

· 基础研究 ·

清心开窍方有效成分对 AD 大鼠学习记忆能力及其海马区 Bax、Bcl-2、Caspase-3 和 β APP 表达的影响王逸如¹ 张益慧¹ 陈志裕¹ 徐冬梅¹ 陈翔³ 张晓艳¹ 胡海燕^{1,2}

摘要 目的 探讨清心开窍方中皂苷、挥发油及多糖有效成分对淀粉样蛋白($A\beta$)₁₋₄₀ 海马注射诱导痴呆(Alzheimer's disease, AD)大鼠海马区 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 β APP 表达的影响。方法 选取 112 只雄性 SD 大鼠,随机分为 7 组,每组 16 只,分别为正常组、假手术组、模型组、安理申组、皂苷组、挥发油组、多糖组。采用海马注射 $A\beta$ ₁₋₄₀ 诱导 AD 大鼠模型。造模后第 2 天开始灌胃,正常组、假手术组、模型组给予等量双蒸水灌胃,安理申组[盐酸多奈哌齐片,1.67 mg/(kg·d)]、皂苷组[9 mL/(kg·d)]、挥发油组[3.33 mL/(kg·d)]、多糖组[8.33 mL/(kg·d)]灌胃,每天 1 次,连续 2 周(上午 10:00)。灌胃结束后,采用 Morris 水迷宫测试大鼠的空间学习记忆能力;采用 TUNEL 染色检测海马 CA1 区细胞凋亡;采用免疫组化、实时定量荧光 PCR 及 WB 法检测 AD 大鼠海马区 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 β APP 表达。结果 造模前各组大鼠同一时间点的逃避潜伏期、穿台次数比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),且逃避潜伏期随时间推移逐渐缩短。造模后,与模型组比较,除挥发油组、多糖组外,安理申组、皂苷组逃避潜伏期均缩短,穿台次数显著增多($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,皂苷组、挥发油组、多糖组大鼠海马 CA1 区凋亡细胞数量明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$);Bcl-2 表达上调,Bax、Caspase-3、 β APP 表达下调,Bcl-2/Bax 比值明显提高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 清心开窍方 3 种有效成分能不同程度地改善 AD 大鼠的学习记忆能力,其机制可能与降低海马区 Bax、Caspase-3 及 β APP 表达,提高 Bcl-2 表达,抑制 AD 大鼠海马区内细胞凋亡有关。

关键词 阿尔茨海默病;清心开窍方;Bcl-2 相关 X 蛋白;B 淋巴细胞瘤-2;半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶-3;淀粉样前体蛋白

Effect of Active Ingredients of Qingxin Kaiqiao Recipe on Spatial Learning and Memory Capacities, and Expressions of Bax, Bcl-2, Caspase-3, and β APP in Hippocampus of AD Model Rats
WANG Yi-ru¹, ZHANG Yi-hui¹, CHEN Zhi-yu¹, XU Dong-mei¹, CHEN Xiang³, ZHANG Xiao-yan¹, and HU Hai-yan^{1,2} 1 Second Clinical Medical College, Wenzhou Medical University, Zhejiang (325003); 2 Department of Traditional Chinese Medicine, Second Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University, Zhejiang (325003); 3 Department of Rehabilitation, Second Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University, Zhejiang (325003)

ABSTRACT Objective To observe the effects of active ingredients of Qingxin Kaiqiao Recipe (QKR), such as saponins, volatile oils, effective compositions of polysaccharides, on expressions of Bcl-2 associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3), and β -amyloid precursor protein (β APP) in hippocampus of $A\beta$ ₁₋₄₀-induced Alzheimer's disease (AD) model rats. Methods Totally 112 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30973780);浙江省自然科学基金资助项目(No.Y2080273)

作者单位:1.温州医科大学第二临床学院(浙江 325003);2.温州医科大学附属第二医院中医科(浙江 325003);3.温州医科大学附属第二医院康复科(浙江 325003)

通讯作者:胡海燕, Tel:13867707082, E-mail:wyzhongyixi@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2017.02.0189

into 7 groups, i.e., the normal control group, the sham-operation group, the model group, the Aricept group, the saponin group, the volatile oil group, the polysaccharide group, 16 in each group. The AD rat model was established by injecting $A\beta_{1-40}$ from bilateral hippocampus. Equal volume of double distilled water was administered to rats by gastrogavage in the normal control group, the sham-operation group, the model group from the 2nd day after modeling, once per day for 2 successive weeks (at 10:00 am). Aricept (Donepezil Hydrochloride Tablet, 1.67 mg/kg per day), saponin (9 mL/kg per day), benzene (3.33 mL/kg per day), and polysaccharides (8.33 mL/kg per day) was administered to rats by gastrogavage to the Aricept group, the saponin group, the volatile oil group, the polysaccharides group, respectively, once per day for 2 successive weeks (at 10:00 am). By the end of gastrogavage spatial learning and memory capacities were detected using Morris water maze (MWZ). Apoptosis in hippocampal CA1 region was detected using TUNEL staining. Expressions of Bax, Bcl-2, Caspase-3, and β APP were measured via Real-time fluorescent quantitative PCR, Western blot, and immunohistochemistry, respectively. Results There was no statistical difference in pre-modeling escape latency and times of crossing platforms among groups at the same time point ($P > 0.05$). Besides, escape latency was gradually shortened as time went by. Compared with the model group, escape latency was shortened, and times of crossing platforms was significantly increased in the Aricept group and the saponin group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the amount of apoptotic cells in hippocampal CA1 region was obviously reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), expressions levels of Bax, Caspase-3, and β APP were down-regulated, Bcl-2/Bax ratio was obviously elevated in the saponin group, the volatile oil group, the polysaccharide group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion Three active ingredients (saponins, benzene, and polysaccharides) of QKR could improve spatial memory and learning capacities to different degrees, which might be possibly achieved by decreasing expressions of Bax, Caspase-3, β APP in hippocampal CA1 region, elevating Bcl-2 expression, and inhibiting apoptosis in hippocampus.

KEYWORDS Alzheimer's disease; Qingxin Kaiqiao Recipe; Bcl-2 associated X protein; B-cell lymphoma-2; cysteinyl aspartate specific proteinase-3; β -amyloid precursor protein

阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年人常见的复杂的、不可逆的神经退行性疾病,其病理特征为由不溶性的 $A\beta$ 构成的老年斑(senile plaque, SP)、神经原纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)、皮层神经元减少以及新皮层和脑膜血管出现淀粉样变^[1]。临床上以记忆力的减退和丧失、语言和行为障碍、思维能力下降以及认知功能障碍等为特征^[2]。目前,现代医学对本病尚缺乏理性的治疗方法,中医药对 AD 的治疗有一定的疗效^[3],而清心开窍方用于临床多年,疗效肯定^[4-6]。本课题组前期研究该方能改善 AD 大鼠学习记忆能力^[7]。现提取该方有效成分,采用 Morris 水迷宫进行行为学检测;运用 TUNEL 染色检测细胞凋亡,并对 AD 大鼠海马 CA1 区 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶-3(cysteinyl aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)、 β 淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein, β APP)表达的影响进行研究,现报道如下。

材料与方法

1 动物及分组 SPF 级 SD 大鼠 112 只,雄性,3 月龄,体重(250 ± 20)g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供[许可证号 SCXK(沪)2012-002]。随机分成 7 组,即:正常组、假手术组、模型组、安理申组、皂苷组、挥发油组和多糖组。

2 药物 清心开窍方由生地 6 g 麦冬 6 g 白芍 6 g 石斛 6 g 牡丹皮 6 g 茯神 6 g 陈皮 4 g 知母 5 g 石菖蒲 6 g 组成,由温州医科大学附属第二医院药剂科提供。皂苷成分提取:经水提醇沉法得到初提药液(浓度 80%),然后采用乙醚、乙酸乙酯、正丁醇等提取分离,得到含 70% 总皂甙成分的清心开窍方有效部位^[8]。挥发油成分的提取:采用 CO_2 超临界萃取法分离清心开窍方挥发性成分^[9]。多糖成分的提取:采用水提醇沉法得清心开窍方总多糖。制备方法如下:清心开窍方药材 10 倍水量,煎煮 1 h,过滤,滤渣再加 8 倍量水煎煮 1 h,合并过滤液,浓缩至 2 倍体积。冷却后,加入 95% 乙醇使含醇量达到 60%,静

置 24 h。过滤,沉淀冻干后 *Sevage* 除蛋白即可^[10]。盐酸多奈哌齐片(安理申),5 mg/片,卫材(中国)药业有限公司生产,批号:100223A,蒸馏水制成浓度 50% 的混悬液; $A\beta_{1-40}$ 由 Sigma 公司提供,聚集态 $A\beta_{1-40}$ 按说明书配置,4 ℃ 冰箱保存备用。

3 主要试剂及仪器 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 β APP 免疫组化试剂盒、SABC 试剂盒、DAB 显色剂(北京中杉生物有限公司);荧光定量 PCR 试剂盒、Sybr green I、逆转录酶(韩国 BioNeer 公司);定量 PCR 所需引物(大连宝生物工程有限公司);actin 抗体、蛋白质 Marker (Cell Signal Technology 公司);ECL Plus 发光试剂盒(江苏碧云天生物技术研究);TUNEL 试剂盒(美国 Roche 公司)单臂数字式脑立体定位仪(68003)、微型手持式颅钻(深圳瑞沃德公司);KDS310 脑立体微量注射泵(美国 KSD 公司);80030 微量注射器(美国 Hamilton 公司);Morris 水迷宫(上海吉量软件科技公司);JY3002 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司);BMJ-1 生物组织包埋机(天津航空机电公司);Shandon325 型石蜡切片机(英国 Shandon 公司);DNP-9162 型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);微型电泳仪及电泳槽、蛋白电泳转移系统(美国 Bio-RAD);梯度 PCR 扩增仪(Effendorf 公司);荧光定量 PCR 仪(韩国 BioNeer 公司)。

4 方法

4.1 AD 模型制备 经环境适应性饲养 1 周后,造模前进行 Morris 水迷宫训练 3 天,剔除差异明显者。借助脑立体定位仪和微量注射泵将 $A\beta_{1-40}$ (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 注入大鼠双侧海马制作 AD 模型^[11]。

4.2 干预方法 正常组不进行任何手术处理,假手术组大鼠双侧海马内注射 2 μL ddH₂O,剩余 5 组大鼠双侧海马内注射浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的老化的 $A\beta_{1-40}$ 2 μL (相当于 5 μg $A\beta$)。于造模后第 2 天开始灌胃,连续灌胃 14 天(上午 10:00),依据标准动物质量法及人与实验用动物给药剂量换算公式^[8,12],清心开窍方皂苷组、挥发油组、多糖组给药剂量每天分别是(9、3.33、8.33 mL/kg),安理申组给药剂量为每天 1.67 mg/kg,分别相当于 60 kg 成人用药的 20 倍。正常组及模型组予以等体积生理盐水。

5 观察项目及检测方法

5.1 逃避潜伏期(定位航行实验) 此实验于造模前训练 3 天,造模后训练 4 天,每天定于固定时间段训练 4 次,共 16 次。训练开始时,将平台置于任一象

限的中央(本实验置于第 4 象限),从池壁 4 个起始点的任一点将大鼠面向池壁放入水池,4 次训练将大鼠分别从 4 个不同的起始点放入水中,且同次训练各组大鼠的入水点相同。图像处理系统记录大鼠找到平台的时间(即逃避潜伏期)和游泳路径。大鼠游泳最长记录时间为 60 s,若大鼠在 60 s 内未找到平台,将其引至平台并停留 10 s,记录潜伏期 60 s,最后将大鼠擦干放入鼠笼。每天以大鼠 4 次训练潜伏期的平均值作为大鼠当天的学习成绩。该数据反应大鼠的记忆能力,逃避潜伏期越短,说明大鼠学习记忆获得和巩固的能力越强。

5.2 穿台次数(空间探索试验) 造模前、后定位航行试验结束后的第 2 天进行空间探索实验。撤除平台,然后将大鼠投入水中的方法及次数同定位航行实验,每次记录大鼠在 60 s 内穿越原平台位置的次数,每天以大鼠 4 次穿越平台次数的平均值作为大鼠当天的学习成绩。该数值反应大鼠对空间位置的记忆和判断能力(穿台次数越多,说明大鼠的空间探索能力越强)。

5.3 凋亡细胞 采用 TUNEL 染色检测法。按罗氏 TUNEL 凋亡染色试剂盒说明书进行 TUNEL 细胞凋亡染色,细胞核呈棕黄色染色为阳性细胞。每只大鼠脑染色 5 张切片,每张切片在注射针道附近病理改变明显处随机观察并拍摄 5 个非重叠高倍(ro 目镜 $\times 40$ 物镜)视野,将所拍图片用美国 IPP6.0 图像处理,计算凋亡细胞数目,用凋亡细胞数/高倍镜视野表示。

5.4 大鼠海马区 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 β APP 蛋白表达 采用免疫组织化学检测法。末次给药结束后第 2 天处死动物,冰台上迅速取出大脑组织,放入 4% 多聚甲醛固定液中固定,将固定好的大脑组织取出,室温下经梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,切片厚度 5 μm 。按免疫组化试剂盒说明书进行操作,光学倒置显微镜下,每组任意选取 6 张切片,每张切片随机观察 5 个视野 200 或 400 倍视野,拍照并精确选取视野内所有阳性颗粒,采用 Image-pro Plus 6.0 分析软件,求出平均光密度值(mean optical density,MOD),用于定量表达免疫组化阳性反应程度。

5.5 大鼠海马区 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 β APP 基因表达 采用实时荧光定量 PCR 检测法。总 RNA 抽提:采用异硫氰酸胍法提取组织总 RNA,紫外分光光度计 260/280 nm 测 RNA 浓度,在甲醛-MOPS 凝胶电泳缓冲液中 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 质量。逆转录反应:于冰浴的去酶 EP 管中配置

反转录反应液,反转录反应条件的设置:25 ℃ 10 min, 42 ℃ 60 min,85 ℃ 5 min,终止反应,冰浴 5 min。(3)PCR 引物设计:βAPP mRNA、Bax mRNA、Bcl-2 mRNA、Caspase-3 mRNA 检测所需引物均根据标准 Real-time PCR 引物设计原则,由上海瑞晶生物工程有限公司设计并合成(表 1)。(4)荧光定量荧光 PCR 反应:荧光定量 PCR 扩增条件的设置:94 ℃ 4 min, 94 ℃ 20 s, 60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 循环 35 次,72 ℃ 检测信号。

表 1 Bax、Bcl-2、Caspase-3 和 βAPP 基因实时荧光定量 PCR 检测引物序列

基因名称	引物序列	扩增长度 (bp)
βAPP	F:5'-CCAAGAGGTCTACCTGAACTGC-3' R:5'-GCATCGCTTACAACTCACCAAC-3'	159
Bax	F:5'-CCCGAGAGGTCTTCTCCG-3' R:5'-GAAGTCCAGTGTCCAGCCCA-3'	167
Bcl-2	F:5'-GTGAAGTGGGGAGGATTGT-3' R:5'-GCATCCAGCCTCCGTTA-3'	167
Caspase-3	F:5'-CGAAACTCTTCATCATTCAGGC-3' R:5'-AGTAAGCATACAGGAAGTCGCG-3'	129
β-actin	F:5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC -3' R:5'-TTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'	150

5.6 大鼠海马区 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 βAPP 蛋白表达 采用蛋白免疫印迹检测法。将大鼠海马的总蛋白提取后,按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书进行蛋白定量。每组蛋白上样量为 40 μg,经 SDA-PAGE 电泳分离后取出凝胶,随后进行蛋白质电转印,5%脱脂奶粉的 TBST(1:20)常温下封闭 1.5 h,加入相应的一抗(兔抗鼠 Bax,1:1 000 兔抗鼠 Bcl-2, 1:1 000 兔抗鼠 Caspase-3,1:1 000 兔抗鼠 βAPP, 1:1 000)4 ℃ 过夜,次日取出,TBST 洗膜 5 min,5 次,与辣根过氧化物酶标记的二抗(山羊抗兔 IgG,1:5 000)室温孵育 2 h,TBST 洗膜 5 min,3 次,按照 ECL Plus 发光试剂盒配制发光液,进行显色,移入凝胶成像分析仪曝光显影,Quantity One 凝胶软件分析系统分析。

5.7 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,Morris 水迷宫定位航行实验逃避潜伏期同一时间点不同组间的结果比较,采用重复测量方差分析;Morris 水迷宫穿台次数及实验及其他检测指标不同组间比较,采用单因素方差分析;两两比较方差齐者用 LSD 检验,方差不齐者用 Dunnett' T3 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 大鼠行为学检测结果

1.1 各组大鼠造模前后逃避潜伏期比较(表 2)
造模前后,正常组与假手术组大鼠逃避潜伏期比较,

表 2 各组大鼠造模前后 MWM 定位航行试验逃避潜伏期比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	潜伏期(s)
正常	16	造模前 1 d	45.14 ± 5.25
		2 d	29.51 ± 2.85
		3 d	19.16 ± 2.34
		造模后 1 d	29.36 ± 8.51
		2 d	18.23 ± 4.24
		3 d	8.38 ± 2.53
		4 d	7.68 ± 2.53
		造模前 1 d	46.55 ± 6.75
		2 d	28.89 ± 2.65
假手术	16	3 d	20.43 ± 2.92
		造模后 1 d	30.34 ± 9.43
		2 d	21.15 ± 5.75
		3 d	9.13 ± 3.64
		4 d	7.23 ± 4.62
		造模前 1 d	48.61 ± 8.15
		2 d	30.57 ± 4.46
		3 d	20.84 ± 1.35
		造模后 1 d	37.61 ± 13.53 **
模型	16	2 d	31.64 ± 6.19 **
		3 d	17.22 ± 5.23 **
		4 d	13.67 ± 3.22 **
		造模前 1 d	45.16 ± 5.43
		2 d	27.74 ± 3.75
		3 d	19.35 ± 2.34
		造模后 1 d	33.34 ± 12.66 △
		2 d	28.39 ± 4.64 △
		3 d	9.29 ± 5.27 △
安理申	16	4 d	9.23 ± 3.19 △
		造模前 1 d	44.43 ± 7.36
		2 d	30.64 ± 5.37
		3 d	20.57 ± 5.35
		造模后 1 d	4.65 ± 8.13 △△
		2 d	29.58 ± 8.32 △△
		3 d	12.04 ± 4.12 △△
		4 d	10.64 ± 2.93 △△
		造模前 1 d	20.57 ± 5.35
皂苷	16	2 d	29.47 ± 6.37
		3 d	18.59 ± 3.59
		造模后 1 d	36.23 ± 9.43 △△
		2 d	30.84 ± 7.23 △△
		3 d	13.58 ± 4.64 △△
		4 d	11.14 ± 2.37 △△
		造模前 1 d	45.06 ± 9.44
		2 d	28.39 ± 6.58
		3 d	20.48 ± 4.64
挥发油	16	造模后 1 d	37.34 ± 9.53 ▲
		2 d	31.38 ± 6.23 ▲
		3 d	17.14 ± 3.28 ▲▲
		4 d	12.64 ± 2.58 ▲
		造模前 1 d	45.06 ± 9.44
		2 d	28.39 ± 6.58
		3 d	20.48 ± 4.64
		造模后 1 d	37.34 ± 9.53 ▲
		2 d	31.38 ± 6.23 ▲
多糖	16	3 d	17.14 ± 3.28 ▲▲
		4 d	12.64 ± 2.58 ▲
		造模前 1 d	45.06 ± 9.44
		2 d	28.39 ± 6.58
		3 d	20.48 ± 4.64
		造模后 1 d	37.34 ± 9.53 ▲
		2 d	31.38 ± 6.23 ▲
		3 d	17.14 ± 3.28 ▲▲
		4 d	12.64 ± 2.58 ▲

注:与假手术组同期比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组同期比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与安理申组同期比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;下表同

差异无统计学意义($P > 0.05$);与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期显著延长($P < 0.01$);与模型组比较,多糖组大鼠逃避潜伏期差异无统计学意义($P > 0.05$);安理申组、皂苷组、挥发油组大鼠逃避潜伏期均缩短($P < 0.05$);与安理申组比较,皂苷组、挥发油组、多糖组大鼠逃避潜伏期均延长($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

1.2 各组大鼠造模前后穿台次数比较(表 3)
造模前,各组大鼠之间平均穿台次数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模后,正常组与假手术组比较,大鼠平均穿台次数差异无统计学意义($P > 0.05$);与假手术组比较,模型组大鼠平均穿台次数显著减少($P < 0.05$);与模型组比较,安理申组及皂苷组大鼠平均穿台次数显著增加($P < 0.05$);而挥发油组,多糖组大鼠平均穿台次数差异无统计学意义($P > 0.05$);与安理申组比较,皂苷组、挥发油组、多糖组大鼠平均穿台次数显著减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 3 各组 AD 大鼠造模前后穿台次数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	穿台次数(次)	
		造模前	造模后
正常	16	5.39 ± 1.32	5.41 ± 1.44
假手术	16	4.77 ± 1.02	4.86 ± 1.26
模型	16	4.96 ± 1.35	2.48 ± 0.59 **
安理申	16	5.03 ± 1.16	4.16 ± 1.06 Δ
皂苷	16	5.22 ± 1.39	3.38 ± 0.95 $\Delta\Delta$
挥发油	16	5.14 ± 1.64	2.67 ± 0.88 $\Delta\Delta$
多糖	16	5.08 ± 1.04	2.61 ± 0.72 $\Delta\Delta$

2 各组大鼠海马 CA1 区神经元细胞凋亡数比较(表 4,图 1) 经 TUNEL 染色后,各组均可见 TUNEL 阳性细胞,凋亡细胞被染成棕色,细胞核呈棕黄色,有

些细胞核则固缩深染,呈深棕色,形状不规则,有的呈指环样,有的在其核周可见棕黄色毛刷样结构,部分凋亡阳性细胞胞浆亦着色。正常组与假手术组比较,海马凋亡细胞数/高倍镜视野差异无统计学意义($P > 0.05$);与假手术组比较,模型组海马细胞凋亡数/高倍镜视野显著增多($P < 0.01$);与模型组比较,安理申组、皂苷组、挥发油组、多糖组海马细胞凋亡数均显著减少($P < 0.01$);与安理申组比较,挥发油组及多糖组差异有统计学意义($P < 0.01$)。皂苷组和安理申组比较,凋亡细胞数/高倍镜视野差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 4 各组 AD 大鼠海马 CA1 区神经元凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TUNEL 阳性细胞率(%)
正常	6	0.210 ± 0.024
假手术	6	0.221 ± 0.021
模型	6	0.923 ± 0.027 **
安理申	6	0.614 ± 0.053 $\Delta\Delta$
皂苷	6	0.626 ± 0.030 $\Delta\Delta$
挥发油	6	0.748 ± 0.043 $\Delta\Delta\Delta\Delta$
多糖	6	0.786 ± 0.038 $\Delta\Delta\Delta\Delta$

3 各组大鼠海马区 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 β APP 蛋白表达水平比较(表 5,图 2-5) Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 β APP 表达主要在细胞浆上,免疫组化染色呈棕黄色,正常组与假手术组比较,海马区各指标差异无统计学意义($P > 0.05$);与假手术组比较,模型组海马区 Bax、Caspase-3 及 β APP 表达均明显增多,Bcl-2 表达明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$);Bcl-2/Bax 比值下调。与模型组比较,安理申组、皂苷组、挥发油组和多糖组海马区 Bax 和 Caspase-3 表达均明显减少,Bcl-2 表达明显增多($P < 0.05$, $P < 0.01$);皂苷组

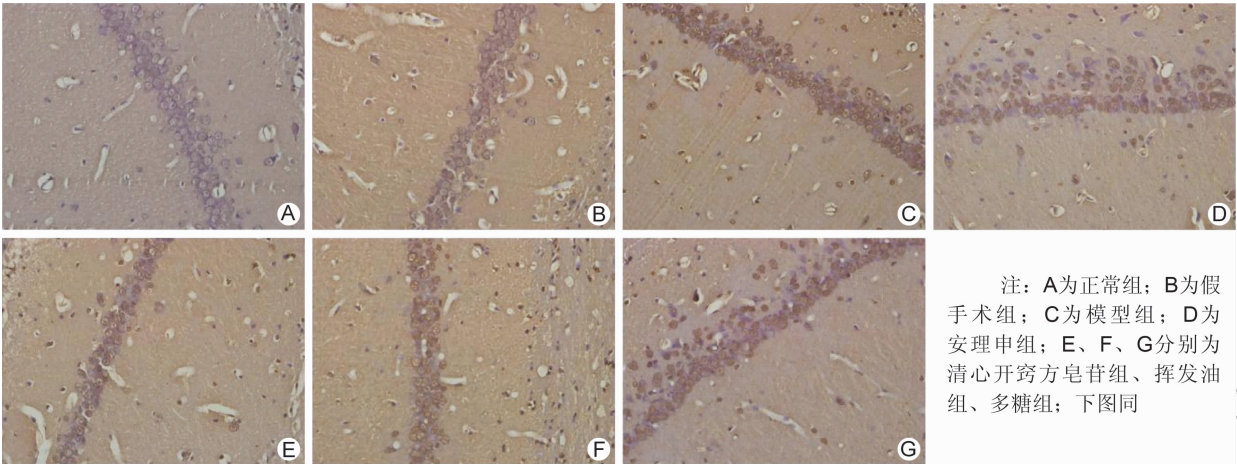


图 1 各组 AD 大鼠海马 CA1 区神经元凋亡数比较 (TUNEL 染色, $\times 400$)

海马区 β APP 表达明显减少($P < 0.05$);各治疗组 Bcl-2/Bax 比值上调;挥发油、多糖组海马区 β APP 表达差异无统计学意义($P > 0.05$);与安理申组比较,皂苷组、挥发油组和多糖组海马 Bax、Caspase-3 及 β APP 表

达增高,Bcl-2 表达减少($P < 0.01$)。
4 各组大鼠海马区 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 β APP 基因表达水平比较(表 6) 正常组与假手术组比较,海马区各指标差异无统计学意义($P > 0.05$);与

表 5 各组大鼠海马区 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 β APP 蛋白表达水平比较 (OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bax	Bcl-2	Bcl-2/Bax	Caspase-3	β APP
正常	16	0.047 $\pm$ 0.002	0.154 $\pm$ 0.005	—	0.099 $\pm$ 0.004	0.059 $\pm$ 0.004
假手术	16	0.049 $\pm$ 0.002	0.160 $\pm$ 0.006	—	0.102 $\pm$ 0.006	0.061 $\pm$ 0.004
模型	16	0.266 $\pm$ 0.007 **	0.091 $\pm$ 0.005 **	↓	0.154 $\pm$ 0.005 **	0.212 $\pm$ 0.016 **
安理申	16	0.155 $\pm$ 0.005 $\Delta\Delta$	0.130 $\pm$ 0.004 $\Delta\Delta$	↑	0.115 $\pm$ 0.008 $\Delta\Delta$	0.187 $\pm$ 0.007 $\Delta\Delta$
皂苷	16	0.212 $\pm$ 0.007 $\Delta\Delta\Delta$	0.119 $\pm$ 0.003 $\Delta\Delta\Delta$	↑	0.128 $\pm$ 0.004 $\Delta\Delta\Delta$	0.198 $\pm$ 0.006 $\Delta\Delta\Delta$
挥发油	16	0.236 $\pm$ 0.005 $\Delta\Delta\Delta$	0.112 $\pm$ 0.007 $\Delta\Delta\Delta$	↑	0.136 $\pm$ 0.006 $\Delta\Delta\Delta$	0.209 $\pm$ 0.008 $\Delta\Delta$
多糖	16	0.257 $\pm$ 0.008 $\Delta\Delta\Delta$	0.096 $\pm$ 0.004 $\Delta\Delta\Delta$	↑	0.146 $\pm$ 0.005 $\Delta\Delta\Delta$	0.210 $\pm$ 0.016 $\Delta\Delta\Delta$

注: ↑ 上调; ↓ 下调; — 表达量无明显变化;表 6,7 同

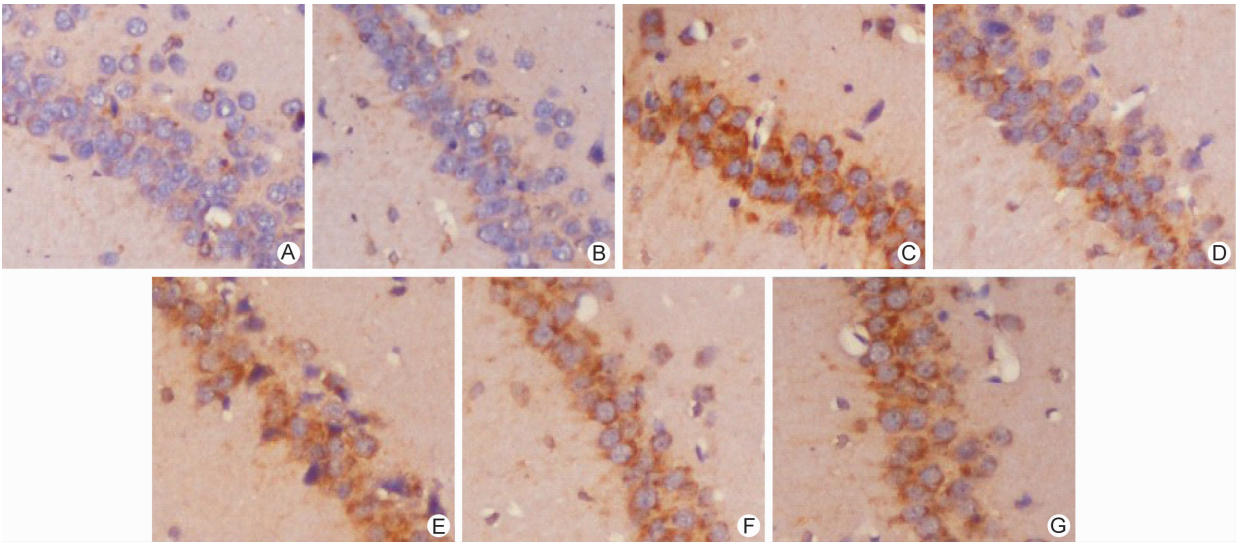


图 2 各组大鼠海马 CA1 区 Bax 表达(免疫组化, $\times 400$)

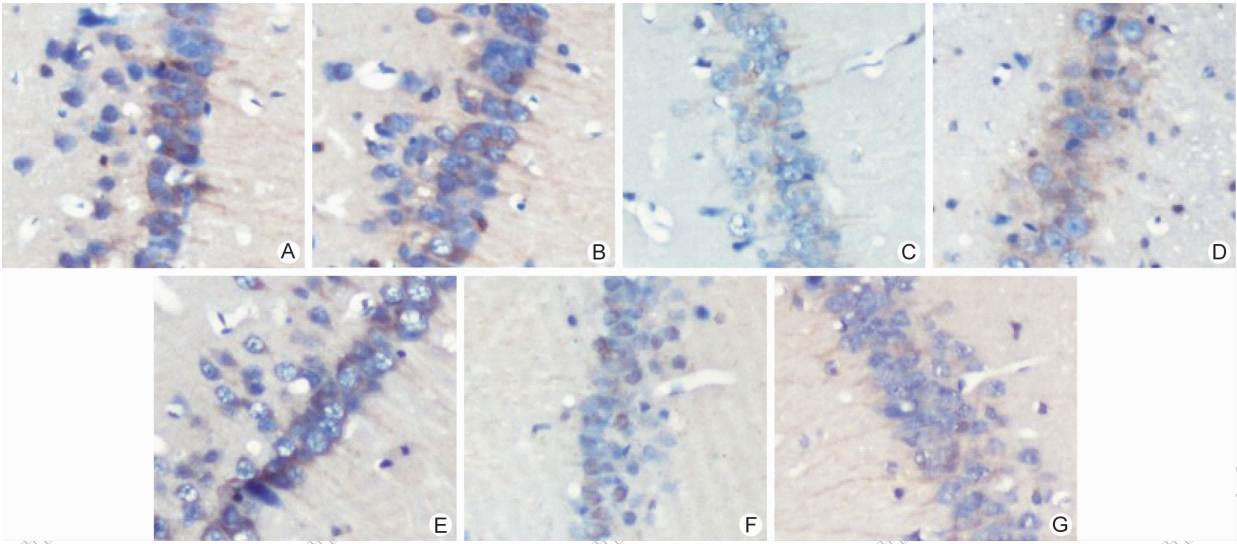


图 3 各组大鼠海马 CA1 区 Bcl-2 表达(免疫组化, $\times 400$)

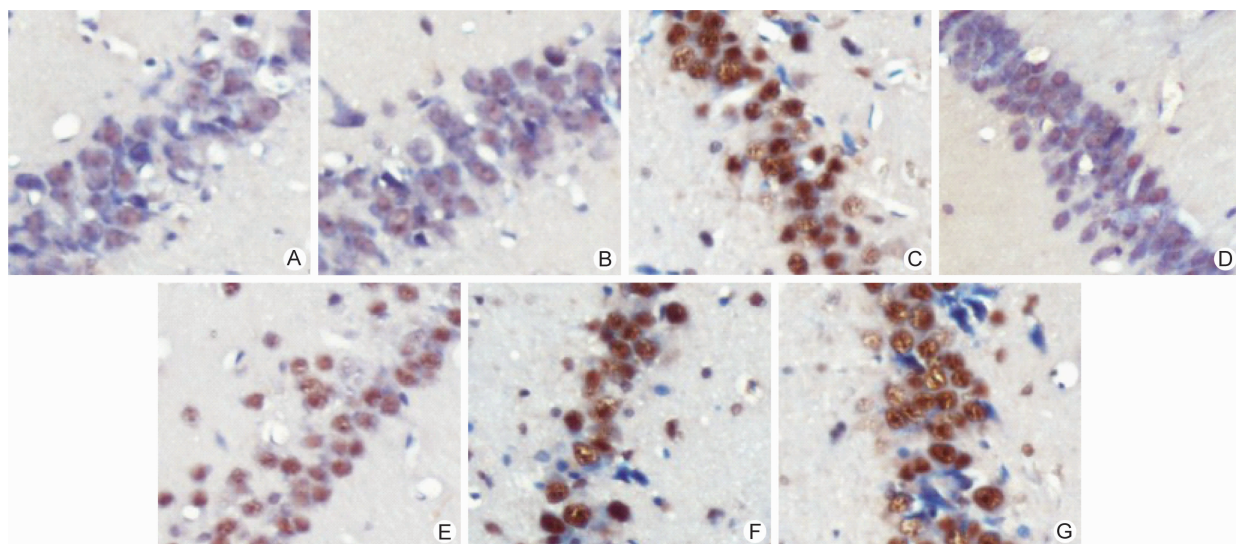


图 4 各组大鼠海马 CA1 区 Caspase-3 表达(免疫组化, ×400)

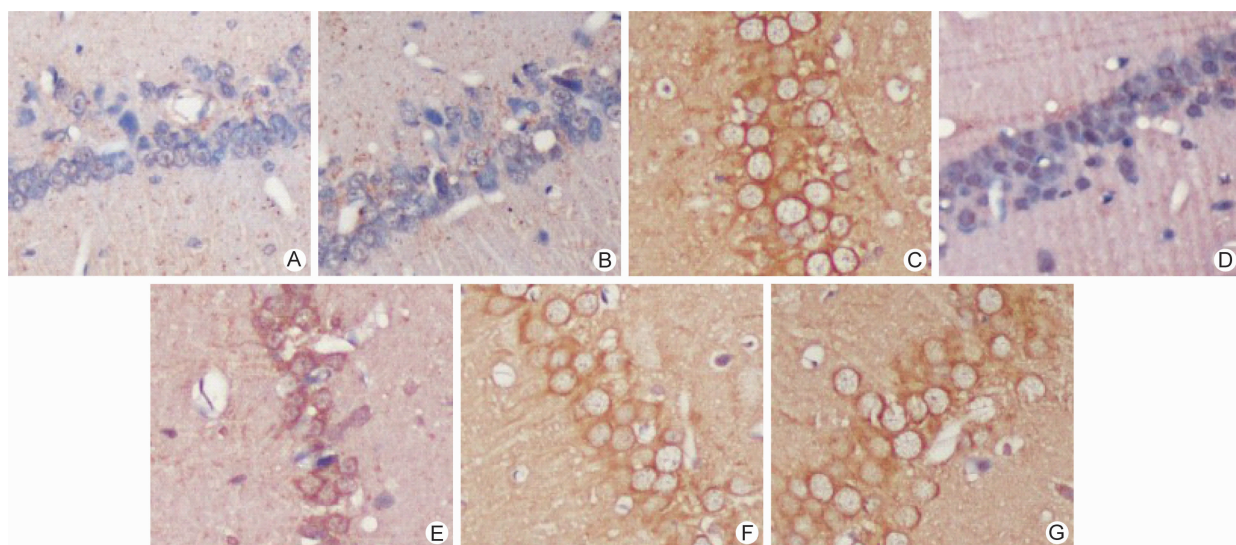


图 5 各组大鼠海马 CA1 区 βAPP 表达(免疫组化, ×400)

假手术组比较,模型组海马区 Bax mRNA、Caspase-3 mRNA 及 βAPP mRNA 表达均明显增多, Bcl-2 mRNA 表达明显减少($P < 0.01$), Bcl-2/Bax 比值下调;与模型组比较,除多糖组海马区 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA、Caspase-3 mRNA 表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),安理申组、皂苷组和挥发油组海马区 Bax mRNA、Caspase-3 mRNA 及 βAPP mRNA 表达均明显减少, Bcl-2 mRNA 表达均明显增多($P < 0.01$);安理申组、皂苷组、挥发油组和多糖组 Bcl-2/Bax 比值上调;与安理申组比较,皂苷组、挥发油组和多糖组海马 Bax mRNA、Caspase-3 mRNA 及 βAPP mRNA 表达增高, Bcl-2 mRNA 表达减少($P < 0.01$)。

5 各组大鼠海马区 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及

βAPP 蛋白表达水平比较(表 7, 图 6) 正常组与假手术组比较,海马区各指标差异无统计学意义($P > 0.05$);与假手术组比较,模型组海马区 Bax、Caspase-3 及 βAPP 蛋白表达明显增多, Bcl-2 蛋白表达明显减少($P < 0.01$);Bcl-2/Bax 比值下调;与模型组比较,多糖组海马区 Caspase-3 和 βAPP 蛋白表达无统计学意义($P > 0.05$),安理申组、皂苷组、挥发油组和多糖组海马区 Bax、Caspase-3 及 βAPP 蛋白表达均明显减少, Bcl-2 蛋白表达明显增多($P < 0.01$);安理申组、皂苷组、挥发油组和多糖组 Bcl-2/Bax 比值上调;与安理申组比较,皂苷组差异无统计学意义($P > 0.05$),挥发油组与多糖组海马 Bax、Caspase-3 及 βAPP 蛋白表达增高, Bcl-2 蛋白表达减少,差异显著($P < 0.01$)。

表 6 各组大鼠海马区 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 βAPP mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin	Bcl-2/Bax	Caspase-3/β-actin	βAPP/β-actin
正常	6	0.071 ± 0.008	0.444 ± 0.031	—	0.025 ± 0.004	0.068 ± 0.005
假手术	6	0.068 ± 0.006	0.430 ± 0.019	—	0.029 ± 0.004	0.071 ± 0.005
模型	6	0.213 ± 0.011 **	0.114 ± 0.011 **	↓	0.101 ± 0.005 **	0.214 ± 0.022 **
安理申	6	0.113 ± 0.014 △△	0.279 ± 0.012 △△	↑	0.053 ± 0.005 △△	0.130 ± 0.003 △△
皂苷	6	0.178 ± 0.008 △△▲	0.186 ± 0.011 △△▲	↑	0.085 ± 0.006 △△▲	0.165 ± 0.005 △△▲
挥发油	6	0.188 ± 0.007 △△▲	0.167 ± 0.006 △△▲	↑	0.091 ± 0.004 △△▲	0.180 ± 0.013 △△▲
多糖	6	0.202 ± 0.011 ▲▲	0.124 ± 0.007 ▲▲	↑	0.097 ± 0.005 ▲▲	0.192 ± 0.009 ▲▲

表 7 各组大鼠海马区 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 βAPP 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin	Bcl-2/Bax	Caspase-3/β-actin	βAPP/β-actin
正常	6	0.206 ± 0.005	1.014 ± 0.166	—	0.217 ± 0.055	0.706 ± 0.067
假手术	6	0.201 ± 0.005	1.032 ± 0.176	—	0.243 ± 0.062	0.724 ± 0.071
模型	6	0.929 ± 0.063 **	0.078 ± 0.025 **	↓	1.102 ± 0.178 **	1.540 ± 0.057 **
安理申	6	0.458 ± 0.045 △△	0.718 ± 0.096 △△	↑	0.532 ± 0.056 △△	1.004 ± 0.115 △△
皂苷	6	0.657 ± 0.098 △△▲	0.625 ± 0.051 △△	↑	0.624 ± 0.048 △△	1.055 ± 0.131 △△
挥发油	6	0.758 ± 0.049 △△▲	0.450 ± 0.049 ▲▲▲	↑	0.829 ± 0.081 ▲▲▲	1.302 ± 0.081 ▲▲▲
多糖	6	0.784 ± 0.049 ▲▲▲	0.319 ± 0.015 ▲▲▲	↑	0.999 ± 0.134 ▲▲	1.429 ± 0.071 ▲▲

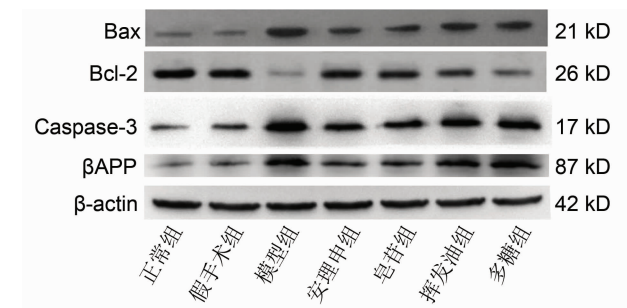


图 6 各组大鼠海马 CA1 区 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 βAPP 蛋白表达

讨 论

AD 患者的临床表现为记忆力的减退和丧失、语言和行为障碍、思维能力下降以及认知功能障碍,所以在 AD 的诊断和疗效评价指标中,学习记忆水平是最重要的因素。Morris 水迷宫于 20 世纪 80 年代初设计并应用于学习记忆脑机制研究的,其能提供较多的实验参数,系统客观地反映实验动物的认知水平,操作简便,数据误差较小。本实验结果表明,模型组定位航行潜伏期明显长于正常组及假手术组,穿台次数明显低于正常组及假手术组,提示 Aβ₁₋₄₀ 具有神经毒性,可模拟痴呆长时记忆障碍特征^[13],说明本实验动物模型造模成功。给予清心开窍方有效成分治疗后,与模型组比较,大鼠记忆明显改善,说明其具有改善 AD 模型大鼠记忆障碍的作用。

有研究发现,过度表达突变型 APP 的转基因小鼠的海马及皮层中有细胞凋亡^[14],且神经退行性疾病患

者的特定神经组织具有细胞凋亡的形态学改变^[15]。这些证据都表明细胞凋亡参与了 AD 病变过程,本实验提示,清心开窍方有效成分具有抑制大鼠脑组织中海马 CA1 区神经元细胞发生凋亡。

现在已明确 βAPP 的基因位于 21 号染色体上,在 β-分泌酶(β-secretase, BACE)的参与下降解形成 β-淀粉样蛋白(Aβ)^[16,17]。有证据表明 Aβ 在脑内的沉积是 AD 早期的主要病理变化^[18,19]。Caspase 是特异的凋亡信号转导分子,激活后的 Caspase 是凋亡执行者,Caspases 的激活表现为“瀑布式”的级联反应,而 Caspase-3 是 Caspases 级联反应中下行的最关键的凋亡执行蛋白酶,在各种程序启动的细胞凋亡中起最后枢纽的作用^[20],是细胞凋亡的关键标志因子,有人称之为“死亡蛋白酶”。Caspase 底物包括:Caspase 前体、细胞骨架蛋白、肌动蛋白及血影蛋白、Bcl-2 家族成员、蛋白激酶、APP 及 PS 等。本实验提示,类 AD 模型大鼠大脑海马 CA1 区 Caspase-3 表达明显增多,其原因可能是海马注射 Aβ₁₋₄₀ 使大鼠大脑 βAPP 的表达增加为 Caspase-3 提供了更多的底物,激活了 Caspases 级联反应的发生。因为本实验中还观察到,模型大鼠海马部位 βAPP 的表达量明显增高;清心开窍方有效成分和安理申能明显减少 Caspase-3 表达,可能与其下调 βAPP 表达有关。

在神经细胞的凋亡中,Bcl-2 家族是不可缺少的,Bcl-2 不仅作用 Caspase-3 的上游,而且还是 Caspase-3 的直接底物。两者在凋亡事件中起着关

键性的作用。有研究表明,Bcl-2 基因能促进细胞周期和细胞增殖,过多表达则抑制细胞凋亡,Bax 基因过度表达能加速细胞凋亡,并抵抗 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制作用^[21]。Bcl-2/Bax 组成一个平衡体系,Bcl-2 过多则细胞凋亡被抑制,Bax 过剩细胞凋亡加速。本实验提示,AD 模型大鼠海马 Bax 表达明显增多,而 Bcl-2 表达显著降低;皂苷组、挥发油组能明显改善这一变化;而多糖组作用则不明显。Bcl-2/Bax 反映出在凋亡事件中最终所起到的作用,上调意味着抑制凋亡,下调意味着促进凋亡。本实验结果显示,AD 模型大鼠在海马部位 Bcl-2/Bax 降低,说明注射 A β_{1-40} 均呈现促凋亡作用,治疗组呈现抑制凋亡作用。这与上述 Caspase-3 结果完全吻合。

本研究采用 A β_{1-40} 双侧海马注射法,通过 A β 的毒性作用制作 AD 大鼠模型,以清心开窍方有效成分进行干预,安理申作为治疗对照,结果显示清心开窍方有效成分能提高模型大鼠定向学习记忆能力,且能明显降低海马区 Bax、Caspase-3 及 β APP 表达,提高 Bcl-2 表达,这可能是清心开窍方有效成分治疗 AD 的重要机制之一。

参 考 文 献

- [1] Selkoe DJ. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases[J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(11): 1054-1061.
- [2] Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease[J]. Hum Mol Genet, 2010, 19(2), R12-R20.
- [3] 黄洁茹,傅雷,刘涛,等. 中医药治疗老年痴呆病的研究进展[J]. 中医学报, 2013, 28(5): 729-730.
- [4] 王宇峰. 颜乾麟运用清法治疗阿尔茨海默病的经验[J]. 江苏中医药, 2004, 25(3): 10-11.
- [5] 洪文. 张景岳关于痴呆病的学术思想[J]. 河北中医, 2000, 22(7): 551-552.
- [6] 颜乾麟,邢斌. 阿尔茨海默病中医治疗目的和方法的拓展[J]. 中医杂志, 2003, 44(10): 725-726.
- [7] Hu HY, Cui ZH, Li HQ. Fumanjian, a classic Chinese herbal formula, can ameliorate the impairment of spatial learning and memory through apoptotic signaling pathway in the hippocampus of rats with A β_{1-40} -induced Alzheimer's disease[J]. Evid-Based Complement Alternat Med, 2014: 942917.
- [8] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 69-71.

- [9] 潭晓梅,陈龙飞. 超临界 CO₂ 萃取法与水蒸气蒸馏法提取的北五味子挥发油成分分析[J]. 中药材, 2002, 25(11): 796-797.
- [10] 吴枫,朱丹妮,林志宏,等. 当归芍药散防治老年期痴呆的物质基础与作用机理研究Ⅸ—当归芍药散精简方多糖部位的抗氧化作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(7): 23-26.
- [11] George P, Charles W. The rat brain in stereotaxic coordinates[M]. 3rd ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2005: 30-36.
- [12] 胡海燕,陈志裕,徐冬梅,等. 清心开窍方 3 种提取部位改善阿尔兹海默病大鼠学习记忆能力的机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(5): 595-602.
- [13] 冯荣芳,冯亚青,吕佩源. 阿尔兹海默病动物模型研究进展[J]. 脑与神经疾病杂志, 2008, 16(6): 724-726.
- [14] 杜怡峰,王蓉,姬志娟,等. APP17 肽对 APP 转基因小鼠学习记忆能力和海马神经细胞凋亡的影响[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2007, 14(1): 7-10.
- [15] Deng JB, Niu YL, Huang PCS. The role of neuronal apoptosis in brain development and neurodegenerative disease[J]. J Med Res, 2010, 39(8): 9-16.
- [16] Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease[J]. Nature, 1991, 349(6311): 704-706.
- [17] 南善姬,韩艳秋,范佳. 中国早发性家族性阿尔茨海默病一家系淀粉样前体蛋白基因突变[J]. 中华神经科杂志, 2011, 44(1): 47-51.
- [18] Luo D, Hou X, Hou L, et al. Effect of pioglitazone on altered expression of Abeta metabolism-associated molecules in the brain of fructose-drinking rats, a rodent model of insulin resistance[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 664(1-3): 14-19.
- [19] Zhou ZD, Chan CH, Ma QH, et al. The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease[J]. Cell Adh Migr, 2011, 5(4): 280-292.
- [20] D'Amelio M, Sheng M, Cecconi F. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis[J]. Trends Neurosci, 2012, 35(11): 700-709.
- [21] 郑航,郑新民,李世文. Bcl-2/Bax 基因表达对隐睾生殖细胞凋亡的影响[J]. 中国男科学杂志, 2000, 14(2): 81.

(收稿:2015-04-24 修回:2016-01-20)