

阿尔茨海默病大鼠模型建立及葛根素对大鼠空间学习记忆的影响*

李冬¹, 田寅^{2△}, 宫宇¹, 王曦¹

(佳木斯大学附属第一医院:1. 药剂科;2. 肿瘤外科, 黑龙江佳木斯 154007)

[摘要] 目的 探讨葛根素对 β -淀粉样蛋白(A β 1-42)诱导的阿尔茨海默病(AD)大鼠空间学习记忆障碍的影响。方法 采用双侧海马注射 A β 1-42 诱导 AD 大鼠模型。造模后 3 d 起,葛根素按不同剂量灌胃给药 28 d,给药结束后采用 Morris 水迷宫测试系统,检测大鼠空间学习记忆能力。结果 模型组大鼠表现出明显的学习记忆能力障碍,而葛根素高、中、低剂量组干预则显著地改善了 AD 大鼠学习记忆能力。结论 葛根素能部分的提高 AD 模型大鼠的空间学习记忆能力。

[关键词] 阿尔茨海默病;葛根素;空间学习记忆

[中图分类号] R965.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)16-2180-02

The construction of Alzheimer's disease rats model and the effects of puerarin on rat spatial learning and memory*

Li Dong¹, Tian Yin^{1△}, Gong Yu², Wang Xi¹

(1. Department of Pharmacy; 2. Department of Surgical Oncology, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154002, China)

[Abstract] **Objective** To research the effects of puerarin on Alzheimer's disease(AD) rats spatial learning and memory disorder induced by A β 1-42. **Methods** Bilateral hippocampal injection of A β 1-42 was used to induced AD model rats. All rats underwent gavage administration with puerarin with different dose for 28 d since the 3rd day after the construction of model; and the Morris water maze was used to test the spatial learning and memory ability of rats. **Results** The model group rats showed obvious learning and memory disorder, and the ability of learning and memory disorder of rats in the high, medium and low dose of puerarin intervention group were significantly improved. **Conclusion** Puerarin can improve the spatial learning and memory ability of AD model rats.

[Key words] Alzheimer disease; puerarin; spatial learning and memory

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种起病隐匿的中枢神经系统退行性疾病,其主要临床表现为严重的不可逆转、渐进性的认知功能障碍和精神异常^[1-2]。AD 发病初期,会出现近期记忆出现缺失,保存远期的记忆和高级学习记忆^[3-4]。之后,记忆缺失进展为远期记忆及其他认知和行为功能缺失,认知功能下降、进行技巧工作及理解力损害、语言和视空间反常,计算能力下降^[5-7]。本研究以逃避潜伏期和过台次数为指标,通过 Morris 水迷宫检测葛根素对 AD 大鼠空间学习记忆的影响,为 AD 的研究提供科学依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 将成年健康雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 180~220 g(佳木斯大学实验动物中心)分为 6 组,即假手术组、模型对照组、盐酸多奈哌齐对照组、葛根素低剂量组、葛根素中剂量组、葛根素高剂量组,每组各 10 只。

1.1.2 实验仪器 脑立体定位仪(江湾一型 C,第二军医大学);微量进样器(上海精密激光仪器厂);电子天平(AE-240 型,梅特勒-托利多仪器有限公司);超低温冰箱(MDF-492,日本三洋公司);电冰箱(BCD-243 型,中国康拜恩电冰箱总厂);压力蒸汽灭菌器(ZDX-35SB,上海申安医疗器械厂);PURE-LAB PLUS 超纯水系统(美国波尔公司);电热恒温鼓风干燥箱(101-1AB,天津泰思特仪器有限公司)。

1.1.3 药品及试剂 葛根素纯粉剂(南京正大天晴制药有限公司);盐酸多奈哌齐片(贵州圣济堂制药);A β 1-42(Sigma 公

司);无水乙醇注射液(天津市凯通化学试剂有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 AD 大鼠模型的建立^[8] 大鼠适应性饲养 7 d,术前 12 h 禁食不禁水,进行造模。SD 大鼠经戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉后,固定于江湾 I 型 C 大鼠立体定位仪,颅顶区备皮,消毒,沿头顶中线部位作约 2 cm 的切口,将骨膜分离使其头骨暴露,从前卤向后约 3.0 mm,从中线左、右两旁开 2.0 mm 处,将牙科钻打开颅骨。用微量进样器垂直进针 2.8 mm,将 10 μ g/ μ L β -淀粉样蛋白 I (A β 1-42)溶液在 5 min 内缓慢注入,留针 5 min 后缓慢撤针,再用牙科泥封堵住颅骨,消毒并缝合皮肤。假手术组注射与 1 μ L 0.9%生理盐水注射液,其余操作同前。以假手术组平均逃避潜伏期作为参考值,用每支大鼠的逃避潜伏期与参考值只差占该大鼠的逃避潜伏期的比值来判定 AD 大鼠模型的建立是否成功,该比值大于 20 认为造模成功,造模不成功的大鼠不列入数据计算。

1.2.2 动物给药治疗 动物造模 3 d 后开始灌胃给药治疗。葛根素低、中、高剂量组分别按 25、50、100 mg/kg 给药,盐酸多奈哌齐对照组用盐酸多奈哌齐溶液灌胃治疗(按 0.33 mg/kg 给药),假手术组与模型对照组用相同体积的 0.9%氯化钠注射液灌胃治疗,共给药 28 d。

1.2.3 Morris 水迷宫测试^[9] 预先在水池里注入清水,水温控制在 26 $^{\circ}$ C 左右,加入奶粉使其成为不透明的乳白色水溶液,再将适量的清水注入,使水面略高于平台,水深在 30 cm 左右。实验开始前 1 d 将大鼠分别放入没有平台的水迷宫内,每只鼠

* 基金项目:佳木斯大学青年基金项目(Sq2013-021)。 作者简介:李冬(1982—),主管药师,硕士,主要从事临床药学、天然药化研究。

△ 通讯作者, Tel:15694549965; E-mail: dongdong_3333@163.com。

表 1 定位航行实验各组大鼠平均逃避潜伏期($\bar{x} \pm s, s$)

| 组别 | n | 第 1 天 | 第 2 天 | 第 3 天 | 第 4 天 | 第 5 天 | 第 6 天 |
|---------|----|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 假手术组 | 10 | 58.30±7.62 | 36.45±21.23* | 29.58±7.05* | 18.96±5.69* | 9.82±8.25* | 9.79±7.36* |
| 模型组 | 9 | 57.62±5.32 | 45.03±8.97 | 39.35±10.24 | 34.89±11.02 | 24.93±8.26 | 20.07±7.12 |
| 盐酸多奈哌齐组 | 9 | 57.91±9.45 | 37.37±8.65* | 30.72±10.96* | 28.98±10.04* | 14.69±12.38* | 14.05±9.54* |
| 葛根素低剂量组 | 8 | 58.21±11.23 | 38.26±10.86* | 31.06±15.72* | 29.36±13.96* | 18.29±8.56* | 15.63±12.44* |
| 葛根素中剂量组 | 8 | 57.76±12.68 | 37.83±20.14* | 30.81±14.68* | 29.05±11.24* | 17.64±9.85* | 15.52±15.32* |
| 葛根素高剂量组 | 9 | 57.83±8.68 | 37.75±20.58* | 30.78±16.35* | 28.74±10.52* | 17.58±9.68* | 15.55±13.72* |

*: $P < 0.05$, 与模型组比较。

自由游泳 2 min,使其适应游泳环境,将大鼠头部染成黑色。实验历时 7 d,每次训练限时 1 min。测试开始时沿水池中部的池壁将大鼠缓慢的放入池中,大鼠需面对池壁入水。记录大鼠从入水点入水后在 1 min 内找到平台的时间,若大鼠在 1 min 内没能找到平台,就人工把大鼠置于平台上并使其在上面停留 30 s,结束 1 次训练。实验过程中水池周围的参照物位置保持不变。连续实验 6 d,实验的第 7 天,撤掉安全平台开始测试大鼠对平台空间位置记忆的能力。与前 6 d 测试步骤相同,记录大鼠寻找记忆中的平台所花费的时间。将大鼠第 1 次经过平台的时间(潜伏期)和每只大鼠在 1 min 内经过平台的次数分别记录。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 定位航行实验结果 定位航行实验结果显示,在 6 d 的实验中,各组大鼠的平均逃避潜伏期总体呈下降趋势,说明大鼠经过多次训练,对平台的记忆能力增加,但是各组大鼠的学习记忆能力有所不同。采用重复测量多因素方差分析结果显示:在不同时间大鼠逃避潜伏期差异有统计学意义 [$F_{(5,105)} = 141.225, P < 0.05$],以时间为主效应,差异有统计学意义 [$F_{(25,525)} = 3 921.016, P < 0.05$]。各时间点和不同组别之间存在交互效应 [$F_{(30,535)} = 12.806, P < 0.05$]。表明模型组大鼠学习获取能力较差,而葛根素能改善模型大鼠的学习障碍。比较不同时间段各指数之间的差异,第 1 天各组大鼠逃避潜伏期无明显差异,第 2~6 天,模型组大鼠平均逃避潜伏期较假手术组明显延长 ($P < 0.05$);葛根素组和盐酸多奈哌齐组大鼠平均逃避潜伏期较模型组明显缩短 ($P < 0.05$),见表 1。

2.2 空间探索实验结果 在空间探索实验中,与假手术组比较,模型组跨越原平台的次数明显减少,而葛根素低剂量、中剂量、高剂量组大鼠跨越原平台的次数明显增多。盐酸多奈哌齐与葛根素效应相当,见表 2。

表 2 各组大鼠跨越原平台的次数比较($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 跨越原平台的次数(n) |
|---------|----|-------------|
| 假手术组 | 10 | 8.00±2.00* |
| 模型组 | 9 | 4.05±1.03 |
| 盐酸多奈哌齐组 | 9 | 7.20±1.55* |
| 葛根素低剂量组 | 8 | 6.95±2.20* |
| 葛根素中剂量组 | 8 | 7.21±1.95* |
| 葛根素高剂量组 | 9 | 7.31±1.45* |

*: $P < 0.05$, 与模型组比较。

3 讨 论

迷宫是检测大鼠空间学习记忆能力的装置,本研究先对动物进行某种训练,经过一定的时间后,测其保存量以衡量其记忆。游出时间及错误次数反映了动物的学习记忆能力。实验中,经过反复训练动物,同时记录动物寻找平台的时间来评价其学习能力,动物寻找平台的时间越短,说明动物学习能力越强。撤掉平台后,通过检测动物经过原平台所在位置的次数来评价动物对于训练的记忆能力。给药结束后,将 6 组实验动物分别进行训练和测试,增加训练的次数,各组平均寻找平台的时间呈逐渐缩短趋势。这表明大鼠通过多次训练,寻找平台的能力增加。但 $\text{A}\beta_{1-42}$ 注射所致 AD 大鼠模型组学习记忆能力明显低于假手术组,表明脑内注射 $\text{A}\beta_{1-42}$ 制备的动物模型记忆能力明显的下降,动物具有类似“痴呆”表现,表明 AD 模型制备成功。而葛根素组与多奈哌齐组的潜伏期明显低于模型组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明葛根素和多奈哌齐对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的 AD 大鼠模型的学习记忆缺失具有明显的改善功能。实验结果还显示,葛根素组对 AD 大鼠学习记忆能力的改善作用与假手术组相比还具有一定的差距,表明葛根素只能部分的提高 AD 模型大鼠的学习记忆能力,却不能彻底的治愈。

参考文献

[1] 王泽宇,朱晓峰,黄昕艳,等.蒙特利尔认知量表和 MMSE 量表在阿尔茨海默病筛查中的比较与应用[J].黑龙江医药科学,2011,34(4):40.

[2] 刘祥琴,刘小琦,晏宁.老年性痴呆患者血浆 NO 和 H2S 的变化及意义[J].重庆医学,2012,41(1):19-21.

[3] Moyle W,Gracia N,Murfield JE,et al. Assessing quality of life of older people with dementia in long-term care;a comparison of two self-report measures[J]. J Clin Nurs, 2011,68(10):2237-2246.

[4] Chui H, Lee AE. Clinical criteria for dementia subtypes. Evidence-based dementia practice[M]. Oxford, England: Blackwell Science,2002:106-119.

[5] 杨萍萍,沈军.老年痴呆照顾者虐待倾向及影响因素分析[J].中国老年学杂志,2013,33(3):642-644.

[6] Yeaman PA, Kim DY, Alexander JL, et al. Relationship of physical and functional independence and perceived quality of life of veteran patients with alzheimer disease [J]. Am J Hosp Palliat Med,2013,30(5):462-466

[7] 刘悦,晏宁.脂联素与老年性痴呆的研究进展[J].重庆医学,2013,42(21):2543-2545. (下转第 2185 页)

CDPK1 的表达导致 Tg 运动性降低、入侵/离开宿主细胞能力减弱^[9];Tg CDPK3 与恶性疟原虫 CDPK1(PfCDPK1)高度同源(约 50%),对 Tg 离开宿主细胞的过程至关重要^[10-11]。Zhang 等^[8]将真核表达质粒 pVAX-TgCDPK5 注射昆明鼠后产生强烈的细胞 Th1 免疫应答并一定程度上提高了感染 Tg 小鼠的生存时间,提示 TgCDPK5 可能与细胞毒性、侵袭力相关。本研究所涉及的 Tg CDPK5 基因(NCBI 检索号:EPT26997.1)是 Tg 重要的功能基因,由 682 个氨基酸组成,其定位与生物学功能尚不清楚。关于 Tg CDPK5 对 Tg 生长、毒力、侵袭力、微线体分泌,以及水甘油渗透性的调控作用均未见报道。

为探究 Tg CDPK5 编码蛋白的功能,获得 Tg CDPK5 抗体显得意义重大。本实验通过生物信息学分析获得 Tg CDPK5 免疫多肽,成功制备了兔抗 Tg CDPK5 多克隆抗体。对于 CDPKs 在功能方面的研究通常采用生化方法来进行,可直接测定或使用特异性的激活剂来识别该酶的特异调节因子^[12]。除此之外,较难通过直接提取和纯化的方式获得该蛋白。虽然体外表达目的蛋白可以获得具有天然活性的蛋白激酶,但该方法繁琐,需较大工作量。本研究通过对 Tg CDPK5 的序列信息分析,发现该基因无跨膜区,因此可以选择氨基酸序列 N 端或 C 端免疫原性评分较高的区域选择多肽。通过对 Tg CDPK5 蛋白的免疫原性分析,本研究选定该序列 N 端一段长 17 bp 的多肽序列进行合成,从而获得制备多抗所需的 Tg CDPK5 免疫多肽。该方法较之体外表达目的蛋白的方法更加简便直接,可以获得特异性较强的抗原,为后续抗体的成功制备奠定基础。

综上所述,本实验不仅制备了能特异性识别 Tg 内源性 Tg CDPK5 蛋白的兔抗 Tg CDPK5 多克隆抗体,还利用该多抗证实了 Tg CDPK5 蛋白以可溶形式存在于虫体细胞质中。在接下来的实验中,该抗体将会发挥更多使用价值。了解 Tg CDPK5 的作用机制,针对 Tg CDPK5 独特的生物学特性进行药物设计,对治疗 Tg 的药物研发具有指导性作用,也对顶复门其他原虫的药物研究有一定借鉴意义。

参考文献

- [1] Dubey JP, Beattie CP. Toxoplasmosis of animals and man [M]. FLA:CRC Press,1998:22-50.
- [2] Mercier A, Ajzenberg D, Devillard S, et al. Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*; example of the anthropized environment from French Guiana [J]. Infect Genet Evol, 2011, 11(6):1378-1387.
- [3] Samuel R, Bettiker RL, Sul B. AIDs related opportunistic infections, going but not gone [J]. Arch Pharm Res, 2002, 25(3):215-228.
- [4] 唐宏霞,熊学峰,秦志强.乙酰螺旋霉素联合阿奇霉素治疗孕期弓形虫感染的临床效果 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2013, 25(5):555-556.
- [5] 张念章,陈佳,王萌,等.顶复门原虫钙依赖蛋白激酶的研究进展 [J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(1):1-6.
- [6] Nagamune K, Sibley LD. Comparative genomic and phylogenetic analyses of Calcium ATPases and calcium-regulated proteins in the apicomplexa [J]. Mol Biol Evol, 2006, 23(8):1613-1627.
- [7] Sugi T, Kato K, Kobayashi K, et al. Molecular analyses of *Toxoplasma gondii* calmodulin-like domain protein kinase isoform 3 [J]. Parasitol Int, 2009, 58(4):416-423.
- [8] Zhang NZ, Huang SY, Xu Y, et al. Evaluation of immune responses in mice after DNA immunization with putative *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 5 [J]. Clin Vaccine Immunol, 2014, 21(7):924-929.
- [9] Lourido S, Zhang C, Lopez MS, et al. Optimizing small molecule inhibitors of calcium-dependent protein kinase 1 to prevent infection by *Toxoplasma gondii* [J]. J Med Chem, 2013, 56(7):3068-3077.
- [10] Choi KM, Kim JY, Moon SU, et al. Molecular cloning of *Plasmodium vivax* calcium-dependent protein kinase 4 [J]. Korean J Parasitol, 2010, 48(4):319-324.
- [11] 孔春林,韩红玉,李洋,等.柔嫩艾美耳球虫钙依赖蛋白激酶 3 基因在毕赤酵母中的表达及分析 [J]. 生物技术通报, 2012(4):108-112.
- [12] Kieschnick H, Wakefield T, Narducci CA, et al. *Toxoplasma gondii* attachment to host cells is regulated by a calmodulin-like domain protein kinase [J]. J Biol Chem, 2001, 276(15):12369-12377.

(收稿日期:2016-01-08 修回日期:2016-03-28)

(上接第 2181 页)

- [8] 陆晓红,李洪刚,秦丽红,等.依达拉奉对阿尔茨海默病大鼠海马神经元晚期糖基化终末产物的影响 [J]. 黑龙江医药科学, 2012, 35(3):55-56.
- [9] 王海燕,王影,聂磊,等.左乙拉西坦对癫痫大鼠认知功能

及海马组织中 NPY 和 NCAM-mRNA 表达的影响 [J]. 黑龙江医药科学, 2013, 36(3):3-5.

(收稿日期:2015-12-25 修回日期:2016-03-01)

《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的临床研究论文(主体是以人为研究对象),作者应说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准,并提供(上传)该委员会的批准文件复印件及受试对象或其亲属的知情同意书复印件。

《重庆医学》编辑部