

柴胡疏肝散对阿尔茨海默病大鼠记忆功能的相关研究

赵唯贤^{1*}, 李高申², 范新六³, 薛红莉¹, 黄显峰¹, 裴瑞¹, 李宁宁¹, 王黎¹

(1. 河南职工医学院, 郑州 451191; 2. 黄河科技学院, 郑州 450005;
3. 中国中医药国际合作中心, 北京 100101)

[摘要] **目的:**探讨柴胡疏肝散在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)治疗中的意义。**方法:**大鼠随机分6组,其中模型组(C),柴胡疏肝散低剂量和高剂量组(D,E),补肾组(F)均采用D-半乳糖(ip)和 β -淀粉样蛋白(A β)双侧海马注射联合造模,A β 造模成功后的第9d,D,E组分别ig给予柴胡疏肝散10,20 g·kg⁻¹,F组给予脑力宝20 g·kg⁻¹。各组均在每天上午9:00按10 mL·kg⁻¹的容积ig给药,连续ig 28 d。ig前后分别进行水迷宫行为学检测,最后处死动物取海马进行相关指标信使RNA(mRNA)表达的相对含量测定。**结果:**柴胡疏肝散高剂量组ig前后迷宫寻找平台时间分别为(17.34 ± 3.35), (12.78 ± 2.54) s,补肾组分别为(17.79 ± 2.25), (14.11 ± 2.66) s,2组ig前后比较及ig后与同期的模型组比较均有显著差异($P < 0.01$)。给药后,2组海马蛋白质磷酸酶-2A(PP-2A)mRNA的表达值分别为(0.230 4 ± 0.035), (0.199 4 ± 0.022 2),与模型组(0.099 ± 0.028 8)比较明显增加($P < 0.01$),而细胞周期依赖性蛋白激酶5(CDK-5)和糖原合成酶激酶3 β (GSK-3 β)mRNA的表达高剂量组,补肾组比较及高剂量,低剂量组比较均明显降低($P < 0.01$)。**结论:**柴胡疏肝散通过抑制动物海马GSK-3 β , CDK-5表达而增强PP-2A的表达,可以逆转A β 诱导的tau蛋白过度磷酸化,从而对记忆、认知障碍起到积极的调节作用。

[关键词] 阿尔茨海默病; 学习记忆; 糖原合成酶激酶3 β ; 细胞依赖性蛋白激酶5; 蛋白磷酸酶2A; 柴胡疏肝散

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0207-04

Effect of Chaihu Shugan San on Memory Function in Alzheimer's Disease Rats

ZHAO Wei-xian^{1*}, LI Gao-shen², FAN Xin-liu³, XUE Hong-li¹,
HUANG Xian-feng¹, PEI Rui¹, LI Ning-ning¹, WANG Li¹

(1. Henan Medical College for Staff, Zhengzhou 451191, China;

2. Huanghe Institute of Technology, Zhengzhou 450005, China;

3. China Center for International Cooperation of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100101, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Chaihu Shugan San on memory function in Alzheimer's disease (AD) rats. **Method:** Rats were randomly divided into six groups, including the model group (C), Chaihu Shugan San low-dose and high dose group (D, E), kidney group (F) are used by D-galactose and β -protein (A β) hippocampus co-injection modeling, A β after the success of modeling the first 9 d, D, E groups were given ig Chaihu Shugan San 10, 20 g·kg⁻¹, F group was given Naolibao 20 g·kg⁻¹. Each group were 9:00 in the morning by 10 mL·kg⁻¹ ig administration of volume, continuous ig 28 d. ig before and after the water maze behavioral testing, the last animals were killed for hippocampus-related indicators messenger RNA (mRNA) expression relative determination. **Result:** Chaihu Shugan San maze before and after high-dose group ig time finding the platform, respectively (17.34 ± 3.35), (12.78 ± 2.54) s, kidney groups were (17.79 ± 2.25), (14.11 ± 2.66) s, before and after the two groups of ig and ig with the same period in the model group, there was a significant difference ($P < 0.01$). After administration of the two groups hippocampal protein phosphatase-2A

[收稿日期] 20111017(015)

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2010C360001)

[通讯作者] * 赵唯贤, 本科, 副教授, 从事老年医学研究, Tel: 0371-62576687, E-mail: zhao6316@sina.com

(PP-2A) mRNA expression values were (0.2304 ± 0.035) , (0.1994 ± 0.0222) , with the model group (0.099 ± 0.0288) more significantly increased ($P < 0.01$), and cell cycle-dependent protein kinase 5 (CDK-5) and glycogen synthase kinase 3β (GSK- 3β) mRNA expression in high-dose group, kidney and high-dose group, low dose group were significantly lower ($P < 0.01$). **Conclusion:** Chaihu Shugan San hippocampus by inhibiting GSK- 3β , CDK-5 expression enhanced the expression of PP-2A, can reverse the $A\beta$ -induced tau protein hyperphosphorylation, and thus the memory, cognitive disorders play a positive regulatory the role.

[Key words] Alzheimer's disease; learning and memory; GSK- 3β ; CDK-5; PP-2A; Chaihu Shugan San

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。本课题通过研究柴胡疏肝散对调控 AD 病 tau 蛋白异常磷酸化相关的蛋白激酶及蛋白磷酸酶基因表达水平的影响, 初步探讨疏肝理气方剂在 AD 治疗中的意义, 以期筛选有效抗 AD 中药提供新的探索方向。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 雄性健康大鼠 (鼠龄 5 ~ 6 个月) 48 只, 体重 (300 ± 20) g, 由河南省实验动物中心提供, 许可证号 SCXK(豫)2010-0002。

1.2 药物

1.2.1 制备 每日 7:00 将柴胡疏肝散和脑力宝 2 组处方各称取 120, 90 g 分别放入 2 只 1 000 mL 瓷杯中, 各加 500, 400 mL 纯净水浸泡 30 min, 加盖旺火加热至水沸, 改微火煎煮 30 min, 煎后的药液过滤倒入另 2 只瓷杯中; 重将煎后的药物分别加水 400, 300 mL 再次加盖旺火煮沸微火煎煮 20 min, 过滤倒出与第 2 煎药液混合, 浓缩药液至规定浓度, 分装备用。

1.2.2 组成及配比 柴胡疏肝散: 柴胡、枳壳、白芍、陈皮、香附、川芎、甘草, 各药间质量比 2: 1.7: 1.7: 2: 1.7: 1.7: 1.7: 1, 柴胡疏肝散低、高剂量浓度分别为 1, 2 $g \cdot mL^{-1}$; 脑力宝: 远志、熟地黄、五味子、地骨皮、菟丝子、茯苓、石菖蒲、川芎, 各药间质量等比, 质量浓度为 2 $g \cdot mL^{-1}$, 均由我院科研科提供。

1.3 试剂 D-半乳糖 (D-gal, 国药集团化学试剂有限公司, F20110318), β -淀粉样蛋白 1-42 ($A\beta_{1-42}$, Sigma 公司, A-1010), TRIzol 试剂、SuperScriptTM III Reverse Transcriptase、5 \times RT 缓冲液, 10 000 \times Sybergreen, 2 \times ROX Reference Dye (以上试剂购于 Invitrogen)。MgCl₂ ($25 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$), 10 \times PCR 缓冲液, Taq 聚合酶 (以上试剂购于 Promega)。RNA 酶抑制剂 (Epicentre), 2.5 $\text{mmol} \cdot L^{-1}$ dNTP 混合液 (HyTest Ltd), Oligo (dT)₁₈ (上海生工生物工程公司), 100 bp DNA Ladder (天根生化科技公司)。

1.4 仪器 ABI 7900 Real time PCR 仪 (ABI), 引物设计软件: Primer 5.0, 2H-蓝星 B 型脑立体定位仪 (安徽淮北正华生物仪器设备有限公司生产), DMS-2 型 Morris 水迷宫系统 (中国医学科学院药物研究所)。

2 方法

2.1 动物分组与剂量 将大鼠适应性喂养 3 d 后, 随机分为空白组 (A 组)、生理盐水组 (B 组)、模型组 (C 组)、柴胡疏肝低、高剂量组 (D, E 组), 补肾组 (F 组) 共 6 组, 每组 8 只。大鼠 4 只/笼, 饲养于清洁级动物房, 光照节律 12L: 12D (6: 00 ~ 18: 00), 室内温度控制在 22.0 ~ 24.0 $^{\circ}C$, 相对湿度保持为 30% ~ 40%, 自由饮食饮水。A, C 组不进行药物干预; B 组选用生理盐水 10 $mL \cdot kg^{-1}$, D, E 组分别 ig 柴胡疏肝散 10, 20 $g \cdot kg^{-1}$ (均为 10 $mL \cdot kg^{-1}$), F 组 ig 脑力宝 20 $g \cdot kg^{-1}$ (10 $mL \cdot kg^{-1}$), 于 $A\beta$ 造模后的第 9 天, 每天上午 9:00 各 ig 1 次, 连续 ig 28 d。

2.2 模型制作 采用 D-gal ip 和 $A\beta$ 双侧海马注射联合造模^[1]。①用生理盐水将 D-gal 稀释成 10 $g \cdot L^{-1}$ 的溶液, 自造模第 1 天始, 每天上午 9:00 ~ 10:00, 对 C, D, E, F 各组大鼠 ip 1 次, 100 $mg \cdot kg^{-1}$; B 组 ip 等体积的生理盐水。2 组共计注射 42 d。②用无菌生理盐水事先将 $A\beta_{1-42}$ 稀释成 10 $g \cdot L^{-1}$, 在 37 $^{\circ}C$ 温箱中孵育 7 d, 使其变成为凝聚态的 $A\beta$ 。自 D-gal 造模结束的次日, 大鼠经 6% 水合氯醛 ($0.6 \text{ g} \cdot kg^{-1}$) 麻醉后, 固定于脑立体定位仪上, 常规消毒皮肤, 正中矢状切口, 选择双侧海马 CA1 区作为注射靶区, 前囟向后 3 mm, 中线旁开 2.2 mm 处, 分离骨膜, 用牙科钻钻开颅骨, 暴露硬脑膜, 微量注射器垂直进针 2.8 mm, 将 $A\beta_{1-42}$ 溶液 1 μL 缓慢注入, 留针 5 min 保证溶液充分弥散, 然后缓慢撤针, 用灭菌医用骨蜡填补骨孔, 缝合切口, 碘伏消毒, 并注射青霉素钠每只 8 万 U 预防感染, 每日 1 次, 连用 3 d, 常规饲养; B 组海马注射等体积灭菌生理盐水, 方法同造模组。

2.3 水迷宫行为学检测 各组分别自 $A\beta$ 造模的

第5天(ig干预前)和第37天(ig干预结束次日),各进行水迷宫行为学检测一轮(连续3d),实验在上午9:00进行,每天将所有实验大鼠检测1遍,连续检测3d。方法:将大鼠自第I~IV4个象限放入,分别记录寻找安全平台的时间,取各组大鼠各象限连续3d测得时间的平均值进行统计分析。

2.4 观察指标项目及方法

2.4.1 取材 在末次水迷宫行为学检测后的次日,

分别将各组大鼠经6%水合氯醛($0.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉后断头,冰上剥离取双侧海马,即刻置入液氮速冷, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.4.2 海马 RNA 的提取和质量鉴定 使用 TRIzol 试剂提取 RNA,质量鉴定包括紫外吸收测定法和变性琼脂糖凝胶电泳^[2]。

2.4.3 引物设计 引物由上海康成生物工程公司合成,序列见表1。

表1 目的基因引物序列

基因名	引物序列	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	产物长度/bp
GSK-3 β	F:5'-CCGCCCGGCTAACACCACTG-3' R:5'GTGCTGGTCTTTCCCGCGCA-3'	60	326
cdk-5	F:5'-CCGGGGCCGGGAGTCTTAGAA-3' R:5'CCGGAGGGCTGAACTTGGCAC-3'	60	204
PP-2A	F:5'-TGAGCTGCCTGCAGAAATGTAAGGC-3' R:5'TCTGCAGAGCTGGAAGCCCAA-3'	60	96
GAPDH	F:5'-GGAAAGCTGTGGCGTGAT-3' R:5'AAGGTGGAAGAATGGGAGTT-3'	59	308

2.4.4 Real time PCR 反应 反应体系组成:dNTP ($2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ each) $1.0\text{ }\mu\text{L}$, $10\times$ PCR 缓冲液 $1.0\text{ }\mu\text{L}$, MgCl_2 溶液 $0.6\text{ }\mu\text{L}$, Taq 聚合酶 0.5 units , SybergreenI 终浓度 $0.25\times 10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PCR 特异引物 F $0.4\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PCR 特异引物 R $0.4\text{ }\mu\text{L}$, $2\times$ ROX Reference Dye $0.2\text{ }\mu\text{L}$ 加水至总体积为 $8\text{ }\mu\text{L}$ 。各指标分别按以下程序进行: GAPDH: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 min ; 40 个 PCR 循环($95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 s ; $59\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 s ; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 s ; $83\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 s (收集荧光))。GSK-3 β : $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 min ; 40 个 PCR 循环($95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 s ; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 s ; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 s ; $83\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 s (收集荧光))。CDK-5: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 min ; 40 个 PCR 循环($95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 s ; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 s ; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 s ; $83\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 s (收集荧光))。PP-2A: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 min ; 40 个 PCR 循环($95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 s ; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 s ; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 s ; $81\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 s (收集荧光))。每个样品的目的基因浓度除以其管家基因的浓度,即为此样品此基因的校正后的相对含量。

2.5 统计学方法 实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两两比较采用 Student' t 检验,组间比较用单因素方差分析检验。运用 SSSP 12.0 软件进行分析,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组水迷宫成绩比较 仅造模手术对大鼠智力影响较小,灌注刺激也不会给大鼠的记忆功能造

成影响。ig 给药前经 A β 造模的各组与空白组比较差异明显($P<0.05$),提示本次造模成功。ig 后柴胡疏肝散高剂量组和脑力室组与同组 ig 前及与同期的模型组比较,均明显缩短了迷宫寻找平台时间($P<0.01$)。见表2。

表2 各组大鼠水迷宫寻找平台时间的比较($\bar{x}\pm s, n=8$) s

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	给药前	给药 31 d 后
空白	-	11.06 ± 2.30	9.70 ± 2.89
生理盐水	-	11.44 ± 2.56	10.47 ± 2.84
模型	-	$17.31\pm 3.68^{1)}$	$17.41\pm 2.93^{1)}$
柴胡疏肝散	10	$16.93\pm 3.85^{1)}$	14.52 ± 2.81
	20	$17.34\pm 3.35^{1)}$	$12.78\pm 2.54^{1,2)}$
脑力宝	20	$17.79\pm 2.25^{1)}$	$14.11\pm 2.66^{1,2)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与灌胃前及与同期模型组比较²⁾ $P<0.01$;与柴胡疏肝散 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组比较³⁾ $P<0.01$ (表3同)。

3.2 各组大鼠海马相关指标 mRNA 表达的相对含量 荧光定量 PCR 结果显示:模型组大鼠海马 PP-2A mRNA 的表达较空白组明显降低($P<0.01$),而 CDK-5 和 GSK-3 β mRNA 的表达较空白组明显增加($P<0.01$)。与模型组比较,疏肝高剂量组和脑力宝组大鼠海马 PP-2A mRNA 的表达明显增加($P<0.01$)。与模型组比较,疏肝高剂量组和脑力宝组大鼠海马 CDK-5 和 GSK-3 β mRNA 的表达明显降低($P<0.01$)。与疏肝低剂量组比较,疏肝高剂量组

大鼠海马 CDK-5 和 GSK-3 β mRNA 的表达明显降低 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 各组大鼠海马相关指标 mRNA 表达的相对含量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PP-2A/GAPDH	CDK-5/GAPDH	GSK-3 β /GAPDH
空白	-	0.363 \pm 0.047	0.104 \pm 0.013	0.087 \pm 0.011
生理盐水	-	0.273 \pm 0.069	0.098 \pm 0.001	0.082 \pm 0.008
模型	-	0.099 \pm 0.029 ¹⁾	0.312 \pm 0.034 ¹⁾	0.269 \pm 0.016 ¹⁾
柴胡疏肝散	10	0.163 \pm 0.044	0.224 \pm 0.022 ²⁾	0.165 \pm 0.009 ²⁾
	20	0.230 \pm 0.035 ²⁾	0.187 \pm 0.009 ^{2,3)}	0.126 \pm 0.009 ^{2,3)}
脑力宝	20	0.199 \pm 0.022 ²⁾	0.206 \pm 0.018 ²⁾	0.119 \pm 0.008 ^{2,3)}

4 讨论

GSK-3 β 和 CDK-5 属于蛋白激酶,其活性增加能使 tau 蛋白发生异常磷酸化。GSK-3 β 内含 420 个氨基酸,第 9 位丝氨酸磷酸化引起酶活性抑制,第 216 位丝氨酸磷酸化致酶激活,其功能异常将引起 tau 蛋白异常磷酸化、神经元凋亡和轴突转运障碍。CDK-5 是脯氨酸指导的蛋白激酶,只催化在 C 端连有脯氨酸的丝氨酸或苏氨酸残基的磷酸化,在 tau 蛋白分子中,许多位点是脯氨酸指导的位点,因此能被 CDK-5 有效的磷酸化。CDK-5 基因在大鼠脑组织中的过量表达会导致动物出现 AD 样 tau 过度磷酸化和空间记忆障碍^[3]。PP-2A 属于蛋白磷酸酯酶,在信号传导中承担负性调节作用,其活性增加,可使过度磷酸化的 tau 蛋白发生去磷酸化^[4]。

中医认为,肝主藏魂,魂是阳之精,气之灵,具体来说,魂与神有密切联系,对心理活动会产生较大影响^[6]。因此,理论上支持疏肝法在改善记忆,认知能力障碍上的应用。部分实验研究^[6,9]也表明疏肝方剂能调节记忆,认知方面的障碍。

本实验结果表明,柴胡疏肝散大剂量组经灌胃干预后,大鼠寻找平台的时间较灌胃前及同期模型组比较显著缩短 ($P < 0.01$),其对大鼠记忆能力的提高不低于补肾组。印证了疏肝理气方药对记忆,认知障碍的调节作用,充分显示了以疏肝理气立方在阿尔茨海默病治疗中的意义。

海马神经元凋亡可能是慢性应激长期损伤海马的作用机制之一^[10]。Real time PCR 反应提示,与单纯使用 β 处理组比较,柴胡疏肝散高剂量组通过抑制动物海马 GSK-3 β ,CDK-5 表达而增强 PP-2A 的表达,可以逆转 β 诱导的 tau 蛋白过度磷酸化,从而对老年痴呆有一定的治疗作用。比较而言,柴胡疏肝散高剂量组较低剂量组作用明显。与 AD 模型

组比较,柴胡疏肝散高剂量组迷宫学习成绩明显提高。提示柴胡疏肝散改善痴呆大鼠学习记忆能力,与调节蛋白激酶和磷酸酯酶系统平衡有关。

[参考文献]

[1] 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.

[2] Xiang X, Qiu D, Heger J S, et al. Comparison of different methods of total RNA extraction for viral detection in sputum[J]. J Virol Methods, 2001, 94(1/2):129.

[3] Ratan V. Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CAN therapeutics[J]. J Neurochem, 2004, 10:471.

[4] Stokin G B, Lillo C, Falzone T L. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Science, 2005, 307:1282

[5] 杨维益,王天芳,李峰,等. 肝脏在五脏中的地位演变[J]. 中国医药学报,1995,10(3):10.

[6] 吴红彦,王虎. 逍遥散及其拆方对老年性痴呆模型小鼠学习记忆能力及抗氧化能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(10):102.

[7] 瞿礼萍,曾南,梁珂,等. 逍遥散对慢性温和应激模型小鼠行为学及空间学习记忆能力的影响[J]. 中药药理与临床,2007,23(5):18.

[8] 李维,孔烈,李峰. 四逆散对运动性疲劳大鼠海马突触素的调节作用[J]. 中国康复理论与实践,2009,15(8):739.

[9] 范新六,李峰,宋月晗,等. 加味四逆散对异相睡眠剥夺大鼠前额叶皮质突触可塑性改变的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(19):1960.

[10] 樊蔚虹,姚建平,赵文景. 柴胡疏肝散对卒中后抑郁大鼠海马组织 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):181.

[责任编辑 聂淑琴]