论著

文章编号:1000-5404(2006)21-2146-03

中药地黄饮子对老龄大鼠海马SYP、ERK蛋白表达的影响

吴喜贵,胡 荣 (第三军医大学基础医学部神经生物学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察中药地黄饮子对老龄大鼠海马突触泡膜素(synaptophysin, SYP)、细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein,ERK)表达的影响,探讨其对提高学习记忆、延缓脑老化的功效及机制。**方法** 将老龄大鼠分为对照组、低、中和高剂量组每天灌服地黄饮子(对照组灌服生理盐水)连续30 d。在此基础上进行Morris水迷宫实验,免疫组化和Western blot方法检测海马SYP、ERK的表达。**结果** 给药各组与对照组比较,Morris水迷宫中寻找到平台的逃避潜伏期显著降低($P<0.01$),平台所在象限区域游泳的时间及距离百分比均明显高于对照组(低剂量组$P<0.05$,中、高剂量组$P<0.01$)。免疫组化、Western blot检测海马SYP、ERK蛋白表达较对照组均有明显增加。**结论** 中药地黄饮子能够提高老龄大鼠的学习记忆、延缓脑老化,其作用机制可能与SYP、ERK蛋白表达增加有关。

关键词:地黄饮子;学习记忆;脑老化;SYP;ERK

中图法分类号:R285;R322.8;R329.26 **文献标识码**:A

Effect of Dihuang Yinzi on synaptophysin, extracellular regulated protein in hippocampus of aged rats

WU Xi-gui, HU Rong (Department of Neurobiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the function and mechanism of Dihuang Yinzi (DHYZ) in promoting learning and memory and delaying brain aging. Methods The Wistar rats aged 20 months were randomly assigned to receive oral administration of 6, 12, 18 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ DHYZ, or 2 ml/d normal saline (control) for 30 d ($n=12$ in each group), then space memory was detected with Morris Water Maze, and expression of synaptophysin (SYP) and extracellular regulated protein (ERK) were measured by immunohistochemistry and Western blotting. Results Rats administrated with DHYZ showed shorter mean escape latency ($P<0.01$), and higher percentage of distance and time spent in the platform quadrant ($P<0.05$ for low dose DHYZ group, $P<0.01$ for high dose DHYZ group) than control. The expressions of SYP and ERK in hippocampus of rats pretreated with DHYZ were increased significantly. Conclusion DHYZ promotes learning and memory of the aged rats and delays brain aging, which may be associated with high expressions of SYP and ERK in hippocampus.

Key words: Dihuang Yinzi; learning and memory; brain aging; SYP; ERK

当今人口老化现象日益突出,人体衰老及由衰老引起的疾病也在增加,而以学习记忆障碍为代表的疾病如脑老化和老年性痴呆等疾病给家庭和社会造成了极大的负担,因此,关于提高学习记忆、延缓脑老化及其机制的研究具有重要意义。古方地黄饮子治疗脑老化及老年性痴呆,改善学习记忆的功能在临床与科研中已得到了肯定[1,2]。但其作用机制尚不清楚,本研究观察了中药地黄饮子对老龄大鼠海马突触泡膜素(synaptophysin, SYP)、细胞外信号调节激酶(extracellular regulated protein, ERK)的影响。拟从海马突触可塑性和神经递质及有关学习记忆的蛋白表达等方面探讨地黄饮子增强老龄大鼠学习记忆、延缓脑老化的作用机制,为临床用药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 地黄饮子制备

地黄饮子由熟地黄、麦冬、石斛、山茱萸、五味子、肉苁蓉、

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400610)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30400610)

作者简介:吴喜贵(1954-),男,吉林省吉林市人,高级实验师,主要从事神经生物学方面的研究。电话:(023)68752232,E-mail:wxh0328@yahoo.com.cn

通讯作者:胡 荣,电话:(023)68752232

收稿日期:2006-01-17;修回日期:2006-04-03

巴戟天、炮附子、肉桂、茯苓、石菖蒲、远志、薄荷、生姜、大枣组成。所用中药材一次性购于重庆市中药材公司，并经鉴定为纯正中药材。制备：以药物总体积的 5 倍量水浸泡 45 min，煮沸后改文火煎 30 min，取煎液，继用药物体积 3 倍量水，先后再煎 2 次，合并 3 次煎液，滤过，滤液用文火浓缩至药液浓度为 2 g/ml（生药量）。无菌条件装瓶，置 4 ℃冰箱备用。

1.2　动物分组

老龄（20 月龄，体质量 320 ~ 350 g），Wistar 大鼠 60 只，雌雄不限（由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供）。为避免大鼠智力存在较大的个体差异，在给药前安静环境下饲养至少 24 h 后，逐一进行 Morris 水迷宫实验，其成绩与群体有显著差异的动物剔除，然后编号并分为 4 组（12 只/组），对照组：灌服生理盐水 2 ml/d，地黄饮子低剂量组 6 g · kg^{-1} · d^{-1}，中剂量组 12 g · kg^{-1} · d^{-1}，高剂量组 18 g · kg^{-1} · d^{-1}，连续灌服 30 d。

1.3　水迷宫实验

按文献[1]的方法建立 Morris 水迷宫实验。给药第 24 天后开始实验，连续 6 d，每天 4 次，分别将动物头向池壁随机从 4 个入水点放入水中，记录其在 2 min 内寻找水下平台的时间。2 min 内找不到平台，记为 2 min，并将动物放到平台上熟悉 15 s，休息 30 s，进行下一次训练。最后 1 d 训练结束后撤除平台，将大鼠面向池壁从 4 个不同象限入水，记录 2 min 内在原平台所在象限内游泳时间及距离百分比。

1.4　免疫组化检测 SYP、ERK 的表达

大鼠给药 30 d（水迷宫实验第 6 天结束），大鼠按常规进行麻醉、组织灌注、固定，冰冻切片机（徕卡 CM1800）自海马前段开始行连续冠状切片，片厚 25 μm，置于 0.01 mol/L PBS 中存放，ABC 法做 SYP、ERK 的免疫组织化学染色，DAB 显色。OLYMPUS DP-70 显微照相系统观察、照相。从标本中随机取部分切片用 0.01 mol/L PBS 代替一抗，其余步骤相同，作为阴性对照。

1.5　Western blot 检测 SYP、ERK 的表达

各组大鼠水迷宫实验结束后，腹腔麻醉，断头处死，迅速取海马（8 只/组）称重按 100 mg/500 μl 蛋白裂解液（RIPA），冰浴中匀浆。提取膜蛋白，考马斯亮蓝法定蛋白。SDS-PAGE 电泳，半干法转印，15 V（恒压）40 min，将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜上。PVDF 膜以含 5 % 脱脂奶粉的 TBST［50 mmol/L Tris 150 mmol/ L NaCl（pH 7.5），0.1% Tween-20］室温封闭 2 h，SYP、ERK 抗体（工作浓度为 1∶1 000）室温反应过夜，辣根过氧化物酶标记的羊 IgG（工作浓度为 1∶2 000）室温反应 2 h。DAB 显色，SX-300 图像分析系统检测蛋白表达的相对水平。

1.6　统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10. 0 统计软件行 t 检验。

2　结果

2.1　地黄饮子对老龄大鼠学习记忆的影响

2.1.1　寻找平台潜伏期　　灌药 24 d 后各组大鼠再经水迷宫训练 6 d，寻找水下平台时间（潜伏期）显著减少（$P < 0.01$）（表 1）。潜伏期平均值为：对照组（55. 07 ± 7. 05）s，低剂量组（42. 13 ± 6. 45）s，中剂量组（30. 73 ± 3. 99）s，高剂量组（18. 97 ± 3. 66）s。从潜伏期的变化可见各组大鼠 Morris 水迷宫训练的前 4 d 潜伏期迅速下降，第 4 天开始趋于平稳。提示地黄饮子能改善和提高老年大鼠的学习记忆能力，且随着剂量的增加其效应也增强。

表 1　地黄饮子对老龄大鼠学习记忆的影响（$\bar{x} \pm s$）

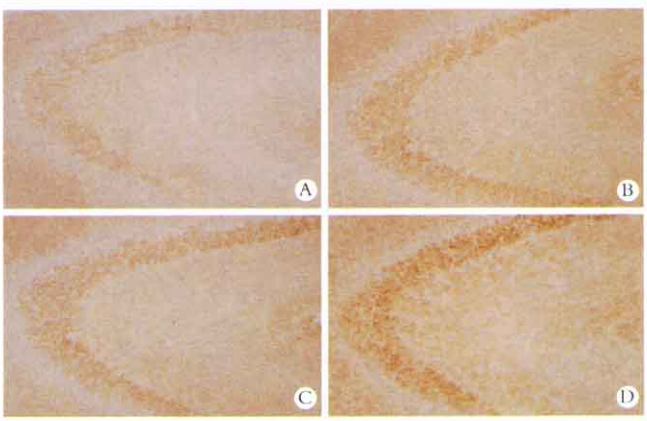
组别	例 数	平台潜伏期（t/s）	空间搜索能力	
			时间百分比（%）	距离百分比（%）
对照组	8	55.07 ± 7.05	32.16 ± 4.98	33.95 ± 4.80
低剂量组	8	42.13 ± 6.45[a]	38.97 ± 5.78[b]	42.08 ± 7.81[b]
中剂量组	8	30.73 ± 3.76[a]	49.86 ± 6.45[a]	50.76 ± 4.54[a]
高剂量组	8	18.97 ± 4.15[a]	57.10 ± 6.75[a]	58.97 ± 8.25[a]

a：$P < 0.01$，b：$P < 0.05$，与对照组比较

2.1.2　空间搜索能力　　在 Morris 水迷宫第 6 天训练结束，撤除水下平台后的（8 次/只）实验中，观察老鼠在水中各象限游泳距离和时间，用来检测老鼠的空间记忆能力，对照组、低、中、高剂量组大鼠在平台所在象限平均游泳距离和时间的百分比（%），见表 1。由表 1 可以看出给予中药的各组大鼠，在平台所在象限区域游泳的距离及时间百分比均高于对照组（低剂量组 $P < 0.05$，中、高剂量组 $P < 0.01$），并且随着剂量的增加而逐渐增高，说明中药地黄饮子可以提高老年大鼠的空间记忆能力。

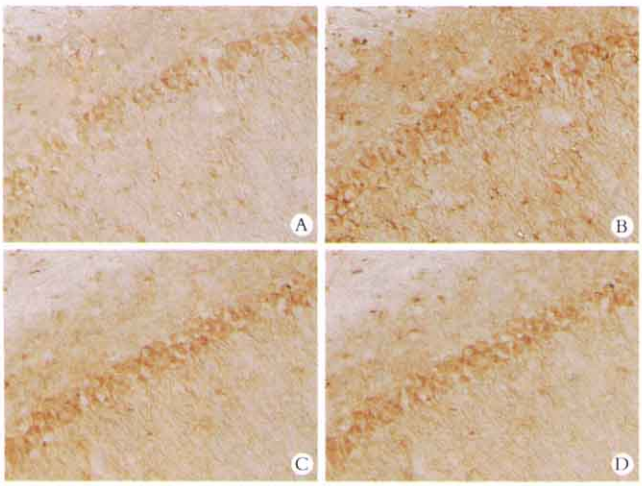
2.2　地黄饮子对老龄大鼠海马 SYP、ERK 影响

2.2.1　免疫组化检测 SYP、ERK 的变化　　光镜下观察，阳性细胞主要集中分布海马 CA 各区锥体细胞层和齿状回颗粒细胞层，DAB 显色呈棕黄色点状或颗粒状。给药各组大鼠海马结构内 SYP 免疫反应产物明显高于对照组。且随着剂量的增加而增加（图 1）。ERK 阳性细胞分布特征与 SYP 基本一致，高倍镜下可见阳性细胞胞体呈空泡状，与对照组相比，在给药后的老年大鼠海马中，不但免疫反应阳性明显增强，胞体着色加深，且 ERK 阳性神经元数量分别有不同程度的增加，增加程度也和剂量相关（图 2），结果表明地黄饮子可以有效提高 SYP、ERK 的表达。



A：对照组；B：低剂量组；C：中剂量组；D：高剂量组

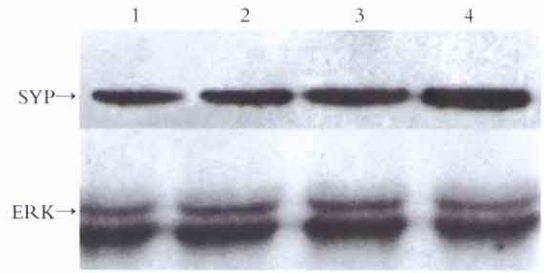
图 1　老龄大鼠海马 CA3 区 SYP 免疫组化结果　（SABC ×10）



A：对照组；B：低剂量组；C：中剂量组；D：高剂量组

图2 老龄大鼠海马 CA3 区 ERK 免疫组化结果 （SABC ×10）

2.2.2 Western blot 检测 SYP、ERK 表达的变化 Western blot 实验进一步验证了免疫组化观察到的结果，给药各组 SYP 和 ERK 的表达均高于对照组（图3）。SX-300 图象分析系统检测 SYP、ERK 的 *OD* 值，表示蛋白表达的相对水平。SYP *OD* 值，分别是对照组的 2.35、2.22、3.12 倍。ERK_1 和 ERK_2 *OD* 值分别是对照组的 1.19、1.07、1.06 倍及 1.32、1.35、1.25 倍。Western blot 结果再次表明地黄饮子可以有效提高 SYP 和 ERK 蛋白的表达。



1：对照组；2：低剂量组；3：中剂量组；4：高剂量组

图3 Western blot 检测 SYP、ERK 的结果

3 讨论

Morris 水迷宫实验是目前研究和探讨学习记忆神经生物学机制及在神经药理（包括中药药理）学研究中的一个重要行为学指标。SYP 是突触囊泡膜蛋白的主要成分之一，与神经递质及某些激素的释放，以及突触的可塑性等都有密切关系[3-5]。ERK 是丝裂原激活蛋白激酶（mitogen activated protein kinase，MAPK）信号传导通路家族重要成员之一，主要介导增殖反应，包括细胞的分裂、生长、分化等[6]。环磷酸腺苷反应单元结合蛋白（CAMP response element binding protein，CREB），是一种重要的核转录因子，其调节启动子中具有环磷酸腺苷反应单元（CAMP response element，CRE）的基因转录，这种核转录因子具有调节包括学习记忆在内的广泛的生物学功能[7]。

本实验结果表明，地黄饮子能改善和提高老年大鼠的学习记忆能力，且随着剂量的增加其效应也增强，这一结果与文献[1,2]报道相一致。同时也提示地黄饮子可以有效提高大鼠海马 SYP 和 ERK 蛋白表达。因此我们推测地黄饮子提高学习记忆的能力可能与 SYP、ERK 蛋白表达增加有关。其作用机制可能为，连续灌服地黄饮子，SYP 表达增加并维持在一个相对高的水平，高表达的 SYP 通过激活酪氨酸激酶，使自身磷酸化增强，从而调节内源性谷氨酸的释放来改善突触的可塑性，增强突触的传递功能[8]。同时由于 SYP 是突触囊泡膜蛋白的主要成分，构成突触囊泡特异性的膜通道，参与囊泡的转运和递质释放。SYP 的增加突触囊泡转运能力升高，使得有关学习记忆的神经递质（Ca^{2+}、胆碱能类、氨基酸类、神经肽类等）得到更有效的释放和传递。另外由于 ERK 可以使 CREB 磷酸化[9]，ERK 表达增加导致 CREB 磷酸化和活化增强，引起有关增强学习记忆的蛋白表达增加。

增强学习记忆，抗脑老化的研究是一个非常复杂的系统工程，本研究在中药地黄饮子提高老龄大鼠学习记忆的实验中，观察了 SYP、ERK 变化情况，为深入研究中药地黄饮子提高老龄大鼠学习记忆，抗脑老化的机制打下基础，要阐明特别从祖国中医学的角度来阐明其作用途径及机制还需进一步研究。

参考文献：

[1] 陈京萍，周乐全，丁胜元，等. 六味地黄汤对老年阴虚大鼠学习记忆能力的改善作用[J]. 中药新药与临床药理，2001，12(4)：282-283.

[2] 谢 鸣，袁学勤，张家俊，等. 地黄饮子对老龄大鼠的血、脑组织过氧化脂质及相关酶的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2001，7(6)：21-23.

[3] 洪 岸，姚志彬，顾耀铭，等. 老年学习记忆减退大鼠齿状回突触的定量研究[J]. 解剖学杂志，1996，19(3)：222-225.

[4] MULLANY P，LYNCH M A. Changes in protein synthesis and synthesis of the synaptic vesicle protein，synaptophysin，in entorhinal cortex following induction of long-term potentiation in dentate gyrus：an age-related study in the rat[J]. Neuropharmacology，1997，36(7)：973-980.

[5] CHEN Y C，CHEN Q S，LEI J L，*et al*. Physical training modifies the age-related decrease of GAP-43 and synaptophysin in the hippocampal formation in C57BL/6J mouse[J]. Brain Res，1998，806(2)：238-245.

[6] TALMOR D，APPLEBAUM A，RUDICH A，*et al*. Activation of mitogen-activated protein kinases in human heart during cardiopulmonary bypass[J]. Circ Res，2000，86(9)：1004-1007.

[7] 江 刚，舒斯云，包新民，等. 中枢学习记忆功能与环磷酸腺苷反应单元结合蛋白的关系[J]. 中国临床康复，2004，8(1)：124-126.

[8] MULLANY P M，LYNCH M A. Evidence for a role for synaptophysin in expression of long-term potentiation in rat dentate gyrus[J]. Neuroreport，1998，9(11)：2489-2494.

[9] PATAPOUTIAN A，REICHARDT L F. Trk receptors：mediators of neurotrophin action[J]. Curr Opin Neurobiol，2001，11(3)：272-280.

（编辑 王小寒）