

调心方活性部位对 β 淀粉样蛋白抑制大鼠海马脑片 CA1 区诱发长时程增强的作用研究

乔海法 杨 胜 周文霞 张永祥

摘要 目的 研究调心方活性部位 A(active fraction of Tiaoxin recipe, TXR-A)对 β -淀粉样蛋白(beta amyloid protein β -AP)抑制大鼠海马脑片长时程增强(long-term potentiation, LTP)效应的影响。方法 采用细胞外微电极记录技术,记录大鼠海马脑片 CA1 区诱发群峰电位(population spike, PS),然后施以 100Hz,100 串的强直刺激诱发 LTP。结果 与正常脑脊液组比较, β -AP(0.2 μ mol/L)孵育海马脑片 >1.5 h,强直刺激后 PS 增幅程度显著降低,提示 β -AP 对海马 LTP 具有抑制作用;如用 β -AP 加 TXR-A 孵育脑片 >1.5 h,则强直刺激后高浓度 TXR-A 组的 PS 平均幅度显著提高,且作用优于调心方,提示 TXR-A 可以增强 LTP 幅度。结论 TXR-A 可能是发挥调心方改善 β -AP 抑制大鼠海马 CA1 区诱发 LTP 作用的主要成分之一,拮抗 β -AP 对 LTP 的抑制可能是其益智机制之一。

关键词 调心方;长时程增强; β -淀粉样蛋白;海马脑片

Inhibitory Effect of Active Fraction of Tiaoxin Recipe on β -Amyloid Protein Induced Long-term Potentiation in CA1 Area of Rats' Hippocampal Slices QIAO Hai-fa, YANG Sheng, ZHOU Wen-xia, et al *Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing (100850)*

Abstract Objective To study the effect of the active fraction of Tiaoxin recipe (TXR-A), in inhibiting long-term potentiation (LTP) induced by beta amyloid protein (β -AP) in CA1 area of rats' hippocampal slices. **Methods** The population spike (PS) in CA1 area of hippocampal slices incubated in different medium was recorded before and after LTP was evoked by a 100Hz, 100 trains high frequency stimulation (HFS), using extracellular microelectrode recording techniques. **Results** The amplitude of PS significantly decreased after HFS in hippocampal slices incubated in medium containing 0.2 μ mol/L β -AP for more than 1.5 hour, as compared with that incubated in normal cerebrospinal fluid, the difference was significant, suggesting that β -AP could inhibit LTP in hippocampal slices. The average amplitude of PS in slices incubated in β -AP containing medium could be significantly enhanced by adding high-concentration TXR-A or TXR into the medium, and TXR-A showed a better effect of enhancing than that of TXR, indicating that TXR-A could increase the amplitude of LTP. **Conclusion** TXR-A may be the chief ingredient extracted from TXR for improving β -AP induced LTP in CA1 area of rats' hippocampus, to antagonise the inhibition of β -AP on LTP is possibly one of the mechanisms for its intelligence benefiting action.

Key words Tiaoxin recipe; long-term potentiation; β -amyloid protein; brain hippocampal slices

调心方(TXR)具有改善阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)认知功能障碍的作用。 β -淀粉样蛋白(beta amyloid protein, β -AP)斑块的出现和沉积被认为是 AD 病理改变较为初始的原因。动物实验表明, β -AP(25-35)杏仁核注射后可导致大鼠空间学习记忆能力障碍, TXR 对 β -AP 诱导的痴呆模型

大鼠的空间学习记忆障碍具有明显的改善作用^[1-3]。我室以往的研究工作提示,调心方对抗 β -AP 抑制海马脑片长时程增强(LTP)的作用是其改善 AD 认知功能障碍的机制之一^[4]。在此基础上,我们通过药理和化学研究的密切配合,获得了几个部位,其中,部位 A(TXR-A)中总皂甙含量占 70% 以上。初步动物实验结果表明,该部位对 β -AP 诱导的痴呆模型大鼠的空间学习记忆障碍具有明显改善作用。为进一步探讨其发挥益智作用的机理及是否是调心方改善 LTP 的物质基础,本研究采用细胞外微电极记录技术,观察了 TXR-A 对 β -AP 抑制大鼠海马脑片 CA1 区诱发 LTP

基金项目 国家自然科学基金重点项目(No. 39830450)

作者单位 军事医学科学院毒物药物研究所(北京 100850)

通讯作者 周文霞, Tel 010-66931625, Fax 010-68211656,

E-mail zhouwx@nic.bmi.ac.cn

的影响。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 二级 Wistar 大鼠,雌性,体重 160~200 g,由军事医学科学院动物中心提供。

1.2 药品与试剂 TXR 为水提浓缩制剂,是由党参、桂枝、茯苓、菖蒲、远志和炙甘草等组成的中药复方,含生药 7.45 g/ml,活性部位则采用水煎、醇沉,进而以乙醚、正丁醇提取的工艺进行提取。TXR-A 配成含生药 7.45 g/ml 的溶液。上述溶液均由上海中医药大学老年医学研究所提供。 β -AP(25-35)购自美国 Sigma 公司。试验中所使用的无机盐购自国内,均为分析纯。

2 方法

2.1 海马脑片制备 具体制备方法见参考文献^[4]。

2.2 群峰电位记录 具体记录方法见参考文献^[4]。

2.3 LTP 诱发 实验开始时,先用中等强度的单刺激(60s interval,200 μ S duration)诱发出特征性的基础群峰电位(population spike, PS),稳定记录 10 min 使 PS 达到稳定,调节 PS 幅度至最大幅度的 50%~60%,再稳定记录 15 min,然后给予 Schaffer 侧支纤维 100Hz、100 串的高频刺激(high frequency stimulation, HFS),此时可以记录到增大的 PS, HFS 后连续记录 1 h。

2.4 给药方法 将 TXR 及 TXR-A 溶液离心,并用人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)稀释为所需浓度,其中, TXR 稀释 1 000 倍,终浓度为 1‰(含生药 7.45 mg/ml); TXR-A 则分别稀释 2 000、1 000、500 倍,终浓度为 0.5‰(含生药约 3.75 mg/ml)、1‰(含生药 7.45 mg/ml)、2‰(含生药 14.9 mg/ml)。当观察 β -AP 对海马脑片基础突触传递的影响

时,先用通常的 ACSF 灌流并记录正常的 PS,然后采用含 0.2 μ mol/L β -AP 的 ACSF 灌流,观察其是否发生变化;当观察 β -AP 对海马脑片 LTP 的抑制作用及 TXR 或 TXR-A 对抗 β -AP 的这种作用时,则分别在实验前用含 β -AP 及 β -AP + TXR 或 β -AP + 不同浓度 TXR-A 的 ACSF 孵育脑片 >1.5 h,并在整个实验记录过程中均用此含药 ACSF 灌流脑片。

2.5 PS 幅度测量方法 实验中以 PS 幅度相对值(%)为观测指标,并观察其平均增幅情况。具体测量方法是:每隔 1 min 记录得到 1 个 PS 值,以 HFS 之前 15 min 内的 PS 均值为 100%, HFS 后每 5 个时间点的 PS 平均得 1 个值,得到的各平均值分别除以 HFS 之前的 PS 均值即 100%,得各时间点(记录 1 h 共 12 个平均值)的 PS 幅度相对值,以百分数(%)表示。整体的平均幅度相对值则是将 HFS 后的 60 min PS 幅度均值除以 HFS 前 15 min 的 PS 均值。

2.6 统计学方法 采用 Origin 6.0 软件(Origin-lab Co. Northampton, USA)及 SAS 软件包(Release 6.12, Sas institute Inc, USA)对所获数据进行作图和统计学处理。两组数据比较采用配对 Student's *t* 检验, LTP 的动态变化采用具有一个重复测量的两因素方差分析(two-way ANOVA);而 1 h 时平均 PS 幅度相对值则采用单因素方差分析(one-way ANOVA);多组比较用 SNK 检验。

结 果

1 β -AP 对大鼠海马脑片诱发 LTP 的抑制作用 所记录的 6 只大鼠脑片在灌流后的 30 min 内 PS 的形状、幅度没有发生明显变化,提示 β -AP 并不影响大鼠海马脑片的基础突触传递。与对照组即正常脑片组比较, HFS 后 PS 增幅及 60 min 内的平均 PS 幅度明显降低($P<0.01$),提示 β -AP 可以明显抑制大鼠海马脑片 LTP(见表 1、图 1)。

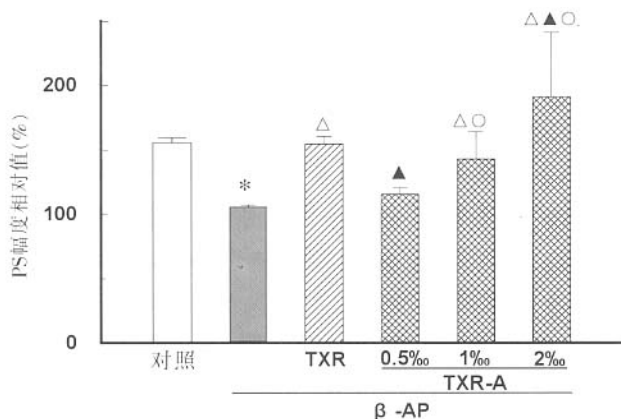
2 TXR-A 对 β -AP 抑制大鼠海马脑片诱发 PS 幅

表 1 TXR-A 对 β -AP 处理大鼠海马脑片 CA1 区不同时间点相对 PS 幅度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PS 相对幅度(%)											
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60(min)
对照	150.8 $\pm$ 5.6	152.2 $\pm$ 3.3	152.4 $\pm$ 3.9	155.0 $\pm$ 8.1	156.9 $\pm$ 7.9	156.6 $\pm$ 9.4	153.0 $\pm$ 3.3	154.7 $\pm$ 7.7	156.8 $\pm$ 9.5	157.9 $\pm$ 4.8	159.5 $\pm$ 12.6	159.3 $\pm$ 17.3
β -AP	109.2 $\pm$ 3.3*	110.3 $\pm$ 1.0*	109.0 $\pm$ 3.2*	107.7 $\pm$ 1.2*	106.7 $\pm$ 1.5*	105.3 $\pm$ 1.6*	104.4 $\pm$ 2.4*	103.7 $\pm$ 2.8*	103.8 $\pm$ 2.5*	102.4 $\pm$ 2.4*	102.7 $\pm$ 2.1*	101.0 $\pm$ 2.1*
β -AP + TXR	139.6 $\pm$ 30.0 $\triangle\triangle$	150.6 $\pm$ 14.0 $\triangle\triangle$	156.4 $\pm$ 5.2 $\triangle\triangle$	153.2 $\pm$ 8.9 $\triangle\triangle$	154.0 $\pm$ 5.6 $\triangle\triangle$	151.9 $\pm$ 7.9 $\triangle\triangle$	157.9 $\pm$ 2.9 $\triangle\triangle$	158.4 $\pm$ 3.1 $\triangle\triangle$	158.9 $\pm$ 3.2 $\triangle\triangle$	157.8 $\pm$ 3.1 $\triangle\triangle$	158.6 $\pm$ 4.2 $\triangle\triangle$	158.6 $\pm$ 4.1 $\triangle\triangle$
β -AP + 0.5‰ TXR-A	117.1 $\pm$ 8.0	115.6 $\pm$ 10.1	115.9 $\pm$ 6.3 $\blacktriangle$	114.9 $\pm$ 6.3 $\blacktriangle$	108.1 $\pm$ 6.6 $\blacktriangle$	108.4 $\pm$ 6.9 $\blacktriangle$	111.3 $\pm$ 5.2 $\blacktriangle$	109.0 $\pm$ 6.0 $\blacktriangle$	118.7 $\pm$ 9.5 $\blacktriangle$	119.3 $\pm$ 10.9 $\blacktriangle$	121.7 $\pm$ 12.9 $\blacktriangle$	123.5 $\pm$ 14.9 $\blacktriangle$
β -AP + 1‰ TXR-A	143.2 $\pm$ 9.1 $\triangle$	141.4 $\pm$ 15.6 $\triangle$	141.3 $\pm$ 7.3 $\triangle$	134.2 $\pm$ 10.7 $\triangle$	125.2 $\pm$ 8.2 $\triangle$	128.6 $\pm$ 12.1 $\triangle$	128.1 $\pm$ 17.8	147.8 $\pm$ 29.1 $\triangle$	132.4 $\pm$ 18.3	149.8 $\pm$ 33.3 $\triangle$	150.4 $\pm$ 38.1	150.3 $\pm$ 39.3
β -AP + 2‰ TXR-A	153.9 $\pm$ 18.0 $\triangle\triangle$	165.4 $\pm$ 15.3 $\triangle\triangle$	165.9 $\pm$ 15.2 $\triangle\triangle$	162.7 $\pm$ 18.1 $\triangle\triangle$	167.8 $\pm$ 26.2 $\triangle\triangle$	175.4 $\pm$ 35.9 $\triangle\triangle$	190.1 $\pm$ 40.8 $\triangle\triangle$	203.2 $\pm$ 45.5 $\triangle\triangle$	215.4 $\pm$ 46.1 $\triangle\triangle$	215.6 $\pm$ 45.1 $\triangle\triangle$	214.9 $\pm$ 45.8 $\triangle\triangle$	215.5 $\pm$ 56.2 $\triangle\triangle$

注:与对照组比较,* $P<0.01$;与 β -AP 组比较, $\triangle$ $P<0.05$, $\triangle\triangle$ $P<0.01$;与 β -AP + TXR 组比较, $\blacktriangle$ $P<0.05$;与 β -AP + 0.5‰ TXR-A 组比较, $\circ$ $P<0.05$, $\circ\circ$ $P<0.01$ 。

度的影响 HSF 后,与 β -AP 组比较,2‰ TXR-A 处理后不同时间点的 PS 幅度明显增高($P < 0.01$);1‰、2‰ TXR-A 处理脑片 HFS 后 60 min 内的平均 PS 幅度均明显增高($P < 0.05$),并表现出一定的量效关系,且 2‰ 浓度 TXR-A 的作用优于 TXR($P < 0.05$,见表 1、图 1)。



注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与 β -AP 组比较,△ $P < 0.05$;与 β -AP+TXR 组比较,▲ $P < 0.05$;与 β -AP+0.5‰ TXR-A 组比较,○ $P < 0.01$

图 1 TXR-A 对 β -淀粉样蛋白抑制大鼠海马脑片 CA1 区诱发 LTP 平均 PS 幅度的影响

讨 论

β -AP 的沉积在 AD 发病过程中发挥着关键作用,被认为是 AD 发病的初始原因。神经病理学研究发现 β -AP 诱导的 AD 大鼠模型的海马有锥体细胞脱落、并部分出现颗粒空泡变性的病理性改变。 β -AP 在神经细胞外及脑血管壁大量沉积从而形成老年斑是 AD 最为重要的病理特征之一。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^[5,6]。近年来研究还发现, β -AP 的沉积可通过多种途径引发细胞凋亡,及诱发 tau 蛋白的过度磷酸化,在与 AD 关系密切的 PHF 形成中可能发挥十分重要的作用^[7]。文献报道及我们以前的研究工作表明, β -AP 可以明显抑制海马 LTP 的诱发^[4,8],调心方可对抗 β -AP 对海马 LTP 诱发的抑制作用。

本实验以 LTP 为观测指标,首先观察了 β -AP 对大鼠海马脑片 LTP 的抑制作用,并在此基础上研究了调心方活性部位 A 对 β -AP 抑制大鼠海马脑片诱发 LTP 的影响。结果表明 β -AP 并不影响大鼠海马脑片的基础突触传递。相同于或 2 倍于调心方浓度的活性部位 A 可以增强被 β -AP 抑制的 LTP 幅度,且 2 倍浓度的作用明显优于调心方。因此,调心方的该活性部位可能是发挥原方对抗 β -AP 抑制大鼠海马脑片诱发

LTP 的主要成分之一;它对被 β -AP 抑制的 LTP 的改善可能是其益智作用的机制之一。

参 考 文 献

- 1 周如倩,林水森,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.现代康复 2001;2(6):46—47.
Zhou RQ, Lin SM, Wang J, et al. Clinical study on Chinese herbal, heart-regulating formula and Kidney tonifying in improving cognitive ability in Alzheimer's disease. Modern Rehabil 2001;2(6):46—47.
- 2 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.中药药理与临床 1998;14(3):29—31.
Zhou H, Zhao WK. Effect of Heart Benefiting Recipe on the spatial learning and memory impairment and cholinergic system in β -amyloid protein treated rats. Pharmacol Clin Chin Materia Med 1998;14(3):29—31.
- 3 刘学源,赵伟康,徐品初,等.调心方对杏仁核注射 $A\beta_{25-35}$ 诱导的阿尔茨海默病模型大鼠的影响.中草药 2004;36(1):50—53.
Liu XY, Zhao WK, Xu PC, et al. Effect of Heart-benefiting Recipe on Alzheimer's disease rats after unilateral $A\beta_{25-35}$ injection into amygdala. Chin Tradit Herbal Drugs 2004;36(1):50—53.
- 4 万勤,张永祥.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.中国实验方剂学杂志 2002;28(6):22—25.
Wan Q, Zhang YX. Effect of Tiaoxinfang on long-term potentiation inhibited by β -amyloid and corticosterone in rat hippocampal slices. Chin J Exp Tradit Chin Formulae 2002;28(6):22—25.
- 5 Tomita T, Maruyama K, Saido TC, et al. The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer's disease (Völgga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at 42nd (or 43rd) residue. Proc Natl Acad Sci USA 1997;94(5):2025—2030.
- 6 Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes and treatments. Science 1997;275(5300):630—631.
- 7 Ye L, Qiao JT. Suppressive action produced by β -amyloid peptide fragment 31—35 on long-term potentiation in rat hippocampus vs N-methyl-D-aspartate receptor independent: it's offset by (—) hyperzine A. Neurosci Lett 1999;275(3):187—190.
- 8 Chen QS, Kagan BL, Hirakura Y, et al. Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides. Neurosci Res 2000;36(1):65—72.

(收稿 2004-03-22 修回 2005-02-12)