

· 药理 ·

超微六味地黄汤对老年痴呆大鼠认知功能和脑组织碱性成纤维生长因子表达的影响

易健, 刘柏炎, 蔡光先*

(湖南中医药大学省部共建中医内科学教育部重点实验室, 长沙 410007)

[摘要] **目的:**探讨超微六味地黄汤对老年痴呆(AD)模型大鼠学习记忆功能及碱性成纤维生长因子(bFGF)表达的影响,阐明超微六味地黄汤益智健脑的机制。**方法:**采用 β -淀粉样蛋白($A\beta_{1-40}$)脑内注射建立 AD 模型,将动物随机分为正常组、假手术组、模型组、中药超微六味地黄汤 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组,给予不同处理,于造模后 5,30 d 处死动物,评价动物的认知功能,RT-PCR 和 ELISA 检测 bFGF 表达水平。**结果:**造模后动物逃避潜伏期明显延长,治疗后中药组与模型组相比,逃避潜伏期明显缩短,差异均有统计学意义($P<0.05$);超微六味地黄汤组与假手术组比较,差异无统计学意义。正常大鼠脑组织有低水平 bFGF 基因和蛋白表达,造模后模型组和中药组表达增强,模型组、超微六味地黄汤 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组与正常组比较差异有统计学意义($P<0.05$),但两组间差异无统计学意义;治疗后超微六味地黄汤组 bFGF 水平维持在相对较高的水平,而模型组基本恢复至正常组水平,超微六味地黄汤组与模型组、正常组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论:** $A\beta_{1-40}$ 脑内注射后动物认知功能下降,超微六味地黄汤能促进其认知功能恢复,增强 AD 大鼠 bFGF 表达,是其益智健脑的可能机制。

[关键词] 认知功能;六味地黄汤;碱性成纤维生长因子;老年性痴呆

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0139-04

Study on Effect of Ultra-powder Liuwei Dihuang Decoction on Recognize and bFGF in Alzheimers Disease Rats bFGF

YI Jian, LIU Bai-yan, CAI Guang-xian*

(Ministry of Education Key Lab of Internal Medicine Constructed by Ministries and Provincial Governments, Traditional Chinese Medicine University of Hunan, Changsha 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of ultra-powder Liuwei Dihuang on recognition and basic fibroblast growth factor (bFGF) in Alzheimers disease rats, and the mechanism of ultra-powder Liuwei Dihuang promoting recognition. **Method:** The rat model of Alzheimer was established by Injection of $A\beta_{1-40}$, rats were randomly divided into normal group, sham group, model group, Chinese medicines group, then at 5 d and 30 d rats were executed to evaluate the recognizing function, bFGF was assayed by ELISA and RT-PCR. **Result:** After modeling, rat escape latency was significantly longer, there was significant difference between the model group and Liuwei Dihuang group at 30 day ($P<0.05$); there was not significant differences between sham-operated group and Liuwei Dihuang group. In the normal and sham-operated group rat brain had a low level bFGF, it was increased in model group and the Chinese medicines group at 30 day, there was significant difference between the model group and Liuwei Dihuang group at 30 day point ($P<0.05$); there was not significant differences between sham-operated

[收稿日期] 20110407(013)

[基金项目] 国家重点基础研究计划(973)课题(2010CB530402);国家自然科学基金(30873355);教育部博士点专项科研基金(20060541007);教育部重点项目(209087)

[第一作者] 易健,助教,从事心脑血管疾病及干细胞研究,Tel:15116312648,E-mail:yijian9657@163.com

[通讯作者] * 蔡光先,教授,博士生导师,从事中医药防治消化、心脑血管疾病研究,Email:lby1203@sina.com

group and Liuwei Dihuang group. **Conclusion:** Rat recognition was declined after injection of $A\beta_{1-40}$ intracerebral, ultra-power Liuweidihuang can promote recognitive function, can enhance bFGF expression in AD rat, which may be possible mechanism of yizhijianao.

[**Key words**] cognitive function; Liuwei Dihuang Tang; Alzheimer disease; basic fibroblast growth factor

阿尔茨海默病(Alzheimers disease, AD),即老年痴呆症,以进行性的记忆能力减退、认知功能障碍、行为异常为特征的原发性神经退行性疾病。该病发病率随年龄增长而逐渐上升,已成为继冠心病、癌症和脑卒中之后引起老年人死亡的第四大病因。六味地黄汤源于宋代钱乙的《小儿药证直决》,是滋补肝肾的传统名方,能健脑益智,临床研究发现其对 AD 患者有良好疗效,能有效改善患者生活质量^[1]。本研究拟观察补肾法代表方六味地黄汤对 β -淀粉样蛋白($A\beta_{1-40}$)所致 AD 模型动物学习记忆功能及碱性成纤维生长因子(bFGF)基因表达的影响,探讨超微六味地黄汤益智健脑的机制,为认知障碍疾患提供理论和实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康 SD 大鼠 80 只,雄性,清洁级,体重 220 ~ 250 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号(004535)。

1.2 药物 六味地黄汤源自《小儿药证直决》,由熟地黄、山药、山茱萸、泽泻、茯苓、丹皮诸药按 8:4:4:3:3:3 比例组成,药材购自湖南中医药大学附属第一医院药剂科,符合国家药典标准,由湖南省超微中药工程技术中心制备为超微制剂,按中心提供的方法制备药液,浓缩至含生药 $0.5775\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,冷藏备用。

1.3 试剂 $A\beta_{1-40}$ (Sigma 公司,博奥森分装 BS-0106P),Trizo 试剂盒 (Invitrogen 公司,批号 15596-026),两步法 RT-PCR 试剂盒 (大连宝生物公司,DRR019A),bFGF ELISA 试剂盒 (上海森雄科技实业有限公司,批号 SXR015)。

1.4 仪器 大鼠脑立体定向仪(淮北正华公司),Morris 水迷宫(实验动物中心提供),Multiscan MK3 型酶标仪(芬兰雷勃公司),DY89-1 型电动匀浆机(宁波新芝科器研究所),GIS-1000 数码凝胶图像分析系统(上海天能科技公司),GE-100 凝胶电泳仪,TC-48/T/H(a)基因扩增仪(杭州大和热磁电子有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 动物随机分为正常组、假手

术组、模型组、中药(1/3 超微六味地黄汤)组,每组每时间点 10 只。动物自术后 1 d 起 ig 给药 30 d,于术后 5,30 d 处死;中药组予 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 相应的药液 ig,每日 1 次(按体表面积换算相当于 60 kg 成人用量的 3 倍);其余动物均 ig 等体积无菌蒸馏水,自由饮食、活动。

2.2 阿尔茨海默病大鼠模型制作方法^[2] $A\beta_{1-40}$ 溶于无菌生理盐水($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$),用前 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育。以 10% 水合氯醛按照 $3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ip 麻醉,将麻醉后大鼠固定于脑立体定位仪上,剪去头顶部的毛,消毒后取顶部正中中线切开头皮(矢状切口),分离皮下组织充分暴露出前囟及其周围部分的颅骨,钻穿颅骨,注射针头挑破硬脑膜。选右侧海马齿状回(dentate gyrus, DG)背侧细胞带为注射区,定位坐标为前囟后 3.3 mm,右侧旁开 2.0 mm,硬脑膜下 3.0 mm,门齿钩平面低于耳间线平面 2.4 mm。微量注射器缓慢注入 $A\beta_{1-40} 1\text{ }\mu\text{L}$,在 5 min 内缓慢注完,注射完后留针 5 min,然后缓缓拔出微量进样器,用牙胶封住伤口,缝合头皮,将动物放回饲养笼内。术后给予青霉素 20 万 U/只,1 次/d,共 3 d,预防感染。假手术组操作同上,但注射等体积生理盐水。正常对照组不做任何处理。所有动物在分组前均进行行为学评分,符合迟到标准者纳入实验。

2.3 检测指标

2.3.1 一般情况观察 观察其外观、精神、毛发、饮食、开场行为(即,老鼠在新环境中探究活动,这些探究活动可通过动物在开场内行走、站立、理毛、排粪便等开场行为来观察)等变化。

2.3.2 学习记忆功能测验^[3] 进行 Morris 水迷宫实验。造模后及连续灌药 25 d 后,进行水迷宫训练 5 d,每天上午、下午各训练 1 次。训练至第 5 天,训练时选择一个入水点,将大鼠面向池壁放入水中,观察并记录大鼠寻找并爬上平台的所需时间(即逃避潜伏期)。如果大鼠在 120 s 未找到平台,需将其引入平台,这时潜伏期为 120 s。

2.3.3 大鼠脑组织 bFGF 含量检测 将冻于液氮中的脑组织取出,按照脑重:生理盐水 100 mg:2 mL

的比例 进行组织匀浆,4 ℃ 条件下,3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,取上清液保存。依试剂盒所提的方法,按步骤进行 ELISA 检测。

2.3.4 大鼠脑组织 bFGF mRNA 表达的检测 以 Trizol 法提取总 RNA。提取完成后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳来鉴定 RNA 的完整性。逆转录反应体系 10 μL,包括细胞总 RNA 1 μL,MgCl₂ 2 μL,10 × RT Buffer 1 μL,去核糖核酸分解酶蒸馏水(RNase free dH₂O) 3.75 μL,核酸混合物(dNTP mixture)1 μL,核糖核酸酶抑制剂(Rnase Inhibitor)0.25 μL,AMV 逆转录酶(AMV reverse transcriptase × 1)0.5 μL,寡聚胸腺嘧啶连接引物(Oligo dT-adaptor primer)

0.5 μL。反应条件为:30 ℃ 10 min,45 ℃ 30 min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min,1 cycles。PCR 引物根据 www.ncbi.nlm.nih.gov 基因库基因序列用软件 Primer5 自行设计 bFGF 和 β-actin 引物,由上海捷瑞生物工程公司合成。PCR 反应体系为 50 μL,包括逆转录产物 10 μL,10 μmol·L⁻¹ 的上、下游引物各 0.5 μL,5 × PCR buffer 10 μL,ddH₂O 28.75 μL,Taq HS 0.25 μL。引物序列和各自 PCR 反应条件见表 1。取 3 μL 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,采用凝胶图像分析仪进行吸光度扫描,应用 GIS-1000 数码凝胶图像分析系统观察条带的灰度强弱,结果以 bFGF 与 β-Action PCR 产物的电泳条带吸光度比值表示。

表 1 聚合酶链式反应引物序列、反应条件及扩增目的片段的大小

基因	引物序列	PCR 反应条件	片段长度/bp
β-actin	上游 5'-AGGGAATCGTGCCTGAC-3'	94 ℃ 45 s,53 ℃ 45 s,72 ℃ 50 s 35 个循环	443
	下游 5'-TGGAAGGTGGACAGTGAGG-3'		
bFGF	上游 5'-AAC GGC GGC TTCTTC CTG CG-3'	94 ℃ 45 s,52 ℃ 45 s,72 ℃ 50 s,35 个循环	363
	下游 5'-TCA GCT CTT ACC AGAGAT TGG-3'		

2.4 数据处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 统计软件包对数据进行统计分析,计量资料用方差分析,组间比较用 q 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 动物一般情况 造模前各组动物均反应良好,毛发顺滑亮泽,腹肌紧收,精神状态良好。假手术组大鼠行为在实验前后无明显改变。实验后期的模型组大鼠逐渐呈现激惹状态,体毛发黄枯燥、不顺泽,四肢和尾巴苍白、感觉比较凉,后肢肌肉显得有些干瘪、僵硬;中药组虽也有上述行为学改变,但表现不明显。

3.2 超微六味地黄汤对大鼠学习记忆功能的影响 通过 Morris 水迷宫检测大鼠逃避潜伏期,治疗前假手术组和正常组基本相当,中药组、模型组与假手术组和正常组相比,逃避潜伏期明显延长,具有显著性差异($P < 0.05$);治疗后中药组与模型组相比,逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$);中药组与假手术组比较,以上指标无显著性差异。见表 2。

3.3 超微六味地黄汤对 AD 大鼠脑 bFGF mRNA 表达、bFGF 蛋白表达的影响 正常大鼠脑组织有低水平 bFGF mRNA 表达,造模后模型组和中药组表达增强,模型组、中药组与正常组比较差异有统计学意

表 2 超微六味地黄汤对大鼠逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	逃避潜伏期/s	
		5 d	30 d
正常	-	35.6 ± 4.83	33.2 ± 5.90
假手术	-	34.7 ± 5.26	34.4 ± 6.14
模型	-	81.6 ± 7.31 ^{1,2)}	50.4 ± 7.42 ^{1,2)}
超微六味地黄汤	10	78.3 ± 7.18 ^{1,2)}	37.1 ± 7.80 ³⁾

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.05$;与假手术组相比²⁾ $P < 0.05$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

义($P < 0.05$),但 2 组间差异无统计学意义;治疗后中药组 bFGF mRNA 水平维持在相对较高的水平,而模型组基本恢复至正常组水平,中药组与模型组、正常组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

bFGF 蛋白水平与 bFGF mRNA 表达相似,造模后模型组和中药组表达增强,模型组、中药组与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),但 2 组间差异无统计学意义;治疗后中药组 bFGF mRNA 水平维持在相对较高的水平,而模型组基本恢复至正常组水平,中药组与模型组、正常组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 超微六味地黄汤对 AD 大鼠脑 bFGF mRNA 和蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	bFGF mRNA 相对量		bFGF 蛋白/ng·L ⁻¹	
		5 d	30 d	5 d	30 d
正常	—	0.24 ± 0.06	0.21 ± 0.05	20.3 ± 2.6	20.3 ± 2.6
假手术	—	0.30 ± 0.07	0.23 ± 0.06	22.1 ± 3.2	20.6 ± 1.8
模型	—	0.42 ± 0.06 ^{1,2)}	0.26 ± 0.03	26.8 ± 1.8 ^{1,2)}	23.2 ± 2.1
超微六味地黄汤	10	0.41 ± 0.03 ^{1,2)}	0.43 ± 0.08 ^{1,2,3)}	26.5 ± 2.3 ^{1,2)}	28.8 ± 1.9 ^{1,2,3)}

4 讨论

老年痴呆起病隐袭,逐渐发病,是以智能障碍为主的慢性进行性疾病。随着我国人口老龄化的日益严重,老年性痴呆越来越成为一个严重的社会问题,据报道老年期痴呆患病率在 6% ~ 9%^[4]。AD 是继心脏病、癌症、中风之后的第四位致死原因,因此加强其防治有着重要意义。目前对 AD 的确切病因、病机尚不清楚。大部分研究者认为在阿尔茨海默病中,由于 Aβ 蛋白浓度增加和聚集导致神经细胞的变性、丢失导致结构的破坏是引起患者认知障碍的原因^[5],因此,提高神经可塑性是治疗认知功能障碍的基础。

中医无老年性痴呆这一病名,根据其临床特点可归属于“善忘”、“呆病”等病证范畴,其发病多因年老体衰、饮食失节、情志失调、劳逸损伤等,导致心、肝、脾、肾多脏腑功能失调,中医学认为:“肾生髓,通于脑”,说明肾精是脑生成的物质基础,以肾虚为主的五脏虚衰是老年痴呆发生的内在机制^[6]。六味地黄汤是滋补肝肾的传统名方,能健脑益智,长期给予六味地黄汤可提高快速老化模型小鼠记忆获得和记忆保持能力,改善其空间记忆能力并部分改善其条件性回避反应能力^[7],但对其作用机制尚不明确。

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)是一种重要的细胞因子,对神经干细胞的增殖、分化有着重要的作用。bFGF 同样能促进 AD 脑内神经再生,如 AD 大鼠脑室内持续注射碱性成纤维细胞生长因子可刺激 AD 模型大鼠海马神经发生^[8],即使皮下注射 bFGF 也能透过血脑屏障,刺激大鼠海马神经干细胞增殖,修复受损组织,改善认知功能^[9]。除影响干细胞外,bFGF 还可干预 AD 发病的其他环节,如 bFGF 与 Aβ 竞争性地结合到硫酸乙酰肝素蛋白聚糖上的同一结合位点而拮抗 Aβ 的毒性;阻断因早老蛋白突变而启动的神经退化级联反应^[10]。可见,影响 bFGF 可多角度阻止 AD 的进展。

本实验研究发现,脑内注射 Aβ₁₋₄₀后动物认知功能下降,超微六味地黄汤能促进认知功能恢复,同时

能增强 AD 大鼠 bFGF 表达,结合我们以往的研究,我们认为六味地黄丸通过调控 bFGF 的表达来达到增加神经干细胞增殖,增强神经可塑性,从而达到提高动物的认知功能的目的。

[参考文献]

[1] 张丽军. 六味地黄汤加减治疗血管性痴呆 30 例[J]. 辽宁中医学院学报,2003,5(4):347.

[2] Kuo Y M, Liang K C, Chen H H, et al. Cocaine but not methamphetamine-associated memory requires de novo protein synthesis [J]. Neurobiol Learn Mem, 2007, 87:483.

[3] Fox G B, Fan L, Levasseur R A, et al. Sustained sensory/ motor and cognitive deficits with neuronal apoptosis following controlled cortical impact brain injury in the mouse [J]. J Neumtrauma, 1998, 15(8):599.

[4] 栗克清,江琴普,崔利军,等. 河北省城乡老年性痴呆的流行病学调查[J]. 中国健康心理学杂志,2008,16(11):1251.

[5] 苗建亭,李柱一,林宏,等. Aβ 氧化应激损伤在 Alzheimer 病大鼠发病中的作用[J]. 第四军医大学学报,2001,22(15):1378.

[6] 王平,张六通. 中医五神脏理论与老年痴呆发病机制探讨[J]. 中国中医基础医学杂志,1999,5(10):10.

[7] 周建政,张永祥,周金黄. 六味地黄汤对快速老化模型小鼠学习记忆能力的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志,1999,5(4):29.

[8] Calza L, Giuliani A, Fernandez M, et al. Neural stem cells and cholinergic neurons: Regulation by immunolesion and treatment with mitogens, retinoic acid, and nerve growth factor [J]. PNAS, 2003, 100(12):7325.

[9] 周思朗,陈俊抛,曹东林,等. 碱性成纤维细胞生长因子影响痴呆大鼠海马神经发生[J]. 中国现代医学杂志,2004,14(8):67.

[10] Mattson M P. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives [J]. Physiol Rev, 1997, 77(4):1081.

[责任编辑 聂淑琴]