

本文引用:高雯华,袁梦石,曾倩柔,范钊坤.何首乌颗粒剂对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆及 miRNA-101 表达的影响[J].湖南中医药大学学报, 2018,38(10):1120-1124.

## 何首乌颗粒剂对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆及 miRNA-101 表达的影响

高雯华<sup>1</sup>,袁梦石<sup>2\*</sup>,曾倩柔<sup>1</sup>,范钊坤<sup>3</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;  
3.浙江省中医院,浙江 杭州 310006)

〔摘要〕目的 研究何首乌对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆能力及双侧海马区 miRNA-101 表达的影响,并探讨其作用机制。

方法 将 120 只 SD 大鼠随机分为 4 组,每组 30 只,分别为假手术组、石杉碱甲组、模型组、中药组。除假手术组外,使用化学试剂冈田酸(OA)注射 SD 大鼠杏仁核部位,形成阿尔茨海默病模型。造模后每组分别予以相应干预(假手术组与模型组均灌等容量生理盐水)。干预 21 d 结束后,运用 Morris 水迷宫作为行为学检测方法,评测大鼠学习记忆能力,行为学观察共进行 5 d,结束后处死实验大鼠,取双侧海马运用 RT-PCR 进行 miRNA-101 半定量检测。结果 经 21 d 干预后,与模型组相比,中药组与石杉碱甲组的阿尔茨海默病模型大鼠的学习记忆能力均更强,其差异具有统计学意义 ( $P<0.01$ );与模型组相比,中药组与石杉碱甲组大鼠双侧海马区 miRNA-101 的相对表达量增加( $P<0.01$ )。结论 何首乌能显著改善阿尔茨海默病模型大鼠的学习记忆能力,对阿尔茨海默病有一定的治疗作用;通过提高模型大鼠海马区 miRNA-101 的含量来改善症状可能是其作用机制之一。

〔关键词〕何首乌;阿尔茨海默病;学习记忆能力;miRNA-101

〔中图分类号〕R285.5;R741 〔文献标志码〕A 〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.10.006

### Effect of Heshouwu Granule on Learning and Memory and miRNA-101 Expression in a Rat Model of Alzheimer's Disease

GAO Wenhua<sup>1</sup>, YUAN Mengshi<sup>2\*</sup>, ZENG Qianrou<sup>1</sup>, FAN Zhaokun<sup>3</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310006, China)

〔Abstract〕Objective To study the effect of *Fallopia multiflora* on learning and memory abilities and miRNA-101 expression in bilateral hippocampus in a rat model of Alzheimer's disease, and to explore its mechanism. Methods A total of 120 Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into four groups: sham-operation group, control (huperzine A) group, model group, and traditional Chinese medicine (TCM) group. To establish a model of Alzheimer's disease, okadaic acid was injected into the amygdala of rats in all the groups except for the sham-operation group. Each group received the corresponding intervention after model establishment (the sham-operation group and the model group were given the same amount of normal saline). After 21 days of intervention, Morris water maze was used for the behavioral test to evaluate the learning and memory abilities of rats.

〔收稿日期〕2017-11-30

〔基金项目〕湖南省中医药管理局资助课题(2015107)。

〔作者简介〕高雯华,女,在读硕士研究生,研究方向:神经系统疾病。

〔通讯作者〕\*袁梦石,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:passy1971@qq.com。

After 5 days of behavioral observation, the rats were sacrificed and the bilateral hippocampus was collected for semi-quantitative measurement of miRNA-101 using RT-PCR. **Results** After 21 days of intervention, the TCM group and the control group had significantly better learning and memory abilities and significantly higher relative expression of miRNA-101 in the bilateral hippocampus than the model group (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion** *Fallopia multiflora* can substantially improve the learning and memory abilities of the rat model of Alzheimer's disease, suggesting a certain therapeutic effect against Alzheimer's disease. The symptoms are improved probably by increasing the content of miRNA-101 in the hippocampus of rats.

[**Keywords**] *Fallopia multiflora*; Alzheimer's disease; learning and memory abilities; miRNA-101

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年性痴呆最常见的一种,属于中枢神经系统退行性疾病,其主要临床特征为学习、记忆能力的减退以及认知功能的受损,伴有大脑功能全面减退的各种临床症状。本病起病隐匿,呈进行性进展,病程缓慢。近几年的调查研究表明,现阶段随着老龄化趋势的加重,在世界范围内 AD 的患病率正在逐年增加,而 AD 在我国老年人中的患病率高达 5%~8%<sup>[1]</sup>。用中医药手段防治 AD 是重要的临床研究方向之一。

AD 的病因与发病机制尚未完全明确,当前研究表明 APP(淀粉样前体蛋白)是形成 AD 重要因素——“老年斑”核心成分  $A\beta^{25}$  的前体物质,而这一环节又有许多调控因子参与其中,如 miRNAs, miRNAs 在 AD 的发生发展中起着重要的调节作用。其中 miRNA-101 可负性调控 APP 的生成,进而起到减少  $A\beta$  异常沉积的作用<sup>[2]</sup>。

根据临床表现及发病特点,中医多将 AD 作为“呆病”“癩病”“健忘”“郁证”等范畴来论述。本病的病位在脑,属本虚标实,其病因多责于年老体衰,气血不足,脏器亏虚,气血津液运行乏力,气、火、痰、瘀等病理产物堆积,上阻于清窍所致。脑为髓海,是认知的物质基础,同时脾主生化为后天之本,心气不足则神不归宿,肾精不足则髓海失养,肝阳上亢则脑络不利,中医在治疗 AD 时常常根据具体症状进行辨证施治。

为明确何首乌对于 AD 的治疗效果及作用机制,研究团队通过动物实验进一步分析研究何首乌治疗 AD 的理论基础。

## 1 实验材料

### 1.1 实验动物

120 只 SPF 级健康成年 Sprague-Dawley (SD)大鼠[动物质量许可证号:CSXK(湘)2013-0004],12 月

龄,(250±50) g,雌雄各半,购于湖南中医药大学第一附属医院中心实验室动物实验中心。

### 1.2 主要药物与试剂

何首乌颗粒剂,购于湖南中医药大学第一附属医院中药房(广州一方颗粒有限公司生产);石杉碱甲(商品名:双益平)购于上海复旦复华药业有限公司,规格:50  $\mu$ g/片,产品批号为:H10960133;水合氯醛购于青岛宇龙海藻有限公司,规格:500 g/瓶,产品批号为:国药准字 H37022673;冈田酸(OA)购于上海泰坦科技股份有限公司,规格:50 mg/瓶,产品批号为:P1117509;Trizol 试剂盒产于美国 Invitrogen 公司,规格:100 mL/瓶,产品货号为:15596026;miRNA 试剂盒购于北京经科宏达生物技术有限公司,规格:10 mL/盒,产品货号为:29066501。

### 1.3 主要仪器与设备

脑立体定位仪(日本 Narishige SN-3 型),1  $\mu$ L 微量注射器(上海精密仪器厂),台式高速离心机(德国 eppendorf),超低温冰箱(中科美菱),荧光定量 PCR 仪、荧光 PCR 板、荧光定量仪均为美国 Thermo 公司提供,天平琼脂糖电泳槽(北京六一),Morris 水迷宫视频分析系统(北京众实迪创科技发展有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 实验动物分组

120 只 SD 大鼠雌雄各半,常规饲养 1 周。然后按照随机区组法将 60 只雌性和 60 只雄性分别进行随机分组,分为假手术组、模型组、石杉碱甲组与中药组,共 4 组,每组 30 只。

### 2.2 造模方法

大鼠腹腔注射 20%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,固定脑立体定位仪上,颅顶正中矢状切开,行立体定位(前囟后 3.0 mm,左右侧方为 4.8 mm,颅骨表面下 8.8 mm)。假手术组:用 5  $\mu$ L 注射器吸取生

理盐水 1  $\mu\text{L}$ ,于 10 min 内缓慢注入杏仁核。用微量注射器向大鼠杏仁核部缓慢注射<sup>[4]</sup>,其中模型组、石杉碱甲组、中药组实验大鼠均予以注射 OA 1  $\mu\text{L}$  (100 mg/ $\mu\text{L}$ ),造模后根据行为学观察结果评判是否造模成功。

### 2.3 干预方法

造模完成第 2 天开始给药,中药组予以 25 g/(kg·d)何首乌颗粒剂溶液(1 mL 溶液即等同于 1g 何首乌颗粒剂),石杉碱甲组予以 0.3 mg/(kg·d)石杉碱甲溶液(1 mL 溶液即等同于 1 mg 石杉碱甲片剂),其余 2 组均予等容量生理盐水,每日 2 次(上午 9 点、下午 4 点)给药。连续干预 21 d。

### 2.4 行为学观测

连续干预 21 d 后参照 Morris 水迷宫实验方法<sup>[5]</sup>观察大鼠学习和记忆能力,评价造模是否成功,并从行为学角度评价石杉碱甲与何首乌对 AD 模型大鼠学习和记忆能力的影响。

### 2.5 miRNA-101 RT-PCR 半定量

大鼠双侧海马取材:于 21 d 灌胃及 5 d 水迷宫实验结束后将各组实验大鼠予 10%水合氯醛腹腔注射,麻醉后以断颈法处死大鼠,迅速取出大脑,在冷冻台上进行分双侧海马的分离:找到额极,向后约 3 mm 取出额叶,由脑中裂向两边约 3 mm、枕叶向前约 3 mm,钝性剥离双侧海马,存于超低温冰箱内。

大鼠双侧海马区 miRNA-101 RT-PCR 半定量<sup>[6]</sup>: Trizol 法提取海马区总 RNA,行 RNA 琼脂凝胶电泳。以组织总 RNA 为模板取 2  $\mu\text{g}$  逆转录 cDNA,42  $^{\circ}\text{C}$  孵育 50 min,85  $^{\circ}\text{C}$  孵育 5 min 后终止反应。在网址 <http://www.mirbase.org/cgi-bin/query.pl?terms=214> 中搜索 miRNA 序列,primer5 软件设计引物,由上海生工合成。设计引物如下:上游引物序列为 5'-AAAGAAAGCCGCCACCT-3',下游引物序列为 5'-GGTCCATCTATGTTGGGGTA-3';GAPDH 的上游引物序列为 5'-GGATTGCTGTCG-TATTGGGC-3',下游引物序列为 5'-CGCTCCTGGAAGATGCTGAT-3'。定量 PCR 扩增条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min,95  $^{\circ}\text{C}$  15 s,60  $^{\circ}\text{C}$  60 s,40 个循环。2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  反映各样品相对于石杉碱甲组样品目的基因的表达水平, $\Delta\text{Ct}$ =目的  $\Delta\text{Ct}$ -内参  $\Delta\text{Ct}$ , $-\Delta\Delta\text{Ct}$ =(石杉碱甲组) $\Delta\text{Ct}$  平均值-各样品  $\Delta\text{Ct}$ ,每个样本重复进行 3 次实验后进行统计分析。

### 2.6 统计学分析

数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,先进行正态性和方差齐性检验,满足正态性时,采用单因素方差分析,组间比较若方差齐时采用方差分析-LSD 检验,方差不齐时用方差分析 Games-Howell 检验;不满足正态性时选择秩和检验;以  $P<0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 动物死亡情况

动物实验周期较长,造模方法有造成颅内感染的可能,每日灌胃有可能对实验大鼠造成伤害,因此出现个别实验大鼠死亡情况。其中假手术组死亡 1 只,石杉碱甲组死亡 2 只,中药组死亡 1 只。

### 3.2 行为学观察

于 21 d 灌胃结束后行水迷宫检测,评价 4 组实验大鼠学习及记忆能力发现:与假手术组比较,模型组平均潜伏期明显延长,停留在原平台象限时间明显缩短,穿越原平台位置的平均次数均明显减少,差异均有显著意义( $P<0.01$ )。与模型组比较,石杉碱甲组、中药组平均潜伏期明显缩短,停留在原平台象限时间明显延长,穿越原平台位置的平均次数有增加,差异均有显著意义( $P<0.01$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠平均潜伏期、停留原平台象限时间和穿越原平台位置次数比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

分组	n	平均潜伏期/s	停留原平台象限时间/s	穿越原平台位置次数/次
假手术组	29	54.37 $\pm$ 7.45	24.42 $\pm$ 1.49	8.03 $\pm$ 1.51
模型组	30	68.43 $\pm$ 9.10**	13.57 $\pm$ 1.96**	4.09 $\pm$ 2.10**
石杉碱甲组	28	59.54 $\pm$ 7.11 $\Delta\Delta$	18.91 $\pm$ 2.42 $\Delta\Delta$	6.64 $\pm$ 3.74 $\Delta\Delta$
中药组	29	58.68 $\pm$ 7.35 $\Delta\Delta$	21.74 $\pm$ 1.87 $\Delta\Delta$	6.69 $\pm$ 1.54 $\Delta\Delta$

注:与假手术组比较,★★ $P<0.01$ ;与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

### 3.3 何首乌对 AD 模型大鼠 miRNA-101 表达的影响

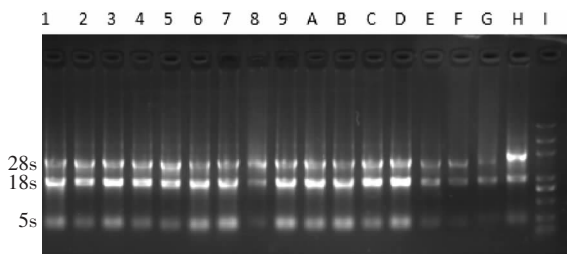
随机选取某一样本(为假手术组样本)miRNA-101 相对表达量为 1,将 4 组样本检验结果进行比较发现:与假手术组比较,模型组 miRNA-101 的表达水平明显下降,差异有显著意义( $P<0.01$ )。与模型组比较,石杉碱甲组与中药组 miRNA-101 的表达水平明显升高,差异有显著意义( $P<0.01$ )。与石杉碱甲组比较,中药组 miRNA-101 的表达水平较高但不明显,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 2。琼脂

凝胶电泳成像,条带由上至下依次为 28 s,18 s,5 s,miRNA-101 在 5 s 位置出现强阳性条带。见图 1。

表 2 各组大鼠 miRNA-101 表达的比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

分组	n	miRNA-101
假手术组	29	0.97±0.07
模型组	30	0.34±0.08**
石杉碱甲组	28	0.81±0.09 $\Delta\Delta$
中药组	29	0.85±0.08 $\Delta\Delta$

注:与假手术组比较,★ $P<0.01$ ;与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。



注:条带由上至下的亮区依次为 28 s,18 s,5 s;从左至右 1-5 为中药组;6-9 为石杉碱甲组;A-D 为假手术组;E-H 为模型组;I 为 Marker。

图 1 琼脂凝胶电泳成像图

## 4 讨论

AD 发病是复杂的病变过程, $A\beta$  异常沉积在 AD 患者持续性大脑损害中扮演了重要的角色,因此有必要从这一环节入手,寻找防治 AD 的有效途径。

在关于痴呆的实验研究中,学者们发现了大量的神经特异性或在神经组织中富集的 miRNAs<sup>[7-8]</sup>,脑组织中检测到的 miRNAs 占实验可以检测出的 miRNAs 的 70%。许多的 miRNAs 在神经系统中特异表达或大量表达<sup>[9]</sup>,并参与了神经分化,突触可塑性<sup>[10]</sup>及记忆形成<sup>[11]</sup>,并参与调控蛋白质的合成。各种各样的 mRNAs 以核糖核蛋白(ribonucleoprotein)颗粒转运成分的形式活跃而快速地转运到树突。一旦 mRNAs 到达它们树突的目的位点,翻译就被抑制,mRNA 处于无功能状态。然而,在感应到突触活动的变化后,这些 mRNAs 的翻译呈现时序性控制,在突触反应的影响下产生持续的持续的变化,进而产生生长时程的记忆<sup>[12]</sup>。研究发现 miRNA 在 AD 的发生发展中起着重要的作用<sup>[13]</sup>并且对 miRNA 的干扰可能成为治疗 AD 的新靶点。miRNA-101 作为脑中富含的 miRNA 在小鼠身上首先被克隆出来<sup>[14]</sup>,现已有研究显示,在 AD 患者脑中 miRNA-101 水平显著下降<sup>[15]</sup>,它是海马神经元内 APP 的负性调节因子,可通

过与 APP mRNA 3' UTR 互补的机制结合到 APP mRNA 上,抑制其转录或直接导致其降解,从而抑制 APP 的表达,起到负性调控 APP 的效果,在体外实验利用慢病毒载体转染 miRNA-101,实现了对原代海马神经元内 APP 代谢产物— $A\beta$  产生的抑制效应<sup>[16]</sup>。

实验结果表明何首乌颗粒剂可改善 AD 模型大鼠学习及记忆能力,提高 AD 模型大鼠海马中 APP 负性调控因子 miRNA-101 的表达。何首乌通过调控提高 miRNA-101 含量来负性调控 APP 的生成,从而延缓 AD 进程、改善 AD 症状。从中医机制来讲,AD 的病因病机可从“不通”和“不荣”两个方面论述。肾作为人身“先天之本”,“受五脏六腑之精而藏之”,主藏精生髓,上通于脑络。肾气所化生的精微物质通过脑络上充于脑窍,是脑发挥其正常生理功能的物质基础;髓的盈亏受肾精之盛衰的影响,即“精汁之清者,化而为髓”。若肾不生则髓不满,脑窍失于充养则神机失用。心为“君主之官”,主藏神,而控制思维和精神活动。心主血脉,上充脑络而养神明,心血充盈又能濡养脑髓,是生命活动的物质基础;心气推动一身血脉运行,乃神志活动的动力。心血不足,神明失养;心阳不振或心气不足,推动运行乏力则易化生痰浊;若痰浊与瘀血互结,于经络之中阻滞、又上蒙清窍,见癫狂之证,或可见邪毒郁久化热、火毒炽盛之证。脾为“后天之本”“生化之源”,主思藏意。生化气血而为髓,又主升清使清阳上荣脑窍,若平人脾气健运,则生化旺盛、气血充盈,表现为思维敏捷、意识清楚;若脾胃虚弱,生化乏源则气血不足、髓海失充;另外,脾主运化水湿,若脾虚而不运水湿、酿生痰浊,阻于脉络,气机失和而逆乱则使痰浊蒙蔽神明。肝主疏泄、调畅气机,胆为决断之官,两者共同调节思维情志。若本气血亏虚,肝之疏泄条达无力,见“郁滞”之证;或可见夹肝火亢盛、或肝气横犯脾胃酿生痰湿、或肝风夹痰上扰神明、或痰湿郁而化热蒙蔽清窍之证。

人至老年多阴血不足,多见虚证,虚实之间又多有转化,可因虚致实,生成痰饮、瘀血。何首乌苦甘涩,性微温,补肝肾而滋人之阴血,助神明正常生理功能的物质基础,又能助肾气激发一身之气,使生命活动旺盛,推动身体各项机能正常发挥,滋肾之阴精以助上充髓海、滋养元神。若将“髓海”比作现代生物学中脑内神经元的营养因子或部分调控因子来诠释

何首乌在治疗 AD 中的作用, 例如 miRNA-101, 它在神经细胞中负性调控 APP 的生成, 进而减少 A $\beta$  的异常沉积, 何首乌可提高 AD 模型大鼠海马区 miRNA-101 即视作起到充盈髓海的作用, 从中医理论体系下的病因病机学方面起到了“治病求本”的治疗作用。

#### 参考文献:

- [1] YUETAO SONG, JINTANG WANG. Overview of Chinese research on senile dementia in mainland China[J]. Ageing Research Reviews, 2010, 9 suppl 1(6):s6.
- [2] 张玉岭, 陈宝贵. 回神颗粒对双转基因阿尔茨海默病小鼠海马区 A $\beta$ 1-42 表达的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2015, 35(8):22-26.
- [3] 魏建设, 张玲妹, 黄娅琳, 等. 冈田酸诱导大鼠脑 tau 蛋白磷酸化和神经细胞退化[J]. 中国神经科学杂志, 2002, 18(3):577-821.
- [4] 陈向良, 袁长津, 袁梦石, 等. 损伤杏仁核制备阳虚阿尔茨海默病大鼠模型[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(2):137-140.
- [5] 李爱萍, 赵慧李, 韶朴花, 等. 不同鼠种在 Morris 水迷宫学习记忆行为中的种属差异[J]. 中国行为医学科学, 2005, 14(1):29-31.
- [6] KING, NICOLA. RT-PCR Protocols[M]. Germany: Springer, 2011:86-93.
- [7] CAO X, YEO G, MUOTRI A R, et al. Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system[J]. Annu Rev Neurosci, 2006, 29(1):77-103.
- [8] MISKA E A. Microarray analysis of micro RNA expression in the developing mammalian brain[J]. Genome Biol, 2004, 5(9):68-69.
- [9] HOHJOH H, Fukushima T. Expression profile analysis of microRNA (miRNA) in mouse central nervous system using a new miRNA detection system that examines hybridization signals at every step of washing[J]. Gene, 2007, 391(1):39-44.
- [10] SCHRATT G M. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development[J]. Nature, 2006, 439(7074):283-289.
- [11] LUO L. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity[J]. Annu. Rev. Cell Dev. Biol, 2002, 18: 601-635.
- [12] ASHRAFS LAND KUNESS A trace of silence memory and microRNA at the synapse[J]. Curr. Opin. Neurobiol, 2006, 16(5):535-539.
- [13] SATOH J. MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: aberrant microRNA expression in Alzheimer's disease brains[J]. Pharmacol Sci, 2010, 114(3):269-275.
- [14] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, YALCIN A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse[J]. Curr Biol, 2002, 12(9):735-739.
- [15] COGSWELL J P, WARD J, TAYLOR I A, et al. Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways[J]. Alzheimers Dis, 2008, 14(1):27-41.
- [16] VILARDO E, BARBATO C, CIOTTI M, et al. MicroRNA-101 regulates amyloid precursor protein expression in hippocampal neurons[J]. Biol Chem, 2010, 285(24):18344-18351.

(本文编辑 杨 瑛)