

- [4] CHEN Q, QIN R, FANG Y, et al. Berberine sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin through miR-93/PTEN/Akt signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(3): 956-965.
- [5] YAN L, KUANG H, SHEN W, et al. Letrozole, berberine, or their combination for anovulatory infertility in women with polycystic ovary syndrome: study design of a double-blind randomised controlled trial[J]. *BMJ Open*, 2013, 3(11): e003934-e003944. DOI: 10.1136/bmjopen-2013-003934.
- [6] 田璐. 补肾化痰方对多囊卵巢综合征大鼠的影响及作用机制研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2016.
- [7] 陈琍琍, 李文艺, 刘安诺. 多囊卵巢综合征伴不孕临床治疗方法探讨[J]. *安徽医药*, 2014, 18(4): 681-683.
- [8] 杨志平. 达英-35联合二甲双胍治疗多囊卵巢综合征对激素、胰岛素抵抗的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2016, 31(5): 1015-1017.
- [9] 程小林, 郭伟伟, 解菁. 瘦素及胰岛素拮抗与多囊卵巢综合征不孕症相关性研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2014, 35(12): 1389-1391.
- [10] DING Y, ZHUO G, ZHANG C, et al. Point mutation in mitochondrial tRNA gene is associated with polycystic ovary syndrome and insulin resistance[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 13(4): 3169-3172.
- [11] GREENWOOD EA, PASCH LA, SHINKAI K, et al. Putative role for insulin resistance in depression risk in polycystic ovary syndrome[J]. *Fertility & Sterility*, 2015, 104(3): 707-714.
- [12] WU XK, WANG YY, LIU JP, et al. Randomized controlled trial of letrozole, berberine, or a combination for infertility in the polycystic ovary syndrome[J]. *Fertility & Sterility*, 2016, 106(3): 757-765.
- [13] LI Y, ZHANG C, ZHANG H, et al. Application of metabolomics in treating polycystic ovary syndrome with berberine based on ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Se Pu*, 2014, 32(5): 464-471.
- [14] KIM S, LEE J, YOU D, et al. Berberine suppresses cell motility through downregulation of TGF- β 1 in triple negative breast cancer cells[J]. *Cellular Physiology & Biochemistry*, 2018, 45(2): 795-807.
- [15] LI Y, MA H, ZHANG Y, et al. Effect of berberine on insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome: study protocol for a randomized multicenter controlled trial[J]. *Trials*, 2013, 14(5): 226-230.
- [16] 李慕白, 刘畅, 匡洪影, 等. 小檗碱对多囊卵巢综合征病人子宫内胰岛素信号分子的调节作用[J]. *中医药学报*, 2016, 44(2): 30-32.
- [17] 安媛, 张雅娟, 吕荟明, 等. 小檗碱对行体外受精-胚胎移植的多囊卵巢综合征患者临床、内分泌、代谢指标及妊娠结局的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(5): 459-462.
- [18] SKANDALIS SS, AFRATIS N, SMIRLAKI G, et al. Cross-talk between estradiol receptor and EGFR/IGF-IR signaling pathways in estrogen-responsive breast cancers: focus on the role and impact of proteoglycans [J]. *Matrix Biology*, 2014, 35(4): 182-193.
- [19] BERNUCI MP, LEITE CM, BARROS P, et al. Transitory activation of the central and ovarian norepinephrine systems during cold stress-induced polycystic ovary in rats [J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2013, 25(1): 23-33.
- [20] CHEN CI, HSU MI, LIN SH, et al. Adiponectin and leptin in overweight/obese and lean women with polycystic ovary syndrome [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2015, 31(4): 264-268.
- [21] RIZK NM, SHARIF E. Leptin as well as free leptin receptor is associated with polycystic ovary syndrome in young women [J]. *International Journal of Endocrinology*, 2015, 2015: 927805-927815. DOI: 10.1155/2015/927805.

(收稿日期: 2018-03-07, 修回日期: 2018-09-14)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.10.007

◇ 药学研究 ◇

梓醇对阿尔茨海默病大鼠模型大脑皮质保护作用

刘倩倩^a, 刘倩^a, 李文涛^b, 王金红^a, 曲梅花^a作者单位: 潍坊医学院, ^a应用药理学重点实验室, ^b机能学实验室, 山东 潍坊 261053

通信作者: 王金红, 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为神经药理学, E-mail: lwtwfm@sina.com

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2014HL106)

摘要: **目的** 观察梓醇对阿尔茨海默病(AD)大鼠模型大脑皮质的保护作用。**方法** 健康雄性Wistar大鼠36只, 体质量范围为250~300 g, 随机数字表法分为4组, 每组9只: 健康对照组、模型组、梓醇小剂量组、梓醇大剂量组。除健康对照组大鼠外, 其余组大鼠均行右侧脑室定位注射 β -淀粉样蛋白片段25-35($A\beta_{25-35}$)和腹腔注射D-半乳糖结合制备AD模型, 然后梓醇小剂量组大鼠注射梓醇 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 梓醇大剂量组大鼠注射梓醇 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 健康对照组和模型组大鼠注射等容积0.9%氯化钠水溶液, 连续腹腔注射给药7 d。Y-迷宫检测大鼠的学习指数, 苏木精-伊红(HE)染色和透射电镜观察AD大鼠皮层结构, 免疫组织化学染色观察大脑皮质胆碱能毒蕈碱受体 M_1 亚型(M_1 受体)的表达, 蛋白质印迹法(Western Blot)检测 M_1 受体蛋白的含量。**结果** 实验过程中模型组大鼠死亡1只, 最终模型组 $n=8$, 其余组均 $n=9$ 。与模型组比较, 从造模后第14天开始, 梓醇显著提高了大鼠的学习指数(第14天: 小剂量组 $t=3.267, P=0.0309$, 大剂量组 $t=4.648, P=0.0097$; 第21天: 小剂量组 $t=5.010, P=0.0074$, 大剂量组 $t=4.614, P=0.0099$), 第14天4组大鼠的学习指数分别为 (5.6 ± 0.2) , (2.6 ± 0.3) , (3.7 ± 0.5) , (4.4 ± 0.6) ; 第21天4组大鼠的学习指数各组分别为 (6.3 ± 0.8) , (4.1 ± 0.5) , (5.3 ± 0.4) , (5.8 ± 0.8) 。HE染色可见模型组大鼠大脑皮质结构有损伤性表现, 透射电镜检查见大脑皮质神经元细胞内线粒体、粗面内质网、核染色质等异常改变, 梓醇干预组神经元的结构显著

改善。免疫组织化学染色可见模型组大鼠大脑皮质 M₁受体染色浅,神经元数目减少, M₁受体蛋白表达下调,梓醇能够显著上调 M₁受体蛋白表达(与模型组比较,小剂量组 $t = 3.983, P = 0.016 4$;大剂量组 $t = 6.694, P = 0.002 6$),4组大鼠 M₁受体蛋白表达分别为 100%,64.75%,74.63%,85.74%。结论 梓醇能够改善 AD 大鼠大脑皮质结构异常,升高 M₁受体表达。

关键词:阿尔茨海默病; 梓醇; 大脑皮质; 受体,毒蕈碱 M₁; 迷宫学习; 大鼠,Wistar

The protective effect of catalpol on cerebral cortex in an Alzheimer's disease rat model

LIU Qianqian^a, LIU Qian^a, LI Wentao^b, WANG Jinhong^a, QU Meihua^a

Author Affiliation: ^aKey Laboratory of Applied Pharmacology, ^bFunctional Laboratory,
Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China

Abstract: Objective To observe the protective effect of catalpol on cerebral cortex in an Alzheimer's disease (AD) rat model.

Methods Thirty-six male Wistar rats, weighing 250-300 g, were used and assigned into 4 groups according to random number table method, 9 rats in each group. The groups included the normal control group, the model group, the low-dose catalpol group and the high-dose catalpol group. Except for the rats in normal control group, the rats in other groups were prepared by injection of A β_{25-35} in the right ventricle and D-galactose intraperitoneally. The low-dose catalpol group was injected with 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ of catalpol, and the high-dose catalpol group was injected with 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ of catalpol. The normal control group and the model group were injected with the same volume of 0.9% sodium chloride solution intraperitoneally once a day for 7 days. Study index of rats was observed by Y-maze test, cortex structure of AD rats observed by Hematoxylin-eosin (HE) staining and electronic microscope, expression of M₁ subtype of muscarinic cholinergic receptors (M₁ receptor) in cerebral cortex observed by immunohistochemical staining, and protein content of M₁ receptor detected by Western Blot. **Results** A rat in the model group died during the study and there were 8 rats left in the group while there were 9 rats in each of the other groups. Compared with the model group, the study index of the rats increased significantly from the 14d (day 14: as for low-dose catalpol group $t = 3.267, P = 0.030 9$, as for high-dose catalpol group $t = 4.648, P = 0.009 7$; day 21: as for low-dose catalpol group $t = 5.010, P = 0.007 4$, as for high-dose catalpol group $t = 4.614, P = 0.009 9$). At day 14, the study indexes of rats in the 4 groups were (5.6±0.2), (2.6±0.3), (3.7±0.5), (4.4±0.6) respectively, and the study indexes turned to (6.3±0.8), (4.1±0.5), (5.3±0.4), (5.8±0.8) respectively at day 21. Abnormalities were found in cortex structure by HE staining, and ultrastructure changes of mitochondria, rough endoplasmic reticulum, nuclear chromatin were observed by transmission electron microscope, while the structure of the neuron was significantly improved in catalpol groups. Immunohistochemical staining results showed that the expression of M₁ receptor in the cerebral cortex of rats decreased, the number of neurons decreased, and the expression of M₁ receptor protein was down-regulated. Catalpol could increase the expression of M₁ receptor protein significantly (compared with the model group, catalpol low dose group $t = 3.983, P = 0.016 4$ in the low-dose catalpol group; $t = 6.694, P = 0.002 6$ in the high-dose catalpol group). The expressions of M₁ receptor protein in rats from 4 groups were 100%, 64.75%, 74.63%, and 85.74% respectively. **Conclusion** Catalpol could improve the abnormal structure of cerebral cortex in AD rats and increase the expression of M₁ receptor.

Key words: Alzheimer disease; Catalpol; Cerebral cortex; Receptor, muscarinic M₁; Maze learning; Rats, wistar

神经退行性疾病阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的主要临床病征包括进行性学习记忆功能下降、认知功能损害等,对病人、家庭和社会危害严重^[1-3],积极探索有效的治疗药物成为近年来重要的研究方向。梓醇是中药地黄的主要有效成分之一,大量研究证明其有神经保护作用^[4]。我们前期的研究表明梓醇改善 AD 大鼠学习记忆能力,其作用机制与胆碱酯酶无关^[5],但可提高 AD 大鼠模型脑内降低的胆碱乙酰基转移酶 (choline acetyl-transferase, ChAT) 活性^[6]。本实验于 2016 年 5 月至 2018 年 2 月实施,探讨了梓醇对大鼠大脑皮质结构和胆

碱能毒蕈碱受体 M₁ 亚型 (M₁ 受体) 表达的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 无特定病原体 (SPF) 级健康雄性 Wistar 大鼠, 体质量范围为 250~300 g, 购于山东鲁抗医药股份有限公司, 医学实验动物合格证号: No.0010061, 许可证号: SCXK(鲁)20140007。饲养条件: 温度范围为 20~25 ℃, 湿度范围为 50%~60%, 自然昼夜节律光照, 自由进食和饮水。本研究符合一般实验动物伦理学原则。

1.1.2 实验药品及试剂 梓醇购自北京索莱宝科技

有限公司(批号20161124); β -淀粉样蛋白片段25-35($A\beta_{25-35}$)购自Sigma公司(批号050M4765);D-半乳糖为国药集团化学试剂有限公司产品(批号20150615);抗 M_1 受体抗体购自上海江莱生物科技有限公司;辣根酶标记的羊抗兔二抗购自美国Protein-tech公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;四甲基乙二胺(TEMED)购自碧云天生物技术有限公司;超敏ECL化学发光即用型底物和DAB试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制备及行为学检测 侧脑室内注射用 $A\beta_{25-35}$ 溶液的配制:无菌0.9%氯化钠水溶液稀释 $A\beta_{25-35}$ 至2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内孵育1周置4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。D-半乳糖用无菌0.9%氯化钠水溶液配成20 mg/mL 溶液置4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。参考文献[7]方法制作AD大鼠模型。大鼠腹腔注射2%D-半乳糖50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,连续6周。腹腔注射D-半乳糖第3周的第1天侧脑室内定位注射 $A\beta_{25-35}$:大鼠术前禁食不禁水12 h,腹腔注射水合氯醛麻醉,固定于脑立体定位仪,剪去手术区毛发,皮肤常规消毒,沿颅顶中线切开头皮约2 cm ,分离骨膜,暴露颅骨和前囟。参照《大鼠脑立体定位图》^[8],右侧侧脑室定位于前囟后1.0 mm ,右侧1.8 mm ,硬膜下3.8 mm ,钻开颅骨,暴露硬脑膜,用微量注射器垂直进针,缓慢注入 $A\beta_{25-35}$ 5 μL 即10 μg ,注射过程持续5 min ,留针3 min ,缓慢拔针。

Y-迷宫实验检测大鼠行为学,学习指数降低表明模型制作成功。

1.2.2 动物分组及取材 造模后的大鼠按照体质量编号后按随机数字表法分组,每组9只:健康对照组、模型组、梓醇小剂量组、梓醇大剂量组。梓醇小剂量组和梓醇大剂量组大鼠分别给予梓醇5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,健康对照组和模型组大鼠注射等容积0.9%氯化钠水溶液。均腹腔注射给药,从侧脑室注射 $A\beta_{25-35}$ 完毕次日开始给药,连用7 d。

大脑皮质取材:实验结束时麻醉大鼠,立即断头,于冰上开颅迅速取出脑组织,电镜检测取材找到右侧大脑皮质,不同大鼠尽量在皮层相同部位,取约1 $\text{mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 小块,放入3%戊二醛中,置4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱固定进行电镜观察,其余脑组织立即放入液氮准备进行蛋白质印迹法(Western Blot)检测。左侧大脑皮质取下后放入4%多聚甲醛固定,然后依次进行常规脱水透明、浸蜡、包埋,切片厚度5 μm ,制成石蜡切片,进行苏木精-伊红(HE)染色和免疫组织化学染色检测。

1.2.3 指标检测方法 行为学检测:Y-迷宫实验检

测大鼠学习能力^[9],根据初筛结果选定工作电压范围35~45 V。大鼠每天做逃避反应实验1次,每次试验20次,间隔5 s,记录20次试验的正确反应次数及完成该过程的总时间,连续15 d。正确反应的次数与总反应时间的比值即学习指数作为衡量学习能力的指标。

HE染色:石蜡切片脱蜡,二甲苯透明,梯度乙醇脱二甲苯,充分浸洗后苏木素染色15 min ,1%盐酸乙醇镜检分化后入1%氨水蓝化2~3 min ,蒸馏水充分冲洗,1%伊红染色3 min ,梯度乙醇脱水、二甲苯透明,中性树胶封片。

电镜观察:组织于3%戊二醛4 $^{\circ}\text{C}$ 固定,PBS缓冲液反复冲洗后4 $^{\circ}\text{C}$ 固定于1%四氧化锇(OsO_4)置冰箱固定,系列乙醇梯度脱水和丙酮脱水,包埋剂37 $^{\circ}\text{C}$ 浸透过夜后环氧树脂包埋,恒温箱逐渐加温聚合,甲苯胺蓝染色,切片厚度70 nm ,依次醋酸铀避光染色和柠檬酸铅染色,电镜观察。

免疫组织化学染色:脑切片常规脱蜡,3%过氧化氢室温30 min ,5%牛血清白蛋白(BSA)室温30 min ,依次加抗 M_1 受体一抗(1:200)4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜(阴性对照以PBS代替)、生物素化二抗37 $^{\circ}\text{C}$ 45 min 、SABC复合物37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min ,DAB显色试剂盒染色,倒置显微镜观察并拍照。各步骤间按照操作要求PBS充分冲洗切片3次。

蛋白质印迹法检测:首先提取组织蛋白,事先准备组织裂解液,将大脑皮质从-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出,放入1.5 mL 微型离心管(EP管),加RIPA裂解液研磨,匀浆后用BCA法测定蛋白质浓度,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),每孔上样50 μg 蛋白,转膜、封闭后,加入一抗(1:500稀释)置4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加入二抗、显色。

1.3 统计学方法 所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 11.5处理,经方差齐性检验后,多组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),进一步各组与模型组间采用Dunnett- t 检验进行比较。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学指标 实验过程中模型组大鼠死亡1只,最终模型组 $n=8$,其余组均 $n=9$ 。实验前大鼠学习指数为第0天的数据,侧脑室定位注射后第7天开始每天进行Y-迷宫行为学检测,连续15 d。与健康对照组大鼠比较,模型组大鼠的学习指数明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,除第7天外,梓醇小剂量、大剂量组第14天、第21天均显著提高了大鼠的学习指数。见表1。

表1 各组大鼠的学习指数比较 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	第0天	第7天	第14天	第21天
健康对照组	9	5.4±0.7	5.3±0.2 ^a	5.6±0.2 ^a	6.3±0.8 ^a
模型组	8	5.5±0.9	2.3±0.3	2.6±0.3	4.1±0.5
梓醇小剂量组	9	5.7±1.1	2.8±0.6	3.7±0.5 ^b	5.3±0.4 ^a
梓醇大剂量组	9	5.5±0.9	3.1±0.7	4.4±0.6 ^a	5.8±0.8 ^a
F值		0.171 3	61.625 1	71.765 6	17.395 6
P值		0.915 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0

注:与模型组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$ (第14天:小剂量组 $t = 3.267$, $P = 0.030 9$,大剂量组 $t = 4.648$, $P = 0.009 7$;第21天:小剂量组 $t = 5.010$, $P = 0.007 4$,大剂量组 $t = 4.614$, $P = 0.009 9$)

2.2 大脑皮质HE染色 切片在40倍镜下观察,健康对照组神经元结构清晰,细胞排列整齐,细胞核深染(图1A);模型组皮层结构有损伤性改变,表现为组织结构疏松,神经元细胞体积有缩小,部分神经元细胞核固缩(图1B);小剂量梓醇干预后细胞结构有所改善,可见细胞结构较正常,核膜清晰,神经元细胞数目增多(图1C);大剂量梓醇对结构的改善作用更明显(图1D)。

2.3 大脑皮质超微结构-电镜观察结果 健康对照组大鼠大脑神经元形态正常,胞质内大量正常线粒体,粗面内质网和高尔基复合体正常分布,脂褐素颗粒极少见,细胞核染色质分散,部分可见清晰的突触结构(图2A)。模型组大鼠大脑神经元固缩多见,电子密度增高,粗面内质网扩张,出现脱颗粒现象,大量脂褐素颗粒见于胞质内,高尔基复合体异常丰富,线粒体肿胀、嵴脱颗粒现象多见,部分呈空泡样变,有些细胞核呈不规则固缩,核周隙局部增宽,甚至有些核内异染色质呈边集现象(图2B)。

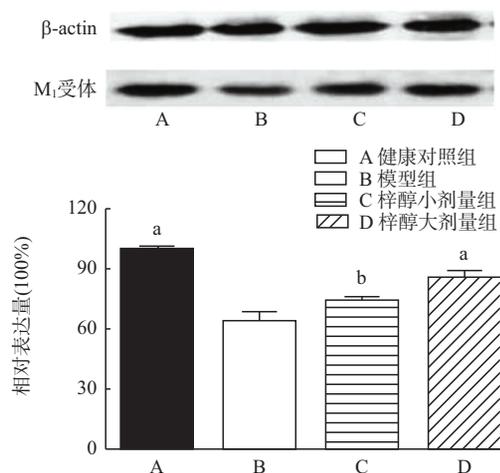
梓醇低剂量组细胞核固缩及核周隙增宽现象改善,异染色质有部分边集现象,线粒体较丰富,小部分线粒体嵴紊乱(图2C)。梓醇高剂量组神经元结构与模型组比较有明显改善,胞质和细胞核内线粒体丰富,线粒体嵴排列整齐,个别嵴间腔增大,粗面内质网丰富,脱颗粒少见,细胞核常染色质均匀,异染色质少(图2D)。

2.4 大脑皮质M₁受体免疫组织化学染色 正常大鼠大脑皮质神经元胞体大,细胞多为梭形和椭圆形,突起明显,M₁受体阳性染色分布于神经元膜上(图3A)。模型组阳性染色神经元细胞数目减少,部分萎缩,染色浅(图3B)。梓醇小剂量组M₁受体染色神经元个体增大,染色深(图3C)。梓醇大剂量组神经元的形态和着色深度显著好转(图3D)。

各组大鼠免疫组织化学阳性染色神经元在显微镜下计数,每张切片选择3个相邻视野(1个视野=1 mm³),计数并取其平均值。结果可见,模型组的

阳性神经元个数(35.7±3.4)个少于健康对照组(41.3±5.1)个,差异有统计学意义($t = 3.085$, $P = 0.007 1$);梓醇小剂量组神经元个数(38.8±3.9)个增加,与模型组(35.7±3.4)个比较差异有统计学意义($t = 2.153$, $P = 0.047 0$);梓醇大剂量组神经元个数(41.4±1.5)个增加显著,与模型组(35.7±3.4)个比较差异有统计学意义($t = 4.514$, $P = 0.000 4$);四组间大鼠皮层M₁受体染色阳性神经元数比较,差异有统计学意义($F = 4.369 0$, $P = 0.011 2$)。

2.5 大脑皮质M₁受体蛋白的表达 蛋白质印迹法结果显示,模型组的M₁受体蛋白表达较健康对照组减少,梓醇两个剂量对其表达有不同程度升高作用。通过蛋白质印迹法条带灰度进行分析比较,以健康对照组蛋白表达为100%计算,模型组大鼠大脑皮质M₁受体蛋白的表达为64.75%,明显低于健康对照组,差异有统计学意义($t = 14.39$, $P = 0.000 1$),梓醇小剂量升高蛋白表达达至74.63%,大剂量升高受体蛋白表达达至85.74%,与模型组比较差异有统计学意义($t = 3.983$, $P = 0.016 4$; $t = 6.694$, $P = 0.002 6$)。见图4。



注:各组整体分析 $F = 376.375$, $P = 0.000$ 。与模型组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$ (健康对照组 $t = 14.39$, $P = 0.000 1$;梓醇小剂量组 $t = 3.983$, $P = 0.016 4$;梓醇大剂量组 $t = 6.694$, $P = 0.002 6$)

图4 蛋白质印迹法检测各组大鼠大脑皮质M₁受体蛋白表达

3 讨论

AD是常见的中枢神经系统变性疾病,表现为学习记忆能力逐步减退,严重降低病人的生活质量。由于发病机制迄今不明,至今AD临床治疗效果并不理想,而根据AD研究进展开发的各种治疗措施如A β 疫苗、脑内注射神经生长因子(NGF)等在临床试验中均存在一定的不足而最终没有进入临床^[10],因此,开发有效治疗AD的药物具有重要的临床意义。

研究证明,A β 是老年斑的主要成分,AD时神经元退行性病变主要源于A β 产生和清除失衡导致的

A β 聚集,是各种原因诱发AD的共同通路。聚集态A β 可诱导细胞凋亡,损伤神经元,导致学习记忆功能障碍^[7],对体外培养和在体神经细胞均可观察到其毒性作用。A β 的主要效应片段是A β_{25-35} , A β_{25-35} 已成为制作拟AD动物及细胞模型的常用工具药^[11-12]。因此,本研究选择用A β_{25-35} 复制AD大鼠模型。联合应用D-半乳糖的机制在于,D-半乳糖是一种小分子单糖,连续注射后机体内含量增多,通过自由基引起氧化应激损伤等途径诱发动物衰老^[13]。实验选择对大脑皮质进行观察,因为大脑皮质是学习记忆的关键脑区之一,而且脑M受体的含量与学习记忆密切相关。AD临床症状的产生主要与中枢胆碱能神经系统功能减退有关,胆碱能系统功能低下,包括相关脑区胆碱能神经元较正常明显减少,合成乙酰胆碱的关键酶ChAT活性降低,M受体密度降低等。正常情况下,M₁受体是大脑皮质分布的主要M受体亚型,乙酰胆碱与其结合后调节学习记忆能力,AD病人大脑皮质M₁受体显著降低,被认为是AD发病的重要中间环节^[14],寻找提高脑内M受体的药物治疗AD具有重要的意义,因此本研究观察了大脑皮质M₁受体的表达。

梓醇是从中医常用的抗衰老药物地黄中提取的一种活性成分,研究证实其具有神经保护作用^[4,15-17]。本研究从大脑皮质结构和M₁受体的表达方面研究梓醇对AD的保护作用,文中梓醇设定了小剂量和大剂量2个组,所用剂量分别为5 mg/kg和10 mg/kg,这是根据已有的实验结果和相关文献而设定的^[6]。

本研究结果表明,模型大鼠学习指数降低,说明其学习能力下降,梓醇对这种学习能力有显著改善作用。大脑皮质形态学检查中,HE染色发现梓醇改善了大脑皮质组织疏松、神经元萎缩等损伤性改变;透射电镜观察发现模型大鼠大脑皮质神经元固缩、粗面内质网扩张、脱颗粒,线粒体肿胀、嵴脱颗粒、空泡样变等结构改变,梓醇抑制了这种超微结构的损伤性改变。中枢胆碱能神经系统功能异常是导致AD病人学习能力降低的重要因素,脑M₁受体减少是AD发病的重要一环,因此,提高脑M₁受体表达可能改善AD病人的学习记忆能力。本研究观察到M₁受体免疫组织化学阳性染色分布于神经元膜上,模型组大鼠M₁受体在大脑皮质神经元的染色浅,阳性染色神经元数目减少,同时蛋白质印迹法结果也进一步印证了M₁受体蛋白表达降低。梓醇能够增加M₁受体的表达,意味着其对中枢的胆碱能神经系统的功能有一定改善作用,可能对AD的学习记忆能力产生相应的治疗效应。

综上所述,梓醇具有提高AD模型大鼠学习记忆能力的作用,同时改善大鼠大脑皮质的结构异常,其改善学习能力可能与提高大鼠脑内M₁受体表达有关。

(本文图1~3见插图10-2)

参考文献

- [1] BLENNOW K, LEON MJD, ZETTERBERG H. Alzheimer's disease[J]. J Lancet, 2006, 368(9533): 387-403.
- [2] FRERE S, SLUTSKY I. Alzheimer's disease: from firing instability to homeostasis network collapse[J]. Neuron, 2018, 97(1): 32-58.
- [3] BUI TT, NGUYEN TH. Natural product for the treatment of Alzheimer's disease[J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2017, 28(5): 413-423.
- [4] XIA Z, WANG F, ZHOU S, et al. Catalpol protects synaptic proteins from beta-amyloid induced neuron injury and improves cognitive functions in aged rats[J]. Oncotarget, 2017, 8(41): 69303-69315.
- [5] 王金红, 孙启祥, 夏宗勤, 等. 地黄活性成分梓醇对转基因CHO细胞M₂受体的调节作用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(12): 1462-1466.
- [6] WANG J, XIE H, ZHAO TK, et al. Catalpol regulates cholinergic nerve system function through effect on choline acetyl-transferase not M receptor affinity [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2015, 69: 291-296.
- [7] 汪润, 赵丽娟, 王全英, 等. β -淀粉样蛋白1~42与D-半乳糖联合作用建立复合阿尔茨海默病样模型[J]. 解剖学报, 2011, 42(4): 461-464.
- [8] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 165.
- [9] 刘硕, 胡雅儿, 夏宗勤. 小鼠脑内注射A β_{25-35} 记忆和M受体变化及梓醇的调节作用[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2007, 27(8): 945-948.
- [10] 运会喜. 阿尔茨海默病治疗药物研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(24): 6269-6272.
- [11] 李超, 毕鹏翔, 董妍, 等. 姜黄素类似物对A β_{25-35} 诱导的AD细胞模型细胞凋亡的影响[J]. 中国现代医生, 2017, 55(10): 1-4, 封3.
- [12] 吴芳. N-甲基-D-天冬氨酸受体抑制剂盐酸美金刚对老年性痴呆大鼠 β -淀粉样前体蛋白及 β 分泌酶表达的影响[J]. 安徽医药, 2016, 20(7): 1246-1249.
- [13] BUDNI J, PACHECO R, DA SS, et al. Oral administration of d-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats[J]. Behav Brain Res, 2016, 302: 35-43.
- [14] LEBOIS EP, THORN C, EDGERTON JR, et al. Muscarinic receptor subtype distribution in the central nervous system and relevance to aging and Alzheimer's disease[J]. Neuropharmacology, 2018, 136(Pt C): 362-373.
- [15] LIU J, HE QJ, ZOU W, et al. Catalpol increases hippocampal neuroplasticity and up-regulates PKC and BDNF in the aged rats[J]. Brain Research, 2006, 1123(1): 68-79.
- [16] HUANG JZ, WU J, XIANG S, et al. Catalpol preserves neural function and attenuates the pathology of Alzheimer's disease in mice [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(1): 491-496.
- [17] CAI QY, CHEN XS, ZHAN XL, et al. Protective effects of catalpol on oligodendrocyte death and myelin breakdown in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. Neurosci Lett, 2011, 497(1): 22-26.

(收稿日期: 2018-05-02, 修回日期: 2018-07-02)