

· 药理 ·

益肾化浊方对阿尔茨海默病模型大鼠海马区 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白表达的影响

王凯¹, 张琳琳², 宋宛珊², 林翠茹², 韩文文², 张玉莲^{2*}

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150)

〔摘要〕 目的:观察益肾化浊方对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠海马区脑源性神经营养因子(BDNF)及其酪氨酸蛋白激酶受体 B(TrkB)蛋白表达的影响,探讨益肾化浊方治疗 AD 的作用途径。方法:雄性 SD 大鼠随机分为 5 组,即假手术组、AD 模型组、益肾化浊方低、中、高剂量组。参照《大鼠脑立体定位图谱》,选取左侧侧脑室注射聚集态的 β -淀粉样蛋白 25-35 ($A\beta_{25-35}$),制备 AD 大鼠模型。造模成功后予益肾化浊方低、中、高剂量(2.8,5.6,11.2 g·kg⁻¹),每日灌胃 1 次,共灌胃 4 周。采用 Morris 水迷宫测试各组大鼠学习记忆能力,Western blot 法检测海马区 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白表达的变化。结果:与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期时间延长,穿越平台次数减少,海马区 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白表达显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,益肾化浊方低、中、高剂量组大鼠逃避潜伏期时间缩短,穿越平台次数增加,海马区 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白表达明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:益肾化浊方可能通过促进 AD 模型大鼠海马区 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白的表达,进而改善其学习记忆功能。

〔关键词〕 阿尔茨海默病; 益肾化浊方; 脑源性神经营养因子; 酪氨酸蛋白激酶受体 B

〔中图分类号〕 R285.5 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2015)05-0111-04

〔doi〕 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050111

Effects of Yishen Huazhuo Decoction on Expression of BDNF and Its TrkB Receptor in Hippocampus of Experimental Rat Model of Alzheimer's Disease WANG Kai¹, ZHANG Lin-lin², SONG Wan-shan², LIN Cui-ru², HAN Wen-wen², ZHANG Yu-lian^{2*} (1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300193, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 300150, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To observe the effect of Yishen Huazhuo decoction on express of brain derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase keceptor B (TrkB) in the hippocampus of experimental rat model with Alzheimer's disease and explore the mechanism of Yishen Huazhuo decoction. **Method:** Male SD rats were randomly divided into 5 groups, sham operation group, model group, low, middle and high dose group of Yishen Huazhuo decoction. According to the brain stereotaxic atlas of rats, animal model of Alzheimer's disease was established by injecting $A\beta_{25-35}$ into the left lateral ventricle. Treatment groups were given three different doses of Yishen Huazhuo decoction (2.8, 5.6, 11.2 g·kg⁻¹) within the next 4 weeks, once daily. The Morris Water Maze was employed to investigate the function of learning and memory in model rats. The effect of protein expression of BDNF and its TrkB receptor in the hippocampus were detected by means of Western blot. **Result:** Compared with sham operation group, models' learning and memory ability and the protein expression of BDNF and its TrkB receptor in the hippocampus were significantly lower ($P < 0.05$). Yishen Huazhuo decoction could significantly enhance the learning and memory ability and the protein expression of BDNF as well as its TrkB receptor in the hippocampus of the rats compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Yishen Huazhuo

〔收稿日期〕 20140915(016)
〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81273940);国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB530405)
〔第一作者〕 王凯,硕士,从事中医脑病治疗研究,Tel:15822947052,E-mail:wangkai19881023@163.com
〔通讯作者〕 * 张玉莲,医学博士,教授,主任医师,博士生导师,从事中西医结合防治脑病工作,E-mail:zhyl220@126.com

decoction could promote the protein expression of BDNF and its TrkB receptor in the hippocampus, and improve the learning and memory ability of the AD rats.

[**Key words**] Alzheimer’s disease; Yishen Huazhuo decoction; brain-derived neurotrophic factor; tyrosine kinase receptor B

阿尔茨海默病 (Alzheimer’s disease, AD) 是一种起病隐匿,以慢性进行性学习、记忆等认知障碍为主要临床特征的中枢神经系统退行性疾病。其病因及发病机制迄今尚不十分清楚,但脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 其酪氨酸蛋白激酶受体 B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 在发病中起重要作用, BDNF 和 TrkB 信号受损导致神经元营养减少和突触可塑性及记忆下降^[1], 现已成为 AD 的研究热点。本实验拟通过观察其对 AD 模型大鼠海马区 BDNF 及受体 TrkB 蛋白表达的影响,以期探讨益肾化浊方治疗 AD 可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠 50 只, SPF 级, 体重 200 g 左右, 购自北京大学医学部实验动物科学部, 合格证号 SCXK (京) 2011-0012。

1.2 药物及试剂 益肾化浊方组成: 女贞子 10 g, 淫羊藿 10 g, 补骨脂 10 g, 石菖蒲 12 g, 炙黄芪 10 g, 川芎 10 g。上述药物 4 340 g, 加 1 000 mL 水浸泡 12 h 之后加水 14 000 mL, 80 ℃, 30 min 超声, 过滤, 保存滤液, 滤渣按上述操作加水煎煮, 反复 3 次, 将滤液合并, 过滤, 滤液 100 ℃ 水浴加热, 浓缩至 7 000 mL, 生药质量浓度为 0.62 g·mL⁻¹。由天津中医药大学制剂中心制备, 药液置于 4 ℃ 冰箱保存。BDNF (abcam 公司, 批号 ab108319), TrkB (abcam 公司, 批号 ab74840), Aβ₂₅₋₃₅ (Sigma 公司)。

1.3 仪器 Neofuge 13R 型高速离心机 (Heal Force 上海力申科学仪器有限公司), W-754 型紫外-可见分光光度仪 (上海坤肯生物化工有限公司), -20 ℃ 低温冰箱 (Haier), DYCZ-22A 型垂直板电泳转移装置, WD-9405A 型恒温水浴摇床 (北京市六一仪器厂)。

2 方法

2.1 动物模型制备 β 样淀粉蛋白 25-35 (Aβ₂₅₋₃₅) 制备参照 Miguel A. 等^[2] 方法。模型参照杨晓娟等^[3] 方法, 5% 的水合氯醛 6 mL·kg⁻¹ 腹腔麻醉, 将鼠头固定在脑立体定位仪上保持前后囟在同一水平, 头顶部正中切口, 暴露前囟, 按大鼠脑立体定位图谱进行定位, 在前囟点后方 1.3 mm, 中线旁 2.0 mm, 用 5 mL 注射器针头钻一小孔, 垂直插入 10 μL

微量注射器, 深度为 4.0 mm (达侧脑室)。缓慢注射 5 μL 聚集态的 Aβ₂₅₋₃₅, 注射持续 10 min, 留针 10 min。注射完毕后, 缝合头皮, 术后肌肉注射青霉素每 4 × 10⁴ U·d⁻¹, 连续 3 d。假手术组予和 Aβ₂₅₋₃₅ 等量的生理盐水注入大鼠侧脑室。

2.2 分组与给药 采用随机数字表将 50 只大鼠分为 5 组, 即假手术组、模型组、益肾化浊方低、中、高剂量组, 每组 10 只。假手术组与模型组 ig 给予等体积生理盐水, 益肾化浊方低、中、高剂量组参照文献^[4] 为 2.8, 5.6, 11.2 g·kg⁻¹, 每日 ig 1 次, 共 ig 4 周。

2.3 大鼠海马区 BDNF、TrkB 蛋白表达检测 取大鼠海马裂解提取总蛋白, 测定蛋白浓度, 采用 Western blot 凝胶电泳, 转膜, 封闭, 一抗孵育, 4 ℃ 静置过夜。洗涤后加入二抗孵育, 充分洗涤后利用超敏 ECL 化学发光试剂盒, 借助凝胶成像系统观察相关蛋白的表达。图像结果采用 Image J 软件分析。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计分析软件分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经正态及方差齐性检验后, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 Morris 水迷宫检测 90 s 内定位航行试验逃避潜伏期实验结果显示: 5 d 实验中各组大鼠平均逃避潜伏期时间均有所下降, 提示在每天的训练试验中寻找平台能力均得到提高。其中模型组与假手术组比较, 时间显著增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。第 1 天中, 与模型组相比, 益肾化浊方低剂量组有缩短逃避潜伏期时间的趋势, 中、高剂量组能显著缩短逃避潜伏期, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。在随后的 4 d 中, 与模型组相比, 益肾化浊方低、中、高剂量组均能显著缩短逃避潜伏期, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

空间探索试验穿越平台次数结果显示: 与假手术组比较, 模型组大鼠 90 s 内穿越平台次数明显减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 与模型组相比, 益肾化浊方低、中、高剂量组均能显著增加大鼠穿越平台次数, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

见表 2。

表 1 各组 AD 大鼠定位航行试验逃避潜伏期实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Results of escape latency of each group of AD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	逃避潜伏期/s				
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
假手术	—	55 ± 9	58 ± 15	56 ± 15	54 ± 14	54 ± 12
模型	—	81 ± 4 ¹⁾	80 ± 4 ¹⁾	79 ± 5 ¹⁾	80 ± 5 ¹⁾	79 ± 6 ¹⁾
益肾化浊方	2. 8	79 ± 5	75 ± 3 ²⁾	73 ± 3 ²⁾	73 ± 5 ²⁾	70 ± 4 ²⁾
	5. 6	76 ± 2 ²⁾	74 ± 3 ²⁾	73 ± 2 ²⁾	72 ± 4 ²⁾	68 ± 3 ²⁾
	11. 2	76 ± 3 ²⁾	73 ± 3 ²⁾	69 ± 3 ²⁾	70 ± 3 ²⁾	66 ± 2 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0. 05$;与模型组比较²⁾ $P < 0. 05$ (表 2 ~ 3 同)。

表 2 各组 AD 大鼠空间探索试验中穿越平台次数结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Results of crossing platform of each group of AD rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	穿越数/次
假手术	—	5. 67 ± 0. 44
模型	—	1. 42 ± 0. 31 ¹⁾
益肾化浊方	2. 8	2. 49 ± 0. 30 ²⁾
	5. 6	3. 46 ± 0. 31 ²⁾
	11. 2	3. 56 ± 0. 32 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0. 05$;与模型组比较²⁾ $P < 0. 05$ 。

3. 2 海马区 BDNF、TrkB 蛋白表达 Western blot 结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠海马区 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白表达显著下降,差异具有统计学意义 ($P < 0. 05$);与模型组相比,益肾化浊方低、中、高剂量组大鼠海马区 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白表达明显升高,差异具有统计学意义 ($P < 0. 05$)。见表 3。

表 3 各组 AD 大鼠海马区 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Relative expression of BDNF and TrkB in hippocampus of each group of AD rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BDNF/ β -actin	TrkB/ β -actin
假手术	—	1. 47 ± 0. 06	1. 03 ± 0. 07
模型	—	0. 82 ± 0. 03 ¹⁾	0. 72 ± 0. 07 ¹⁾
益肾化浊方	2. 8	1. 18 ± 0. 09 ²⁾	1. 15 ± 0. 02 ²⁾
	5. 6	1. 18 ± 0. 03 ²⁾	1. 16 ± 0. 03 ²⁾
	11. 2	1. 32 ± 0. 04 ²⁾	1. 17 ± 0. 04 ²⁾

4 讨论

AD 属祖国医学“呆病”、“健忘”范畴,病位在脑,发病关键在肾^[5]。病机特点以肾精亏虚为本、

痰浊瘀阻于脑络为标,故治以补肾填精为主,祛痰化浊为辅切中病机。本研究所采用的益肾化浊方,方中女贞子补肝肾、益精髓;淫羊藿、补骨脂温助肾精;石菖蒲化痰开窍;黄芪补气行血;川芎辛散上行,三者共达化浊通络之效。诸药共奏补肾益髓、化浊通络、强神益智之功。前期临床研究发现该方对轻度 AD 患者具有较好的临床疗效^[6],同时本实验研究中发现益肾化浊方可明显改善 AD 模型大鼠学习记忆能力^[7]。

在神经系统中,学习记忆能力的形成与维持依赖于神经元突触(synapse)功能的正常发挥,突触是神经元之间在功能上发生联系的部位,也是信息传递和加工的基础环节,其中突触可塑性(synapse plasticity)长期以来被认为是学习和记忆活动的神经生物学基础^[8]。

BDNF 是神经营养蛋白家族的一员,广泛分布于大脑皮层、海马、杏仁体等区域,对神经元突触传递功能具有重要的促进作用。研究发现,AD 的病理解产物 $A\beta$ 沉积可导致 BDNF 神经调节功能障碍^[1],同时 BDNF 的缺乏会导致疾病晚期神经元变性、细胞凋亡以及胆碱能神经传递的丢失^[9-13],进而影响海马学习记忆能力,因此被认为是记忆形成过程的关键蛋白之一^[14-16]。

TrkB 是 BDNF 的最高亲和力受体^[17],二者结合,促使 BDNF 发挥生物学效应,通过增加突触密度进而调节海马突触可塑性与诱发长时程增强等机制,参与学习和记忆过程^[18-19]。

本研究结果表明,模型组大鼠海马区 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白表达下降,平均逃避潜伏期时间延长、穿越平台次数减少,提示 $A\beta$ 沉积导致了海马区 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白的分解,损伤了海马神经元突触功能,进而使其学习记忆能力减退。而采用益肾化浊方治疗后显著增加了海马区 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白表达,缩短平均逃避潜伏期时间、增加穿越平台次数,提示益肾化浊方改善 AD 模型大鼠学习记忆能力,可能是通过促进海马区 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白的表达,从而修复神经元损伤,提高突触可塑性实现的,为今后进一步深入研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] Jerónimo-Santos A, Vaz S H, Parreira S, et al. Dysregulation of TrkB receptors and BDNF function by amyloid- β peptide is mediated by calpain. [J] Cereb

Cortex, 2014, 23. pii:bhu105. [Epub ahead of print]

[2] Miguel A. Neurogenic effect of β -amyloid peptide in the development of neural stem cells. [J]. J Neuroscience, 2004,24(23) :5439-5444.

[3] 杨晓娟,张生林,陈芸,等. 新型复合式老年痴呆动物模型的建立[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2006,4(4) :318-320.

[4] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社,2002:911.

[5] 张于. 老年痴呆中医研究简史[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2012.

[6] 傅凯丽,林翠茹,张玉莲,等. “益肾化浊方”治疗轻度阿尔茨海默病 15 例临床研究[J]. 江苏中医药, 2012,44(8) :28-29.

[7] 张玉莲,崔远武,周震,等. 益肾化浊方对 SAMP8 小鼠学习记忆能力及海马神经元突触关键蛋白 CREB 的影响[J]. 中医杂志,2014,55(22) :1942-1946.

[8] Tang Y P, Shimizu E, Dube G R, et al. Genetic enhancement of learning and memory in mice [J]. Nature, 1999,401(6748) :63-69.

[9] Li N, Liu G T. The novel squamosamide derivative FLZ enhances BDNF/TrkB/CREB signaling and inhibits neuronal apoptosis in APP/PS1 mice [J]. Acta Pharmacol Sin,2010, 31(3) :265-272.

[10] Counts S E, Mufson E J. The role of nerve growth factor receptors in cholinergic basal forebrain degeneration in prodromal Alzheimer disease [J]. J Neuropathol Exp Neurol,2005, 64(4) :263-272.

[11] Tapia-Arancibia L, Aliaga E, Silhol M, et al. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease[J]. Brain Res Rev,2008,59(1) : 201-220.

[12] Fumagalli F, Racagni G, Riva M A. The expanding role of BDNF; a therapeutic target for Alzheimer’ s disease? [J]. Pharmacogenomics J,2006,6(1) :8-15.

[13] Phillips H S, Hains J M, Armanini M, et al. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer’ s disease[J]. Neuron, 1991,7(5) : 695-702.

[14] Petti Pang, Bai Ln. Regulation of late-phase LTP and long term memory in normal and aging hippocampus; role of secreted Proteins tPA and BDNF [J]. Ageing Research Reviews, 2004,3(4) :407-430.

[15] Keiko M, Karl P G. Hippocampus dependent memory formation; do memory type-specific mechanism exist [J]. J Pharmacol Sci, 2005,98(3) :191-197.

[16] 张卓,王廷华,朱榆红,等. NGF, BDNF 和 NT3 在 AD 大鼠海马中的分布及表达变化[J]. 四川大学学报: 医学版,2005,36(6) :789-791.

[17] Skup M, Dwornik A, Macias M, et al. Long-term locomotor training up regulates TrkB(FL) receptor-like proteins, brain derived neurotrophic factor, and neurotrophin 4 with different topographies of expression in oligodendroglia and neurons in the spinal cord[J]. Exp Neurol,2002,176(2) :289-307.

[18] Castello N A, Nguyen M H, Tran J D, et al. 7, 8- dihydroxyflavone, a small molecule TrkB agonist, improves spatial memory and increases thin spine density in a mouse model of Alzheimer disease-like neuronal loss [J]. PLoS One,2014, 9(3) :e91453.

[19] Lu B, Nagappan G, Lu Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. [J]. Handb Exp Pharmacol,2014, 220:223-250.

[责任编辑 聂淑琴]