

· 实验研究 ·

补肾益智方对 Alzheimer 病模型大鼠脑内 β -淀粉样前体蛋白的影响*

高 洁¹ 赖世隆² 饶 燕²

内容提要 目的:观察补肾益智方对 Alzheimer 病(AD)模型大鼠脑内 β -淀粉样前体蛋白(β -APP)的影响。方法:以 D-半乳糖致亚急性衰老合并 Meynert 核损毁作为 AD 大鼠模型,用免疫组织化学检测及体视学分析方法观察大鼠脑内 β -APP 的变化。结果:补肾益智方能显著降低 AD 模型大鼠脑内顶叶皮质、海马 CA1 区、齿状回 β -APP 免疫阳性神经元的细胞数、积分光密度值($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:补肾益智方能减少或抑制 β -APP 的过度产生,这可能是其减少 β -淀粉样蛋白(β -AP)沉积,改善 AD 模型大鼠学习记忆的作用机制之一。

关键词 Alzheimer 病 补肾益智方 β -淀粉样前体蛋白

Effect of Bushen Yizhi Recipe on Brain β -Amyloid Precursor Protein in Rat Model of Alzheimer Disease GAO Jie, LAI Shi-long, RAO Yan College of Life Science, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou (510275)

Objective: To observe the effect of Bushen Yizhi Recipe (BYR) on brain β -amyloid precursor protein (β -APP) in rat model of Alzheimer disease (AD). **Methods:** AD model was established with D-galactose, which caused subacute aging combined with Meynert nucleus damage. The change of brain β -APP in the model rats were observed by immuno-histochemical examination and stereologic method. **Results:** BYR could lower significantly the β -APP immunoreactive neurons and its integrated optic density in parietal cortex, CA1 region of hippocampus and dentate gyrus in model rat ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion:** BYR could reduce or inhibit the over-production of β -APP in brain, which may be one of the mechanisms of BYR in reducing β -amyloid precursor protein deposition, improving the learning and memory capacity of AD model rats.

Key words Alzheimer disease, Bushen Yizhi Recipe, β -amyloid precursor protein

Alzheimer 病(Alzheimer's disease, AD)是人类老年期一种神经系统退行性疾病,其神经病理学的重要特征之一就是脑组织中出现大量老年斑(SP), β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, β -AP)是老年斑的主要成分。 β -AP 来自一个跨膜糖前体蛋白—— β -淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor β -APP)。研究发现, β -APP 的过度产生、积聚可能是 β -AP 沉积形成及 AD 发病的主要致病机理之一⁽¹⁾,因此抑制和减少 β -APP 的过度产生是治疗 AD 的重要环节。为此,我们观察了补肾益智方对 AD 模型大鼠脑内 β -APP 的影响,旨在探讨中医药防治 AD 的途径和措施。

材料和方法

1 主要试剂、药物和仪器 D-半乳糖(上海试剂二厂生产),鹅膏蕈氨酸(ibotenic acid, IBO, 购自 Sigma 公司),补肾益智方浓缩液(由蛇床子 20g 枸杞子 10g 人参 10g 何首乌 10g 丹皮 10g 等组成,广东省中医院制剂科配制,每克成药含生药量 6.44g),石杉碱甲(上海红旗制药厂生产的双益平片,批号:970101,每片 0.05mg),脑立体定位仪(日本精工生产),单克隆小鼠抗大鼠 β -APP 抗体、LSAB 试剂盒、DAK(DAKO 公司产品)。

2 实验动物及分组 Wistar 大鼠,3 月龄,体重 200~250g,为青年对照组(简称青年组);20 月龄,体重 450~550g,随机分为老年对照组(简称老年组)和造模组,造模结束后将存活的大鼠再随机分为模型对照组(简称模型组)、补肾益智方高剂量组(简称高剂量

* 国家“九五”重点攻关项目(No. 96-906-09-02)

1. 中山大学生命科学学院(广州 510275) 2. 广州中医药大学老年脑病研究所
万方数据

组) 补肾益智方低剂量组(简称低剂量组) 石杉碱甲对照组(简称石杉碱甲组)。所有实验动物均由广州中医药大学实验动物中心提供。

3 造模及给药 进行造模的大鼠腹腔注射 D-半乳糖 $48\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,连续 6 周,第 7 周开始以 IBO 损毁双侧 Meynert 基底核,方法见有关文献⁽²⁾。青年组和老年组在腹腔和相同脑区注射等体积生理盐水。造模结束后,补肾益智方高、低剂量组分别以补肾益智方浓缩液按 $0.87\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $0.435\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (相当于成药 $5.6\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $2.8\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃,石杉碱甲组以双益平 $0.3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃,模型组、青年组及老年组以等体积生理盐水灌胃,连续 4 周。

4 β -APP 免疫组织化学反应 灌胃结束后,以戊巴比妥钠($35\text{mg}/\text{kg}$ 体重)腹腔麻醉大鼠,经左心室主动脉插管灌流固定,开颅取脑作冠状切片,片厚 $40\mu\text{m}$,采用常规免疫组织化学染色法进行 β -APP 免疫组织化学反应:切片先入 10% 羊血清、0.3% TritonX-100,30min;然后入小鼠抗大鼠 β -APP 抗体(1:10),4℃ 48h;再入 Link reagent(1:400),1h;最后 DAB 显色,常规脱水,透明,封片。阴性对照切片入不含第一抗体的抗体稀释液。

5 形态计量学分析 采用 metaMorph 3.6 图像处理系统分析 β -APP 免疫阳性神经元的数目、细胞平均截面积和积分光密度。每只大鼠均选取相同部位的结构,每个区域测 3 个不同视野,取其均值。

6 统计学方法 用 SAS 6.12 统计软件进行单因素方差分析、 q 检验。

结 果

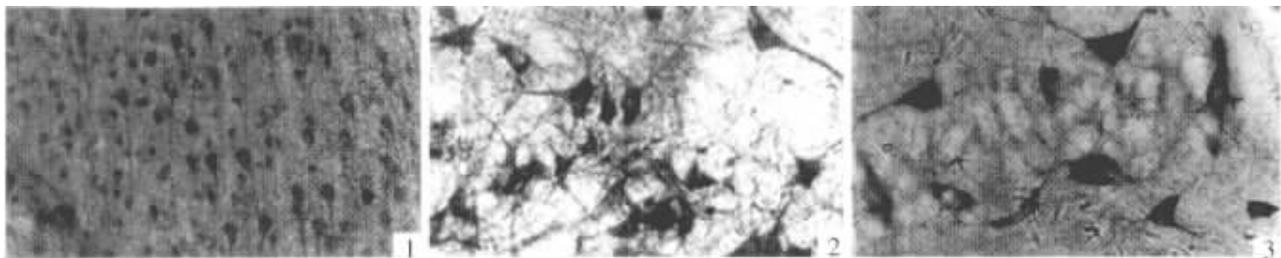
1 β -APP 免疫阳性神经元主要分布于大脑皮层、海马、基底前脑等部位,神经元呈梭形、椭圆形、锥形或多边形,细胞大小不一,可见较长神经突起。阳性反应

产物主要位于神经元核周质、突起及其分支上,细胞核为阴性。大脑新皮质区 β -APP 阳性神经元主要分布于 II、IV、V 层,以梭形细胞为主,突起长,多垂直于大脑表面(见图 1)。齿状回 β -APP 阳性神经元主要分布于多形细胞层,突起较多,多为横行走向(见图 2)。海马 CA1 区 β -APP 阳性神经元主要分布于锥体细胞层,突起长,伸向放射层、腔隙层或分子层,多垂直走行(见图 3)。

2 各组大鼠新皮质区、海马 CA1 区和齿状回 β -APP 免疫阳性神经元定量分析 见表 1。大脑新皮质区,顶叶的阳性神经元数量最多,故以此部位做图像分析。顶叶皮质、海马 CA1 区,模型组 β -APP 阳性神经元的细胞数、积分光密度值均较青年组和老年组显著升高($P<0.01$),齿状回细胞数、平均截面积、积分光密度值较青年组显著增加($P<0.05$, $P<0.01$)。石杉碱甲组与模型组比较,仅在顶叶皮质 β -APP 阳性神经元的细胞数显著减少($P<0.05$),而补肾益智方低剂量组在海马 CA1 区、齿状回 β -APP 阳性神经元的积分光密度值均显著减少($P<0.05$),顶叶皮质的细胞数、积分光密度值也显著降低($P<0.05$);高剂量组在 3 个脑区 β -APP 阳性神经元的细胞数、积分光密度值均较模型组显著减少($P<0.05$, $P<0.01$)。

讨 论

近年研究认为 β -AP 在脑组织中沉积造成神经元的退变是 AD 发病机制中重要的环节之一,而 β -AP 在 AD 中的致病作用很大程度上与其前体 β -APP 的异常加工处理过程有关。目前认为 β -APP 通过两种代谢方式产生 β -AP,一种称为“分泌酶途径”,即分泌酶 α 、 β 、 γ 分别作用于 β -APP 的不同位点,其中分泌酶 β 、 γ 是形成 β -AP 的主要方式。另一种称为“溶酶体途径”,细胞膜上成熟 β -APP 内聚到溶酶体中,在特异蛋白酶



β -APP 免疫阳性神经元

图 1 为顶叶皮质($\times 100$);

图 2 为齿状回($\times 200$);

图 3 为海马 CA1 区($\times 200$)

表 1 各组大鼠顶叶皮质、海马 CA1 区和齿状回 β -APP 阳性神经元形态学参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	顶叶皮质			海马 CA1 区			齿状回		
		细胞数 (个/标准视野)	平均截面积 (μm^2)	积分光 密度值	细胞数 (个/标准视野)	平均截面积 (μm^2)	积分光 密度值	细胞数 (个/标准视野)	平均截面积 (μm^2)	积分光 密度值
青年	11	82.9±15.4	57.6±7.9	11.0±1.8	16.4±4.9	69.1±10.5	2.8±1.0	57.9±9.8	70.2±15.5	11.7±2.5
老年	10	97.0±14.7	61.2±11.6	14.7±1.6 [△]	21.8±3.6	69.1±10.4	3.2±1.1	88.1±11.3 ^{△△}	78.4±13.5	18.9±2.5 [△]
模型	10	132.4±20.2 ^{**△△}	74.5±10.8 [△]	20.9±2.7 ^{**△△}	41.0±5.0 ^{**△△}	73.0±9.5	7.6±1.4 ^{**△△}	99.3±12.1 ^{△△}	92.3±14.4 [△]	21.6±2.4 ^{△△}
石杉碱甲	10	105.3±16.9 ^{△▲}	72.4±11.2 [△]	17.3±2.2 ^{*△△}	33.9±4.3 ^{*△△}	71.3±9.1	6.7±0.9 ^{**△△}	81.9±14.2 [△]	85.4±16.7	17.2±1.8 [△]
低剂量	9	99.1±18.9 [▲]	69.0±12.9	16.6±1.8 ^{△△▲}	32.4±4.2 ^{*△}	71.9±10.4	5.8±0.7 ^{△▲}	80.1±13.5 [△]	84.8±12.8	16.6±2.0 ^{△▲}
高剂量	9	93.9±14.6 ^{▲▲}	67.1±11.6	15.6±1.4 ^{△▲▲}	29.8±3.8 ^{△▲}	70.7±9.9	5.3±0.9 ^{△▲}	71.7±12.2 [▲]	84.2±18.4	16.6±2.3 ^{△▲}

注:与老年组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与青年组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$

作用下形成 β -AP⁽³⁾。有研究发现在 AD 患者大脑新皮质区、海马结构及其他相关脑区内有大量淀粉样蛋白沉积,同时出现 β -APP 免疫阳性神经元数量的增加⁽⁴⁾。实验研究表明 β -APP 的过度表达能引起神经元病变,如能致离体实验中神经元样细胞死亡及在体研究中实验动物脑内出现淀粉样物质沉积和认知损害⁽⁵⁾。钱亦华等⁽⁶⁾用过量铝诱导建立 AD 大鼠模型,表现为学习记忆减退 β -APP 表达增多。治疗后随着 β -APP 表达的降低,学习记忆能力亦得到改善(受电击次数减少,潜伏期延长)。有研究已表明,D-半乳糖致亚急性衰老合并 IBO 损毁 Meynert 核的 AD 模型大鼠有明显的学习记忆障碍⁽²⁾。补肾益智方主要由蛇床子、人参、何首乌、丹皮等组成,具有补肾填精、益气补血、活血化瘀、开窍醒神之功效。相关研究已表明该方能明显改善 AD 模型大鼠的学习记忆障碍⁽⁷⁾。根据本实验结果,其作用的生物学基础可能是通过抑制 β -APP 的产生,减少 β -AP 在脑内的沉积,从而改善 AD 模型大鼠学习记忆能力。至于补肾益智方减少 β -APP 产生的机制,我们推测可能与以下两个方面有关(1)方中主药之一蛇床子的主要成分蛇床子素具有雌激素样作用⁽⁸⁾,而近年研究揭示雌激素疗法可降低女性患 AD 的危险⁽⁹⁾,蛇床子的雌激素样生物活性可能参与 β -APP 合成、代谢的调节,对 AD 模型大鼠学习记忆障碍有改善作用。(2)有研究表明 β -APP 对神经系统损伤有高度敏感性,神经元的损伤会导致 β -APP 免疫反应活性的增加⁽¹⁰⁾,补肾益智方可能有保护部分神经元免于 IBO 的损伤或降低 IBO 对神经元毒性的作用,从而在一定程度上降低 β -APP 的免疫反应活性。

从实验结果看,高、低剂量组之间差异无显著性,不过可以看出高剂量组在降低模型大鼠脑内 β -APP 作用方面有优于低剂量组的趋势,这可能与中药复方药味多,成分复杂,难以得到准确的量效关系有关。对于其确切的量效关系,我们将增加补肾益智方的剂量

分组以做进一步的研究。

参 考 文 献

- Gentleman SM, Nash MJ, Sweeting CJ, et al. β /A4 amyloid precursor protein (β -APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett* 1993 ;160:139—143.
- 胡镜清 赖世隆,王 奇,等. D-半乳糖加速衰老合并 Meynert 核损毁大鼠学习记忆能力变化的初步观察. *中华老年医学杂志* 2000 ;19(2):5—6.
- Busciglio J, Gabuzda DH, Matsudaira P, et al. Generation of β -amyloid in the neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ;90(5):2092—2096.
- Yamaguchi H, Nakazato Y, Hirai P, et al. Immunoelectron microscopic location of amyloid β protein in the diffuse plaque of Alzheimer-type dementia. *Brain Res* 1990 ;508(2):320—324.
- Moran PM, Higgins LS, Cordell B, et al. Aged-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human β -amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ;92:5341—5345.
- 钱亦华 胡海涛,杨 杰,等. 川续断对 Alzheimer 病模型大鼠海马内淀粉样前体蛋白表达的影响. *中华神经科杂志* 1999 ;15(2):134—138.
- 胡镜清 赖世隆,王 奇,等. 补肾益智方对阿尔茨海默病大鼠模型脑内胆碱能神经系统的保护作用. *广州中医药大学学报* 1999 ;16(3):201—204.
- 李朝阳. 蛇床子素对去卵巢大鼠近侧胫骨代谢的影响. *药理学学报* 1996 ;31(5):327—332.
- Paganini HA, Henderson VW. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer disease in women. *Am J Epidemiol* 1994 ;140(3):256—261.
- Siman R, Card JP, Nelson RB, et al. Expression of β -amyloid precursor protein in reactive astrocytes following neuronal damage. *Neuron* 1989 ;3:275—285.

(收稿 2001-09-25 修回 2002-04-25)