

## 通络救脑口服液对快速老化模型小鼠 RAGE 和 A $\beta$ 的影响

高爱社<sup>1</sup>, 杜欢<sup>2</sup>, 范英昌<sup>2</sup>, 王榭延<sup>1</sup> (1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450008; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

**摘要:** **目的** 探讨通络救脑口服液对快速老化模型(SAMP8)小鼠晚期糖基化终末产物受体(RAGE)和淀粉样蛋白  $\beta$ (A $\beta$ )表达的影响。**方法** 24 只 SAMP8 小鼠随机分为模型组、通络救脑高、低剂量组(9, 6 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup> $\cdot$ d), 另设抗快速衰老亚系 1(SAMR1)小鼠对照组(正常对照组), 连续灌胃给药 21 d。取海马区脑组织, 分别采用酶联免疫吸附法(ELISA)和免疫组织化学法检测小鼠大脑海马内 A $\beta$  以及 RAGE 的表达。**结果** 与模型组比较, 通络救脑高、低剂量组海马区脑组织 RAGE 和 A $\beta$  表达降低( $P < 0.01$ ), RAGE 蛋白含量明显降低( $P < 0.01$ )。**结论** 通络救脑口服液可通过抑制海马区脑组织 RAGE 和 A $\beta$  的表达, 以减轻 RAGE 和 A $\beta$  介导的神经病理损伤作用。

**关键词:** 通络救脑口服液; 淀粉样蛋白  $\beta$ ; 晚期糖基化终末产物受体; 快速老化模型小鼠

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2016)04-

**doi:** 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2016. 04

Influences of Tongluo Jiunao Oral Liquid on RAGE and A $\beta$  in rapid aging mice **去掉?**

Gao Aishe<sup>1</sup>, Du Huan<sup>2</sup>, Fan Yingchang<sup>2</sup>, Wang Xieyan<sup>1</sup> (1. **School?of?Basic** Medicine, Hena university of Traditional Chinese Medicine, 1 Jin Shui Lu, Jin Shui District, Zhengzhou 450008, China; 2. School of Integrative Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 88 Yu Quan Lu, Nan Kai District, Tianjin 300193, China)

**Abstract** To observe the influences of Tongluo Jiunao Oral Liquid (TLJN) on Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) deposits in a senescence accelerated mouse (SAM) model. **Methods** we used healthy male senescence accelerated mouse prone-8 strain (SAMP8) mice that were randomly divided into model, TLJN min, TLJN max, and senescence-accelerated resistant mouse (SAMR1) that we used as a control group. The A $\beta$  deposits were measured using immunohistochemistry. The expression of RAGE were measured using ELISA and immunohistochemistry. **Results** Compared with model group, The TLJN-treated groups exhibited a reduction of A $\beta$  deposits, and TLJN effectively attenuated A $\beta$ -induced expression of RAGE. **Conclusion** TLJN might have protective effects, and could potentially act to attenuate neural injury by influence RAGE- A $\beta$  in the pathogenesis of AD.

**Keywords:** Tongluo Jiunao Oral Liquid; amyloid- $\beta$ ; Receptor for advanced glycation endproducts; senescence accelerated mouse

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是以进行性痴呆为主要临床表现的神经退行性疾病, 其主要病理变化包括细胞外淀粉样斑块沉积、细胞内神经原纤

维缠结以及神经性炎症反应<sup>[1]</sup>。大量研究表明淀粉样蛋白  $\beta$ (A $\beta$ )不仅是淀粉样斑块的主要化学成分, 而且在 AD 的早期, A $\beta$  通过与 RAGE 结合, 激活相应

收稿日期: 2016-01-12

作者简介: 高爱社 女, 副教授, 研究方向: 中药防治心脑血管疾病。Email: gaoaishe@126.com。通讯作者: 杜欢, 副教授, 研究方向: 中医药防治心脑血管疾病的机制研究。Email: duhuan0420@tjutcm.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81303088); 河南省科技厅基础与前沿科研项目(142300410171)。

的细胞内信号通路,最终通过氧化应激、神经毒性、神经性炎症反应等级联反应造成神经功能障碍<sup>[2-3]</sup>。因此,RAGE可能成为AD药物治疗的重要靶点。中医认为AD乃气血渗灌失常,营卫失和、化生火毒,进而损伤络脉而致。目前中医药已广泛应用于AD早期认知功能障碍。通络救脑复方由三七、栀子配伍而成,已成功地对血管性痴呆患者进行了I期临床试验<sup>[4-5]</sup>。本研究进一步观察通络救脑口服液对快速老化模型(SAMP8)小鼠大脑海马内RAGE及A $\beta$ 表达的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂、仪器及动物** 淀粉样蛋白 $\beta_{1-40}$ (A $\beta_{1-40}$ )和RAGE抗体,英国Abcam公司;RAGE ELISA试剂,优尔生科技股份有限公司;通络救脑口服液,天津红日药业股份有限公司,由栀子和三七提取配伍制成,含京尼平苷4.95 mg/mL,京尼平苷酸1.73 mg/mL,人参皂苷1.02 mg/mL,批号:20131102;340S酶标仪,美国Beckman公司;显微照像系统,德国Lecia公司。8月龄快速老化模型SAMP8小鼠及8月龄抗快速衰老亚系1(SAMR1)小鼠,均为雄性,体质量约25 g,天津中医药大学第一附属医院针灸研究所老化鼠繁育中心,许可证号:SCXK(津)2015-0003。所有小鼠饲养于SPF动物房,自由进食。

**1.2 分组及给药** 24只SAMP8小鼠随机分为模型组、通络救脑高、低剂量组(9,6 mL $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d)<sup>[6]</sup>。另设立正常对照组(SAMR1小鼠8只)。正常对照组和模型组给予0.9%氯化钠注射液。各组胃连续灌胃给药21 d。

**1.3 组织标本提取** 连续灌胃21 d后,用氯胺酮麻醉(100 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ )和甲苯噻嗪(10 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ )麻醉小鼠并取脑,沿中线将脑组织分开,一半放入4%多聚甲醛磷酸缓冲液(PBS, pH7.4)中,置于4℃冰箱保存,用于海马区免疫组化检测,另一半脑组织置于-80

℃冰箱储存,进行海马区蛋白的检测。

**1.3 免疫组织化学法检测A $\beta$ 和RAGE** 标本经石蜡包埋,切片,脱蜡,梯度酒精脱水,并用0.01 mol $\cdot$ L $^{-1}$  PBS漂洗,室温下用3%过氧化氢抑制内源性过氧化物酶活性30 min,再用10%血清进行封闭,加入A $\beta_{1-40}$ 抗体(1:1000)或RAGE抗体(1:1000)4℃过夜。用ABC试剂盒染色并用苏木精复染,用不加一抗的脑组织片做阴性对照。中性树胶固定封片,置于莱卡DM4000显微镜下观察、照相。细胞内或细胞间内有棕色染色者为阳性,每张切片选定要检测的区域,采用Image pro plus 7.0图像分析系统进行半定量分析,结果用平均光密度(OD)值表示。

**1.4 酶联免疫吸附法(ELISA)检测RAGE蛋白的含量** 取脑组织加入PBS,用高速分散匀质机制成10%的脑匀浆,反复冻融3次,14000  $\times$  g离心,取上清液,采用ELISA法测定RAGE蛋白的含量,严格按照试剂盒操作说明进行。用酶标仪在波长450 nm上读取各孔OD值,绘出标准曲线,根据样品的OD值计算出各组样品浓度。

**1.5 统计学处理方法** 所有计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,应用SPSS17.0统计软件,多组间比较采用单因素方差分析,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 各组小鼠海马区A $\beta_{1-40}$ 的表达** 免疫组织化学检测显示,正常对照组小鼠大脑海马区没有A $\beta_{1-40}$ 的表达,模型组海马区有大量的A $\beta_{1-40}$ 的沉积,与模型组比较,通络救脑高、低剂量组大脑海马区A $\beta_{1-40}$ 的表达均有减少,且高、低剂量组呈一定的量效关系,见图1、图2。

**2.2 各组小鼠海马区脑组织RAGE的表达** 免疫组织化学法检测显示,正常对照组小鼠海马区脑组织RAGE有微量表达;与正常对照组比较,模型组小鼠

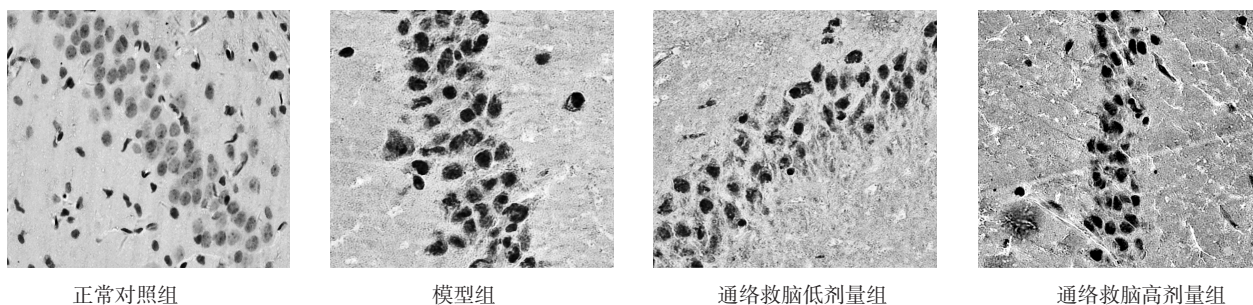
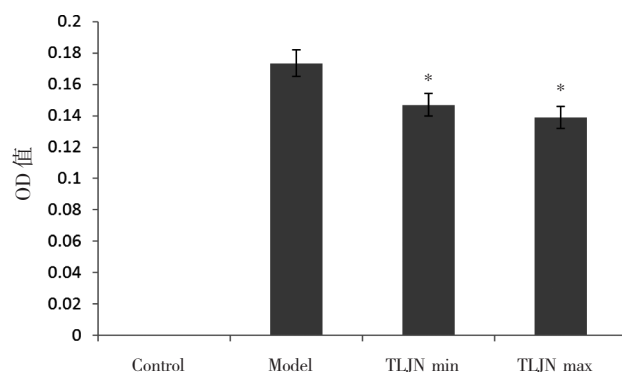


图1 各组小鼠海马区脑组织A $\beta_{1-40}$ 的表达

Figure 1 Expression of A $\beta_{1-40}$  of the mice hippocampus in each group



注：与模型组比较，\* $P < 0.01$ 。

图 2 各组小鼠海马区脑组织  $A\beta_{1-40}$  的 OD 值( $n=6$ )

Figure 2 The OD value of  $A\beta_{1-40}$  of mice hippocampus in each group

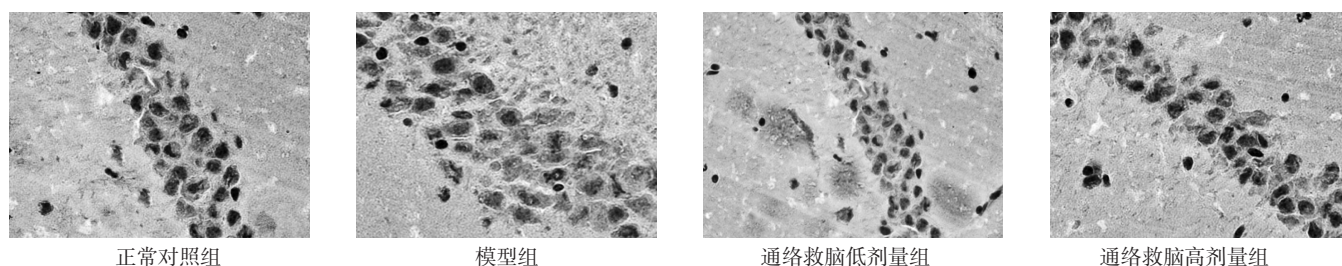
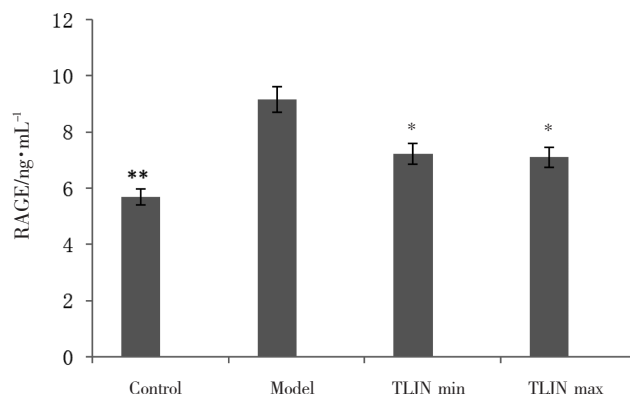


图 3 各组小鼠海马区脑组织 RAGE 的表达

Figure 3 Expression of RAGE of the mice hippocampus in each group



注：与正常对照组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较，\*\* $P < 0.01$ 。

图 4 对各组小鼠海马区脑组织 RAGE 蛋白含量的影响( $n=6$ )

Figure 4 Effect of RAGE protein in the mice hippocampus in each group

通络救脑口服液用通泻三焦火毒的栀子为君药，和营止血、通脉化瘀的三七为臣药，经提取分离有效组分而形成的具有解毒通络功效的中药复方。课题组前期研究<sup>[7-10]</sup>发现，通络救脑复方对脑缺血后神经元具有一定的保护作用，可以减轻炎症因子对脑组织的级联损伤，改善 AD 模型大鼠的学习记忆能力，提高  $A\beta_{1-40}$  损伤的脑微血管内皮细胞的活性。本研究观察通络救脑口服液对 SAMP8 小鼠海马区脑组织 RAGE

海马区脑组织 RAGE 表达显著增加；与模型组比较，通络救脑高、低剂量组小鼠海马区脑组织 RAGE 表达明显降低，见图 3。ELISA 法检测大脑海马组织 RAGE 蛋白的含量，与正常对照组比较，模型组小鼠海马区脑组织 RAGE 蛋白的含量显著增加 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，通络救脑高、低剂量组小鼠海马区脑组织 RAGE 蛋白的含量明显降低 ( $P < 0.01$ )，见图 4。

### 3 讨论

中医认为 AD 乃气血渗灌失常，营卫失和、化生火毒，进而损伤络脉而致。因此，毒损脑络是本病的主要病机。活血化瘀、通络解毒是防治本病的关键。

及  $A\beta_{1-40}$  表达的影响，探讨其通过 RAGE- $A\beta$  途径减轻 AD 神经病理性损伤的作用机制。细胞间  $A\beta$  的沉积是 AD 特征性的病理学改变，它由  $A\beta$  的前体蛋白，通过  $\gamma$ - 和  $\beta$ - 分泌酶裂解产生。大脑内过多  $A\beta$  的沉积会导致老年斑形成、神经元内纤维缠结以及神经炎症反应的发生<sup>[11]</sup>。寡聚体的  $A\beta$  与 RAGE 结合后，通过激活相应的细胞信号通路，导致细胞功能障碍<sup>[12-13]</sup>。另外，RAGE 的拮抗物 sRAGE 可以抑制  $A\beta$  对小胶质细胞的迁移、激活和炎症因子的产生<sup>[14]</sup>。内皮细胞膜上的 RAGE 可摄取血液中  $A\beta$ ，经内吞和跨膜作用介导其通过血脑屏障入脑<sup>[15-17]</sup>。因此，在神经系统中，RAGE 可以从多个途径介导  $A\beta$  引起的神经病理损伤，通过干预 RAGE- $A\beta$  途径是防治 AD 的重要靶点。研究发现<sup>[18]</sup>京尼平苷能通过降低 RAGE 的表达调控  $A\beta$  介导的炎症反应。本课题运用免疫组织化学法和酶联免疫吸附法检测 RAGE 和  $A\beta$  在海马区的表达，结果发现通络救脑口服液可明显减少 SAMP8 小鼠海马内  $A\beta$  和 RAGE 的表达。我们推测通络救脑口服液可能通过抑制 RAGE- $A\beta$  途径，减轻 AD 神经损伤，为通络救脑口服液的临床应用提供实验基础。

## 参考文献:

- [1] Yankner BA. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease[J]. *Neuron*, 1996, 16(5): 921-932.
- [2] Chen X. RAGE: a potential target for Abeta-mediated cellular perturbation in Alzheimer's disease[J]. *Curr Mol Med*, 2007, 7(8): 735-742.
- [3] Arancio O. RAGE potentiates Abeta-induced perturbation of neuronal function in transgenic mice[J]. *EMBO J*, 2004, 23(20): 4096-4105.
- [4] Hua Q, Qing X, Li P, et al. Brain microvascular endothelial cells mediate neuroprotective effects on ischemia/reperfusion neurons [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 129(3): 306-313.
- [5] Li W, Li P, Liu Z, et al. A Chinese medicine preparation induces neuroprotection by regulation paracrine signaling of brain microvascular endothelial cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 686-693.
- [6] Liu, Y, et al, Effect of Tong Luo Jiu Nao on Abeta-degrading enzymes in AD rat brains [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 137(2): 1035-1046.
- [7] Wang J. Tong Luo Jiu Nao injection, a traditional Chinese medicinal preparation, inhibits MIP-1 beta expression in brain microvascular endothelial cells injured by oxygen-glucose deprivation [J], *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(1): 151-157.
- [8] 李卫红, 王东坡, 李兴广, 等. 通络救脑注射液及其有效成分对拟缺血损伤人脑微血管内皮细胞的保护作用[J]. *安徽中医学院学报*, 2011, 30(6): 42-46.
- [9] 刘洋, 李澎涛, 刘希伟. 通络救脑注射液对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆及氧化应激反应的影响[J]. *中医学报*, 2012, 27(12): 1614-1616.
- [10] 高爱社, 杜欢, 范英昌, 等. 通络救脑注射液对 A $\beta$  1-40 致脑微血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(2): 157-160.
- [11] Du H, Li P, Wang J, et al. The interaction of Amyloid- $\beta$  and the receptor for advanced glycation endproducts induces Matrix Metalloproteinase-2 expression in brain endothelial cells[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2012, 32(2): 141-147.
- [12] Franko B, Brault J, Jouve T, et al. Differential impact of glucose levels and advanced glycation end-products on tubular cell viability and pro-inflammatory/profibrotic functions [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 451: 627-631.
- [13] Lv C, Wang L, Liu X, et al. Multi-faced neuroprotective effects of geniposide depending on the RAGE-mediated signaling in an Alzheimer mouse model[J]. *Neuropharmacology*, 2015, 89: 175-184.
- [14] Fang F. RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, A $\beta$  accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *The FASEB Journal*, 2010, 24(4): 1043-1055.
- [15] Pflanzner T, Kuhlmann C, Pietrzik C. Blood-brain-barrier models for the investigation of transporter- and receptor-mediated amyloid-beta clearance in Alzheimer's disease[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2010, 7: 578-590.
- [16] Qosa H, Abuasal BS, Romero IA, et al. Differences in amyloid-beta clearance across mouse and human blood-brain barrier models: kinetic analysis and mechanistic modeling[J]. *Neuropharmacology*, 2014, 79: 668-678.
- [17] Sagare AP, Deane R, Zlokovic BV. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1: a physiological Abeta homeostatic mechanism with multiple therapeutic opportunities [J]. *Pharmacol Ther*, 2012; 36: 94-105.
- [18] Lv C, Wang L, Liu X, et al. Geniposide attenuates oligomeric A $\beta$  1-42-induced inflammatory response by targeting RAGE-dependent signaling in BV2 cells[J]. *Curr. Alzheimer Res*, 2014, 89: 175-184.

(编辑: 梁进权)