

益智健脑颗粒对 SAMP/8 快速老化小鼠行为学及神经元凋亡的影响

杨 聘^{1,*}, 董克礼², 曾望远²

(1. 杭州市中医院干部科 杭州 310007; 2. 中南大学湘雅三医院中医科, 长沙 410003)

[摘要] 目的: 检测益智健脑颗粒浓缩液(YCF)对 SAMP/8 快速老化小鼠模型行为学、海马神经元凋亡率及凋亡基因 Bcl-2 和 Bax 表达的影响, 探讨益智健脑颗粒浓缩液改善学习记忆能力的部分作用机制。方法: 6 月龄 SAMP/8 快速老化小鼠模型随机分为中药组、西药组、老年对照组, 4 月龄 SAMP/8 作为青年对照组, 各组给予不同药物干预 8 周后水迷宫实验观察行为学改变, 应用流式细胞技术、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法测定海马神经元凋亡率和 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达。结果: 与老年对照组相比, 中药组逃避潜伏期缩短, 跨平台象限次数增多, 凋亡率显著降低, Bcl-2 mRNA 表达上调, Bax mRNA 表达下调, Bcl-2 mRNA/Bax mRNA 相对表达量比率增高。结论: 中药益智健脑颗粒能促进 Bcl-2 表达, 抑制 Bax 的表达, 维持 Bcl-2/Bax 的平衡, 降低凋亡率, 这可能是其改善 SAMP/8 快速老化小鼠学习记忆能力的部分作用机制。

[关键词] 益智健脑颗粒; 老年性痴呆; 行为学; 凋亡

[中图分类号] R282.71

[文献标识码] A

[文章编号] 1672-7347(2006)01-0056-04

Effect of yizhi jiannao granule on the behavior and neuron apoptosis in SAMP/8 mice

YANG Pin^{1,*}, DONG Ke-li², ZENG Wang-yuan²

(1. Department of Geriatrics Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410003, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of yizhi jiannao granule concentration fluid (YCF) on the behavior, the apoptosis rate of hippocampus neuron and the expression of apoptosis gene Bcl-2, Bax in senescence accelerated mice Senile-Prone/8 (SAMP/8), and to discuss some mechanism of traditional chinese medicine YCF in improving the capability of learning and memory. **Methods** Forty 6-month old SAMP/8 mice were randomly divided into the old group, huperzine A (Hup-A) group and YCF group. Ten 4-month old SAMP/8 mice were served as a young control group. Four groups were given different drugs for 8 weeks, their behavior changes were observed, and the hippocampus were taken out to examine the apoptosis rate by flow cytometry (FCM) and the expression of Bcl-2, Bax mRNA by RT-PCR. **Results** In the YCF group, the escape latency was significantly shortened, the time of swim in the platform quadrant significantly increased, the apoptosis rate of hippocampus neural decreased; the level of Bcl-2 mRNA and the rate of Bcl-2/Bax increased, and the level of Bax mRNA decreased. **Conclusion** Yizhi jiannao granule can decrease the neuron apoptosis rate and the Bax level, increase the Bcl-2 level, and modulate the rate of Bcl-2/Bax in SAMP/8 brain, which is probably part of the mechanisms of inhibiting the apoptosis and improving learning and memory.

Key words: yizhi jiannao granule; the Alzheimer's disease; behavior; cell apoptosis

[J Cent South Univ (Med Sci), 2006 31(1) 0056-04]

老年性痴呆(阿尔茨海默病, Alzheimer's disease, AD)是一种原因未明、以认知功能减退为主要临床表现的神经系统退行性疾病。在 AD 病的实验研究中快速老化模型小白鼠简称老化鼠(senescence accelerated mouse, SAM)作为一个较理想的衰老模型,目前应用得较为广泛。此模型包括正常老化的 R(senile-resistant)系和快速老化的 P(senile-prone)系^[1]。P 系渡过了生长期(4~6 月龄)后,则迅速出现明显的学习记忆障碍,处于一种低紧张低恐怖痴呆状态^[2]。SAMP/8 脑中有明显的 $A\beta$ 沉积、皮质萎缩、星状胶质细胞增生和海绵样病变等病理改变,表明 P8 是比较理想的研究脑老化和痴呆的模型。董克礼教授^[3]根据中医基本理论,以淫羊藿、锁阳、川断、田七等药物组成益智健脑颗粒,长期用于临床实践治疗 AD 之肾虚型,取得满意疗效。本实验选用 SAMP/8 作为 AD 动物模型,通过观察益智健脑颗粒对 SAMP/8 行为学、海马神经元凋亡率及凋亡基因 *Bcl-2* 和 *Bax* 表达的影响,进一步阐明益智健脑颗粒治疗 AD 的疗效机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器 Mastercycler gradient PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);Centrifuge 5415R 冷冻变速离心机(德国 Eppendorf 公司);Biophotometer 紫外分光光度计(德国 Eppendorf 公司);DYY-11 型电脑三恒多用电泳仪(北京六一仪器厂);SYNGENE 凝胶成像系统(英国 Syngene 公司);流式细胞仪(Becton Dickson, 美国)。

1.2 主要试剂和药物 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(MBI 公司产品);DEPC(BBI);TRI REAGENT(Molecular Research Center);氯仿、异丙醇、无水乙醇(上海化学试剂公司); $6\times$ 上样缓冲液(北京鼎国生物);琼脂糖(西班牙 Biowest 公司);溴乙锭(Sigma 分装);10 mmol/L dNTP mix, *Taq* DNA 聚合酶, 10 \times PCR 反应缓冲液, 胰蛋白酶, 25 mmol/L $MgCl_2$, 100 bp DNA Ladder Marker(均为 Promage 公司产品)。益智健脑颗粒浓缩液为湘雅三医院名老中医董克礼教授治疗老年性痴呆的经验方(由湖南德康药物研究所加工, 1 mL 含 3 g 生药)。石杉碱甲(上海红旗制药厂生产双益平片, 批号为 970101)。

1.3 动物分组及喂养 SAMP/8 雄性小鼠购自天津中医学院附属第一医院动物部, 清洁级, 体质量 18~22 g。选用 6 月龄 SAMP/8 小鼠 40 只, 随机分为 3 组, 即老年对照组 12 只、中药组 14 只、西药组 14 只。另选 10 只 4 月龄 SAMP/8 作为青年对照组;

动物喂养于层流室, 温度 18 $^{\circ}C$ ~22 $^{\circ}C$, 湿度 55%~58%, 饮水及饲料高温蒸汽灭菌。中药组给予益智健脑颗粒浓缩液, 每天 0.3 g 灌胃。西药组给予石杉碱甲, 每天 1 μ g 灌胃。老年组和青年组予同体积的蒸馏水灌胃, 每天 1 次, 持续 8 周。

1.4 实验方法

1.4.1 行为学测试 Morris 水迷宫主要由两部分组成, 即内含平台的圆形水池和记录装置。水池直径 130 cm, 高 50 cm, 在水池边缘等距离依次标有东(E)、南(S)、西(W)、北(N)4 个方向, 据此将水池分为 4 个象限。平台直径 9 cm, 高 29 cm, 水深 30 cm。记录装置包括摄像机、录像机。测试内容包括定位航行实验和空间探索实验。

1.4.1.1 定位航行试验 测试时平台置于 EN 象限, 鼠分别从 E、S、W、N 4 个位置面对池壁放入水池, 记录该鼠找到平台所用的时间(逃避潜伏期), 休息 4 min 再行下一次测试。超过 2 min 未找到平台, 潜伏期记为 2 min。测完 4 个入水点的潜伏期为一个单元, 每天上、下午各测一个单元, 连续 4 d, 共 8 个单元。

1.4.1.2 空间探索试验 第 5 天, 撤除平台, 使鼠在无平台情况下寻找记忆中的平台, 游泳 120 s, 用记录装置记录鼠的游泳路线。在整个测试过程中, 水池周围参照物(迷宫外线索)包括实验者本身位置不变。主要比较各组跨平台象限游泳次数。

1.4.2 流式细胞术(FCM)测凋亡率 将动物断头取脑后分离海马, PBS 漂洗, 眼科剪尽可能剪碎后置于盛有 0.25% 胰酶 + 0.02% EDTA 的中号培养皿中, 37 $^{\circ}C$ 消化 10 min 后加入冰冷的 PBS 终止消化, 100 目筛板过滤, 滤液移入离心管中 1 500 r/min 室温离心 10 min, 去上清液, 加入 1 mL PBS 用吸管轻轻吹打成单细胞悬液。调整 PBS 重悬细胞至 1×10^6 /mL, 取 100 μ L 细胞悬液(10^5 cells)至 5 mL 管, 加入 5 μ L AnnexinV-FITC, 10 μ L PI 混匀, 室温下避光孵育 15 min, 每管加入 400 μ L PBS, 1 h 内进行流式细胞分析。激发波长 488 nm, 计数 10^4 个细胞, 所有资料均经 Cell Quist 软件收集处理。

1.4.3 RT-PCR 测 *Bcl-2* mRNA 和 *Bax* mRNA 的表达

1.4.3.1 总 RNA 的提取 将动物断头取脑, 无菌条件下分离海马, 取海马组织于组织匀浆器中, Trizol 一步法提取组织总 RNA(参照说明书方法), 紫外分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度, 琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性, 按 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书操作步骤进行逆转

录合成 cDNA。

1.4.3.2 RT-PCR 采用 Primer Premier 5.0 设计引物序列,委托上海鼎安生物科技有限公司合成。Bcl-2 :上游,5'-CTCGTTCGCTACCGTCTGTGACTTCG-3';下游,5'-CAGATGCCGGT TCAGGTACTCAGTC-3';扩增产物长度为 240 bp。Bax :上游,5'-AAGCT-GAGCGAGTGTCTCCGGCG-3';下游,5'-GCCACAAA-GATGGTCACTGTCTGCC-3';扩增产物长度为 360 bp。同时选用 GAPDH 作为内参,上游,5'-GTGAAG-GTCGGTGTGAACGG-3';下游,5'-GATGCAGGGAT-GATGTTCTG-3';扩增产物长度为 620 bp。PCR 反应体系为 20 μ L,包括灭菌去离子水 13 μ L,10 \times PCR 缓冲液 2 μ L,dNTP(10 mmol/L)0.4 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 1.6 μ L,Bcl-2 和 Bax 上、下游引物各 0.4 μ L,GAPDH 上、下游引物各 0.1 μ L,cDNA 模板 1.6 μ L,TaqDNA 聚合酶 0.4 μ L。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 2.5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,60 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 反应产物 5 μ L,加 1 μ L 上样缓冲液,琼脂糖凝胶电泳 50 min,紫外灯下观察结果,用凝胶成像系统扫描条带灰度值,并以 GAPDH 灰度值作为参考定量标准,将待测基因/GAPDH 的比值作为待测基因 mRNA 的相对表达量。

1.5 统计学处理 所有数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并采用 SPSS 11.0 对数据进行统计分析。采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较用 LSD(least significant difference)检验。方差不齐时用秩和检验,组间比较用 Kruskal-Wallis test。

2 结果

2.1 潜伏期比较 4 组小鼠经过 4 d 的训练,前 2 d 潜伏期迅速下降,从第 3 天开始逐渐趋于稳定,比较历时 4 d 共 32 次潜伏期及后 2 d 共 16 次平均潜伏期结果(表 1),中药组的潜伏期缩短,与老年对照组比较差异有显著性($P < 0.05$);但高于青年对照组($P < 0.05$);中药组与西药组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1 不同组别训练 4 d 及后 2 d 的平均潜伏期比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	训练 4 d 潜伏期	后 2 d 潜伏期
青年对照组	10	41.48 \pm 3.63	23.85 \pm 2.04
老年对照组	10	85.49 \pm 2.96	68.34 \pm 2.09
西药组	10	59.95 \pm 4.03 ^{*Δ}	40.67 \pm 3.79 ^{*Δ}
中药组	10	61.35 \pm 3.67 ^{*Δ}	40.74 \pm 2.38 ^{*Δ}

与老年对照组比较,* $P < 0.05$ 与青年对照组相比, $\Delta P < 0.05$

2.2 空间搜索能力比较 第 5 天撤除平台,观察小鼠的空间探索能力,中药组轨迹大部分位于原平台象限,其次较多地在原平台象限相邻的左右两侧象限寻找。西药组运动轨迹与其大致相同,但老年对照组基本围绕池壁游泳,其运动轨迹呈随机分布于各象限之中。中药组跨平台象限游泳次数为(6.10 \pm 1.37)次,高于老年对照组(3.70 \pm 1.16)次($P < 0.05$),但低于青年对照组(8.90 \pm 1.66)次($P < 0.05$),与西药组(5.20 \pm 1.55)次相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 流式细胞术(FCM)测凋亡率 细胞凋亡早期,细胞膜上磷脂酰丝氨酸(PS)从膜内侧翻到膜外侧,预连荧光素 FITC 的 Annexin-V 蛋白可与 PS 结合,从而检测到 PS 的变化,成为细胞凋亡的早期检测指标。同时,凋亡细胞的细胞膜是完整的,故对 PI 拒染。因此,PI(-)且 Annexin-V(+)的细胞为早期凋亡细胞。4 组小鼠海马组织单细胞悬液凋亡率有显著性差异($F = 64.156, P < 0.05$)。组间比较显示:中药组凋亡率(2.776 \pm 0.206)和西药组凋亡率(3.274 \pm 0.795)低于老年对照组凋亡率(6.012 \pm 0.632),差异有显著性($P < 0.05$),但仍高于青年对照组凋亡率(1.268 \pm 0.385)($P < 0.05$),中药组和西药组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 各组小鼠海马组织 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 的表达 凝胶电泳图像的灰度值结果表明,经过 8 周药物干预后,4 组小鼠海马组织 Bcl-2 mRNA 相对表达量之间差异有显著性($F = 16.861, P < 0.05$)。组间比较显示,中药组和西药组 Bcl-2 mRNA 相对表达量高于老年对照组($P < 0.05$),但仍低于青年对照组($P < 0.05$);中药组和西药组比较差异无统计学意义($P = 0.195$)。4 组小鼠海马组织 Bax mRNA 相对表达量之间差异有统计学意义($F = 3.921, P < 0.05$)。组间比较显示,中药组、西药组和青年对照组 Bax mRNA 相对表达量低于老年对照组($P < 0.05$),中药组、西药组和青年对照组比较差异无统计学意义($P = 0.816, P = 0.468, P = 0.341$)。Bcl-2 mRNA/Bax mRNA 相对表达量的比例差异有统计学意义($F = 19.234, P < 0.05$)。组间比较显示:中药组和西药组 Bcl-2 mRNA/Bax mRNA 相对表达量的比例高于老年对照组($P < 0.05$),但仍低于青年对照组($P < 0.05$),中药组和西药组比较差异无统计学意义($P = 0.182$) (图 1 表 2)。

表2 各组小鼠海马组织 *Bcl-2*、*Bax*、*Bcl-2/Bax* mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	<i>Bcl-2</i> mRNA	<i>Bax</i> mRNA	<i>Bcl-2/Bax</i> mRNA
青年对照组	5	1.326 ± 0.232 ^{△△}	0.984 ± 0.071 ^{△△}	1.342 ± 0.175 ^{△△}
老年对照组	5	0.574 ± 0.129 ^{**}	1.176 ± 0.151 ^{**}	0.508 ± 0.188 ^{**}
西药组	5	0.838 ± 0.135 ^{**△}	1.042 ± 0.054 [△]	0.808 ± 0.152 ^{**△}
中药组	5	0.984 ± 0.168 ^{**△△}	1.028 ± 0.064 [△]	0.964 ± 0.191 ^{**△△}

与青年组对照相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与老年对照组相比, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$

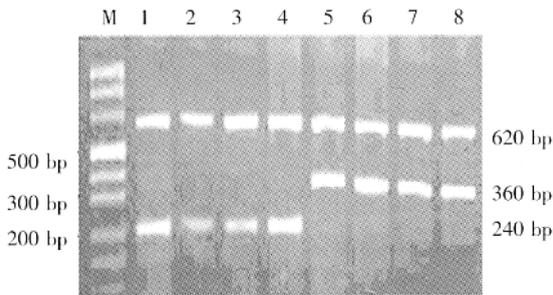


图1 各组小鼠海马组织 *Bcl-2*、*Bax* PCR 扩增产物凝胶电泳图 1: 中药组 2: 老年组 3: 西药组 4: 青年组

Fig. 1 Gel electrophoresis image of the PCR products of *Bcl-2*, *Bax* in mouse hippocampus 1: Chinese medicine group; 2: Agedness group; 3: Medicine group; 4: Youth group

2.5 凋亡率与 *Bcl-2/Bax* 的相关性分析 小鼠海马组织中神经元凋亡率与 *Bcl-2* mRNA/*Bax* mRNA 表达量的比例经相关分析显示, Pearson 相关系数为 -0.796, 提示小鼠海马组织中神经元凋亡率与 *Bcl-2* mRNA/*Bax* mRNA 表达量的比例之间有直线相关关系, 为负相关。

3 讨论

细胞凋亡又称程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD), 是一种不同于细胞坏死的细胞主动性死亡, 研究表明凋亡与阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 有密切关系, 是 AD 的神经元损坏的重要途径^[4~6]。细胞凋亡是在基因控制下的细胞自我消亡过程, 涉及一个基因表达的级联反应, 其中 *Bcl-2/Bax* 的比例关系是决定细胞是否发生凋亡及凋亡严重性的重要因素。*Bax* 和 *Bcl-2* 通过形成不同类型的二聚体, 发挥对细胞凋亡的调节^[7]。如当细胞内 *Bax* 与 *Bcl-2* 的分子数相当时, 两者形成异二聚体, 此时均不能发挥各自的作用。但当 *Bax* 较多时, 自身形成同源二聚体, 则起促进细胞凋亡的作用; 反之, 则抑制细胞凋亡。

老年性痴呆在中医属“健忘”、“呆症”范畴, 病位在脑, 与心肝脾肾功能失调密切相关, 肾精不足, 构成了老年性痴呆内在的原发始动因素; 血瘀痰凝是老年性痴呆发病的重要因素, 本虚标实是老年性痴呆的基本病机。肾衰则精气化生不足, 髓海空虚,

肾气亏虚则蒸腾气化失常, 津液不能运化输布而为痰浊, 推动血行无力致淤血阻滞或因肾精亏虚, 阴虚火旺, 灼津为痰, 痰瘀阻塞经络则脑髓失养, 发为本病。根据上述基本理论, 董克礼教授以淫羊藿、锁阳、川断、刺五加、柏子仁、水蛭、田七等药物制成益智健脑颗粒, 方中淫羊藿补肾填精, 为君药, 锁阳、水蛭补肾活血, 为臣药; 田七、川断加强补肾行血的作用, 为佐药, 刺五加、柏子仁宁心健脑, 共为使药。临床疗效较好。本研究则在临床观察的基础上, 采用流式细胞术和 RT-PCR 方法, 观察了益智健脑颗粒对 SAMP/8 快速老化模型鼠海马神经元细胞凋亡率及其凋亡基因表达的影响, 结果表明中药益智健脑颗粒能提高 SAMP/8 的学习记忆能力, 降低 SAMP/8 脑内神经元的凋亡率, 促进 *Bcl-2* mRNA 表达, 抑制 *Bax* mRNA 表达, 上调 *Bcl-2/Bax* 的比率。据此推断中药益智健脑颗粒有改善 SAMP/8 小鼠的学习记忆能力的神经保护作用, 其机制可能是通过调整 *Bcl-2/Bax* 的比率, 抑制神经元细胞凋亡来实现的。

参考文献:

- [1] 韩景献. 日本快速老化模型小鼠 (SAM) 老化诸特征 [J]. 实验动物科学与管理, 1995, 12(4): 21-29.
- [2] Miyamoto M. Characteristics of age-related behavioral changes in senescence accelerated mouse SAMP/8 and SAMP/10 [J]. *Exp Gerontol*, 1997, 32(1-2): 139-148.
- [3] 董克礼, 宋治. 益智健脑颗粒治疗早发性痴呆 64 例临床观察 [J]. 湖南中医杂志, 1999, 15(4): 5-6.
- [4] Savitz SI, Rosenbaum DM. Apoptosis in neurological diseases [J]. *Neurosurg*, 1998, 42(3): 555-572.
- [5] Smale G, Nichols NR, Brady DR, et al. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease [J]. *Exp Neurol*, 1995, 133(2): 225-230.
- [6] Yamatsuji T, Okamoto T, Takeda S, et al. Expression of V₆₄ APP mutant cause cellular apoptosis as Alzheimer trait-linked phenotype [J]. *EMBOJ*, 1996, 15(3): 498-509.
- [7] Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. *Bcl-2* heterodimerizes in vitro with a conserved homolog *Bax*, that accelerates programmed cell death [J]. *Cell*, 1993, 74(4): 609-619.