

补骨脂汤对血管性痴呆大鼠海马内 BDNF/TrkB、GAP-43 蛋白的影响

郑里翔* 郭慧君 崔志远 施 敏

江西中医学院基础医学院, 南昌市湾里区云湾路 18 号, 330004

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目(0610159); 江西省教育厅基金资助项目(Gjj09281);

江西省卫生厅基金资助项目(2008Z0028)

* 通讯作者: zlx000168@sina.com, (0791)7118921

[摘要] 目的 探讨补骨脂汤改善血管性痴呆大鼠学习记忆的作用靶点。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分成假手术组、模型组、银杏叶片组、补骨脂汤低剂量组(补低组)、补骨脂汤高剂量组(补高组), 每组 12 只, 制备血管性痴呆大鼠模型, 手术后第 3d 开始给药, 采用二维电泳分离海马内总蛋白, 用 ImageMaster 软件分析蛋白差异点, 用蛋白印迹法、免疫组化分析差异蛋白的表达量。结果 补高组、补低组总蛋白二维电泳的结果与模型组比较, 发现差异蛋白点 19 个, 其中与空间学习记忆相关的蛋白脑源性神经营养因子(BDNF)、生长相关蛋白-43(GAP-43)灰度比值及 TrkB 阳性细胞数补高组明显高于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 补骨脂汤可能通过提高 BDNF/TrkB、GAP-43 基因的表达水平, 改善和治疗血管性痴呆者学习记忆能力。

[关键词] 补骨脂汤; 血管性痴呆; 脑源性神经营养因子/TrkB 受体、生长相关蛋白-43

Influence of Buguzhi Decoction on BDNF/TrkB and GAP-43 in the Hippocampus of Vascular Dementia Rats

ZHENG Lixiang, GUO Huijun, CUI Zhiyuan, SHI Min

(College of Preclinical Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004)

ABSTRACT **Objective** To explore the acting targets of Buguzhi Decoction (Decoction of psoralea fruit) in improving the learning memory of vascular dementia (VD). **Methods** Sixty SD rats were divided into sham operation group, model group, ginkgo leaf tablet group, Buguzhi Decoction low dosage group, and Buguzhi Decoction high dosage group, 12 rats in each group. Medication was started since the third day after modeling. Two-dimensional electrophoresis was used to separate the total protein in the hippocampus of rats. Image Master software was adopted to analyze the differential protein spots, and protein molecularly imprinted method and immunohistochemical analysis were applied to detect the expression quantity of differential protein. **Results** The result of two-dimensional electrophoresis experiment shows that, there were 19 differential protein spots found in the total protein of the two Buguzhi Decoction groups, of them, the gray ratio between brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and growth associated protein-43 (GAP-43) relating to space learning memory and Trk positive cell count were significantly higher than those of the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Buguzhi Decoction improves the learning memory of VD rats possibly through increasing the expression level of BDNF/TrkB and GAP-43.

Key Words Buguzhi Decoction (Decoction of psoralea fruit); vascular dementia (VD); brain-derived neurotrophic factor/TrkB receptor; growth-associated protein 43 (GAP-43) gene expression

血管性痴呆(VD)是由一系列脑血管因素导致脑组织损害所引起的痴呆的总称, 为一种进行性疾病^[1]。中医辨证认为病位在脑, 涉及肝、肾、心、脾, 往往因虚致使痰瘀毒留于脑窍, 形成巢囊, 脑气与脏气不相接续而致病。故本课题组以此病因病机为依据, 经一系列的方药筛选, 发现补骨脂汤能明显改善 VD 大鼠的学习记忆^[2-4], 但其靶点目前尚不清楚。本课题经双向电泳, 发现与空间学习记忆相关的蛋白, 以此探讨该方的作用靶点, 为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与药物

选用清洁级 SD 大鼠 60 只(购于南昌大学医学院动物中心), 雌雄各半, 实验动物许可证号: SYXX(赣)2009-0001, 体重 160~180g。

补骨脂汤(由补骨脂 6g、熟地黄 15g、肉苁蓉 12g、当归 6g、人参 6g、白芍 3g、益智仁 5g、茯苓 6g、远志 2g、丹参 6g、川牛膝 6g、大枣 2 枚、生姜 3 片组成), 所有中药由江西中医学院附属医院药房提供并鉴定, 均属正品, 用煎煮液灌胃。银杏叶片(每片含

总黄酮醇苷 9.6mg, 萜类内酯 2.4mg), 扬子江药业集团有限公司生产, 批号: 07112001。

1.2 仪器与试剂

水迷宫实验装置(中国医学科学院药物研究所, 型号 DMS-2), 等电聚焦电泳仪 Ettan IPGphor、双向-SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳仪 Ettan DALTsix 大型垂直电泳系统、凝胶扫描仪 Image Scanner、图像处理软件 Image Master2D 均为 GE 公司产品, DPG-900 型凝胶图像分析系统(上海光都仪器设备有限公司, 型号 ZWZM-1), DYY-5 型电泳仪。Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司(批号: 1401902), PCR 引物由上海生物工程公司合成, 兔抗脑源性神经生长因子(BDNF)(批号: F-1407)、生长相关因子(GAP-43)(批号: bs-0154R)、TrkB(批号: bs-0175R)单克隆抗体购于北京博奥森生物有限公司, 辣根过氧化物酶标山羊抗兔 IgG 单克隆抗体(批号: 82580)、兔 SP-9001 检测试剂盒(批号: K82721E)、DAB 显色试剂盒(批号: 375230AJ)购于北京中杉金桥公司。

1.3 动物分组、模型制备与给药

按随机数字表法将 60 只大鼠随机分成 5 组, 分别为假手术组、模型组、银杏叶片组、补骨脂汤低剂量组(根据人和动物体表面积算法^[5], 以人的正常给药量计算为低剂量, 简称补低组)、补骨脂汤高剂量组(以人的正常给药量 2 倍计算为高剂量, 简称补高组), 每组各 12 只。

在造模前补高组、补低组用补骨脂汤灌胃 7 天, 第 8 天对 5 组大鼠进行手术造模, 用 2% 的戊巴比妥钠 40mg/kg 腹腔注射麻醉, 75% 酒精消毒颈前皮肤, 颈正中切口分离双侧颈总动脉穿线备用, 用无创动脉夹夹闭一侧颈总动脉 10min, 去夹后立即关闭另一侧颈总动脉, 每侧夹闭 1 次, 每次 10min, 去动脉夹撤线缝合皮肤^[2-3]。假手术组只进行颈总动脉的分离不夹闭血管, 各组手术造模后存活的大鼠, 苏醒后放回笼中饲养。

术后第 3d 开始给药, 银杏叶片组给药剂量 7.2mg/(kg·d), 补低组给药剂量 9.82mg/(kg·d), 补高组给药剂量 19.64mg/(kg·d), 每天 2 次, 连续 30d。而后进行 Morris 实验^[2-4]。实验完成后处死所有大鼠, 剥离海马。

1.4 蛋白样品制备

取海马组织 100mg, 加 3ml 抽提液(0.1mol/L

PMSF, 0.05mol/L DTT), 超声, 4℃、10500r/min 离心 10min。上清按 1:1 体积比加入 Tris-饱和酚, 室温混悬后 4℃、10500r/min 离心 10min, 保留酚相。在酚相中加入 0.1mol/L Tris-HCl(pH8.8)及 0.01mol/L DTT 后加入 4 倍体积甲醇(含 0.01mol/L 乙酸铵及 0.01mol/L DTT), -80℃沉淀后, 4℃、10500r/min 离心 10min。沉淀用预冷的 90%乙醇(含 0.01mol/L DTT)洗涤 2~3 次, 4℃、10500r/min 离心 10min。蛋白溶解在溶解液(8.5mol/L urea, 2.5mol/L thiourea, 5% CHAPS, 1% IPG Buffer, 0.1mol/L DTT)中, 室温混悬, 4℃、13000r/min 离心 10min, 上清即为蛋白质样本溶液。

1.5 双向电泳

分别将 18cm、pH3~10 的胶条放入 200μl(含 250μg 样本)水化液的泡胀盘持胶槽中水化过夜。水化过夜后的胶条转移到聚焦盘中, 按照仪器提供的程序进行升压: ① 500V, 500VH; ② 1000V, 800VH; ③ 6000V, 7000VH; ④ 6000V, 2200VH。等电聚焦结束后采用两步平衡法平衡胶条。平衡后进行第二维凝胶电泳。胶的浓度为 12.5%(26cm×20cm×1mm), 将平衡后的胶条放置于已聚合的聚丙烯酰胺凝胶胶面上, 用 6% 的琼脂糖封顶液封闭排除气泡。以恒定功率方式电泳, 20℃循环水冷却, 先 5W/gel 电泳 20~30min, 待溴酚蓝前沿进入凝胶约 2cm 时将电流加大至 17W/gel, 直至溴酚蓝前沿距离玻璃板下缘 1cm 时停止电泳。

1.6 二维凝胶电泳分析

银染色后的凝胶用 Image master Lab scan 扫描仪获取图像, 利用 Image Master 2D 凝胶图像分析软件读取二维图像数据, 以假手术组为参照胶, 选取表达水平相差 2 倍以上的蛋白质点进行分析, 得出模型组和补骨脂汤组海马差异蛋白。

1.7 蛋白印迹实验

取 20mg 海马组织剪碎后加入 0.5ml 裂解液, 放入匀浆器中充分混匀, 然后加入 1ml 抽提试剂充分混匀, 室温静置 10min, 12000r/min 低温离心 10min, 吸除上下层液体保留中间层蛋白膜, 干燥后加入 1%SDS 溶解紫外光吸收法测定蛋白浓度。取 80μg 总蛋白与等体积的 2×蛋白质上样缓冲液, 混合后煮沸 5min, 然后置于冰上快速冷却, 10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离胶 150V/90min, 浓缩胶电压 80V/30~40min, 蛋白分离后转膜, 100mA

40min,转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭液室温摇床封闭 2h,加入 1:200 兔抗 BDNF 单克隆抗体,1:100 兔抗 GAP-43 单克隆抗体,室温摇床孵育 2h。洗膜 3 次,每次 10min,1:2500 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体孵育 1h,洗膜, DAB 显色。凝胶成像仪测定灰度值,与 β -actin 的灰度值比衡量 BDNF、GAP-43 的蛋白质水平。

1.8 免疫组化

1.8.1 免疫组化方法 取动物海马组织,放入 4%多聚甲醛中固定 24h。石蜡切片常规烤片脱蜡至脱水,3%室温孵育 H_2O_2 10min,以消除内源性过氧化物酶的活性。微波炉抗原修复。滴加正常山羊血清工作液封闭(SP-9001 试剂盒,试剂 A),室温孵育 10min。倾去血清,滴加适当比例稀释的一抗(PBS 稀释 TrkB 1:200),4℃冰箱孵育过夜。滴加生物素标记二抗工作液(SP-9001 试剂盒,试剂 B),室温孵育 30min。滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液(SP-9001 试剂盒,试剂 B),室温孵育 30min。各步骤间除有说明外,均以 PBS 冲洗 3 次,每次 5min。DAB 显色,显微镜下掌握染色程度。苏木素复染。常规脱水透明,中性树胶封片,显微镜观察照相。PBS 代替一抗为阴性对照。

1.8.2 结果判定 以细胞核不染色,细胞浆内出现棕褐色颗粒为阳性染色。光镜下对每张切片取 5 个不重复视野,计数 5 个视野内的总细胞数和总阳性细胞数,再计数阳性细胞均数。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。计量资料组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠海马内蛋白的比较

各组大鼠海马蛋白质经双向凝胶电泳及银染后获得(851 $\pm$ 36)个蛋白点,以假手术组为参考胶,各组与之匹配,匹配率为(81 $\pm$ 4.3)%,用 ImageMaster 软件分析蛋白差异点,补低组、补高组海马内蛋白点无差异,两者与模型组比较共有 19 种差异蛋白,其中 13 点上调,6 点下调。搜索网上数据库中所有的已鉴定蛋白点,经相似性搜索的结果与本研究差异蛋白点进行对比分析(设定误差范围为: pI 为 ± 0.2 , Mr 为 $\pm 1kDa$),初步鉴定出 BDNF/TrkB、GAP-43 蛋白特性具有相似性,为验证此结论,进一步用蛋白印迹和免疫组化的方法分析。

2.2 各组大鼠海马内 BDNF、GAP-43 蛋白的比较

表 1 示,补高组海马内的 BDNF、GAP-43 基因表达的蛋白量明显高于模型组,且有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示补骨脂汤高剂量可提高 BDNF、GAP-43 基因的蛋白表达量。

表 1 各组大鼠 BDNF、GAP-43 基因表达的 mRNA 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	蛋白灰度比值		阳性细胞数 TrkB(个)
		BDNF	GAP-43	
假手术组	8	0.31 $\pm$ 0.08	0.41 $\pm$ 0.15	12.02 $\pm$ 2.64
模型组	11	0.27 $\pm$ 0.07	0.34 $\pm$ 0.06	9.77 $\pm$ 1.51
银杏叶片组	11	0.33 $\pm$ 0.08	0.40 $\pm$ 0.11	10.30 $\pm$ 1.74
补低组	10	0.38 $\pm$ 0.11	0.44 $\pm$ 0.10	10.97 $\pm$ 3.11
补高组	8	0.63 $\pm$ 0.23*	0.57 $\pm$ 0.12**	13.65 $\pm$ 3.85*

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.3 各组大鼠海马内 TrkB 蛋白表达的比较

表 1 示,银杏叶片组、补低组、补高组大鼠海马内的阳性细胞数均高于模型组,其中补高组与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$),提示补骨脂汤可提高 TrkB 基因的蛋白表达量。

3 讨论

VD 病理生理机制复杂,可能为多个环节相互影响。中医学在治疗 VD 方面采用多靶点、多环节干预手段,已经显示了一定的优势,并取得了一定进展,目前临床使用的诸多中医药疗法均有一定的疗效^[6-7]。补骨脂汤原载于《医醇贍义·卷二》,原书主治“则气馁,骨节无力,神情不安”。课题组经过近几年的研究发现,补骨脂汤具有明显改善痴呆大鼠的学习记忆功能。方中的补骨脂能补肾填精;人参大补元气,使气旺精足,安神益智;熟地黄养血滋阴,填精益髓;益智仁暖肾固精;肉苁蓉补肾阳、益精血;远志能安神祛痰开窍;大枣、当归具有益气作用;丹参有活血行气祛瘀通络之功效。诸药合用,具有补肾精、益气安神、活血化瘀的作用,达到醒脑开窍、精足气旺、脑髓充养的功效,从而使 VD 大鼠的学习记忆得到明显改善^[2-3]。

为进一步探讨该方的作用机理,本课题组采用双向电泳分离海马中所有蛋白,与数据库中的蛋白性质比较,发现补低组、补高组与模型组之间的 BDNF/TrkB、GAP-43 的蛋白存在差异,经蛋白印迹和免疫组化分析:补高组能明显提高 VD 大鼠海马内 BDNF/TrkB、GAP-43 基因蛋白表达水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示海马内 BDNF/TrkB、GAP-43 基因可能是该方作用的重要靶点。既往研究表明,

人参与的人参皂苷能使大鼠海马神经元的 BDNF 及 TrkB 蛋白表达上调,上调 BDNF 启动神经再生的相关基因 GAP-43 的表达,调节 GAP-43 或者其他神经再生相关因子的表达,促进神经再生,改善大鼠神经元对神经递质的摄取并不断完善其功能;而丹参具有较强的抗炎和免疫调节作用,有利于因缺血导致的神经组织损伤的修复和炎症的吸收,同时茯苓、远志等能够增加神经细胞内神经生长因子及其受体的表达^[8-10],综上所述,该方对海马中的 DNF/TrkB、GAP-43 基因表达的影响可能是通过多环节、多途径整合作用的结果,对于支持和维持神经元的存活、损伤神经元的恢复以及调节神经功能和神经可塑性有重要作用。

参考文献

- [1]陈晓琴,尹思源. 血管痴呆的中医和中西医结合治疗进展[J]. 中华实用中西医杂志, 2009, 22(1): 1377-1378.
- [2]郑里翔,汪敏,辛增平. 补骨脂汤对血管性痴呆大鼠海马内 C-FOS 基因表达及学习记忆的影响[J]. 中医药学刊, 2006, 24(5): 849-851.
- [3]郑里翔,汪敏,辛增平. 补骨脂汤对实验性血管性痴呆大鼠学习记忆行为学的影响[J]. 江西中医学院学报, 2007, 19(2): 83-84.
- [4]郑里翔,崔志远,郭慧君,等. 补骨脂汤对痴呆大鼠海马 NR2B、BDNF/TrkB 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 1007-1009.
- [5]徐彭,韩立明. 医学功能学科实验指导[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2007: 216.
- [6]刘淑云. 血管性痴呆的药物干预[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(3): 247.
- [7]魏居瑞,刘喆. 血管性痴呆相关研究及治疗进展[J]. 甘肃中医学院学报, 2008, 25(13): 53-54.
- [8]赖红,赵海花,曾亮. 人参皂苷对老龄大鼠海马结构 BDNF 及 TrkB 蛋白表达的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2006, 15(1): 60-65.
- [9]王玉珠,张均田. 认知功能和神经可塑性——调节神经可塑性是人参皂苷 Rg1 改善认知功能的基本机制[J]. 医药导报, 2007, 26(7): 702-704.
- [10]王岩峰,吕刚,李花. 神经干细胞移植对大鼠脊髓损伤后 BDNF 与 GAP-43 基因表达的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2004, 12(23): 1870-1872.

(收稿日期:2010-05-19;修回日期:2011-05-09)

[编辑:行之]



东华原—煎药机行业标准参与制定者

○ 专业品牌

煎药包装设备行业领军品牌,拥有多项国家专利(ZL02 2 53232.3 ZL 03 2 66107.X 等),6000多家医院、40000多家终端客户共同见证。

○ 专业资质

9大系列、30多个型号产品,覆盖了中药煎药包装行业全部领域,充分满足医院、药店、诊所等不同机构的不同需求。

○ 专业品质

通过ISO9001、ISO13458质量体系认证,德国CE产品安全质量认证,产品质量、服务及安全均已达到欧盟标准。

○ 专业服务

全国30多家分公司和办事处,100多位维修工程师,450多位服务人员,为您提供及时周到的“一站式”服务。



密闭两煎煎药机
(YJ20-GL)



十功能自动煎药机
(YJD20-GL)

北京东华原医疗设备有限责任公司

传 真: 010-89718021
网 址: www.donghuagroup.com
邮 编: 102200
地 址: 北京市中关村科技园区昌平园振超路1号

400-800-0258
800-810-0359