

智脑胶囊对阿尔茨海默病模型大鼠脑组织 BDNF 及其 TrkB 影响的实验研究

杨文明^{1*}, 周磊¹, 孙林娟²

(1. 安徽中医学院第一附属医院神经内科, 合肥 230031;
2. 首都医科大学宣武医院神经内科, 北京 100053)

[摘要] 目的: 观察智脑胶囊对实验性阿尔茨海默病(AD)模型大鼠脑组织脑源性神经营养因子(BDNF)及其酪氨酸蛋白激酶受体 B(TrkB)的影响, 探讨智脑胶囊治疗 AD 的作用机制。方法: 雄性 Wistar 大鼠, 随机分为 7 组, 即正常对照组、假手术组、AD 模型组、石杉碱甲组、智脑胶囊低、中、高剂量组。参照《大鼠脑立体定位图谱》, 选双侧 Meynert 基底核为注射点, 以鹅膏蕈氨酸(BO)毁损双侧 Meynert 基底核, 制作实验性 AD 大鼠模型。用 ELISA 酶联免疫法检测脑组织 BDNF 及其受体 TrkB 的含量, 并观察其在大鼠脑组织皮层和海马不同部位含量的变化。结果: 智脑胶囊能提高模型大鼠脑组织(皮层和海马) BDNF 及其受体 TrkB 的含量, 与模型组比较, 差异有显著性($P < 0.05$)。其中智脑胶囊高、中剂量组和石杉碱甲组的提高作用优于智脑胶囊低剂量组。结论: 智脑胶囊促进大鼠脑组织皮层和海马神经元合成 BDNF 及其受体 TrkB 表达增加是其改善学习记忆的重要作用机制。

[关键词] 阿尔茨海默病; 智脑胶囊; 脑源性神经营养因子; 酪氨酸蛋白激酶受体 B

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0067-04

Experimental Research of Effect on Brain-derived Neurotrophic Factors and Tyrosine Protein Kinase Receptors in the Tissue of Experimental Rat Model of Alzheimer's Disease Treated by Zhinao Capsule

YANG Wen-ming^{1*}, ZHOU Lei¹, SUN Lin-juan²

(1. First Affiliated Hospital of Anhui College of TCM, Hefei 230031, China;

2. Xuanwu Hospital of the Capital University of the Medical Science, Beijing 100053, China)

[收稿日期] 2009-02-01

[基金项目] 安徽省人才开发基金(2003Z026); 安徽省自然科学基金(99044591); 安徽省学科拔尖人才基金(教秘人[2006]112号)及重点学科基金(教高[2008]2号)资助

[通讯作者] * 杨文明, Tel: (0551) 2838708; E-mail: yangwenming8810@sina.com

[3] Smas CM, Kachinskas D, Liu CM, et al. Transcriptional control of the pref-1 gene in 3T3-L1 adipocyte differentiation. Sequence requirement for differentiation-dependent suppression[J]. J Biol Chem. 1998, 273: 31751.

[4] 李红辉, 覃果真, 丁殊节, 等. 马来酸罗格列酮对大鼠 tPA 和 PAI-1 活性的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2006, 14(2): 146.

[5] Yuhui W, Kyung-Ah Kim, Jung-Hyun Kim, et al. Pref-1, a Preadipocyte Secreted Factor That Inhibits Adipogenesis[J]. American Society for Nutrition, 2006, 136: 2953.

[6] 方朝晖, 王佑民, 王开成, 等. 丹蛭降糖胶囊对胰岛素抵抗大鼠 PPAR- mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(4): 36.

[7] 方朝晖, 鲍陶陶, 章小平. 2 型糖尿病中医辨证与氧化应激损伤相关性的研究[J]. 中国中医急症, 2006, 15(9): 994.

[8] 方朝晖, 倪英群. 丹蛭降糖胶囊改善 2 型糖尿病患者血管内皮粘附状态及炎症损伤的临床观察[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(21): 22.

[Abstract] Objective: To investigate the effect mechanism of *Zhinao* Capsule in treating Alzheimer disease and effect on brain-derived neurotrophic factors (BDNF) and tyrosine protein kinase receptors in the tissue of experimental rat model of Alzheimer's disease. **Methods:** Male Wistar rats were divided randomly into 7 groups: (1) normal group; (2) Sodium Chloride group; (3) model group; (4) huperzine A group; (5) low dose group of *Zhinao* Capsule; (6) middle dose group of *Zhinao* Capsule; (7) high dose group of *Zhinao* Capsule. According to "Brain stereotaxic atlas of rats", animal models of Alzheimer dementia were established by injecting IBO into Meynert basal nuclear. The content of BDNF and TrkB receptor in brain tissue (cortex and hippocampus) were detected by means of ELISA. **Results:** Compared with model group, *Zhinao* Capsule could significantly enhance the content of BDNF as well as its TrkB receptor in the cortex and hippocampus of the rats ($P < 0.05$). The performance of high, middle dose of *Zhinao* Capsule, and huperzine A treated group in improving the content of BDNF and TrkB in brain tissue was higher than low dose group of *Zhinao* Capsule ($P < 0.05$). The performance of high, middle dose group of *Zhinao* Capsule was not higher than that in huperzine A group ($P < 0.05$). **Conclusions:** *Zhinao* Capsule has the function of improving the learning-memory ability in model rats, its function mechanism mainly is that Meynert basal nuclei synthesize acetylcholine, transporting more acetylcholine to cortex and hippocampus. *Zhinao* Capsule can improve the neurons who synthesize BDNF content and express more TrkB receptors.

[Key words] Alzheimer's disease; *Zhinao* Capsule; learning-memory ability; brain-derived neurotrophic factors; tyrosine protein kinase receptor B

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 是以进行性记忆力和认知功能障碍为特征的慢性神经系统变性病, 是老年人群中继心脏病、脑血管病、恶性肿瘤之后的第四大杀手, 严重危害人类健康^[1]。虽然 AD 的确切病因至今仍不清楚, 存在多种假说, 但目前已公认脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 在其发病中起着重要作用, 并已成为 AD 研究的热点。先前的临床研究表明, 具有健脾益气、豁痰化瘀, 健脑开窍作用的中药复方智脑胶囊有较好的提高 AD 病人的学习记忆能力、改善病人的智能功效。本文观察了智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠脑组织 BDNF 及其酪氨酸蛋白激酶受体 B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 的影响, 探讨智脑胶囊治疗 AD 的作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性健康 Wistar 大鼠, 体重 300 g 左右, 清洁级, 由安徽医科大学实验动物中心提供 (合格证号: SCXK(皖)-2005-001)。

1.2 药物 智脑胶囊由党参、黄精、川芎、石菖蒲等中药依处方比例组成, 由安徽中医学院第一附属医院药剂科提供, 实验前稀释至所需浓度, 依剂量分别制成含生药剂量为 $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (高剂量)、 $25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (中剂量)、 $12.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (低剂量); 石杉碱甲, 河南竹林众生制药有限公司 (产品批号: 060802)。

1.3 试剂 BDNF、TrkB 及鹅膏蕈氨酸 (ibotenic acid, IBO) 均由美国 SIGMA 公司提供。

2 实验方法

2.1 模型制备方法 大鼠自引入实验室适应性喂养 7 d, 喂食普通饲料, 自由饮水。术前 12 h 禁食, 不禁水。用 3.5% 水合氯醛 ($350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ip 麻醉, 保证手术期间有自主呼吸。待翻正反射消失后, 参照《大鼠脑立体定位图谱》^[2], 将大鼠固定在脑立体定位仪上, 前囟正中点设为 0 点。自 0 点向中线旁 (ML) 各 3.2 mm, 前囟后 (AP) 1.5 mm, 确定深度标记硬脑膜下 (DV) 7.6 mm 为 Meynert 核坐标点; 用固定于定位仪上的微量注射器缓慢进针至硬脑膜下 7.6 mm 深度, 向脑内 Meynert 核注射 IBO $1 \mu\text{L}$ ($5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 注药和留针时间各为 5 min。针孔用牙科水泥固定, 同法注射另一侧。造模术后 3 d, 随机选取模型大鼠 10 只与正常组、假手术组进行学习记忆成绩比较并随机取 2 只模型大鼠做病理形态学观察判断造模是否成功。

2.2 分组 选择造模成功存活的大鼠 50 只进行分组, 按照随机数字表分别将大鼠分为 5 组, 每组 10 只, 即 AD 模型组 (模型组)、石杉碱甲组、智脑胶囊低、中、高剂量组, 另选雄性健康 Wistar 大鼠 20 只, 分为 2 组, 每组 10 只, 即正常对照组 10 只, 假手术组 10 只 (手术方法同 2.1, 但脑内 Meynert 核不注射

药物), 共 7 组。

2.3 给药 正常组、假手术组、模型组予等体积生理盐水, 石杉碱甲组予石杉碱甲混悬液 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 智脑胶囊低、中、高剂量组分别给予智脑胶囊 $12.5, 25$ 及 $50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 均 ig, 1 次/d, 连续 28 d。

2.4 大鼠脑组织 BDNF、TrkB 含量的检测 所有大鼠行为学测试后, 称重, 将动物快速断头处死, 冰盘上快速剖取脑组织, 弃去嗅球、小脑和低位脑干, 吸去血迹, 称量每侧皮层脑组织 100 mg, 海马 20 mg 左右, 按组织重量体积比为 1:9 加预冷的生理盐水制成 10% 的组织匀浆, $4 \sim 3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 取上清液, 储存 -20℃ 冰箱备用。

大鼠脑组织 BDNF 检测采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法, 用抗大鼠 BDNF 单抗包被于酶标板上, 标准品和样品中的 BDNF 与单抗结合, 加入生物素化的抗大鼠 BDNF, 形成免疫复合物连接在板上, 辣根过氧化物酶标记的 streptavidin 与生物素结合, 加入酶底物邻苯二胺 (OPD), 出现黄色, 加终止液硫酸, 颜色变深, 在 492 nm 处测光密度 (OD) 值, BDNF 浓度与 OD 值成正比, 通过绘制标准曲线求出标本中的 BDNF 浓度。

大鼠脑组织 TrkB 含量的检测: 取出酶标板, 按照次序对应分别加入 50 μL 的标准品于空白微孔中; 分别标记样品编号, 加入 50 μL 样品于空白微孔中; 在样品孔中加入 10 μL 的生物素标记液; 在标准品和样品孔中加入 50 μL 的酶标记溶液; (36 ± 2) 孵育反应 60 min; 洗板清洗 5 次, 每次静置 10 ~20 s; 每孔加入底物 A, B 液各 50 μL ; (36 ± 2) 下避光孵育反应 15 min; 每孔加入 50 μL 终止液, 终止反应。于波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的 OD 值; 以 OD 值为纵坐标, 以标准品的浓度为横坐标, 绘制曲线图, 根据样品的 OD 值查出对应的浓度范围。

3 结果

3.1 智脑胶囊对 AD 模型大鼠学习记忆的影响(采用跳台法和水迷宫法) 结果表明, 智脑胶囊能明显地改善实验性 AD 模型大鼠学习记忆, 结果另文表述。

3.2 智脑胶囊对 AD 模型大鼠脑组织 BDNF 含量的影响 假手术组与正常组比较, 大鼠脑组织皮层、海马 BDNF 含量无显著性差异, 提示手术对本实验结果无影响; 与正常组相比, 模型组大鼠脑组织皮

层、海马 BDNF 含量明显减少 ($P < 0.01$), 提示模型组大鼠脑组织皮层、海马合成脑源性神经营养因子能力显著下降。与模型组相比, 智脑胶囊中、高剂量组、石杉碱甲组脑组织皮层、海马中 BDNF 含量明显增加 ($P < 0.01$); 智脑中、高剂量组的作用优于低剂量组, 与石杉碱甲组比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 提示智脑胶囊中、高剂量组提高组织合成、分泌 BDNF 的能力与石杉碱甲组相当。结果见表 1。

3.3 智脑胶囊对 AD 模型大鼠脑组织 TrkB 含量的影响 假手术组与正常组相比, 大鼠脑组织 TrkB 含量无显著性差异 ($P > 0.05$), 提示手术对本实验结果无影响; 与正常组相比, 模型组大鼠脑组织 TrkB 含量明显减少 ($P < 0.01$), 提示模型组大鼠脑组织表达 TrkB 的能力明显降低。与模型组相比, 智脑胶囊中、高剂量组与石杉碱甲组脑组织中 TrkB 含量明显增多 ($P < 0.01$), 提示两者均有促进脑组织表达脑源性神经因子受体的作用; 智脑胶囊中、高剂量组的作用优于低剂量组, 与石杉碱甲组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。结果见表 2。

表 1 智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠大脑皮层和海马 BDNF 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 $/(\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	BDNF/(OD 值)	
		皮层	海马
正常组	-	$0.3560 \pm 0.0322^{1)}$	$0.3573 \pm 0.0306^{1)}$
假手术组	-	$0.3510 \pm 0.0269^{1)}$	$0.3613 \pm 0.0259^{1)}$
模型组	-	0.2589 ± 0.0305	0.2580 ± 0.0327
石杉碱甲组	1×10^{-4}	$0.3312 \pm 0.0292^{1,2)}$	$0.3310 \pm 0.0288^{1,2)}$
智脑组	12.5	0.2897 ± 0.0145	0.2915 ± 0.0150
	25	$0.3481 \pm 0.0058^{1,3)}$	$0.3475 \pm 0.0055^{1,3)}$
	50	$0.3428 \pm 0.0273^{1,3)}$	$0.3428 \pm 0.0271^{1,3)}$

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与低剂量组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 2 智脑胶囊对 AD 模型大鼠脑组织 TrkB 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 $/(\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	TrkB/(OD 值)	
		皮层	海马
正常组	-	$0.8017 \pm 0.0719^{1)}$	$0.8023 \pm 0.0685^{1)}$
假手术组	-	$0.8012 \pm 0.0694^{1)}$	$0.7914 \pm 0.0637^{1)}$
模型组	-	0.5821 ± 0.0763	0.5846 ± 0.0754
石杉碱甲组	1×10^{-4}	$0.7374 \pm 0.0641^{1)}$	$0.7412 \pm 0.0648^{1)}$
智脑组	12.5	0.6273 ± 0.0654	0.6281 ± 0.0732
	25	$0.7645 \pm 0.0572^{1,2)}$	$0.7721 \pm 0.0569^{1,2)}$
	50	$0.7826 \pm 0.0581^{1,2)}$	$0.7814 \pm 0.0576^{1,2)}$

4 讨论

BDNF 在 AD 发病中的重要作用已达成共识。研究表明, BDNF 既能保护基底前脑胆碱能神经元, 也能改善海马和皮层神经元的生存。AD 患者脑中 BDNF 基因和蛋白表达水平明显降低, 而增加脑中 BDNF 水平可能延缓或阻止 AD 的进展。

BDNF 是神经营养素家族成员之一, 是一类含量极微、能够维持和促进特异性神经元生长、存活和分化, 影响突触可塑性的可溶性多肽分子。BDNF 广泛分布于大脑皮层、海马、杏仁体、屏状核、隔区、基底前脑、脊髓、黑质、纹状体、苍白球、小脑、脑干等各个区域, 主要表达于神经元的轴突上。它影响中枢神经系统变性易感的 AD 脑区的神经元的生存和功能。BDNF 对神经元的作用和作用机制非常复杂, BDNF 除保护和修复损伤的神经元外, 在促进学习和记忆的基础——功能依赖性神经可塑性方面有强大作用。而学习记忆的关键部位的海马与皮层是可塑性特别重要的脑区。海马是编码新信息的中心部件, 损伤后会出现严重的学习记忆障碍, AD 早期海马的功能即受到损害。AD 患者 BDNF 水平下降可通过二条通路影响海马: 一是低水平的 BDNF 可使突触编码能力降低, 二是 BDNF 水平不足使海马神经元更易遭受缺血、兴奋性毒性等损伤和变性疾病的损害^[3~4]。

BDNF 和相应的 TrkB 受体特异性结合, 引发细胞内受体区酪氨酸残基二聚化以及自磷酸化, 从而激活胞浆细胞信号途径。这样, 酪氨酸-磷酸化的 Trk 便成为吸收各种酶结构蛋白质和酶的支架, 最终

转导 BDNF 信号。

本研究结果表明, 模型组大鼠脑组织的 BDNF, TrkB 含量显著下降, 反映了兴奋性毒物 IBO 对基底前脑 Meynert 核和广泛性的神经元损害, 这是造成学习记忆障碍的重要机制。这与先前的文献报道一致。经智脑胶囊治疗后 BDNF、TrkB 含量显著升高, 与模型组比较有统计学意义; 智脑胶囊中剂量、高剂量组与石杉碱甲组均能增加模型大鼠脑组织 BDNF, TrkB 含量, 3 组间差异无统计学意义, 智脑胶囊低剂量组的作用要明显弱于中、高剂量组。本研究结果表明智脑胶囊具有促进神经元合成、释放 BDNF, 表达 TrkB 增加, 促进细胞信号转导, 从而修复和促进神经轴突重塑; 增强细胞内抗氧化酶活性, 对抗兴奋性氨基酸的毒性损伤, 保护和修复皮层和海马损伤的神经元, 从而具有改善学习记忆的作用。

[参考文献]

- [1] Sonnen JA, Keene CD, Montine KS, *et al.* Biomarkers for Alzheimer's disease [J]. *Expert Rev Neurother*, 2007, 7(8) : 1021.
- [2] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 33.
- [3] Bekinschtein P, Cammarota M, Izag LM, *et al.* Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis-and BDNF-dependent phase in the hippocampus [J]. *Neuron*, 2007, 53(2) : 261.
- [4] Fumagalli F, Racagni G, Riva MA. The expanding role of BDNF: a therapeutic target for Alzheimer's disease? [J]. *Pharmacogenomics J*, 2006, 6(1) : 8.

《中国实验方剂学杂志》入编中文核心期刊信息

依据文献计量学的原理和方法, 经研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 以及学科专家评审, 《中国实验方剂学杂志》入编《中文核心期刊要目总览》2008 年版(即第五版)之中国医学类的核心期刊。该核心期刊按《中国图书馆分类法》的学科体系, 列出了 73 个学科的核心期刊表, 并逐一对核心期刊进行了著录。著录项目包括: 题名、并列题名、主办单位、创刊时间、出版周期、学科分类号、ISSN 号、CN 号、邮发代号、编辑部地址、邮政编码、电话、网址、电子邮箱、内容简介等。该研究成果只是一种参考工具书, 主要是为图书情报部门对中文期刊的评估与订购、为读者导读提供参考。