et al. Role of high mobility group protein-1 (HMGB1) in amyloid-beta homeostasis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(3):699.

[责任编辑 李玉洁]