

山茱萸多糖对血管性痴呆大鼠学习记忆能力的影响及其机制研究^Δ

李永格*,刘庆春(南阳医学高等专科学校基础医学部,河南 南阳 473000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)07-0889-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.07.08

摘要 目的:研究山茱萸多糖对血管性痴呆(VD)模型大鼠学习记忆能力的影响及其机制。方法:将30只大鼠随机均分为假手术(生理盐水)组、模型(生理盐水)组和山茱萸多糖(0.28 g/kg)组。除假手术组外,其余各组大鼠均复制VD模型,并同时ig相应药物,每天1次。4周后,测定各组大鼠跨越原平台位置次数、水迷宫平均逃避潜伏期、平台滞留时间、平均游泳路程,测定各组大鼠海马组织中脑源性神经生长因子(BDNF)、凋亡相关基因Bcl-2 mRNA及其蛋白的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠的学习记忆能力下降,表现为跨越原平台位置次数减少、水迷宫平均逃避潜伏期延长、平台滞留时间缩短、平均游泳路程变长($P<0.05$),海马组织中BDNF、Bcl-2 mRNA及其蛋白表达明显减弱($P<0.05$);与模型组比较,山茱萸多糖组大鼠的学习记忆能力增强,表现为跨越原平台位置次数增加、水迷宫平均逃避潜伏期缩短、平台滞留时间延长、平均游泳路程变短($P<0.05$),海马组织中BDNF、Bcl-2 mRNA及其蛋白表达明显增强($P<0.05$)。结论:山茱萸多糖能够改善VD大鼠的学习记忆能力,其机制可能与上调海马组织中BDNF、Bcl-2的表达有关。

关键词 山茱萸多糖;脑源性神经生长因子;凋亡相关基因;血管性痴呆;学习记忆;大鼠

Effects of *Cornus officinalis* Polysaccharide on Learning and Memory Ability of Vascular Dementia Rats and Its Mechanism

LI Yongge, LIU Qingchun (Dept. of Basic Medicine, Nanyang Medical College, Henan Nanyang 473000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of *Cornus officinalis* polysaccharide on learning and memory ability of vascular dementia (VD) model rats and its mechanism. METHODS: 30 rats were randomly divided into sham operation (normal saline) group, model (normal saline) group and *C. officinalis* polysaccharide (0.28 g/kg) group. Except sham operation group, VD model was induced in other groups and given relevant medicine intragastrically once a day. After 4 weeks, the frequency of leaping over original platform position, water maze mean escape latencies, platform retention time and average swimming distance were detected, and the mRNA and protein expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and apoptosis related gene Bcl-2 in hippocampal tissue of rats were determined. RESULTS: Compared with sham operation group, learning and memory ability of rats in model group weakened, manifesting as the frequency of leaping over original platform position decreased, water maze mean escape latencies prolonged, platform retention time shortened, average swimming distance extended ($P<0.05$); mRNA and protein expression of BDNF and Bcl-2 in hippocampus decreased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, learning and memory ability of rats in *C. officinalis* polysaccharide group increased, manifesting as the frequency of leaping over original platform position increased, water maze mean escape latencies shortened, platform retention time prolonged, average swimming distance shortened ($P<0.05$); mRNA and protein expression of BDNF and Bcl-2 in hippocampus was enhanced significantly ($P<0.05$). CONCLUSIONS: *C. officinalis* polysaccharide can improve the learning and memory ability of VD rats, and its mechanism may be associated with the expression up-regulation of BDNF and Bcl-2 in hippocampus.

KEYWORDS *Cornus officinalis* polysaccharide; Brain-derived neurotrophic factor; Apoptosis related gene; Vascular dementia; Learning and memory; Rat

血管性痴呆(Vascular dementia, VD)是由脑血管病变所引起的以智力以及认知功能障碍为特征的临床综合征,是仅次于阿尔茨海默病的引发老年痴呆的第二大病因^[1]。近年来,随着人口老龄化的加重以及脑血管病变的增多,VD的发病率不断升高,对老年人的日常生活造成极为不利的影 响,但临床上仍缺乏治疗VD的特效药物。山茱萸多糖为主产于河南南阳的山茱萸提取物,具有抗氧化、增强免疫、抗休克及降血糖等药理作用^[2]。近来有研究表明,山茱萸多糖还具有保护缺血后脑组织^[3]、抗衰老的作用^[4],且能够提高阿尔茨海默病模型大鼠

的学习记忆能力^[5]。

笔者在前期实验中已从抗氧化角度探讨了其治疗VD可能的作用机制^[6-7],但VD确切发病机制尚不明确,更多可能的机制有待进一步研究。相关学者对VD发病机制研究结果提示,细胞凋亡在VD发病过程中具有重要作用^[8],山茱萸多糖在治疗VD过程中,是否可通过调控细胞凋亡来发挥作用还未见相关文献报道。故本研究旨在通过复制VD大鼠模型,利用山茱萸多糖对其进行干预,通过测定VD模型大鼠海马组织中脑源性神经生长因子(BDNF)、凋亡相关基因Bcl-2表达的变化,从抗凋亡角度探讨山茱萸多糖的作用机制,为该药临床治疗VD提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

Δ 基金项目:河南省高校重点科研项目(No.15B310009);南阳市2012年科技发展计划项目(No.2012GG050)

* 讲师,硕士。研究方向:神经生理学。电话:0377-63526123。E-mail:liyongge19810719@aliyun.com

GL-21M型高速冷冻离心机(长沙湘智离心机有限公司); TU-1901型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); PTC-200型聚合酶链反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司); JY1600-E型多用电泳仪、JY04S-3C型凝胶图像分析系统(北京君意东方电泳设备公司); WMT-100型Morris水迷宫(成都泰盟仪器有限公司); DW-HL388型-86℃超低温冰箱(中科美菱低温科技股份有限公司)。

1.2 药品与试剂

山茱萸多糖(由我校药理学实验室惠赠,纯度:91.5%,临用前用蒸馏水将其制备成0.05 g/ml的山茱萸多糖溶液); Trizol裂解液、蛋白裂解液RIPA(日本Takara公司); 反转录试剂盒(宝生物工程大连有限公司); BDNF基因引物序列(上游引物5'-GCAGCCTTCTTTTGTGTAACC-3',下游引物5'-AGAGT-GATGACCATCCTTTTC-3')、Bcl-2基因引物序列(上游引物5'-CCGGCATCTGCACACCTGG-3',下游引物5'-CACAACTTTGTTTCATGGTCCATCC-3')、 β -actin基因引物序列(上游引物5'-CTCCTTAATCTCACGCACGA-3',下游引物5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3')均由上海英骏生物工程公司合成; 兔抗BDNF多克隆抗体(一抗)、小鼠抗Bcl-2单克隆抗体(一抗)、鼠抗 β -actin单克隆抗体(一抗)(美国Santa Cruz公司); 碱性磷酸酶标记的羊抗小鼠抗体(二抗)、碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体(二抗)(美国Proteintech公司); 焦碳酸二乙酯(DEPC)、琼脂糖、DNA Marker、2×Taq PCR MasterMix染料、随机引物(均购自南京依贝仪器设备有限公司); 其他试剂均为国产分析纯或化学纯。

1.3 动物

清洁级成年SD大鼠30只,♂,体质量150~250 g,购于河南省实验动物中心(生产合格证号:20130711)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药

30只成年SD大鼠随机分为3组,包括假手术组、模型组、山茱萸多糖组,每组10只。除假手术组不接受造模外,模型组与山茱萸多糖组参考马大勇等^[9]改良方法复制VD大鼠模型。造模成功的标志是术后出现同侧Horner's征及动物麻醉清醒后出现以左前肢为主的偏瘫。剔除无神经损伤者、术后2~3 h不能自发行走且意识丧失者和死亡者。假手术组与模型组大鼠分别ig生理盐水,山茱萸多糖组大鼠按照0.28 g/kg剂量^[7],ig 0.05 g/ml山茱萸多糖溶液,每天1次,持续4周。

2.2 各组大鼠学习记忆能力的检测

实验结束后,采用Morris水迷宫试验检测所有实验大鼠的学习记忆能力。检测方法参考文献^[10]。

2.3 各组大鼠海马组织中BDNF、Bcl-2 mRNA表达的检测

采用逆转录-PCR(RT-PCR)法进行检测。水迷宫实验结束后,各组大鼠ip 10%水合氯醛(0.35 ml/100 g)麻醉,断头开颅取脑,定位、分离海马组织,迅速放入-86℃冰箱中保存。临用时,从-86℃冰箱取出海马组织,加入Trizol裂解液后匀浆,提取总RNA,紫外分光光度计测定RNA的浓度。取RNA,以随机引物(Random primer)按反转录试剂盒说明书进行cDNA的合成。在PCR管中分别依次加入2×Taq PCR MasterMix 25 μ l, cDNA 2 μ l, 目的基因上、下游引物各1 μ l, DEPC 21 μ l, 总体积为50 μ l。分别按不同条件对BDNF、Bcl-2、 β -actin进行扩增,每个样品重复3次。用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR扩增产物,使用GeneTools成像系统照相并保存。采用Image J软件进行半定量分析,以BDNF和Bcl-2条带的灰度值

与 β -actin(内参)条带灰度值的比值表示其相对表达水平。设置假手术组大鼠海马组织中目的基因的mRNA水平值为100,计算模型组和山茱萸多糖组大鼠海马组织中目的基因的mRNA相对水平。

2.4 各组大鼠海马组织中BDNF、Bcl-2蛋白表达检测

采用Western-blot法进行检测。从-86℃冰箱取出海马组织,加入RIPA裂解液后匀浆,提取蛋白后离心,取上清用于Western-blot检测。首先配制4%的浓缩胶和10%的分离胶,点样后进行垂直电泳(90 V、20 min, 120 V、80 min)和电转膜(100 V、90 min);将转膜后的硝酸纤维素(NC)膜置于5%脱脂牛奶中封闭,然后根据抗体(一抗)说明书上的蛋白分子质量以及DNA Marker指示的分子大小对NC膜进行裁剪,分别在4℃条件下孵育BDNF、Bcl-2和 β -actin 12 h;取出NC膜洗涤后,孵育种属特异性的第二抗体,洗涤后进行化学显影。每个样品重复测定3次。所得图像用Image J软件对目的基因条带的灰度值进行分析,蛋白相对含量计算方法同“2.3”项下。

2.5 统计学方法

采用SPSS 13.0分析软件进行数据处理。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差进行分析,两组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠学习记忆能力检测结果

与假手术组比较,模型组大鼠跨越原平台位置次数减少、水迷宫平均逃避潜伏期延长、平台滞留时间缩短、平均游泳路程变长($P < 0.05$);与模型组比较,山茱萸多糖组大鼠跨越原平台位置次数增加、水迷宫平均逃避潜伏期缩短、平台滞留时间延长、平均游泳路程变短($P < 0.05$)。结果提示一定剂量山茱萸多糖有提高VD大鼠学习记忆能力的作用。各组大鼠学习记忆能力检测结果见表1。

表1 各组大鼠学习记忆能力检测结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Determination results of learning and memory ability of rats in all groups($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	跨越原平台位置次数	水迷宫平均逃避潜伏期,s	平台滞留时间,s	平均游泳路程,cm
假手术组	3.48±0.54	34.49±4.95	40.59±6.69	7.15±0.89
模型组	1.17±0.21*	69.72±7.98*	23.62±3.45*	12.95±1.52*
山茱萸多糖组	2.85±0.35 [#]	48.52±6.24 [#]	32.86±4.86 [#]	8.42±0.96 [#]

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$

3.2 各组大鼠海马组织中BDNF、Bcl-2 mRNA及其蛋白表达检测结果

与假手术组比较,模型组大鼠海马组织中BDNF、Bcl-2 mRNA及其蛋白表达明显减弱($P < 0.05$);与模型组比较,山茱萸多糖组大鼠海马组织中BDNF、Bcl-2 mRNA及其蛋白表达明显增强($P < 0.05$)。结果提示一定剂量山茱萸多糖能够增强VD大鼠海马组织中BDNF、Bcl-2 mRNA及蛋白表达。各组大鼠海马组织中BDNF、Bcl-2 mRNA及其蛋白表达结果见图1、表2。

4 讨论

Morris水迷宫实验最早由英国心理学家Morris设计,是目前世界上公认的较为客观的学习记忆功能评价方法。在本研究中,笔者通过Morris水迷宫实验发现,与假手术组比较,模型组大鼠跨越原平台位置次数减少、水迷宫平均逃避潜伏期延长、平台滞留时间缩短、平均游泳路程变长($P < 0.05$),这提

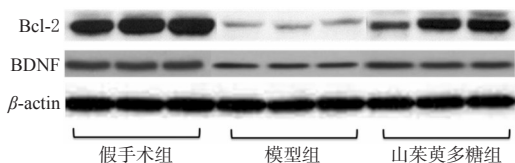


图1 各组大鼠海马组织中BDNF、Bcl-2蛋白表达的电泳图

Fig 1 Electrophoretograms protein expression of BDNF and Bcl-2 in hippocampal tissue of rats in all groups

表2 各组大鼠海马组织中BDNF、Bcl-2 mRNA及其蛋白检测结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Determination results of mRNA and protein expression of BDNF and Bcl-2 in hippocampal tissue of rats in all groups($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	mRNA		蛋白	
	BDNF	Bcl-2	BDNF	Bcl-2
假手术组	100 ± 19.09	100 ± 17.48	100 ± 17.19	100 ± 18.37
模型组	24.95 ± 3.85*	19.85 ± 2.98*	27.82 ± 3.90*	20.48 ± 4.04*
山茱萸多糖组	68.89 ± 7.72 [#]	61.75 ± 9.52 [#]	70.13 ± 8.89 [#]	66.78 ± 9.03 [#]

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$

示模型组大鼠学习记忆能力下降,模型复制成功;与模型组比较,山茱萸多糖组的跨越平台位置次数增加、水迷宫平均逃避潜伏期缩短、平台滞留时间延长、平均游泳路程变短($P < 0.05$),这提示山茱萸多糖有改善VD大鼠学习记忆能力,对VD有一定治疗作用。这一结果也与作者前期实验结果相符。

细胞凋亡是一种重要的生命现象,其不仅出现在生理状态下,更与许多疾病的发生有密切关系。其中,迟发性神经细胞凋亡是VD的发病机制之一^[11]。BDNF是一种在中枢神经系统表达、广泛分布在脑内不同部位的神经因子^[12],以海马组织中的水平最高,其对周围和中枢神经元有促进生存、有助分化和再生、增进代谢、增强功能表达及营养、支持、保护的作用。越来越多的证据表明BDNF能够通过抑制细胞凋亡实现对神经元的保护作用^[13],其中通过调节Bcl-2等抗凋亡相关基因的表达是其中一种途径^[14]。Bcl-2是细胞凋亡中重要的调节因子,在细胞是否进行凋亡途径中有重要作用。Bcl-2可以保护线粒体膜,抑制细胞色素C(CytC)的释放,从而抑制CytC/凋亡酶激活因子1/半胱氨酸蛋白酶9激活,阻止细胞凋亡^[15];也能够抑制抑制基因(p53)对其靶基因的反式激活作用,进而对p53调节凋亡有潜在的抑制作用^[16]。因此,Bcl-2水平升高提示细胞凋亡几率下降;反之,则发生细胞凋亡几率增加^[17]。在本实验中,模型组大鼠海马组织中BDNF、Bcl-2基因表达明显弱于假手术组($P < 0.05$),而通过山茱萸多糖干预后,大鼠海马组织中BDNF、Bcl-2表达增强($P < 0.05$)。这提示山茱萸多糖能够诱导大鼠BDNF、Bcl-2基因表达,发挥其抗细胞凋亡作用,促进海马神经元修复及自我保护,发挥脑保护作用,从而改善VD大鼠学习记忆能力。

综上,本实验研究结果证实了中药山茱萸有效成分山茱萸多糖能够通过上调海马神经元BDNF、Bcl-2基因的表达,抑制细胞凋亡,从而提高VD大鼠学习记忆能力。实验中大鼠先通过Morris水迷宫筛选,选择较灵活大鼠,之后随机分组,排除了个体差异的影响;另外,通过前期实验证明,0.28 g/kg山茱萸多糖为提高VD大鼠学习记忆能力最合适的剂量,因此本实

验中只考察了此剂量山茱萸多糖对VD模型大鼠的影响。但是,随着山茱萸多糖剂量增加本实验效应是否会发生相应变化,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Stewart JT. Psychiatric and behavioral manifestations of vascular dementia[J]. *Am J Geriatr Cardiol*, 2007, 16(3): 165.
- [2] 戴建子,张志豪,唐蕾,等.山茱萸化学成分及药理作用研究进展[J]. *中国药业*, 2006, 15(2): 74.
- [3] 张丽娟,孔军伶.山茱萸多糖的提取工艺优化及对大鼠局灶性缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中药材*, 2007, 11(30): 1466.
- [4] 周少承,韩晓明,王力冬,等. D-半乳糖致衰老模型大鼠脑组织Ach活性、NGF表达变化及山茱萸多糖的干预作用[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(24): 4841.
- [5] 范惠晗,刘泰佐,毛金军,等.山茱萸多糖对AD大鼠c-fos和早老素1表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(13): 3513.
- [6] 李永格,陈亚奇,王爱梅.山茱萸多糖对血管性痴呆大鼠抗氧化作用的研究[J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(3): 74.
- [7] 李永格.山茱萸多糖对血管性痴呆大鼠的治疗作用[J]. *社区医学杂志*, 2015, 13(15): 12.
- [8] 孙莉,吴江,王守春,等.血管性痴呆大鼠脑血流量及细胞凋亡的研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2001, 3(6): 409.
- [9] 马大勇,范吉平,朱陵群,等.三种拟血管性痴呆大鼠模型比较[J]. *北京中医药大学学报*, 2011, 12(34): 832.
- [10] 杜冰,谢湘林,方圣博,等.血栓心脉宁片对血管性痴呆大鼠的保护作用[J]. *中国药房*, 2015, 26(16): 2222.
- [11] 田金洲.血管性痴呆[M].北京:人民卫生出版社, 2003: 294-295.
- [12] Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain[J]. *EMBO J*, 1982, 1(5): 549.
- [13] 谭永星,李雪梅,文素芳,等.不同时间脑室注射BDNF对大鼠脑缺血再灌注损伤氧化应激及神经细胞凋亡的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(18): 1681.
- [14] 王岩峰,秦光华,张玉强,等. BDNF对大鼠急性脊髓损伤后Bcl-2表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(13): 22.
- [15] Chiaruqi V, Maqnelli L, Cinelli M. Complex interplay among apoptosis factors: RB, p53, E2F, TGF-beta, cell cycle inhibitors and the bcl2 gene family[J]. *Pharmacol Res*, 1997, 35(4): 257.
- [16] Tsukahara S, Yamamoto S, Tin-Tin-Win-Shwe, et al. Inhalation of low-level formaldehyde increases the Bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2006, 13(2): 63.
- [17] 尚振德,张相彤,谢春成.葛根素对创伤性脑损伤神经细胞Bcl-2、Bax蛋白表达影响[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2012, 11(2): 105.

(收稿日期:2015-09-15 修回日期:2015-12-04)

(编辑:林静)