

文章编号:1001-6880(2015)1-0045-05

# 二十五味珊瑚丸对 D-半乳糖衰老大鼠 神经元特异性烯醇化酶表达的影响

杨春<sup>1,4</sup>,李鹏<sup>2</sup>,罗远带<sup>3</sup>,杜以宽<sup>2</sup>,黄福开<sup>3\*</sup>,甄丽芳<sup>3</sup>,胡贤达<sup>3</sup>,杨勤劳<sup>1</sup>,原林<sup>2,4\*</sup><sup>1</sup>深圳大学光电工程学院 光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室,深圳 518000;<sup>2</sup>南方医科大学,广州 510515; <sup>3</sup>中国藏学研究中心北京藏医院,北京 100029; <sup>4</sup>深圳大学医学院,深圳 518060

**摘要:**探讨二十五味珊瑚丸(25 Odors Coral Pills)对D-半乳糖(D-gal)衰老大鼠海马锥体细胞形态和神经元特异性烯醇化酶(NSE)表达的影响。采用颈背部皮下注射D-gal模拟衰老大鼠模型。治疗组于造模第6周,给予25 Odors Coral Pills灌胃2周,之后取各组脑组织行相关检测。与模型组比较,25 Odors Coral Pills组大鼠海马CA1、CA3区锥体细胞层细胞丢失较少,细胞排列较紧密、整齐;DG区NSE阳性的细胞减少,胞体较小,突起较细;海马NSE表达下降,有统计学差异( $P < 0.05$ )。D-gal衰老模型鼠海马锥体细胞衰老变性且NSE的表达增多;25 Odors Coral Pills可抑制D-gal衰老鼠海马锥体细胞的衰老变性和NSE的表达。

**关键词:**二十五味珊瑚丸;神经元特异性烯醇化酶;D-半乳糖;衰老;锥体细胞

中图分类号:R741

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.009

## Effect of 25 Odors Coral Pills on Pyramidal Cell and the Expression of NSE in Hippocampus of D-galactose Induced Brain Aging Rats

YANG Chun<sup>1,4</sup>, LI Peng<sup>2</sup>, LUO Yuan-dai<sup>3</sup>, DU Yi-kuan<sup>2</sup>, HUANG Fu-kai<sup>3\*</sup>,  
ZHEN Li-fang<sup>3</sup>, HU Xian-da<sup>3</sup>, YANG Qin-lao<sup>1</sup>, YUAN Lin<sup>2,4\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Ministry of Education and Guangdong Province, College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518000, China; <sup>2</sup>Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>3</sup>Beijing Tibetan Hospital, China Tibetology Research Center, Beijing 100029, China; <sup>4</sup>School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

**Abstract:** The D-galactose induced brain aging model was used to study the effect of 25 odors coral pills on hippocampus. The morphology of pyramidal cells and the expression of neuron-specific enolase (NSE) in hippocampus were determined in each experimental group. Hippocampal neuronal degeneration on CA1, CA3, DG region was observed by hematoxylin-eosin staining. The expression of NSE was explored by immunohistochemistry, Western blotting and densitometric analysis. The results showed that the degeneration of hippocampal pyramidal cells in 25 odors coral pills group was significantly improved, and the number of cells positive for NSE and the expression of NSE in the hippocampus were significantly reduced. These results indicated that 25 odors coral pills can inhibit hippocampal neuronal degeneration and the expression of NSE protein in the D-galactose induced brain aging rats.

**Key words:** 25 odors coral pills; NSE; D-galactose; aging; pyramidal cells

阿尔茨海默病(又称老年性痴呆,AD)是发生在老年及老年前期、以进行性认知功能障碍和行为损害为特征的中枢神经退行性疾病<sup>[1,2]</sup>。中医理论认为AD属于“老年呆病”的范畴,其病理机制主要是

本虚标实,本虚主要是脑髓亏虚,标实主要是痰浊、血瘀。目前治疗AD大都是针对其某一特定病理环节进行干预,但由于AD发病机制复杂,单一作用点的药物很难取得满意的治疗效果。而中药治疗AD多途径、多靶点的特征,正契合了该病复杂多样的发病机制。神经元及神经胶质细胞在神经退行性疾病发生中起着重要作用。在衰老及相关的神经退行性疾病防治中,调节神经细胞的功能成为一种新的靶标。D-半乳糖致大鼠衰老模型是一种简便优良的衰

收稿日期:2014-06-25 接受日期:2014-09-11

基金项目:国家重大财政专项:藏医心脑血管临床研究与药物研发(1981020421);省产业技术研究与开发资金项目(2011B01050004)

\* 通讯作者 Tel:86-20-61648637; E-mail:yuanl@fimmu.com

老模型,此模型神经元大量变性衰老。反应性星形胶质细胞增生参与了 D-半乳糖诱导脑衰老的病理过程。二十五味珊瑚丸为藏药名方,具有开窍、通络和止痛的功效,对脑部神经血管病变具有较好的疗效<sup>[3]</sup>。本实验选用 D-半乳糖制备衰老鼠模型,之后给予二十五味珊瑚丸干预,通过 HE 染色观察海马区锥体细胞形态,通过 NSE 免疫组化染色和 Western blotting 法观察海马神经元特异性烯醇化酶(NSE)的表达情况,探讨二十五味珊瑚丸对衰老鼠海马细胞的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组与模型制备

成年 SD 雄性大鼠 18 只,体重 180~220 g(No. 4402101582);随机分为模型组、对照组和二十五味珊瑚丸组,每组各 6 只。模型组及二十五味珊瑚丸组颈背部皮下注射 D-半乳糖 500 mg/(kg·d)(溶于生理盐水中),对照组颈背部皮下注射生理盐水,连续给药 8 周。于造模的第 6 周,对照组、模型组给予生理盐水灌胃,二十五味珊瑚丸组(根据前期结果采用最适浓度)给予二十五味珊瑚丸 64 mg/(kg·d)(混于生理盐水中)灌胃,连续给药 2 周。

### 1.2 脑组织切片的制备

灌胃 4 周后,各组大鼠用 10% 水合氯醛腹腔麻醉,固定,暴露心脏,剪开右心耳,经左心室灌注生理盐水,待肝脏颜色变浅,然后以 4% 的多聚甲醛灌注约 60 min,先快后慢,待肝脏及尾巴变硬,断头取脑,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,经 PBS 缓冲液反复浸洗,最后将脑组织脱水,透明,石蜡包埋,冠状切片(厚约 5 μm)备用。

### 1.3 HE 染色及 NSE 免疫组化染色

石蜡切片烤片(65 °C, 60 min);二甲苯脱蜡(2 × 10 min);经 100%~50% 酒精梯度脱水后入蒸馏水;苏木素染色 5 min;蒸馏水洗 2 min;1% 盐酸乙醇 1~3 s;流水冲洗 30 min;0.5% 伊红液染色 3 min;蒸馏水洗 2 min;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。Olympus 显微镜下观察,并拍照收集海马切面图像。

石蜡切片烤片(65 °C, 60 min);二甲苯脱蜡(2 × 10 min);经 100%~50% 酒精梯度脱水后入蒸馏水;50% 甲酰胺 2 × SSC, 65 °C 2 h;2 × SSC 洗 5 min;2 mol/L HCl 37 °C 30 min, 0.1 mol/L 硼酸室温 10

min;1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS 10 min, 1 × PBS 洗 3 × 10 min;5% 山羊血清/0.3% tritonX-100 室温封闭 2 h;加 1:100 稀释的兔抗鼠 NSE 一抗 4 °C 过夜,用 PBS 代替一抗做阴性对照,PBS 漂洗(3 × 10 min);加入 1:200 稀释的辣根过氧化物标记的羊抗兔 IgG 二抗,37 °C 孵育,PBS 漂洗(3 × 10 min);加新配制的 DAB 溶液,显微镜下观察 5~10 min;自来水充分冲洗;苏木素复染;去离子水分化;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。Olympus 显微镜下观察,并拍照收集海马切面图像。采用 Image pro Plus 6 图像分析软件,测量 NSE 阳性细胞数。

### 1.4 Western blotting 分析 NSE 表达

称取各组大鼠海马组织 50 mg,液氮中研磨后,加入 300 μL RIPA 细胞裂解液,冰上静置 30 min,4 °C、13000 g 离心 10 min,取上清,即为提取的海马组织总蛋白。BCA 蛋白定量法计算出蛋白浓度。吸取 50 μg 总蛋白,加入 25% 体积电泳上样缓冲液,98 °C 加热变性 5 min。12% SDS-PAGE 分离胶,5% SDS-PAGE 积层胶电泳,上样 50 μg 总蛋白。电泳后将蛋白从 SDS-PAGE 凝胶转至 PVDF 膜上。用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h。TBS-T 洗脱三次,每次 5 min。加一抗:兔多克隆抗体 NSE 以 1:500 稀释。鼠多克隆抗体 actin 以 1:1000 稀释,4 °C 孵育过夜。次日室温孵育 30 min,TBS-T 洗脱三次,每次 5 min。加二抗:鼠抗兔二抗以 1:2000 稀释,室温孵育 2 h,BeyoECL Plus 发光液显影。Kodak Image Station 2000MM 成像系统采集图像,获得图像用图像处理软件 Image Tool 3.0 分析,用 NSE/Actin 代表 NSE 的相对表达量。

### 1.5 统计分析

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件处理,应用单因素方差分析,以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 实验结果

### 2.1 各组大鼠海马 CA3 区 HE 染色

海马 CA3 区主要为锥体细胞层,HE 染色后胞浆呈红色,细胞核呈蓝色;与对照组相比,模型组锥体细胞层细胞数量明显减少,排列稀疏、紊乱,细胞间隙增大,可见核固缩;与模型组相比,二十五味珊瑚丸组锥体细胞丢失较少,细胞排列较紧密、整齐,结果见图 1。

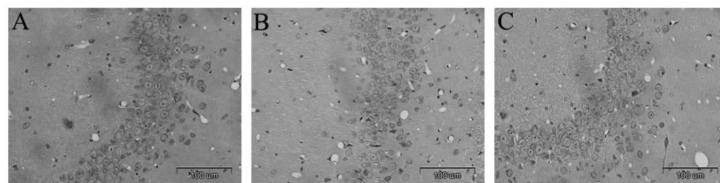


图 1 对照组(A)、模型组(B)及二十五味珊瑚丸组(C)大鼠海马 CA3 区 HE 染色( $\times 400$ )

Fig. 1 H&E staining of CA3 of blank control group (A), aging model group (B) and 25 odors coral pills group (C) ( $\times 400$ )

## 2.2 各组大鼠海马 DG 区 NSE 免疫组化染色

NSE 在各组大鼠海马齿状回区均有表达, 主要分布在胞浆, 为黄色或棕黄色颗粒物; 与对照组相比, 模型组 NSE 阳性的细胞数量增多, 胞体肥大, 突

起较粗; 与模型组相比, 二十五味珊瑚丸组 NSE 阳性的细胞数量明显减少, 胞体较小, 突起较细, 结果见图 2。

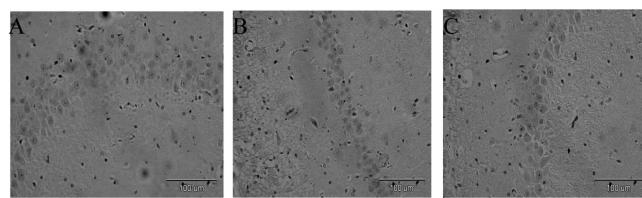


图 2 对照组(A)、模型组(B)及二十五味珊瑚丸组(C)大鼠海马区 NSE 染色( $\times 400$ )

Fig. 2 NSE expression of aging model group (A), blank control group (B) and 25 odors coral pills group (C) ( $\times 400$ )

## 2.3 各组大鼠海马区 NSE 阳性细胞数和累积光密度

与对照组比较, 模型组海马各区的细胞数明显增多, 累积光密度值(IOD)明显增大, 差异有显著性

( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 二十五味珊瑚丸组各区的细胞数明显减少, 累积光密度值 IOD 明显减小, 差异有显著性( $P < 0.05$ ), 结果见表 1 及表 2。

表 1 各组大鼠海马区 NSE 阳性细胞数比较( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of the number of NSE positive cells in the hippocampus of rats ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	CA1 阳性细胞数 CA1 positive cell	CA3 区阳性细胞数 CA3 positive cell	CA3 区阳性细胞数 DG positive cell
模型 Aging model group	$34.00 \pm 1.42^*$	$31.50 \pm 1.05^*$	$40.83 \pm 1.94^*$
空白对照 Control group	$23.00 \pm 1.55$	$20.67 \pm 1.21$	$23.67 \pm 2.25$
二十五味珊瑚丸 25 odors coral pills	$27.17 \pm 2.14^{**}$	$23.50 \pm 1.05^{**}$	$32.33 \pm 1.63^{**}$

注: 与空白对照组比较,  $^* P < 0.05$ ; 与模型组比较,  $^{**} P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group,  $^* P < 0.05$ ; Compared with aging model group,  $^{**} P < 0.05$ .

表 2 各组大鼠海马区 NSE 阳性细胞累积光密度(IOD)比较( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of the integrated optical density (IOD) for NSE in the hippocampus of rats ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	CA1 累积光密度 CA1 IOD	CA3 累积光密度 CA3 IOD	CA3 累积光密度 DG IOD
模型 Aging model group	$1360.00 \pm 7.44^*$	$1344.73 \pm 8.55^*$	$1391.98 \pm 3.64^*$
空白对照 Control group	$190.88 \pm 5.70$	$164.17 \pm 6.29$	$195.19 \pm 3.59$
二十五味珊瑚丸 25 odors coral pills	$463.11 \pm 20.22^{**}$	$443.04 \pm 12.12^{**}$	$483.77 \pm 7.84^{**}$

注: 与空白对照组比较,  $^* P < 0.05$ ; 与模型组比较,  $^{**} P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group,  $^* P < 0.05$ ; Compared with aging model group,  $^{**} P < 0.05$ .

## 2.4 Western blotting 分析各组大鼠海马 NSE 表达

与对照组比较, 模型组 NSE 蛋白表达有增高趋势, 差异有显著性( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 二十

五味珊瑚丸组 NSE 蛋白表达有下降趋势, 差异有显著性( $P < 0.05$ ), 结果见图 3。

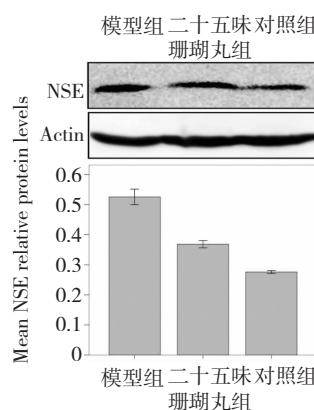


图 3 各组大鼠海马 NSE 表达 (Western blotting 分析)

Fig. 3 Expression of NSE in different groups (Western blotting and densitometric analysis)

### 3 讨论

老年性痴呆是一类以渐进性痴呆和皮质萎缩为主要特征的老年性疾病,其发病也可能是遗传和环境共同作用的结果<sup>[4]</sup>。脑老化在器官老化中占有非常重要的地位,研究较多。脑老化患者其临床最突出的特点之一是学习、记忆功能的明显降低,反应迟钝;其病理表现是神经元突触减少,神经元纤维缠结形成<sup>[5]</sup>。中医理论认为脏腑功能紊乱是 AD 发生的前提,继之产生的内生浊毒是重要的病理因素。脏腑功能不足,尤其是肾精的不足,是导致 AD 的先决条件。内生浊毒不仅是 AD 发病的关键病理因素,也是进一步损伤脏腑功能的继发因素。西医学认为 A<sub>B</sub> 的过度沉积和 tau 蛋白异常聚集形成的神经原纤维缠结是 AD 形成的重要病理标志,它不仅是人体衰老的产物,也是进一步加剧 AD 的关键因素这与中医学所说的内生浊毒有很高的致一致性。

老年性痴呆与细胞凋亡的关系近来引起广泛关注,在培养细胞、动物模型以及老年性痴呆病人的尸解中,均发现了细胞凋亡的证据,在阿尔茨海默病过程中也有凋亡发生<sup>[2]</sup>。目前认为,神经细胞丢失与患者智能衰退的关系最为密切。近来研究发现,阿尔茨海默病患者脑内细胞丢失的机制可能与细胞凋亡有关。活性氧引起细胞凋亡是阿尔茨海默病发病的重要原因。通过 D-gal 产生活性氧过荷来进行造模,旨在观察二十五味珊瑚丸对海马神经元由 D-gal 造模后产生的细胞凋亡的抑制作用,加上后续的实验对其机制进行研究,从而为二十五味珊瑚丸防治老年性痴呆提供新的线索。

神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 是一种神经系统特异性蛋白质,是糖酵解过程的催化酶,主要存在于神经元和神经内分泌细胞的胞浆中,其含量可敏感而特异地反映神经元损伤程度。是目前唯一能特异性反映神经元损伤的生化标志物<sup>[3,6]</sup>。脑组织损伤致神经元损伤或坏死后,NSE 迅速从细胞内溢入脑脊液,通过受损的血脑屏障进入血液中,致血清 NSE 浓度升高,其含量可反映神经元受损的程度,对早期直接而准确地了解脑损伤程度,具有重要的临床意义<sup>[7]</sup>。故 NSE 是神经元损伤最为敏感的生化指标,可作为脑保护作用药物疗效的重要评价指标。

D-半乳糖作为衰老模型 1991 年由我国学者龚国清等首次提出,随后许多学者在大鼠和小鼠上都证实该模型表现出与人类自然衰老相类似的生化改变、免疫功能低下、基因表达调控异常、细胞生长繁殖能力下降、细胞的退行性变、大鼠记忆巩固和再现障碍等现象,其机理是氧自由基介导的脂质过氧化效应。

D-半乳糖致大鼠衰老模型,表现为退行性病变,是一种简便优良的衰老模型。海马是脑内参与记忆贮存功能的重要部分,海马中与记忆有关的神经元主要是齿状回 DG 区、海马 CA1 区和 CA3 区锥体细胞。D-半乳糖老鼠学习记忆功能下降,齿状回 DG 区、海马 CA1 区和 CA3 区的 TUNEL 阳性细胞显著增加,细胞萎缩和核固缩,大量神经元变性。

AD 是一种多因素相关的复杂性疾病。近年来,研发的一些 AD 治疗药物在临床试验中不成功,重要原因是药物仅针对单靶点或单致病途径,因此目前国际上许多学者提出,应当转换思路,应用多靶点、多途径的治疗策略来研发治疗 AD 的药物。在这方面我国的中药具有优势。藏药名方二十五味珊瑚丸,以芳香开窍,活血化瘀药物为主,对脑部神经血管病变具有较好的疗效,适用于藏医理论中的“白脉病”,如神志不清、身体麻木、头晕目眩、血压不调、头痛、癫痫及各种神经性疼痛。目前,二十五味珊瑚丸的各项研究工作较以往有了长足的进步,但是一直缺少现代药理学的研究。本方中含有多种中草药,研究表明,珍珠母具有抗脑缺血作用,可以明显降低局灶性脑缺血大鼠脑组织中单核细胞趋化蛋白 (MCP-1) 的表达。MCP-1 是脑缺血损伤中的重要因子,表达显著增加,它可以强烈趋化单核细胞,引起一系列的炎症反应,而炎症反应在脑缺血损伤中占重要地位。诃子常应用在藏医学、蒙药中,是蒙

药中应用比例最大、功用最广泛的药物, 被称之为蒙药之王。诃子提取物含药血清对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤心肌细胞具有保护作用, 其机制可能与稳定细胞膜和抗氧化有关; 麝香提取物对脂多糖所致神经细胞炎性损伤具有显著的保护作用。麝香能明显缩小水肿区移行带, 有利于三羧酸循环进行和膜结构的稳定; 吴启端等通过实验研究发现石菖蒲具有兴奋 CNS, 抗缺氧, 清除自由基, 抑制脑神经细胞凋亡作用, 并有防止脑组织萎缩的作用, 从而有效地延缓脑组织的衰老和改善小鼠学习记忆功能。石菖蒲对神经元的保护作用可能是防止神经元变性或延缓神经元结构的改变。因此, 我们推测二十五味珊瑚丸对神经元细胞有一定的保护作用。

实验结果显示: 与对照组相比, 模型组大鼠海马 CA3 区的锥体细胞层排列层次紊乱, 数量减少, 细胞萎缩和核固缩, 海马齿状回 DG 区 NSE 表达的细胞数较多, 胞体和突起较肥大, 海马 NSE 蛋白表达增多, 提示 D-半乳糖大鼠的海马神经元变性、受损。与模型组相比, 二十五味珊瑚丸组大鼠 CA3 区的锥体细胞层排列层次整齐, 数量较多, 细胞萎缩和核固缩减轻, 齿状回 DG 区的 NSE 表达的细胞数较少, 胞体和突起较小, 海马 NSE 蛋白表达下降, 说明二十五味珊瑚丸能抑制 D-半乳糖诱导的神经元变性, 从而减轻神经元的损伤。本实验也说明藏药在治疗 AD 在实验研究方面, 可以通过减低炎症反应、抑制凋亡、增强神经生长、提高抗氧化能力等环节, 改善模型动物学习记忆功能, 体现了中医多途径、多环节、多靶点的优势。随着对中医药治疗 AD 机制的深入研究, 探索 AD 中医病理与西医病理之间的交

叉点, 发现两者之间的内在联系, 可成为筛选有效治疗 AD 药物的途径。这些结果为拓展二十五味珊瑚丸药效和深入洞察其药理作用提供了实验资料。但对于二十五味珊瑚丸的哪些有效成分, 以及通过何种途径抑制神经元变性, 还有待深入研究。

## 参考文献

- Greig NH, Lahiri DK. Editorial: advances in understanding Alzheimer's disease, and the contributions of current Alzheimer research: ten years on and beyond. *Curr Alzheimer Res*, 2014, 11:107-109.
- Sandoz M, Demonet JF, Fossard M. Theory of mind and cognitive processes in aging and Alzheimer type dementia: a systematic review. *Aging Ment Health*, 2014, 18:815-827.
- Du WB(杜文兵), Huang FK(黄福开), Luo YD(罗远带), et al. Pharmacological and clinical research progress of 25 odors coral pills. *World J Integr Tradit Western Med* (世界中西医结合杂志), 2013, 8:537-540.
- Landau SM, Frosch MP. Tracking the earliest pathologic changes in Alzheimer disease. *Neurology*, 2014, 82: 1576-1577.
- Wang YJ. Alzheimer disease: Lessons from immunotherapy for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 2014, 10:188-189.
- Ondruschka B, Pohlers D, Sommer G, et al. S100B and NSE as useful postmortem biochemical markers of traumatic brain injury in autopsy cases. *J Neurotrauma*, 2013, 30: 1862-1871.
- Bharosay A, Bharosay VV, Varma M, et al. Correlation of brain biomarker neuron specific enolase (NSE) with degree of disability and neurological worsening in cerebrovascular stroke. *Indian J Clin Biochem*, 2012, 27:186-190.
- Alix T, Leslie B, Bernard R, et al. Preparative isolation of glucosinolates from various edible plants by strong ion-exchange centrifugal partition chromatography. *Sep Purif Technol*, 2011, 83:15-22.
- Ana MA, Maria JN, Jose L, et al. Optimized extraction, separation and quantification of twelve intact glucosinolates in broccoli leaves. *Food Chem*, 2014, 152:66-74.

(上接第 72 页)

- Pan Z(潘正), Gao YL(高运玲), Liu Y(刘毅), et al. Chemical constituents from *Thlaspi arvenus* Linn. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2013, 35:995-997.
- Pedras MSC, Chumala PB, Suchy M. Phytoalexins from *Thlaspi arvense*, a wild crucifer resistant to virulent *Leptospaeria maculans*; structures, syntheses and antifungal activity. *Phytochemistry*, 2003, 64:949-956.