

复方地黄对老年痴呆大鼠学习记忆 及海马 GDNF mRNA 表达的影响

张海燕¹, 刘忠锦², 廉洁¹, 孙丽慧^{1*}

(1. 齐齐哈尔医学院组胚教研室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2. 齐齐哈尔医学院第一附属医院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] **目的:**探讨复方地黄对阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 大鼠海马 GDNF mRNA 表达的影响。**方法:**通过 Morris 水迷宫筛选 40 只健康 Wistar 大鼠随机分出正常组 10 只 (常规饮水和饲料, 不给予任何处理), 其余 3 组大鼠均采用链脲菌素 (STZ) 致 AD 模型, 模型组 10 只造模后不进行治疗。造模后第 6 天开始治疗, 安理申组 ($0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 和复方地黄组 (含生药 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 每组 10 只, 疗程 4 周。用 Morris 水迷宫检测大鼠的学习记忆能力, 用原位杂交法和 RT-PCR 检测大鼠海马胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF) GDNF mRNA 的表达。**结果:**模型组大鼠学习能力比正常组降低 ($P < 0.05$), 复方地黄大鼠上述变化明显改善, 与模型组差异显著 ($P < 0.05$)。与正常组大鼠比较, 模型组大鼠海马 GDNF mRNA 表达降低明显 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 复方地黄组大鼠海马 GDNF mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$)。**结论:**复方地黄可能通过增强 AD 大鼠海马 GDNF mRNA 表达而起到对神经保护作用。

[关键词] 复方地黄; 阿尔茨海默病大鼠; 胶质细胞源性神经营养因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0280-04

[doi] 10.11653/syfj2013100280

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130308.1044.008.html>

[网络出版时间] 2013-03-08 10:44

Effects of Compound Rehmannia on Learning and Memory and GDNF mRNA in Hippocampus of Rats with Alzheimer's Disease

ZHANG Hai-yan¹, LIU Zhong-jin², LIAN Jie¹, SUN Li-hui^{1*}

(1. Histoembryology Department, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China;

2. First Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China)

[Abstract] **Objective:** To study effect of compound rehmannia on expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in hippocampus of rats with Alzheimer's disease (AD). **Method:** Forty healthy Wistar rats were screened by the Morris water maze, then the rats were divided 4 groups: the normal group, model group, western medicine group and traditional Chinese medication group randomly ($n = 10$ each). The normal group was given tap water and routine food without any treatment. The remaining 3 groups were established with AD model induced by streptozotocin (STZ), and the model group was not given any treatment after the model establishment. The rats in traditional Chinese medication group were orally given compound rehmannia $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, and the rats in western medicine group were orally given donepezil hydrochloride $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for a course of 4 weeks. The Morris water maze test was used to evaluate learning and memory ability in rats; and the expression of GDNF mRNA in hippocampus was detected by in situ hybridization and RT-PCR. **Result:** Compared with normal

[收稿日期] 20121218(653)

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12521652)

[第一作者] 张海燕, 讲师, 硕士, 从事中西医结合防治老年痴呆的研究, Tel:0452-2663167, E-mail: zhanghaiyan0204@163.com

[通讯作者] * 孙丽慧, 教授, 从事中西医结合防治老年痴呆的研究, Tel:18604529916, E-mail:369426303@qq.com

group, the learning and memory abilities in model group were lowered ($P < 0.05$). After given compound rehmannia all the abilities were significantly improved ($P < 0.05$). Compared with the normal group, GDNF mRNA in hippocampus in the model group was obviously decreased, the difference was marked ($P < 0.05$). Compared with the model group, GDNF mRNA in the western medicine group and traditional Chinese medication group was obviously improved, the difference was marked ($P < 0.05$). **Conclusion:** Compound rehmannia may protect the nerve in AD rats by improving the expression of GDNF mRNA in hippocampus.

[Key words] compound rehmannia; rats with Alzheimer's disease; glial cell line derived neurotrophic factor

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以学习记忆能力损害为主的中枢神经系统退行性疾病,是致老年痴呆最常见的原因^[1],主要病理特征为中枢神经系统出现老年斑、神经元纤维缠结。患者往往以进行性智力减退、人格发生改变为主要特征^[2]。神经营养因子 (NTFs) 与神经系统疾病具有密切关系。而胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 是神经营养因子家庭中一名新成员。本研究观察了复方地黄对链脲霉素致大鼠老年痴呆模型学习记忆能力及海马 GDNF mRNA 表达的影响。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康 4 月龄 Wistar 大鼠,雄性,体重 200 ~ 250 g,由白求恩医大实验动物中心提供,合格证号 2010-002,室内常温下常规饲养,实验室温度 22 ~ 25 °C,明暗周期 12 h/12 h。

1.2 药物试剂与仪器 复方地黄由熟地黄、龟板、山茱萸、何首乌、丹参、茯苓、泽泻、石菖蒲、远志等组成,中药饮片加 8 倍量水,浸泡后煎煮,合并 2 次滤液,浓缩至含生药 1 g·mL⁻¹;盐酸多奈哌齐 (安理申),卫材 (中国) 药业有限公司,进口药品注册证号 H20050978;链脲佐菌素 (STZ-II,注射前以生理盐水溶解);GDNF 原位杂交检测试剂盒 (博士德生物工程有限公司),RNA 抽提试剂盒 Trizol Reagent (Gibco),RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa),GDNF 分子引物序列:上游引物 5'-GACTCCAATGTGCCCGAAGA-3',下游引物 5'-CCTACCTTGTCCTTGTAGCC-3',该引物产生 426 bp 的 cDNA 片段, β -actin 分子引物序列:上游引物 5'-ATGCCATCCTGCGTC TGGACCTGGC-3',下游引物 5'-AGCATTTGCGGTG CCGATGG AGGG-3',该引物产生 205 bp 的 cDNA 片段由北京三博生物科技有限公司合成,SDS (上海生工生物工程公司),DEPC (Fluka 公司);Morris 水迷宫由中国医学科学院药物所生产。

2 方法

2.1 分组 动物适应 1 周后,经水迷宫测试,筛选

40 只合格大鼠^[3]。随机分为 4 组:正常组、模型组、安理申组、复方地黄组,每组 10 只。

2.2 造模与给药 10% 水合氯醛 3 mL·kg⁻¹ 麻醉大鼠,固定在脑立体定位仪上。消毒皮肤,剪毛,在头部做正中矢状切口,牙科钻孔器钻颅有突破感,坐标为脑表面下 3.5 mm,前囟 1.5 mm,矢状缝左右旁开 1.5 mm。在每侧侧脑室注射 10% 链脲霉素 10 μ L。创口缝合饲养,3 d 后重复注射 1 次,术后大鼠 im 青霉素 4 万 U/只预防感染。造模后第 6 天开始治疗,分别给予复方地黄混悬液 10 g·kg⁻¹·d⁻¹ 和安理申混悬液 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹,ig,共 4 周。

2.3 Morris 水迷宫测试 ①定位航行试验:历时 4 d,每日上、下午各 1 次,将大鼠面向池壁分别从 4 个人水点放入水中,记录其在 3 min 内寻找到并爬上平台的时间即逃避潜伏期。如果大鼠在 3 min 未找到平台,则由实验者用手牵引其至平台上,让大鼠停留 10 s 再放回笼中,潜伏期记为最高分 180 s。分别在治疗前后进行游泳实验,大鼠每次在 3 min 内寻找到并爬上平台的时间为大鼠的记忆成绩,每日 2 次,连续 4 d,计算平均成绩。②空间探索实验:第 5 天撤除平台,将大鼠任选 1 个人水点放入水中,测其 2 min 内跨越原平台所在位置的次数。上、下午各 1 次,计算平均成绩。

2.4 原位杂交法测定大鼠海马 GDNF mRNA 麻醉后,暴露出心脏,在左心室插入灌注针头,快速灌入无菌生理盐水 500 mL 冲洗,同时剪开右心耳,冲洗至肝脏变白,然后灌注 4% 多聚甲醛,约 10 min 后,断头取脑,分离海马。一侧海马装入冻存管,保存至液氮罐内,一侧置于 4% 多聚甲醛中,浸泡外固定 24 h,切片经脱蜡,水化至水,滴加 2 mg·L⁻¹ 胃蛋白酶消化 15 min 灭活内源性酶,加预杂交液 20 μ L,放置 4 h,滴加杂交液 20 μ L,4 °C 孵化过夜;滴加生物素化鼠抗地高辛标记 DNA 探针,37 °C 40 min 后滴加 DAB 显色液,生物素化过氧化物酶 37 °C 30 min,脱水,透明,封片。以 PBS 代替探针为阴

性对照。采集 GDNF mRNA 图像,用 Image-ProPlus 分析软件进行图像分析,每组切片取 10 个视野,测定积分吸光度(IA),取平均值代表 GDNF mRNA 表达强度,IA 越大表示阳性产物表达越强。

2.5 RT-PCR 测定大鼠海马 GDNF mRNA 各组大鼠海马组织 PBS 冲洗,匀浆后,采用 Trizol 一步法获得 RNA,RT-PCR 反应过程按试剂盒严格操作,PCR 反应结束后,取 5 μ L PCR 产物(内标取 2.5 μ L)加 1 μ L(6 \times) 样品缓冲液混匀后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,100 V 电泳 20 min。琼脂糖电泳凝胶条带经 Bio-Rad Quantity one 4.4.0 图像分析系统采集电泳图

像,并进行半定量分析,结果用基因扩增条带吸光度(A)/内参照 β -actin A 表示。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用独立样本 t 检验,计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对痴呆模型大鼠 Morris 水迷宫试验的影响 治疗前,造模动物逃避潜伏期和跨越平台次数与正常组存在明显差异($P < 0.05$),复方地黄和安理申治疗后比模型组的逃避潜伏期明显缩短而且跨越平台次数增加($P < 0.05$)。见表 1。

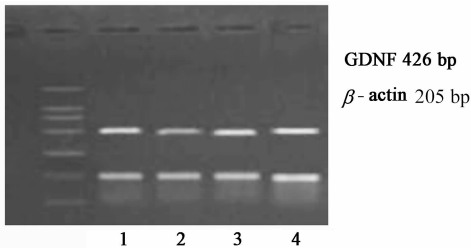
表 1 复方地黄对大鼠迷宫实验的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	逃避潜伏期/s		跨越平台数/次	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
正常	-	21.68 \pm 5.37 ¹⁾	17.31 \pm 3.12 ¹⁾	6.34 \pm 1.45 ¹⁾	7.64 \pm 1.71 ¹⁾
模型	-	60.83 \pm 8.51	53.50 \pm 7.47	2.56 \pm 1.27	2.50 \pm 1.04
安理申	0.4	62.62 \pm 7.84	34.65 \pm 6.24 ¹⁾	2.25 \pm 1.43	4.79 \pm 1.23 ¹⁾
复方地黄	10.0	68.96 \pm 7.53	36.81 \pm 5.33 ¹⁾	2.92 \pm 1.62	4.82 \pm 1.36 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 对大鼠海马 GDNF mRNA 表达的影响 与正常组大鼠(78.89 \pm 8.43)比较,模型组大鼠海马 GDNF mRNA 表达(21.93 \pm 12.44)明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,复方地黄(53.52 \pm 13.56)和安理申(58.56 \pm 14.43)组大鼠海马 GDNF mRNA 表达明显增加($P < 0.05$)。见图 1。

中医学认为 AD 的发病机制为肾精亏虚、痰浊阻窍、瘀血阻滞,是一个多因素相互作用的疾病。单一因素治疗老年痴呆的效果较差。复方中药在延缓脑衰老方面有丰富的理论和经验^[6]。祖国医学认为老年痴呆的证因脉治散见于“健忘”、“癫狂”、“文痴”、和“呆症”等文献中。人到老年,则气郁、气虚均可致血癖,而癖血入脑,精髓枯萎而痴呆。复方地黄首推熟地黄、龟板为君,滋补肾阴,肾主骨生髓充脑;次用人参、山茱萸、山药、何首乌为臣,以补脾气益肾精,君臣共济,气阴两生;再用茯苓、泽泻、牡丹皮、丹参为佐,调和五脏气血,不使滋补太过;最后用石菖蒲、远志为使,以引药入清窍,充脑安神^[7]。复方地黄有益肾健脾、祛痰清瘀、滋阴养血的作用^[8],有研究报道用此药防治 AD 已经取得较好的效果^[9-10]。



1. 正常组;2. 模型组;3. 安理申 0.4 $g \cdot kg^{-1}$ 组;
4. 复方地黄 10.0 $g \cdot kg^{-1}$ 组

图 1 复方地黄对痴呆大鼠模型 GDNF mRNA 表达影响

4 讨论

随着世界人口日趋老龄化,人类平均寿命已经大为延长。因衰老而形成的老年疾病已成为目前医学研究的重点。老年疾病的防治不仅是一个医学问题,同时也是一个社会问题^[4]。

星形胶质细胞约占正常成人中枢神经系统细胞总数的 40%,对神经元有保护、支持、修复、营养功能。研究发现,星形胶质细胞释放的胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)、神经生长因子(NGF)等大量活性物质可以防止神经元凋亡,促进神经修复和神经生长^[5]。

本研究结果表明,与正常组大鼠比较,模型组大鼠海马 GDNF mRNA 表达明显降低,与模型组比较,复方地黄组大鼠海马 GDNF mRNA 表达明显增加,有正向调节作用。复方地黄治疗 AD 大鼠,可能通过刺激 GDNF 的表达,而发挥其恢复神经的功能,改善老年痴呆的症状。研究结果为临床应用提供了一定的依据。

[参考文献]

[1] 袁电杰,张印发,姚春香. 灵芝多糖对阿尔茨海默病模型大鼠海马内突触及突触素表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):151.

榄香烯注射液对鼻咽癌细胞株 CNE1 增殖和凋亡的影响

魏玮¹, 相芳^{1*}, 相红²

(1. 中国人民解放军第八一医院药剂科, 南京 210002;
2. 江苏省军区南京第一干休所门诊部, 南京 210037)

[摘要] 目的:探讨榄香烯注射液对鼻咽癌细胞株 CNE1 增殖和凋亡的影响。方法:分别用 20,10,5,2.5,0 g·L⁻¹榄香烯注射液处理 CNE1 细胞 12,24,48 h 后, Prestoblue 法检测细胞的增殖抑制率, 光镜观察细胞形态变化, Hoechst-PI 双染、流式细胞仪检测细胞的凋亡。结果:榄香烯注射液对 CNE1 细胞的增殖有抑制作用, 并呈剂量和时间依赖性, 处理 12,24,48 h 的 IC₅₀ 值分别为 (10.70 ± 0.26), (7.06 ± 0.11), (5.52 ± 0.10) g·L⁻¹; 光镜下显示, 给药后细胞大量凋亡, 折光性下降; 榄香烯注射液可诱导 CNE1 细胞凋亡。结论:榄香烯注射液能抑制 CNE1 细胞增殖并诱导其凋亡。

[关键词] 榄香烯注射液; 鼻咽癌; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0283-03

[doi] 10.11653/syjf2013100283

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130308.1037.001.html>

[网络出版时间] 2013-03-08 10:37

Effects of Elemene Injection on Proliferation and Apoptosis of Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line CNE1

WEI Wei¹, XIANG Fang^{1*}, XIANG Hong²

(1. Department of Pharmacy, the 81st Hospital of PLA, Nanjing 210002, China;
2. Nanjing First Cadre Sanatorium Clinic, Jiangsu Provincial Military District, Nanjing 210037, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of elemene injection on proliferation and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE1. **Method:** The cytotoxic effect of elemene injection (20, 10, 5, 2.5, 0 g·L⁻¹; 12, 24, 48 h) on CNE1 cells was tested by Prestoblue, cell morphological changes was observed by

[收稿日期] 20121217(645)

[第一作者] 魏玮, 研究生, 副主任药师, 从事抗肿瘤的中药研究, Tel:15877558947, E-mail:769334032@qq.com

[通讯作者] *相芳, 主管药师, 从事药事管理研究, Tel:13605144515, E-mail:shuangw1968@163.com

- [2] 仇成纤, 施侣元. 进一步重视我国老年性痴呆流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(12):931.
- [3] 王红梅, 宋彩梅, 刘新民, 等. 六味地黄丸对肾虚型老年痴呆动物模型的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5):112.
- [4] 赵立刚, 马莉. 针灸百会、大椎治疗老年性痴呆的疗效观察[J]. 针灸临床杂志, 2007, 23(9):42.
- [5] 王月菊, 陈贵海, 周江宁, 等. 阿尔茨海默病海马 CaMK II- α 神经元表达的变化[J]. 安徽医药, 2007, 1(11):64.
- [6] 杨斌. 复方地黄对老年痴呆动物模型学习记忆能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):195.
- [7] 孙丽慧, 费洪新, 纪慧. 复方地黄对老年痴呆小鼠形态影响和相关增殖因素变化的研究[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(12):2605.
- [8] 刘丹阳, 侯魁元. 复方地黄对快速老化痴呆小鼠脑组织凋亡机制的实验研究[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(6):66.
- [9] 冯靖涵, 蔡宝昌, 过伟峰, 等. 中医药治疗阿尔茨海默病的实验研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(4):394.
- [10] 李林, 张兰. 中药治疗阿尔茨海默病的作用特点[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(8):816.

[责任编辑 何伟]