

调心方对 β -淀粉样蛋白和皮质酮 抑制大鼠海马脑片 CA1 区 LTP 的作用研究

万 勤, 张永祥

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 采用细胞外微电极记录技术, 观察调心方对 β -淀粉样蛋白和皮质酮抑制大鼠海马脑片 LTP 作用的影响。结果发现, 在正常情况下, 海马脑片 LTP 诱发成功率约为 60%, 施以高频串刺激后 PS 幅度显著增高, PS 潜伏期明显缩短。预先用 β -淀粉样蛋白(0.2 μ M) 或皮质酮(2 μ M) 孵育海马脑片对正常 PS 的形状、幅度无明显影响; 但两者均可显著抑制脑片 LTP 的诱发率, 并且 PS 增幅程度与对照组相比也显著降低, 提示两者对海马 LTP 的诱导具有抑制作用。若用调心方(7.45mg/ml) 与 β -淀粉样蛋白或皮质酮共同孵育脑片后, 其 LTP 诱发率呈现上升趋势, 同时 PS 增幅也显著提高。以上结果表明, 调心方对 β -淀粉样蛋白或皮质酮对海马 LTP 的抑制效应具有明显的对抗作用, 这可能是其改善 AD 患者认知功能障碍的作用机制之一。

关键词: 调心方; LTP; β -淀粉样蛋白; 皮质酮; 海马脑片

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)06-0022-04

Effects of Tiao-Xin-Fang on Long-term Potentiation Inhibited by β -amyloid and Corticosterone in Rat Hippocampal Slices

WAN Qin, ZHANG Yong-xiang

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China)

Abstract: The effects of Tiao-Xin-Fang(TXF) on long-term potentiation (LTP) in rat hippocampal slices pretreated with β -amyloid or corticosterone were investigated by extracellular microelectrode recording technique. The results showed that the successful rate of evoking LTP was about 60% under normal condition. The PS amplitude was significantly increased and PS latent period was decreased. Pre-incubation of hippocampal slices with β -amyloid(0.2 μ M) or corticosterone(2 μ M) had little effect on either the sharp or amplitude of PS, indicating that they didn't influence the basal synaptic transmission. However, after tetanus the LTP induction rate and PS amplitude were both obviously decreased compared with the control, suggesting either of them inhibited LTP generation. In vitro application of TXF(7.45mg/ml) significantly antagonized their inhibitory effects on LTP induction. These results suggested that TXF antagonized the inhibitory effects of β -amyloid and corticosterone on LTP in rat hippocampal slices and that may be one of the mechanisms of TXF in improving the impaired learning and memory function of Alzheimer's disease patients.

Key words: Tiao-Xin-Fang; long-term potentiation; β -amyloid; corticosterone; hippocampal slices

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是发生于老年前期或老年期的以进行性痴呆为主要症状同时伴有精神行为异常的神经退行性疾病,其显著特征是严重的记忆丧失和个性改变,患者生活不能自理,寿命明显缩短^[1]。据报道,国外 AD 患病率在 65 岁以上的老年人中占 3%~8%,在 80 岁以上的老年人中高达 20%。随着世界人口老龄化,AD 已成为严重危害老年人身心健康的四大疾病之一。目

前虽有各种假说对 AD 的发病机制予以解释,但均不能从根本上得以阐明,其致病因素非常复杂,倾向于认为是一种与衰老密切相关的由多种致病因素共同作用的综合症。目前临床上尚无理想的药物用于 AD 的预防和治疗,因此,阐明 AD 的发病机理,研制新型的防治药物是当今国际药理学研究领域的重要课题之一。调心方是由党参、桂枝、茯苓、菖蒲、远志和炙草等组成的中药复方,大量临床实验研究表明,调心方能改善 AD 患者的认知功能障碍,对中重度 AD 患者均有一定的治疗作用^[2,3,4]。动物实验也显示,调心方对 β -淀粉样蛋白诱导的痴呆模型大鼠的

收稿日期: 2002-02-25

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(39830450)

空间学习记忆障碍具有明显的改善作用^[5,6],但目前对其作用机制仍不十分清楚。本文采用细胞外微电极记录技术诱导大鼠海马脑片长时程增强(long-term potentiation, LTP),然后分别观察β-淀粉样蛋白和皮质酮对脑片 LTP 的作用,进而研究调心方对其影响,从而深入探讨调心方改善 AD 患者认知功能障碍的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物与药物 二级成年雄性 Wistar 大鼠(体重 120g~200g)由军事医学科学院动物中心提供。调心方口服液由上海中医药大学老年医学研究所研制,含 7.45g 生药/ml。β-淀粉样蛋白(25~35)购于美国 Sigma 公司。皮质酮购于美国 Gibco BRL 公司。

1.2 海马脑片制备 将大鼠在乙醚麻醉下断头取脑,于大脑半球腹内侧分离出双侧海马,在 4℃ 供氧条件下,用振动切片机(Vibroslice MA752, Campden Ins, UK)沿与海马长轴垂直的方向将其切成约 400μm 的脑片,全部脑片置于不断通入氧混合气(95% O₂+5% CO₂)的人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)中,在室温下孵育 1~2h。ACSF 的成分为(mmol/L): NaCl 124; KCl 5; KH₂PO₄ 1.2; MgSO₄ 1.3; NaHCO₃ 26; CaCl₂ 2.5; Glucose 10,调节 pH 值至 7.3~7.4。

1.3 群峰电位记录 将孵育后的脑片置于 29~31℃ 恒温浴槽内,并不断通入氧混合气,用蠕动泵持续灌流 ACSF,速度为 2ml/min。双极刺激电极置于 CA1 区 Schaffer 侧支上,玻璃微电极(内充 4mol/L NaCl 溶液,阻抗 4~10MΩ)置于海马 CA1 区锥体细胞层,记录细胞外诱发群峰电位(population spike, PS),通过微电极放大器(Axoclamp 2A, Axon Ins, USA)与计算机联机经 Pclab2.2 软件(北京微信斯达科技发展有限公司)进行采样处理。

1.4 LTP 的诱发 记录前将刺激强度调节到能诱发 1/2~2/3 最大 PS 幅度的刺激强度水平,待 PS 基本稳定后施以 100Hz、100 串的强直刺激,如果 PS 增幅在 20% 以上,并且能维持 30min 以上则认为 LTP 成功诱发,分别观察对照组和给药组的 LTP 诱发率以及 PS 幅度、PS 潜伏期的变化情况。

1.5 数据分析及统计学处理 采用 Origin5.0(Microcal Software, USA)和 SPSS 软件对所获数据进行分析作图以及统计学处理。定量资料数据用“平均数±标准差”表示,采用单因素方差分析+q 检验进行统计学处理,LTP 诱发率采用定性资料的小样本

Fisher 精确检验,如果 $P < 0.05$ 则认为两组之间的差异具有显著性。

2 结果

2.1 大鼠海马脑片 LTP 的诱发 首先记录大鼠海马脑片 CA1 区细胞外诱发 PS,使其形状、幅度在较长一段时间内基本维持稳定。然后采用 100Hz、100 串的强直刺激诱发 LTP 产生。实验中观察到,在所记录的 28 例正常海马脑片中,当施以强直刺激后有 17 例脑片的 PS 幅度显著增大,并且能持续 30min 以上,即 LTP 的诱发成功率约为 60% 左右。以刺激前脑片的 PS 幅度为 100% 计算,强直刺激后 PS 约增加了 $35.77 \pm 10.79\%$ (自身对照 t 检验, $P < 0.001, n = 17$)。同样,也以刺激前 PS 潜伏期为 100% 计算,可见刺激后 PS 潜伏期也明显缩短,仅为刺激前的 $87.7 \pm 8.95\%$ (自身对照 t 检验, $P < 0.001, n = 17$)。

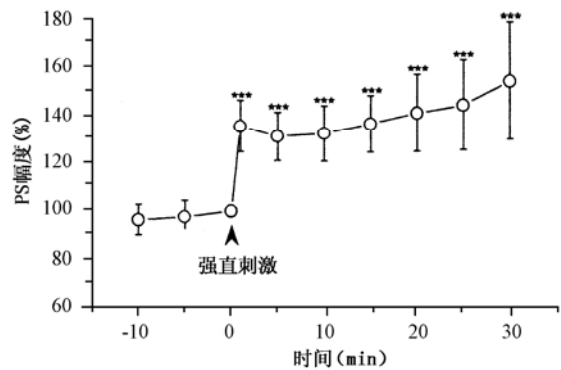


图 1 大鼠海马脑片强直刺激后 LTP 的诱发

上图为 LTP 诱发呈阳性的脑片在强直刺激后的 PS 增幅情况,以强直刺激前的基础 PS 幅度为 100% 计算,将其它各时间点的 PS 的平均值与之相比得到 PS 幅度的相对值,以百分数表示。自身对照 T 检验,*** $P < 0.001, n = 17$ 。

2.2 β-淀粉样蛋白对海马脑片 LTP 的抑制效应以及调心方的作用 待脑片 PS 基本稳定后,灌流含 0.2μM β-淀粉样蛋白的 ACSF,观察其对脑片基础 PS 的影响,结果发现所记录的五例脑片在灌流后的 30min 内 PS 的形状、幅度没有发生明显的变化,提示 β-淀粉样蛋白对大鼠海马脑片基础突触传递基本没有影响。

预先用同样浓度的 β-淀粉样蛋白孵育海马脑片 2~3h 后,再观察其 LTP 的诱发情况。结果发现 LTP 的诱发受到了明显的抑制,15 例脑片中仅有 4 例诱发出,即 LTP 的诱发率降到了 26% (表 1);同时,与正常对照组相比,强直刺激后 PS 的增幅也明显降低(图 2),提示 β-淀粉样蛋白对大鼠海马脑片 LTP 的诱发具有显著的抑制作用。

若预先将含有 7.45mg 生药/ml 的调心方与

0.2μM β-淀粉样蛋白(均为终浓度)的 ACSF 孵育脑片,同时也用此液灌流脑片后,LTP 的诱发率呈现出一定的升高趋势(表 1),同时 PS 的增幅也显著提高(图 2),从而提示调心方可对抗 β-淀粉样蛋白对海马脑片 LTP 的抑制作用,但三组之间的 PS 潜伏期并没有表现出明显差别。

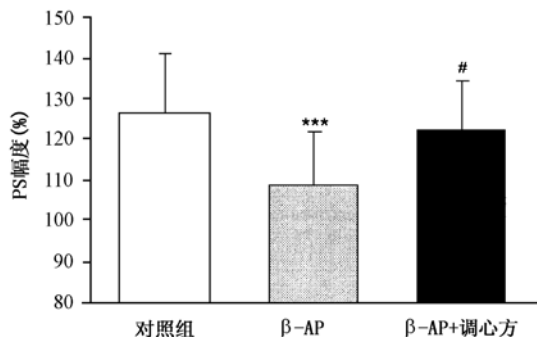


图 2 调心方对 β-淀粉样蛋白抑制强直刺激后大鼠海马脑片 PS 增幅的影响

三组均分别以强直刺激前的基础 PS 幅度为 100% 计算,将其它各时间点的 PS 的平均值与之相比得到 PS 幅度的相对值,以百分数表示。One-way ANOVA + q 检验,与对照组相比,*** P < 0.001, n = 15~ 28; 与 β-AP 组相比,# P < 0.05, n = 14~ 15。

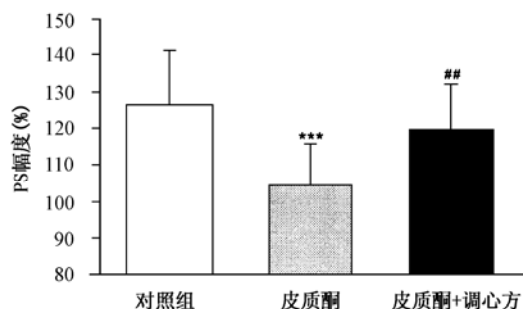


图 3 调心方对皮质酮抑制强直刺激后大鼠海马脑片 PS 增强的影响

三组均分别以强直刺激前的基础 PS 幅度为 100% 计算,将其它各时间点的 PS 的平均值与之相比得到 PS 幅度的相对值,以百分数表示。One-way ANOVA + q 检验,与对照组相比,*** P < 0.001, n = 15~ 28; 与皮质酮组相比,## P < 0.01, n = 15~ 16。

2.3 皮质酮对海马脑片 LTP 的抑制效应以及调心方的影响 同样,待脑片 PS 基本稳定后,再灌流含 2μM 皮质酮的 ACSF 观察其对基础 PS 的影响,发现五例脑片在所记录的 30min 内 PS 的形状、幅度基本没有发生变化,提示皮质酮也不影响大鼠海马脑片的基础突触传递。

预先用同样浓度的皮质酮孵育海马脑片 2~ 3h 后,再观察其 LTP 的诱发情况。结果发现,海马脑片 LTP 的诱发也受到了明显的抑制,15 例脑片中仅有 3 例诱发出来(表 2);同时,与正常对照组相比,强直刺激后 PS 的增幅也显著降低(图 3),提示皮质酮对

大鼠海马脑片 LTP 的诱发也具有明显的抑制作用。

若将含有 7.45mg/ml 终浓度的调心方与 2μM 皮质酮的 ACSF 孵育并灌流脑片后 LTP 的诱发率呈现出一定的升高趋势(表 2),同时 PS 的增幅也明显提高(图 3),从而提示调心方也可对抗皮质酮对海马脑片 LTP 的抑制作用,同样,三组之间的 PS 潜伏期并没有显示出明显差别。

表 1 调心方对 β-淀粉样蛋白抑制大鼠海马脑片 LTP 诱发率的影响

组别	脑片例数			LTP 诱发百分率 (%)
	阳性数	阴性数	总数	
对照组	17	11	28	60.71
β-淀粉样蛋白	4	11	15	26.67*
β-淀粉样蛋白+ 调心方	6	8	14	42.86

注:采用小样本的 Fisher 精确检验法,与对照组相比,* P < 0.05

表 2 调心方对皮质酮抑制大鼠海马脑片 LTP 诱发率的影响

组别	脑片例数			LTP 诱发百分率 (%)
	阳性数	阴性数	总数	
对照组	17	11	28	60.71
皮质酮	3	12	15	20*
皮质酮+ 调心方	6	10	16	37.5

3 讨论

病理学研究发现,AD 患者大脑尤其是皮层和海马具有典型的病理改变,如大量神经元丢失,神经原纤维缠结以及淀粉样蛋白大量沉积等。海马是脑内与学习记忆功能关系最为密切的部位之一,在动物和人类中枢神经系统的所有脑区和神经核团中,海马的增龄性功能障碍最为明显。在老年性痴呆和其它一些神经退行性病变过程中都存在着严重的海马功能障碍,老年性痴呆患者海马损伤程度同其认知功能的衰退之间具有明显的相关性,说明海马功能障碍同 AD 患者认知功能障碍密切相关^[7,8]。

AD 最为重要的病理特征之一是纤维状 β-淀粉样蛋白(β-AP)在神经细胞外及脑血管壁大量沉积从而形成老年斑。大量研究表明,β-AP 的沉积在 AD 发病中发挥着关键性作用,它可能是 AD 发生的早期性共同病理促发因素,现已明确与家族性 AD 相关的致病基因 APP 基因、APOE 基因、PS-1 基因、PS-2 基因几乎都涉及到 β-AP 的异常释放或沉积增多^[9,10]。近年来研究还发现,β-AP 在促进神经元凋亡方面也起重要作用,它可通过多种途径引发细胞凋亡,其它一些致病因素也可直接或间接地通过 β-

AP 加速神经细胞的凋亡, 而神经细胞凋亡直接参与了 AD 的发病机制^[11], 表明 β -AP 在 AD 发病过程中具有非常重要的作用。我们在实验中发现, 预先用 0.2 μ M 的 β -AP 孵育海马脑片后, 其 LTP 的诱发率以及 PS 增幅程度均明显降低, 表明 β -AP 对海马 LTP 的诱发具有抑制作用, 这与文献报道相一致^[12, 13]; 而将调心方与 β -AP 共同孵育脑片后 LTP 的诱发率呈上升趋势, 同时 PS 增幅也明显升高, 从而提示调心方可对抗 β -AP 对海马 LTP 的抑制作用。

目前普遍认为中药复方的作用是通过方中所含的多种活性物质, 由经多种途径而发挥的综合效应, 因此调心方的作用亦可能是多途径、多环节的。因而我们还观察了一类重要的内源性糖皮质激素—皮质酮对海马脑片 LTP 的作用以及调心方的影响。在体内皮质酮的分泌受控于下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA) 轴。大量研究表明, 海马的增龄性机能障碍以及老年性痴呆所表现的海马机能损伤同糖皮质激素的过度分泌关系密切相关。Landfield 等提出糖皮质激素致脑老化学说, 认为血浆糖皮质激素水平呈增龄性升高, 它作用于富含糖皮质激素受体的海马导致海马神经细胞退化和死亡。同时海马还参与 HPA 轴的负反馈调节, 海马损伤导致其调节能力下降, 使血浆糖皮质激素水平升高, 致使海马受损程度加重; 而海马损伤加重又可进一步引起糖皮质激素水平升高, 从而形成正反馈恶性循环。当血浆糖皮质激素水平升高到一定程度时即可普遍作用于大脑神经细胞, 导致神经细胞的广泛退化和死亡, 进而引起整个大脑功能的衰退^[14, 15]。我们在实验中发现, 2 μ M 的皮质酮对海马脑片 LTP 诱发率以及 PS 增幅具有显著的抑制作用, 而调心方对皮质酮的作用也表现出明显的对抗效应。

目前广泛认为, 海马 LTP 是与学习记忆有关的突触可塑性的重要实验模型, 是海马对外来信息进行编码记忆的神经生物学基础^[16]。 β -AP 和皮质酮均与 AD 的发病机制密切相关, 也都可以抑制海马 LTP, 表明两者对海马学习记忆功能具有损伤作用; 而调心方对 β -AP 和皮质酮抑制海马 LTP 的作用表现出明显的对抗效应, 提示方中所含活性物质可直接作用于海马突触传递过程, 改善神经突触的可塑性, 易化突触传递, 该作用可能是其改善 AD 患者认知功能障碍的重要作用机制之一。

参考文献:

- [1] Cummings JL, Vinter HV, Cole GM, et al. Alzheimer's disease (etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities) [J]. *Neurology*, 1998, 51(Suppl): 2-17.
- [2] 林水淼, 杨柏灿. 养心健脑液治疗 Alzheimer 痴呆的临床研究[J]. *上海中医药大学学报*, 1997, 11(1): 44-45.
- [3] 李亚明, 张春燕, 王健, 等. 调心方对中、重度老年性痴呆病智力的影响[J]. *现代康复*, 2000, 4(7): 996-997.
- [4] 周如倩, 林水淼, 王健, 等. 中药调心方、补肾方改善阿尔茨海默病认知功能的临床研究[J]. *现代康复*, 2001, 5(6): 46-47.
- [5] 周晖, 赵伟康. 调心方对大鼠痴呆模型空间学习记忆障碍和胆碱能系统的影响[J]. *中药药理与临床*, 1998, 14(3): 29-31.
- [6] 刘学源, 徐品初, 林水淼, 等. 调心方对杏仁核注射 A β 大鼠记忆行为和胆碱能系统作用的研究[J]. *现代康复*, 2001, 5(5): 48-49.
- [7] Coleman P, Flood D. Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 1987, 11: 1316-1321.
- [8] Mann DMA. The neuropathology of Alzheimer's disease: a review with pathogenetic, etiological and therapeutic considerations[J]. *Mech Aging Dev*, 1985, 31: 213-255.
- [9] Tomita T, Maruyama K, Saido TC, et al. The presenilin2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer's disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(5): 2025-2030.
- [10] Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes and treatments[J]. *Science*, 1997, 275: 630-631.
- [11] Smale G, Nichols NR, Brady DR. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease[J]. *Exp Neurol*, 1995, 133: 225-230.
- [12] Ye L, Qiao LT. Suppressive action produced by β -amyloid peptide fragment 31-35 on long-term potentiation in rat hippocampus is NMDA receptor independent: It's offset by (-) hyperzine A[J]. *Neuroscience Letters*, 1999, 275: 187-190.
- [13] Chen QS, Kagan BL, Hirakura Y, et al. Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta peptides[J]. *J Neurosci Res*, 2000, 60(1): 65-72.
- [14] Landfield PW, Sundberg DK, Smith MS, et al. Mammalian aging: theoretical implications of changes in brain and endocrine systems during mid and late life[J]. *Peptides*, 1980, 1(Suppl 1): 185-196.
- [15] Landfield PW. Modulation of brain aging and studies on brain endocrine correlates by long-term alteration of adrenal steroid and neurally-active peptides [M]. In: *Progress in brain research*. Vol. 72. de Kloet ER, Weiegant VM and de Wied D, Eds, 1987, 278-300. Elsevier Science publishers. Amsterdam.
- [16] Bliss T, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus[J]. *Nature*, 1993, 361: 31-39.