

· 基础研究 ·

头顶一颗珠对衰老大鼠认知及
海马 BDNF、TrkB 的影响王子礼^{1*} 陈显兵^{1,2} 王凤杰^{1,2} 覃晓莉² 唐鲜娥² 赵方毓²

摘要 目的 探讨头顶一颗珠提取物(TTM)对衰老大鼠认知能力及海马组织中脑源性神经营养因子(BDNF)和酪氨酸激酶 B(TrkB)表达的影响。方法 将雄性 SD 大鼠 30 只随机分为 3 组:对照组、模型组、TTM 组,每组 10 只。模型和 TTM 组皮下注射 100 mg/kg D-半乳糖,对照组注射等量生理盐水;同时,TTM 组用 100 mg/kg TTM 灌胃,对照组和模型组灌胃等量生理盐水,每日 1 次,连续给药 6 周。Morris 水迷宫训练并测试大鼠认知能力,取大鼠海马组织测超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量,HE 染色观察形态学改变,免疫荧光染色检测神经元损伤,Western Blot 检测海马组织内 BDNF 和 TrkB 蛋白表达。结果 与对照组比较,模型组大鼠认知功能下降,海马组织内 SOD 活性下降($P<0.01$),MDA 含量升高($P<0.01$),8-OHdG 阳性表达增多,BDNF、TrkB 及 p-TrkB 蛋白水平均降低($P<0.01$)。与模型组比较,TTM 干预后大鼠认知功能改善,海马组织内 SOD 活性增加($P<0.05$),MDA 含量降低($P<0.01$),BDNF、TrkB 及 p-TrkB 水平均提高($P<0.01$, $P<0.05$)。结论 TTM 可改善衰老大鼠认知功能障碍,可能与提高海马组织内 BDNF 和 TrkB 表达、增强抗氧化能力有关。

关键词 头顶一颗珠;衰老;脑源性神经营养因子;酪氨酸激酶受体 B;氧化应激

Effect of Extracts from *Trilliumtschonoskii Maxim* on Cognitive Ability and Expression of BDNF and TrkB in Hippocampus of Rats with Aging WANG Zi-li¹, CHEN Xian-bing^{1,2}, WANG Feng-jie^{1,2}, QIN Xiao-li², TANG Xian-e², and ZHAO Fang-yu² 1 Pathology Department, Minda Hospital of Hubei Minzu University, Hubei (445000); 2 Department of Pathology, Medical School, Hubei Minzu University, Hubei (445000)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of extracts from *Trilliumtschonoskii Maxim* (TTM) on the cognitive ability of rats with aging and the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase receptor BC (TrkB) in hippocampus. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into three groups, i.e., the control group, the model group and the TTM group, with 10 rats in each group. Rats in the model group and TTM group were administrated with 100 mg/kg of D-galactose (D-gal) subcutaneously in the neck and back every day, and with the equal amount of normal saline (NS) in the control group. Rats in the TTM group were administered intragastrically with 100 mg/kg of TTM once a day, while the control group and the model group received equal volume of normal saline for 6 weeks. The cognitive ability of rats was tested by Morris water maze. Morphological changes of hippocampus were detected by HE staining. The DNA damage in hippocampus was evaluated using immunofluorescence staining. The malondialdehyde (MDA) content in hippocampus was determined by Thiobarbituric acid method and superoxide dismutase (SOD) activity using xanthine oxidase method. The expression of BDNF and TrkB was tested by Western Blot analysis. **Results** Compared with the control group, the ability of learning and memory impaired, the SOD activity decreased ($P<0.01$) and MDA content increased ($P<0.01$), the posi-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81660672)

作者单位:1. 湖北民族大学附属民大医院病理科(湖北 445000); 2. 湖北民族大学医学部病理学教研室(湖北 445000)

通讯作者:王凤杰, Tel: 0718-8301032; E-mail: 350805@hbmj.edu.cn

作者现在河南省平顶山市中医院重症医学科(河南 467000)

DOI: 10. 7661/j. cjm. 20200903. 028

tive expression of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) elevated, and the levels of BDNF, TrkB and p-TrkB in hippocampus tissues in the model group significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the cognitive ability improved in the TTM group, SOD activity increased ($P < 0.05$), and MDA content decreased ($P < 0.01$). Moreover, the levels of BDNF, TrkB and p-TrkB in the TTM group significantly elevated ($P < 0.01$, $P < 0.05$) compared with those in the model group. **Conclusion** TTM could significantly improve the learning and memory dysfunction of rats with aging caused by D-gal, which might be related to the increase of the expression of BDNF and TrkB proteins in the hippocampus and the enhancement of antioxidative ability.

KEYWORDS *Trilliumtschonoskii Maxim*; aging; brain-derived neurotrophic factor; tyrosine kinase receptor B; oxidative stress

衰老是机体各组织器官功能逐渐退化的过程,当今人口老龄化严重,因而衰老已成为社会问题^[1]。脑衰老致认知记忆能力减退是衰老患者的早期症状之一,而海马结构和功能的改变与学习记忆障碍密切相关,且出现早、病变严重^[2],已成为现代医学的研究热点。脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 是重要的营养因子,可特异性结合其受体酪氨酸激酶 B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 发挥生物学效应,如促神经细胞分化、调节突触可塑性等^[3],尤其是在海马神经元的老龄性改变中发挥重要作用,其表达异常与学习认知功能障碍相关,因而成为神经退行性疾病研究的重要指标^[3]。

头顶一颗珠又称为延龄草 (*Trilliumtschonoskii Maxim*, TTM), 主要含有甾体皂苷、黄酮、苯丙素、多糖等成分^[4,5], 是湖北省恩施州土家族地区“四大神药”之一,其味甘、性平,有小毒,民间应用疗效明确,是传统名贵中草药。目前已有越来越多研究发现中药抗衰老方面有明显疗效;前期研究发现 TTM 有抗衰老^[6]、抗氧化^[7]等功效,但其作用机制尚不明确。本研究采用 D-半乳糖诱导大鼠衰老模型,观察 TTM 对大鼠认知功能及海马组织内 BDNF 及 TrkB 蛋白表达的影响,深入探讨其作用机制,为其临床开发利用提供可靠的实验依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,6~7 周龄,体质量 200~250 g,由湖北省实验动物中心提供,许可证号:SCXK (鄂) 2015-0018。实验动物饲养环境温度 20~23℃,相对湿度 (50±5)%,自然交替给予照明 (12 h/12 h),饲喂标准饲料,自由进食饮水,适应性喂养 7 天。本实验由湖北民族大学伦理委员会审查通过 [No. (2016) 012]。

2 药物、试剂及仪器 药材采自恩施本地,由湖

北民族大学中医药实验室鉴定为 TTM。清洁药材后,用 65℃ 恒温干燥箱干燥、粉碎,75% 酒精浸泡过夜后萃取,过滤提取物并浓缩干燥,得到延龄草提取物;加双蒸水至提取物完全溶解,再采用水饱和的正丁醇萃取,减压浓缩干燥,检测提取物中总皂苷含量为 12.41 mg/g 生药。

D-半乳糖购自美国 Sigma 试剂公司,批号:G5388;β-actin (批号:AF0003) 及 p-TrkB (Tyr817,批号:AF1963) 抗体购自上海 Beyotime 公司;8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG,批号:ab48508)、BDNF (批号:ab226843) 及 TrkB (批号:ab33655) 抗体购自美国 Abcam 公司;超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD,批号:A001-3-2)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA,批号:A003-1-2) 试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

Morris 水迷宫记录仪购自中国医学科学院药物研究所;电泳仪全套购自美国 Bio-Rad 公司;荧光显微镜 (Eclipse 80i) 购自日本 Nikon 公司;全自动化学发光图像分析系统 (Tanon 5200) 购自上海天能科技公司。

3 动物分组、造模及干预方法 实验动物采用随机数字表法平均分为 3 组:对照组、模型组、TTM 组,每组 10 只。模型及 TTM 组大鼠颈背部皮下注射 D-半乳糖 (D-gal, 100 mg/kg) 进行造模^[8],对照组注射等量生理盐水,每天 1 次;于造模当天开始,TTM 组大鼠按课题组实验用药量 (100 mg/kg TTM) 进行灌胃^[9],约相当于成人 (60 kg) 内服生药的最大剂量 (9 g/d);对照组及模型组灌胃等量生理盐水,每日 1 次,连续干预 6 周。

4 检测指标及方法

4.1 Morris 水迷宫 按文献方法 [10] 进行训练实验,从造模第 36 日开始进行连续 5 日的定位航行实验:圆形水池分为四个象限,在第三象限放置一个略低

于水平面 0.5~1 cm 的圆形逃生平台,将大鼠面向池壁分别沿其余象限边缘放下(设定时间 60 s),大鼠寻求逃离水的方法从而搜寻到平台,并记录所需时间(逃避潜伏期)。第 41 日大鼠休息,第 42 日进行空间探索实验:撤掉平台,拍摄大鼠 60 s 内的运动路线并记录穿越平台次数、计算平台象限逗留时间(t_3)与总时间($t_{总}$)的比值(%)。

4.2 组织灌注和取材 第 42 日探索实验结束后,每只大鼠给予 10% 水合氯醛 4 mL/kg 腹部注射进行麻醉处死。每组随机选择 5 只剪断头颅,立即取出新鲜海马组织并储存 -80 °C;余 5 只大鼠麻醉后打开胸腔,从心尖位置灌注 37 °C 生理盐水至肝脏变白或从右心耳流出无血色液体,换 4% 多聚甲醛溶液灌注 30 min。脑组织冠状面切块后置于 4% 多聚甲醛溶液浸泡 24 h,脱水石蜡包埋后切片 5 μ m。

4.3 SOD 活性和 MDA 含量测定 取海马组织,在冰浴条件下充分匀浆、离心,取上清。用硫代巴比妥酸法检测 MDA 含量,用黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 活性。实验严格参照试剂盒说明书进行操作。

4.4 HE 染色观察海马形态学改变 石蜡切片常规脱蜡后,HE 染色 15 min,双蒸水洗涤,盐酸酒精分化 5~10 s,双蒸水洗涤,碳酸锂中放置 3~5 min 后双蒸水洗涤,75% 酒精洗涤 1 min,伊红染色 15 s,双蒸水洗涤,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,晾干封片。

4.5 免疫荧光染色检测海马组织内 8-OHdG 的表达 常规脱蜡后,高压锅抗原修复 5 min,血清 37 °C 封闭 30 min,滴加 8-OHdG(1:200)4 °C 孵育过夜。加入 FITC 标记的山羊抗小鼠荧光二抗,避光 37 °C 放置 30 min;滴加 DAPI 染液 37 °C 避光放置 5 min;滴加抗淬灭封片剂后封片观察。8-OHdG 荧光染色可用于评价海马组织中 DNA 氧化性损伤的情况。

4.6 Western Blot 检测海马组织内 BDNF 和 TrkB 表达 海马组织称重后,按照每 1 mg 组织加入 9 μ L 组织裂解液、0.09 μ L 蛋白酶抑制剂、0.09 μ L 磷酸酶抑制剂的比例进行组织匀浆、超声,然后以 12 000 r/min 速度离心 15 min,取上清。根据 Beyotime BCA 蛋白浓度测定试剂盒的说明进行蛋白浓度定量检测。

制备 SDS-PAGE 凝胶(12% 分离胶,5% 浓缩胶),加入蛋白样品后电泳,电泳结束后根据预染 Marker 指示切取目标条带所在区域凝胶,转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 3 h(摇床摇动),TBST 清洗 3 次,每次 5 min,一抗(p-TrkB, 1:2 000;BDNF, 1:1 000;TrkB, 1:500)4 °C 过夜,TBST 清洗,二

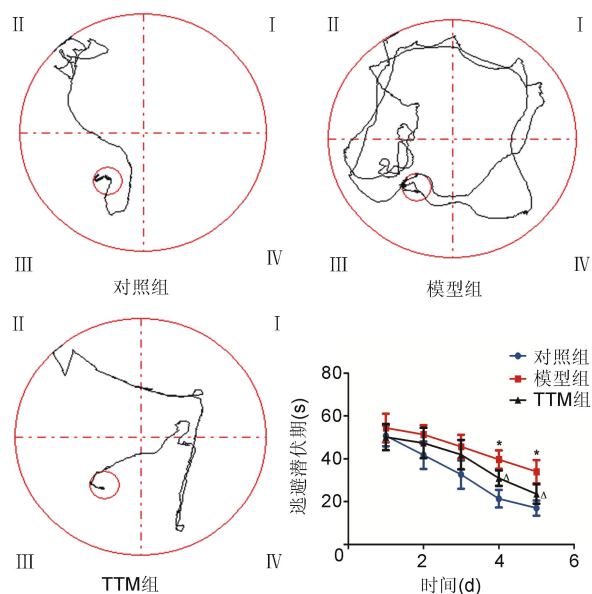
抗(1:5 000)室温孵育 3 h,TBST 清洗。滴加适量显影液,用 Tanon 5200 凝胶成像系统显影并统计分析目标条带相对灰度值。

5 统计学方法 运用 SPSS 22.0 进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析或 t 检验进行处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 Morris 水迷宫行为学检测结果(图 1,表 1)

各组大鼠逃避潜伏期随训练天数增加而逐渐缩短。与对照组比较,训练第 5 日时,模型组大鼠行动路线仍旧杂乱无章,逃避潜伏期时间明显延长($P < 0.01$);逗留平台象限时间(t_3)占总时间($t_{总}$)的比值减少($P < 0.01$),穿越平台次数减少($P < 0.01$)。与模型组比较,TTM 组大鼠表现出一定的目标趋向性,逃避潜伏期缩短($P < 0.05$);平台象限逗留时间占总时间的比值增加($P < 0.05$),穿越平台次数亦增加($P < 0.05$)。



注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

图 1 定位航行实验结果

表 1 各组空间探索实验结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	穿越平台次数	$t_3/t_{总}$ (%)
对照	10	9.5 $\pm$ 2.95	39.04 $\pm$ 10.15
模型	10	4.0 $\pm$ 1.15*	18.22 $\pm$ 7.31*
TTM	10	6.3 $\pm$ 2.00 Δ	25.35 $\pm$ 6.42 Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2 各组海马组织 SOD 活性和 MDA 含量比较(表 2) 与对照组比较,模型组大鼠海马组织内 SOD 活性降低($P < 0.01$),MDA 含量升高($P < 0.01$)。与

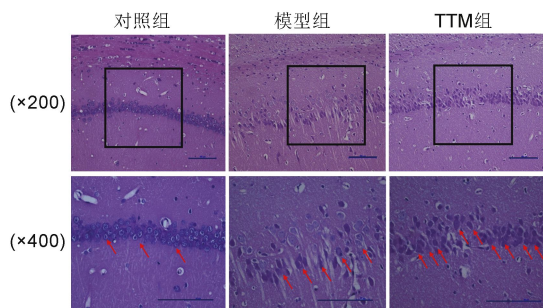
模型组比较,TTM 组大鼠海马中 SOD 活性升高 ($P < 0.05$),MDA 含量降低 ($P < 0.01$)。

3 各组大鼠海马组织形态学比较(图 2) 对照组海马内神经元数目较多、排列紧凑,胞浆丰富、胞核饱满;模型组内神经元稀疏、排列紊乱,细胞核丢失,可见细胞肿胀空泡化;TTM 组内神经细胞数量增多,细胞损伤性改变减轻。

表 2 各组海马组织 SOD 活性和 MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD (U/mg · prot)	MDA (nmol/mg · prot)
对照	10	122.58±6.85	1.66±0.40
模型	10	89.77±7.52 *	3.95±0.27 *
TTM	10	100.42±6.77 Δ	2.16±0.40 $\Delta\Delta$

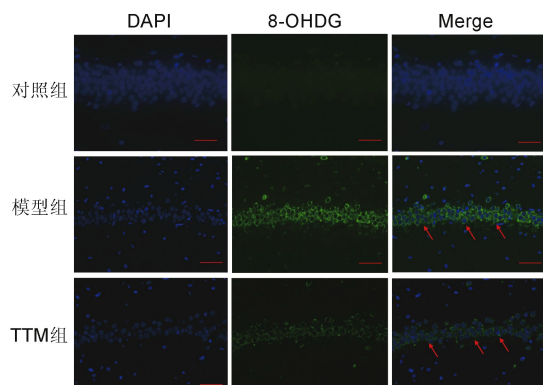
注:与对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$



注:红色箭头示神经元;比例尺 50 μm ;200 倍图中选取实线矩形框内部分放大即为下图 400 倍的图像

图 2 各组海马形态学比较 (HE)

4 各组大鼠海马内 8-OHdG 表达比较(图 3) 与对照组比较,模型组海马内 8-OHdG 阳性表达细胞数明显增多、荧光强度增加;而 TTM 干预可降低阳性细胞数及细胞内荧光表达强度。

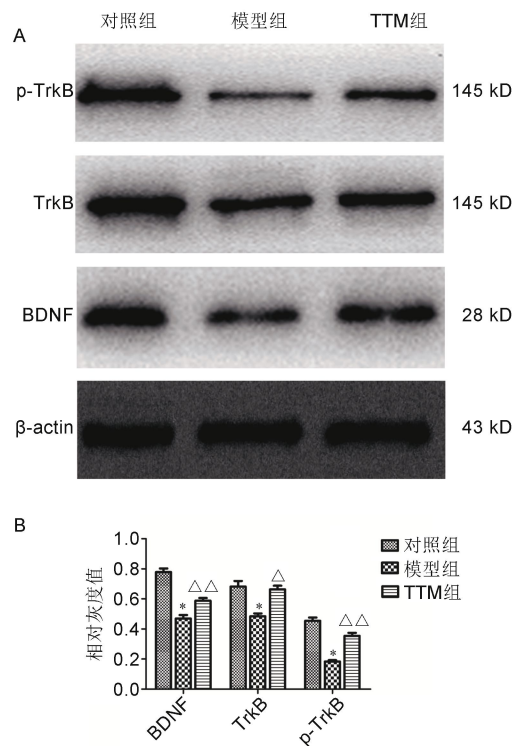


注:8-OHdG (绿色)和 DAPI (蓝色)分别用于标记 DNA 氧化性损伤和神经细胞核;红色箭头示阳性表达的神经元;比例尺 50 μm

图 3 各组大鼠海马内 8-OHdG 表达比较 (IF, $\times 200$)

5 各组大鼠海马组织内 BDNF 和 TrkB 表达比

较(图 4) 与对照组比较,模型组大鼠海马中 BDNF、TrkB 及 p-TrkB 蛋白含量均减少 ($P < 0.01$)。与模型组比较,TTM 组内 TrkB、BDNF 和 p-TrkB 蛋白表达均增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。



注:A 为蛋白条带图;B 为蛋白相对表达量统计图;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 4 各组大鼠海马组织内 BDNF 和 TrkB 表达比较

讨 论

随着社会老龄化加快,与大脑学习记忆功能减退相关的疾病研究越来越多,中药复方及有效成分在衰老预防与治疗方面已显示出明显优势。前期已发现 TTM 提取物具有抗氧化、抗衰老、清除自由基等功效^[6,7],其可通过提高组织内抗氧化酶活性发挥抗衰老作用^[11],亦可明显改善老年痴呆模型大鼠的学习记忆功能^[12]。然而,这些研究主要集中在 TTM 总提取物的药理活性作用方面,而发挥药效作用的活性成分研究较少。

衰老患者机体内自由基产生与清除机制失衡、抗氧化酶活性下降,造成自由基大量产生并堆积,脑组织细胞内存在明显氧化应激反应,可能是造成学习记忆功能障碍的原因之一。D-gal 注射可致体内产生大量自由基而损伤组织细胞,伴机体生理机能减退、学习记忆功能降低,因而可用于模拟自然衰老的神经损害特征^[13]。本研究通过 Morris 水迷宫实验检测发现 D-gal 模型大鼠逃避潜伏期延长、穿越虚拟平台次数减少及目标象限逗留时间缩

短,这些均说明大鼠出现明显的学习记忆功能障碍;而 TTM 干预可改善 D-gal 所致的模型大鼠学习功能障碍,表明该模型成功,且 TTM 有改善衰老大鼠学习记忆障碍的作用。SOD 可协助清除体内过多自由基和过氧化物;MDA 含量可反映体内脂质过氧化程度^[14],二者已成为抗衰老产品开发及药物治疗的关键作用靶点。体内氧化应激反应会引起细胞内 DNA 受损,而 8-OHdG 是公认的 DNA 氧化损伤后产生的一种特异性的生物标志物,可反映机体 DNA 氧化性损伤的程度^[15]。本研究发现 TTM 干预衰老大鼠后,可提高海马组织内 SOD 活性、增强清除自由基的能力;同时降低了 MDA 含量、减轻了组织内 DNA 氧化性损伤,表明 TTM 有良好的抗氧化损伤之功效,可能是改善衰老大鼠学习记忆功能障碍的机制之一。

海马是大脑内与学习记忆密切相关的重要组成部分,是空间记忆形成的重要结构和功能区,而衰老过程中海马损伤是学习记忆减退的重要原因。BDNF 主要在哺乳动物中枢神经系统(central nervous system, CNS)中表达,尤其是海马组织中含有最为丰富,有促神经元生存作用^[16]。BDNF 主要通过与其特异性受体 TrkB 结合,使其磷酸化进而启动细胞内信号转导,发挥生物学作用^[16],因而 BDNF 及 TrkB 缺失或功能异常可伴有海马学习记忆功能受损。本研究发现 D-gal 注射可引起衰老大鼠海马损伤,且 BDNF、TrkB 及 p-TrkB 表达降低,这可能是衰老大鼠出现学习记忆障碍的原因之一。而上调海马组织中 BDNF 及 TrkB 表达可促进神经元损伤性修复^[17],表明 BDNF/TrkB 通路活化可能在 CNS 疾病中发挥保护作用。本研究亦发现 TTM 干预上调了海马组织内 BDNF 和 TrkB 的表达、且提高了 TrkB 磷酸化水平,因而 TTM 改善衰老大鼠记忆障碍可能与调节 BDNF/TrkB 通路活化有关。

综上所述 TTM 改善衰老大鼠学习记忆障碍,可能与增强海马组织内抗氧化酶活性来提高机体抗氧化能力,及上调海马组织内 BDNF 和 TrkB 表达来减轻细胞损伤有关。然而,TTM 的有效成分具有多种药理活性,其抗衰老作用亦是多途径、多靶点的,因此其具体分子机制还有待于深入研究。

利益冲突: 所有作者认可本研究无相关利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 陈厚早,刘德培. 衰老的基础研究现状与干预策略[J]. 蚌埠医学院学报, 2018, 43(10): 1261-1265.
- [2] 贺改英,张志雄,徐颖,等. 银杏叶提取物对衰老大鼠前额叶皮层和海马炎症细胞因子及胶质细胞超微结构的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(8): 1064-1068.
- [3] Lu B, Nagappan G, Guan X, et al. BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases[J]. Nat Rev Neurosci, 2013, 14(6): 401-416.
- [4] 李小沛,张亚玉,李乐,等. 延龄草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 特产研究, 2016, 27(2): 71-78.
- [5] 涂星,斯琴,陈家艺,等. 鄂产头顶一颗珠的 HPLC 指纹图谱及主成分分析[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(12): 5924-5929.
- [6] Wang LJ, Du JL, Zhao FY, et al. Trillium tschonoskii maxim saponin mitigates D-galactose-induced brain aging of rats through rescuing dysfunctional autophagy mediated by Rheb-mTOR signal pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 98: 516-522.
- [7] 张忠立,左月明. 延龄草提取物对对异质性及多因性阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆与抗氧化能力的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(14): 3362-3364.
- [8] 常艳芬,宫文霞,郑艳红,等. 黄芩醇提物干预 D-半乳糖致衰老大鼠的尿液代谢组学研究[J]. 药理学学报, 2016, 51(1): 86-92.
- [9] 陈显兵,杨清煜,陈颖,等. 头顶一颗珠提取物对 D-gal 所致大鼠脑衰老 miR-155-3p 的影响[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(12): 1743-1748.
- [10] 蒋殿宇,吕黄伟. 电针刺激对高龄鼠氯胺酮麻醉认知功能及 β -淀粉样蛋白抗体的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(11): 1502-1505.
- [11] 詹光杰,黄发军,肖本见. 头顶一颗珠对 D-半乳糖所致小鼠衰老模型的影响[J]. 中国现代医药杂志, 2013, 15(10): 1-4.
- [12] 谢文执,罗洪斌,谢枫枫,等. 头顶一颗珠水煎液对阿尔茨海默病模型大鼠认知功能障碍的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(9): 1268-1275.
- [13] Cui X, Zuo P, Zhang Q, et al. Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid[J]. J. Neurosci Res, 2006, 84(3): 647-654.
- [14] Zhang S, Dong Z, Peng Z, et al. Anti-aging effect of adipose-derived stem cells in a mouse model of skin aging induced by D-galactose[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97573.
- [15] 徐鹏琛,孙超. 8-羟基脱氧鸟苷研究进展[J]. 淮海医药, 2018, 36(1): 126-128.
- [16] Boschen KE, Criss KJ, Palamarchouk V, et al. Effects of developmental alcohol exposure vs. intubation stress on BDNF and TrkB expression in the hippocampus and frontal cortex of neonatal rats[J]. Int J Dev Neurosci, 2015, 43: 16-24.
- [17] 杨艳春. 头穴丛刺结合丰富环境对 HIBD 大鼠海马 CA1 区细胞凋亡及 BDNF/TrkB 通路相关蛋白的影响[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016.

(收稿: 2019-04-19 在线: 2020-09-25)

责任编辑: 赵芳芳