

脑尔康对 AD 模型小鼠脑内 APP, A β 表达的影响

袁海峰*, 李玺, 张智燕

(西安交通大学医学院第二附属医院, 西安 710004)

[摘要] **目的:**观察复方中药脑尔康对慢性铝中毒阿尔茨海默病(AD)模型小鼠学习记忆及脑内淀粉样前体蛋白(APP), β 淀粉样蛋白(A β)表达的影响,探讨该药抗痴呆的分子机制。**方法:**60只昆明小鼠随机分为空白对照、模型、西药吡啦西坦、脑尔康高、中、低剂量6组,除空白组外,其余各组均采用氯化铝(AlCl_3)溶液以 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ ip}$ 造模,空白组给予等量生理盐水 ip,3个剂量脑尔康组给予脑尔康($34, 17, 8.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)连续 ig 50 d,吡啦西坦组给予吡啦西坦($10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) ig,空白组和模型组给予等量生理盐水 ig。采用跳台法检测 AD 模型小鼠学习记忆成绩,用免疫组织化学方法观察脑尔康对 AD 模型小鼠脑皮层及海马结构区域 APP, A β 表达的影响,对 APP, A β 阳性反应物质采用图像信号采集与分析系统进行灰度分析。**结果:**与对照组比较,模型组记忆潜伏期明显缩短($P < 0.01$),学习潜伏期明显延长($P < 0.05$),学习与记忆的错误次数明显增多($P < 0.01$);用药各组分别与模型组比较记忆潜伏期明显延长($P < 0.01$),学习潜伏期明显缩短($P < 0.05$),学习与记忆的错误次数明显减少($P < 0.01$)。各用药组模型小鼠脑内 APP, A β 的表达均不同程度减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);脑尔康3个剂量组比较存在明显量效关系。**结论:**脑尔康对慢性铝中毒 AD 模型具有显著的抗痴呆作用,其作用机制可能与调控 APP, A β 表达有关。

[关键词] 脑尔康; 阿尔茨海默病; 淀粉样前体蛋白; β 淀粉样蛋白; 抗痴呆

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0140-04

Protective Effects of Naoerkang on AD Mice Induced by Chronic Al Toxicity Involved in Regulatting Protein Expression of APP and A β

YUAN Hai-feng*, LI Xi, ZHANG Zhi-yan

(The Second Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects of Naoerkang (NEK) on Alzheimer disease (AD) mince induced by chronic Al(AlCl_3) toxicity involved in regulating protein expression of amyloid precursor protein (APP) and β -amyloid (A β). **Method:** Sixty male mice were randomly divided into normal control group, model group, piracetam group, low-dose NEK group, medium-dose NEK group, and high-dose NEK group, with 10 mice in each group, AlCl_3 ($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) were injected into abdominal cavity in mice to establish AD model whereas the normal control mice were injected with same volume of saline for comparison. The mice in the NEK groups were intragastrically treated respectively with high, medium and low dose ($1.36, 0.68, 0.34\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) NEK for 50 days consecutively; piracetam ($10\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was intragastrically administered to mice in the piracetam group; and normal saline was applied in the control and model groups. Jumping stand was used to examine their abilities in learning and memory. The positive protein expression of APP and A β in cortex and hippocampal region of the mice in each group were detected by immunohistochemistry, and the results were analyzed by gray scale adopting Qwin550CW images and signals clection and analysis system. **Result:** Compared with the control group, the Latent

[收稿日期] 20110322(001)

[基金项目] 陕西省科技攻关计划项目[2007K16-07(5)]

[通讯作者] *袁海峰, 硕士, 主治医师, 从事中药防治老年性痴呆的临床与基础研究, Tel:13572234796, E-mail: yhfirfirst@tom.com

Period of memory was shortened significantly ($P < 0.01$), while that of learning had been prolonged obviously ($P < 0.05$) and the times of mistakes for learning and memory increased significantly ($P < 0.01$) for the mice of the model group. Compared with the model group, the Latent Period memory in the groups treatment with drug shortened significantly ($P < 0.01$), while that of learning had been prolonged obviously ($P < 0.05$) and the Frequency of Error for learning and memory had been increased evidently ($P < 0.01$). The expressions of APP, A β in cortex and hippocampus had been increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) for the mice of the model group, and it had shown a more obvious reduction compared with the group using Naoerkang ($P < 0.01$). **Conclusion:** Naoerkang can ameliorate the AD induced by A β , the mechanism maybe involve in regulating APP and A β .

[**Key words**] Naoerkang; Alzheimer's disease; amyloid precursor protein; β -amyloid; anti-dementia

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的主要病理改变为脑内淀粉样沉淀、神经元纤维缠结、神经元颗粒空泡变性和神经元缺失等,其中淀粉样沉淀的主要物质A β 来源于相对分子质量更大的A β 前体蛋白(APP),在脑内具有广泛的神经毒性。复方中药脑尔康的前期研究结果显示,该药具有抑制AD模型小鼠大脑皮层和海马胆碱酯酶活性^[1]、改善AD模型小鼠学习记忆的作用^[2],初步阐明该药抗痴呆的作用机制。本试验就脑尔康对慢性铝中毒AD模型小鼠脑内APP,A β 表达的影响进行了研究,旨在揭示该药抗痴呆的分子机制。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠60只,雄性,体重(28.9 \pm 2.8)g,清洁级,由西安交通大学医学院实验动物中心提供,合格证号SCXK(陕)2007-002。按体重大小顺序编号后,采用计算机随机分为空白对照、模型、西药、脑尔康高、中、低剂量6组,每组10只。实验期间均喂以固体平衡饲料,自由饮水,在室温(22 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度50% \pm 5%的条件下饲养。

1.2 药品及试剂 脑尔康由人参10g,黄芪30g,葛根10g,川芎10g,生地黄15g,益智仁12g,丹参20g,石菖蒲10g,何首乌15g,枸杞子10g,冰片1g等组成,生药饮片由西安交通大学医学院第二附属医院中药房提供,按传统方法水煎,水浴浓缩至含生药1.36g \cdot mL⁻¹,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。吡啦西坦,200mg/片,西安交通大学制药厂产品,批号20090324;结晶氯化铝分析纯(AlCl₃·6H₂O相对分子质量241.43),西安化学试剂厂产品,批号010615;APP,批号081102,A β ,批号081212一抗浓缩型SABC试剂盒,批号090115,武汉博士德生物工程有限公司产品。

2 方法

2.1 药品制备 脑尔康浓缩液生药质量浓度按高、

中、低剂量组为1.36,0.68,0.34g \cdot mL⁻¹。AlCl₃溶液用蒸馏水配制成10g \cdot L⁻¹。

2.2 动物模型的建立与分组 按文献[2]AlCl₃溶液以100mg \cdot kg⁻¹ip,除空白组外,每组每只小鼠隔日注射1次,共50d。空白组和模型组每天给予生理盐水ig(0.5mL \cdot d⁻¹);西药组用吡啦西坦(200mg \cdot kg⁻¹)ig;中药组用脑尔康ig,剂量分别为34,17,8.5g \cdot kg⁻¹,从造模开始,每天1次,共50d。

2.3 学习记忆成绩测试^[1] 最后1次ipAlCl₃及ig给药30min后,首先将小鼠放置于跳台仪中,适应环境5min后,轻放于平台上,当小鼠从跳台上跳下,四肢接触铜栅时,即给予40V电压刺激,记录小鼠逃避至平台上的潜伏期,并记录5min内的触电次数(错误次数),以此作为学习成绩。24h后进行测试,将小鼠置于平台上,记录其第一次跳下受电击的时间(潜伏期)及3min内受电击的次数(错误次数),以此作为记忆功能的评价指标。测试时若小鼠停留在平台上超过了3min,其潜伏期以180s计。

2.4 标本制备 各组动物用20%的乌拉坦5mL \cdot kg⁻¹ip麻醉后,开胸从主动脉灌注0.9%生理盐水至左心室无血,采用10%中性甲醛灌注至小鼠身体僵硬,取脑,入10%的中性甲醛液固定72h,常规石蜡包埋,切片4 μm 厚,每张切片含皮层、海马、齿状回,每只小鼠取2张切片,进行免疫组化染色。

2.5 APP蛋白的检测^[2] 采用SABC免疫组化法检测APP,步骤如下:①石蜡切片,常规脱蜡至水,PBS振洗5min \times 2;②3mol \cdot L⁻¹尿素消化30min。PBS振洗5min \times 2;③1% H₂O₂蒸馏水阻断内源性过氧化物酶30min。PBS振洗5min \times 2;④微波炉热源修复,沸腾后微热10min。PBS振洗5min \times 2;⑤10%正常牛血清(BSA)室温封闭15min,吸干;⑥滴加1:50的APP一抗,置4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜;⑦37 $^{\circ}\text{C}$ 孵

育 30 min 后, PBS 振洗 5 min × 2; ③滴加生物素标记的二抗(1:100), 电热恒温 37 °C 孵育 40 min 后, PBS 振洗 5 min × 2; ④滴加 SP 复合物, 电热恒温 37 °C 孵育 40 min 后, PBS 振洗 5 min × 2; ⑤DAB 显色、衬染、脱水、透明、封片; ⑥光镜观察。用 PBS 做阴性对照。

2.6 Aβ 蛋白的检测 采用 SABC 免疫组化法, 步骤同 APP 蛋白检测。Aβ 一抗稀释浓度为 1:50, 用 PBS 做阴性对照。

2.7 图像分析 采用 Qwin550CW 图像处理与分析系统, 检测阳性反应物质的平均灰度值。每张切片同一区域中, 随机选取 5 个视野, 检测面积相同, 采集 5 组数据, 取其平均值作为该切片目标区域的平均灰度值, 每组切片依次完成检测, 计算该组切片被检区域灰度值的平均值及标准差。

2.8 统计学处理 使用 SPSS 11.0 统计软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组资料的均衡性检验采用 *t* 检验,

组间均数的显著性检验用单因素方差分析法, 满足方差齐性要求时采用 LSD 法, 不满足方差齐性要求时则采用 Dunnett' C 法。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 AD 模型小鼠学习记忆障碍的影响 模型组与空白组比较, 模型组记忆潜伏期明显缩短 (P < 0.01), 学习潜伏期明显延长 (P < 0.05), 学习与记忆的错误次数明显增多 (P < 0.01), 表明用氯化铝所造成的老年痴呆小鼠模型是成功的。与模型组比较, 脑尔康 3 剂量组记忆潜伏期均明显延长 (P < 0.01 或 P < 0.05); 学习潜伏期明显缩短 (P < 0.01 或 P < 0.05); 学习与记忆的错误次数脑尔康 3 个剂量组亦明显减少 (P < 0.01); 脑尔康组记忆潜伏期明显缩短 (P < 0.05); 学习潜伏期无明显改变; 学习错误次数明显缩短 (P < 0.01); 记忆错误次数无明显差异。表明各用药组对 AD 模型小鼠学习记忆障碍均有一定的改善作用。见表 1。

表 1 脑尔康对 AD 模型小鼠学习记忆障碍的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	错误数/次		潜伏期/min	
			学习	记忆	学习	记忆
空白对照	-	10	2.86 ± 1.35	0.29 ± 0.49	21.45 ± 19.94	184.27 ± 60.74
模型	-	9	9.86 ± 2.34 ⁴⁾	1.43 ± 0.53 ⁴⁾	45.99 ± 21.35 ³⁾	70.64 ± 67.41 ⁴⁾
吡啦西坦	0.2	8	6.33 ± 0.58 ²⁾	0.91 ± 0.38	37.81 ± 17.94	143.12 ± 34.43 ¹⁾
脑尔康	34	9	3.77 ± 1.63 ²⁾	0.2 ± 0.45 ²⁾	13.93 ± 18.25 ²⁾	153.97 ± 58.20 ²⁾
	17	9	4.01 ± 2.76 ²⁾	0.5 ± 0.84 ²⁾	16.47 ± 38.99 ²⁾	149.73 ± 96.23 ²⁾
	8.5	9	2.5 ± 0.71 ²⁾	0.4 ± 0.76 ²⁾	18.35 ± 10.18 ¹⁾	149.00 ± 28.33 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与空白组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01(表 2 ~ 3 同)。

3.2 对 AD 模型小鼠脑内 Aβ 表达的影响 Aβ 阳性反应物呈棕色或黄色, 主要分布于皮层、海马神经元的胞质和突起, 以胞质的表达为明显。皮层主要分布于第 III, V 层的锥体细胞, 海马主要分布于颗粒细胞层, 呈指环状。模型组与空白组比较, 模型组 Aβ 表达明显增高 (P < 0.05 或 P < 0.01), 而且各区的表达不一致, 以 Cortex, CA₁, DG 的表达增高明显, 而 CA₃ 稍次之, 说明慢性铝中毒模型小鼠脑内 Aβ 生成明显增多, 模型制备是成功的; 各用药组与模型组比较, Aβ 表达均不同程度减少, 脑尔康 3 个剂量组减少更为明显 (P < 0.01), 脑尔康组在 CA₁ 区无明显变化, 其余各区均明显减少 (P < 0.01), 说明药物治疗能干预 Aβ 的生成, 见表 2。

3.3 对 AD 模型小鼠脑内 APP 表达的影响 APP

在皮层和海马的分布主要在胞浆及突起, 细胞核无着色, 在海马 CA₁, CA₃, DG 呈指环状, 皮层以第 II, IV 层的表达较强, 而第 I, III, V 层的表达稍弱, 海马, DG 主要表达于颗粒层。模型组与空白组比较, 模型组 APP 表达明显增高 (P < 0.01), 而且各区的表达不一致, 以 CA₁, CA₃, DG 的表达增高明显, 而皮层稍次之, 说明慢性铝中毒模型小鼠脑内 APP 表达较高, 模型制备成功。各用药组与模型组比较, 脑尔康 3 个剂量组 APP 表达均明显减少 (P < 0.01)。见表 3。

4 讨论

阿尔茨海默病 (AD) 其特征性病理改变之一为细胞外以 β-淀粉样蛋白 (Aβ) 沉积为核心的神经炎症性斑 (NPs 又称老年斑 SPs) 形成^[3-4]。目前关于

表 2 脑尔康对 AD 模型小鼠脑内 A β 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

灰度值

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	海马 CA1 区	海马 CA3 区	齿状回区	大脑皮层
空白对照	-	10	90.85 ± 1.73	96.24 ± 1.19	97.99 ± 0.93	92.56 ± 2.04
模型	-	9	77.08 ± 2.04 ⁴⁾	84.04 ± 2.12 ³⁾	80.15 ± 1.02 ⁴⁾	81.17 ± 2.01 ⁴⁾
吡啦西坦	0.2	8	76.73 ± 1.49	85.23 ± 1.18 ²⁾	85.87 ± 1.45 ²⁾	87.08 ± 2.78 ²⁾
脑尔康	34	9	85.43 ± 1.12 ²⁾	92.52 ± 1.54 ²⁾	89.44 ± 0.82 ²⁾	88.91 ± 2.76 ²⁾
	17	9	78.96 ± 3.59 ²⁾	89.29 ± 2.61 ²⁾	87.35 ± 1.3 ²⁾	86.05 ± 2.21 ²⁾
	8.5	9	79.62 ± 2.42 ²⁾	83.42 ± 2.54 ²⁾	82.19 ± 2.03 ²⁾	87.86 ± 2.24 ²⁾

表 3 脑尔康对 AD 模型小鼠脑内 APP 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

灰度值

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	海马 CA1 区	海马 CA3 区	齿状回区	大脑皮层
空白对照	-	10	188.49 ± 1.16	185.62 ± 1.25	175.99 ± 0.53	172.25 ± 1.05
模型	-	9	177.04 ± 0.82 ⁴⁾	170.97 ± 4.15 ⁴⁾	167.95 ± 1.21 ⁴⁾	168.79 ± 4.05 ⁴⁾
吡啦西坦	0.2	8	176.36 ± 6.04	170.49 ± 0.21	168.86 ± 1.77	170.79 ± 0.93
脑尔康	34	9	183.89 ± 1.28 ²⁾	187.09 ± 1.79 ²⁾	174.37 ± 0.54 ²⁾	172.07 ± 0.83 ²⁾
	17	9	179.84 ± 2.13 ²⁾	182.26 ± 1.41 ²⁾	172.19 ± 2.49 ²⁾	170.28 ± 1.16 ²⁾
	8.5	9	180.94 ± 2.94 ²⁾	180.15 ± 0.52 ²⁾	171.23 ± 2.12 ²⁾	169.00 ± 1.33 ²⁾

阿尔茨海默病的具体发病机制仍不十分明确,但 A β 的产生和聚集被认为是重要因素之一。A β 来源于 β -淀粉样前体蛋白 (APP) 的蛋白水解,APP 及其代谢产物除了发挥正常生理作用外,在阿尔茨海默病的发病过程中也起到关键作用,研究发现,APP 降解后产生的 A β ,在细胞外聚集形成老年斑,通过触发多种毒性机制(激活 caspases 触发细胞凋亡^[5]、炎症反应^[6]、氧化应激^[7]、轴突运输障碍、磷酸化 tau 蛋白形成神经原纤维缠结沉淀^[8]和钙离子内流增加等)产生包括致突触结构和功能障碍、抑制长时程突触电位、致神经元退行性变等细胞毒性作用,最终引起细胞凋亡、自噬或坏死。因此研究如何降低 APP, A β 表达、沉积具有重要的理论与实际意义。复方中药具有活性成分多样、作用靶点广泛、副作用小的优势,因此复方中药治疗 AD 具有良好的应用前景,已成为临床治疗老年性痴呆的重要手段。脑尔康由人参、川芎、生地黄、益智仁、冰片等组成,具有益智健脑、活血化瘀、补肾生髓、调养心神之功效,且前期研究发现,该药具有一定的抗痴呆作用。本研究发现,脑尔康干预后,各组小鼠不同脑区 APP, A β 的表达明显减少 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),而且学习记忆能力显著提高,表明脑尔康可能通过抑制 APP, A β 的表达发挥抗痴呆、改善学习记忆作用,但其发挥作用的详细机制有待于进一步阐明。

[参考文献]

[1] 李玺,张雪飞,乔成林,等.脑尔康对老年痴呆小鼠脑内

胆碱酯酶活性及神经元的影响[J].中国临床康复,2003,31(7):4222.

[2] 李玺,王建军,乔成林,等.脑尔康对小鼠学习记忆障碍的改善作用[J].西安医科大学学报,1999,20(1):126.

[3] Glenner G G, Wong C W. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1984,122:1131.

[4] Nelson P T, Jicha G A, Schmitt F A, et al. Clinicopathologic correlations in a large Alzheimer disease center autopsy cohort: neuritic plaques and neurofibrillary tangles "do count" when staging disease severity [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2007,66(12):1136.

[5] D'Amelio M, Cavallucci V, Middei S, et al. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Nat Neurosci, 2011, 14(1):69.

[6] Lee Y J, Han S B, Nam S Y, et al. Inflammation and Alzheimer's disease [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(10):1539.

[7] Manolopoulos K N, Klotz L O, Korsten P, et al. Linking Alzheimer's disease to insulin resistance: the FoxO response to oxidative stress [J]. Mol Psych Hiatory, 2010, 15(11):1046.

[8] Leinonen V, Koivisto A M, Savolainen S, et al. Amyloid and tau proteins in cortical brain biopsy and Alzheimer's disease [J]. Ann Neurol, 2010, 68(4):446.

[责任编辑 聂淑琴]