

调心方对快速老化模型小鼠海马学习记忆有关基因表达的影响^{*}

周文霞 张永祥

内容提要 目的:研究调心方对快速老化模型小鼠(senescence accelerated mouse, SAM)海马学习记忆有关基因表达的影响。方法:应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)的方法,以 β -actin为内参照,检测SAM海马盐皮质激素受体(MR)、早老蛋白1(PS-1)、早老蛋白2(PS-2)、tau、APP、apoE及bcl-2等学习记忆有关基因表达水平的变化及调心方对其影响。实验中选用E2020为对照药物。结果:与同龄抗快速老化的R系(SAMR1)比较,5月龄快速老化亚系(SAMP8)海马MR、tau、PS-2、APP基因表达水平显著升高,apoE基因表达水平降低,而PS-1和bcl-2基因表达水平无明显变化;12月龄SAMP8海马MR、tau基因表达水平升高,bcl-2基因表达水平降低,而PS-1、PS-2、apoE、APP基因表达水平无明显变化。连续口服给予调心方对5月龄SAMP8海马MR、tau、apoE基因的异常表达具有纠正作用,对12月龄SAMP8海马MR、bcl-2基因的表达异常亦具有纠正作用。结论:连续口服给予调心方对5月龄及12月龄SAMP8海马学习记忆有关基因的异常表达有纠正或调节作用。

关键词 调心方 快速老化模型小鼠 海马 基因表达

Effect of Tiaoxin Recipe on Learning and Memory Related Gene Expression in Hippocampus of Senescence Accelerated Mice ZHOU Wen-xia, ZHANG Yong-xiang *Institute of Pharmacology and Toxicology, Military Medical Academy of PLA, Beijing (100850)*

Objective: To study the effect of Tiaoxin Recipe (TXR) on learning and memory related gene expression in hippocampus of senescence accelerated mice (SAM). **Methods:** Changes of learning and memory related gene expression, including mineralocorticoid receptor (MR), presenile protein 1 and 2 (PS-1, PS-2), tau, APP, apoE and bcl-2 in hippocampus of SAM were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The effect of TXR were tested. E2020 was used as the drug for control. **Results:** Compared with those in the same aged mice, in the 5-month old SAM, levels of gene expression of MR, tau, PS-2 and APP were significantly higher, that of apo-E lower, levels of gene expression PS-1 and bcl-2 were unobviously changed; while in the 12-month old SAM, gene expression of MR and tau were higher, bcl-2 was lower and PS-1, PS-2, apoE and APP were also unobviously changed. Continuously orally taken TXR could correct the abnormality of MR, tau and apoE gene expression in hippocampus of 5-month SAM and that of MR and bcl-2 in 12-month SAM. **Conclusion:** Continuously orally taken of TXR has the effect of regulating and correcting learning and memory related gene expression in hippocampus of 5-month and 12-month SAM.

Key words Tiaoxin Recipe, senescence accelerated mice, hippocampus, gene expression

调心方由党参、远志、石菖蒲、茯苓等中药组成,具有益心气、振心阳、化痰湿、通心窍等作用。临床研究表明,调心方治疗老年性痴呆(alzheimer's disease, AD)具有明显疗效^[1]。实验药理学研究发现,该方对电解损毁、化学损毁及 β -淀粉样蛋白沉积所致大鼠学习记忆功能障碍具有明显的改善作用,对自然衰老小

鼠学习记忆能力减退亦具有明显改善作用^[2,3]。最近我们应用快速老化模型小鼠(senescence accelerated mouse, SAM)研究了调心方对其学习记忆行为的影响,发现调心方对快速老化亚系(SAMP8)所表现的被动性回避反应能力低下具有明显改善作用,表明调心方对衰老相关的神经退行性病变所导致的学习记忆功能衰退具有改善作用。本研究应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法研究了调心方(TXF)对SAM海马学习记忆有关基因表达的影响,旨在从基因水平探

^{*} 本课题为国家自然科学基金重点资助项目(No. 39830450)

军事医学科学院毒物药物研究所(北京 100850)

讨论调心方发挥益智作用的机理。

材料和方法

1 动物及分组 快速老化亚系(SAMP8)及抗快速老化 R 系(SAMR1)模型小鼠,由日本京都大学引进,在本院动物中心普通清洁环境下饲养繁殖。选择 5 月龄及 12 月龄小鼠分别分为 5 组,即 SAMR1、SAMP8、SAMP8 加 E2020 1mg/kg、SAMP8 加 TXF34.7g/kg 组、SAMP8 加 TXF69.4g/kg 组,每组 10~12 只,分别灌服等体积生理盐水(SAMR1 组和 SAMP8 组)或相应药物,每日 1 次,连续 8 周。

2 药品与试剂 TXF 由党参、远志、石菖蒲、茯苓、桂枝、炙甘草等组成,为水提浓缩制剂,含生药量为 7.45g/ml,由上海中医药大学老年医学研究所提供;E2020 为 Eisai 公司产品(批号 86HO1R);总 RNA 提取试剂盒购自 Gibco 公司;RT-PCR 反应试剂盒购自 Promega 公司。

3 仪器 Cintra20 型紫外可见分光光度计为澳大利亚 GBC 公司产品;HV3000 多用电泳仪为北京东方仪器厂产品;9600 型 PCR 仪为美国 Perkin Elmer 产品;图像分析仪及分析软件为美国 Kodak 公司产品。

4 方法

4.1 引物设计 根据 Genbank 的序列,用 Gold-key 软件分别设计中枢学习记忆有关基因 MR、APP、PS-1、PS-2、bcl-2、apoE 和 tau 的引物。经检验引物内部无发夹结构,引物之间无二聚体形成,引物与基因库之间无非特异性同源区域。

4.2 总 RNA 提取 小鼠断头处死,迅速分离海马,每组取海马组织约 100mg,加入 1ml Trizol 试剂研磨后,收集于 1.5ml 的 eppendorf 管中,室温放置 15min 充分裂解,加入 0.2ml 氯仿,剧烈震荡 20s,室温放置 5min,4℃,12000×g 离心 15min。吸取上清,加入 0.5ml 异丙醇,-20℃放置 2h 以上,4℃,12000×g 离心 10min。弃上清,以 75%乙醇洗涤沉淀 1 次,吸去乙醇,沉淀干燥后用 0.04ml 无 RNA 酶的水溶解。用紫外分光光度计鉴定所提取的总 RNA 纯度并进行定量,用甲醛变性凝胶电泳鉴定其质量。提取的总 RNA 于 -70℃保存备用。

4.3 RT-PCR 反应 在 0.2ml PCR 专用管中依次加入灭菌水 30μl,5×AMV/Tfl 缓冲液 10μl,dNTP (10mmol/L)1μl,3' 和 5' 端引物(2.5μmol/L)各 2μl,MgCl₂(25mmol/L)2μl,AMV 逆转录酶(5u/μl)和 Tfl DNA 聚合酶(5u/μl)各 1μl,总 RNA 1μl,混匀后稍加

离心,在 9600 型 PCR 仪(Perkin Elmer 公司)上进行扩增。逆转录反应参数设置:48℃ 反应 45min,94℃ 2min 终止反应;PCR 扩增参数设置:94℃ 变性 30s,60℃ 退火 1min,68℃ 延伸 2min,扩增 34~40 个循环,最后 68℃ 终延伸 7min。

4.4 PCR 产物定量 10μl PCR 产物加 2μl 载样缓冲液,以 1×TBE 为电泳缓冲液,在 1.5% 的琼脂糖凝胶上以 50V 电压电泳约 1h。电泳结束后,用 EDAS-120 数码凝胶成像分析系统(Kodak 公司)对凝胶进行分析,计算待测基因和 β-actin 光密度的比值,比较各组间 gene/β-actin 比值的大小。

5 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 *t* 检验。

结 果

1 总 RNA 的鉴定及 PCR 产物电泳图谱 见图 1。样本 RNA 经紫外分光光度计测得 A260nm/A280nm 比值为 1.8~2.0,表明所提取的 RNA 纯度高。经甲醛凝胶电泳发现 28s 和 18s 两条带十分清晰,亮度比为 2:1,表明 RNA 结构完整,无降解,可作为逆转录反应的模板。应用引物扩增得到相应长度的扩增片段,以琼脂糖凝胶电泳对其进行鉴定,结果表明各引物扩增出的片段与设计扩增片段长度基本一致。

2 调心方对 SAM 海马学习记忆有关基因表达的影响 见图 2 和图 3。调心方对扫描琼脂糖凝胶电泳图谱上的扩增产物条带并对其进行图像分析,计算基因与 β-actin 的积分面积之比,得到各基因的相对表达量。结果显示,与同龄 SAMR1 比较,5 月龄 SAMP8 海马 MR、tau、PS-2 和 APP 基因表达量明显升高($P < 0.05$),apoE 表达量明显降低($P < 0.05$),PS-1 和 bcl-2 的表达量无明显变化。12 月龄 SAMP8 海马 MR 和 tau 的表达量仍明显高于同龄 SAMR1($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),apoE 表达水平有降低趋势(与同龄 SAMR1 比较, $P > 0.05$);PS-1 的表达量无明显变化。同时,与同龄 SAMR1 比较,12 月龄 SAMP8 海马 APP 由 5 月龄时的高表达转为正常表达;PS-2 由高表达转为低表达;bcl-2 则由正常表达转为低表达。口服给予调心方可明显纠正 5 月龄 SAMP8 海马 MR、tau 和 apoE 的异常表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),对 12 月龄 SAMP8 海马 MR 和 bcl-2 的表达异常亦具有明显纠正作用($P < 0.05$)。口服给予 E2020 对 5 月龄 SAMP8 海马 MR、tau 和 APP 的异常表达具有纠正作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但对 12 月龄 SAMP8 则只能纠正 MR 的异常表达($P < 0.05$),对 bcl-2 的表达异常则无纠正作

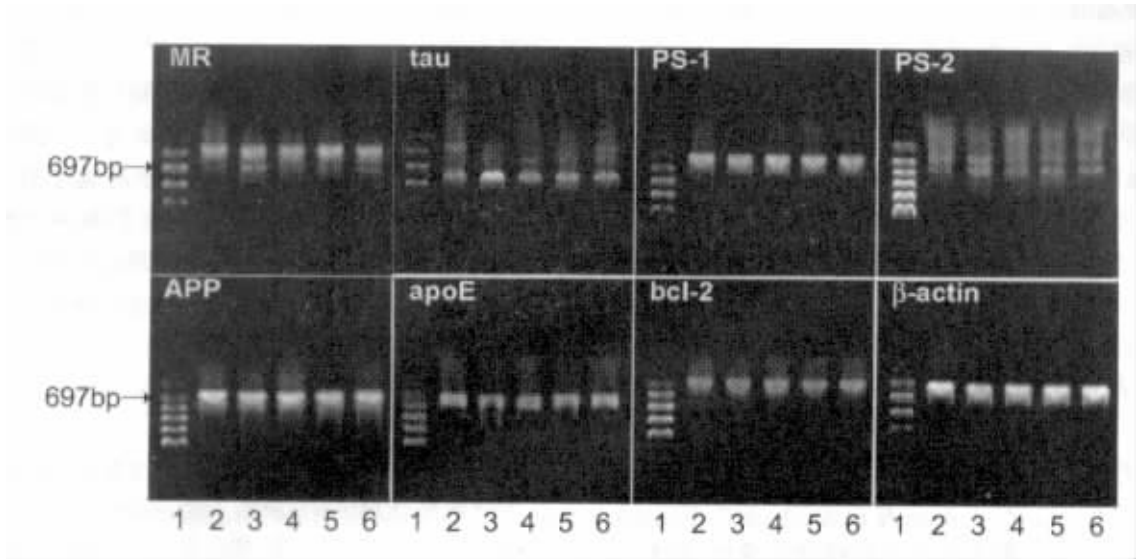


图 1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

注 :1 为 PCR marker 2 为 SAMR1 3 为 SAMP8-CON 4 为 SAMP8-E2020 1mg/kg 5 为 SAMP8-TXF 34.7g/kg 6 为 SAMP8-TXF69.4g/kg

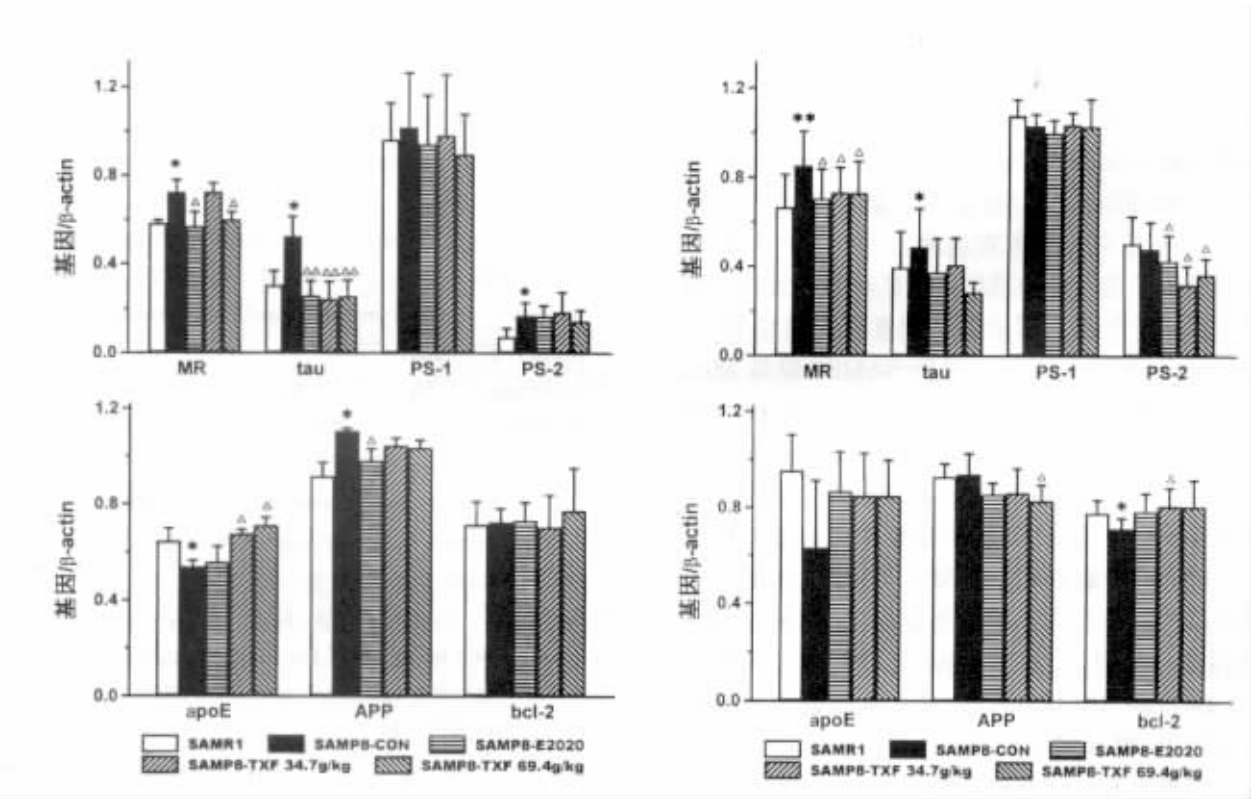


图 2 长期给予调心方对 5 月龄 SAM 海马学习记忆有关基因表达的影响

注 :与 SAMR1 比较 , $* P < 0.05$;与 SAMP8-CON 比较 , $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$, $\triangle\triangle\triangle P < 0.001$

图 3 长期给予调心方对 12 月龄 SAM 海马学习记忆有关基因表达的影响

注 :与 SAMR1 比较 , $* P < 0.05$, $** P < 0.01$;与 SAMP8-CON 比较 , $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$, $\triangle\triangle\triangle P < 0.001$

用。

讨 论

近年来大量研究表明,中枢学习记忆功能受基因调控,多种基因及其产物参与或介导了中枢学习记忆的生理过程^[4]。有研究发现,在学习记忆行为实验过程中,动物学习记忆功能状态的变化与中枢尤其是海马多种基因的表达变化密切相关。Mileusnic 等研究发现,小鼠被动及主动性回避反应以及长时程增强效应的诱发均可导致海马 c-fos 表达明显增加^[5,6];神经粘附分子(NCAM)基因与神经突触可塑性的形成具有密切关系,并影响神经细胞间的粘附连接^[7]。此外,大量研究表明,认知功能障碍性疾病的发生涉及多种基因的异常表达,如已知 AD 的发生与 APP、presenilin (PS)、apoE、tau 等基因的异常表达或突变具有密切关系,因此,调控上述基因的表达可能有助于改善中枢认知功能。

SAM 由日本京都大学竹田教授培育成功,包括快速老化的 P 系(SAMP)和抗快速老化的 R 系(SAMR)两大系,其中 SAMP8 亚系的特征是中枢学习记忆功能随增龄进行性快速衰退^[8],此外,SAMP8 脑内具有多种与 AD 类似的病理变化如 APP 及 β -淀粉样蛋白含量的升高^[9],因此,目前 SAM 被普遍应用于神经退行性疾病发生机理及促智药物药效和作用机理的研究。我室以往研究表明,SAMP8 在增龄过程中,海马 GR、MR、apoE、PS-2、tau、bcl-2、NCAM 等多种与中枢学习记忆功能有关的基因表达异常^[10],提示 SAMP8 随增龄而发生的进行性中枢学习记忆功能的衰退与海马学习记忆功能有关基因的表达异常具有密切关系。本研究发现,口服调心方对 5 月龄 SAMP8 海马 MR、tau 和 apoE 的异常表达具有明显纠正作用,对 12 月龄 SAMP8 海马 MR 和 bcl-2 的异常表达具有明显纠正作用,提示调节海马 MR、tau 和 apoE 基因的表达可能是调心方改善学习记忆功能、发挥益智作用的重要机制之一。胆碱酯酶抑制剂 E2020 对 5 月龄 SAMP8 海马某些基因表达的异常也具有纠正作用,如能明显纠正 APP 基因的异常表达,但对 apoE 的异常表达无明显作用,对 12 月龄 SAMP8 海马 bcl-2 基因表达的异常也无纠正作用,提示调心方改善 SAMP8 学习记忆功能的作用机理与 E2020 有所不同。

我室以往研究发现,连续给予小鼠氢化可的松(HC)3 周,其学习记忆行为无明显变化,但海马 GR、MR、PS2、apoE、tau 及 APP 等基因表达已发生明显变

化,继续给予 HC 至 8 周时,小鼠学习记忆行为明显损害,其海马上述基因的表达仍处于明显改变状态,说明 HC 引起小鼠海马学习记忆有关基因表达的变化早于学习记忆功能障碍的发生。此外,我们还发现,体外应用皮质酮处理原代培养胚胎大鼠海马神经细胞时,上述基因表达的变化也早于神经元损伤的出现。以上结果提示,海马学习记忆功能有关基因是介导中枢学习记忆功能的重要始动和调控因素之一;调心方改善 SAMP8 学习记忆功能的作用可能是通过影响海马学习记忆功能有关基因的表达,进而影响中枢学习记忆功能的有关环节而发挥的。有关调心方影响海马学习记忆有关基因表达的途径及作用方式等更为深入的作用机理研究目前正在进行中。

参 考 文 献

1. 林长兴,杨柏灿,林水森. 调心补肾改善老年性痴呆智力的临床研究. 上海中医药杂志 1995;29(9):8—9.
2. 戴向东,赵伟康,陈长勋. 调心方对化学损毁及自然衰老小鼠记忆功能的影响. 中成药 1994;16(12):27—29.
3. 周 晖,赵伟康. 调心方对 β A 大鼠痴呆模型空间学习记忆障碍和胆碱能系统的影响. 中药药理与临床 1998;14(3):29—31.
4. 魏小龙,张永祥. 中枢认知功能有关的基因. 中国药理学通报 1999;19(3):193—197.
5. Mileusnic R, Anokin K, Rose SP. Antisense oligonucleotides to c-fos are amnesic for passive avoidance in the chick. Neuroreport 1996;7(7):1269—1272.
6. Dragunow M, Abraham WC, Goulding M, et al. Long-time potentiation and the induction of c-fos mRNA and protein in the dentate gyrus of unanesthetized rats. Neurosci Lett 1989;101(3):274—280.
7. Linnemann D, Skarsfelt T. Regional changes in expression of NCAM, GFAP, and S100 in aging rat brain. Neurobiol Aging 1994;15(5):651—655.
8. Takeda T. Senescence accelerated mouse(SAM): a biogerontological resource in aging research. Neurobiol Aging 1999;20(2):105—110.
9. Kumar VB, Vyas K, Franko M, et al. Molecular cloning, expression, and regulation of hippocampal amyloid precursor protein of senescence accelerated mouse(SAMP8). Biochem Cell Biol 2001;79(1):57—67.
10. Wei X, Zhang Y, Zhou J. Alzheimer's disease-related gene expression in the brain of senescence-accelerated mouse. Neurosci Lett 1999;268(3):139—142.