

# 钩藤散对 AD 模型大鼠海马 CA1 区相关指标的影响

钟荣玲, 黄厚才\*, 夏智, 宋捷, 杨德功

(江苏省中医药研究院, 南京 210028)

**[摘要]** **目的:**观察钩藤散对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠海马 CA1 区相关指标的影响。**方法:**用  $\beta$ -淀粉样蛋白( $A\beta_{1-40}$ )海马注射建立 AD 大鼠模型,然后分成钩藤散高、中、低剂量、模型、正常对照 5 个组,钩藤散分别用 5, 2.5, 1.25  $g \cdot kg^{-1}$  ig AD 大鼠,每天 1 次,连续给药 15 d,14 d 时迷宫法测定其行为学指标,末次给药后 1 h 将动物麻醉、心脏灌注、取脑、制作海马 CA1 区病理切片,用免疫组化法测定神经细胞数,  $A\beta$ , 突触后密度蛋白-95(PSD-95)阳性细胞数和平均吸光度(A)。**结果:**行为学测试成绩:对照组、各给药组均好于模型组( $P < 0.01$ ),说明模型制作成功并提示钩藤散有益智作用;CA1 区的神经细胞数、PSD-95 阳性细胞数和平均 A:各给药组均高于模型组( $P < 0.001$ ); $A\beta$  阳性细胞数和平均 A:各给药组均低于模型组( $P < 0.01$ ),说明钩藤散能有效降低脑组织  $A\beta$  含量、提高 PSD-95 水平,保护神经细胞。**结论:**钩藤散对 AD 模型大鼠海马组织有一定保护作用。

**[关键词]** 钩藤散; AD 模型大鼠; 海马;  $\beta$ -淀粉样蛋白; PSD-95

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0211-04

## The Effect of Gouteng San on the Related Indicators on the Hippocampal CA1 Area in Alzheimer's Disease Model Rat

ZHONG Rong-ling, HUANG Hou-cai\*, XIA Zhi, SONG Jie, YANG De-gong

(Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the regulatory effect of Gouteng San on the related indicators on the hippocampal CA1 area in Alzheimer's disease (AD) model rat. **Method:** AD rat model was established by hippocampal injection of  $\beta$ -amyloid protein ( $A\beta_{1-40}$ ), and then divided into high, meddlu and low-dosage, the model and normal control group. Oral administration of Gouteng San (5, 2.5, 1.25  $g \cdot kg^{-1}$ ) was started for 15 constitutive days. The maze behavioral indicators were measured at day 14. After administration of Gouteng San for

**[收稿日期]** 20111130(004)

**[基金项目]** 江苏省中医药研究院项目(BK201023126)

**[第一作者]** 钟荣玲, 大学本科, 助理畜牧师, 从事实验动物管理与动物实验, Tel:13770848185, E-mail:wency@163.com.

**[通讯作者]** \* 黄厚才, 硕士, 副研究员, 从事实验动物管理与动物实验, Tel:13372018795, E-mail:huanghoucai@sina.com.

同浓度的 NaCl 溶液作为洗脱剂,取得了较好的分离效果。且 DEAE-纤维素柱层析法较乙醇分部沉淀法,超滤法等非柱层析法分离效能高,DEAE-纤维素的价格也远远低于凝胶,是一种分离酸性多糖的较为理想的方法。

### [参考文献]

[1] 张一芳,冯怡,徐德生. 枸杞多糖对大鼠实验性胃溃疡的作用研究[J]. 中国药业,2011,20(1):14.

[2] 张晓莉,李玉婷,王亚贤,等. 红花多糖的提取与含量

测定[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):19.

[3] 韦奇志,周智. 胃乐胶囊的抗溃疡作用实验研究[J]. 广东药学院学报,2000,16(4):300.

[4] 陈文,何晓晖,徐泽宇,等. 双蒲散抗溃疡作用的实验研究[J]. 中成药,2008,30(5):654.

[5] 沈鸿,张英华,田甲丽,等. 胃舒安胶囊对动物实验性胃溃疡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(13):174.

[责任编辑] 聂淑琴

1 h, the rats were given anesthesia and cardiac perfusion to obtain the brain, make hippocampal CA1 district biopsy, and immunohistochemical determination was used to assay nerve cells,  $A\beta$ , postsynaptic density-95 (PSD-95) positive cells and mean optical density value. **Result:** After the treatment of Gouteng San, behavioral test results showed that that Gouteng San could improve the learning and memory ability in the rats. The nerve cells in CA1 region, PSD-95 positive cells and average optical density values were higher than model group ( $P < 0.001$ ),  $A\beta$  positive cells and the mean optical density values were lower than the model group ( $P < 0.01$ ), indicating that Gouteng San could effectively reduce  $A\beta$  levels in the brain tissue while increasing PSD-95 positive cells and protecting nerve cells. **Conclusion:** Gouteng San has a protective effect on the hippocampus area in AD rats.

[**Key words**] Gouteng San; AD model rat; hippocampus;  $\beta$ -amyloid protein; postsynaptic density-95

作者的前期研究表明钩藤散对 Alzheimer's Disease (AD) 动物模型有一定的疗效, 为了进一步探讨其作用机制, 本实验用  $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $A\beta_{1-40}$ ) 海马注射建立 AD 大鼠模型, 观察钩藤散对 AD 模型大鼠脑组织海马 CA1 区神经细胞、 $A\beta$  及突触后密度蛋白-95 (PSD-95) 的影响, 了解钩藤散对脑组织的保护作用。

## 1 材料

**1.1 中药** 钩藤散由钩藤、陈皮、麦冬、半夏、茯苓各 3 g, 人参、防风、菊花各 2 g, 生姜、甘草各 1 g, 石膏 5 g 等 11 味药组成, 由本院中药制剂室按传统方法水提、浓缩、消毒等制成钩藤散浸膏。临用前每 19 mL 钩藤散浸膏加蒸馏水配至 100 mL, 成 0.5 g 生药/mL 溶液, 实验中所用剂量均以生药量计。

**1.2 动物** SD 大鼠, 220 ~ 240 g, 6 周龄, 清洁级, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号 SCXK(沪)2007-0005。

**1.3 试剂** 兔抗  $A\beta$ -淀粉样蛋白单克隆抗体, 兔抗 PSD-95 蛋白单克隆抗体,  $A\beta_{1-40}$ , Sigma 公司; DBA 显色试剂盒 (上海生物制品研究所); 辣根过氧化物酶 (HRP) B 标记的链霉卵白素, 北京鸿跃科技有限公司; 山羊血清, 郑州益康生物工程有限公司。

**1.4 仪器** Olympus 倒置显微镜 (日本产), SW-CJ-2FD 医用型净化工作台 (苏净集团安泰公司产), 酶标仪 (芬兰产), SN-2 型鼠脑立体定位仪 (日本产), 石蜡切片机 (Leitz) (德国产), 微量进样器 (上海安亭微量进样器厂生产), MG-2 迷宫 (张家港市生物医学仪器厂生产)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 220 ~ 240 g SD 大鼠 50 只, 随机分为对照、模型、钩藤散高、中、低剂量 5 个组, 每组 10 只, 雌雄各半。

**2.2  $A\beta_{1-40}$  的孵育** 用无菌生理盐水将  $A\beta_{1-40}$  稀

成  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 1 周, 使其变为凝聚态的  $A\beta_{1-40}$ 。

**2.3 AD 动物模型的复制** 将模型、钩藤散高、中、低剂量组大鼠麻醉后固定于大鼠于脑立体定位仪上, 参照 George Paxinos 等著, 诸葛启钊主译的《大鼠脑立体定位图谱》用微量注射器向大鼠左侧海马区 (以 Bregma 点为 0 点, AP-3.0 mm, ML-2.0 mm, DV-2.9 mm) 注入凝聚态  $A\beta_{1-40}$  5  $\mu\text{L}$ , 留针 5 min, 以使  $A\beta$  充分弥散, 然后缓慢撤针, 用牙科泥封好颅骨, 撒消炎粉, 缝合切口。对照组注入等容积生理盐水, 方法同造模组, 术后动物单笼饲养, 肌注青霉素 (40 万 U/只/d) 抗感染, 连续 4 d。

**2.4 动物给药** 大鼠造模后第 5 天开始给药, 钩藤散高、中、低剂量组 (5.0, 2.5, 1.25  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 模型对照组与正常组每天给等体积的蒸馏水, 每天 1 次, 每次 20  $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 连续给药 15 d。

**2.5 电迷宫法<sup>[1]</sup>行为学测试** 给药 14 d 后进行行为学实验, 训练时, 将大鼠放入 I 臂起步区停留 3 min 后给予电击 (35 V), 按 I  $\rightarrow$  II  $\rightarrow$  III  $\rightarrow$  I 或 I  $\rightarrow$  III  $\rightarrow$  II  $\rightarrow$  I 连续试验。a 项: 大鼠到达安全区停留 0.5 min, 然后取出放回原臂, 1 min 后给予下次电击, 达到连续 2 次直接逃至安全区后, 以逃入的安全区作为起步区进行电击训练。当大鼠在三臂均达到连续 2 次直接逃至安全区后, 进行 b 项试验。b 项: 大鼠在 I 臂起步区停留 1 min 后给予电击, 逃至安全区停留 0.5 min, 再以此区作为起步区予以电击, 连续循环电击训练 (每 2 次电击之间休息 1 min), 以大鼠连续 10 次 (或 9/10) 正确反应 (直接逃入安全区) 作为空间辨别记忆指标, 每回连续学习的电击总次数一般不超过 30 次。最后将 a 项和 b 项相加作为训练成绩, 统计学习成绩。

**2.6 病理标本制作** 各组动物末次给药 1 h 后, 用 3% 的戊巴比妥麻醉 ( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 麻醉成功后打

开胸腔,剪开右心房,经左心室插管至升主动脉,先灌注生理盐水 100 mL,后灌注 4% 多聚甲醛与 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS(pH 7.2)混合液 100 mL,尔后取脑,并放入 4% 多聚甲醛与 0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 混合液中固定过夜,在海马注射点附近(CA1)冷冻连续冠状切片,片厚 6 μm。

**2.7 免疫组化测定** 石蜡切片脱蜡至水并 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min;正常山羊血清 37 °C 孵育 15 min,倾去血清;分别滴加稀释浓度均为 1:100 的兔抗 Aβ-淀粉样蛋白单克隆抗体或兔抗 PSD-95 蛋白单克隆抗体 37 °C 孵育 1 h 并置于 4 °C 冰箱孵育过夜;生物素标记羊抗兔 IgG(1:100)孵育 37 °C 30 min;辣根过氧化物酶(HRP)B 标记的链霉卵白素工作液孵育 37 °C 30 min,DAB 暗环境下显色,显微镜下观察显色程度,时间不超过 5 min。0.01 mol·L<sup>-1</sup> PBS 代替一抗作为对照,每只大鼠随机取 4 张切片,每张切片在注射区附近随机抽取 4 个不重叠的视野,在 400 倍光镜下以目镜网络测试系统手工计数 100 μm 长度内海马 CA1 区结构完整的正常锥体细胞数;采用 Image-Pro plus v6 图像分析系统测定 Aβ,PSD-95 阳性细胞数和平均吸光度值(A)。

**2.8 统计** 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,统计软件 SSPS 12.0 进行统计学分析,组间数据比较用方差分析, $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对学习记忆的影响** 模型组测试成绩明显差于正常组( $P < 0.001$ ),说明通过侧脑室海马注射 Aβ<sub>1-40</sub> 复制 AD 大鼠模型是成功的;钩藤散给药组测试成绩明显好于模型组( $P < 0.01$ ),说明钩藤散对 AD 模型鼠有较好的益智作用。见表 1。

表 1 钩藤散对 AD 模型大鼠学习记忆的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	测试成绩/次
正常	-	24.85 ± 6.04 <sup>3)</sup>
模型	-	38.34 ± 8.44
钩藤散	5.0	27.18 ± 5.66 <sup>2)</sup>
	2.5	28.12 ± 5.01 <sup>2)</sup>
	1.25	30.03 ± 3.30 <sup>1)</sup>

注:与模型组比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.001$ (表 2~4 同)。

**3.2 对大鼠海马 CA1 区神经细胞(锥体细胞)的影响** 正常对照组神经细胞数显著高于模型组,说明 AD 模型制作成功;各用药组与模型组比,神经细胞数显著高于模型组( $P < 0.001$ ),提示钩藤散能有效

阻止 Aβ 对神经细胞的影响,从而保护神经细胞。见表 2。

表 2 钩藤散对 AD 大鼠海马 CA1 区神经细胞数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	神经细胞数/个/100 μm
正常	-	46.6 ± 3.41 <sup>3)</sup>
模型	-	15.5 ± 3.44
钩藤散	5.0	30.4 ± 4.03 <sup>3)</sup>
	2.5	27.1 ± 4.63 <sup>3)</sup>
	1.25	24.7 ± 3.83 <sup>3)</sup>

**3.3 对 AD 大鼠海马 Aβ, PSD-95 阳性细胞数的影响** 与模型组比,各剂量组 Aβ 阳性细胞数明显减少,而 PSD-95 阳性细胞数明显增加( $P < 0.001$ ),因此钩藤散能明显降低 AD 模型大鼠脑中 Aβ 水平,增加 PSD-95 含量,提示其对老年性痴呆有一定疗效。见表 3。

表 3 钩藤散对 AD 大鼠海马 Aβ, PSD-95 阳性细胞数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	阳性细胞数/个	
		Aβ	PSD-95
正常	-	1.40 ± 1.07 <sup>3)</sup>	31.00 ± 2.58 <sup>3)</sup>
模型	-	9.60 ± 1.78	13.90 ± 2.38
钩藤散	5.0	4.40 ± 1.65 <sup>3)</sup>	24.50 ± 2.22 <sup>3)</sup>
	2.5	5.20 ± 1.40 <sup>3)</sup>	20.30 ± 2.21 <sup>3)</sup>
	1.25	5.90 ± 1.37 <sup>3)</sup>	17.80 ± 2.10 <sup>3)</sup>

**3.4 对 AD 大鼠海马 Aβ, PSD-95 平均吸光度的影响** 与模型组比,各给药组 Aβ 平均 A 明显升高,而 PSD-95 平均 A 明显降低( $P < 0.01$ ),并呈一定的量效关系。钩藤散能有效降低 AD 大鼠脑中 Aβ 水平,维持神经细胞突触结构与功能的完整和稳定。见表 4。

表 4 钩藤散对 AD 大鼠海马 Aβ, PSD-95 平均吸光度的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Aβ		PSD-95
		Aβ	PSD-95	
正常	-	0.078 ± 0.012 <sup>3)</sup>	0.307 ± 0.024 <sup>3)</sup>	
模型	-	0.118 ± 0.017	0.244 ± 0.016	
钩藤散	5.0	0.092 ± 0.015 <sup>2)</sup>	0.284 ± 0.020 <sup>3)</sup>	
	2.5	0.094 ± 0.014 <sup>2)</sup>	0.272 ± 0.021 <sup>2)</sup>	
	1.25	0.098 ± 0.014 <sup>1)</sup>	0.262 ± 0.013 <sup>1)</sup>	

### 4 讨论

近年来, Aβ 直接脑内注射建立 AD 动物模型因

周期短、实用、可操作逐渐受到青睐。 $A\beta$  注射致痴呆模型主要有海马注射、脑室注射及复合 AD 模型等<sup>[2-4]</sup>,其中  $A\beta$  侧脑室注射致痴呆模型由于  $A\beta$  直接注入脑室后,经侧脑室弥漫至全脑,因此更接近于引起细胞毒作用的实际过程,是临床前药效学评价的重要模型。Nabeshima<sup>[5]</sup>等将  $A\beta_{1-40}$  稀释后持续缓慢注入大鼠单侧脑室,2 周后大鼠出现行为学改变,并发现大鼠海马及皮层出现  $A\beta$  的沉积,海马胆碱能神经元受损。

突触后致密区 (postsynaptic density, PSD) 是位于突触后膜胞浆面的半圆形区域,是突触后信号传导和整合的结构基础。PSD-95 和 Glu 受体是兴奋 PSD 的主要蛋白组成成分<sup>[6]</sup>。PSD-95 是在谷氨酸能突触的突触后致密区中发现的一种特殊蛋白质,参与突触连接的形成和维持,在介导和整合 NMDA 受体信号转导中具有关键性作用<sup>[7]</sup>。

$A\beta$  是含有 39-43 氨基酸残基的短肽,由淀粉样前体蛋白 (APP) 裂解而来,是导致 AD 形成和发展的关键因素。Maurice 等发现,侧脑室注射较大剂量  $A\beta_{25-35}$  可引起大鼠学习记忆功能的下降<sup>[8]</sup>。因此,锥体细胞数、 $A\beta$  与 PSD-95 阳性细胞数及其平均吸光度是判断药物对神经细胞保护的重要指标。

钩藤散由钩藤、陈皮、麦冬、人参等 11 味药组成。方中钩藤、菊花、防风清热平肝,熄风止痉;半夏、茯苓、陈皮、甘草、生姜化痰安神,降逆止呕;生石膏、人参、麦冬清热养阴,益气生津。全方共奏平肝熄风,清热化痰,益气养阴,降逆止呕之功,故临床上可用于因痰热内扰,肝风内动而致头晕、中风、癫痫等疾病。

本实验用  $A\beta_{1-40}$  海马左侧注射建立 AD 大鼠模型,用电迷宫法行为学指标检测发现 AD 模型的建立是成功的。用免疫组化的方法测定海马 CA1 区的完整锥体细胞数,  $A\beta$ , PSD-95 阳性细胞数及其平均吸光度,结果发现:钩藤散各给药组神经细胞数、PSD-95 阳性细胞数及平均吸光度均高于模型组

( $P < 0.001$ ),而  $A\beta$  阳性细胞数及其平均吸光度则低于模型组 ( $P < 0.01$ ),因此,钩藤散能有效阻止注射  $A\beta$  对海马神经细胞的影响,促进 NMDA 受体信号的转导,从而对海马组织具有一定的保护作用,对 AD 模型大鼠有一定疗效,但具体作用机制有待进一步探讨。

### [参考文献]

- [1] 陈勤. 抗衰老研究实验方法 [M]. 北京: 中国医学科技出版社, 1996: 86.
- [2] Nitta A, Fukuta T, Nabeshima T. Continuous infusion of beta-amyloid Protein into the rat cerebral ventricle induces learning impairment and neuronal and morphological degeneration [J]. The Japanese of Pharmacology, 1997, 73 (1): 51.
- [3] 吴树亮, 金连弘, 李竹琴, 等. 阿尔茨海默氏病动物模型的建立 [J]. 解剖科学进展, 2004, 10(2): 109.
- [4] 贾丽艳, 拓西平, 朱嘉琦. 侧脑室注射  $\beta$ -淀粉样肽对大鼠海马内 L-1 $\beta$  及 iNOS mRNA 水平的影响 [J]. 中国微循环, 2005, 9(3): 164.
- [5] Nabeshima, Frautschy, Andrew B. Effect of inject Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptides in rat brain [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1991, 88: 8362.
- [6] Gardoni F, Schramm L H, Kamal A, et al. Hippocampal synaptic plasticity involves competition between  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein Kinase II postsynaptic density 95 for binding to the NR2A subunit of the NMDA receptor [J]. J Neuro Sci, 2001: 1501.
- [7] 陆珊, 雷亚平, 催艳君, 等. 侧脑室注射链脲佐菌素对大鼠海马突触相关蛋白 PSD-95 和 Shank 1 表达的影响 [J]. 解剖学报, 2007, 38(3): 281.
- [8] Maurice T, Lockhart B P, Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered  $\beta$ -amyloid peptides involves cholinergic dysfunction [J]. Brain Res, 1996, 706 (2): 181.

[责任编辑 聂淑琴]