

开心散对 APP/PS1 转基因小鼠在体 LTP 和 PSD-95 表达的影响

狄亚琪， 桑旭星， 方 芳*
(北京中医药大学中药学院, 北京 100029)

摘要: **目的** 考察开心散(远志、人参、茯苓、石菖蒲)对 APP/PS1 转基因小鼠海马在体长时程增强(LTP)、海马 CA1 区 and 大脑皮层突触后致密蛋白-95(PSD-95)的表达的影响。**方法** 32 只 APP/PS1 雄性小鼠(3 月龄)随机均分为模型组、多奈哌齐 [0.75 mg/(kg·d)] 组、开心散 [1.5、3 g/(kg·d)] 组,另设 C57/BL6 小鼠为对照组,连续给药 3 个月。记录海马区穿通纤维通路(perforant pathway, PP)至齿状回(dentate gyrus, DG)的在体 LTP,免疫组化法观察小鼠海马 CA1 区、大脑皮层 PSD-95 的表达。**结果** 与对照组相比,模型组小鼠场兴奋性突触后电位(fEP-SP)斜率明显下降,海马 CA1 区、大脑皮层中 PSD-95 阳性细胞的平均光密度明显减少;而多奈哌齐、开心散可明显提高模型组小鼠 fEPSP 斜率。多奈哌齐能增加海马 CA1 区 PSD-95 阳性细胞的平均光密度,开心散 [1.5 g/(kg·d)] 可以增加海马 CA1 区、大脑皮层 PSD-95 阳性细胞的平均光密度,开心散 [3 g/(kg·d)] 能增加大脑皮层 PSD-95 阳性细胞的平均光密度。**结论** 开心散能促进 APP/PS1 转基因小鼠 LTP 形成,增强突触可塑性,可能与调节 PSD-95 蛋白表达有关。

关键词: 开心散; APP/PS1 转基因小鼠; LTP; PSD-95
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)03-0471-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.006

Effects of Kaixin Powder on LTP *in vivo* and expression of PSD-95 in APP/PS1 transgenic mice

DI Ya-qi, SANG Xu-xing, FANG Fang*
(School of Chinese Materia Medica, Beiing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore the effects of Kaixin Powder (*Polygalae Radix*, *Ginseng Radix et Rhizoma*, *Poria* and *Acori tatarinowii Rhizoma*) on hippocampal long-term potentiation (LTP) *in vivo* in APP/PS1 transgenic mice and expression of PSD-95 in hippocampus CA1 area and cerebral cortex. **METHODS** Thirty-two 3-month-old male APP/PS1 mice were randomly divided into model group, Donepezil [0.75 mg/(kg·d)] group, Kaixin Powder [1.5, 3 g/(kg·d)] groups. C57/BL6 mice were used as the control group. Kaixin Powder and Donepezil were administered to the APP/PS1 mice for three months, respectively. Afterwards, the LTP *in vivo* was recorded in a perforant pathway-dentate gyrus in the hippocampus. Immunohistochemical method was used for measuring the expression of PSD-95 in hippocampus CA1 area and cerebral cortex. **RESULTS** The fEPSPs slopes were significantly decreased in the model group as compared with the control group. Kaixin Powder or Donepezil treatment significantly enhanced the fEPSPs slopes in the model group. The average optical density of PSD-95 positive cells in hippocampus CA1 area and cerebral cortex was obviously decreased in the model group. Donepezil increased the average optical density of PSD-95 positive cells in hippocampus CA1 area. Kaixin Powder [1.5 g/(kg·d)] increased the average optical density of PSD-95 positive cells in hippocampus CA1 area and cerebral cortex. Kaixin Powder [3 g/(kg·d)] increased the average optical density of PSD-95 positive cells in

收稿日期: 2016-10-17
基金项目: 国家自然科学基金 (81373995)
作者简介: 狄亚琪 (1991—), 女, 硕士生, 研究方向为阿尔茨海默症。Tel: 13051169081, E-mail: dyq_qq@126.com
* 通信作者: 方 芳 (1972—), 女, 博士, 副教授, 从事中药防治神经退行性疾病的研究。Tel: 18611660822, E-mail: fangf1166@126.com

cerebral cortex. **CONCLUSION** Kaixin Powder can promote the LTP formation in APP/PS1 transgenic mice and enhance synaptic plasticity, which may be related to the regulation of protein expression of PSD-95.

KEY WORDS: Kaixin Powder; APP/PS1 transgenic mice; LTP; PSD-95

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以进行性认知功能降低为主要临床表现的神经退行性疾病。突触可塑性是学习记忆形成的基础, 海马长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 是反映突触可塑性和空间学习记忆过程中神经元生理活动的客观电生理指标, 突触后致密物 (post synaptic density, PSD) 是接受和整合突触信号并将其传导给突触后细胞的分子装置, 在突触可塑性中起重要作用; PSD-95 则是突触后致密物中含量丰富的脚手架蛋白, 对突触信号传导有重要作用^[1-2]。

开心散始见于唐代孙思邈《备急千金要方》, 由远志、人参、茯苓、菖蒲组成, 是中医益智养心、安神定志的基础方剂。研究结果提示, 其益智作用可能是通过直接作用于中枢学习记忆的生理过程, 尤其是海马与学习记忆活动有关的突触传递过程而发挥的^[3-4]。本课题前期研究证实, 开心散能改善 AD 老年痴呆 APP/PS1 转基因小鼠的认知功能。为更好阐明其作用机制, 本研究观察开心散对 APP/PS1 转基因小鼠海马 LTP 的影响和 PSD-95 蛋白表达的影响。

1 材料

1.1 药物与试剂 开心散复方各单味药材购自同仁堂, 由茯苓 (批号 20131120、20131228)、远志 (批号 20130921)、人参 (批号 20131109)、石菖蒲 (批号 20130704) 按处方比例 (2 : 1 : 1 : 1) 将药材粉碎, 8 倍量的蒸馏水浸泡 1 h, 煮沸提取 1 h, 收集提取液, 再加入 6 倍量的蒸馏水煮沸提取 1 h 后, 合并提取液, 旋转蒸发仪浓缩, 低温减压干燥制成粉剂, 1 g 相当于 5.02 g 生药。一抗 PSD-95 (英国 Abcam 公司, ab18258, 批号 GR208408-1); 二抗 K4002 (丹麦 Dako 公司, K4002, 批号 20024970); DAB (丹麦 Dako 公司, K5007, 批号 20024970); Image-Pro Plus 多功能真彩色细胞图像分析管理系统 (美国 Media Cybernetics 公司); RM2235 切片机 (德国 Leica 公司)。

1.2 动物 雄性 3 月龄 APP/PS1 转基因小鼠 32 只, 同月龄相同遗传背景 C57/BL6 小鼠 8 只, 体重 19 ~ 26 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司。许可证号 SCXK (京) 2014-0004, 实验过程

中动物自由摄食和饮水。

2 方法

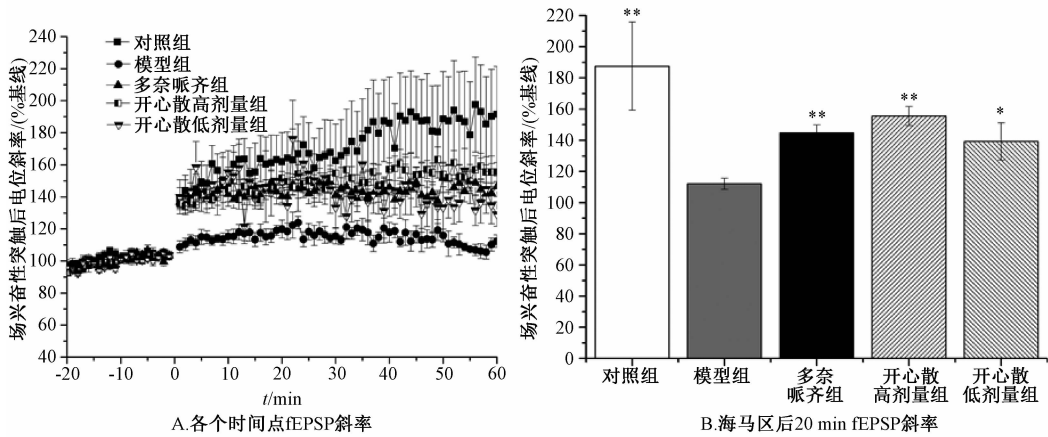
2.1 分组与给药 将 APP/PS1 转基因小鼠 32 只随机分为 4 组: APP/PS1 模型组, 多奈哌齐 [0.75 mg/(kg · d)] 组, 开心散高、低剂量 [3、1.5 g/(kg · d)] 组, 开心散、多奈哌齐组分别灌胃给予上述相应剂量药物, 模型组 APP/PS1 转基因小鼠和对照组给予等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续灌胃 3 个月。

2.2 APP/PS1 转基因小鼠海马 LTP 测定 动物麻醉 (乌拉坦, 腹腔注射, 1.5 g/kg) 后, 将头水平固定于立体定位仪 (SR-6N, Narishige, Japan) 上, 暴露颅骨, 以前囟和失状缝为基点, 记录电极下插至齿状回颗粒细胞层 (前囟后 2.0 mm, 中线旁开 1.4 mm, 硬脑膜下 1.5 mm), 刺激电极下插至前穿通纤维 (前囟后 3.8 mm, 中线旁开 3.0 mm, 硬脑膜下约 1.5 mm^[5]), 参比电极夹于头皮上。缓慢插入记录电极和刺激电极, 调整刺激强度至记录到的电位反应是最大值的 70%。记录 20 min 单脉冲刺激 (0.05 Hz, 波宽 0.1 ms) 诱导的反应作为基准值; 用比较接近生理变化的 theta 频率刺激 (theta burst stimulation, TBS) (参数为 30 个 5 Hz 的串刺激, 每个串刺激有 12 个 200 Hz 的单脉冲) 诱导 LTP。记录并保存刺激前 20 min 和刺激后 60 min 内的反应, 分析场兴奋性突触后电位 (field excitatory post synaptic potential, fEPSP) 的斜率。

2.3 PSD-95 蛋白的免疫组化检测 电生理实验结束后对实验动物进行麻醉, 经心脏快速灌注生理盐水, 用 4% 多聚甲醛灌注冲洗固定, 取全脑, 放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 脱水、包埋、切片, 操作按试剂盒说明书进行免疫组化染色, 切片脱蜡入水, 微波炉抗原修复, 3% H₂O₂ 室温静置 10 min, 滴加 I 抗 (1 : 200) 37 °C 孵育 2 h, 滴加 II 抗 37 °C 孵育 50 min, DAB 显色 3 ~ 5 min, 在显微镜下掌握染色程度, 自来水冲洗, 苏木精复染 2 min, 每次孵育前后 PBS 洗片, 盐酸酒精分化, 脱水、透明、封片、镜检。从各组小鼠海马相同层面的连续切片中选取 5 张, 在每张切片选取 5 个视野, 用 Image-Pro Plus 图像分析系统 (Media Cybernetics,

USA) 分析阳性细胞的平均光密度值 (AOD)。

2.4 数据分析与统计学处理 采用 Origin 9.0 软件 (Microcal Software, USA) 及 SAS 软件包 (Release 6.12, Sas institute Inc, USA) 对数据进行作图和统计学处理。数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 如数据符合正态分布, 组间平均 fEPSP 斜率相对值采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 多组比较用 SNK 检验。反之则用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 记录 20 min 稳定的基准值后, 给予 TBS 诱导的 LTP ($\bar{x} \pm s$, $n = 6 \sim 8$)

Fig. 1 LTP induced by TBS after recording a stable baseline for 20 min ($\bar{x} \pm s$, $n = 6 \sim 8$)

3.2 开心散对 APP/PS1 转基因小鼠海马 CA1 区 PSD-95 表达的影响 阳性反应细胞可见胞浆内有棕黄色的阳性反应颗粒, 部分临近胞膜处染色较深。对照组海马 CA1 区、皮层 PSD-95 阳性细胞密集分布, 呈圆形、椭圆形或三角形。与对照组小鼠比较, APP/PS1 模型组小鼠海马、皮层阳性细胞染色较浅, 平均光密度明显降低 ($P < 0.05$)。开心散 [1.5 g/(kg · d)] 能增加 APP/PS1 转基因小鼠海马 CA1 区和皮层阳性细胞数和平均光密度 ($P < 0.05$)。开心散 [3 g/(kg · d)] 能增加 APP/PS1 转基因小鼠皮层 PSD-95 表达 ($P < 0.05$), 也能增加海马 CA1 区 PSD-95 的表达, 但无统计学差异 ($P > 0.05$)。多奈哌齐能增加 APP/PS1 转基因小鼠 CA1 区 PSD-95 表达 ($P < 0.05$), 也能增加皮层区 PSD-95 的表达, 但无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 1、图 2 ~ 3。

4 讨论

研究表明, AD 患者脑海马神经元突触密度降低, 海马和皮质突触联系缺失的严重程度与 AD 的学习记忆障碍呈正相关, 提示脑内神经元的突触缺

3 结果

3.1 开心散对 APP/PS1 转基因小鼠海马 LTP 的影响 与对照组小鼠相比, TBS 刺激后, APP/PS1 模型组小鼠海马区各个时间点的 fEPSP 斜率显著降低 ($P < 0.01$); 与 APP/PS1 模型组小鼠比较, 多奈哌齐组, 开心散 [3、1.5 g/(kg · d)] 组小鼠海马区神经细胞在 TBS 后各个时间点 EPSP 的斜率显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 1。

表 1 开心散对 APP/PS1 小鼠海马 CA1 区、大脑皮层 PSD-95 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Tab. 1 Effect of Kaixin Powder on the expression of PSD-95 in hippocampus CA1 area and cerebral cortex in APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	剂量	平均光密度	
		海马 CA1 区	大脑皮层
对照组	—	0.031 ± 0.006	0.024 ± 0.005
模型组	—	0.015 ± 0.004 *	0.012 ± 0.004 *
多奈哌齐组	0.75 mg/kg	0.027 ± 0.004 [△]	0.020 ± 0.003
开心散高剂量组	3 g/kg	0.049 ± 0.024	0.030 ± 0.004 [△]
开心散低剂量组	1.5 g/kg	0.032 ± 0.003 [△]	0.025 ± 0.002 [△]

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$

失和突触可塑性的变化是 AD 学习记忆能力降低的生物学基础^[6]。突触可塑性包括结构和功能可塑性^[7]。LTP 是指神经通路在强直刺激 (tetanic stimulation, TS) 或其它特殊刺激作用后, 其神经突触传递效能长时间增强的现象, 是突触功能可塑性的表现形式, 测量神经核团 LTP 的最常用的参数为 fEPSP 的斜率。自从 1973 年 Bliss 和 Lomo^[8]首次报道海马 LTP 以来, 其作为研究学习记忆的一个重要模型而倍受关注, 并已广泛应用于学习记忆的生

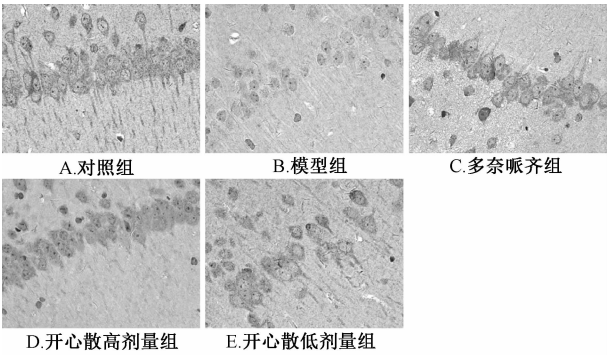


图 2 开心散对 APP/PS1 小鼠海马 CA1 区 PSD-95 表达的影响 (×400)

Fig. 2 Effect of Kaixin Powder on the PSD-95 expression in hippocampus CA1 area in APP/PS1 mice (×400)

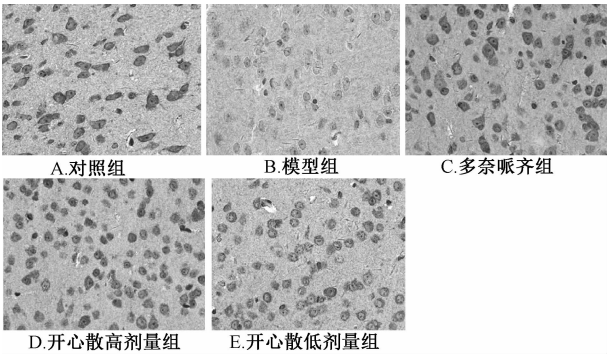


图 3 开心散对 APP/PS1 小鼠大脑皮层 PSD-95 表达的影响 (×400)

Fig. 3 Effect of Kaixin Powder on the PSD-95 expression in cerebral cortex in APP/PS1 mice (×400)

理学和药理学研究。已有大量文献报道多种 AD 模型动物在体和离体脑片海马 LTP 的降低^[9-10]。突触功能可塑性可通过影响突触前膜释放神经递质和突触后膜的反应性而改变。PSD 是突触后可塑性的结构基础,能帮助膜受体的锚定,调节粘附分子,离子通道和谷氨酸受体的转运和定位,控制神经传导和受体间的关系,最终决定突触反应^[1-2],是记忆形成和信息传递的重要区域。PSD-95 是 PSD 重要组成蛋白之一,介导结构蛋白和信号蛋白间的相互作用,可能是促进突触稳定性的关键蛋白^[11]。基因敲除实验证实,PSD-95 在突触结构组织的作用不可或缺^[12]。其异常表达及活性改变与阿尔茨海默病等神经退行性疾病相关^[13-14]。本研究结果显示,TBS 刺激后,对照组小鼠在各个时间点的 fEPSP 斜率明显增加,而 APP/PS1 转基因小鼠各个时

间点的 fEPSP 斜率明显低于对照组,海马 CA1 区及大脑皮层 PSD-95 蛋白表达下降,提示 APP/PS1 转基因小鼠海马突触可塑性明显受损,可能与其学习记忆能力的降低有关。

开心散为益气养心、安神定志之代表方剂,具有“主好忘”之功效,主要用于治疗心气不足,神志不宁,健忘失眠,心悸怔忡等证^[15]。现代药理研究表明,不同配比的开心散对多种模拟 AD 动物模型有改善学习记忆障碍的作用,其机制可能与改善中枢胆碱能系统功能、抗自由基与脂质过氧化、改善脑部血流量及促进 LTP 形成有关^[16]。

组成开心散的单味药中,人参和茯苓能显著增加阈下刺激引起的 LTP 的峰电位的幅度^[17]。本研究结果显示,开心散诱导和维持 TBS 刺激后 fEPSP 均高于模型组,提示其能增强 APP/PS1 小鼠海马 LTP 形成,改善突触功能可塑性。免疫组织化学结果也显示,开心散能显著增加 APP/PS1 转基因小鼠海马 CA1 区和皮层 PSD-95 蛋白的表达,提示其能改善 APP/PS1 小鼠突触结构可塑性。

上述研究结果表明,开心散可能通过促进 APP/PS1 转基因小鼠海马 LTP 的形成和增加 PSD-95 的表达,从而改善 APP/PS1 转基因小鼠突触可塑性损害。因参与突触可塑性形成的结构基础及分子机制非常复杂,开心散改善 APP/PS1 小鼠突触可塑性的作用是否与调节 LTP 的激酶、磷酸酶及突触后膜受体(NMDA-R、AMPA-R)等有关,特别是对突触形态的影响,还需进一步研究。

参考文献:

[1] Okabe S. Molecular anatomy of the postsynaptic density G[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2007, 34(4): 503-518.

[2] Sheng M, Kim M J. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms[J]. *Science*, 2002, 298(5594): 776-780.

[3] Zhang Y, Saito H, Nishiyama N, et al. Effects of DX-9386, a traditional Chinese medicinal prescription, on long-term potentiation in the dentate gyrus in rats[J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(10): 1337-1340.

[4] 尚伟芬,刘江云,齐云,等. 开心散有效部位对小鼠学习记忆功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2003, 9(2): 24-26.

[5] Gureviciene I, Ikonen S, Gurevicius K, et al. Normal induction but accelerated decay of LTP in APP + PS1 transgenic mice [J]. *Neuro Biol Dis*, 2004, 15(2): 188-195.

[6] Redman S. The hippocampus, long-term potentiation and memory[J]. *Clin Exp Pharmacol Psychol*, 1996, 23(10-11): 961-964.

[7] 陈燕. 神经元的突触可塑性与学习和记忆[J]. *生物化*

学与生物物理进展, 2008, 35(6): 610-619.

[8] Bliss T V, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path [J]. *J Physiol*, 1973, 232 (2): 331-356.

[9] Cullen W K, Suh Y H, Anwyl R, *et al.* Block of LTP in rat hippocampus *in vivo* by beta-amyloid precursor protein fragments [J]. *Neuroreport*, 1997, 8(15): 3213-3217.

[10] Chen Q S, Kagan B L, Hirakura Y, *et al.* Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid β -peptides[J]. *Neurosci Res*, 2000, 60(1): 65-72.

[11] Taft C E, Turrigiano G G. PSD-95 promotes the stabilization of young synaptic contacts[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014, 369(1633): 20130134.

[12] Kim M J, Futai K, Jo J, *et al.* Synaptic accumulation of PSD-95 and synaptic function regulated by phosphorylation of serine-295 of PSD-95[J]. *Neuron*, 2007, 56(3): 488-502.

[13] Nyffeler M, Zhang W N, Feldon J, *et al.* Different expression of PSD proteins in age-related spatial learning impairments [J]. *Neurobiol Aging*, 2007, 28(1): 143-155.

[14] 聂志玲, 周小莉. 补肾活血化痰方对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆的影响[J]. 湖北中医杂志, 2014, 36(7): 17-18.

[15] 王 欣. 开心散的源流与发展[J]. 山东中医药大学学报, 1997, 21(5): 393-394.

[16] 温 薇, 金在顺, 周 敏, 等. 开心散影响突触可塑性的研究进展[J]. 中医药学报. 2010, 38(2): 140-141.

[17] Smriga M, Saito H, Nishiyama N. Hoelen (*Poria Cocos Wolf*) and ginseng (*Panax Ginseng* C. A. Meyer), the ingredients of a Chinese prescription DX-9386, individually promote hippocampal long-term potentiation *in vivo* [J]. *Biol Pharm Bull*, 1995, 18(4): 518-522.

生姜泻心汤治疗伊立替康导致的结直肠癌小鼠迟发性腹泻

彭 罡, 关焕玉, 王小明, 何 洋, 覃文婷, 石 钺*
(中国医学科学院药用植物研究所, 北京协和医学院, 北京 100193)

摘要: **目的** 观察生姜泻心汤(生姜、干姜、黄连等)对伊立替康(CPT-11)导致的迟发性腹泻结直肠癌小鼠的治疗效果, 探讨其可能的作用机制。**方法** 采用氧化偶氮甲烷/葡聚糖硫酸钠(AOM/DSS)诱导的雌性结直肠癌小鼠模型, 随机分为正常组、模型组、生姜泻心汤组。生姜泻心汤组灌胃生姜泻心汤, 正常组和模型组均灌胃生理盐水, 检测腹泻指数、直肠病理形态, 测定 β -葡萄糖醛酸苷酶活性、白介素-15(IL-15)含有量和尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶1A1(UGT1A1)表达。**结果** 生姜泻心汤组腹泻指数显著低于模型组, 这可能与显著抑制 β -葡萄糖醛酸苷酶的活性, 提高血清IL-15的含有量和UGT1A1的表达有关。**结论** 生姜泻心汤对AOM/DSS诱导结直肠癌小鼠由伊立替康导致的迟发性腹泻有一定的治疗作用。

关键词: 生姜泻心汤; 伊立替康(CPT-11); 迟发性腹泻; 白介素-15(IL-15); 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶1A1(UGT1A1)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)03-0475-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.03.007

Shengjiang Xiexin Decoction treats irinotecan-induced delayed diarrhea in colorectal carcinoma mice

PENG Gang, GUAN Huan-yu, WANG Xiao-ming, HE Yang, TAN Wen-ting, SHI Yue*
(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

ABSTRACT: **AIM** To observe the therapeutic effects of Shengjiang Xiexin Decoction (*Zingiberis recens* Rhizo-

收稿日期: 2016-08-25
基金项目: 国家自然科学基金(81274054); 北京市自然科学基金(7142109); 国家重大新药创制专项(2012ZX09301002-001-028)
作者简介: 彭 罡(1984—), 男, 博士生, 研究方向为天然产物化学。Tel: (010) 57833255, E-mail: hedapgrain@126.com
* **通信作者:** 石 钺(1963—), 男, 研究员, 研究方向为中药及复方药效物质基础及其质量控制方法。Tel: (010) 57833270, E-mail: yshi@implad.ac.cn