

# 天芪益智颗粒对阿尔茨海默病模型大鼠炎症性反应的保护作用

张佳佳 孟繁兴 马涛 王乐 陈志刚 陈路 刘一川

**【摘要】 目的** 研究中药治疗 AD 相关机制,探究以益气活血法为组方原则的天芪益智颗粒对 AD 大鼠脑组织炎症性反应的保护作用。**方法** 90 只雄性 SD 大鼠随机分成 6 组,每组 15 只,模型组和治疗组予  $A\beta_{1-42}$  在大鼠侧脑室注射建立 AD 动物模型,造模成功后,治疗组分别灌服浓度为高、中、低剂量的天芪益智颗粒每天一次,对照组灌服石杉碱甲每天一次,空白组和模型组予等量生理盐水每天一次,给药体积均为 20 mL/kg 体重,分别连续给药 30 天。喂养 30 天以后取大鼠脑组织进行蛋白提取,用 western blot 方法观察各组大鼠脑组织相关蛋白的表达。**结果** (1)模型组较空白组 GFAP 和 Iba-1 的表达显著增高( $P<0.05$ );(2)天芪益智颗粒和石杉碱甲可使大鼠脑组织 GFAP 和 Iba-1 的表达量显著降低( $P<0.05$ );(3)天芪益智颗粒和石杉碱甲使 phospho-p38/t-p38 的表达量明显降低( $P<0.05$ );(4)天芪益智颗粒使 AD 大鼠脑 iNOS、COX-2 表达量显著降低( $P<0.05$ )。**结论** (1) $A\beta_{1-42}$  侧脑室注射可以模拟 AD 炎症反应机制;(2)天芪益智颗粒通过抑制脑组织胶质细胞的激活、降低 phospho-p38/t-p38 表达及 p38-NF- $\kappa$ B 信号通路激活、抑制促炎因子 COX-2、iNOS 的表达对 AD 大鼠炎症反应具有保护作用。

**【关键词】** 阿尔茨海默病; 天芪益智颗粒; 实验研究; 炎症反应

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.07.003

## Protective effect of Tianqi Yizhi granule on inflammatory reaction in rats with Alzheimer's disease

ZHANG Jiajia, MENG Fanxing, MA Tao, et al. Department of encephalopathy, Beijing Pinggu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing 101200, China

Corresponding author: Meng Fanxing, E-mail: mengfx1971@126.com

**【Abstract】 Objective** To reveal the related mechanism of Chinese traditional medicine in treatment on AD, and to explore the Yiqihuoxue prescription principle for Tianqi Yizhi granules on the protective effect of inflammatory reaction in brain tissue of AD rats. **Methods** 90 rats were randomly divided into six groups (15 in each group). Five of them were injected with  $A\beta_{1-42}$  in lateral ventricle to establish AD model rats. Treatment groups were received different doses of Tianqi Yizhi granules, and control group was given huperzine. 30 days later the rats were sacrificed and the proteins in brain tissue were extracted, the western blot was applied for determination of protein expression in brain tissue, and the possible mechanism of tradition Chinese medicine in treatment of AD rats was discussed. **Results** (1) Compared with blank group, the expression levels of GFAP and Iba-1 in model group had significantly increased ( $P<0.05$ ). (2) The expression of GFAP and Iba-1 had respectively decreased ( $P<0.05$ ). (3) Tianqi Yizhi granules and huperzine could significantly decreased the expression of phospho-p38/t-p38

基金项目: 国家重大科技专项重大新药创制专项(2013X09103002-002)

作者单位: 101200 北京市平谷区中医医院脑病科(张佳佳);北京中医药大学东方医院脑一科(孟繁兴、陈路、陈志刚),科研处(王乐);北京中医药大学东方医院科研中心、北京师范大学老年脑健康研究中心(马涛);中航工业北京航空制造工程研究所(刘一川)

作者简介: 张佳佳(1989-),女,硕士,住院医师。研究方向:中西医结合治疗脑病系统疾病。E-mail: 18511780920@163.com

通信作者: 孟繁兴(1971-),女,本科,副主任医师。研究方向:中西医结合治疗脑病系统疾病。E-mail: mengfx1971@126.com

( $P < 0.05$ )。 (4) *Tianqi Yizhi* granules could significantly decreased the expression of iNOS and COX-2 in brain tissue ( $P < 0.05$ )。 **Conclusion** (1)  $A\beta_{1-42}$  lateral ventricle injection could imitate the AD inflammatory reaction mechanism; (2) *Tianqi Yizhi* Granules play a protective role on the inflammatory reaction in the brain of AD rats by suppressing the activation of glial cells in brain tissues, decreased the expression of phospho-p38/t-p38 and inhibited p38-NF-kappa B signaling pathway activation. Moreover, it can inhibit the expression of COX-2 and iNOS.

**【Key words】** Alzheimer's disease; *Tianqi Yizhi* granules; Experimental study; Inflammatory reaction

阿尔茨海默病是老年人中常见的神经系统退行性疾病,全世界大约有 3600 万人患有 AD,中国 60 岁以上人群中阿尔茨海默病的患病率为 3% ~ 5%,并且逐年上升,据世界卫生组织推算,到 21 世纪中叶 AD 将成为中国疾病负担排名第四位的疾病<sup>[1]</sup>,对 AD 的预防及治疗是一项重大的课题。

中医药对阿尔兹海默病的预防及治疗有一定的意义。已知 AD 发病是与年龄密切相关的,有流行病学调查显示年龄每增加 5 岁,痴呆的发病率会增加一倍,在中国 80 岁以上的老年人的发病率高达 20%,中医素有“久病必瘀”“老人多瘀”“虚久致瘀”的说法。五脏虚衰与瘀血的产生有相互作用关系,因虚可以致瘀,而瘀久则使虚更甚。现研究者多将 AD 的治疗窗前移,1999 年国外学者首次提出轻度认知功能障碍(mild cognitive impairment, MCI)诊断标准,MCI 的发病与 AD 的关系受到重视,在国外的研究中指出 MCI 患者发展为 AD 的概率比正常人高 10 倍,平均每年有 12% 的 MCI 患者发展为 AD<sup>[2]</sup>。国内临床研究提示气虚血瘀是 MCI 的主要病机<sup>[3-4]</sup>。

天芪益智颗粒是王永炎教授从痴呆病机出发创制的,由君药红芪 18 g、臣药红景天 6 g 配伍组成,具有益气活血通络的作用,治疗痴呆属气虚血瘀、脑脉痹阻型。药理研究表明红芪具有抗衰老、调节免疫、抗氧化应激、抑制炎症反应等作用;红景天可增强神经细胞功能、提高记忆力、改善认知行为等。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

SPF 级雄性 4 月龄 SD 大鼠 90 只,购自中国食品药品鉴定研究院(许可证号: SCXK(京) 2014-0013),体重 190 ~ 220 g。SPF 级环境饲养,温度(24±2)℃,相对湿度(50±10)%,大鼠自由饮食,明暗交替 12 小时。大鼠以随机数字表法分治疗组、阳性对照组、假手术组、模型组,其中治疗组分天芪

益智颗粒药液高、中、低剂量 3 组,每组 15 只。

### 1.2 动物造模

将 1 mg  $A\beta_{1-42}$ 溶于无菌 0.9% 生理盐水至浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ , 4℃ 孵育 24 小时,用 10% 水合氯醛 0.4 mL/100 g 腹腔注射麻醉大鼠,将大鼠头部固定于脑立体定位仪上,手术区消毒,在颅顶中间部作一纵切口,暴露颅骨,在前囟向右旁开 1.4 mm、向后 1.4 mm 处用颅骨钻钻开颅骨,垂直插入微量进样器进针 4 mm,将 1  $\mu\text{L}$   $A\beta_{1-42}$ 以 1  $\mu\text{L/min}$  的速度缓慢地注入大鼠侧脑室,留针 3 分钟以保证溶液充分弥散,随后缓慢撤针。皮肤切开处用庆大霉素点滴,缝合切口。假手术组注入等体积生理盐水,其他操作同上。

### 1.3 实验用药

天芪益智颗粒的组成包括君药红芪和臣药红景天,由北京中医药大学中药学院提供,批号: 20140913。将天芪益智颗粒药液稀释成 214 g/mL、107 g/mL、53.4 g/mL 三个浓度。阳性对照药为石杉碱甲片(哈伯因),河南太龙药业股份有限公司生产,批号 140910A,采用无菌生理盐水配制成 0.004 mg/mL 溶液。

### 1.4 主要试剂及仪器

$A\beta_{1-42}$ (杭州中肽生化有限公司)、BCA 试剂盒、RIPA 蛋白裂解液(北京普利莱基因技术有限公司)、多克隆抗体  $\beta$ -actin(美国 Santa Cruz 公司)。低温高速离心机(Eppendorf 公司)、电泳仪(Bio-rad 公司)、电热恒温水箱(北京长安科学仪器厂)、凝胶成像仪(Gene 公司)。

### 1.5 Western blot

取适量大鼠脑组织,加预冷的 RIPA 裂解液(100 mg 加 1 mL RIPA 裂解液),在冰上于匀浆器中充分研磨,放置 5 分钟,4℃、12000 r/min 离心 15 分钟,取上清液,测定蛋白含量,电泳,转膜,封闭,加一抗、二抗孵育后,用 ECL 发光法采集图像,用凝胶图象处理系统分析目标带的分子量和净光密度值。

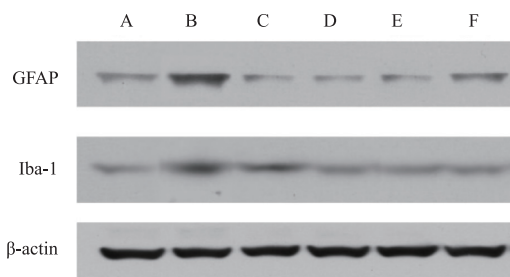
## 1.6 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件进行数据处理, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 先进行正态性及方差齐性检验, 若符合正态分布及方差齐, 采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 LSD 检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 天芪益智颗粒对 AD 大鼠脑组织胶质细胞激活的影响

脑组织中炎症反应主要由激活的胶质细胞启动, GFAP 和 Iba-1 分别是星形胶质细胞和小胶质细胞的特异性标示蛋白。如图 1、表 1 所示, 与假手术组相比, AD 模型大鼠脑组织 GFAP 和 Iba-1 表达显著升高( $P<0.05$ )。与模型组大鼠相比, 天芪益智颗粒高、中、低剂量组和石杉碱甲组大鼠脑组织 GFAP 和 Iba-1 的表达量显著降低( $P<0.05$ )。其中高、中、低剂量的天芪益智颗粒和石杉碱甲可分别使 GFAP 表达量降低 65.12%、58.39%、5.15% 和 62.18%, 使 Iba-1 表达量降低 71.63%、54.44%、50.58% 和 13.02%。该结果表明天芪益智颗粒可明显抑制 AD 模型大鼠脑组织胶质细胞的激活。



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 阳性药组; D. 天芪益智颗粒高剂量组; E. 天芪益智颗粒中剂量组; F. 天芪益智颗粒低剂量组

图 1 胶质细胞 GFAP、Iba-1 的激活

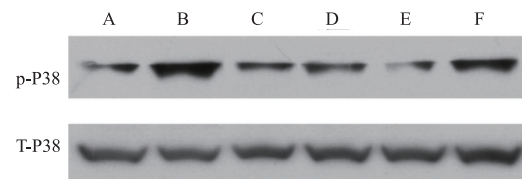
表 1 天芪益智颗粒对 AD 大鼠脑组织胶质细胞 GFAP、Iba-1 激活的影响(与假手术组百分比值,  $n=5$ )

动物分组	GFAP	Iba-1
假手术组	100.000	100.000
模型组	610.855	337.937
阳性药组	225.166	292.951
天芪益智颗粒高剂量组	211.513	95.058
天芪益智颗粒中剂量组	248.898	152.577
天芪益智颗粒低剂量组	392.312	163.091

注: 与模型组相比, 药物组 Iba-1 和 GFAP 的表达量均降低( $P<0.05$ )。

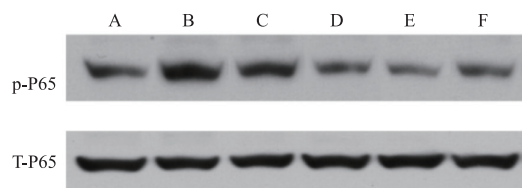
### 2.2 天芪益智颗粒对 AD 大鼠脑 p38-NF- $\kappa$ B 信号通路激活的影响

如图 2、3 和表 2 所示, 与假手术组相比, 模型组 AD 大鼠脑组织 p38 蛋白磷酸化占总蛋白的比值 p-p38/t-p38 和 p65 碱性磷酸化占总蛋白的比值 NF- $\kappa$ B phospho-p65/NF- $\kappa$ B p65 显著升高( $P<0.05$ ), 表明 p38-NF- $\kappa$ B 信号通路被激活。与模型组相比, 天芪益智颗粒和石杉碱甲可明显降低 phospho-p38/t-p38 的表达量( $P<0.05$ ), 与模型组相比, 高、中、低剂量天芪益智颗粒及石杉碱甲可分别使 phospho-p38/t-p38 降低 56.17%、38.83%、30.51% 和 59.66%。天芪益智颗粒高、中、低剂量分别使 NF- $\kappa$ B phospho-p65/NF- $\kappa$ B p65 降低 58.88%、41.29% 和 17.13%, 而石杉碱甲则对 NF- $\kappa$ B 激活没有显著影响, 结果显示天芪益智颗粒对 AD 大鼠脑内 p38-NF- $\kappa$ B 信号通路激活具有显著的抑制作用。



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 阳性药组; D. 天芪益智颗粒高剂量组; E. 天芪益智颗粒中剂量组; F. 天芪益智颗粒低剂量组

图 2 p38 碱性磷酸化程度



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 阳性药组; D. 天芪益智颗粒高剂量组; E. 天芪益智颗粒中剂量组; F. 天芪益智颗粒低剂量组

图 3 NF- $\kappa$ B 亚基 p65 磷酸化的程度

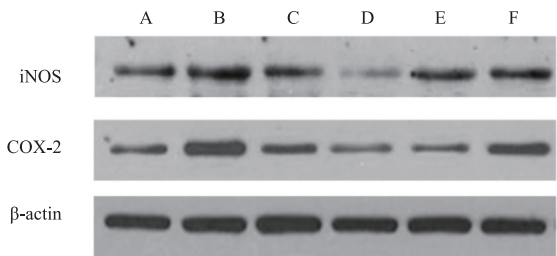
表 2 天芪益智颗粒对 AD 大鼠 p-38 磷酸化、NF- $\kappa$ B 亚基 p65 磷酸化的影响(与假手术组百分比值)

动物分组	p-p38/t-p38	NF- $\kappa$ B phospho-p65/NF- $\kappa$ B p65
假手术组	100.000	100.000
模型组	685.018	485.414
阳性药组	283.352	474.658
天芪益智颗粒高剂量组	289.602	201.345
天芪益智颗粒中剂量组	413.610	56.280
天芪益智颗粒低剂量组	472.627	52.432

注: 药物组与模型组对比, p38 碱性磷酸化、NF- $\kappa$ B 亚基 p65 磷酸化的程度减低( $P<0.05$ )。

2.3 天芪益智颗粒对促炎性因子 iNOS、COX-2 表达的影响

如图 4、表 3 所示,与假手术组相比,模型大鼠脑组织内 iNOS、COX-2 表达量显著升高 ( $P<0.05$ ),与模型组大鼠相比,天芪益智颗粒可使 AD 大鼠脑 iNOS、COX-2 表达量显著降低 ( $P<0.05$ )。高、中、低剂量天芪益智颗粒和石杉碱甲可分别使 iNOS 表达量降低 92.30%、72.85%、40.95% 和 21.32%,使 COX-2 表达量降低 84.19%、75.30% 和 48.64% 和 51.64%。结果提示天芪益智颗粒对 AD 大鼠脑内促炎性因子 iNOS、COX-2 的表达具有显著的抑制作用。



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 阳性药组; D. 天芪益智颗粒高剂量组; E. 天芪益智颗粒中剂量组; F. 天芪益智颗粒低剂量组

图 4 炎症因子 iNOS、COX-2 的表达

表 3 天芪益智颗粒对 AD 大鼠 iNOS、COX-2 表达的影响(与假手术组百分比值,  $n=15$ )

动物分组	假手术组的%	假手术组的%
假手术组	100.000	100.000
模型组	436.888	666.717
阳性药组	339.687	318.203
天芪益智颗粒高剂量组	33.873	107.315
天芪益智颗粒中剂量组	132.177	161.084
天芪益智颗粒低剂量组	282.075	312.348

3 讨论

McGeer PL 等<sup>[5]</sup>根据其研究结果提出抗炎治疗或许可以治疗 AD,他在 1996 年发表文章称其根据对不同地区不同国家进行流行病学研究得出风湿性关节炎患者经长期抗炎治疗后,AD 的患病率较未经抗炎治疗显著降低,因此他认为抗炎治疗或许

可以治疗 AD。此后,多项研究认为炎症反应是 AD 发病的重要因素,证据提示,神经炎症反应是 AD 发病的驱动因素<sup>[6-7]</sup>。本实验证实益气活血方天芪益智颗粒及石杉碱甲对 AD 模型大鼠炎症反应具有保护作用。益气活血方天芪益智颗粒可以通过抑制脑组织胶质细胞的激活、抑制 p38-NF-κB 信号通路激活、抑制促炎因子 COX-2、iNOS 的表达对 AD 大鼠炎症反应起到保护作用,其保护作用与药物剂量呈正相关,提示采用益气活血治法在 AD 早期干预对于 AD 防治的重要临床意义。

实验研究应当为临床应用服务,目前临床常用于治疗 AD 的药物长期疗效不确切,不良反应较多,且药价昂贵,患者依从性较差,中药具有价格便宜、不良反应较小等优点,因此研究中药对 AD 的治疗有重要的意义。本实验为后续临床研究用益气活血法治 AD 提供了理论基础,其保护机制有待进一步研究,临床上可进行多中心随机对照研究,进一步评价益气活血法治 AD 的临床有效性及安全性。

参 考 文 献

[1] 陈新平. 阿尔茨海默病病因学及发病机制研究进展[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2005, 5(3): 152-155.  
[2] 贾建平. 重视轻度认知障碍与老年性痴呆关系的研究[J]. 中华神经科杂志, 2002, 35(6): 324-326.  
[3] 郑卫莉, 张杜平, 刘莹. 益气活血法治轻度认知功能障碍的临床研究[J]. 新疆中医药, 2008, 5(3): 5-7.  
[4] 谢丽英, 陈朝俊. 补阳还五汤联合多奈哌齐治疗轻度认知功能障碍 30 例[J]. 江西中医药, 2015, (4): 26-28.  
[5] McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies[J]. Neurology, 1996, 47(2): 425-432.  
[6] 李慧源, 姜源, 孙晓红. 阿尔茨海默病炎症反应机制的研究进展[J]. 中国临床研究, 2016, 29(1): 130-132.  
[7] Cagnin A, Myers R, Gunn RN, et al. In vivo visualization of activated glia by [<sup>11</sup>C] (R)-PK11195-PET following herpes encephalitis reveals projected neuronal damage beyond the primary focal lesion[J]. Brain, 2001, 124(10): 2014-2027.

(收稿日期: 2016-11-02)  
(本文编辑: 董历华)