

· 基础研究 ·

洗心汤对 APP/PS1 双转基因小鼠突触功能 相关蛋白及受体表达的影响

高彦斌¹ 第五永长² 唐学成¹ 古赞¹ 杨珂¹ 翟家明¹ 李婷¹ 邵怡然¹

摘要 **目的** 观察洗心汤对 APP/PS1 双转基因小鼠空间学习记忆能力、海马 CA1 区突触超微结构和突触功能相关蛋白及受体表达的影响,初步探讨洗心汤方治疗阿尔茨海默病的作用机制。**方法** 选用 8 周龄雄性 APP/PS1 双转基因小鼠,分为模型组、盐酸多奈哌齐组、洗心汤组,另以同窝阴性小鼠设立空白对照组,每组 15 只。连续灌胃给药 6 个月后进行相关指标检测。采用 Morris 水迷宫实验观测 APP/PS1 转基因小鼠空间学习记忆能力;透射电镜观察小鼠海马 CA1 区突触超微结构;分别采用免疫荧光法及免疫印迹法检测 APP/PS1 转基因小鼠海马 CA1 区突触后致密物质-95 (PSD95)、N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B (NMDAR2B)、髓鞘碱性蛋白 (MBP)、生长相关蛋白 43 (GAP43) 表达水平。**结果** 与空白对照组比较,模型组逃避潜伏期延长,在目的象限游泳距离与穿越平台次数的百分比降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,洗心汤组小鼠逃避潜伏期均值总体下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),在目的象限游泳距离及穿越平台的次数占总路程与总穿越平台次数的百分比显著增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。电镜结果表明,洗心汤组较模型组神经元细胞密集,细胞核多为圆形,核内染色质轻度凝集,核仁可见;细胞质内线粒体轻度肿胀,粗面内质网轻度扩张,游离核糖体丰富,脂褐素颗粒少见,突触结构基本清晰。免疫荧光结果表明,海马 CA1 区 PSD95、NMDAR2B、MBP、GAP43 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),免疫印迹实验中其含量亦呈现高表达水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 洗心汤对 APP/PS1 转基因小鼠的空间学习记忆功能具有明显的改善作用,其机制可能与影响小鼠海马突触结构,提高小鼠海马突触功能蛋白及受体表达有关。

关键词 洗心汤; 海马; 突触; 蛋白; 受体

Effect of Xixin Decoction on Expressions of Functional Protein Related to Synapse and Receptors in APP/PS1 Double Transgenic Mice GAO Yan-bin¹, DIWU Yong-chang², TANG Xue-cheng¹, GU Zan¹, YANG Ke¹, ZHAI Jia-ming¹, LI Ting¹, and SHAO Yi-ran¹ 1 Department of Traditional Chinese Medicine, First Clinical Medical College, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi (712046); 2 Discipline Construction Office, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi (712046)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Xixin Decoction (XXD) on the spatial learning memory deficit in APP/PS1 double transgenic mice; synaptic ultrastructure, and synaptic functional related protein and receptor expressions in hippocampal CA1 region, so as to primarily study the mechanism of XXD for treatment of Alzheimer's disease (AD). **Methods** Eight weeks old male APP/PS1 double transgenic mice were recruited and divided into the model group, the donepezil hydrochloride group, the XXD group, 15 in each group. Besides, normal mice of the same brood (with no transgene) were recruited as a normal control group ($n = 15$). Related indices were detected after 6 months continuous gavage. The spatial learning-memory deficit of APP/PS1 double transgenic mice was detected by Morris water maze test. The synaptic ultrastructure of hippocampal CA1 region was observed by transmission e-

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (No. 81373703; No. 81674042)

作者单位:1. 陕西中医药大学第一临床医学院中医系 (陕西 712046); 2. 陕西中医药大学学科建设办公室 (陕西 712046)

通讯作者:第五永长, Tel: 029-38183462, E-mail: diwuyongchang@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20170828.242

electron microscopy (TEM). The expression levels of PSD95, NMDAR2B, MBP, and GAP43 protein in hippocampal CA1 region of APP/PS1 transgenic mice were detected by immunofluorescence. The expression levels of PSD95, NMDAR2B, MBP, and GAP43 protein in hippocampus were detected by Western blot. Results Compared with the model group, the mean value of escape latency was decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the percentage of swimming distance in the target quadrant to the number of times of crossing the platform were significantly increased in the XXD group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Results of electron microscopy showed, as compared with the model group, the neurons were dense, the nuclei were mostly round, the intranuclear chromatin were mildly agglutinated, and the nucleolus was visible in the XXD group. And the intracytoplasmic mitochondria were mildly swollen and rough endoplasmic reticulum was mild expanded. Free ribosome was rich, lipofuscin particles were rarely seen, and synaptic structure was basically clear. Results of immunofluorescence showed that the expressions of PSD95, NMDAR2B, MBP, and GAP43 in hippocampal CA1 region was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Their contents also showed higher levels of expression in Western blot ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion XXD showed obviously improvement on the spatial learning-memory deficit in APP/PS1 double transgenic mice, which might be associated with affecting the synaptic structure of hippocampus and improving the expressions of synaptic functional proteins and receptors.

KEYWORDS Xixin Decoction; hippocampus; synapse; protein; receptor

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 又称老年性痴呆, 目前已成为世界范围内严重威胁老年人健康的疾病。由于 AD 具有隐匿性和不可逆性, 目前治疗效果并不理想, 无法从根本上阻止 AD 的进展。中医药在 AD 的防治方面有一定的经验^[1]。有学者采用古方洗心汤治疗 AD, 疗效确定^[2]。APP/PS1 双转基因小鼠是目前国际公认的 AD 动物模型, 目前被广泛用于 AD 研究^[3,4]。本实验通过观察洗心汤对 APP/PS1 双转基因小鼠空间学习记忆能力、海马 CA1 区突触超微结构和突触功能相关蛋白及受体表达的作用, 初步探讨了洗心汤方治疗 AD 的部分作用机制。

材料与方

1 动物及分组 8 周龄雄性 APP/PS1 双转基因小鼠和同窝阴性小鼠共 60 只, 体重 (20 ± 2) g。均购买自南京模式动物研究所, 生产许可证号: SCXK (苏) 2015-0001。所有动物在 SPF 级实验室的独立送风系统 (IVC) 动物房繁殖或饲养, 动物房温度为 $20 \sim 25$ °C, 12 h 光照 12 h 黑暗循环, 并保证充足的进食和饮水。所有动物饲养和实验操作程序符合陕西中医药大学实验动物福利伦理委员会相关规定, 并经陕西中医药大学动物伦理委员会批准。所有小鼠称重后, APP/PS1 双转基因小鼠分为模型组、盐酸多奈哌齐组、洗心汤组, 另以同窝阴性小鼠设立空白对照组, 共 4 组, 每组 15 只。

2 药物 盐酸多奈哌齐片, 5 mg/片, 由卫材(中

国) 药业有限公司生产, 产品批号: H20050978。洗心汤颗粒均由单味免煎颗粒等比配制而成, 全部实验所用洗心汤颗粒由北京康仁堂药业有限公司免费提供, 中药剂量及(批号): 人参 30 g (130901) 茯神 30 g (14019422) 酸枣仁 30 g (15003201) 半夏 15 g (14017932) 陈皮 15 g (15000602) 炒神曲 9 g (14002422) 附子 3 g (14004472) 石菖蒲 3 g (14013091) 甘草 3 g (140112672)。中药配方颗粒每剂共 15.75 g。

3 主要试剂及仪器 抗-突触后致密物质-95 (PSD95)、兔抗单克隆抗体 (Cell signaling, 3409S); N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B (NMDAR2B) 兔抗单克隆抗体 (Abcam, AB65783); 抗-髓鞘碱性蛋白 (MBP) 鼠抗单克隆抗体 (Cell signaling, 2396); 抗-生长相关蛋白 43 (GAP43) 兔抗单克隆抗体 (Bio-world, BS3655); FITC 标记山羊抗兔与抗鼠二抗、HRP 标记山羊抗兔与抗鼠二抗、BCA 蛋白定量试剂盒, 由北京全式金生物技术有限公司提供; 透射式电子显微镜 (H-7650, 日本 HITACHI 公司); 超薄切片机 (LKB-V/NOVA, 瑞典 LKB 公司); 样品处理机、自动染色机 (德国 Leica 公司); 倒置荧光数码显微镜 (日本 Nikon 公司); 冰冻切片机 (德国 Leica 公司); 电泳/转膜仪 (Bio-Rad, 上海天能科技有限公司); 多功能全波长酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司)。

4 方法

4.1 AD 小鼠模型鉴定 本研究所采用的转基因小鼠即为过表达 APP 和 PS1 两种基因的 APP/

PS1 双转基因模型,是 AD 研究领域的最佳动物模型之一,能够很好地模拟遗传型 AD 脑内 A β 沉积的病理学特征^[5]。采用 PCR 法对 AD 模型进行基因鉴定,得出 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠的饲养和繁殖获得成功,是成功转入了 APP/PS1 基因的纯合子小鼠^[6]。

4.2 给药方法 洗心汤组采用研钵把药物颗粒研成粉末,用生理盐水溶解,按 1.8 g/(kg·d) 剂量灌胃给药,每天 1 次;盐酸多奈哌齐组用生理盐水溶解按 0.014 mg/(kg·d) 剂量灌胃给药,每天 1 次;所有药用剂量根据患者临床用量的等效剂量和动物体表面积折算而来^[7]。空白对照组及模型组均给予等量生理盐水,所有小鼠按 0.1 mL/10 g 的量给药。持续灌胃给药 6 个月后进行行为学测试。

4.3 行为学测试 采用 Morris 水迷宫实验方法^[8] 分别进行可视平台实验、定位航行实验、撤平台实验。小鼠每天分别于上午 8:00 和下午 2:00 各进行 2 次试验,每次实验时间 60 s,分别以 4 个象限池壁的中点作为入水点,各组小鼠每天训练 2 次,共训练 8 天,前 2 天训练时,经 60 s 未找到平台者,将其引领至平台,放置 30 s 引导其学习记忆。第 3~7 天重复如上操作,记录小鼠找到平台的确切时间记为潜伏期,并将各组小鼠 Morris 水迷宫作业中第 3~7 天的平均潜伏期作为衡量其学习记忆能力的指标。第 8 天,撤掉平台,重复上述步骤,记录小鼠在 60 s 内在目的象限的游泳距离及穿越平台次数。

4.4 电镜观察海马超微结构 小鼠于末次行为学测试后,每组随机选取 2 只小鼠,分别行心脏灌注和固定,快速断头取全脑,在低温下取动物脑组织。样品取出后切成 1 mm×1 mm×1 mm 的小块最后放入 2.5% 的戊二醛溶液固定过夜。将经戊二醛固定过的脑组织用 0.1 mol/L PBS 缓冲液浸洗 30 min,冲洗后的脑组织放入 1% 四氧化锇固定液中固定 2 h 后取出,0.1 mol/L PBS 缓冲液浸洗,10 min;然后依次用 30%、50%、70% 乙醇脱水 10 min;70% 乙醇醋酸双氧铀块染 2 h 或过夜;90% 乙醇脱水 2 次,每次 10 min;100% 乙醇脱水 3 次,每次 10 min;还氧丙烷置换 10 min;环氧树脂 Epon812 浸透、包埋;聚合后作半超薄切片 1~2 μ m,美兰染色后光学显微镜下定位,瑞典 LKB-V 型超薄切片机进行超薄切片 70 nm;将超薄切片铀染 7 min,洗涤 20 s,铅染 7 min,洗涤 20 s;采用日本 H-7650 透射式电子显微镜下观察、拍照。

4.5 免疫荧光法检测小鼠海马 CA1 区 PSD95、

NMDAR2B、MBP、GAP43 蛋白表达 末次行为学测试后,每组随机选取 6 只小鼠,分别进行心脏灌注和固定,然后快速断头取全脑,在低温条件下取下完整的脑组织放入 4% 多聚甲醛固定过夜;将固定后的脑组织依次放入 15%、20%、30% 的蔗糖溶液中脱水,4 $^{\circ}$ C 过夜(每次脱水 12 h);将脱水后的脑组织置于 -20 $^{\circ}$ C 的恒冷切片机中,用 OCT 包埋剂包埋,然后进行切片,厚度为 10 μ m,以倒贴法将切片贴于载玻片上。用含 0.3% Triton-X 100 的 PBS 处理 30 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min,用 10% 羊血清工作液(需事先用 TBST 配置)封闭 30 min。弃去封闭液后,用 PBS 洗去残余的封闭液。一抗使用 PBS 稀释(1:200),4 $^{\circ}$ C 过夜。弃去一抗,用含 0.3% Triton-X 100 的 PBS 洗 2 次,每次 5 min,再用 PBS 洗 1 次,每次 5 min。二抗使用免疫荧光二抗稀释液稀液(1:400),室温避光孵育 40 min。弃去二抗,用含 0.3% Triton-X 100 的 PBS 洗 2 次,每次 5 min,再用 PBS 洗 1 次,5 min。用 DAPI 染核 5~10 min。弃去染液,用含 0.3% Triton-X 100 的 PBS 洗 2 次,每次 5 min。再用 PBS 洗 1 次,5 min。弃去 PBS,滴加适量防荧光淬灭保护液,倒置荧光数码显微镜下观察海马 CA1 区 PSD95、NMDAR2B、MBP、GAP43 蛋白表达情况。

4.6 免疫印迹法检测小鼠海马 PSD95、NMDAR2B、MBP、GAP43 蛋白表达 末次行为学测试结束后,颈椎脱臼处死每组剩余的 6 只小鼠,冰浴分离大脑皮层及海马组织;在样品离心管中按 1 mg 海马组织加 10 μ L 的 RIPA 裂解液,按 1% 比例加 RIPA 附带的 PMSF,另按 1% 比例加磷酸酶抑制剂;并用镊子搅碎脑组织,然后再用细胞超声破碎仪破碎。BCA 法定蛋白后调节各组蛋白浓度统一为 2 μ g/ μ L,加 5 \times 上样缓冲液,97.9 $^{\circ}$ C 变性 5 min。各泳道中分别加入 20 μ L 样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(5% 浓缩胶、10% 分离胶与 6% 分离胶)电泳分离,先用 80 V 恒压电泳,待溴酚蓝跑至浓缩胶下层后改用 100 V 恒压电泳,当溴酚蓝距离分离胶底部 1 cm 时停止电泳。分离的蛋白在 250 mA、冰浴条件下转膜 90 min,将目的蛋白湿转到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗(抗 PSD95 抗体 1:1 000,抗 NMDAR2B 抗体 1:1 500,抗 MBP 抗体 1:1 000,抗 GAP43 抗体 1:600),4 $^{\circ}$ C 过夜,倾去一抗,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,再用 TBS 洗膜 1 次,每次 10 min。分别加入 1:2 000 羊抗兔甘油二抗(孵育 MBP 的膜上按 1:2 000 的浓度加入羊抗鼠甘油二抗),置于摇床上摇动,室温下 2 h。弃去二抗,TBST 洗膜 3 次,每

次 10 min,再用 TBS 洗膜 1 次,每次 10 min;加入 ECL 发光液进行曝光。以 β -actin 作为内参照,统计各组蛋白与 β -actin 灰度值的比值。

4.7 统计学方法 采用 SPSS 20.0 进行统计分析,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠空间学习记忆能力比较(表 1) 在定位航行实验的 5 天内所有小鼠的逃避潜伏期都呈下降趋势。与空白对照组比较,模型组逃避潜伏期明显延长($P < 0.01$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组逃避潜伏期整体有所下降,除第 4 天($P < 0.05$)外,其余结果均无统计学意义($P > 0.05$);而在第 4~7 天,洗心汤组游泳逃避潜伏期均下降明显($P < 0.01, P < 0.05$)。在空间探索实验中,模型组小鼠在目的象限游泳距离

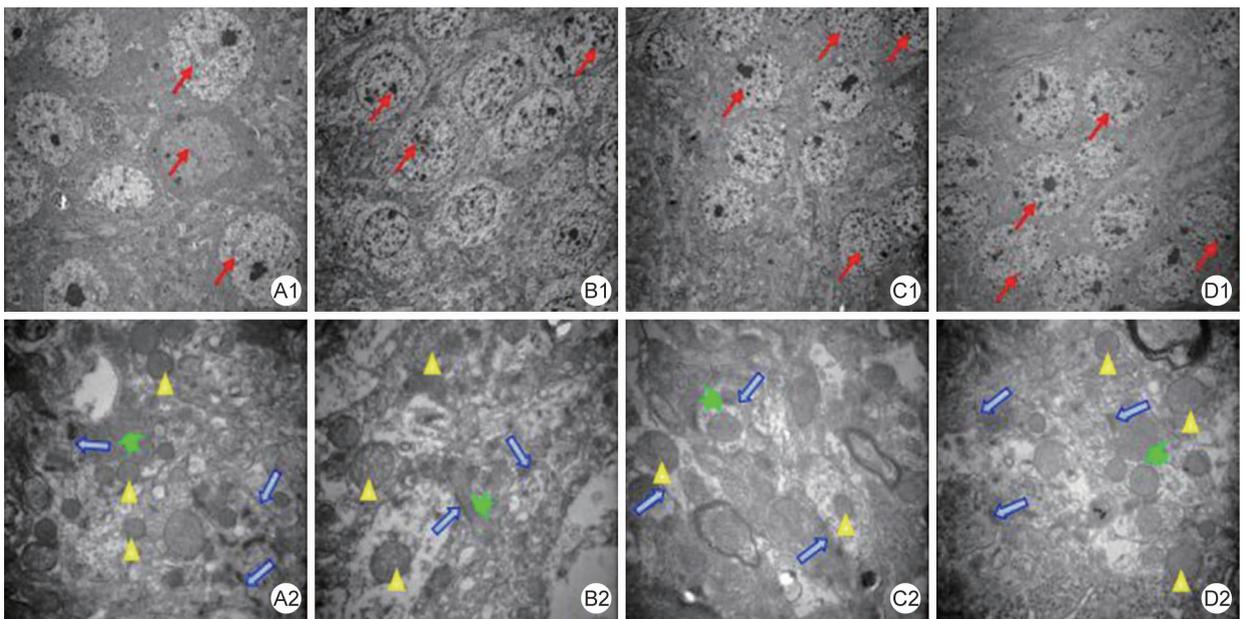
与穿越平台次数的百分比比较空白对照组明显较低($P < 0.01$);与模型组比较,洗心汤组距离与穿越平台次数的百分比均显著增加($P < 0.01, P < 0.05$),盐酸多奈哌齐组其目的象限游泳距离占总距离的百分比增加($P < 0.01$),穿越平台的次数占穿越平台总次数的百分比亦有增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 各组小鼠海马突触超微结构比较(图 1) 空白对照组细胞核多为圆形,核内染色质分布均匀,常染色质丰富,异染色质较少;细胞质内细胞器丰富,高尔基复合体发达,线粒体圆形或杆状,分散于细胞质内,大量密集的粗面内质网堆叠排列,游离核糖体丰富,电子密度不一的脂褐素颗粒常见。突触结构及突触细胞器结构清晰,突触小泡丰富。模型组细胞肿胀明显,电子密度降低;细胞核多为圆形,核内染色质结构疏松,核仁可见;细胞质内结构空旷,线粒体肿胀,线粒体嵴减少甚至消失,部分线粒体呈空泡样改变,粗面内质网池样扩张,细胞质内游离核糖体减少,高尔基复合体扁

表 1 各组小鼠在不同时段平均逃避潜伏期、游泳距离及穿越平台次数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	逃避潜伏期(s)					游泳距离(%)	穿越平台次数(%)
		3天	4天	5天	6天	7天	8天	
空白对照	12	42.12 ± 19.76	37.53 ± 20.55	36.42 ± 18.97	35.13 ± 18.98	34.55 ± 16.72	31.46 ± 3.86	33.14 ± 1.99
模型	12	51.21 ± 15.78*	51.27 ± 12.87*	49.56 ± 15.47*	48.76 ± 15.35*	47.18 ± 16.40*	20.29 ± 0.90*	22.82 ± 1.81*
盐酸多奈哌齐	12	48.09 ± 17.24	45.74 ± 17.94 [△]	45.58 ± 18.22	45.48 ± 18.20	44.58 ± 18.21	23.55 ± 0.81 ^{△△}	23.90 ± 1.83
洗心汤	12	45.54 ± 19.40	41.40 ± 19.42 ^{△△}	39.28 ± 19.56 ^{△△}	38.75 ± 21.95 [△]	37.55 ± 18.74 ^{△△}	26.56 ± 1.86 ^{△△}	29.03 ± 2.87 [△]

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组同期比较,[△] $P < 0.05, \Delta \Delta P < 0.01$



注:A 为空白对照组(A₁ × 4 000; A₂ × 30 000);B 为模型组(B₁ × 4 000; B₂ × 30 000);C 为盐酸多奈哌齐组(C₁ × 4 000; C₂ × 30 000);D 为洗心汤组(D₁ × 4 000; D₂ × 30 000)

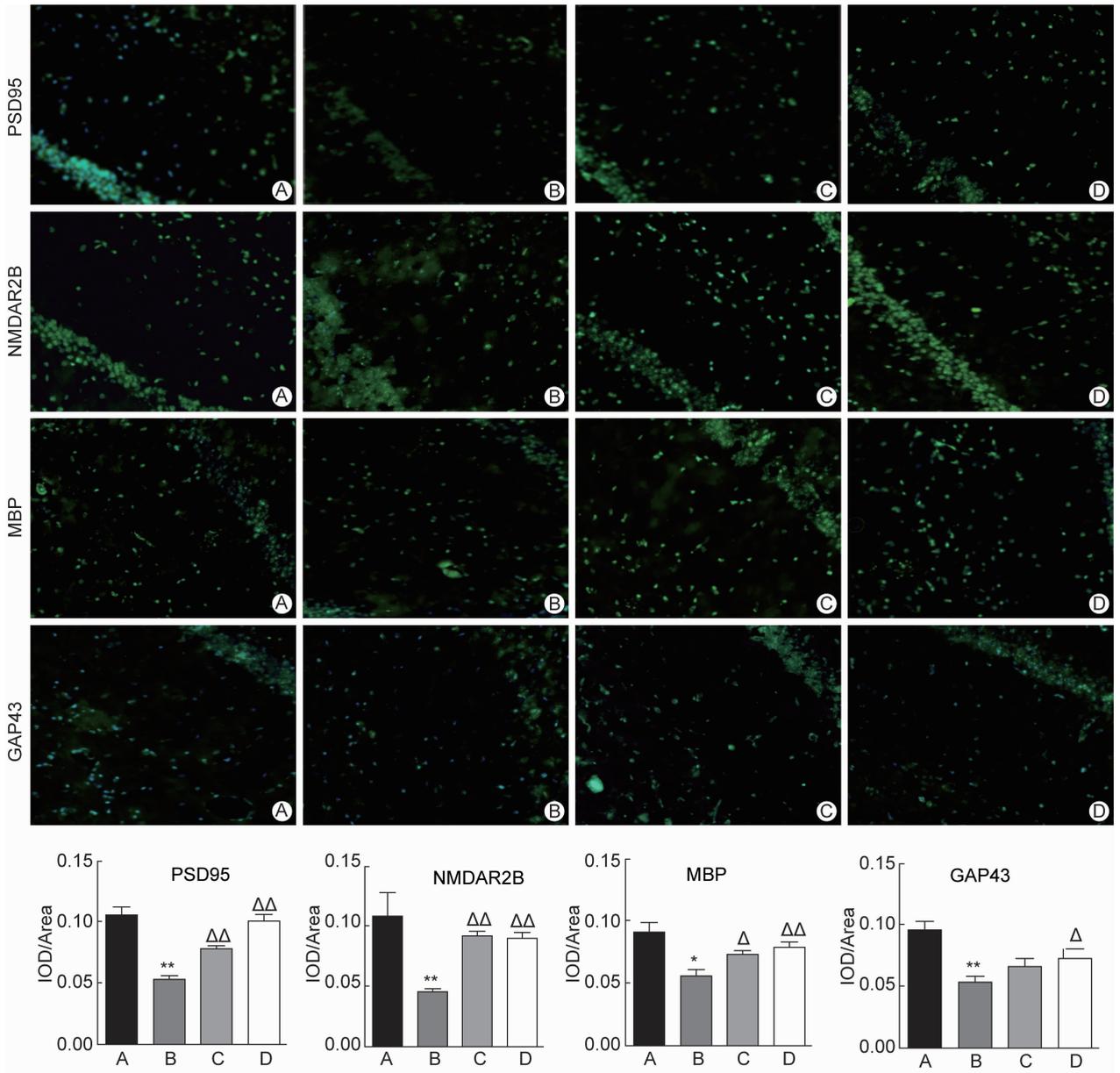
图 1 各组小鼠海马突触超微结构图 (美兰染色)

平囊扩张,脂褐素颗粒电子密度降低。突触结构肿胀,多呈空泡样结构,部分突触间隙消失,突触小泡减少。盐酸多奈哌齐组神经元细胞体积较大,细胞核略圆,核膜多有切迹,核内染色质分布均匀,核仁少见;细胞质内细胞器丰富,高尔基复合体常见,线粒体圆形或杆状,部分线粒体肿胀,粗面内质网呈条索状分散在细胞质中,游离核糖体丰富,脂褐素颗粒常见,突触数量极少,突触小泡较少。洗心汤组细胞核多为圆形,核内染色质轻度凝集,核仁可见;细胞质内线粒体轻度肿胀,粗面内质网

轻度扩张,游离核糖体丰富,高尔基复合体扁平囊扩张,脂褐素颗粒少见。突触结构基本清晰,突触小泡丰富。

3 免疫荧光法检测 各组小鼠海马 CA1 区 PSD95、NMDAR2B、MBP、GAP43 蛋白表达情况

3.1 各组小鼠海马 CA1 区 PSD95 蛋白表达比较(图 2) 与空白对照组比较,模型组小鼠海马区 PSD95 蛋白表达水平降低($P < 0.01$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组及洗心汤组 PSD95 表达水平均增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



注:A 为空白对照组;B 为模型组;C 为盐酸多奈哌齐组;D 为洗心汤组;n 为 6;与 A 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 B 组比较,Δ $P < 0.05$,ΔΔ $P < 0.01$

图 2 各组小鼠海马 CA1 区 PSD95、NMDAR2B、MBP、GAP43 蛋白表达水平比较 (Merge, ×200)

3.2 各组小鼠海马 CA1 区 NMDAR2B 蛋白表达比较(图 2) 与空白对照组比较,模型组小鼠海马 NMDAR2B 表达水平明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组及洗心汤组小鼠海马 NMDAR2B 表达水平显著增高($P < 0.01$)。

3.3 各组小鼠海马 CA1 区 MBP 蛋白表达比较(图 2) 与空白对照组比较,模型组小鼠海马 MBP 表达水平降低($P < 0.05$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组及洗心汤组小鼠海马区 MBP 表达水平均升高($P < 0.05, P < 0.01$)。

3.4 各组小鼠海马 CA1 区 GAP43 蛋白表达比较(图 2) 与空白对照组比较,模型组小鼠海马 GAP43 蛋白表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,洗心汤组小鼠海马 GAP43 蛋白表达升高($P < 0.05$),盐酸多奈哌齐组 GAP43 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 免疫印迹法检测各组小鼠海马 PSD95、NMDAR2B、MBP 和 GAP43 蛋白表达情况

4.1 各组小鼠海马 PSD95 表达比较(图 3) 与空白对照组比较,模型组小鼠海马 PSD95 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组及洗心汤组海马区 PSD95 表达水平明显增加($P < 0.05$)。

4.2 各组小鼠海马 NMDAR2B 蛋白表达比较(图 3) 与空白对照组比较,模型组小鼠海马 NMDAR2B 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,洗心汤组小鼠海马区 NMDAR2B 蛋白表达水平增高($P < 0.05$);盐酸多奈哌齐组 NMDAR2B 蛋

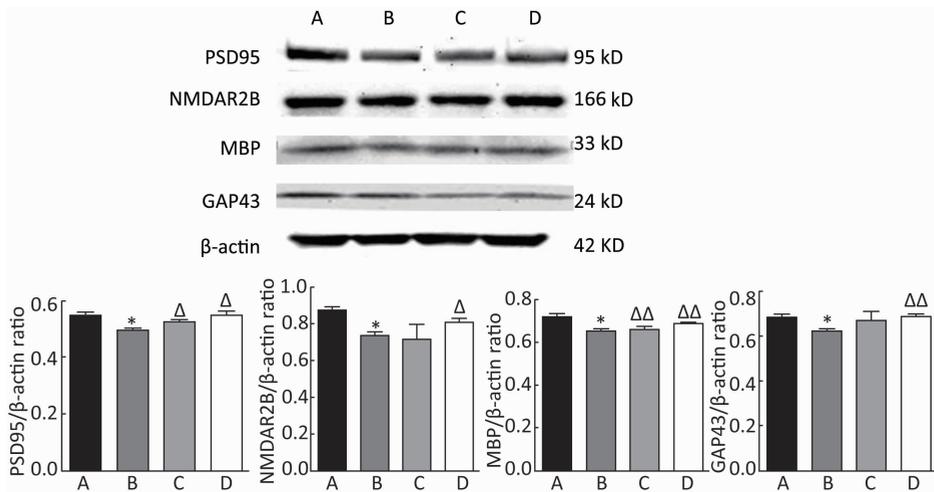
白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4.3 各组小鼠海马 MBP 蛋白表达比较(图 3) 与空白对照组比较,模型组小鼠海马 MBP 蛋白表达水平显著较低($P < 0.05$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组及洗心汤组小鼠海马 MBP 蛋白表达均增加($P < 0.01$)。

4.4 各组小鼠海马 GAP43 蛋白表达比较(图 3) 与空白对照组比较,模型组小鼠海马 GAP43 蛋白表达水平较低($P < 0.05$);与模型组比较,洗心汤组小鼠海马 GAP43 蛋白表达明显增加($P < 0.01$),盐酸多奈哌齐组 GAP43 蛋白表达,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

AD 属于老年神经退行性疾病,临床主要表现为记忆、认知和行为障碍。A β 沉积与级联反应及 tau 蛋白的异常磷酸化是 AD 发病的重要环节^[9]。有研究证实,皮质和海马突触联系的丧失是 AD 脑内一个突出的神经病理学改变,而突触数量减少较神经元丧失更显著,还伴有突触病理性变化^[10]。因此,突触丧失是 AD 的结构基础^[11]。应用电子显微镜及免疫组织化学染色方法的量化研究发现 AD 患者海马和相关脑皮质区突触密度明显下降^[12]。而富含脯氨酸的 PSD95 和骨架蛋白 Shank1 是突触后致密区内核心构架蛋白,在维持突触正常功能和可塑性方面具有重要作用^[13,14]。突触后致密区是接受和整合突触信号并将其传导给突触后细胞的分子装置,在突触可塑性中起重要作用^[15]。PSD95 蛋白对突触信号转导有重要作用。脑内高浓度 A β 寡聚体可以影响谷氨酸在神经细



注:A 为空白对照组;B 为模型组;C 为盐酸多奈哌齐组;D 为洗心汤组;n 为 6;与 A 组比较, * $P < 0.05$;与 B 组比较, $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$

图 3 各组小鼠海马区 PSD95、NMDAR2B、MBP、GAP43 蛋白表达水平比较

胞的正常转运,发挥谷氨酸的兴奋性毒性作用,损伤突触可塑性^[16]。 $A\beta$ 对突触信号传递破坏的最敏感和最典型的表现是使长时增强效应(LTP)受到抑制,以及长时抑制效应(LTD)增强^[17,18]。谷氨酸离子型受体N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA),广泛参与AD的生理和病理活动。NMDA受体被认为是神经元突触可塑性及大脑皮质和海马神经元LTP的主要调控者,构成了中枢神经系统的重要功能,如学习和记忆的基础^[19]。NMDA受体的功能结构基础主要位于NR2B上,NMDAR2B在中枢神经系统中具有广泛的分布,有“聪明基因”、“记忆基因”之称。有研究证明,NMDAR2B亚单位在兴奋性突触传递和神经元兴奋性毒性等方面起重要的作用,尤其在突触可塑性和学习记忆中扮演重要的角色^[20]。NMDAR2B可以诱导细胞的LTD、激活细胞凋亡和氧应激,增加 $A\beta$ 分泌^[21]。但是也有研究表明,选择性阻断NMDAR2B可抑制突触可塑性及皮质和海马神经元LTD而不是LTP的产生,NMDAR2B表达增强可使LTP增强,同时也可以提高小鼠在空间和非空间学习和记忆能力^[22]。最新的研究也证实,过表达的NMDA受体具有对膜的保护作用,减少了膜穿孔的过程^[23]。髓鞘是构成神经元细胞的主要结构,其主要成分为蛋白质和脂质,是脑内信息快速传递和整合功能的结构基础。有研究发现AD患者的髓鞘发生缺失^[24]。MBP和蛋白脂蛋白又是构成髓鞘的重要结构蛋白,可维持中枢神经系统髓鞘的正常功能,保证神经元的完整性^[25]。AD患者皮层中这两种蛋白含量均降低。研究发现纯化的鼠脑MBP、重组表达的鼠脑MBP和人脑MBP都具有在体外降解 $A\beta$ 的活性^[26]。GAP43是一种胞膜磷酸蛋白质,与神经系统的发育、突触形成和可塑性以及神经再生有密切关系,在引导轴突生长和调节轴突形成新的联系上起关键作用^[27]。转基因小鼠脑内GAP43过度持续表达,能引起正常范围之外的中枢神经系统轴突末端自发性的出芽反应^[27]。在神经元发育和神经再生过程中,GAP43在神经组织内大量合成,并在生长锥、轴突及突触前末梢大量表达。该蛋白可通过加速生长锥基部膜的扩展而促进轴突生长,调节生长锥及突触形态,参与神经元损伤后轴突再生和突触重建过程,被认为是神经元发育和再生的一个内在决定因子,可作为神经元损伤后再生的标志^[28]。

本研究中洗心汤方源自清代名医陈士铎的《辨证录》,正如陈氏所言“正虚必然生痰,不祛痰则正气难补,补正气而因之祛邪,是消痰仍是补正也。”《辨证录》指出:“人有一时而成果病者,全不起于忧郁,其状

悉与呆病无异,人以为有祟凭之也,谁知是起居失节,胃气伤而痰迷之乎^[29]。故本研究采用洗心汤方补气生精,豁痰开窍。其中半夏、陈皮理气化痰,石菖蒲豁痰开窍,酸枣仁、茯神宁心安神,少量附子以温通阳气,神曲以消食健胃。然而痰浊之生,必与正气不足有关,故更用人参以补气,甘草以助之,并和诸药,方中化痰与扶正之品并用,正所谓“邪见正气之旺,安得不消灭于无踪哉。”

本研究 Morris 水迷宫实验结果表明,各组小鼠找到并爬上平台的逃避潜伏期都呈下降趋势。模型组较空白对照组明显延长,说明APP/PS1双转基因小鼠学习记忆功能受损。洗心汤组较模型组逃避潜伏期下降,其在目的象限游泳距离及穿越平台的次数占总路程与总穿越平台次数的百分比增加,提示洗心汤对模型小鼠的学习记忆功能损伤具有明显的改善作用。本研究电镜观察可见,洗心汤组神经元细胞密集,细胞核多为圆形,核内染色质轻度凝集,核仁可见;细胞质内线粒体轻度肿胀,粗面内质网轻度扩张,游离核糖体丰富,脂褐素颗粒少见,突触结构基本清晰。说明经过洗心汤治疗,APP/PS1双转基因小鼠结构及细胞器损伤明显减轻。

PSD95、NMDAR2B、MBP及GAP43是与突触功能及受体表达密切相关的蛋白,本实验将这4项指标检测作为评价小鼠突触结构功能受损程度的评价指标。免疫荧光结果表明,PSD95、NMDAR2B、MBP及GAP43蛋白在小鼠海马区均有表达,与模型组比较,洗心汤组表达量明显增加。免疫印迹法进一步检测发现,与模型组比较,洗心汤组PSD95、NMDAR2B、MBP及GAP43蛋白表达亦增高,这与小鼠行为学检测结果一致。说明洗心汤改善APP/PS1转基因模型小鼠学习记忆能力的机制可能与其提高PSD95、NMDAR2B、MBP及GAP43在小鼠海马组织中表达有关。当然,本实验研究结果仍属初步探索,关于洗心汤方改善学习记忆能力,防治AD的深层次作用机制,值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王清峰,张丹,李柱.健脾化痰法治疗老年性痴呆痰浊阻窍证的疗效及机制研究[J].中医临床研究,2013,5(2):12-13.
- [2] 王德学.洗心汤治疗阿尔茨海默病36例疗效观察[J].中国民间疗法,2016,24(2):46-47.
- [3] Yao ZG, Zhang L, Liang L, et al. The effect of PN-1, a traditional Chinese prescription, on the learning and memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. Evid-Based Complement

- Alternat Med, 2013, 2(17): 2-12.
- [4] Neumeister KL, Riepe MW. Bupropion and Citalopram in the APP23 mouse model of Alzheimer's disease: A study in a dry-land maze [J]. Int J Alzheimer's Dis, 2012: 673584.
- [5] 颜培培, 赵晓娟, 王铜浩. APP/PS1 转基因小鼠的甲状腺功能变化[J]. 中国医科大学学报, 2011, 40(8): 703-705.
- [6] 毛敬洁, 李钻芳, 林如辉, 等. APP/PS1 双转基因阿尔海默病小鼠的繁殖及基因型鉴定[J]. 实用中西医结合临床, 2015, 15(10): 4-6.
- [7] 邱云平. 肿瘤多药耐药逆转剂—磷酸咯萘啶口服新剂型的研究[D]. 天津: 天津大学, 2005.
- [8] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat [J]. Neurosci Methods, 1984, 11(1): 47-60.
- [9] Ying W. Deleterious network: a testable pathogenetic concept of Alzheimer's disease [J]. Gerontology, 1997, 43(4): 242-253.
- [10] Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Casoli T, et al. Morphological adaptive response of the synaptic junctional zones in the human dentate gyrus during aging and Alzheimer's disease [J]. Brain Res, 1990, 517(1-2): 69-75.
- [11] Cao Y, Xiao Y, Ravid R, et al. Changed clathrin regulatory proteins in the brains of Alzheimer's disease patients and animal models [J]. Alzheimer's Dis, 2010, 22(1): 329-342.
- [12] Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, et al. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer's disease [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1997, 56(8): 933-944.
- [13] Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, et al. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein [J]. Nature, 1998, 396(6710): 433-439.
- [14] Sheng M, Kim E. The shank family of scaffold proteins [J]. J Cell Sci, 2000, 113(Pt 11): 1851-1856.
- [15] 侯筱宇, 张光毅. NMDA 受体信号复合体中蛋白质的相互作用[J]. 生命科学, 2003, 15(5): 274-278.
- [16] Bozso Z, Penke B, Simon D, et al. Controlled in situ preparation of A beta(1-42) oligomers from the isopeptide "iso-A beta(1-42)", physicochemical and biological characterization [J]. Peptides, 2010, 31(2): 248-256.
- [17] Cullen WK, Suh YH, Anwyl R, et al. Block of LTP in rat hippocampus *in vivo* by beta-amyloid precursor protein fragments [J]. Neuroreport, 1997, 8(15): 3213-3217.
- [18] Kim JH, Anwyl R, Suh YH, et al. Use-dependent effects of amyloidogenic fragments of beta-amyloid precursor protein on synaptic plasticity in rat hippocampus *in vivo* [J]. J Neurosci, 2001, 21(4): 1327-1333.
- [19] Fukunaga K, Muller D, Ohmitsu M, et al. Decreased protein phosphatase 2A activity in hippocampal long-term potentiation [J]. J Neurochemistry, 2000, 74(2): 807-817.
- [20] Frankland PW, O'Brien C, Ohno M, et al. Alpha-CaMK II dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory [J]. Nature, 2001, 411(6835): 309-313.
- [21] Wang D, Jacobs SA, Tsien JZ. Targeting the NMDA receptor subunit NR2B for treating or preventing age-related memory decline [J]. Expert Opin Ther Targets, 2014, 18(10): 1121-1130.
- [22] 江汉秋, 张晓君, 刘瑾. N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B 基因 (GRIN2B) 启动子区多态性与散发性阿尔茨海默病的相关性分析 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(1): 1-4.
- [23] Peters C, Sepúlveda FJ, Fernández-Pérez EJ, et al. The level of NMDA receptor in the membrane modulates amyloid- β association and perforation [J]. Alzheimer's Dis, 2016, 53(1): 197-207.
- [24] Horres CR, Hannun YA. The roles of neutral sphingomyelinases in neurological pathologies [J]. Neurochem Res, 2012, 37(6): 1137-1149.
- [25] Stapulionis R, Oliveira CL, Gjelstrup MC, et al. Structural insight into the function of myelin basic protein as a ligand for integrin α 5 β 2 [J]. Immunology, 2008, 180(6): 3946-3956.
- [26] Liao MC, Ahmed M, Smith SO, et al. Degradation of amyloid beta protein by purified myelin basic protein [J]. J Biol Chem, 2009, 284(42): 28917-28925.
- [27] Aigner L, Arber S, Kapfhammer JP, et al. Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice [J]. Cell, 1995, 83(2): 269-278.
- [28] 苑振云, 姜向明, 王铭维, 等. 自愿运动对快速老化小鼠学习记忆能力和海马生长相关蛋白 43 的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(1): 48-52.
- [29] 清·陈士铎. 王水谦等点校. 辨证录 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 242-243.

(收稿: 2017-05-17 在线: 2017-11-27)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶