

补肾祛瘀化痰法对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠 Morris 水迷宫研究的影响

姜洋 杨惠民 马玉琪 梁志齐

【摘要】目的 通过研究补肾祛瘀化痰法对 ApoE 基因敲除小鼠 Morris 水迷宫成绩的影响,探讨补肾祛瘀化痰法对认知功能障碍的改善作用。**方法** 将 ApoE 基因敲除小鼠共 32 只随机分为成年中药组、成年模型组及老年中药组、老年模型组,并取相同遗传背景的 C57BL/6J 小鼠共 16 只随机分成成年正常组及老年正常组,连续给予补肾祛瘀化痰法组方灌胃 12 周,成年组至 32 周龄、老年组至 44 周龄时检测 Morris 水迷宫定位航行实验及空间探索实验的成绩。**结果** 定位航行实验逃避潜伏期结果不符合正态分布,故采用非参数检验中 K 组独立样本检验进行数据统计;成年各组之间逃避潜伏期无明显差异($P>0.05$)。老年模型组较老年中药组逃避潜伏期显著延长($P<0.01$),老年模型组较老年正常组亦明显延长($P<0.05$)。空间探索实验中,第Ⅲ象限路程及第Ⅲ象限时间均符合正态分布,故采用单因素方差分析进行数据统计;成年各组之间在穿台次数、第Ⅲ象限路程及第Ⅲ象限时间均无明显差异($P>0.05$);老年模型组较老年正常组穿台次数明显减少($P<0.05$),老年中药组及老年模型组均较老年正常组在第Ⅲ象限路程及第Ⅲ象限时间明显缩短($P<0.05$)。**结论** 老年中药组及老年正常组小鼠 Morris 水迷宫成绩较理想,说明补肾祛瘀化痰法可改善老龄小鼠 Morris 水迷宫成绩,从而改善认知功能。

【关键词】 补肾祛瘀化痰法; ApoE 基因敲除小鼠; Morris 水迷宫

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.01.006

The effects of tonifying kidney and removing stasis and phlegm on morris water maze of ApoE knockout mice JIANG Yang, YANG Hui-min, MA Yu-qi, et al. Department of traditional Chinese medicine, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

Corresponding author: JIANG Yang, E-mail: jiangyang310@sohu.com

【Abstract】Objective To assess the effects of tonifying kidney and removing stasis and phlegm on the test of morris water maze of ApoE knockout mice in adult and old groups. **Methods** ApoE knockout mice were divided into adult treatment group, adult model group, old treatment group and old model group. And C57BL/6J mice were divided into adult normal groups and old normal groups. When the adult groups mice were 32 weeks and the old groups were 44 weeks, the mice were tested by morris water maze. The scores of navigation experiment and space exploration experiment in morris water maze were recorded. **Results** The escape latency of adult rats in the treatment group, model group and normal group had no significantly difference($P>0.05$). But in old rats, the escape latency of the model group was significantly longer than that of the normal group and treatment group. The space exploration experiment showed that the normal group was much better than the treatment and model groups. **Conclusions** The normal group and the treatment group show better scores in morris water maze than the model group. The results support that tonifying kidney and removing stasis and phlegm can improve cognitive function of old ApoE knockout mice.

【Key words】 Tonifying kidney and removing stasis and phlegm; ApoE knockout mice; Morris water maze

基金项目:北京中医药大学博士自主课题(2013-JYB22-XS-128)

作者单位:100035 北京积水潭医院中医科(姜洋、马玉琪、梁志齐);北京中医药大学第一临床医学院教务处(杨惠民)

作者简介:姜洋(1986-),女,博士,住院医师。研究方向:中医老年病学。E-mail:jiangyang310@sohu.com

ApoE 基因敲除小鼠由于缺乏 ApoE 基因而易出现脂质代谢障碍,可导致血脂异常及脂质堆积引起的血管内皮炎性损伤,故 ApoE 基因敲除小鼠更易受到氧化应激作用的侵害而出现认知功能障碍、动脉粥样硬化等。本实验中以补肾祛瘀化痰中药干预 ApoE 基因敲除小鼠,并观察各组在 Morris 水迷宫实验中对空间位置感和方向感(空间定位)的学习记忆能力,从而探索补肾祛瘀化痰法对小鼠认知功能的改善作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 清洁级 8 周龄 ApoE 基因敲除小鼠 32 只,均为雄性,体质量(20 ± 2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号为:SCXK(京)2011-0012;8 周龄相同遗传背景 C57BL/6J 小鼠 16 只,均为雄性,体质量(20 ± 2)g,购自军事医学科学院动物实验室,动物许可证号为:SCXK(军)2007-004。饲养场地为北京中医药大学清洁级动物房,普通饮食,充足摄食及饮水,室温(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,每天光照 12 小时,湿度 50%~70%。

1.1.2 实验药物 通脉益智胶囊的药物组成:女贞子 15 g、何首乌 20 g、丹参 30 g、赤芍 15 g、石菖蒲 20 g、远志 10 g、漏芦 10 g。将上述药物水煎煮后浓缩干燥,粉碎过筛,混匀制成胶囊,购自中日友好医院试剂科,批号:Z20053786。

1.1.3 主要实验仪器 Morris 水迷宫系统,包括水迷宫、电脑摄像系统、配套软件分析系统,上海移码数字有限公司生产,由北京中医药大学第一临床医学院中心实验室提供。

1.2 方 法

1.2.1 动物分组及给药方法 将 32 只 ApoE 基因敲除小鼠随机分为四组,即成年中药组、老年中药组、成年模型组及老年模型组,每组 8 只;将 16 只同品系 C57BL/6J 小鼠随机分为两组,即成年正常组及老年正常组,每组 8 只。成年组小鼠至 20 周起、老年组小鼠至 32 周起,中药组以通脉益智胶囊 750 mg/(kg·d)灌胃 12 周(本剂量根据人与实验动物用药剂量换算得出),模型组与正常组以同容积 0.9% 氯化钠注射液灌胃 12 周,均每天 1 次。

1.2.2 实验方法 成年组小鼠到 32 周龄时、老年组小鼠到 44 周龄时,予 Morris 水迷宫实验。Morris

水迷宫测试程序主要包括定位航行实验和空间探索实验两个部分。定位航行实验历时 5 天,其中训练 2 天,正式测试 3 天,检测小鼠的逃避潜伏期,统计结果以正式测试为准。空间探索实验历时 1 天,在定位航行实验后正式测试后进行。根据池壁上悬挂的四个入水点,将水池分为 I、II、III、IV 四个象限,第 III 象限处存在隐匿平台。定位航行实验训练期间,小鼠每天分别从 I、II、IV 象限入水点处入水 2 次(每天共入水 6 次),由图像采集及处理系统记录小鼠航行轨迹、找到隐匿平台时间(即:逃避潜伏期)等,若小鼠 60 秒内未找到隐匿平台,则逃避潜伏期按 60 秒计算,并由实验者引导小鼠至平台。待小鼠在平台上休息 10 秒后捞出,将下只小鼠放入水池。定位航行实验正式测试时,亦按照训练期间方式进行测试,并采集各项数据;于正式测试结束后第二日进行空间探索实验,小鼠入水步骤不变,将位于第 III 象限隐匿平台撤掉,记录其在第 III 象限航行的路程及时间,来考察小鼠对原平台的记忆。

恒温游泳池直径 120 cm,水深 30 cm,隐匿平台低于水面 1~2 cm,水温保持在(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。为与黑色 ApoE 基因敲除小鼠形成鲜明对比,故在池水中加入适量奶粉,使池水呈现乳白色。

1.3 统 计 学 处 理

本实验采用 SPSS 18.0 统计软件对实验数据进行分析、处理。其中各组小鼠定位航行实验成绩、第 III 象限航行的路程及时间为计量资料,以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组之间比较若符合正态分布且方差齐则采用单因素方差分析,两组之间比较采用 LSD 及 S-N-K 统计方法;若符合正态分布而方差不齐则采用 Tamhane's T2 及 Dunnett's T3 检验;若不符合正态分布则采用非参数检验;穿台次数为计数资料,使用卡方检验;以 $P<0.01$ 表示有显著差异的界限。

2 结 果

2.1 定 位 航 行 实 验 成 绩

先检测每组小鼠每天定位航行时间,再汇总三天测试结果(第三、四、五天),统计各组小鼠之间的定位航行时间差异,结果显示,与老年模型组相比,老年中药组定位航行时间更短,具有显著差异($P<0.01$),老年正常组航行时间亦较短,具有明显差异($P<0.05$)。见表 1、2,图 1A、B。

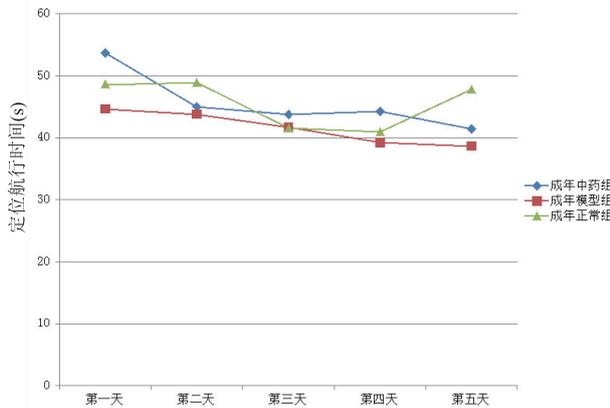
表 1 各组小鼠定位航行实验成绩 ($\bar{x} \pm s, n=8, s$)

组别	训练		测试		
	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天
成年中药组	53.68±12.6	45.04±16.5	43.79±16.39	44.23±16.6	41.4±19.27
成年模型组	44.67±16.97	43.81±14.01	41.68±17.6	39.26±18.55	38.68±15.92
成年正常组	48.6±17.61	48.94±15.52	41.57±18.13	40.98±20.04	47.79±16.91
老年中药组	50.17±14.78	36.87±14.24	28.90±14.57	34.76±18.51	26.76±18.01
老年模型组	50.64±16.56	46.26±15.83	44.93±18.83	37.46±20.86	38.65±21.05
老年正常组	48.61±18.08	38.79±19.85	39.98±19.69	34.35±16.7	27.51±16.06

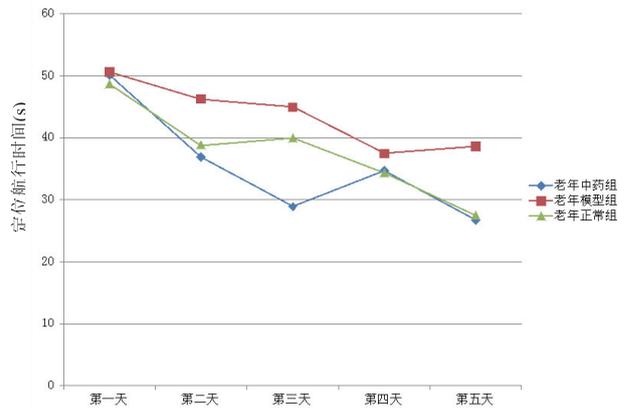
表 2 各组小鼠定位航行测试汇总结果 ($\bar{x} \pm s, n=8, s$)

组别	测试汇总	组别	测试汇总	组别	测试汇总
成年中药组	43.14±17.37	成年模型组	39.87±17.28	成年正常组	43.45±18.49
老年中药组	30.14±17.29 ^a	老年模型组	40.35±20.35	老年正常组	33.95±18.13 ^b

注：与老年模型组相比，^a $P < 0.01$ 、^b $P < 0.05$ 。



A 成年组



B 老年组

图 1 各组小鼠定位航行实验成绩

第 1 天各组小鼠的定位航行实验成绩无明显差异 ($P > 0.05$), 随着训练时间的增长, 小鼠逃避潜伏期呈递减趋势。将第三天至第五天汇总后得出逃避潜伏期的成绩 (即测试成绩) 进行统计得出: 成年各组之间, 模型组较正常组及中药组逃避潜伏期虽有所缩短, 但无统计学差异 ($P > 0.05$); 老年各组则可见明显差异, 与老年模型组相比, 老年中药组逃避潜伏期明显缩短, 具有显著差异 ($P < 0.01$), 老年正常组亦具有明显差异 ($P < 0.05$), 而老年中药组与老年组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.2 空间探索实验

小鼠入水步骤不变, 将位于第 III 象限隐匿平台撤掉, 记录其在第 III 象限航行的路程及时间。穿台次数的结果显示: 老年模型组较老年正常组有明显差异 ($P < 0.05$), 而成年各组之间无明显差异

($P > 0.05$)。第 III 象限路程: 老年中药组及老年模型组较正常组均有显著差异 ($P < 0.01$)。成年各组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。第 III 象限时间: 老年中药组及老年模型组较正常组均有明显差异 ($P < 0.05$), 成年各组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠空间探索实验成绩 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	穿台次数	第 III 象限路程 (cm)	第 III 象限时间 (s)
成年中药组	0.95±1.28	175.19±124.37	14.22±9.71
成年模型组	1.00±1.03	215.12±74.55	18.14±6.93
成年正常组	0.83±0.79	197.07±70.71	15.36±7.24
老年中药组	1.78±1.44	337.17±170.42 ^a	16.42±9.14 ^b
老年模型组	1.50±1.88 ^b	348.0 ±306.99 ^a	16.40±13.33 ^b
老年正常组	2.39±1.46	445.9 ±119.35	20.12±4.23

注：与老年正常组相比，^a $P < 0.01$ ，^b $P < 0.05$ 。

空间探索实验以穿越撤走平台次数及平台所在第Ⅲ象限的游泳路程及时间计算。空间探索实验成绩中,成年各组在穿台次数、第Ⅲ象限游泳路程及第Ⅲ象限停留时间均无明显差异($P>0.05$)。而老年各组中,老年正常组在第Ⅲ象限游泳路程显著超越中药组及模型组($P<0.01$),老年正常组在第Ⅲ象限时间明显超越中药组及模型组($P<0.01$),穿台次数亦较模型组有明显差异($P<0.05$)。

3 讨论

本实验中采用的 Morris 水迷宫是一种强迫实验动物游泳,学习寻找隐藏在水中平台的一种实验,主要用于测试实验动物对空间位置感和方向感(空间定位)的学习记忆能力。由于本实验 ApoE 基因敲除小鼠均饲养于清洁级动物房,在饲养周期无法将小鼠移出实验室进行 Morris 水迷宫实验,故水迷宫实验仅在饲养周期完成后、取材前进行。Morris 水迷宫实验结果显示,成年各组 ApoE 基因敲除小鼠在学习及记忆能力未见明显差异($P>0.05$),说明当 ApoE 基因敲除小鼠成年阶段并未表现出明显的认知障碍,前期研究亦表明在小鼠 32 周龄时动脉硬化、高脂血症等症状表现并不明显。但是当 ApoE 基因敲除小鼠进入老年化阶段时,其认知功能明显减低。研究表明老年组小鼠在 44 周龄时,实验成绩显示中药组及正常组小鼠在记忆和学习能力方面明显高于模型组小鼠($P<0.01$),中药组及正常组小鼠并无明显差异($P>0.05$)。实验结果将定位航行实验中的三天测试结果相结合比较,增加了统计的样本量,进而增加了统计的精确度;而最后一天的空间探索实验由于小鼠数量有限,而且仅有一次空间探索结果,故样本量较少,统计的精确度有待提高,在以后的实验中应增加实验次数以提高统计的精确度。

中医学认为,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)属痴呆范畴,其病位在心和脑,属虚实夹杂之证,病机主要有肾精亏虚、髓海失充而导致脑失所养,或由肝郁脾湿、痰阻血瘀造成脑脉痹阻。治以补肾填精、益智开窍、涤痰化瘀为法,佐以益气健脾、养血柔肝、通络开痹之品。通脉益智胶囊中女贞子、何首乌补肝益肾,填精充髓,有滋阴强壮之力,为君药;丹参、赤芍活血化瘀,为臣药;石菖蒲、

远志芳香化浊,祛痰利窍,为佐药;再配以漏芦清热通窍疏经,诸药合用,共奏补肝益肾、化痰祛痰、益智醒神之功。

研究发现^[1], ApoE 基因可能与记忆呈相关性。ApoE 基因敲除小鼠的血脑屏障的通透性是普通小鼠的 3.7 倍,这就导致一些非必需小分子化合物进入大脑,造成大脑功能的部分紊乱,从而可能引发老年痴呆^[2]。Zhang N 等^[3]发现,载脂蛋白 E 敲除(ApoE^{-/-})小鼠海马神经元内 β -淀粉样蛋白的表达高于 C57BL/6J 小鼠,与 ApoE 基因异常导致 AD 等神经退行性疾病的认知功能障碍可能有着密切联系。ApoE 基因敲除小鼠一直被用于动脉粥样硬化的研究,由于其认知功能的异常,故近期亦被用于认知障碍的研究。

Morris 水迷宫实验成年组及老年组 ApoE 基因敲除小鼠的行为学表现成绩可知,补肾祛瘀化痰法针对认知功能障碍有一定改善作用,而且在前期研究中,补肾祛瘀化痰法针对血管性痴呆^[4]、动脉粥样硬化^[5]及高脂血症等均有较好疗效。本实验通过对中药干预 ApoE 基因敲除小鼠 Morris 水迷宫实验的研究,证明补肾祛瘀化痰法具有改善小鼠认知功能的作用,为进一步深入开展实验及临床研究打下基础。

参 考 文 献

- [1] Masliah E, Samuel W, Veinbergs I, et al. Neurodegeneration and cognitive impairment in ApoE-deficient mice is ameliorated by infusion of recombinant ApoE [J]. Brain Res, 1997, 751(12): 307-314.
- [2] Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Wagner DD. ApoE deficiency leads to a progressive age-dependent blood-brain barrier leakage [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(4): 1256-1262.
- [3] Zhang N, Jia XM, Xu L, et al. The expression change of amyloid protein β in the hippocampal neurons of ApoE knockout mice [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2011, 46(6): 531-534.
- [4] Wang H, Yan XP. Changes of ET and CGRP in Vascular Dementia with Tongmai yizhi Capsule [J]. Journal of Beijing University of TCM, 2000, 23(2): 64-65.
- [5] Zhang TZ, Wang YX. Experiment on the Effects of Tongmai yizhi Capsules Against Atherosclerosis [J]. Journal of Beijing University of TCM, 2002, 25(5): 33-37.

(收稿日期: 2015-06-12)

(本文编辑: 韩虹娟)