

复方脑康胶囊对 *D*-半乳糖老化小鼠海马 神经元凋亡级联反应的影响

胡文军^{1,2}, 邓朝晖², 李国锋^{1*}

(1. 南方医科大学南方医院药剂科, 广州 510515;

2. 广州军区联勤部药品仪器检验所, 广州 510500)

[摘要] **目的:**观察复方脑康胶囊水提液对 *D*-半乳糖老化小鼠海马神经元凋亡级联反应的影响。**方法:**将小鼠随机分为 5 组:正常对照组(E 组),*D*-半乳糖模型组(D 组),复方脑康胶囊高、中、低剂量组(A,B,C 组)。每日 sc *D*-半乳糖 60 mg·kg⁻¹ 造模,给模型小鼠复方脑康胶囊水提液(0.65,0.35,0.15 g·kg⁻¹)ig,连续 3 个月。用免疫组织化学染色方法和 Western blotting 检测海马神经元凋亡诱导因子(AIF),Bax,细胞色素 C(Cyt C)及 Bcl-2 的表达。**结果:**Western blotting 结果显示,模型组 Cyt c, Bax, Bcl-2 表达量较正常对照组减少,而药物组表达量与正常对照组相似。免疫组织化学染色结果显示,模型小鼠海马神经元 AIF,Bax,Cyt C 的阳性细胞数分别比正常对照小鼠增加,而 Bcl-2 则比正常小鼠减少。与模型组相比,复方脑康胶囊水提液高、中、低 3 种不同剂量模型小鼠海马神经元 AIF 阳性细胞数从(24.7±6.1)个降低为(8.9±1.82),(12.6±4.51),(13.2±5.71)个;Bax 阳性细胞数从(47.8±9.7)个降低为(11.2±3.2),(29.4±8.2),(31.1±6.3)个,Cyt C 阳性细胞数从(36.7±9.1)个降低为(12.1±3.2),(20.2±6.8),(25.2±7.1)个,Bcl-2 阳性细胞数从(10.4±6.4)个增加为(59.5±7.4)个,(48.6±9.2)个,(32.3±7.0)个。**结论:**复方脑康胶囊对 *D*-半乳糖老化小鼠的海马神经元凋亡级联反应具有一定的改善作用。

[关键词] 复方脑康胶囊;*D*-半乳糖老化小鼠;凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0198-04

Effect of Compound Naokang Capsule on the Apoptosis Cascade Reaction of Hippocampus Neurons in Mouse Aging Model Induced by *D*-Galactose

HU Wen-jun^{1,2}, DENG Zhao-hui², LI Guo-feng^{1*}

(1. *Pharmaceutical Department of Nanfang Hospital, Southern Medical University,*

Guangzhou 510515, China; 2. *Institute for Drug and Instrument Control of*

Guangzhou Military Region, Guangzhou 510500, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of compound Naokang capsule liquid extract on apoptosis cascade reaction of hippocampus neurons in mouse aging model induced by *D*-galactose. **Method:** The mice were randomly divided into 5 groups: normal control group (group E), *D*-galactose model group (D group), high dose group (A group), middle dose group (B group), low dose group (C group). 60 mg·kg⁻¹ of *D*-galactose was sc given to the mice to produce AD model mice daily. Different doses of compound Naokang capsule liquid extract were given to model mice. The expression of apoptosis inducing factor (AIF) of hippocampus neuron, bax, cytochrome C (Cyt C) and Bcl-2 was tested by immunohistochemical staining and Western blotting. **Result:** The result of Western blotting showed that expression in the model group decreased, while the treatment groups were similar to the control group. The immunohistochemical staining results showed that, compared with control group,

[收稿日期] 20110712(013)

[第一作者] 胡文军,博士研究生,副主任药师,Tel:020-38198373,E-mail:Stars3@sina.com

[通讯作者] *李国锋,博士生导师,教授,Tel:020-62787724,E-mail:lgfnf@fimmu.com

the number of AIF positive cells was reduced from 24.7 ± 6.1 to 8.9 ± 1.8 , 12.6 ± 4.5 , 13.2 ± 5.7 ; the number of Bax positive cells was reduced from 47.8 ± 9.7 to 11.2 ± 3.2 , 29.4 ± 8.2 , 31.1 ± 6.3 , the number of Cyt C positive cells was reduced from 36.7 ± 9.1 to 12.1 ± 3.2 , 20.2 ± 6.8 , 25.2 ± 7.1 , and the number of Bcl-2 positive cells was increased from 10.4 ± 6.4 to 59.5 ± 7.4 , 48.6 ± 9.2 , 32.3 ± 7.0 . **Conclusion:** The apoptosis cascade reaction of hippocampus neurons in mouse aging model induced by *D*-galactose is obvious, which can be partly improved by compound Naokang capsule liquid extract.

[**Key words**] compound Naokang capsule; aging mouse induced by *D*-galactose; apoptosis

阿尔茨海默病(AD)是老年人最常见的神经系统退行性疾病,目前尚无根治AD的有效方法。*D*-半乳糖老化模型小鼠存在学习、记忆功能障碍和海马神经元超微结构改变、海马神经元神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、神经营养因子-3(neurotrophin-3, NT-3)免疫阳性反应细胞数减少,并出现凋亡级联反应,部分神经元出现凋亡,可作为研究AD的动物模型^[1]。复方脑康胶囊是由广州军区联勤部药品仪器检验所研制,由生地黄、龟甲、红花、石菖蒲、核桃仁、益智仁等组成的复方中药制剂,具有补肾益精,行气活络,生血壮骨,活血祛瘀等功效。临床用于治疗精神发育迟滞、脑瘫、癫痫、脑血管病后遗症、脑外伤后遗症等多种脑病而伴发各种智力和肢体功能障碍的患者,疗效确切。本文以*D*-半乳糖老化小鼠为动物模型,研究复方脑康胶囊水提液对海马神经元的凋亡级联反应的影响,为复方脑康胶囊的药效学研究和临床应用提供依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 复方脑康胶囊(由生地黄、龟甲、红花、石菖蒲、核桃仁、益智仁等组成,规格0.25 g/粒,广州军区联勤部药品仪器检验所提供,批号20100510,临床用法:15粒/d)。*D*-半乳糖(北京化学试剂公司,批号100805);SP试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

1.2 动物 昆明小鼠,雄性,体质量25~29 g,购自广州军区广州总医院实验动物中心,动物许可证号SCXK(粤)2010-1005。

1.3 仪器 1100型高效液相色谱仪,美国Agilent公司生产;PB1502-S型精密电子天平,瑞士梅特勒公司生产;微量注射器(5 μ L),瑞士Hamilton;倒置相差显微镜,日本Olympus公司生产;KSB-1A型超净工作台,天津尘埃净化设备厂。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备 将小鼠随机分为5组:正常对照组(E组),*D*-半乳糖模型组(D组),复方脑康胶囊高剂量药物组(A组)、中剂量药物组(B

组)、低剂量药物组(C组),每组10只动物。A,B,C,D组小鼠每日sc半乳糖60 mg·kg⁻¹,A,B,C3个处理组分别用复方脑康胶囊水提取液灌胃,给药剂量分别相当于生药量0.65,0.35,0.15 g·kg⁻¹,E组每日给动物注射并灌注等量的生理盐水,连续3个月,并置于SPF环境中饲养,光照:明暗各12 h,温度22℃,湿度65%~75%。

2.2 复方脑康胶囊水提取液的制备 取胶囊内容物,用冷蒸馏水浸泡48 h,离心,取上清,将上清液调整为含生药0.5 g·mL⁻¹,调pH 7.4,高压灭菌,4℃冰箱保存备用。

2.3 免疫组织化学染色^[2] 3个月后,每组各取8只小鼠进行取材。用100 g·L⁻¹水合氯醛腹腔注射麻醉,开胸暴露心脏,于小鼠左心室迅速插管,同时剪开右心耳,快速灌注生理盐水,待肝脏变白后,改灌4%多聚甲醛固定液,至小鼠僵硬。取脑投入4%多聚甲醛溶液中固定24 h,待脑组织下沉后,取中段进行冷冻切片,厚度为40 μ m。采取漂浮染色法进行免疫组织化学染色;实验步骤按常规方法进行,阴性对照以正常兔血清替代I抗。

在显微镜下观察海马神经元,并进行免疫反应阳性细胞计数形态学研究。每组动物于相应海马的部位连续切片,每隔3张取1张进行免疫组化染色,分析结果时,每只鼠脑取3张相同部位的脑切片,在10倍物镜下计算视野中海马CA1区的阳性神经元数目。

2.4 Western blotting^[3] 3个月后,小鼠断头取脑,剥离双侧海马,称重后加入组织裂解液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.4, 10 g·L⁻¹ PMSF, 10 g·L⁻¹ 亮肽素)进行组织匀浆,13 000 $\times$ g, 4℃离心30 min,取上清分装, -20℃冻存备用;Lowery's法进行蛋白定量。

2.5 凋亡诱导因子(AIF)、Bax、细胞色素(Cyt C)多克隆抗体的制备 用固相法合成AIF, Bax, Cyt C, Bcl-2多肽片段,用HPLC纯化后,分别与KLH交联,制备小鼠、兔多克隆抗体。该两种抗体经ELISA鉴定

抗体滴度均在 1:32 000 以上,吸收试验均为阴性。表明抗体的效价及特异性均可满足实验条件的需要。

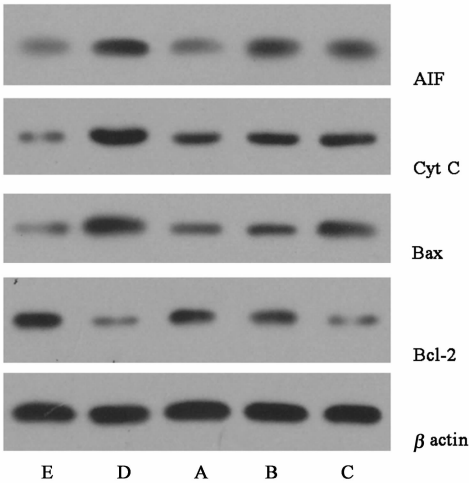
2.6 统计学分析 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 13.0 软件对所得数据进行方差分析比较各组间差异。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 Western blotting 检测 Cyt C 在 11 ku 处有一清晰的条带,Bax 在 21 ku 处有一清晰的条带,Bcl-2 在 26 ku 处有一清晰的条带。模型组表达量较正常对照组减少,而药物组表达量与正常对照组相似(图 1)。

3.2 免疫组织化学染色 AIF,Bax,Cyt C 免疫组织化学染色结果显示,正常对照组的阳性细胞在海马广泛分布,细胞数量与模型组存在显著差异。模型小鼠海马神经元 AIF,Bax,Cyt C 阳性细胞数分别比正常对照小鼠增加 3.7,6.1,3.7 倍。高倍镜下在皮质与海马可见胞浆及突起(两三级),内有棕黄色阳性反应颗粒,胞核不着色,阳性细胞为梭形或星形。复方脑康胶囊 3 个剂量组海马阳性反应细胞着色浅,少有突起,细胞数目少,均不同程度使这 3 种蛋白质表达的异常有所恢复。见图 2~3,表 1。

Bcl-2 免疫组织化学染色结果显示,模型小鼠及中药组深染的阳性细胞在海马广泛分布,细胞计数



A. 复方脑康胶囊 0.65 g·kg⁻¹组; B. 复方脑康胶囊 0.35 g·kg⁻¹组; C. 复方脑康胶囊 0.15 g·kg⁻¹组; D. D-半乳糖模型组; E. 正常对照组(图 2~3 同)

图 1 小鼠海马神经元 Bax,Cyt C,Bcl-2 Western blotting 检测

与正常对照组有显著性差异,模型小鼠海马神经元阳性细胞数仅为正常小鼠的 12%。高倍镜下观察海马阳性反应细胞可见,正常对照组着色浅,少有突起,细胞数目少;模型组在皮质与海马可见胞浆及突起,突起分支达三四级,胞浆内有棕黄色阳性反应颗粒,胞核不着色,阳性细胞为梭形或星形。结果见图 2~3。海马阳性神经元数目见表 1。

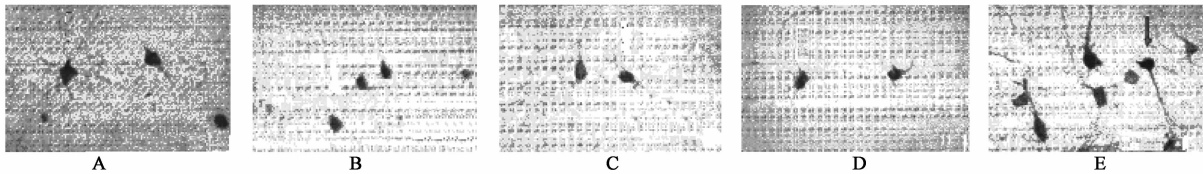


图 2 小鼠海马 Cyt C 免疫组化染色(×400)

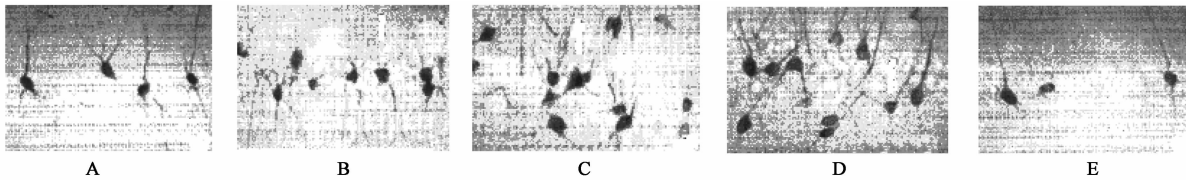


图 3 小鼠海马 Bcl-2 免疫组化染色(×400)

表 1 各组小鼠海马神经元免疫反应阳性细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AIF	Bax	Cyt C	Bcl-2
正常对照	—	6.7 ± 2.4	7.9 ± 2.4	9.9 ± 3.7	69.8 ± 7.3
模型	—	24.7 ± 6.1	47.8 ± 9.7	36.7 ± 9.1	10.4 ± 6.4
复方脑康胶囊	0.65	8.9 ± 1.8 ²⁾	11.2 ± 3.2 ²⁾	12.1 ± 3.2 ²⁾	59.5 ± 7.4 ²⁾
	0.35	12.6 ± 4.5 ¹⁾	29.4 ± 8.2 ¹⁾	20.2 ± 6.8 ¹⁾	48.6 ± 9.2 ²⁾
	0.15	13.2 ± 5.7 ¹⁾	31.1 ± 6.3 ¹⁾	25.2 ± 7.1 ¹⁾	32.3 ± 7.0 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

复方脑康胶囊是由红花、生地黄、龟甲、枸杞子、川芎、枳实、石菖蒲、当归、地龙、酸枣仁、泽泻、冬虫夏草等 13 味药组成的中药复方制剂。该方使用生地黄为君药,滋阴增液,补肾养血兼以清热,精血并补,配以冬虫夏草强化益肾补肺化痰醒脑以治其本。龟甲、枸杞子、当归为臣药,龟甲入肾,滋阴补肾,养血益精,又可平肝潜阳,为治肾亏腰酸、健忘眩晕之要药;枸杞子补肾益髓,养肝明目;当归功能补血养营,又能调肝和血,化瘀通滞,3 药共用以助君药补益肝肾以化生精血。再用红花活血化瘀,与当归为伍,可促进血脉通行,使血瘀消,血脉通,精血上承以濡养髓海。地龙入络,性善走窜,长于通经活络,其与当归、红花相配,补血行血,通经活络,以增强疗效。石菖蒲、远志、培植牛黄开窍化痰,宁神益智;酸枣仁养肝血,安心神;泽泻清泄肾浊,利水渗湿;枳实理气,宽中,化滞消痞,与诸滋补之品合用,可制约诸药之厚腻,使该方滋而不腻,补中有通,是为佐药。佐药之用,一则可活血化瘀,通经活络,使瘀血去,血脉通,二则另作为引药入脑,兼为使药。诸药合用,共奏填精补髓、补肾养血、化瘀开窍之功,其填补精血力宏,且滋而不腻,补中有通,使髓海盈,痰瘀化,血络通,心窍通,心神宁,从而使人聪慧而不愚痴。

有关研究表明,AD 的特征性病理变化之一是脑内神经元数目的明显减少,尤以基底前脑和海马区受累最为严重,神经元的减少平均达 47%。目前认为细胞凋亡可能是引起 AD 神经元数目减少的重要原因^[4-5]。本研究发现模型小鼠海马神经元 AIF,

Bax, Cyt C 的阳性细胞数分别比正常对照小鼠增加数倍,而 Bcl-2 则比为正常小鼠大为减少,结合 Western blot 定性结果,显示 *D*-半乳糖可致小鼠的海马神经元产生明显的凋亡级联反应,*D*-半乳糖老化小鼠可作为 AD 研究的模型。

复方脑康胶囊水提液 3 种不同剂量均不同程度使 AIF, Bax, Cyt C 和 Bcl-2 这 4 种蛋白质表达的异常有所恢复,提示复方脑康胶囊水提液对改善 *D*-半乳糖老化小鼠凋亡级联反应有一定作用。本实验结果可为复方脑康胶囊治疗 AD 提供一定的实验基础和理论参考。

[参考文献]

[1] 谢日青,陶涛,陈民利,等. *D*-半乳糖致衰老模型大鼠的学习记忆和行为学观察及中药干预作用[J]. 中国比较医学杂志,2010,20(5):32.

[2] 周小鸽. 免疫组织化学染色的干扰因素及其处理[J]. 临床与实验病理学杂志,2006,22(4):389.

[3] 孔令泉,蒲莹晖,马仕坤,等. 快慢转法及不同滤膜和显色检测法在 Western blotting 中的应用分析[J]. 南方医科大学学报,2008,28(1):26.

[4] Eckert A, Marques C A, Keil U, et al. Increased apoptotic cell death in sporadic and genet Alzheimer's disease[J]. Ann NY Acad Sci, 2003,1010:604.

[5] 王永丽,魏芳,韩璇,等. 清开灵对 AD 小鼠学习记忆及脑组织 β -淀粉样蛋白水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):192.

[责任编辑 聂淑琴]