

加味桃核承气汤对 $A\beta$ 损伤大鼠学习记忆能力的影响

王淳*, 董秀, 林大勇, 马贤德, 曲静

(辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110032)

[摘要] **目的:**观察加味桃核承气汤对 β -淀粉样蛋白($A\beta$)损伤大鼠学习记忆能力的影响,并探讨其作用机制。**方法:**SD 大鼠随机分成 3 组,利用立体定位仪将 $A\beta_{1-42}$ 全长肽注射到大鼠双侧海马,构建 $A\beta$ 损伤痴呆鼠模型(即 $A\beta_{1-42}$ 模型组);同时注射 $A\beta_{42-1}$ 反序列全长肽(即 $A\beta_{42-1}$ 对照组)和磷酸盐缓冲液(PBS)对照组(PBS 对照组)。造模 7 d 后,每组再分成 2 个亚组,即加味桃核承气汤治疗组和空白组,分别以灌胃法(ig)给予加味桃核承气汤 20 mL($20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和同样体积的生理盐水,1 次/d,连续 21 d。利用水迷宫定位航行实验检测各组大鼠学习记忆能力情况,并应用 Western blotting 方法检测各组大鼠海马组织中 Tau, p-Tau 蛋白的表达情况。**结果:**在定位航行实验中, $A\beta_{1-42}$ 模型组大鼠平均逃避潜伏期(59.20 ± 10.12)s 长于 $A\beta_{42-1}$ 对照组(34.26 ± 15.23)s 和 PBS 对照组(32.07 ± 9.50)s($P < 0.05$); $A\beta_{1-42}$ 模型组大鼠应用加味桃核承气汤治疗后,平均逃避潜伏期明显缩短,与给予生理盐水组相比存在统计学差异($P < 0.05$);而应用加味桃核承气汤治疗后 $A\beta_{42-1}$ 对照组和 PBS 对照组的平均逃避潜伏期改变不明显。此外,应用加味桃核承气汤治疗的 $A\beta_{1-42}$ 模型组大鼠海马组织中 Tau 和 p-Tau 蛋白的表达水平也低于生理盐水组。**结论:**加味桃核承气汤可能通过降低脑组织中 Tau 蛋白表达,抑制 Tau 蛋白异常磷酸化,提高痴呆大鼠学习记忆能力。

[关键词] 加味桃核承气汤;阿尔茨海默病;学习记忆能力;Tau 蛋白;p-Tau 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0174-03

Effect of Jiawei Taohe Chengqi Decoction on Learning and Memory in Rats with Alzheimer's Disease Induced by $A\beta_{1-42}$

WANG Chun*, DONG Xiu, LIN Da-yong, MA Xian-de, QU Jing

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

[Abstract] **Objective:**To observe the effect of Jiawei Taohe Chengqi decoction(JWTHCQD)on learning and memory in $A\beta_{1-42}$ induced Alzheimer's disease(AD)in rats and study its mechanism. **Method:**Rats were injected bilaterally of aggregated $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{42-1}$ or PBS into hippocampus mounted using stereotaxic apparatus for AD model establishment. Three groups rats were treated with JWTHCQD($20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)or saline solution respectively. After 21 days, learning and memory ability of the rats were determined by Morris water maze test. And hippocampus tissue specimens for each group were harvested for Tau and p-Tau protein detected by Western blotting. **Result:**In place navigation test, the time of escape latency was significantly longer in $A\beta_{1-42}$ group than that in other groups($P < 0.05$), but shorter in JWTHCQD treated $A\beta_{1-42}$ group($P < 0.05$). Besides, Tau and p-Tau protein were all down-regulation in the $A\beta_{1-42}$ group after JWTHCQD treatment. **Conclusion:**JWTHCQD could improve the learning and memory in AD model rats by regulating Tau and p-Tau protein expression.

[Key words] Jiawei Taohe Chengqi decoction; Alzheimer's disease; learning and memory; Tau protein; p-Tau protein

[收稿日期] 20110111(003)

[基金项目] 教育部博士点基金新教师项目(20092133120001)

[通讯作者] *王淳, Tel:024-31207074, E-mail: chunwang2000@yahoo.com.cn

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种慢性进行性发展的大脑退行性疾病,是成人痴呆症中最常见的一种^[1]。随着我国进入老龄化社会,该病给家庭和社会带来沉重负担。AD的主要病理改变是在大脑新皮质区和海马区可见淀粉样沉着斑块和大脑组织中神经元纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)^[2],而NFT主要由成对螺旋纤维(paried helical filaments, PHF)聚集而成,其中,主要表现为Tau蛋白的过度表达及异常磷酸化^[3]。

中医学理论认为,老年痴呆症属“呆病、健忘、痴呆”范畴,多属本虚标实,虚为气血不足,诸脏亏虚;实为痰阻血瘀。为此,我们采用活血化瘀方——加味桃核承气汤对 $A\beta$ 损伤大鼠学习记忆能力进行观察,并探讨可能存在的作用机制。

1 材料

1.1 试剂 Tau (Tau 46, 批号 32274), p-Tau (Ser 262, 批号 101813), GAPDH (L-20, 批号 31915) 抗体购自 Santa Cruz 公司; HRP-标记羊抗小鼠 IgG (批号 090815), HRP-标记羊抗兔 IgG (批号 091210), HRP-标记兔抗羊 IgG (批号 100313) 购自北京中山生物技术公司; ECL 试剂盒购自 Amerham Pharmarcia。

1.2 药物 加味桃核承气汤(桃仁 10 g, 大黄 6 g, 桂枝 6 g, 甘草 3 g, 芒硝 6 g, 黄芪 30 g, 生地黄 15 g, 麦冬 12 g, 玄参 12 g), 适量水煎, 头煎 20 min, 二煎 30 min, 分别滤取药液, 合并两次药液, 在 60 °C 恒温条件下浓缩成每 1 mL 含生药 1 g 的药液备用。

1.3 动物 SD 大鼠, 清洁级 36 只, 雌雄各半, 体重 (180 ± 20) g, 购自中国医科大学实验动物中心。

2 方法

2.1 造模与分组 大鼠随机分成 3 组, 每组 12 只, 分为 β -淀粉样蛋白 ($A\beta_{1-42}$) 模型组(利用立体定位

仪将 $A\beta_{1-42}$ 全长肽注射到大鼠双侧海马)、 $A\beta_{42-1}$ 对照组(利用立体定位仪将 $A\beta_{42-1}$ 反序列全长肽注射到大鼠双侧海马)和磷酸盐缓冲液(PBS)对照组(利用立体定位仪将 PBS 注射到大鼠双侧海马)。在造模第 7 d 后开始给药治疗, 上述 3 组大鼠再随机分成 2 个亚组, 即加味桃核承气汤治疗组(ig 给予加味桃核承气汤 20 g·kg⁻¹)和生理盐水组(ig 给予生理盐水), 给药容量 20 mL·kg⁻¹, 1 次/d, 连续 21 d。

2.2 Morris 水迷宫行为学测试 Morris 水迷宫系统, 直径 183 cm, 深 64 cm, 水温 (23 ± 1) °C。让大鼠在水中自由游泳 2 min, 让其熟悉环境, 第 2 天开始测定。每只大鼠每天连续进行 4 次测定, 中间休息 2 min, 连测 3 d。以大鼠自水迷宫起点游至终点所需时间作为衡量学习及记忆的指标。每次训练结束后清洗泳路侧壁以消除嗅觉提示^[4]。

2.3 p-Tau, Tau 蛋白表达的检测 大鼠经过加味桃核承气汤治疗 21 d 后, 处死, 取脑部海马组织, 采用 Western blotting 方法检测蛋白的表达情况, 具体方法参照文献操作^[5]。

2.4 统计学方法 应用 SPSS 13.0 统计软件对所得数据进行统计与分析。各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用方差分析检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 Morris 水迷宫 $A\beta_{1-42}$ 模型组大鼠平均逃避潜伏期 (59.20 ± 10.12) s 长于 $A\beta_{42-1}$ 对照组 (34.26 ± 15.23) s 及 PBS 对照组 (32.07 ± 9.50) s, ($P < 0.05$)。 $A\beta_{1-42}$ 模型加味桃核承气汤治疗组大鼠平均逃避潜伏期明显缩短, 与模型组相比有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 $A\beta_{42-1}$ 对照组及 PBS 对照组大鼠给予药物治疗后, 大鼠平均逃避潜伏期虽有所缩短, 但与

表 1 应用加味桃核承气汤治疗后大鼠平均逃避潜伏期 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	逃避潜伏期/s		
		第 19 天	第 20 天	第 21 天
$A\beta_{1-42}$ 模型	-	62.35 ± 11.24	56.40 ± 16.48	49.51 ± 13.12
$A\beta_{1-42}$ + 加味桃核承气汤	20	42.25 ± 20.5 ¹⁾	39.10 ± 11.12 ¹⁾	33.25 ± 14.68 ¹⁾
$A\beta_{42-1}$ 对照	-	39.39 ± 20.48	27.52 ± 12.50	21.36 ± 11.25
$A\beta_{42-1}$ + 加味桃核承气汤	20	35.80 ± 17.36	28.64 ± 17.53	20.32 ± 13.20
PBS 对照	-	30.39 ± 15.23	21.29 ± 11.53	19.70 ± 18.45
PBS + 加味桃核承气汤	20	28.45 ± 15.05	22.31 ± 12.35	18.25 ± 9.30

注: 与 $A\beta_{1-42}$ 模型组比¹⁾ $P < 0.05$ 。

生理盐水组比较,没有统计学意义(表 1)。

3.2 p-Tau, Tau 蛋白表达情况 在 $A\beta_{1-42}$ 全长肽诱导下, $A\beta_{1-42}$ 模型组大鼠海马组织中 Tau 蛋白和磷酸化 Tau 蛋白(即 p-Tau)表达量增加;而应用加味桃核承气汤治疗后, Tau 和 p-Tau 表达水平降低,与 $A\beta_{42-1}$ 对照组和 PBS 对照组相近(图 1)。

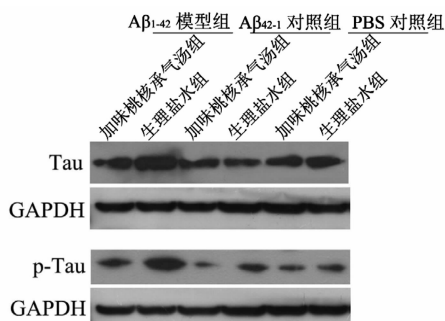


图 1 大鼠海马组织中 Tau 和 p-Tau 的表达情况

4 讨论

Tau 蛋白是神经元主要微管相关蛋白。正常脑中 Tau 蛋白与微管蛋白结合促进其聚合形成微管,并参与其稳定作用。当 Tau 蛋白的蛋白激酶和蛋白磷酸酶系统失衡,可导致 Tau 蛋白过度磷酸化,形成异常 p-Tau 蛋白。一方面, p-Tau 蛋白自身聚集成 NFT 结构,另一方面, p-Tau 还可与微管蛋白竞争结合包括正常 Tau 蛋白在内的其他微管相关蛋白,导致微管解聚,破坏正常微管系统^[6]。在 AD 患者脑中就是如此: Tau 蛋白总量多于正常人,且 p-Tau 蛋白大量增加,造成神经元微管结构广泛破坏,正常轴突转运受损,引起突触丢失、神经元功能损伤,发生脑神经退行性病变,这与本研究构建的 $A\beta$ 损伤痴呆鼠模型一致,行为学上表现为学习、记忆能力减退,分子水平上表现为 Tau 和 p-Tau 表达量增加。

最近研究表明, AD 的认知功能降低与脑血管病变之间存在着密切的关系,表现为 AD 病人脑中毛细血管损伤和老化,诱发异常血管生成过程,引起 $A\beta$ 清除受体水平降低或流入受体水平增加,导致 $A\beta$ 在血脑屏障不完全清除,造成脑间质液中可溶性 $A\beta$ 浓度增加,引起血管淀粉样损伤并活化神经炎症反应。这与祖国医学关于 AD 发病的痰瘀学说相一致, AD 的病机为: 肾虚是本, 痰浊、瘀血是标, 痰瘀成毒, 毒损脑络, 进一步加重 AD 的症状^[7]。为此, 我们尝试应用活血化瘀方药治疗 AD 疾病。

现代药理学认为桃核承气汤除具有活血化瘀、泄热通下的功效外, 还有降血脂、降血糖、抗血小板

凝聚、抗血栓形成的作用^[8], 即具有清除体内“瘀毒”的作用。在桃核承气汤原方(桃仁、大黄、桂枝、芒硝、甘草)基础上加入益气养阴成分(黄芪、生地、麦冬、玄参), 使其在原有活血化瘀、泄热通下等作用之上, 又具益气养阴之效, 具有保护血管内皮细胞抗氧化自由基的作用^[9]。

我们应用加味桃核承气汤治疗 $A\beta$ 损伤痴呆鼠, 实验结果提示: 加味桃核承气汤能增强大鼠学习记忆能力, 并降低海马组织中 Tau 及 p-Tau 蛋白的表达水平。这可能与加味桃核承气汤活血化瘀、温化痰湿、清除脑内痰浊瘀毒有关, 即通过降低脑组织中 Tau 蛋白表达, 抑制 Tau 蛋白异常磷酸化, 降低大脑组织中神经元纤维缠结, 提高痴呆大鼠学习记忆能力。对于加味桃核承气汤是否具有保护 AD 病人脑毛细血管损伤和老化的功能, 将有待于进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Blennow K, de Leon M J, Zetterberg H. Alzheimers disease[J]. Lancet, 2006, 368:387.
- [2] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. Science, 2002, 297(5580):353.
- [3] Kickstein E, Krauss S, Thornhill P, et al. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling[J]. Proc Natl Acad Sci, 2010, 107(50):21830.
- [4] 陈玉静, 田金洲, 王蓉, 等. 金思维对散发性老年性痴呆模型大鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(4):29.
- [5] Liu Y J, Guo D W, Tian L, et al. Peripheral T cells derived from Alzheimer's disease patients overexpress CXCR2 contributing to its transendothelial migration, which is microglial TNF-alpha-dependent[J]. Neurobiol Aging, 2010, 31(2):175.
- [6] Hoover B R, Reed M N, Su J, et al. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration[J]. Neuron, 2010, 68(6):1067.
- [7] 于俊生. 痰瘀相关学说疑难病治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008:104.
- [8] 储全根. 近 10 年来桃核承气汤临床应用研究进展[J]. 安徽中医学院学报, 2005, 24(1):51.
- [9] 李赛美, 凌家杰, 王志高. 加味桃核承气汤及其拆方对糖尿病血管病变的体外作用观察[J]. 广州中医药大学学报, 2008, 25(1):51.

[责任编辑 聂淑琴]