

· 经典名方 ·

补肾益气方药左归丸和益气聪明汤对老年大鼠学习记忆能力及相关基因表达的影响

王璐, 孙丽娥, 康湘萍, 张学礼, 胡海燕, 龚张斌, 金国琴*
(上海中医药大学基础医学院, 上海 201203)

[摘要] **目的:**观察补肾方药(左归丸)、益气方药(益气聪明汤)及两方合用(合剂)对老年大鼠空间学习能力及学习记忆相关基因表达变化的影响,并探索相关表观遗传酶的变化。**方法:**以自然衰老(24月龄)SD雄性大鼠为动物模型,随机分为老年组,左归丸组($12.12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),益气聪明汤组($10.18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),合剂组($11.15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和老年皮质酮(glucocorticoid,GC)拮抗组($5\times 10^{-3}\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),另设青年组(同品系5月龄)。采用Morris水迷宫法观察各组大鼠空间记忆能力,激光共聚焦法观察各组大鼠大脑海马区乙酰化酶2(histone deacetylase 2,HDAC2)与甲基化CpG岛结合蛋白2(methyl CpG binding protein 2,MeCP2)的共定位情况,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织HDAC2,组蛋白乙酰转移酶1(histone acetyltransferase 1,HAT1),糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR),突触蛋白I(synapsin,Syn-1)表达变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测HDAC2 mRNA的表达及各药物对上述指标异常变化的改善作用。**结果:**与青年组(正常组)比较,老年组(模型组)大鼠潜伏期显著延长($P<0.05$),穿越平台次数显著减少($P<0.05$);与老年组(模型组)比较,左归丸组、益气聪明汤组大鼠潜伏期显著缩短($P<0.05$),穿越平台次数有所增加。与青年组比较,老年组大鼠HDAC2蛋白与mRNA表达显著增多($P<0.05$, $P<0.01$),且在细胞核内与MeCP2的共表达明显增多;HAT1,GR和Syn-1表达显著降低($P<0.05$, $P<0.01$)。各给药组均能不同程度改善上述指标的异常变化,但益气方药以及两方合剂对HAT1无改善作用。**结论:**补肾方药左归丸、益气方药益气聪明汤可通过增加老年大鼠学习记忆相关蛋白GR,Syn-1与表观遗传修饰酶HAT1的表达,降低HDAC2的表达,并同时减少HDAC2蛋白与MeCP2的细胞核内共定位,以改善老年大鼠空间学习记忆能力。

[关键词] 衰老; 补肾方药; 左归丸; 益气方药; 益气聪明汤; 学习记忆; 表观遗传修饰

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)06-0015-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190601

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181204.1054.010.html>

[网络出版时间] 2018-12-05 10:34

Effect of Recipes for Tonifying Kidney and Replenishing Qi on Learning and Memory-related Genes in Aged Rats

WANG Lu, SUN Li-e, KANG Xiang-ping, ZHANG Xue-li, HU Hai-yan, GONG Zhang-bin, JIN Guo-qin*
(Basic Medical School, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of recipes for tonifying kidney and replenishing Qi, Zuoguiwan (ZG) and Yiqi Congming Tang (YQ) on memory capacity, expressions of learning and memory-related genes expression, and explore the changes in relevant epigenetic modification enzymes. **Method:** SD male rats with natural aging (24 months old) were used as animal models and randomly divided into aged control group, aged ZG group ($12.12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), aged YQ group ($10.18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), aged compound group ($11.15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and aged antagonist RU38486 group ($5\times 10^{-3}\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Another 5 months old male SD rats were included as the young

[收稿日期] 20180829(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473583)

[第一作者] 王璐,在读博士,从事中药预防衰老及老年病的研究,Tel:021-51322378,E-mail:doubledear@163.com

[通信作者] *金国琴,硕士,教授,从事中药预防衰老及老年病的研究,Tel:021-51322147,E-mail:jinguoqin8405@126.com

control group. Morris water maze method was used to observe the spatial learning and memory ability of the rats. The co-localizations of histone deacetylase 2 (HDAC2) and methyl CpG binding protein 2 (MeCP2) in hippocampus of rats in each group were observed by laser confocal microscope. The changes in expressions of glucocorticoid receptor (GR), synapsin1 (Syn-1), HDAC2, and histone acetyltransferase 1 (HAT1) proteins in hippocampus of each group were detected by Western blot, and mRNA expression of HDAC2 was detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase Chain reaction (Real-time PCR). At the same time, the effects of ZG, YQ and compound decoction in alleviating the above-mentioned abnormal changes were observed. **Result:** Compared with the young control group (control group), the latency of the aged control group was significantly prolonged ($P < 0.05$), the number of crossing platforms was significantly reduced ($P < 0.05$); compared with the aged control group (model group), the latencies of the ZG group and the YQ group were significantly shortened ($P < 0.05$), and the numbers of crossing platforms were increased. Compared with the young control group, the protein and mRNA expressions of HDAC2 in the aged control group were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the co-expression with MeCP2 in the nucleus was significantly increased; and the expressions of HAT1, GR and Syn-1 were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). ZG, YQ and compound can all alleviate the abnormal changes of the above indicators to varying degrees, but the YQ and the compound group had no effect on HAT1. **Conclusion:** ZG group, YQ group, and compound group can improve the spatial learning and memory abilities of aged rats by increasing the expression of learning-memory-associated protein GR and epigenetic modification enzyme HAT1, and reducing the expression of HDAC2 and the co-localization of HDAC2 protein and MeCP2 in the nucleus.

[**Key words**] aging; tonifying kidney decoction; Zuoguiwan; Yiqi decoction; Yiqi Congming Tang; learning and memory; epigenetic modification

老年人群中记忆损害是非常普遍的现象,称为年龄相关性记忆损害(age-associated memory impairment, AAMI),记忆损害不仅影响老年人的生活质量,如果得不到有效控制,将进一步发展为阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)。目前对于衰老相关学习记忆功能损伤的原因及分子机制的认识并不透彻,导致缺乏有效的改善方法和干预措施。

大量实验报道及本课题组前期研究结果表明,衰老过程中下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA)过度亢进引起糖皮质激素(glucocorticoid, GC)(人类主要为皮质醇,啮齿动物主要为皮质酮)异常增高,高水平的GC与学习记忆关键基因表达的下降以及认知损伤存在密切的联系^[1-2]。大脑海马是糖皮质激素受体密度最高的脑分区,衰老过程中异常增高的GC透过血脑屏障,可作用于海马糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR),引起海马GR下调,抑制后续的兴奋性氨基酸受体N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR)-钙调蛋白依赖蛋白激酶II(Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase II, CaMK II)-细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)-环磷腺

苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)信号通路,进而影响学习记忆关键基因突触蛋白1(Synapsin, Syn-1)的表达,从而影响神经元的突触可塑性,导致学习记忆能力的损伤^[3-4]。

近年有大量研究报道,表观遗传修饰变化参与学习记忆相关基因的表达调控^[5]。组蛋白去乙酰化酶2(histone deacetylase 2, HDAC2)是表观遗传修饰酶,与甲基化CpG岛结合蛋白2(methyl CpG binding protein 2, MeCP2)结合可抑制基因转录。老年大鼠大脑海马区HDAC2表达升高,抑制Syn-1等学习记忆基因的表达影响学习记忆。组蛋白乙酰转移酶1(histone acetyltransferase 1, HAT1)与HDAC2作用相反,促进基因转录,有利于学习记忆。

增龄性学习记忆能力损伤在中医理论中属“健忘”范畴。“健忘”一词,最早见于《太平圣惠方》,“夫心者,精神之本,意智之根……气浊则神乱,神乱则血脉不荣,精神离散,故令心智不利而健忘也”。中医认为其病位在脑,但与脾、肾功能衰退关系密切^[6-7]。针对某老年病门诊600例55岁以上患者的首诊结果显示,证候的诊断率以肾阴虚证651次,占50.2%;其次为脾虚证321次,占24.8%^[8]。

故中医常用补肾健脾益气法防治衰老和衰老性疾病,具有较好疗效。左归丸(出自《景岳全书》)与益气聪明汤(出自《东垣试效方》)分别为临床经典的补肾方与益气方。课题组前期研究初步发现,左归丸与益气聪明汤可通过改善衰老大鼠 HPA 轴过度亢进,影响突触受体表达与脑源性神经营养因子(BDNF)/酪氨酸激酶 B(TrkB)信号转导链活性,延缓学习记忆退化^[9]。

本研究在前期工作基础上,进一步以中医衰老与脾肾虚衰理论为指导,以 24 月龄自然衰老大鼠为动物模型,主要采用激光共聚焦法,蛋白免疫印迹法(Western blot),实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)等方法,着重观察老年大鼠表观遗传修饰酶 HDAC2, HAT1 表达变化与学习记忆相关基因 GR, Syn-1 表达变化的关系,及中药复方左归丸、益气聪明汤及两方合剂的调整作用,为临床采用补肾填精、益气升阳健脾法延缓学习记忆退化提供新的实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康 12 月龄 SD 大鼠 36 只,雄性,体重(450 ± 20) g, SPF 级,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。上海中医药大学实验动物中心清洁级饲养,动物合格证号 SCXK(沪)2008-2016。本研究涉及的动物实验部分均符合上海中医药大学动物伦理委员会的要求(批号#11051)。

1.2 药物与试剂 左归丸由熟地黄 20 g(批号 150918),山药 10 g(批号 150905),菟丝子 10 g(批号 150923),枸杞子 10 g(批号 150905),山萸肉 10 g(批号 150922),牛膝 7.5 g(批号 150727),龟板胶 10 g(批号 150922),鹿角胶 10 g(批号 150922)组成;益气聪明汤由黄芪 15 g(批号 150924),炙甘草 15 g(批号 150922),人参片 15 g(批号 150806),升麻 9 g(批号 150928),葛根 9 g(批号 150908),蔓荆子 4.5 g(批号 150630),芍药 3 g(批号 150828),黄柏 3 g(批号 150825)组成,以上中药由学校资产管理处试剂采购部统一采购,购自上海康桥中药饮片有限公司,由上海中医药大学李西林教授鉴定。将各方药按传统方法水煎成剂浓缩,左归丸和益气聪明汤药液最终分别含生药量为 1.69 g·mL⁻¹和 2.0 g·mL⁻¹。-80 ℃ 保存,临用前稀释饮用,合剂以稀释后的左归丸药液与益气聪明汤药液等体积混合后饮用。Syn-1 兔抗大鼠单克隆抗体,GR 兔抗大鼠单克隆抗体,HDAC2 兔抗大鼠单克隆抗体,HAT1 兔抗大鼠单克隆抗体,MeCP2 小鼠抗兔单克隆抗体

(美国 Abcam 公司,批号分别为 GR145230-8, 2768, GR112991-34, GR7602801, 236013-4);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔抗大鼠多克隆抗体(美国 CST 公司,批号#5174);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G, HRP 山羊抗兔 IgG, trizol(碧云天生物技术研究所,批号分别为 A0216, A0208, A0221);GC 拮抗剂 RU38486(美国 MCE 公司,批号 HY-13683)。

1.3 仪器 DigBehv-MG 型 Morris 水迷宫测试分析软件(上海吉量软件科技有限公司);PVDF 膜(美国 Milipore 公司);PowerPac™ HC 型蛋白电泳仪,Mini Protean 3 Cell 型电泳槽、转移槽, biorad ChemiDoc MP 型凝胶成像分析系统, CFX96Touch 型 Real-time PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);LSM800 型蔡司激光共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模^[10]与给药 SD 大鼠随机分为 5 组,分别为老年组、左归丸组、益气聪明汤组、合剂组及 GC 拮抗组,另设同品系 5 月龄青年组。青年组与老年组 SPF 级饲养(学校动物房专人给予大鼠饲料和饮水,严格质控)。自 21 月龄起,分别给左归丸组、益气聪明汤组及合剂组大鼠饮用左归丸、益气聪明汤及合剂药液(剂量相当于临床成人每公斤体质量剂量的 9 倍)^[4],连续 3 个月,每周服药 5 d,停药 2 d;GC 拮抗组于水迷宫 3 h 前,腹腔注射 GC 拮抗剂 RU38486(5 mg·kg⁻¹)^[5]。

2.2 观测指标

2.2.1 Morris 水迷宫法测试空间学习记忆能力 实验前大鼠自由游泳 2 min。平台固定于迷宫西南象限正中,水面高出平台 1.5 cm,水温保持在 19 ~ 20 ℃。大鼠连续训练 5 d,每天 2 次分别从正北、正东两个起始点投放,设定最长游动时限为 70 s,电脑自动计时,记录大鼠找到平台所需要的时间,即潜伏期(s)。如果大鼠 70 s 内未能找到平台,潜伏期记为 70 s,同时将其引至平台上,在平台上停留 20 s。记录每天各组大鼠两次潜伏期的时间(s),取均值进行统计学评价。

2.2.2 激光共聚焦检测 HDAC2 和 MeCP2 共定位 脑组织冰冻切片的制备:大鼠麻醉(10%水合氯醛,3.0 mL·kg⁻¹体质量);“U”型切口剪开腹腔暴露心脏;将输液管粗针头插入左心室并随即剪破右心耳;快速滴注灌流生理盐水 250 mL;慢速滴注灌流 4%多聚甲醛 250 mL;开颅取出整个脑组织,并将其转入 4%多聚甲醛于 4 ℃继续固定 24 h;转入 15%

蔗糖溶液脱水,待脑组织沉淀后再转入 30% 蔗糖溶液;OCT 于 12 孔板中包埋脑组织。置于 -80 °C 保存;使用冰冻切片机切得 30 μm 厚度脑片,放入冰冻切片保护液,-20 °C 保存。

激光共聚焦观察 HDAC2/MeCP2 蛋白共定位:将脑片进行抗原修复,0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,0.2% PBS-TritonX-100 透膜洗涤 20 min,封闭 1 h 孵育,一抗 HDAC2 兔单克隆抗体(1:1 000),MeCP2 鼠单克隆抗体(1:200),洗涤,孵育荧光二抗(Cy3 1:1 000,FITC 1:200),洗涤,封片。激光共聚焦显微镜下观察记录各蛋白表达情况。

2.2.3 Western blot 检测蛋白表达 分离大鼠海马 50 mg 放入 1.5 mL 离心管中;加入 RIPA 裂解液 900 μL(含 100 nmol·L⁻¹ PMSF)冰浴匀浆 4 °C,14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,提取上清液分装,-80 °C 保存。另留取少量上清双缩脲法定量蛋白。取上述等量蛋白提取液(总蛋白 40 μg)进行聚丙烯酰胺电泳,采用湿转法转膜(300 mA,90 min),室温封闭 1 h,PBST 洗膜、发光检测,加入一抗(1:1 000),二抗(1:2 万),ECL 显色后凝胶成像分析系统直接成像、拍照,使用 Image J 软件分析蛋白条带,求得灰度值。

2.2.4 Real-time PCR 检测 HDAC2 mRNA 表达 trizol 试剂提取大鼠海马总 RNA,测定吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀,琼脂糖凝胶电泳判断所提取 RNA 的纯度和完整性;测定 RNA 浓度后分装,-30 °C 保存待用。逆转录生成 cDNA 及 RT-PCR 反应参照试剂盒说明书进行,采用两步法,热循环参数为 95 °C 30 s,95 °C

5 s,60 °C 30 s,40 个循环。HDAC2 引物上游 5'-CAAGCGGATAGCTTGTGATG-3',下游 5'-CTCAATCCTGGCTTTTTTGG-3',片段长度 164 bp。β-肌动蛋白(β-actin)引物上游 5'-CCCATCTA TGAGGGTTACGC-3',下游 5'-TTTAATGTCACGCA CGATTTC-3',片段长度 150 bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成。实验结果采用 2^{-ΔΔC_t} 法分析。

2.3 统计学方法 统计学处理采用 SPSS 20.0 软件,所有数据符合正态分布且方差齐者以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,LSD 法检测。水迷宫检测数据采用重复测量数据的方差分析方法进行统计^[11],P<0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对老年大鼠空间学习记忆行为变化的影响 训练第 1~5 天期间,无论青年组还是老年组,大鼠随训练次数增加,找到平台所需时间(潜伏期,s)逐渐缩短,但老年组大鼠的潜伏期较青年组明显延长(P<0.05);第 2~5 天期间,各用药组大鼠的潜伏期较老年组均有缩短趋势,其中老年拮抗剂组达到显著性差异(P<0.05),左归丸组和益气聪明汤组在第 3~4 天期间达到显著差异(P<0.05)。老年组大鼠穿越平台区的次数较青年组明显减少(P<0.05),各用药组大鼠穿越平台次数较老年组有所增加,其中 GC 拮抗组穿越平台次数最多,其次为左归丸组,益气聪明汤组、合剂组,但未见显著差异。各组潜伏期变化见表 1,穿越平台区次数见表 2。

表 1 补肾益气方药对老年大鼠水迷宫潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of recipes for tonifying kidney and replenishing Qi on latency of aging rats($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
青年	-	55.47 ± 4.23	44.91 ± 3.39	20.50 ± 8.12	17.00 ± 4.43	11.67 ± 6.02
老年	-	71.00 ± 0.00 ¹⁾	65.00 ± 11.61 ¹⁾	69.33 ± 4.08 ¹⁾	67.17 ± 9.39 ¹⁾	66.33 ± 5.72 ¹⁾
左归丸	12.12	64.67 ± 10.76	60.33 ± 9.35	53.83 ± 8.57 ³⁾	34.17 ± 5.91 ³⁾	42.83 ± 11.69
益气聪明汤	10.18	67.17 ± 9.39	60.50 ± 6.72	59.17 ± 8.59 ³⁾	45.67 ± 11.84 ³⁾	56.00 ± 10.95
合剂	11.15	71.00 ± 0.00	69.00 ± 4.90	66.83 ± 6.46	61.50 ± 14.05	58.17 ± 12.69
GC 拮抗	5 × 10 ⁻³	58.67 ± 9.60 ³⁾	54.50 ± 10.45 ³⁾	47.00 ± 8.85 ³⁾	29.33 ± 8.31 ³⁾	30.50 ± 8.29 ³⁾

注:与青年组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与老年组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表 2~4 同)。

3.2 对老年大鼠 HDAC2 与 MeCP2 蛋白在海马神经细胞核中共表达的影响 图中 Cy3(红色)标记 HDAC2,FITC(绿色)标记 MeCP2,DAPI(蓝色)标记细胞核,用 Cy3 荧光剂标记 HDAC2,老年组较青年组红色荧光强度升高,表示 HDAC2 蛋白表达增强。

与老年组比较,老年 GC 拮抗组、左归丸组、益气聪明汤组和合剂组红色荧光强度有所下降,表示 HDAC2 蛋白表达降低;而用 FITC 标记 MeCP2,各实验组则出现相反变化趋势。进一步用 DAPI 标记细胞核,并与 HDAC2 和 MeCP2 荧光图片重叠,观察到

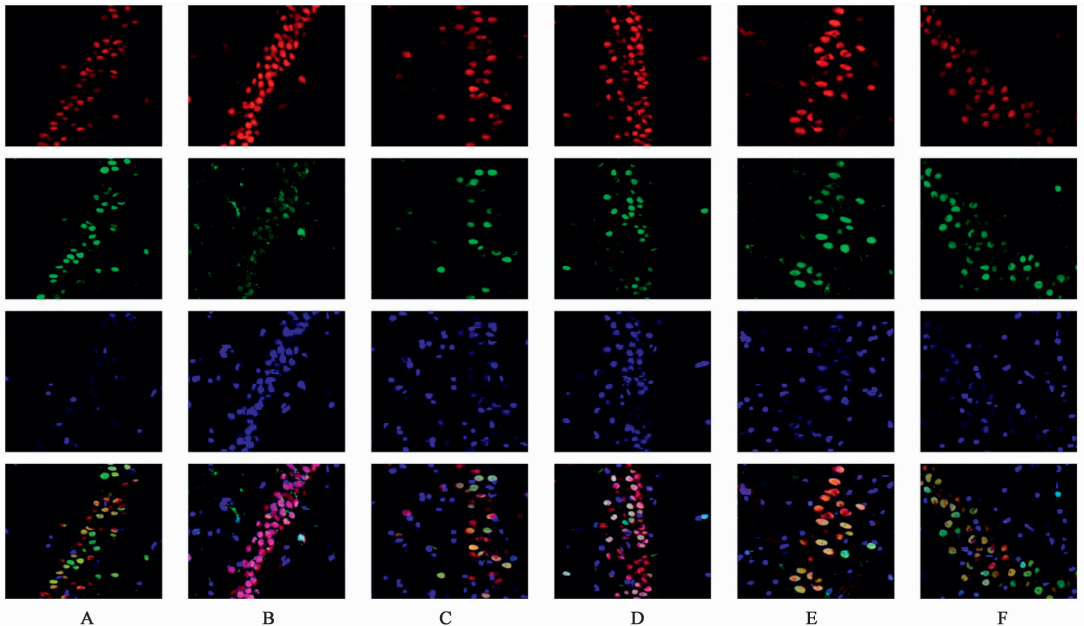
表 2 补肾益气方药对老年大鼠穿越平台区次数的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 2 Effect of recipes for tonifying kidney and replenishing Qi on number of crossing platforms of each aging rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	第 6 天/次
青年	-	2.83 ± 1.94
老年	-	$0.83 \pm 0.41^{1)}$
左归丸	12.12	1.50 ± 0.84
益气聪明汤	10.18	1.17 ± 0.41
合剂	11.15	1.00 ± 0.63
GC 拮抗	5×10^{-3}	1.83 ± 0.75

HDAC2 和 MeCP2 蛋白表达均发生在细胞核内,并显示出增龄性变化。各用药组均有不同程度的纠正作用,其中 GC 拮抗组效果最为明显,其次为左归丸

组。见图 1。

3.3 对老年大鼠海马组织 HDAC2, HAT1, GR 和 Syn-1 蛋白表达的影响 与青年组比较,老年组大鼠表观遗传学修饰酶 HDAC2 蛋白的表达显著升高($P < 0.01$), HAT1 蛋白的表达显著降低($P < 0.01$);学习记忆相关基因 GR, Syn-1 蛋白的表达显著下降($P < 0.01$)。与老年组比较,各用药组均可显著降低 HDAC2 蛋白的表达($P < 0.01$);左归丸组可显著升高 HAT1 的表达($P < 0.01$),而其他用药组对 HAT1 无显著改善作用。左归丸组、合剂组均可显著上调 GR 蛋白表达($P < 0.01$);左归丸组、益气聪明汤组、合剂组均可显著上调 Syn-1 蛋白的表达($P < 0.01$)。见图 2,表 3。



A. 青年组; B. 老年组; C. 左归丸组; D. 益气聪明汤组; E. 合剂组; F. GC 拮抗组(图 2 同)

图 1 补肾益气方药对老年大鼠 Hdac2 与 MeCP2 蛋白在海马神经细胞核中共表达的影响(免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of recipes for tonifying kidney and replenishing Qi on co-localization of Hdac2 and MeCP2 proteins in hippocampal neurons of aging rats(IF, $\times 400$)

3.4 对老年大鼠海马组织 HDAC2 mRNA 表达的影响 与青年组比较,老年组大鼠海马组织表观遗传修饰酶蛋白 HDAC2 mRNA 表达显著增高($P < 0.01$)。与老年组比较,各用药组大鼠海马组织 HDAC2 mRNA 表达不同程度降低,其中左归丸组效果最佳($P < 0.01$),其次为益气聪明汤组、合剂组($P < 0.01$)和 GC 拮抗组($P < 0.05$)。见表 4。

4 讨论

学习记忆能力降低是衰老的重要标志之一,继续发展可能引发轻度老年性认知缺陷(MCI),甚至 AD^[12],所以对增龄性学习记忆损害的机制研究与改善记忆损伤药物的研发具有重要的意义。近年

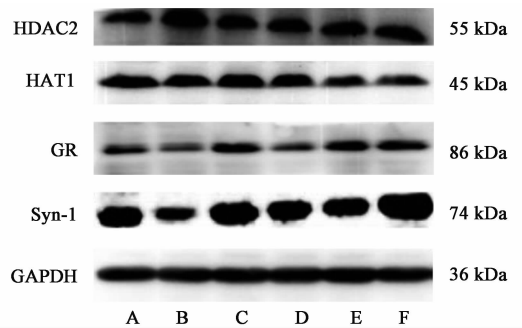


图 2 大鼠海马组织中 HDAC2, HAT1, GR 和 Syn-1 蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of HDAC2, HAT1, GR and Syn-1 protein of hippocampus in rats

来,已陆续有研究报道,中药复方可通过学习记忆相

表 3 补肾益气方药对老年大鼠海马组织 HDAC2, HAT1, GR 和 Syn-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of recipes for tonifying kidney and replenishing Qi on expression of HDAC2, HAT1, GR and Syn-1 protein in hippocampus of aging rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HDAC2/GAPDH	HAT1/GAPDH	GR/GAPDH	Syn-1/GAPDH
青年	-	0.66 ± 0.05	0.99 ± 0.02	0.49 ± 0.03	0.71 ± 0.02
老年	-	1.00 ± 0.05 ²⁾	0.75 ± 0.03 ²⁾	0.36 ± 0.02 ²⁾	0.41 ± 0.03 ²⁾
左归丸	12.12	0.68 ± 0.04 ⁴⁾	0.87 ± 0.03 ⁴⁾	0.61 ± 0.04 ⁴⁾	0.83 ± 0.03
益气聪明汤	10.18	0.67 ± 0.08 ⁴⁾	0.80 ± 0.03	0.33 ± 0.04	0.70 ± 0.01
合剂	11.15	0.78 ± 0.10 ⁴⁾	0.51 ± 0.05 ⁴⁾	0.57 ± 0.04 ⁴⁾	0.65 ± 0.03
GC 拮抗	5 × 10 ⁻³	0.82 ± 0.05 ³⁾	0.55 ± 0.04 ⁴⁾	0.65 ± 0.04 ⁴⁾	1.13 ± 0.02

表 4 补肾益气方药对老年大鼠海马组织 HDAC2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of recipes for tonifying kidney and replenishing Qi on expression of HDAC2 mRNA in hippocampus of aging rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Hdac2
青年	-	1.00
老年	-	2.19 ± 0.33 ²⁾
左归丸	12.12	1.08 ± 0.29 ⁴⁾
益气聪明汤	10.18	1.11 ± 0.34 ⁴⁾
合剂	11.15	1.19 ± 0.21 ⁴⁾
GC 拮抗	5 × 10 ⁻³	1.39 ± 0.31 ³⁾

关基因的表达缓解学习记忆退化^[13-16]。海马是调控学习记忆的高级中枢结构,也是众多学习记忆(尤其是空间记忆)研究的主要结构区^[17]。目前认为学习记忆的神经生物学基础是神经细胞之间突触的可塑性变化,参与突触可塑性的基因表达变化可影响学习记忆能力。Morris 水迷宫是检测大鼠空间学习记忆的常用装置,可反映空间记忆水平^[18]。海马既是学习记忆发生的场所,也是 HPA 轴的高级调控中枢。有关增龄性学习记忆损伤的机制具有多种假说。其中一种认为,衰老过程中海马对 HPA 轴的抑制作用减弱导致 HPA 轴过度亢进,引起糖皮质激素水平增高,因为海马区域含有丰富的 GR,使得海马区域成为老年性高水平皮质激素毒性的靶位。长期的高浓度糖皮质激素损伤海马结构与功能,导致认知障碍^[19]。GR 被 GC 激活后,可作为特异转录因子调控 BDNF mRNA 等表达^[20]。也可间接通过学习记忆通路中重要的转录因子 CREB,介导 Syn-1, BDNF 等 mRNA 的转录^[21]。Syn-1 是一类在进化上相对保守的、神经系统特异的糖蛋白,分布在突触前轴索终末的囊泡膜上,通过控制突触小泡的存储和动员突触传递^[22]。

近年报道,衰老机体海马内参与突触可塑性的基因转录变化受表观遗传修饰酶的影响^[23-24]。HDAC2 是组蛋白去乙酰化酶,负性调控学习记忆。HDAC2 在衰老机体体内表达升高,受其调控的基因有 GR, Syn-1, 脑源性神经营养因子 (BUNF) 等^[25]。HAT1 与 HDAC2 作用相反,是组蛋白乙酰化酶,对学习记忆有促进作用^[26]。HDAC2 不能直接与甲基化 CpG 岛接触而发挥转录抑制作用,需要与 MeCP2 蛋白连接形成转录抑制物而发挥其功能^[27]。所以,依据 HDAC2 与 MeCP2 这两种蛋白的核内共定位和荧光强度变化可判断 HDAC2 的转录抑制活性。本研究采用激光用聚焦显微镜观察了 HDAC2 与 MeCP2 的共定位情况,以推测 HDAC2 的转录抑制能力。

本实验结果显示,与青年组比较,老年组学习能力降低(水迷宫潜伏期延长,穿梭平台次数减少)。老年大鼠大脑海马组织表观遗传修饰酶 HAT1 表达降低而 HDAC2 表达升高,使组蛋白去乙酰化作用增强,经过在核内 HDAC2 与 MeCP2 共定位,以增强转录抑制活性,进而降低学习记忆相关基因的表达。有文献报道,GR 和 Syn-1 都参与对学习记忆建立的调控作用。同时,本实验又观察到,与青年组比较,老年组大鼠大脑海马组织中 GR 和 Syn-1 表达显著降低,与老年组大鼠水迷宫检测到的学习记忆能力的降低结果一致。结合表观遗传修饰酶的改变,推测老年大鼠 GR 和 Syn-1 表达降低可能与表观遗传修饰酶活性降低有关。

各用药组对于老年大鼠的学习记忆能力降低有改善作用。GC 拮抗剂 RU38486 可以拮抗高浓度 GC 对海马的损伤作用,以提高老年大鼠的学习记忆能力。在本研究中,同老年组比较,GC 拮抗组学习记忆能力显著提高,与课题组前期研究结果一致^[4]。并在此次研究中发现, RU38486 在降低

HDAC2 表达的同时可显著升高 GR 与 Syn-1 的表达,但并未观察到对 HAT1 的升高作用。本实验结果还显示,左归丸组大鼠学习记忆能力显著提高,并发现左归丸对老年大鼠表观遗传修饰酶 HDAC2, HAT1 的增龄性改变均有显著的调整作用,并显著提高 2 种学习记忆相关蛋白(GR 与 Syn-1)的表达。益气聪明汤可显著降低老年大鼠 HDAC2 的表达,同时升高 Syn-1 的表达,但对 HAT1 与 GR 的增龄性改变无调整作用。两方合剂组对大鼠学习记忆能力及相关基因蛋白的表达有一定的改善作用,但未及左归丸和益气聪明汤的单独服用,分析原因可能是,实验中将两方的简单组合导致药液浓度过高,反而影响了大鼠的主动饮用量,以致未达到两方的叠加效果。这也说明,不同方药的组合可能不是简单的相加的效果,还需要合理的配伍,有待于进一步深入研究。

健忘的成因复杂,中医学认为其病位在脑,与脾、肾功能失调关系密切。肾藏精,精生髓,脑为髓之海,随增龄肾脏亏虚在老年病病理变化中起着核心作用。但老年人元气之不足,多由脾胃之气受伤而无以养,顾护脾胃也是防治老年病的关键。左归丸出自《景岳全书》,是补肾的代表方剂,被后世广泛应用于临床各科,疗效确切。方中重用熟地滋肾填精,以补养真阴,为君药。山茱萸、枸杞子养肝滋肾;山药大补脾肺肾;龟鹿二胶为血肉有情之品,峻补精髓,龟板善补阴,鹿角善于补阳,补阳药用于此体现了“阳中求阴”的用药法则,以上各药共为臣药。菟丝子平补肾之阴阳,牛膝补肝肾强筋骨同菟丝子共为佐药,以助诸药补肾填精之功。益气聪明汤源于《东垣试效方》,方中人参片、黄芪甘温以补脾胃;炙甘草甘缓以和脾胃;葛根、升麻、蔓荆轻扬升发,能入阳明,鼓舞胃气,上行头目。芍药敛阴和血,黄柏补肾生水。该方补中气,升清阳,可使九窍通利,耳聪而目明矣。古人评论有“久服无内外障、耳鸣耳聋之患,又令精神过倍,元气自益,身轻体健,耳目聪明”之述,即有抗衰老作用,故对增龄性退化脑部疾病亦有预防和治疗的效果,临床可用于治疗 AD 和多发性硬化等神经内科疾病。

本实验研究还观察到两方皆有改善老年性学习记忆减退的作用,推测其作用机制,可能与拮抗高浓度皮质酮对海马神经元的损伤和相关记忆蛋白(GR, Syn-1)表达下降及组蛋白乙酰化修饰有关,其详细的分子作用机制仍需进一步实验研究。

[参考文献]

- [1] Meijer O C, Topic B, Steenbergen P J, et al. Correlations between hypothalamus-pituitary-adrenal axis parameters depend on age and learning capacity [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(3): 1372-1381.
- [2] Sandi C. Glucocorticoids act on glutamatergic pathways to affect memory processes [J]. *Trends Neurosci*, 2011, 34(4): 165-176.
- [3] 金国琴, 赵伟康, 徐品初, 等. 补肾药延缓老年大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴的功能退化 [J]. *标记免疫分析与临床*, 1998, 5(1): 32-35.
- [4] 康湘萍, 金国琴. 左归丸及右归丸对老年大鼠学习记忆相关信号分子表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(8): 2056-2059.
- [5] Singh P, Srivas S, Thakur M K. Epigenetic regulation of memory-therapeutic potential for disorders [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2017, 15(8): 1208-1221.
- [6] 张子洋, 常富业. 《普济方》论治健忘方药探析 [J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(10): 2320-2322.
- [7] 孙丽娥, 金国琴. 微小 RNA 在衰老及衰老性疾病发生发展中的调控作用 [J]. *生命的化学*, 2018, 38(2): 200-206.
- [8] 叶丹, 朱建贵. 基于数据挖掘技术的朱建贵从脾肾治老年病经验研究 [J]. *中国医药导刊*, 2009, 11(1): 1-3.
- [9] 康湘萍, 金国琴, 梁超, 等. 补肾方药对老年大鼠 BDNF 介导的信号通路关键分子表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(5): 1309-1312.
- [10] 尹芳, 郑静, 康湘萍, 等. 老年大鼠学习记忆相关基因 *egr1* 表达变化的机制及补肾益气方药的调整作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(19): 4689-4691.
- [11] 邱宏, 金国琴, 金如锋, 等. 水迷宫重复测量数据的方差分析及其在 SPSS 中的实现 [J]. *中西医结合学报*, 2007, 5(1): 101-105.
- [12] Janoutová J, Šerý O, Hosák L, et al. Is mild cognitive impairment a precursor of Alzheimer's disease? [J]. *Cent Eur J Publ Heal*, 2015, 23(4): 365-367.
- [13] 刘聪, 李宁, 敬舒, 等. 五味子-淫羊藿混合提取物对 D-半乳糖致脑衰老小鼠学习记忆能力的改善作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(21): 147-152.
- [14] 朱金华, 徐义勇, 万红娇, 等. 温胆汤对精神分裂症模型鼠海马组织 PI3K, Akt 和 GSK3 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(1): 101-106.
- [15] 黄倩倩, 赵永烈, 高俊峰, 等. 地黄饮子对 AD 大鼠中枢神经线粒体结构及功能的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(21): 99-104.
- [16] 尹超, 游秋云, 张美娅, 等. 生慧汤对慢性睡眠剥夺小鼠学习记忆及海马 IL-6, TNF- α , COX-2 基因表达的

- 影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (1): 96-100.
- [17] Kutlu M G, Gould T J. Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory; contributions to development and maintenance of addiction [J]. *Learn Memory*, 2016, 23 (10): 515-533.
- [18] Tabrizian K, Hashemzaei M, Nasiri A A, et al. Interactive involvement of hippocampal cAMP/PKA and cyclooxygenase-2 signaling pathways in spatial learning in the Morris water maze [J]. *Folia Neuropathol*, 2018, 56(1): 58-66.
- [19] Madalena K M, Lerch J K. The effect of glucocorticoid and glucocorticoid receptor interactions on brain, spinal cord, and glial cell plasticity [J]. *Neural Plast*, 2017, doi:10.1155/2017/8640970.
- [20] Tesic V, Perovic M, Lazić D, et al. Long-term intermittent feeding restores impaired GR signaling in the hippocampus of aged rat [J]. *J Steroid Biochem*, 2015, 149:43-52.
- [21] Daskalakis N P, De Kloet E R, Yehuda R, et al. Early life stress effects on glucocorticoid—BDNF interplay in the hippocampus [J]. *Front Mol Neurosci*, 2015, doi: 10.3389/fnmol.2015.00068.
- [22] Marte A, Messa M, Benfenati F, et al. Synapsins are downstream players of the BDNF-mediated axonal growth [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(1): 484-494.
- [23] Kim S, Kaang B K. Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory [J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(1): e281.
- [24] Duke C G, Kennedy A J, Gavin C F, et al. Experience-dependent epigenomic reorganization in the hippocampus [J]. *Learn Memory*, 2017, 24(7): 278-288.
- [25] Schmauss C. The roles of class I histone deacetylases (HDACs) in memory, learning, and executive cognitive functions: a review [J]. *Neurosci Biobehav R*, 2017, 83: 63-71.
- [26] Singh P, Srivas S, Thakur M K. Epigenetic regulation of memory-therapeutic potential for disorders [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2017, 15(999): 1208-1221.
- [27] Uchida S, Shumyatsky G P. Epigenetic regulation of Fgf1 transcription by CRTCL1 and memory enhancement [J]. *Brain Res Bull*, 2018, 141: 3-12.

[责任编辑 周冰冰]