

立论于肝脾同治研究逍遥散对老年性痴呆模型鼠行为学及神经可塑性的影响

李琼锋 杜义斌 赵 义

(云南省中医医院老年病科,昆明,650021)

摘要 目的:立论于肝脾同治研究逍遥散对老年性痴呆模型鼠行为学及神经可塑性生长相关蛋白(GAP-43)和突触素(SYN)的影响。方法:72只健康SPF级雄性大鼠,根据随机数字表法随机分为3组,假手术组、痴呆组和逍遥散组,每组各24只。痴呆组和逍遥散组进行老年痴呆AD大鼠的模型制备,假手术组:常规饲料饮水SPF级饲养;痴呆组:在空白组的基础上,给予等量0.2 mL/10 g 无菌生理盐水灌胃;逍遥散组:在空白组的基础上,逍遥散水煎液,给予0.2 mL/10 g 的逍遥散水煎液灌胃。1次/d,疗程6周。采用Y型迷宫进行大鼠的学习记忆行为检测,透射电子显微镜(TEM)观察海马CA1区突触结构,免疫组化检测海马CA1区生长相关蛋白(GAP-43)的表达情况,蛋白质印迹法(Western Blot)检测突触素(SYN)的表达情况。结果:1)与假手术组比较,痴呆组和逍遥散组中EN均增加($P < 0.05$),CN均减少($P < 0.05$);其中逍遥散组EN低于痴呆组($P < 0.05$),CN则高于痴呆组($P < 0.05$)。2)TEM下观察假手术组突触结构和形态正常,逍遥散组大鼠海马CA1区突触结构和形态均较痴呆组规则($P < 0.05$)。3)与假手术比较,痴呆组和逍遥散组GAP-43和SYN表达均下调($P < 0.05$),而逍遥散组中GAP-43和SYN的表达则高于痴呆组($P < 0.05$)。结论:逍遥散(肝脾同治)有效改善老年性痴呆模型鼠的学习记忆行为学和突触结构形态,其机制可能与上调了生长相关蛋白(GAP-43)免疫组化8和突触素(SYN)神经可塑性相关蛋白有关。

关键词 肝脾同治;逍遥散;老年性痴呆;行为学;神经可塑性

Effect of Xiaoyao Powder on Praxiology and Neural Plasticity in Rats with Alzheimer's Diseases from Simultaneous Treatment in Liver and Spleen Theory

Li Qiongfeng, Du Yibin, Zhao Yi

(Geratology Department, Yunnan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021, China)

Abstract Objective: To study the effect of Xiaoyao Powder on praxiology and neural plasticity of growth protein (GAP-43) and synaptophysin (SYN) in rats with alzheimer's diseases from simultaneous treatment in liver and spleen theory. **Methods:** Seventy-two healthy male SPF rats were randomly divided into 3 groups: sham operation group, dementia group and Xiaoyao Powder group, with 24 rats in each group. Rats in the dementia group and Xiaoyao Powder group had operation for senile dementia in AD model. Sham operation group received conventional feeding of grade SPF; dementia group was additionally treated with 0.2 mL/10 g sterile saline, while Xiaoyao Powder group received Xiaoyao Powder based on the blank group treatment and was given by 0.2 mL/10 g decoction lavage, once a day for 6 weeks. Y maze was applied for the study of learning and memorial behavior, and synaptic structure in hippocampal CA1 region was detected by transmission electron microscopy (TEM), immunohistochemistry was used to detect the expression of hippocampus CA1 growth protein (GAP-43), and Western blot (Western Blot) was applied to detect the expression of synaptophysin (SYN). **Results:** 1) Compared with the sham operation group, EN of the dementia group and Xiaoyao Powder group was increased ($P < 0.05$) and CN decreased ($P < 0.05$). EN in the Xiaoyao Powder group was lower than that of dementia group ($P < 0.05$) and CN was higher than that in senile dementia group ($P < 0.05$). 2) The structure and morphology of the synapses were observed in the sham operated group. The structure and morphology of CA1 in the hippocampus of the Xiaoyao Powder group were significantly lower than those in the dementia group ($P < 0.05$). 3) Compared with sham operation group, the expression of GAP-43 and SYN in the dementia group and the Xiaoyao Powder group were all down-regulated ($P < 0.05$), while the expression of GAP-43 and SYN in Xiaoyao Powder group was higher than that in dementia group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xiaoyao Powder (from simultaneous treatment for Liver and spleen theory) may effectively improve the learning and memorial behavior of senile dementia model rats and its synaptic structure form. Its mechanism may be related to the up-regulation of growth associated protein (GAP-43) immunohistochemistry 8 and synaptophysin (SYN) on neural plasticity associated protein.

Key Words Liver and spleen; Xiaoyao Powder; Alzheimer's disease; Praxiology; Neural plasticity

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.05.042

基金项目:云南省科技计划项目[编号:2015FB205(033)]

作者简介:李琼锋(1966.12—),女,本科,副主任医师,研究方向:老年常见病,E-mail:dlk5131568@sina.com

通信作者:杜义斌(1968.07—),男,硕士,主任医师,老年病二科主任,研究方向:老年常见病,E-mail:dybys@126.com

老年性痴呆即阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD),是机体大脑皮质不断退化而出现不同认知领域减退的中枢神经系统变性疾病,目前发病原因尚不明了。中医学患者年老体虚,气血津液亏虚,因虚致瘀,痰浊蒙窍,脑窍失养而出现此症,因此我们认为AD病因病机不外乎虚、瘀、痰三者。《素问》一书中描述到:“肝为将军之脏,喜调达而恶抑郁”,《临证指南医案·肝风》有“肝体阴而用阳”,《难经》曰:“脾藏二神意与智,意不安,思无虑,神夺愚也”,脾乃后天之本,气血生化之源,脾气健运气血生化有源则可上达濡养脑窍,下渗于肾以充髓海,因此我们认为治疗AD的核心在于肝脾两脏。《逍遥散》首载于《太平惠民和剂局方》一书,是肝脾同治之经典方,可通过土木同调,从而实现气血并治,则血充脑灵,气畅神安。我们在临床立论于肝脾同治理论,利用逍遥散治疗老年性痴呆,获得理想疗效,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 72只购于昆明楚商科技有限公司的健康SPF级雄性大鼠,平均体重(280 ± 21)g,饲养环境设置:室温 $23 \sim 25$ ℃,相对湿度(56 ± 6)%。

1.1.2 仪器 脑立体定位仪(北京拜安吉科技有限公司提供,型号:SR-5R),干粉剂(首都医科大学宣武医院多肽室提供),10%水合氯醛(武汉远成共创科技有限公司生产)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 根据随机数字表法随机分为3组,假手术组、痴呆组和逍遥散组,每组24只。老年痴呆AD大鼠的模型制备,10%水合氯醛按照大鼠体重腹腔注射麻醉(4 mL/kg),固定在大鼠脑立体定位仪上,常规备皮,分离暴露颅骨,参照包新民《大鼠脑立体定位图谱》在右侧前囟后 3.0 cm ,中线右侧 2.0 cm ,马克笔标记定点,用牙科钻钻开颅骨,微量注射器垂直进针 2.5 cm 定位海马区,缓慢注射 $5 \mu\text{L}$ 的凝聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$,凝聚态的制备是将 $\text{A}\beta_{1-42}$ 干粉剂溶于 2 g/L 的无菌生理盐水中。注射完以后留针 5 min 再出针并缝合皮肤。假手术组同上方法注入 $5 \mu\text{L}$ 的无菌生理盐水。

1.2.2 干预方法 1)假手术组:常规饲料饮水SPF级饲养;2)痴呆组:在空白组的基础上,给予等量 0.2 mL/10 g 无菌生理盐水灌胃;3)逍遥散组:在空白组的基础上,逍遥散(柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、生姜各 15 g 、薄荷 5 g)水煎获取逍遥散水煎液,

给予 0.2 mL/10 g 的逍遥散水煎液灌胃,1次/d,疗程为6周。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 老年痴呆行为学检测 治疗结束后,各组大鼠采用Y型迷宫进行大鼠的学习记忆行为检测,观察其学习记忆能力。将大鼠放于Y型迷宫中适应 5 min 熟悉环境,起步区,安全区等,开始试验后选择安静黑暗的环境,设定 75 V 电压,通电后若大鼠 10 s 内一次性跑到安全区,即为“正确反应”,否则为“错误反应”。安全区无规则变换,每次测试间隔 1 min ,连续测试重复,记录大鼠达到学会标准(10次中有9次为正确反应),错误反应次数(EN),越小学习能力越强;正确反应次数(CN),是学习测试 24 h 后,连续电击10次的记录,值越大记忆能力越强。

1.2.3.2 透射电子显微镜(TEM)观察海马CA1区突触结构 治疗后每组8只大鼠麻醉猝死,取脑分离大鼠海马CA1区,迅速用2%戊二醛和1%锇酸后固定 1 h ,常规脱水、固定和环氧树脂包埋,超薄切片机(LKB-8800,瑞典)切片,醋酸铀、柠檬酸铅双染色,透射电子显微镜(JEM-2100日本电子株式会社)下观察并拍片。

1.2.3.3 免疫组化检测海马CA1区生长相关蛋白(GAP-43)的表达情况 治疗后每组8只大鼠麻醉猝死,断头取脑,4%多聚甲醛固定,随后采用常规梯度酒精进行脱水,石蜡包埋后连续冠状切 $4 \mu\text{m}$ 厚度片。根据GAP-43免疫组化试剂盒(CST公司,美国),标准SP法操作,DAB显色,显微镜观察GAP-43的表达情况。

1.2.3.4 蛋白质印迹法(Western Blot)检测突触素(SYN)的表达情况 治疗后每组8只大鼠麻醉断头取脑放入液氮中,脑组织研磨提取蛋白上清液,BCA测定蛋白含量,计算上样量,配置SDS-PAGE蛋白电泳胶,常规电泳,转膜,封闭杂交和ECL曝光显影,扫描成像,用ImageLab进行图像分析。GAPDH作为内参。试剂均购于CST公司。

1.3 统计学方法 采用SPSS 18.0统计软件进行统计学分析,多组间采用单因素方差分析,两两比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠学习记忆行为学比较 与假手术组比较,痴呆组和逍遥散组中EN均增加($P < 0.05$),CN均减少($P < 0.05$);其中逍遥散组EN低于痴呆组($P < 0.05$),CN则高于痴呆组($P < 0.05$)。见表1。

2.2 TEM观察大鼠海马CA1区突触超微结构变化

TEM 下观察假手术组突触结构和形态正常,逍遥散组大鼠海马 CA1 区突触结构和形态均较痴呆组规则($P < 0.05$),逍遥组中突触前区分布均匀,小泡丰富,较少线粒体凝聚。见图 1。

表 1 各组大鼠学习记忆行为学比较($n, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	EN	CN
假手术组	24	40.12 ± 10.35	7.43 ± 1.36
痴呆组	24	73.45 ± 21.56*	4.12 ± 1.09*
逍遥散组	24	51.29 ± 9.67* [△]	6.37 ± 1.12* [△]
F		432.213	38.618
P		0.000	0.000

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与痴呆组比较,[△] $P < 0.05$ 。



图 1 TEM 大鼠海马 CA1 区突触超微结构变化(40 000 ×)

2.3 各组免疫组化 GAP-43 的表达情况 免疫组化 GAP-43 表达上痴呆组较假手术组阳性细胞数减低($P < 0.05$),而逍遥散组中 GAP-43 的阳性细胞数则高于痴呆组($P < 0.05$)。见图 2。

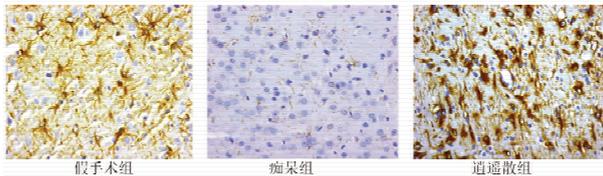


图 2 各组免疫组化 GAP-43 的表达情况(400 ×)



图 3 不同组别 Western Blot 条带结果

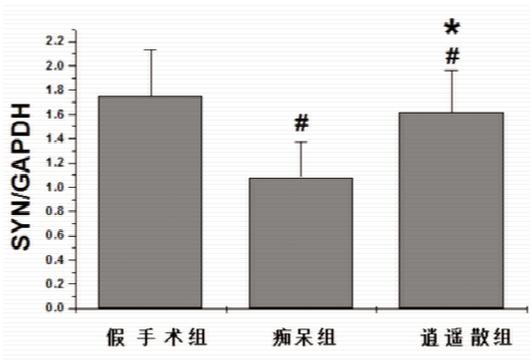


图 4 不同组别 Western Blot 灰度值结果

注:与痴呆组比较,* $P < 0.05$;与假手术组比较,[#] $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠 Western Blot 中 SYN 表达情况 与假手术比较,痴呆组和逍遥散组 Western Blot 中 SYN 表达均下调($P < 0.05$),而逍遥散组中 SYN 的蛋白表达则高于痴呆组($P < 0.05$)。见图 3、图 4。

3 讨论

《素问·经脉别论》一书中曰:“食气入胃,散精于肝,淫气于筋”,我们认为此句话应理解为食气入胃,透过脾的运化,将营养散播到全身。这体现了古代医贤认为脾为后天之本之观点,脾气健运,气血生化有源,饮食水谷精微不断输送至肝脏以滋养全身筋骨脉络,所以元代李杲在其《脾胃论·脾胃盛衰论》中描述:“百病皆由脾胃衰而生也”。现代解剖学资料证实被胃肠道所吸收的营养物质随之进入胃肠外血路,随后进入肝门静脉,部分营养物质停留于肝脏内以肝糖原形式储存,这就医圣张仲景“肝主筋,故胃散谷气于肝,则浸淫滋养于筋也”的观点一致,清末名医柳宝诒在其临床医册中记载:“血藏肝,而生于脾……滋润肝阴尤应培土,以补营血之源”,上述医贤的观点充分体现了肝脾同治的重要性^[1]。对大量传统医学文献进行研读,并根据循证医学研究结果我们认为 AD 的发生发展与肝脾两脏的病变密不可分,肝藏血主疏泄,与情志调节及思忆息息相关,精血同源,肝血充则髓海盈,若肝血亏虚不能涵养怒志而致情志失调,气机不畅而郁结成病,皆可发为痴呆。《难经》一书云:“脾藏意与智”,《医方类聚》亦有记载:“脾藏二神意与智”,脾乃后天之本,肾为后天之本,先天养后天,活力资助,后天养先天,培育充养,如若脾气亏虚,气血生化乏源,则上无法充盈脑窍,下无法培育肾精而髓海化生无源。此外,脾主运化,脾虚则水湿内停,痰浊丛生,肝失疏泄则气机散布不畅,导致气滞血瘀,上冲蒙于清窍,神明失养而成呆病。基于上述理论我们从肝脾同治着手探讨治疗 AD 的临床思路,以逍遥散为手段对 AD 模型大鼠进行治疗,结果显示逍遥散理想地提高了 AD 大鼠行为学习能力,这说明肝脾同治符合 AD 的治则。逍遥散源自《太平惠民和剂局方》,是疏肝调脾的经典名方,实现气血兼顾、肝脾同调的目的。方中柴胡疏肝解郁,肝气调达,处君药之位,当归养血和血,白芍养血敛阴,柔肝缓急,三药合用补肝体而助肝用,血和其肝和,血充则肝柔,当归联合白芍共为臣药以藏神魂,舍意智。木郁不达而致脾虚不运,故加白术、茯苓、甘草以益气健脾,既可实土以御木侮,又可充盈气血生化之源,以解蒙蔽,聪神明,共为佐药。方中加少许薄荷以加强悦神魂、畅情志之功,生

姜温运和中,辛散达郁,亦为佐药。诸药合用,气血并治,肝脾兼顾,使筋肉并健,清阳得升而气机得畅,精气上注则神明得安,气畅神安,脑脉得养,神聪自和,组方严谨,具有中药治疗 AD 的理论基础。

近年来随着分子生物学研究的日益深入,研究人员发现认知功能与神经元突触的可塑性关系密切^[2-4]。中枢神经系统的可塑性存在于各级环节,包括神经网络、突触连接以及神经环路等,其中突触是最不稳定因素,亦是可塑性的关键环节^[5-6]。最新研究显示 GAP-43 对神经的生长、再生以及突触形态、功能的维持有着重要作用,甚至被视为神经再塑的标志性因子^[7-8]。根据超微结构研究发现随着神经元的生长或再生,神经组织内有大量 GAP43 在突触组织合成,并分布于轴突生长锥质膜面中,不断刺激生长锥质膜面从而实现促进轴突生长的目的,胚胎时期 GAP-43 大量分泌以促进神经元生长发育,随着机体逐渐发育成熟 GAP43 浓度逐渐降低,但在新皮质、海马等组织 GAP-43 仍以较高水平分布于此^[9-10]。当修复受损脑组织时,侧枝长芽及反应性轴突再生均有 GAP-43 浓度的变化,在本研究中我们发现 AD 模型大鼠脑组织 GAP-43 浓度大量减少,而随着逍遥散的使用,AD 大鼠脑组织的 GAP-43 反应性增多,从而促进了神经元的不断修复,促进病情发育。在研究中我们同时检测了 SYN 的浓度变化,我们可以清楚观察到经过 AD 造模的大鼠 SYN 浓度急剧减少,而逍遥散组大鼠虽然 SYN 浓度较假手术组减少,但与 AD 组比较明显上调,这说明逍遥散改善 AD 模型大鼠认知可能还与改变 SYN 蛋白浓度有关。SYN 蛋白是突触前终末的特异性蛋白因子之一,其浓度变化直接体现了反应体内突触的数量及分布情况^[11-15],有研究人员利用医学手段改善痴呆大鼠脑血流的同时发现促进了新的树突和轴突生长,于此同时检测到 SYN 浓度随之上调,我们在研究中亦利用电镜对不同组别大鼠的突触超微结构进行观察,结果发现逍遥散组大鼠海马 CA1 区突触结构和形态均较痴呆组规则,逍遥组中突触前区分布均匀,小泡丰富,较少线粒体凝聚,与此同时我们利用 Western blotting 技术观察到 SYN 蛋白在随着突触形态改善的同时水平逐渐上调,因此我们有理由相信逍遥散通过增加 SYN 的表达从而促进突触重建。

通过一系列实验研究,我们发现逍遥散可改善 AD 模型大鼠的认知能力,于此同时,其明显修复了

突触的形态,而这一作用机制可能与上调 GAP-43 及 SYN 等突触相关性蛋白浓度有关。

参考文献

- [1] 汤川安.《内经》之肝脾同治论[J]. 中医文献杂志,2011,29(3): 25-28.
- [2] Baliotti M, Tamagnini F, Fattoretti P, et al. Impairments of synaptic plasticity in aged animals and in animal models of Alzheimer's disease [J]. *Rejuvenation Res*, 2012, 15: 235-238.
- [3] 符鹏程, 杨期东. 脑室注射链脲佐菌素对大鼠空间学习记忆能力及海马 CA1 区神经元数量和海马突触素表达的影响[J]. *神经解剖学杂志*, 2009, 25(3): 249-254.
- [4] 王威, 唐伟, 孙忠人. 电针对拟老年性痴呆大鼠学习记忆功能和海马 CA1 区突触可塑性的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(11): 2045-2048.
- [5] Gruart A, Muñoz MD, Delgado-García JM. Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(4): 1077-1087.
- [6] Li Y, Meloni EG, Carlezon WA, et al. Learning and reconsolidation implicate different synaptic mechanisms[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(12): 4798-4803.
- [7] Benowitz LI, Perrone-Bizzozero NI. The expression of GAP-43 in relation to neuronal growth and plasticity: when, where, how, and why? [J]. *Prog Brain Res*, 1991, 89: 69-87.
- [8] 赵宇红, 李芳芳, 曾宇. 芹黄素对 SAMP8 小鼠学习记忆及突触可塑性的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(15): 4113-4116.
- [9] 孙治坤, 陈生弟. 阿尔茨海默病的治疗[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2008, 28(5): 596-599.
- [10] 袁章, 杨拯, 徐艳, 等. 骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化及其在神经修复中的应用[J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(8): 766-769.
- [11] Hwang DH, Shin HY, Kim BG. Fortuitous benefits of activity-based rehabilitation in stem cell-based therapy for spinal cord repair: enhancing graft survival[J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(10): 1589-1590.
- [12] Yin Y, Zhou X, Guan X, et al. In vivo tracking of human adipose-derived stem cells labeled with ferumoxytol in rats with middle cerebral artery occlusion by magnetic resonance imaging [J]. *Neural Regen Res*, 2015, 10(6): 909-915.
- [13] Jahn R, Schiebler W, Ovimcte, et al. A 38000 · dalton membraneprotein (p38) present in synaptic vesicles [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, 82(12): 4137-4141.
- [14] Nadeau SE, McCoy KJ, Crucian GP, et al. Cerebral blood flow changes in depressed patients after treatment with repetitive transcranial magnetic stimulation: evidence of individual variability [J]. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol*, 2002, 15(3): 159-175.
- [15] Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(12): 1701-1710.