

脑还丹对 APP/PS1 双转基因小鼠海马区学习记忆功能及细胞内钙离子浓度的影响

李进营, 黄启辉, 陶彦谷

中山大学孙逸仙纪念医院中医科, 广东 广州 510120

[摘要] 目的: 观察脑还丹对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆功能及海马区细胞内钙离子浓度的影响。方法: 将 3 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠 (雄性) 36 只, 随机分为模型组、脑还丹组和多奈哌齐组, 每组各 12 只, 同月龄同遗传背景 C57BL/6J 小鼠 12 只为正常对照组。治疗组分别以脑还丹浓缩液及多奈哌齐灌胃; 正常对照组和模型组以同体积蒸馏水灌胃, 5 月后进行行为学测试, 并测定各种小鼠海马组织细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 。结果: Morris 水迷宫实验: 与模型组相比, 正常对照组、脑还丹组和多奈哌齐组逃避潜伏期较模型组明显缩短 ($P < 0.05$), 药物治疗组在原平台象限停留时间明显增加 ($P < 0.01, P < 0.05$)。海马区 $[Ca^{2+}]_i$: 模型组较对照组海马细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 明显增高 ($P < 0.01$); 脑还丹组及多奈哌齐组 $[Ca^{2+}]_i$ 较模型组明显降低 ($P < 0.01$); 而脑还丹组和多奈哌齐组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。结论: 脑还丹对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆功能具有改善作用, 这可能与其稳定海马区细胞内 $[Ca^{2+}]_i$, 减少自由基的产生, 保护细胞生物膜。

[关键词] APP/PS1 双转基因小鼠; 脑还丹; 钙离子超载; 多奈哌齐

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 06-0213-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.06.100

老年性痴呆, 又称阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是发生在老年期或者老年前期的一种原发性中枢神经系统退行性病变, 以进行性持续性学习记忆功能减退为主要临床特征, 以老年斑 (senile plaque, SP)、神经元纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT)、神经元丢失为主要病理改变。现代研究证实, 钙离子稳态失调及自由基形成过多是体内一切细胞死亡的“共同通道”^[1]。脑还丹是在具有抗衰老作用古方“草还丹”的基础上, 结合现代中药药理研究, 用骨碎补、熟地黄、石菖蒲等中药组成的复方; 既往研究表明脑还丹能使 AD 患者的临床症状得到明显改善; 可明显提高去势老龄大鼠血清中的胰岛素样生长因子水平^[2], 稳定去势老龄大鼠海马区神经元结构, 维持其突触密度^[3], 抑制快速老化鼠 SAMP8 脑内过氧化反应及神经元超微结构的损伤, 促进抗凋亡基因 bcl-x 及海马 CA1 区 PSD-95、Shank-1 蛋白的表达^[4-5]。本实验以 A β 前体蛋白 APP 及能够反映神经细胞凋亡情况的细胞内钙离子浓度为观察指标, 以 APP/PS1 双转基因小鼠为 AD 模型, 观察脑还丹对其学习记忆能力及海马区 APP 蛋白表达情况及细胞内钙离子浓度的影响, 进一步探讨脑还丹改善学习记忆功能的机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 3 个月龄 SPF 级雄性 APP/PS1 双转基因小鼠

36 只, 同月龄同遗传背景 C57BL/6J 小鼠 12 只, 体重为 (30 \pm 5)g, 以上动物均购自中国医学科学院实验动物研究所[生产许可证号: SCXK(京)2013-0002]。

1.2 实验用药 脑还丹由人参 10 g、熟地黄 30 g、骨碎补 15 g 等组成, 采用颗粒剂 (广东一方制药有限公司提供, 批号 312046T), 盐酸多奈哌齐片 [安理申 5 mg/片, 卫材 (中国) 药业有限公司提供, 批号 130437B], 实验时均按照需要, 用蒸馏水配制成所含生药量不同浓度的药液。

1.3 主要试剂及仪器 Fluo-4/AM 荧光探针 (Sigma 公司, 美国), 山羊血清由郑州益康生物工程有限公司提供。其他如胰酶、水合氯醛、PBS 液等均为国产试剂。超净工作台 (苏州净化仪器厂); BD FACS Calibur 流式细胞仪 (碧迪医疗器械有限公司)。

2 实验方法

2.1 动物分组 将上述 36 只小鼠随机分为 3 组, 分别为模型组、脑还丹组、多奈哌齐组, 每组各 12 只; 另 C57BL/6J 小鼠 12 只作为正常对照组。

2.2 给药 用双蒸水将脑还丹颗粒冲剂配制成浓度为 1 g/mL 的药液, 盐酸多奈哌齐配制成浓度为 0.24 mg/mL 的药液; 小鼠灌胃剂量以成人 60 kg 常用剂量为参考^[6], 多奈哌齐用量为: 8.0 mg/(kg·d), 脑还丹用量为: 41.6 g/(kg·d); 正常对照组、

[收稿日期] 2014-04-25

[基金项目] 广东省中医局课题 (编号: 20131147)

[作者简介] 李进营 (1986-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治心脑血管疾病。

[通讯作者] 黄启辉, E-mail: Hqhui84181833@sina.com。

模型组小鼠每天灌以等量蒸馏水。每天1次,连续5月。

2.3 Morris水迷宫实验 参考文献^[7],采用由中国科学院研制Morris水迷宫(中山大学北校区解剖教研室)进行行为学测试。包括隐蔽平台实验5天及空间探索实验1天。以此评价小鼠的学习记忆能力及多奈哌齐和脑还丹对其影响。

2.4 标本采集 Morris水迷宫测试结束后,每组取6只小鼠断头处死,无菌条件下剥出全脑,沿大脑纵裂切开,并用玻璃棒分离出海马组织,放入冻存管立即置于液氮内保存备用,用于细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的检测。海马区细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 检测:①将海马组织置于生理盐水中进行机械剪切,而后添加胰酶进行消化,制备单细胞悬液,加入终浓度为 $4\mu\text{mol/L}$ 的Fluo-4/AM荧光探针, 37°C 细胞培养箱孵育20min后除去Fluo-4/AM工作液;用PBS溶液洗涤细胞3次,然后加入PBS重悬细胞, 37°C 培养箱孵育约30min后加入PBS液,调整细胞悬液浓度为 $1\times 10^5/\text{mL}$,以流式细胞仪检测细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 。②结果统计:以发射波长为516nm,激发波长为488nm条件下用流式细胞仪所检测到的神经细胞内钙离子的荧光强度作为统计值,进行统计分析。

2.5 统计学方法 采用SPSS13.0进行数据分析,计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,不同实验组计量资料的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P<0.05$ 为差异有显著性意义;组间差异的多重比较采用S-N-K法(Student-Neuman-Keuls'test),检验水平取 $\alpha=0.05$ 。

3 实验结果

3.1 各组小鼠隐蔽平台试验结果比较 见表1。随着天数的增加,各组小鼠的潜伏期均逐渐缩短,且模型组小鼠的潜伏期明显长于正常对照组($P<0.01$);从第3天开始,脑还丹组及多奈哌齐组的潜伏期较模型组明显缩短($P<0.001$);多奈哌齐组与脑还丹组相比无明显差异($P>0.05$)。

表1 各组小鼠隐蔽平台试验结果比较 $(\bar{x}\pm s, n=12)$ s

组别	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
正常对照组	30.47±3.98	27.21±4.97	26.78±5.2	25.65±4.02	23.41±3.96
模型组	62.04±4.87	59.03±3.74	57.69±4.27	55.63±4.12	53.74±5.04
脑还丹组	54.21±4.76	49.75±4.84	32.37±4.51	24.54±4.74	21.23±5.01
多奈哌齐组	53.86±5.13	50.03±4.47	31.98±4.87	25.24±4.34	22.18±4.05

与正常对照组比较,① $P<0.001$,② $P<0.01$,③ $P<0.05$;与模型组比较,④ $P<0.001$,⑤ $P<0.05$

3.2 第4天时各组小鼠搜索平台线路图 见图1。搜索平台路线方面,随着时间增加,各组小鼠采取边缘式、随机式探索路线的次数逐渐减少,而趋向式、直线式探索路线次数逐渐增加。从第2天开始,正常对照组趋向式、直线式探索路线次数较其他四组明显增加。第4、5天时,脑还丹组及多奈哌齐组采取直线式、趋向式策略的次数明显多于模型对照组。

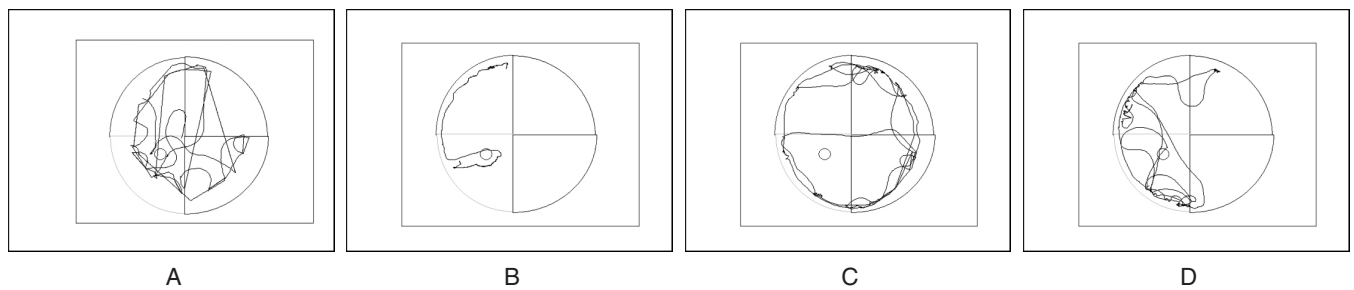


图1 第4天时各组小鼠搜索平台线路图

(A:多奈哌齐组;B:正常对照组;C:模型组;D:脑还丹组)

3.3 各组小鼠平台象限内停留时间、首次跨越平台时间比较 见表2。平台撤去后,第6天进行空间探索实验。记录小鼠在平台象限内停留的时间,以测试小鼠对平台的空间记忆能力。结果显示,正常对照组小鼠在平台象限的停留时间明显长于模型组($P<0.001$);脑还丹组和多奈哌齐组小鼠在平台象限的停留时间较模型组显著延长($P<0.01$);多奈哌齐组与脑还丹组相比无明显差异($P>0.05$)。

3.4 各组小鼠海马细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 比较 见表3、图2。流式细胞仪检测结果显示,4组小鼠海马区神经细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 之间的差异总体上有显著性意义($F=112.75, P<0.05$),与其他3组相比,模型组海马区神经细胞内的钙离子浓度浓度明

显增多($P<0.001, P<0.01$);脑还丹组与多奈哌齐组相比无明显差异。

表2 各组小鼠平台象限内停留时间、首次跨越平台时间比较 $(\bar{x}\pm s, n=12)$ s

组别	平台象限停留时间	首次跨越平台时间
正常对照组	22.13±2.05	26.21±2.21
模型组	8.98±2.14	66.49±4.02
脑还丹组	17.24±2.35	33.65±2.32
多奈哌齐组	18.02±2.35	34.03±2.53

与模型组比较,① $P<0.001$,② $P<0.01$

表3 各组小鼠海马细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	海马细胞内 $[Ca^{2+}]_i$
空白组	117.02 ± 3.24
模型组	441.01 ± 3.78
脑还丹组	258.45 ± 3.89
多奈哌齐组	257.68 ± 4.01

与正常对照组比较, ① $P < 0.001$; 与模型组比较, ② $P < 0.01$

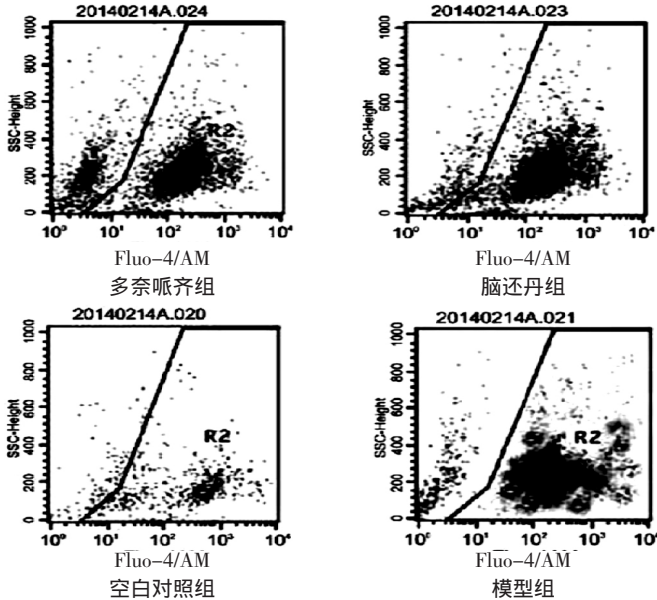


图2 各组小鼠海马细胞中 $[Ca^{2+}]_i$

4 讨论

研究表明, 在 AD 的发生发展过程中伴有钙离子稳态失调。正常情况下钙离子在细胞内外的分布受膜和质膜的屏障作用及膜上 Ca^{2+} 通道调节。 Ca^{2+} 通道是镶嵌膜上有孔道的蛋白质, 其对钙离子的通透性受电压、受体及胞内钙量等的调控。生理条件下, 由于质膜上和胞膜上 Ca^{2+} -ATP 酶(钙泵)的存在, 细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 保持在低浓度状态, 仅约为胞外的 1/20 000。作为细胞内第二信使, Ca^{2+} 参与了神经细胞的发育分化、递质的释放、突触的传递、激素的放大效应、酶的激活等多种生理过程。

当质膜受损或者钙泵供能障碍时, 可发生钙离子内流, 引起钙离子稳态失调而导致 Ca^{2+} 超载的发生; 细胞内过多的游离 Ca^{2+} 可激活 Ca^{2+} 调节的核酸内切酶、CaM 等多种酶, 进而引起一系列基因、蛋白的表达异常, 从而导致细胞功能障碍甚至死亡^[8]。在 AD 的发生、发展过程中 $A\beta$ 及活性氧自由基的也都是通过引起神经 Ca^{2+} 超载而产生神经毒性作用的。 Ca^{2+} 稳态失调导致的钙超载在 AD 发病过程中的作用已经得到人们的重视。已有学者研究发现, 通过减少细胞内的 $[Ca^{2+}]_i$ 可有效改善痴呆动物模型的学习记忆功能^[9]。

APP/PS1 双转基因小鼠是以 APP 单转基因小鼠与 PS1 单

转基因小鼠进行杂交, 或运用 DNA 重组技术将 APP 和 PS1 两种外源突变基因同时传染、整合到小鼠的基因组中而得到。实验研究表明, APP/PS1 双转基因小鼠在 4.5 月龄时, 大脑皮层即出现淀粉样沉积和 SP, 并且随着月龄增大, 大脑皮层 SP 数量面积明显增大^[10]; 至 9~12 月龄时, 可出现与 AD 患者相似的 SP^[10~11]。而行为学方面研究发现, 在 3 个月龄时, APP/PS1 双转基因小鼠就已出现明显的学习记忆功能障碍。这一结果表明 APP/PS1 双转基因小鼠表现出与 AD 患者相似的发病进程, 是研究 AD 较为理想的动物模型。

本实验研究显示, 与模型组相比, 正常组及多奈哌齐和脑还丹干预组小鼠在隐蔽平台试验中所用时间明显缩短, 而空间探索试验中在原平台象限停留时间明显增加; 提示脑还丹、多奈哌齐均可明显改善 APP/PS1 双转基因小鼠的学习、记忆功能。海马区 $[Ca^{2+}]_i$ 检测提示, 模型组较对照组海马细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 明显增高($P < 0.001$); 脑还丹组及多奈哌齐组 $[Ca^{2+}]_i$ 较模型组明显降低($P < 0.01$)。钙离子稳态失调与学习记忆功能的关系推断可能有以下几方面原因: ①机体老化时伴随着全身脏器、组织和细胞的老化; ②机体的老化只是外在表象, 其本质是细胞生物膜的受损; ③细胞膜的损伤, 导致各离子通道的功能异常, 其中 Ca^{2+} 通道所受的影响尤为明显, 导致 Ca^{2+} 内流增加, 使 Ca^{2+} 在胞内聚积, 激活细胞内质网、线粒体钙库释放, 使细胞内 Ca^{2+} 浓度进一步升高, 加剧细胞的老化; ④细胞老化, 导致线粒体功能障碍, 细胞供能障碍, 钙泵失常, 进一步导致细胞内 Ca^{2+} 的滞留; ⑤细胞老化与钙离子稳态失调, 形成恶性循环, 进而引起突触丢失、细胞凋亡等一系列病理变化, 导致 APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆功能障碍。这可能是 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力明显低于 C57BL/6J 小鼠的原因之一, 而脑还丹和多奈哌齐可通过稳定细胞内钙离子浓度, 减轻下游的细胞功能损害, 保护神经细胞功能, 进而改善 APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆功能。

综合以上分析, 脑还丹可显著改善 APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆功能, 其机制可能与其稳定细胞内 $[Ca^{2+}]_i$, 降低钙离子超载, 减少自由基的产生, 保护细胞生物膜有关。

[参考文献]

[1] 高利平, 方海立. 钙超载与细胞损伤[J]. 四川医学, 2004, 25(9): 1039-1041.
 [2] 黄启辉, 李庆明, 谭朝晖. 脑还丹胶囊治疗老年性痴呆的临床研究[J]. 实用老年医学, 2002, 16(6): 21-24.
 [3] 程志安, 李庆明, 曾志勇, 等. “脑还丹”对老龄去势大鼠血清 IGF-1 和血脂水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(1): 38-40.
 [4] 程志安, 李庆明, 李红毅, 等. “脑还丹”对老龄去势大鼠海马 CA3 区及皮质神经元超微结构的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(1): 31-33.

- [5] 魏昌秀, 黄启辉, 李庆明, 等. 脑还丹对快速老化小鼠学习记忆及 SOD、MDA、GSH-Px 的影响[J]. 新中医, 2004, 36(6): 77-78.
- [6] 贺石林, 陈修, 等. 医学科研方法导论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 62-64.
- [7] 陶彦谷, 黄启辉. 脑还丹对快速老化小鼠学习记忆能力的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6): 643-645.
- [8] Vannucci RC, Brucklacher RM, Vannucci SJ. Intracellular calcium accumulation during the evolution of Hypoxic-ischemia brain damage in the immature rat[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2001, 126(1): 117-121.
- [9] 李雪燕, 安方玉, 李世功, 等. 当归多糖对老年痴呆小鼠脑组织钙超载及胆碱能神经损伤的影响[J]. 中医研究, 2013, 26(3): 68-70.
- [10] Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, et al. The promise of slow down ageing may come from curcumin[J]. Curr Pharm Des, 2010, 16(7): 884-892.
- [11] De la Torre JC. Pathophysiology of neuronal energy crisis in Alzheimer's disease [J]. Neurodegener Dis, 2008, 5(3-4): 126-132.

(责任编辑: 骆欢欢, 李海霞)

打造行业精英 创立百年基业

邢台市痔瘘职业学校创办于 1985 年 4 月, 学校附属医院自主创新的“痔瘘微创无痛三步疗法”, 较好的解决了痔瘘病传统疗法疗程长、术后疼痛、并发症、远期复发、后遗症不能避免的难题。学校是省、市社会力量办学诚信单位。由于教学和医疗事迹突出, 全国肛肠界十大名医之一校长刘恒均副主任医师先后荣获中央、省、市 36 次嘉奖和荣誉称号。1990 年作为河北省唯一的“全国学雷锋先进代表”在北京中南海接受党和国家最高领导同志的亲切接见并合影留念。

学校创办至今, 先后办班 110 期, 招收我国 31 个省市、自治区的学员 3600 余人。以及美国、俄罗斯、加拿大、西班牙、巴西、阿根廷、厄瓜多尔、马来西亚、菲律宾、新加坡、越南、朝鲜、港澳台等 15 个国家和地区, 共计招收海外学员 54 人。《人民日报》(海外版)、《健康报》、《中国中医药报》、《南洋商报》、《世界日报》、《中国报》(东海岸版)、《华侨日报》、《商报》、中央人民广播电视台、中央电视台等 30 多家国内外媒体重点报道了学校的先进事迹和先进技术。学校先后出版了《实用痔瘘学讲义》(河北科技出版社)、《肛肠病的最新中医治疗》(北京古籍出版社)等 4 部专著。学校及附属医院的科研成果先后获得多项专利。学校是我国首家痔瘘专业学校, 编写了中国第一部痔瘘专科教材, 是首家在业界实行合同制教学的学校(1986 年)。学校占地 13.5 亩, 实用建筑面积 4200 平方米, 是我国最大的肛肠专业教育基地。

“痔瘘无痛三步疗法”的问世, 较满意地解决了同行业间迫切需要的专业技术难题, 使绝大多数内痔、外痔、混合痔、肛瘘、肛裂、肛门狭窄、肛管瘤等多种疾病, 仅需 4—7 天基本治愈。为了发扬祖国传统医学, 使对社会对大众健康有益的实用技术更好的推广, 学校决定面向国内外扩大招生。

副主任医师、中国巨鹿国际肛肠病研究会会长、邢台市“十佳”优秀知识分子、巨鹿政协常委、中国肛肠界十大名医之一刘恒均校长以办学 28 年的良好信誉向国内外学员郑重承诺:

一、痔、瘘、肛裂、直肠息肉、脱肛、肛管瘤、肛窦炎、肛周湿疹、结肠直肠炎、肛周脓肿、肛门口梗阻性中老年顽固性便秘治疗有特效。

二、痔瘘手术后疼痛者一概不收费。

三、疗程和费用是大中型医院传统方法的三分之一至五分之一。

四、疗效失真或半数以上学不会者, 全额退还未学会学员的全部学费, 并赔偿学习损失 2 万元。

五、残疾学员、特困学员一概免收学费。

六、一期学不会可免费延期再学, 学会为止。

七、学习期满颁发中级盖钢印的中英文对照结业证书。

主要传授国内外专著、大中型医院没有的新技术、新理论。重点传授用传统疗法多次治疗无效的重症痔瘘病, 短时间内康复, 远期不复发的独立自主的创新技术。学校另外开展技术合作、技术转让事宜。

学期 10 天, 学费 1200 元。赠送学校在河北科技出版社、北京古籍出版社出版的肛肠医学专著及其它学习资料。

欲 10 天数倍提高自身价值, 欲创立百年基业者, 可前来考察 3 天, 免费食宿, 且报销往返路费。确认技术领先, 疗效实用独特, 再签约入学。

要求: 爱好本专业的大中专以上学历, 工作五年以上的医生。

联系地址: 河北省邢台市巨鹿县富强北路中段 邢台市(巨鹿)痔瘘专业学校 中国巨鹿国际肛肠病研究会院内电话 0319—4333842 4338495 手机: 13930920719 18631919323

联系人: 刘华格医师