

· 基础研究 ·

涤痰汤及其拆方对阿尔茨海默病大鼠
神经保护作用的研究尹漾阳^{1,2} 王 平²

摘要 **目的** 观察涤痰汤及其拆方对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型大鼠的神经保护作用。**方法** 通过对 SD 大鼠海马注射 $A\beta_{1-42}$ 复制 AD 大鼠模型。84 只动物随机分为对照组、模型组、涤痰汤全方组、涤痰汤拆方 1 组(半夏+姜南星)、涤痰汤拆方 2 组(橘红+石菖蒲)、涤痰汤拆方 3 组(人参+茯苓+甘草)、涤痰汤拆方 4 组(枳实+竹茹), 每组 12 只。灌胃 4 周后利用 Morris 水迷宫、Bielschowsky's 银染、Western Blot、ELISA 分别检测各组大鼠空间学习记忆能力、海马神经原纤维缠结情况、 β 淀粉样前体蛋白(APP)磷酸化水平和 β -淀粉样蛋白($A\beta$)含量的变化。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠空间学习记忆能力明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), 神经原纤维缠结明显增多($P < 0.01$), APP 蛋白 Thr668 位点的磷酸化水平明显增加($P < 0.01$), 海马 $A\beta_{1-42}$ 的生成明显增加($P < 0.01$)。与模型组比较, 涤痰汤全方组及各拆方组模型鼠空间学习记忆障碍均改善($P < 0.05$, $P < 0.01$), 模型鼠海马的神经原纤维缠结减轻, APP 蛋白 Thr668 位点的磷酸化水平下调($P < 0.05$, $P < 0.01$), 海马 $A\beta_{1-42}$ 的生成减少($P < 0.01$)。**结论** 涤痰汤全方组和拆方组能减轻 AD 模型鼠脑神经病理学改变、减少 $A\beta$ 的生成, 从而发挥神经保护作用。

关键词 涤痰汤; 拆方; 阿尔茨海默病; 神经原纤维缠结; β 淀粉样蛋白

Neuroprotection of Ditan Decoction and Its Decomposed Recipes on Alzheimer's Disease Rats

YIN Yang-yang^{1,2} and WANG Ping² 1 Faculty of Pathology, School of Basic Medical Science, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan (430065); 2 Institute of Gerontology, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan (430065)

ABSTRACT **Objective** To observe the neuroprotective effects of Ditan Decoction (DTD) and its decomposed recipes on Alzheimer's disease (AD) model rats. **Methods** AD rat model was duplicated by injecting $A\beta_{1-42}$ into bilateral hippocampus of Sprague Dawley rats. The rats were treated with DTD and each decomposed recipe by gastrogavage. Totally 84 rats were randomly divided into the control group, the model group, DTD group, DTD1 group 1 (*Pinellia Ternata* + *Rhizoma Arisaematis*), DTD2 group (*Exocarpium Citri Rubrum* + *Acorus Tatarinowii*), and DTD3 group (*Ginseng* + *poria* + *licorice*), DTD4 group (immature bitter orange + bamboo shavings), 12 in each group. Morris water maze, Bielschowsky's silver staining, Western Blot, and ELISA were used to detect the spatial learning and memory abilities, the changes of neurofibrillary tangles, β -amyloid precursor protein (APP) phosphorylation levels, and β -amyloid ($A\beta$) levels in each group after 4 weeks gastric administration. **Results** Compared with the control group, the spatial learning and memory abilities of the model group were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the neurofibrillary tangles were significantly increased ($P < 0.01$), the phosphorylation of APP protein at Thr668 was significantly increased ($P < 0.01$), and the production of hippocampal $A\beta_{1-42}$ were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the spatial learning and memory impairment of model rats were alleviated ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the neurofibrillary tangles in the

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81703965); 湖北省自然科学基金资助项目(No. 2017CFB185)

作者单位: 1. 湖北中医药大学基础医学院病理学教研室(武汉 430065); 2. 湖北中医药大学老年医学研究所(武汉 430065)

通讯作者: 王 平, Tel: 027-68890008, E-mail: pwang54@aliyun.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190809.308

hippocampus were attenuated, the phosphorylation level of APP at Thr668 were down-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the production of $A\beta_{1-42}$ were reduced ($P < 0.01$) in all DTD groups. Conclusion Neuropathological changes were attenuated and the production of $A\beta_{1-42}$ reduced in AD model rats by all DTD groups, thus exerting neuroprotective effects.

KEYWORDS Ditan Decoction; decomposed recipe study; Alzheimer's disease; neurofibrillary tangle; β -amyloid

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种不可逆的进行性神经退行性疾病,是痴呆和认知障碍的主要原因。如果不进行干预,到 2050 年全世界将有超过 8 000 万人患上 AD^[1]。AD 重要的神经病理学改变是包含 β 淀粉样蛋白(β -amyloid, $A\beta$)的老年斑在细胞外积聚和神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)^[2]。研究表明 β 淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein, APP)水解产生的 $A\beta$ 在 AD 发病机制中起重要作用,并可能是导致 AD 患者早期认知缺陷的主要原因,其中 $A\beta_{1-42}$ 被认为与疾病密切相关^[3-5]。AD 属于中医学“呆病”范畴,痰浊阻窍为痴呆的主要证型。经典的中药复方涤痰汤出自《奇效良方》,具有化痰开窍之功效,由半夏、茯苓、姜南星、橘红、枳实、竹茹、人参、石菖蒲、甘草 9 味中药组成。前期研究结果发现:涤痰汤可逆转 AD 模型鼠学习记忆能力衰退而发挥治疗作用^[6,7]。为进一步探讨涤痰汤的作用机制,本实验以海马注射 $A\beta_{1-42}$ 复制 AD 大鼠模型,采用拆方研究方法,比较研究涤痰汤全方及不同拆方部分对脑内神经病理学改变及 $A\beta$ 生成的影响及差异。

材料与方法

1 动物 3 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重(250 ± 20)g,购于湖北省华中科技大学同济医学院动物研究中心,生产许可证号:SCXK(鄂)2015-0018,使用许可证号:SCXK(鄂)2012-0068。动物饲养在湖北中医药大学实验动物中心,环境温度为 19 ~ 23 ℃,相对湿度维持在(50 ± 5)%,保持正常的昼夜节律,标准饲料喂养,自由进食和进水,适应性喂养 1 周。本实验严格按照科技部[2006]398 号《关于善待实验动物的指导性意见》文件要求进行实验,经湖北中医药大学动物伦理委员会批准(No. HB1245D)。

2 药物 涤痰汤中各药量分别为半夏 7.5 g 茯苓 6 g 姜南星 7.5 g 橘红 4.5 g 枳实 6 g 竹茹 2 g 人参 3 g 石菖蒲 3 g 甘草 1.5 g(药材均由湖北中医药大学附属医院门诊部提供)。全方按传

统煎法,先煎 40 min,二煎 30 min,煎液过滤,两煎混合后加热浓缩至 70 mL,含生药量 0.59 g/mL,4 ℃ 保存备用。各拆方生药量同原方,拆方 1:半夏 7.5 g、姜南星 7.5 g;拆方 2:橘红 4.5 g、石菖蒲 3 g;拆方 3:人参 3 g、茯苓 6 g、甘草 1.5 g;拆方 4:枳实 6 g、竹茹 2 g,煎法相同,煎后均浓缩至 70 mL,与全方中各相应生药浓度相同,4 ℃ 保存备用。

3 主要试剂及仪器 $A\beta_{1-42}$ 购自美国 Sigma 公司(CAS No. 107761-42-2),APP 抗体购自美国 Proteintech 公司(Catalog:25524-1-ap),pT668-APP 抗体购自美国 Affinity Bioscience 公司(Catalog:AF3084)。 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ Elisa 试剂盒购自 Bio-swamp 公司(批号:HM10851, HM10164)。大鼠脑立体定位仪购自日本 Narishige 公司, Morris 水迷宫自动实验记录仪购自成都泰盟科技有限公司,蛋白电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司,Odyssey 红外成像系统购自美国 LI-COR BioSciences 公司,多功能酶标仪(SpectraMAX M5 型)购自美国 Molecular Devices 公司,光学显微镜购自日本 Olympus 公司。

4 造模及干预方法

4.1 AD 模型的建立 大鼠麻醉后固定于大鼠脑立体定位仪上,暴露枕骨,在前囟向后 3.5 mm、旁开 3.5 mm 处钻一个洞,用微量注射器进针 3.2 mm,缓慢(0.2 μ L/min)注入 DMSO 或 $A\beta_{1-42}$,注入完毕后留针 10 min 再缓慢退针,用先锋霉素预防感染,缝合皮肤。24 h 后,给予双蒸水或中药煎剂灌胃。

4.2 动物分组及处理 84 只动物随机分为 7 组,即对照组、模型组、涤痰汤全方组(涤痰汤组)、涤痰汤拆方 1 组(拆方 1 组)、涤痰汤拆方 2 组(拆方 2 组)、涤痰汤拆方 3 组(拆方 3 组)和涤痰汤拆方 4 组(拆方 4 组),每组 12 只。对照组海马定位注射 2 μ L 10%的 DMSO,继而生理盐水 1 mL/100 g 灌胃;模型组海马定位注射 2 μ L $A\beta_{1-42}$ (5 μ g/ μ L),继而生理盐水 1 mL/100 g 灌胃;全方组海马定位注射 2 μ L $A\beta_{1-42}$,继而涤痰汤煎剂 1 mL/100 g 灌胃;拆方 1 组海马定位注射 2 μ L $A\beta_{1-42}$ 继而拆方 1 组煎剂 1 mL/100 g 灌胃;拆方 2 组海马定位注射 2 μ L $A\beta_{1-42}$,继

而拆方 2 组煎剂 1 mL/100 g 灌胃;拆方 3 组海马定位注射 2 μ L $A\beta_{1-42}$,继而拆方 3 组煎剂 1 mL/100 g 灌胃;拆方 4 组继而涤痰汤煎剂海马定位注射 2 μ L $A\beta_{1-42}$,继而拆方 4 组煎剂 1 mL/100 g 灌胃。每组均灌胃 4 周。

5 检测指标及方法

5.1 Morris 水迷宫检测大鼠空间学习和记忆能力 大鼠灌胃 4 周后,进行空间学习记忆能力训练及检测。每天 14:00–20:00 训练大鼠的空间学习能力连续 6 天。训练方法:训练前 2 h,将大鼠带到水迷宫检测室熟悉环境。将大鼠分别放到水迷宫的 4 个象限中,记录大鼠找到隐藏平台的时间(潜伏期),若 60 s 仍未找到平台,则将其引导至平台,每个象限训练间隔 15 min。第 7 天,撤去平台,任选一相同入水点将大鼠放入水中,检测大鼠 60 s 内第 1 次抵达原平台所用时间。

5.2 Bielschowsky's 银染观察脑内 NFTs 情况 用识别 β -片层结构的 Bielschowsky's 银染法来观察脑内 NFTs 情况,方法如下:水迷宫检测结束后,大鼠处死,断头取脑,制作成 5 μ m 石蜡切片,置于 24 孔板中,双蒸水漂洗 3 $\times$ 5 min,加入 200 μ L/孔的 2% 硝酸银水溶液,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min,双蒸水漂洗 3 $\times$ 5 min,10% 甲醛水溶液还原 5 min,至切片微黄,双蒸水漂洗 3 $\times$ 5 min。加入 200 μ L/孔氨银乙醇液(20% 硝酸银水溶液取 30 mL 加入 20 mL 无水乙醇,混合,加氨水,出现沉淀后,继续缓慢加氨水,直至液体澄清,过滤 3 次,常温避光保存)孵育 5 min。再加入 8% 甲醛水溶液浸泡,至颜色不再加深,双蒸水漂洗 3 $\times$ 5 min。脱水及透明、封片,显微镜下观察及拍照。

5.3 Western Blot 检测大鼠海马总 APP 和磷酸化 APP 表达 由于 APP 第 668 位的苏氨酸残基的磷酸化(pT668-APP)会造成 $A\beta$ 产生增加,用 Western Blot 检测大鼠海马总 APP 和磷酸化 APP 的表达情况,大鼠海马 4 $^{\circ}$ C 匀浆,提取蛋白用于 Western Blot 检测。等量的蛋白质在 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,并转移至硝酸纤维素(NC)膜。NC 膜用 5% 脱脂牛奶-TBST 封闭 1 h,继而用一抗 APP 抗体或 pT668-APP 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。最后用抗-兔或抗-鼠的二抗 15~25 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,用 Odyssey 红外成像系统显像。

5.4 ELISA 检测大鼠海马 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 含量 大鼠海马加入 PBS(0.1 mol/L, pH = 7.4)匀浆后 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液进行 $A\beta_{1-42}$ 含

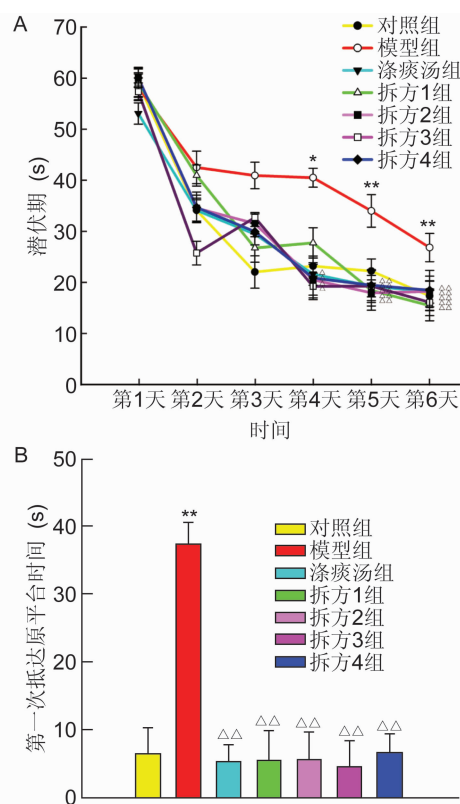
量的测定,测定方法按照试剂盒说明书操作。

6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠 Morris 水迷宫检测结果比较(图 1)

水迷宫检测第 4~6 天,与对照组比较,模型组潜伏期明显延长($P < 0.05$, $P < 0.01$),与模型组比较,涤痰汤组和各拆方组潜伏期均减少($P < 0.05$, $P < 0.01$);水迷宫检测第 7 天,与对照组比较,模型组大鼠第 1 次抵达原平台时间明显延长($P < 0.01$);与模型组比较,涤痰汤组和各拆方组大鼠第 1 次抵达原平台时间明显缩短($P < 0.01$)。



注:A 为 Morris 水迷宫实验第 1~6 天潜伏期比较;B 为第 7 天第 1 次抵达原平台时间比较;与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图 1 各组大鼠 Morris 水迷宫检测结果比较

2 各组大鼠海马 NFTs 比较(图 2) 对照组海马神经元排列整齐、密集,模型组大鼠海马神经元胞浆及纤维染色明显较深,可见拖尾形状轴突,形成 NFTs,而涤痰汤组及各拆方组 NFTs 明显减轻,少见拖尾形状轴突。

3 各组大鼠海马 APP 的磷酸化水平比较(图 3)

与对照组比较,模型组海马磷酸化 APP (pT668-APP) 的相对灰度值(磷酸化的 APP/总的 APP)明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,涤痰汤组及各拆方组 pT668-APP 的相对灰度值均下降,差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

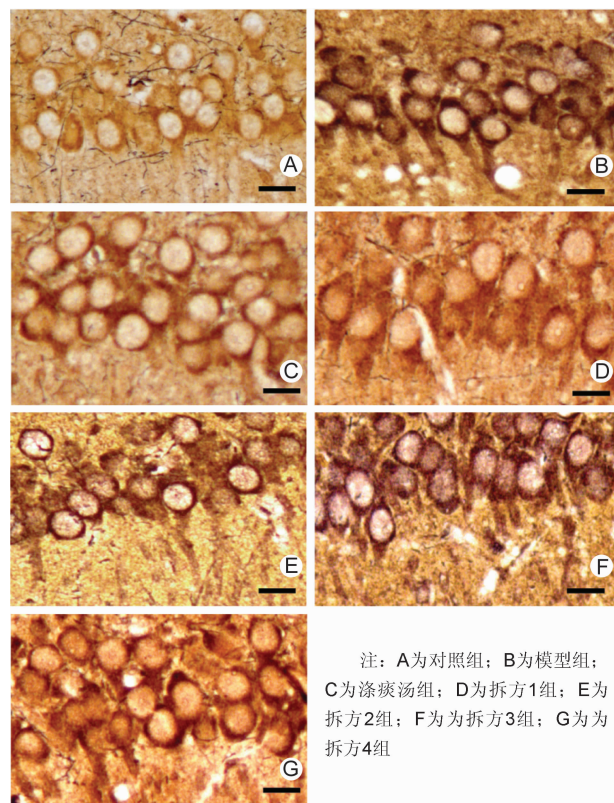
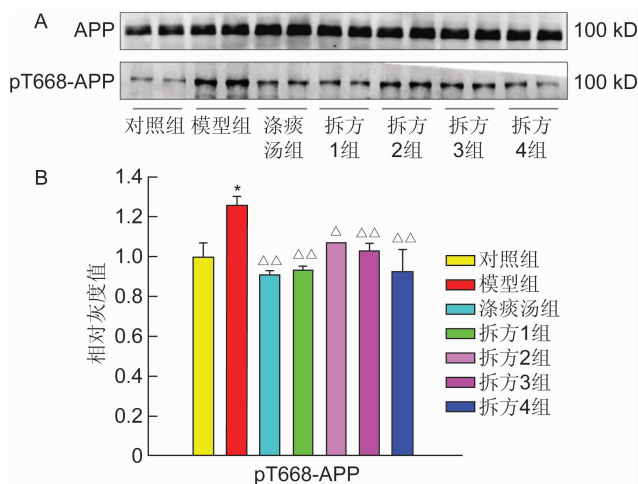


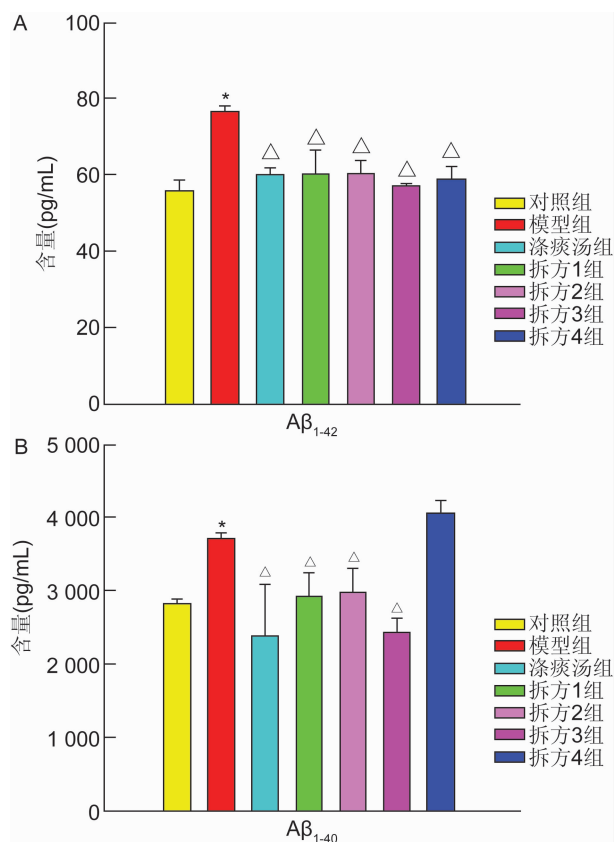
图2 各组大鼠海马 CA1 区 NFTs 比较
(Bielschowsky's 银染法 $\times 400$, bar = 50 μm)



注: A 为 APP、pT668-APP 蛋白表达电泳图; B 为 pT668-APP 蛋白的相对灰度值比较;与对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

图3 各组大鼠海马 APP 和 pT668-APP 蛋白表达比较

4 各组大鼠海马 $\text{A}\beta_{1-42}$ 和 $\text{A}\beta_{1-40}$ 含量比较(图4) 与对照组比较,模型组海马 $\text{A}\beta_{1-42}$ 和 $\text{A}\beta_{1-40}$ 含量明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,涤痰汤组及各拆方组 $\text{A}\beta_{1-42}$ 含量明显下降,涤痰汤组及拆方1组、拆方2组、拆方3组 $\text{A}\beta_{1-40}$ 含量降低($P < 0.01$),而拆方4组 $\text{A}\beta_{1-40}$ 含量无明显改变($P > 0.05$)。



注: A 为海马 $\text{A}\beta_{1-42}$ 含量比较; B 为海马 $\text{A}\beta_{1-40}$ 含量比较;与对照组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

图4 各组大鼠海马 $\text{A}\beta_{1-42}$ 和 $\text{A}\beta_{1-40}$ 含量比较

讨 论

AD 的发生与痰息息相关。老年人由于机体的老化,脏腑功能失调,气化不足,代谢失常,以致水湿停聚,痰浊内生。痰浊停留体内,一则内蒙心窍使神失用,精神错乱,如痴如呆;二则阻遏清阳,使脑髓失养,心神失主,发为痴呆^[8]。涤痰汤可涤痰开窍、醒神定志,临床上常用于治疗呆病^[9,10]。本实验对涤痰汤进行拆方研究:采用半夏、姜南星配伍可治风痰留滞经络;橘红、石菖蒲配伍可化痰开窍;人参、茯苓、甘草配伍可补脾益气;枳实、竹茹配伍可清热化痰。

在 AD 中, NFTs 的出现与痴呆的临床表现密切相

关^[11-12]。NFTs 是由细胞内的双螺旋细丝组成,首先出现在患者内嗅皮质,然后是海马,最后是新皮质^[13],在大脑中的扩散与 AD 的认知状态高度相关^[14]。本研究发现:涤痰汤组及各拆方组均能减少海马 NFTs 的形成,这也与前期研究发现涤痰汤可减轻 AD 模型鼠学习记忆能力衰退的结果一致^[6,7]。

APP 是一种跨膜蛋白,于 1987 年被发现,是 A β 的唯一来源^[15]。研究表明 APP 的成熟及其被分泌酶靶向水解均需要 APP Thr668 磷酸化^[16,17],pAPPThr668 快速顺行轴突运输到神经末梢,继而可被 β -和 α -分泌酶水解,导致 A β 释放增加^[18]。本研究发现:涤痰汤全方组及各拆方组都能降低 APP Thr668 位点的磷酸化,这将阻止突触末端的 A β 生成,从而减少脑内 A β 的水平。

A β 的生成来源于 β -分泌酶对 APP 的水解,通过该途径主要可以形成两种 A β ,A β_{1-42} 和 A β_{1-40} 。数量较多的是 A β_{1-40} ,然而,沉积在老年斑中的主要是 A β_{1-42} 。A β_{1-42} 可引起突触的退化和神经元的丧失,具有神经毒性作用^[19]。本研究发现:涤痰汤全方组及各拆方组均可降低模型鼠海马 A β_{1-42} 含量;除拆方 4 组外,其余组可降低 A β_{1-40} 含量。

本研究结果发现,涤痰汤全方组和拆方组均能减轻 AD 模型鼠脑神经原纤维缠结、减少脑内 A β 的生成,从而改善模型鼠空间学习记忆障碍,发挥神经保护作用。本实验通过拆方研究对涤痰汤处方进行精简,为进一步对拆方后的新方进行药效学的研究打下基础,以期研制出处方更加精练、效果更加显著、符合现代中药特色的抗痴呆药物。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Prince M, Bryce R, Albanese E, et al. The global prevalence of dementia: a systematic review and meta-analysis[J]. *Alzheimer's Dement*, 2013, 9(1): 63-75.
- [2] Dubois B, Hampel H, Feldman HH, et al. Preclinical Alzheimer's disease: definition, natural history, and diagnostic criteria[J]. *Alzheimer's Dement*, 2016, 12(3): 292-323.
- [3] Jack CR Jr, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA research framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease[J]. *Alzheimer's Dement*, 2018, 14(4): 535-562.
- [4] Pensalfini A, Albay R, Rasool S, et al. Intracellular amyloid and the neuronal origin of Alzheimer neuritic plaques[J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 71: 53-61.
- [5] Walsh DM, Selkoe DJ. A beta oligomers—a decade of discovery[J]. *J Neurochem*, 2007, 101(5): 1172-1184.
- [6] 刘玲,李艳,姜幼明,等.涤痰汤对阿尔茨海默病模型大鼠行为学影响的实验研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2010, 19(25): 3154-3158.
- [7] 刘玲,董欢,姜幼明,等.涤痰汤对小鼠学习记忆功能障碍的影响[J]. *光明中医*, 2010, 25(8): 1364-1367.
- [8] 王平,张六通,邱幸凡.老年痴呆发病机制探讨[J]. *陕西中医*, 2001, 22(8): 479-481.
- [9] 吕耀成.加味涤痰汤联合多奈哌齐治疗血管性痴呆痰浊蒙窍证对认知功能及日常生活能力的影响[J]. *实用中医药杂志*, 2019, 35(2): 175-176.
- [10] 王彦华,路永坤,张燕平,等.涤痰汤加减治疗中青年急性缺血性脑卒中合并 OSAHS 痰瘀互结证的疗效观察[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(15): 204-209.
- [11] Alafuzoff I, Iqbal K, Friden H, et al. Histopathological criteria for progressive dementia disorders: clinical-pathological correlation and classification by multivariate data analysis[J]. *Acta Neuropathol*, 1987, 74(3): 209-225.
- [12] Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, et al. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease[J]. *Neurology*, 1992, 42(3 Pt 1): 631-639.
- [13] Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes[J]. *Acta Neuropathol*, 1991, 82(4): 239-259.
- [14] Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussière T, et al. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease[J]. *Neurology*, 2003, 60(9): 1495-1500.
- [15] Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor[J]. *Nature*, 1987, 325(6106): 733-736.
- [16] da Cruz e Silva EF, da Cruz e Silva OA. Protein phosphorylation and APP metabolism[J]. *Neurochem Res*, 2003, 28(10): 1553-1561.
- [17] Lee MS, Kao SC, Lemere CA, et al. APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation[J]. *J Cell Biol*, 2003, 163(1): 83-95.
- [18] Iijima K, Ando K, Takeda S, et al. Neuron-specific phosphorylation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein by cyclin-dependent kinase 5[J]. *J Neurochem*, 2000, 75(3): 1085-1091.
- [19] Kuhlmann J, Andreasson U, Pannee J, et al. CSF A β_{1-42} —an excellent but complicated Alzheimer's biomarker—a route to standardization[J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 467: 27-33.

(收稿: 2019-02-11 在线: 2019-11-04)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶