

肾脑复元汤对阿尔兹海默病大鼠海马区神经保护作用 及对碱性成纤维生长因子、脑源性神经 营养因子表达的影响

盛 望¹ 王瑾茜² 李旭华¹ 胡国恒¹

(1 湖南中医药大学第一附属医院,长沙,410007; 2 湖南中医药大学,长沙,410007)

摘要 目的:观察肾脑复元汤对阿尔兹海默病大鼠海马区神经细胞的作用机制。方法:选取健康雄性 SD 大鼠 120 只,按完全随机法分为:假手术组(侧脑室注射 3 μ L 蒸馏水),模型组(侧脑室注射 3 μ L β -淀粉样蛋白(A β)25-35 + 蒸馏水灌胃)、肾脑复元汤组(侧脑室注射 3 μ L β -淀粉样蛋白 25-35 + 肾脑复元汤灌胃)及对照组(侧脑室注射 3 μ L β -淀粉样蛋白 25-35 + 盐酸多奈哌齐灌胃),各组均各灌胃 1 次,分别于 7,14,21 d 3 个时相处死。观察 HE 染色、tunnel 染色及碱性成纤维生长因子(bFGF),脑源性神经营养因子(BDNF)的变化。结果:与模型组比较,中药组坏死程度较轻,且中药组(第 14 天)细胞凋亡程度较模型组减轻($P < 0.05$)。与模型组比较,中药组(第 7 天)bFGF, BDNF 表达上升($P < 0.05$)。结论:肾脑复元汤对 AD 病大鼠海马区神经具有修复的作用,且发挥作用主要在后期。其机制与促进海马区 BDNF 及 bFGF 表达有关。

关键词 阿尔兹海默病;肾虚血瘀证;神经保护;肾脑复元汤;碱性成纤维生长因子;脑源性神经营养因子;海马区;神经元

Effects of Shennao Fuyuan Decoction on Neuronal Protective Effect and bFGF, BDNF Expression in Rat Hippocampus of Alzheimer's Disease

Sheng Wang¹, Wang Jinxi², Li Xuhua¹, Hu Guoheng¹

(1 The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

2 Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Shennao Fuyuan Decoction on the influence and mechanism of nerve cell in rat hippocampus of Alzheimer's disease. **Methods:** A total of 120 healthy male SD rats were randomly divided into sham operation group (intracerebroventricular injection of 3 μ L distilled water,), model group (intracerebroventricular injection of 3 μ L A β 25-35 + distilled water administered intragastrically), Shennao Fuyuan Decoction group (intracerebroventricular injection of 3 μ L A β 25-35 + Shennao Fuyuan Decoction administered intragastrically) and the control group (intracerebroventricular injection of 3 μ L A β 25-35 + donepezil hydrochloride administered intragastrically). All the groups were administered intragastrically once and killed in 7, 14, 21 days. The changes of HE staining, tunnel staining and the levels of bFGF and BDNF protein were observed. **Results:** Compared with the model group, the degree of necrosis in the Chinese medicine group was mild, and the apoptosis in the traditional Chinese medicine group (14th day) was lower than that of the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of bFGF and BDNF increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in the Chinese medicine group (7th day). **Conclusion:** Shennao Fuyuan Decoction is effective on the repairing nerve of rat hippocampus of AD disease, and plays a role in later period. Its mechanism is related to promoting the expression of BDNF and bFGF in hippocampus.

Key Words Alzheimer's disease; Kidney deficiency and blood stasis syndrome; Neuro protection; Shennao Fuyuan Decoction; bFGF; BDNF; Hippocampus region; Neuron

中图分类号:R289.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.11.042

阿尔兹海默病(Alzheimer Disease, AD)以渐进性记忆和认知障碍为特征,是多种疾病病因引起的神经变性疾病。主要发生在老年人,俗称老年痴呆。其机制与大脑局部,尤其是海马区形成神经细胞外

以 β -淀粉样蛋白(A β)沉积为核心形成的老年斑有关。中医学认为脑髓是由肾精化生而成,肾精是脑髓形成的物质基础。在此基础上选药组方而成的肾脑复元汤是治疗脑疾病方面的有效方药^[1]。基于

此,本研究采用 A β 25-35 注入大鼠侧脑室制备 AD 大鼠模型,旨在为补肾经方-肾脑复元汤治疗阿尔茨海默病,重建神经功能提供实验依据,从而揭示从肾治脑法对阿尔茨海默病的作用机制,为临床防治阿尔茨海默病提供新的治疗靶点和方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选取健康雄性清洁级 SD 大鼠 120 只,体重(250 ± 50)g(湖南中医药大学实验动物中心提供)。许可证号 SYXK(湘)2015-0001。自由进食、饮水,温度 24 ~ 25 °C,湿度 22%,同等条件下分笼适应性饲养 1 周。

1.1.2 药物 肾脑复元汤:熟地黄 10 g、山茱萸 10 g、黄芪 30 g、山药 15 g、红景天 20 g、川芎 10 g、丹参 10 g、牡丹皮 10 g、赤芍 10 g、地龙 10 g、当归尾 10 g(均购于湖南省中医药大学第一附属医院)。

1.1.3 试剂与仪器 脑立体定向仪(Teolinc,型号:MD2000)石蜡切片机(Leica,型号:RM2255)台式离心机(Thermo Fisher,型号:7900HT)A β 25-35(Sigma,货号:#12941)兔抗 bFGF 试剂盒(Abcam,货号:ab106959)兔抗 BDNF 试剂盒(Abcam,货号:ab108319)试剂盒:TUNEL 试剂盒(Abcam,货号:ab66108)0.2% 溴酚蓝(Amresco,货号:0449-100G) β -actin 抗体(碧云填生物技术研究所,货号:H015)

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 除空白组(30 只)外,造模成功后将动物随机分为模型组(30 只)、肾脑复元汤组(30 只)、对照组(30 只)3 组。以上 4 组按处死时间分为造模后 1 周(7 d)、2 周(14 d)、3 周(21 d)3 个时相,每个组每个时相保证造模成功 10 只动物。采用立体定向仪下将 A β 25-35 注入大鼠侧脑室制备 AD 模型。将 A β 25-35 溶于无菌生理盐(4 g/L),用前 37 °C 孵育 1 周以上。腹腔注射水合氯醛 0.35 g/kg 麻醉动物。将大鼠固定于立体定位仪上,选双侧海马齿状回背侧细胞带为注射区。定位坐标为前凶后 3.0 mm,左侧旁开 2.0 mm,硬脑膜下 2.9 mm,门齿钩平面低于耳间线平面 2.4 mm。 β -淀粉样蛋白组以 10 μ L 微量注射器注射 β -淀粉样蛋白溶液 3 μ L(控制注射速度为 0.3 μ L/min),留针 5 min 以保证溶液充分弥散,然后缓慢撤针;假手术组以生理盐水注射于海马。

1.2.2 给药方法 模型组、假手术组每天灌胃 3 mL 蒸馏水,中药组选用肾脑复元汤,人临床用量为 125 g/d,按 11.25 g/kg 剂量灌胃;阳性对照药组选

用盐酸多奈哌齐,人临床用量为 5 mg/d,按 0.92 mg/kg 剂量灌胃。各组大鼠每天每组均各灌胃 1 次,直至处死。

1.2.3 指标检测与方法 取出脑组织,使用 4% 多聚甲醛内固定,取双侧端脑前 2/3,切片行 HE 及 TUNEL 染色,取双侧端脑后 1/3,放置于 -80 °C 冰箱储存备作 Western Blot,以检测碱性成纤维生长因子(basic Fibroblast Growth Factor, bFGF),脑源性神经营养因子(Brain Derived Neurotrophic factor, BDNF)蛋白的表达^[2]。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验进行 2 组间比较,多组比较采用单因素方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织学结果通过 HE 染色后显示,1 周后假手术组细胞排列规整,胞核居中,模型组可见梗死区细胞呈病灶性聚集,排列紊乱,病灶周围有炎性细胞浸润,水肿,坏死发生;中药组细胞排列较规整,坏死程度较轻,但仍然有炎性反应,水肿;对照组可见心肌细胞致密生长,且炎性反应,水肿较为轻。见图 1。

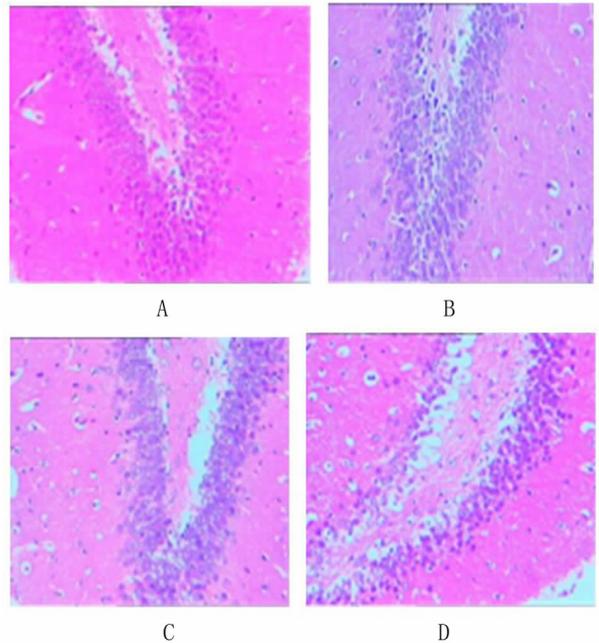


图 1 第 7 天时海马区细胞病理染色(HE ×)

注:A,B,C,D 分别指假手术组、模型组、中药组、对照组

2.2 凋亡细胞结果 通过 TUNEL 染色标记凋亡细胞,检测后显示,各组大鼠均有明显的细胞凋亡表现,但随时间推移凋亡逐渐减轻;中药组(第 14 天)、对照组(第 7、14 天)细胞凋亡较模型组减轻(*P* < 0.05);对照组第 7 天时凋亡较中药组减轻(*P* <

0.05)。见图 2。

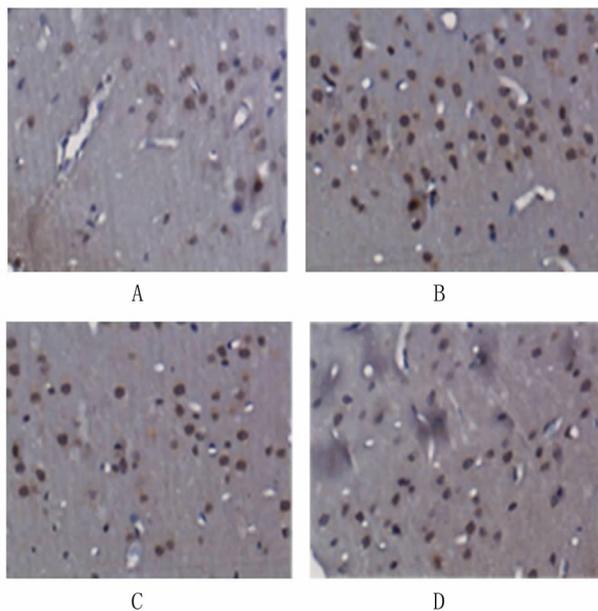


图 2 第 7 天时皮层细胞(TUNEL 染色 ×400)

注:A,B,C,D 分别指假手术组、模型组、中药组、对照组;箭头示凋亡细胞

表 1 第 7 天时各组大鼠海马区 bFGF, BDNF 的蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

组别	BDNF	bFGF
假手术组		
第 7 天	0.168 ± 0.032	0.156 ± 0.016
第 14 天	0.172 ± 0.026	0.159 ± 0.014
第 21 天	0.178 ± 0.016	0.152 ± 0.026
模型组		
第 7 天	0.184 ± 0.020	0.184 ± 0.012
第 14 天	0.168 ± 0.018	0.168 ± 0.014
第 21 天	0.178 ± 0.036	0.148 ± 0.018
中药组		
第 7 天	0.192 ± 0.015 *	0.190 ± 0.026 *
第 14 天	0.198 ± 0.018 *	0.189 ± 0.020 *
第 21 天	0.187 ± 0.012 *	0.176 ± 0.018 *
对照组		
第 7 天	0.204 ± 0.020 *	0.201 ± 0.018 *
第 14 天	0.192 ± 0.010 *	0.198 ± 0.020 *
第 21 天	0.184 ± 0.018 *	0.174 ± 0.014 *

注:与模型组比较, * $P < 0.05$

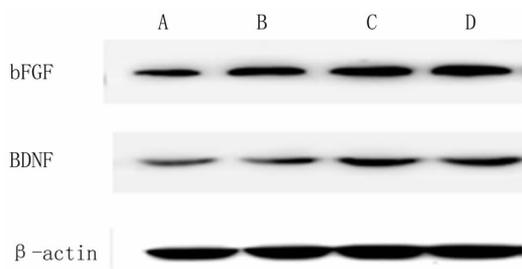


图 3 第 7 天时各组大鼠海马区 bFGF, BDNF 的蛋白表达

注:A,B,C,D 分别指假手术组、模型组、中药组、对照组

2.3 bFGF, BDNF 表达结果 大鼠造模后, bFGF, BDNF 表达较假手术组明显升高;与模型组比较, 中药组(第 7 天)、对照组(第 7 天) bFGF, BDNF 表达上升($P < 0.05$);中药组(第 14 天) bFGF, BDNF 表达较对照组上升($P < 0.05$)。见表 1, 图 3。

3 讨论

阿尔茨海默病(Alzheimer Disease, AD)的发病机制十分复杂,随着对 AD 研究的深入,有关 AD 诊断及治疗指南得到不断修改完善,但迄今其治疗仍是难点。目前对 AD 的治疗除心理社会干预及环境行为改善外,主要药物治疗还是与改善神经元突触的传递功能,或者保护胆碱能神经元免受兴奋性氨基酸毒性的破坏等方面有关,这也仅仅是暂时缓解患者认知功能的减退过程^[3]。目前药物治疗效果不理想,因此寻找有效的治疗方法迫在眉睫。中医学认为,AD 属于“呆证”“健忘”“痴呆”等范畴^[4]。《灵枢·海论》曰:“脑为髓之海”“髓海不足,则脑转耳鸣,眩暈,目无所视,懈怠安卧”。由于脑为元神之府,总统诸神,故 AD 病位主要在脑。而脑髓是由肾精化生而成,肾精是脑髓形成的物质基础。中医学认为脑髓是由肾精化生而成,肾精是脑髓形成的物质基础,其发病主要以肾虚为本,瘀血为标,本虚标实^[5]。因此,当活血化瘀同时,要考虑补肾生髓,即中医“标本兼治”。“治标”为活血祛瘀,“治本”补肾生髓。根据“肾脑同治”方论而成的肾脑复元汤是治疗 AD 的有效方药,具有益肾生髓、活血通络之功效^[6]。其组方为:干地黄 10 g、黄芪 30 g、山药 15 g、山茱萸 10 g、红景天 20 g、赤芍 10 g、牡丹皮 10 g、地龙 10 g、当归尾 10 g。经临床应用证明该方可明显改善 AD 患者的神经功能,提高临床疗效^[7]。

近年来,对神经营养因子家族在阿尔兹海默病中的治疗作用及机制引起广泛关注。有研究发现,神经生长因子能有效保护基底前脑胆碱能神经元受损伤导致的神经变性、改善空间记忆,因而有望成为治疗 AD 的有效途径。碱性成纤维生长因子(basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)及脑源性神经营养因子(Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF)同属神经营养因子家族,在 AD 病中对脑组织损伤修复起着重要的作用。是神经营养因子家族的一员^[8],有研究发现,AD 患者血液和中枢神经系统中 BDNF 的表达水平呈现持续下降的趋势。BDNF 可以调节神经元的存活、分化及可塑性^[9],并且这种能力是通过激活高亲和力受体 TrkB 和低亲和力受体 p75NTR 而实现。研究表明,通过降低 TrkB 从而减少 BDNF

信号可导致空间记忆受损,而 TrkB 表达的适度增加则可以增强记忆。这一系列研究表明, BDNF 可能在 AD 发病机制和治疗中发挥潜在作用^[10]。bFGF 属于 FGF 家族,是神经营养因子家族的一员^[11]。正常情况下,其在脑组织内含量较少,但在阿尔兹海默病后 bFGF 的表达明显增加。其可以通过促血管形成、促进神经生长、并抑制神经元凋亡^[12-13]。在生理和病理过程中起着重要的作用。近年来有研究发现, bFGF 能促进海马神经元的存活,减轻脑损伤引起的认知障碍,改善 AD 模型大鼠基底前脑、皮层和海马胆碱能神经纤维密度,提高学习记忆能力^[14]。

本研究结果表明,与模型组比较,肾脑复元汤可以明显改善细胞坏死,并促进脑梗死组织修复,抑制神经元凋亡,从而改善神经细胞的存活率;且观察到 BDNF 及 bFGF 的表达水平呈上升趋势,证明 BDNF 及 bFGF 参与了 AD 病神经细胞修复的过程。此外在第 7 天时, BDNF 及 bFGF 均呈高峰值,第 7 天后有所下降,证明 BDNF 及 bFGF 峰值期应在第 7 天左右。另外,在 AD 造模后早期(第 7 天)盐酸多奈哌齐疗效更加显著,在后期(第 14, 21 天),二者疗效差异无统计学意义,说明对照组西药盐酸多奈哌齐发挥治疗效应主要是在早期,而肾脑复元汤应在恢复期。这与中药“缓则治本”的原则相应。因此,本实验从动物实验角度初步揭示了肾脑复元汤可能的作用靶点,其作用机制可能与通过改善老年人的脑内环境促进神经营养因子的合成分泌,修复受损脑组织,从而改善神经功能有关。

参考文献

[1] 胡国恒,李映辰,程齐来,等. 肾脑复元汤对脑缺血大鼠 BDNF 及 bFGF 表达的影响[J]. 中成药,2015,37(10):2274-2278.

[2] 李映辰,王瑾茜,胡国恒,等. 基于 Calpain/p35-Cdk5/p25 通路探究肾脑复元汤联合 hUC-MSCs 干预对缺氧缺血神经元的保护作用[J]. 中华中医药杂志,2016,8(5):1874-1878.

[3] 张佳,宋立刚,孔卫娜,等. 红景天苷对 $A\beta_{1-40}$ 所致阿尔茨海默病模型大鼠认知功能改善作用及机制探讨[J]. 中国中药杂志,2012,37(14):2122-2126.

[4] 程书珍,王丽君,刘恒,等. 通经补肾复方对铝诱导阿尔茨海默病模型大鼠海马乙酰胆碱酯酶、胆碱乙酰转移酶、乙酰胆碱的影响[J]. 中国老年学杂志,2012,32(21):4673-4674.

[5] 范金茹. 王行宽临床经验集[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2012:21-23.

[6] 侯燕,郭家奎. 补肾中药激活内源性神经干细胞与阿尔茨海默病的治疗[J]. 吉林中医药,2011,31(8):753-754.

[7] 胡国恒,刘侃,王瑾茜等. 肾脑复元汤治疗缺血性中风临床疗效及对血液流变学的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(6):175-179.

[8] 李福胜,王静,何明大. 脑源性神经营养因子对阿尔茨海默病的作用[J]. 实用预防医学,2007,14(4):1320-1323.

[9] 陈树沙,李新毅,赵大鹏,等. 远志总皂苷增强鹅膏蕈氨酸诱导阿尔茨海默病大鼠的突触可塑性研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2012,19(6):449-452.

[10] 楚生辉,胡海燕,谭展望,等. 清心开窍方及皂苷对 AD 大鼠学习记忆能力及脑组织凋亡信号转导分子, $A\beta$ 及 β APP 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2012,37(19):2947-2950.

[11] 张海燕,刘忠锦,冯化杰,等. 天王补心丹对 AD 模型大鼠学习记忆及 PKC、 $A\beta$ 的影响[J]. 中国医学创新,2012,9(21):12-13.

[12] 程书珍,王丽君,刘恒,等. 通经补肾复方对铝诱导阿尔茨海默病模型大鼠海马乙酰胆碱酯酶、胆碱乙酰转移酶、乙酰胆碱的影响[J]. 中国老年学杂志,2012,32(21):4673-4674.

[13] 张松江,王建人,鄢力祥. 阿尔茨海默病中的 β -淀粉样蛋白和 Tau 蛋白[J]. 生命的化学,2012,32(3):254-258.

[14] 罗红波,石向群,杨金升,等. β -淀粉样蛋白诱导海马神经元自噬通路启动及二苯乙炔苷的干预[J]. 中华神经科杂志,2012,45(2):96-101.

(2017-10-05 收稿 责任编辑:杨觉雄)

法国塞纳市市长访问世界中联

2018 年 10 月 29 日,法国塞纳市市长 Francis Monchet 一行到访世界中联,世界中联副主席兼秘书长桑滨生、副秘书长陈立新参与会见。

桑滨生秘书长对 Francis Monchet 市长表示感谢,他指出世界中联-法国中医药中心得到了中国政府的支持,希望该中心的建设能利用中医药特色优势服务当地群众健康,将中医药传播到更广阔的空间。Francis Monchet 市长表示,通过此次访问,对世界中联有了更深入的认识,更加坚信中医药

会造福法国民众。塞纳市政府将会继续为该中医药中心的建设和运营提供最大的支持和帮助。

世界中联-法国中医药中心于 2018 年 5 月在法国塞纳市揭牌,得到了当地政府的大力支持,市长先生亲自出席了由世界中联于 5 月 16 日在联合国教科文组织主办的第六届中欧中医药国际合作与发展论坛,热情接待了“中医中药世界行”成员,并在世界中联-法国中医药中心揭牌仪式上发表讲话。