

黑逍遥散对阿尔茨海默病大鼠海马基因表达谱的影响

吴红彦^{1,2} 李海龙^{1,2} 顾 静^{1,2} 杨植媛¹ 王虎平^{1,2} 车 敏¹ 兰美华³

摘要 目的 观察黑逍遥散对 $A\beta_{25-35}$ 诱导阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 大鼠模型海马基因表达谱的影响。**方法** 选择雌性 SD 大鼠, 以海马注射 $A\beta_{25-35}$ 淀粉样蛋白建立 AD 模型, 并设立假手术组、模型组、西药组及中药高、中、低剂量组, 每组 14 只。大鼠造模 7 天后连续灌胃 [3 mL/(kg·d)] 28 天, 假手术组与模型组给予生理盐水, 西药组给予石杉碱甲片水溶液 [0.02 mg/(kg·d)], 中药高、中、低剂量组分别给予黑逍遥散水煎液 [17.00、8.50、4.25 g/(kg·d)]。灌胃结束后处死大鼠解剖取得大鼠海马组织, 并提取组织 RNA, 利用大鼠基因表达谱芯片筛选差异表达的基因, 而后对获得的部分剂量依赖性变化的差异表达基因进行 qRT-PCR 验证。**结果** 与假手术组比较, 模型组 583 个基因表达上调, 579 个下调, *wisp1*、*crebbp*、*igfbp-1*、*znf483*、*zfp37* 及 *zic4* mRNA 表达升高, *casq2*、*bcl-2* mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 中药高、中、低剂量组 276 个基因表达上调, 170 个下调, 其中 71 个基因剂量依赖性上调表达, 70 个基因剂量依赖性下调表达, 西药组 *igfbp-1*、*znf483*、*zfp37* 及 *zic4* mRNA 降低, *casq2*、*bcl-2* mRNA 升高 ($P < 0.01$); 中药高剂量组 *wisp1*、*crebbp*、*igfbp-1*、*znf483*、*zfp37* 及 *zic4* 降低 ($P < 0.01$), *casq2*、*bcl-2* mRNA 升高 ($P < 0.01$); 中药中剂量组 *crebbp*、*igfbp-1*、*znf483*、*zfp37* 及 *zic4* 降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), *casq2*、*bcl-2* mRNA 升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 中药低剂量组 *igfbp-1*、*znf483*、*zfp37* 及 *zic4* mRNA 降低 ($P < 0.01$)。与中药高剂量组比较, 中药中剂量组 *crebbp*、*zfp37*、*zic4* mRNA 升高 ($P < 0.01$), *igfbp-1*、*bcl-2* mRNA 降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 中药低剂量组 *crebbp*、*znf483*、*zfp37* mRNA 升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), *igfbp-1*、*bcl-2*、*zic4* mRNA 降低 ($P < 0.01$)。与中药中剂量组比较, 中药低剂量组 *casq2*、*bcl-2*、*zic4* mRNA 降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** 黑逍遥散可通过调控 *zfp37*、*znf483*、*zic4* 表达影响 AD 发生; 通过抑制 wnt 信号通路相关基因 *wisp-1*、*crebbp*、*igfbp-1*、*casq2* 的表达而影响 $A\beta$ 代谢和 Tau 蛋白异常磷酸化。

关键词 黑逍遥散; 阿尔茨海默病; 基因表达谱; 锌指蛋白; wnt 信号通路

Effect of Heixiaoyao Powder on Hippocampal Gene Expression Profile of Alzheimer's Disease Rats WU Hong-yan^{1,2}, LI Hai-long^{1,2}, GU Jing^{1,2}, YANG Zhi-yuan¹, WANG Hu-ping^{1,2}, CHE Min¹, and LAN Mei-hua³ 1 Faculty of Formula, College of Basic Medical Sciences, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou (730000); 2 Key Laboratory of Traditional Chinese Herbs and Prescription Innovation and Transformation in Gansu Province, New Products of Chinese Medicine Engineering Laboratory of Gansu Province, Lanzhou (730000); 3 No. 3 Department of Internal Medicine, Yangjiang Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangdong (529500)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Heixiaoyao Powder (HP) on gene microarray profile of hippocampus in $A\beta_{25-35}$ fragments induced Alzheimer's disease rat model. **Methods** Female SD rats were chosen to establish AD model by injecting $A\beta_{25-35}$ amyloid into hippocampus, and then they were divided into 6 groups, i.e., the sham-operation group, the model group, the Western medicine (WM) group, high, middle, and low dose HP groups, 14 in each group. After 7 days of modeling, all rats were administered with respective solution at the daily dose of 3 mL/kg by gastrogavage for 28 successive days. Normal

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81060284)

作者单位: 1. 甘肃中医药大学基础医学院方剂学教研室 (兰州 730000); 2. 甘肃省中医方药与创新转化实验室, 甘肃省中药新产品创制工程实验室 (兰州 730000); 3. 广东省阳江市中医院内三科 (广东 529500)

通讯作者: 吴红彦, Tel: 0931-8765367, E-mail: wu.hy@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.11.1345

saline was administered to rats in the sham-operation group and the model group. Huperzine A Tablets water solution was administered to rats in the WM group at the daily dose of 0.02 mL/kg. HP at the daily dose of 4.25, 8.50, 17.00 g/kg was administered to rats in the low, middle, high HP groups. All rats were sacrificed after ending gastrogavage, and their hippocampal tissues were collected to extract tissue RNA. Rat gene microarray was used to screen differentially expressed genes, and then differentially expressed genes with partial dose-dependently changing obtained by microarray were verified by qRT-PCR. Results Compared with the sham-operation group, 538 genes were up-regulated, and 579 genes were down-regulated in the model group. mRNA expressions of wisp1, crebbp, igfbp-1, znf483, zfp37, and zic4 increased, while mRNA expressions of casq2 and bcl-2 decreased in the model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, 276 genes were up-regulated, and 170 genes were down-regulated in the 3 HP groups. Of them, 71 up-regulated genes dose-dependently and 70 down-regulated genes dose-dependently. mRNA expressions of igfbp-1, znf483, zfp37, and zic4 decreased, while mRNA expressions of casq2 and bcl-2 increased in the WM group ($P < 0.01$). mRNA expressions of wisp1, crebbp, igfbp-1, znf483, zfp37, and zic4 decreased, while mRNA expressions of casq2 and bcl-2 increased in the high dose HP group ($P < 0.01$). mRNA expressions of crebbp, igfbp-1, znf483, zfp37, and zic4 decreased ($P < 0.01, P < 0.05$), while mRNA expressions of casq2 and bcl-2 increased in the middle dose HP group ($P < 0.01, P < 0.05$). mRNA expressions of igfbp-1, znf483, zfp37, and zic4 decreased in the low dose HP group ($P < 0.01$). Compared with the middle dose HP group, mRNA expressions of crebbp, zfp37, and zic4 increased ($P < 0.01$), mRNA expressions of igfbp-1 and bcl-2 decreased in the middle dose HP group ($P < 0.01, P < 0.05$); mRNA expressions of crebbp, znf483, and zfp37 increased ($P < 0.01, P < 0.05$), mRNA expressions of igfbp-1, zic4, and bcl-2 decreased in the low dose HP group ($P < 0.01$). Compared with the middle HP group, mRNA expressions of casq2, zic4, and bcl-2 decreased in the low dose HP group ($P < 0.01, P < 0.05$). Conclusion HP could affect the occurrence of AD by regulating mRNA expressions of zfp37, znf483, and zic4, and affect the metabolism of A β and abnormal phosphorylation of Tau protein by inhibiting wnt signal pathway related genes such as wisp-1, crebbp, igfbp-1, and casq2.

KEYWORDS Heixiaoyao Powder; Alzheimer's disease; gene expression profile; zinc finger protein; wnt signal pathway

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的以进行性认知功能障碍和行为损害为特征的神经系统退行性病变。目前治疗主要根据其不同病理生理学说给予对应性干预,迄今现代医学尚无防治 AD 的特异方法和药物。本研究前期表明逍遥散具有显著改善 AD 模型小鼠学习记忆能力,增强小鼠认知、判断能力,以及调节脑内相关神经递质的作用^[1-3],近年来,基因芯片和蛋白芯片中医药基因组学和蛋白组学技术逐渐应用于中药靶点筛选和药理机制探讨。本实验以黑逍遥散干预 A β_{25-35} 诱导的 AD 大鼠模型,采用基因表达谱芯片筛选差异表达基因,探讨黑逍遥散防治 AD 的作用靶点。

材料与方法

1 实验动物 SPF 级 SD 雌性大鼠 110 只,体重(200 \pm 20)g,鼠龄 4~5 月,由甘肃中医药大学科研实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(甘)2011-0001-0001058。

2 药物 黑逍遥散组成:熟地:柴胡:当归:白芍:茯苓:白术:生姜:甘草:薄荷=7.5:5:5:5:5:5:5:4:1(按《方剂学》^[4]比例),饮片由甘肃中医学院附属医院提供。采用传统水煎法,加中药 10 倍量冷水浸泡 3 h,加热煮沸 1 h,加入薄荷再煎 5 min,滤出煎液,药渣中再加 6 倍量水煮沸 1 h,滤出煎液,合并两次煎液,过 80 目筛滤过,滤液水浴蒸发浓缩,分别制成浓度为 2.0、1.0 及 0.5 g 生药/mL 黑逍遥散水煎液。石杉碱甲片(哈伯因),0.05 mg/片,河南太龙药业股份有限公司生产,批号:110402,用双蒸水配制成 0.002 mg/mL 水溶液,4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。A β_{25-35} 10 μ g 溶于无菌生理盐水 1 μ L,使用前 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 周,使其呈凝聚态备用。

3 试剂及仪器 A β_{25-35} ,上海强耀生物科技有限公司,批号:20110609;RT2 First Strand 试剂盒,大连宝生物工程有限公司;SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒,大连宝生物工程有限公司;WT-200 型大鼠脑立体定位仪,成都泰盟科技有限公司;Axon Gene-

Pix4000B 扫描仪 ;CFX96 荧光定量 PCR 仪,美国 Bio-Rad;S1000PCR 仪,美国 Bio-Rad;AR224CN 电子天平: OHAUS 公司。

4 动物分组及模型制备 各模型大鼠经腹腔注射 3%戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉,参考《大鼠脑立体定向图谱》^[5]定位方法,大鼠固定于立体定位仪上,确定海马区注射点:前囟后 3 mm,中线向左右各旁开 2.2 mm,硬脑膜下 2.8 mm,用牙科钻在颅骨上钻孔(直径约 1 mm),用微量进样器在两侧各缓慢注射 Aβ₂₅₋₃₅溶液 1 μL,5 min 内注射完,留针 5 min,牙科泥封住颅骨孔,术区滴庆大霉素,缝合皮肤并消毒,假手术组注入等量生理盐水,其余同模型组。单笼饲养至大鼠完全清醒。

大鼠称重,先按随机数字表挑选 16 只大鼠作为假手术组,其余大鼠手术 7 天后进行水迷宫测试,根据测试结果,以假手术组平均逃避潜伏期为标准,从手术造模大鼠中筛选出大于此值的学习记忆障碍大鼠,剔除造模失败大鼠 17 只。大鼠称重,再按照随机数字表法将大鼠分为 5 组:模型组、阳性对照(西药)组、黑逍遥散(中药)高、中、低剂量组,每组 14 只。假手术组保留 14 只。因麻醉、手术操作不当等原因死亡及假手术组剔除共计 9 只大鼠。

5 干预方法 中药高、中、低剂量组分别灌胃 [17.00、8.50、4.25 g/(kg·d)],分别相当于临床人用药剂量 2、1、0.5 倍,西药组灌胃石杉碱甲溶液 [0.02 mg/(kg·d)],模型组、假手术组灌胃等容量生理盐水,每日上午 1 次,连续干预 28 天。

6 检测指标及方法 干预结束后断头处死大鼠,

低温条件快速剖取脑组织,除去脑干和小脑,定位并快速取出海马组织,立即保存于无菌细胞冻存管,置 -80 ℃冰箱保存。RNA 完整性应用变性琼脂糖凝胶电泳进行评估。

6.1 芯片杂交 采用 NimbleGen12x135K 芯片微阵列基因表达分析,芯片探针来自 Ensembl 权威数据源,包括约 26 419 个基因。双链 cDNA 5 μg 总 RNA,使用 Invitrogen 公司寡聚 dT 引物将 ds-cDNA 合成 ds-cDNA。ds-cDNA 清洗和标记根据 NimbleGen 基因表达分析方法进行。基因芯片杂交反应在 42 ℃ 16 ~20 h 完成,洗涤后,应用芯片扫描仪进行扫描。

6.2 芯片杂交数据分析 杂交芯片在扫描后,使用 PRO 6.0 软件扫描图像(TIFF 格式),然后导入 NimbleScan 2.6 进行表达数据分析。所有基因表达数据导入 GeneSpring GX11.5.1 作进一步分析^[6]。

6.3 筛选基因 PCR 扩增 采用 Trizol 试剂从细胞中提取总 RNA,检测 RNA 含量和纯度(A₂₆₀/A₂₈₀ = 1.8 -2.0),以 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性(28S 和 18S RNA 条带比值≥2.0)。提取完成后,进行逆转录反应,反应条件如下:37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s;而后进行 PCR 反应,条件:预变性 95 ℃ 10 s,变性 95 ℃ 15 s,退火 60 ℃ 20 s,40 个循环。扩增反应结束后进行溶解曲线分析,判断产物是否有非特异性扩增;分析扩增曲线,计算 Ct 值,以 β-actin 作为内参基因,qRT-PCR 实验采用相对定量法计算各基因表达量,通过 2^{-ΔΔCt}法计算各组间 mRNA 表达水平差异(模型组基因表达量设为 1)。实验重复 3 次,引物合成由大连宝生物公司合成(引物序列见表 1)。

表 1 引物序列

基因名称	英文全称	英文简称	引物序列	长度(bp)
内参基因	Beta-actin	β-actin	F:5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3' R:5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3'	150
锌指蛋白家族 4	Zic family member 4	zic4	F:5'-GATACAAGACATCCTTGGTGATGAG-3' R:5'-CCATGGTGTCCAGAGCTGCTA-3'	88
锌指蛋白 483	similar to Zinc finger protein483	zfp483	F:5'-GCTGTTTGC GGATGCTGA-3' R:5'-CAGGCACTATACACAGCCAGGA-3'	142
锌指蛋白 37	similar to Zinc finger protein37	zfp37	F:5'-ACCACTGGA GATGGCTGTGTC-3' R:5'-CATGTCTGGTTGGGAGCTTGA-3'	151
WNT1 诱导的信号通路蛋白 1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	wisp1	F:5'-GCCCCAGGTACGCAATAGGA-3' R:5'-CCCACGGTGCCATCAATACA-3'	136
Creb 结合蛋白	Creb binding protein	crebbp	F:5'-CTCCGCGAATGACAGCACA-3' R:5'-GGACGCAGCATCTGGAACAA-3'	127
胰岛素生长因子结合蛋白-1	insulin-like growth factor binding protein 1	igfbp-1	F:5'-ACCAGCCCATCCTGTGGAA-3' R:5'-CATTCTTGTTCAGATTTGGCAGATA-3'	189
SR 钙结合蛋白	SR calcium binding protein	casq2	F:5'-CTGACTTGAGCATCTTGTGGATTG-3' R:5'-GGCAGGTCGTCA TCA TCTGG-3'	163
B 淋巴细胞瘤-2 基因	B-cell lymphoma-2	bcl-2	F:5'-AGTGGGATACTGGAGATGAAGAC-3' R:5'-ACGGTAGCCAGCAGAGAAGT-3'	233

7 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠模型海马组织基因表达谱聚类分析与假手术组比较, 模型组 583 个基因表达上调, 579 个基因表达下调; 与模型组比较, 中药高、中、低剂量组 276 个基因表达上调, 170 个基因表达下调。其中, 有 71 个基因剂量依赖性上调表达, 70 个基因剂量依赖性下调表达。中药各剂量组聚类明显, 全基因表达水平介于假手术组和模型组之间。

2 差异表达基因信号通路分析(表 2、3) 与假手术组比较, 模型组上调表达基因富集分析显示相关信号通路 13 项, 模型组下调表达基因相关信号通路 13 项。与模型组比较, 中药各剂量组表达基因上调信号通路 5 项, 下调 3 项。

3 各组大鼠海马组织 *wisp1*、*crebbp*、*igfbp-1*、*casq2*、*bcl-2*、*znf483*、*zfp37* 及 *zic4* mRNA 表达比较(表 4) 选取部分差异表达的基因进行 qRT-PCR 验证。与假手术组比较, 模型组 *wisp1*、*crebbp*、*znf483*、*zfp37* 及 *zic4* mRNA 表达升高, *casq2*、*bcl-2* mRNA 表达降低($P < 0.05$)。与模型组比较, 西药组 *igfbp-1*、*znf483*、*zfp37* 及 *zic4* mRNA 降低, *casq2*、

表 2 模型组较假手术组基因表达变化信号通路变化趋势

KEGG 信号通路	Fisher-P	富集得分	趋势
扩张型心肌病	8.41E-05	4.075155	↓
肥厚型心肌病	0.000407425	3.389953	↓
青春晚期糖尿病	0.000758245	3.12019	↓
1 型糖尿病	0.00516128	2.287243	↓
天然杀伤细胞介导细胞毒性	0.00797139	2.098466	↓
花生四烯酸代谢	0.008640351	2.063469	↓
JAK-STAT 信号通路	0.009920012	2.003488	↓
视黄醇的代谢	0.02694331	1.569549	↓
自身免疫性甲状腺腺病	0.02949925	1.530189	↓
致心律失常型右心室发育不良	0.02949925	1.530189	↓
2 型糖尿病	0.04755063	1.322844	↓
糖胺聚糖合成硫酸软骨素	0.04923049	1.307766	↓
TGF-β 信号通路	0.04953904	1.305052	↓
有活性神经的配体-受体相互作用	0.000236198	3.626724	↑
哮喘	0.000533628	3.272762	↑
α-亚麻酸代谢	0.003291361	2.482624	↑
细胞黏附分子	0.003737811	2.427383	↑
脂肪消化吸收	0.005770679	2.238773	↑
花生四烯酸代谢	0.00831844	2.079958	↑
钙信号途径	0.01017001	1.992679	↑
弓形体病	0.01897862	1.721735	↑
醚脂代谢	0.01989365	1.701286	↑
亚油酸代谢	0.02139986	1.669589	↑
促性腺激素释放激素信号转导通路	0.02162478	1.665048	↑
病毒性心肌炎	0.02247879	1.648227	↑
1 型糖尿病	0.04953904	1.305052	↑

表 3 中药各剂量组较模型组基因表达信号通路变化趋势

KEGG 信号通路	Fisher-P	富集得分	趋势
糖酵解	0.000147386	3.831543	↑
阿尔茨海默氏病	0.005775086	2.238442	↑
基底转录因子	0.01053158	1.977506	↑
钙信号途径	0.01122169	1.949942	↑
1 型糖尿病	0.0327421	1.484893	↑
哮喘	0.00324904	2.488245	↓
免疫球蛋白 Fc 段受体 FcεRI 信号通路	0.02995528	1.523527	↓
促性腺激素释放激素信号转导通路	0.04851067	1.314163	↓

表 4 各组大鼠海马组织 wisp1、crebbp、igfbp-1、casq2、bcl-2、znf483、zfp37 及 zic4 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	wisp1	crebbp	igfbp-1	casq2
假手术	3	0.63 ± 0.08 **	0.232 ± 0.032 **	0.902 ± 0.010	1.33 ± 0.14 **
模型	3	1.00	1.000	1.000	1.00
西药	3	0.91 ± 0.08	0.928 ± 0.068	0.332 ± 0.020 **	1.34 ± 0.04 **
中药高剂量	3	0.73 ± 0.04 **	0.422 ± 0.052 **	0.502 ± 0.01 **	1.51 ± 0.04 **
中剂量	3	0.92 ± 0.06	0.513 ± 0.028 *△△	0.303 ± 0.010 *△	1.48 ± 0.04 *
低剂量	3	1.02 ± 0.06	0.976 ± 0.055 △△	0.268 ± 0.030 **△△	1.18 ± 0.04 △△▲

组别	n	bcl-2	znf483	zfp37	zic4
假手术	3	1.78 ± 0.04 **	0.071 ± 0.038 **	0.039 ± 0.009 **	0.800 ± 0.063 *
模型	3	1.00	1.000	1.000	1.000
西药	3	2.78 ± 0.19 **	0.030 ± 0.009 **	0.026 ± 0.039 **	0.629 ± 0.057 **
中药高剂量	3	2.49 ± 0.05 **	0.077 ± 0.017 **	0.018 ± 0.008 **	0.198 ± 0.013 **
中剂量	3	1.60 ± 0.04 **△△	0.083 ± 0.009 **	0.050 ± 0.008 **△△	0.464 ± 0.011 **△△
低剂量	3	1.05 ± 0.06 △△▲▲	0.095 ± 0.048 **△	0.063 ± 0.033 **△△	0.050 ± 0.023 **△△▲▲

注:与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01;与中药高剂量组比较,△P<0.05,△△P<0.01;与中药中剂量组比较,▲P<0.05,▲▲P<0.01

bcl-2 mRNA 升高(P<0.01);中药高剂量组 wisp1、crebbp、igfbp-1、znf483、zfp37 及 zic4 降低(P<0.01),casq2、bcl-2 mRNA 升高(P<0.01);中药中剂量组 crebbp、igfbp-1、znf483、zfp37 及 zic4 降低(P<0.01, P<0.05), casq2、bcl-2 mRNA 升高(P<0.01, P<0.05);中药低剂量组 igfbp-1、znf483、zfp37 及 zic4 mRNA 降低(P<0.01)。与中药高剂量组比较,中药中剂量组 crebbp、zfp37、zic4 mRNA 升高(P<0.01),igfbp-1、bcl-2 mRNA 降低(P<0.01, P<0.05);中药低剂量组 crebbp、znf483、zfp37 mRNA 升高(P<0.01, P<0.05), igfbp-1、bcl-2、zic4 mRNA 降低(P<0.01)。与中药中剂量组比较,中药低剂量组 casq2、bcl-2、zic4 mRNA 降低(P<0.01, P<0.05)。

讨 论

近年来,基因组学研究方法诸如基因芯片、蛋白芯片和代谢组学等手段开始应用于 AD 研究^[7-9],筛选特异性分子标记物或用于鉴别诊断、判断预后、探讨分子病理机制、研究药物作用靶点等。

现代药理学表明,黑逍遥散组方中的熟地黄、茯苓、当归等所含有效成分藁本内酯、阿魏酸、白芍总甙、茯苓多糖均具有一定的抗痴呆的作用^[10]。目前抗老年痴呆使用频率高的十四味药材就包括熟地黄、白术、茯苓、当归和甘草^[11]。提示本方中所含中药具有抗衰老的药效物质基础。

本研究通过基因表达谱发现模型组 583 个基因表达上调,579 个基因表达下调;与模型组比较,中药高、中、低剂量组均出现 276 个基因表达上调,170 个基因表达下调。其中,有 71 个基因的剂量依赖性上调表达,70 个基因的剂量依赖性下调表达。聚类分析

显示:中药各剂量组聚类明显,全基因表达水平介于假手术组和模型组之间;与模型组比较,中药各剂量组上调基因相关信号通路 5 项,下调 3 项。与假手术组比较,模型组上调基因信号通路 13 项,下调 12 项。这些通路包括糖代谢、钙信号传递、胰岛素依赖、炎症反应、雌激素及能量代谢等。

有研究认为中枢神经系统胰岛素水平下降可以导致中枢乙酰胆碱和可利用能量的缺乏^[12],进而诱发 Aβ 沉积并出现 Tau 蛋白的过度磷酸化;随着 AD 病程发展,体内雌二醇水平不断下降,下丘脑分泌促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)逐渐减少,增强 Aβ₄₀ 沉积,提高 Tau-pThr231 的表达^[13],从而促进 AD 的病情发展;而钙离子选择性扩张血管,减少因钙离子内流造成的神经细胞损伤或死亡^[14],进而改善记忆和认知功能。研究表明 Aβ 可以通过慢性免疫炎症应答对神经元细胞产生毒性作用^[15]。因 SP 内含急性期蛋白,激活的小神经胶质细胞等炎症标记物。而可溶性 Aβ 激活通过小胶质细胞和星形细胞分泌多种细胞因子,如 IL1、IL6 等,而导致神经细胞损伤。

qRT-PCR 验证表明,与模型组比较,假手术组及药物干预组 zfp37、zf483、zic4 表达均下调,这与大鼠全组基因表达谱结果一致,推测黑逍遥散干预 AD 的机制可能与调控 zfp 表达密切相关。zfp 于 1983 年在非洲爪蟾卵母细胞的转录因子 TFIIIA 中首次被发现^[16],是真核生物基因组中分布最广的一类蛋白,人类基因组中可能有近 1% 的序列编码含有锌指结构蛋白。锌可以通过锌指结构发挥关键的调控作用,使激活子蛋白与增强子序列特异性结合而调节基因的表达。已有研究表明,缺锌可使大鼠脑组织 cAMP 水平升高,并且对 Ca²⁺/CaM-CaMKII 也产生影响;缺锌促进小鼠脑神经细胞凋亡,bcl-2 mRNA 表达受抑制^[17]。许多研究提示海马是含锌

量最高的脑区,锌可以影响细胞凋亡,而且对海马神经元的生长发育起促进作用,一定浓度的锌可以抑制细胞凋亡,而锌浓度过低则促进细胞凋亡的发生^[12,13]。

qRT-PCR 验证表明,与模型组比较,假手术组及药物干预组 *wisp1*、*crebbp*、*igfbp-1* 表达下调,而 *casq2* 基因表达上调,实验结果提示与表达谱芯片检测结果一致。20 世纪 90 年代,Hashimoto Y 等^[18]首次发现 *wisp-1*,这是一种富含半胱氨酸的长度为 367 个氨基酸的分泌性蛋白多肽,其生物学功能包括促进细胞增殖、介导细胞黏附、促进细胞外基质、刺激细胞转移等。Wnt 信号通路对保护神经细胞不被 A β 毒性影响具有关键作用。而 *Wisp1* 可能通过作用 A β 神经毒性而影响 AD 的发生。

Crebbp 是一种转录因子,是组蛋白乙酰基转移酶 HAT 活动固有的转录助激活剂。有研究发现改变 *crebbp* 的结构会导致 HAT 活动以及 Wnt 信号通路基础水平组件表达的改变,这对神经细胞的增殖和分化起到关键作用,*crebbp* 结构改变引起的神经细胞分化缺陷被证明是参与该过程的基因发生了异常转录所致^[19]。因此 *crebbp* 结构的重新排列可以影响蛋白质功能和神经元分化。下调 *crebbp* 表达,可降低 A β 表达,减缓脑损伤。

igfbp-1 是胰岛素生长因子 - 1 (insulin-like growth factor, IGF-1) 的受体,决定其流动、运输、组织分布以及生理活动。IGF-1 信号的减低促使 A β 由毒性较高的寡聚体结合成密度更大,相对分子质量更高,但毒性更低的多聚纤维。此外 IGF-1 还通过抑制 PI3K/GSK-3 β 通路增加 Tau 蛋白与微管结合,减少磷酸化 Tau 蛋白^[20]。有研究表明 IGF-1 可以上调 β -catenin^[21],因此调节 *igfbp-1* 的表达可能与参与 Wnt/ β -catenin 信号转导通路相关。

casq2 在监控肌质网钙释放的过程中具有关键作用。钙调磷酸酶 (calcineurin, CN)^[17] 作为重要的 Tau 蛋白磷酸酶通过规范调控 *casq2* 的表达,而对 AD 的 Tau 蛋白异常磷酸化发挥重要的作用。Wnt/ Ca^{2+} 通路主要通过 Wnt (Wingless and Int1) 与 Fz (Frizzled) 受体介导升高细胞内的钙离子浓度,激活蛋白激酶 C 和其他钙离子依赖性蛋白激酶来发挥作用^[22]。因此,黑逍遥散防治 AD 可能与调节 *casq2* 表达,参与 Wnt/ Ca^{2+} 信号转导通路进而促使 Tau 蛋白异常磷酸化的发生相关。

综上所述,Wnt 信号通路包括 3 条细胞内信号转导通路,即 Wnt/ β -catenin 信号转导通路、Wnt/ Ca^{2+} 信号转导通路和 Wnt/平面细胞极性信号转导通路。

β 淀粉样蛋白会与 FZ 的半胱氨酸富集区域相结合,该区域与 Wnt 蛋白和 FZ 的结合区域相同或非常接近,阻止了经典 Wnt 信号通路,从而影响了 β 连环蛋白的积聚、核转移和 Wnt 靶基因的表达。此外 Wnt 信号通路的负调控因子糖原合成酶激酶 3 β 可以通过对 Tau 蛋白的过度磷酸化破坏神经元产生认知功能障碍^[23]。

因此,通过基因芯片筛选和 qRT-PCR 验证,本研究表明差异表达基因 *wisp1*、*crebbp*、*igfbp-1*、*zfp483*、*zfp37*、*zic4*、*casq2* 和 *bcl-2* 是黑逍遥散的干预靶点,黑逍遥散通过调控 *zfp37*、*zfp483*、*zic4* 表达影响 AD 发病;黑逍遥散通过调控 Wnt 信号通路相关基因 *wisp1*、*crebbp*、*igfbp-1*、*casq2* 的表达而影响 A β 代谢和 Tau 蛋白异常磷酸化,黑逍遥散干预 A β_{25-35} 诱导的 AD 大鼠模型的作用机制可能与调节 A β 淀粉肽在海马组织的沉积和清除等作用密切相关。

参 考 文 献

- [1] 王虎平,吴红彦. 逍遥散对 AD 模型小鼠行为学、形态学及神经递质活性的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(4): 471-474.
- [2] 李海龙,王虎平,刘建鸿,等. 黑逍遥散对 A β_{25-35} 诱导 AD 大鼠模型脑组织和血清 SOD, GSH-Px 及 MDA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 186-189.
- [3] 吴红彦,李海龙,张云,等. 黑逍遥散对东莨菪碱致痴呆小鼠模型的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(10): 35-37.
- [4] 李冀主编. 方剂学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012:66.
- [5] 包新民,舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991:42.
- [6] Li Z, Nie F, Wang S, et al. Histone H4 Lys 20 monomethylation by histone methylase SET8 mediates Wnt target gene activation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(8): 3116-3123.
- [7] Berchtold NC, Sabbagh MN, Beach TG, et al. Brain gene expression patterns differentiate mild cognitive impairment from normal aged and Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2014, 35(9): 1961-1972.
- [8] Wong J. Altered expression of RNA splicing proteins in Alzheimer's disease patients: evidence from two microarray studies[J]. Dement Geriatr Cogn Dis Extra, 2013, 3(1): 74-85.
- [9] Arisi I, D'Onofrio M, Brandi R, et al. Gene expression biomarkers in the brain of a mouse model for Alzheimer's disease: mining of microarray data by logic classification and feature selection[J]. J Alzheimer's Dis, 2011, 24(4): 721-738.
- [10] 韩德军,杨锡燕,时晶,等. 中药治疗痴呆随机对照文献治法及用药规律分析[J]. 中医杂志, 2014, 55(12):

- 1051 - 1054.
- [11] 胡增晓,黄晏,刘港,等. 中药复方治疗老年痴呆的用药规律分析[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 252 - 256.
- [12] 刘洛同,尹华锦,陈礼刚. 胰岛素样生长因子与中枢神经系统疾病研究进展[J]. 泸州医学院学报, 2009, 32(6): 651 - 665.
- [13] 万章. 促性腺激素释放激素与阿尔茨海默病小鼠发病机制的相关性研究[D]. 贵州:遵义医学院:2010.
- [14] 龙元先,唐雨萌,唐利军. 中国阿尔兹海默病主要影响因素的 Meta 分析[J]. 中国预防医学杂志, 2013, 14(1): 59 - 63.
- [15] 黄春霞,张志敏. β 淀粉样多肽细胞毒性作用的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(18): 2414 - 2417.
- [16] 赵楠,赵飞,李玉花. 锌指蛋白结构及功能研究进展[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(1): 131 - 134.
- [17] 庞伟. MEK/ERK 信号通路在缺锌致海马神经细胞损伤中的作用及其机制研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2012.
- [18] Hashimoto Y, Shindo-Okada N, Tani M, et al. Identification of genes differentially expressed in association with metastatic potential of K-1735 murine melanoma by messenger RNA differential display [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(22): 5266 - 5271.
- [19] Sharma N, Jadhav SP, Bapat SA. CREBBP rearrangements affect protein function and lead to aberrant neuronal differentiation [J]. *Differentiation*, 2010, 79(4 - 5): 218 - 231.
- [20] 刘琴,晏勇. 胰岛素和胰岛素样生长因子 - 1 及其受体在阿尔茨海默病发病中的作用[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(1): 275 - 277.
- [21] Wang L, Shao YY, Ballock RT. Thyroid hormone-mediated growth and differentiation of growth plate chondrocytes involves IGF-1 modulation of beta-catenin signaling [J]. *J Bone Miner Res*, 2010, 25(5): 1138 - 1146.
- [22] 于大禹,魏群. 钙调磷酸酶对阿尔茨海默病中 tau 蛋白异常磷酸化的作用[J]. 生命的化学, 2007, 27(4): 339 - 340.
- [23] 王薇,张海廷,王淑辉,等. 阿尔茨海默病与 Wnt 信号通路及神经干细胞的关系[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(19): 3566 - 3572.

(收稿:2014 - 07 - 25 修回:2016 - 07 - 20)

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2017 年 *Chinese Journal of Integrative Medicine*

Chinese Journal of Integrative Medicine (《中国结合医学杂志》)是由中国中西医结合学会、中国中医科学院主办的国际性学术期刊,旨在促进结合医学及替代医学的国际交流,及时发表结合医学或替代医学领域的最新进展、趋势以及临床实践、科学研究、教育、保健方面经验和成果的科学论文。1995 年创刊,由中国科学院院士陈可冀担任主编。设有述评、专题笔谈、论著、临床经验、病例报道、综述、药物相互作用、法规指南、学术探讨、思路与方法、跨学科知识、会议纪要、书评、读者来信等栏目。本刊被多种国际知名检索系统收录,如:Science Citation Index Expanded (SCI-E)、Index Medicus/Medline、Chemical Abstracts (CA)、Abstract Journal (AJ)、CAB Abstracts、CAB International、Excepta Media (EMBASE)、Expanded Academic、Global Health、Google Scholar、Index Copernicus (IC)、Online Computer Library Center (OCLC)、SCOPUS 等。本刊于 2007 年被 SCI-E 收录。根据 2014 年 7 月底汤姆森公司公布的 2013 年期刊引证报告,本刊 SCI 影响因子为 1.401。2010 年 10 月 1 日与汤森路透集团签约,正式采用 ScholarOne Manuscripts 在线投审稿系统。

Chinese Journal of Integrative Medicine 为大 16 开本,铜版纸印刷,彩色插图,2011 年改为月刊,80 页,国内定价为 40.00 元/期,全年定价:480.00 元。国际标准刊号:ISSN 1672 - 0415,国内统一刊号:CN 11 - 4928/R,国内邮发代号:82 - 825,海外发行由 Springer 公司代理。国内订户在各地邮局均可订阅,也可直接汇款至本社邮购。

地址:北京海淀区西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社,邮政编码:100091;电话:010 - 62886827,62876547,62876548;传真:010 - 62874291;E-mail:cjim_en@cjim.cn;网址: <http://www.cjim.cn>。