

## 逍遥散对慢性应激复合阿尔茨海默病体外损伤模型的干预作用

苏珂馨<sup>1</sup>, 范耀耀<sup>2</sup>, 欧立娟<sup>1</sup>, 赵慧<sup>1</sup>(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广东一方制药有限公司, 广东 佛山 528244)

**摘要:** **目的** 建立慢性应激复合阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)体外损伤模型, 并探究逍遥散含药脑脊液(XYS)及空白脑脊液(Cerebro-Spinal Fluid, CSF)对该模型的干预作用。**方法** 以叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ )和皮质酮对原代海马神经元进行药物干预建立模型, 通过CCK8实验筛选干预条件, 利用线粒体膜电位和神经元存活率评价模型特征。将神经元分为正常组, 复合模型组, 5%、10%、20%逍遥散含药脑脊液组, 5%、10%、20%空白脑脊液组, 米非司酮组, 并进行相应干预。以MAP-2荧光强度、APP和GR蛋白表达为指标评价逍遥散对该模型的干预作用。**结果** 确定模型建立方法为先以 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的叠氮化钠干预12 h, 再更换为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的皮质酮干预24 h。该模型特征符合预期, 建立的方法稳定可靠。与正常组比较, 复合模型组神经元存活率、光密度比值、GR表达均明显降低( $P < 0.01$ ), APP表达明显增加( $P < 0.01$ )。与复合模型组比较, 5%空白脑脊液组和5%逍遥散含药脑脊液组APP蛋白表达降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 10%空白脑脊液组神经元存活率增加且APP蛋白表达降低( $P < 0.05$ ); 20%空白脑脊液组光密度比值增加( $P < 0.05$ ), 神经元存活率增加且APP蛋白表达降低( $P < 0.01$ ); 10%、20%逍遥散含药脑脊液组和米非司酮组神经元存活率及光密度比值均明显增加( $P < 0.01$ ), APP蛋白表达明显降低( $P < 0.01$ ); 各用药组的GR蛋白表达均明显增加( $P < 0.01$ )。与相应浓度的空白脑脊液组比较, 5%逍遥散含药脑脊液组APP蛋白表达降低且GR蛋白表达增加( $P < 0.05$ ); 10%、20%逍遥散含药脑脊液组神经元存活率增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 光密度比值增加( $P < 0.01$ ), APP蛋白表达降低( $P < 0.05$ )且GR蛋白表达明显增加( $P < 0.01$ )。**结论** 逍遥散可有效缓解慢性应激复合阿尔茨海默病体外模型的海马神经元细胞损伤, 减少APP蛋白表达, 增加GR蛋白表达, 且其药理作用具有一定的剂量依赖性, 浓度为20%的高剂量逍遥散含药脑脊液组药效较佳。

**关键词:** 逍遥散; 阿尔茨海默病; 慢性应激; 体外损伤模型; 海马神经元

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)05-0646-09

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.05.008

### Effects of Xiaoyao San on Chronic Stress Combined with AD Injury Model *in Vitro*

SU Kexin<sup>1</sup>, FAN Yaoyao<sup>2</sup>, OU Lijuan<sup>1</sup>, ZHAO Hui<sup>1</sup>(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Guangdong E-fong Pharmaceutical Co.LTD, Foshan 528244 Guangdong, China)

**Abstract:** **Objective** To establish an *in vitro* injury model of chronic stress combined with Alzheimer's disease (AD), and to explore the effects of cerebrospinal fluid containing *Xiaoyao san* (XYS) and blank cerebrospinal fluid (CSF) on this model. **Methods** Sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) and corticosterone were used to pharmacologically interfere with primary hippocampal neurons to establish the model. The intervention conditions were screened through the CCK8 experiment, and the mitochondrial membrane potential and neuron survival rate were used to evaluate the characteristics of the model. The neurons were divided into control group, model group, 5, 10, and 20%-XYS group, 5, 10, and 20%-CSF group and mifepristone group. Then both groups were given the corresponding interventions. MAP-2 fluorescence intensity, APP and GR protein expression were used as indicators to evaluate the

收稿日期: 2020-08-18

作者简介: 苏珂馨, 女, 硕士, 研究方向: 中药有效部位与新产品开发。Email: skxskx1996@qq.com。通信作者: 赵慧, 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 中医药防治疾病。Email: zhaohui@gzucm.edu.cn。

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2018A030310496); 广东省中医药局项目(20181076)。

effect of *Xiaoyao san* on the model. **Results** The method of modeling established as follow: neurons were treated with  $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaN}_3$  for 12 hours, and then were interfered by  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  corticosterone for 24 hours. The characteristics of this model are consistent with the expectations, and the method is stable and reliable. Compared with the control group, the neurons survival rate, optical density ratio and GR protein expression in the model group were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), and APP protein expression was significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, APP protein expression in 5%-CSF and 5%-XYS group was reduced ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). In 10%-CSF group, the survival rate of neurons was increased and APP protein expression was reduced ( $P < 0.05$ ). In 20%-CSF group, the optical density ratio was increased ( $P < 0.05$ ), the survival rate of neurons was increased and APP protein expression was reduced ( $P < 0.01$ ). In 10%, 20%-XYS group and mifepristone group, the survival rate of neurons and optical density ratio were significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the expression of APP protein was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The expression of GR protein in all groups was significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the corresponding concentration of CSF group, APP protein expression decreased and GR protein expression increased in 5%-XYS group ( $P < 0.05$ ). In 10%, 20%-XYS group, the survival rate of neurons was increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the optical density ratio was increased ( $P < 0.01$ ), APP protein expression was decreased ( $P < 0.05$ ) and GR protein expression was significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** *Xiaoyao san* can effectively alleviate the damage of hippocampal neurons in the *in vitro* model of chronic stress combined with AD, reduce APP protein expression and increase GR protein expression, and its pharmacological effects are dose-dependent. The high-dose of *Xiaoyao san* drug-containing cerebrospinal fluid at a concentration of 20% has the best efficacy.

**Keywords:** *Xiaoyao san*; Alzheimer's disease; chronic stress; *in vitro* injury model; hippocampal neurons

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是目前老年患病率较高的一种慢性神经退行性疾病。该病会对患者大脑的结构与功能造成影响,从而使其在认知、记忆和行为上始终处于不断恶化的过程。阿尔茨海默病在微观层面上的主要病理特征包括 $\beta$ 淀粉样肽在大脑细胞间沉积形成老年斑、tau蛋白异常磷酸化形成神经纤维缠结以及大量神经元的丢失<sup>[1-2]</sup>。目前阿尔茨海默病的相关发病机制以及具体发病原因尚未明确,研究<sup>[3]</sup>显示其发病可能是由遗传、环境、代谢等多种复杂因素相互作用所致。

慢性应激损伤是由于应激反应长期存在,或机体对应激的调整无效而引起的各种病理性改变。阿尔茨海默病与慢性应激之间存在着千丝万缕的联系,临床上约20%的阿尔茨海默病患者同时伴有慢性应激损伤,二者共同的临床表现有注意力与记忆损害、睡眠模式改变、社交工作能力减退等,且有数据显示慢性应激可加重阿尔茨海默病患者的认知障碍<sup>[4-9]</sup>。

本研究在前期<sup>[10-11]</sup>已充分证实疏肝解郁方药逍遥散可有效缓解慢性应激损伤的基础上,从海马神经元损伤入手,建立慢性应激复合阿尔茨海默病体外

模型,以逍遥散含药脑脊液进行干预,观察神经元存活率、MAP-2 荧光强度、APP 和 GR 的蛋白表达情况,探究逍遥散对该模型的干预作用。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 新生 1 日龄乳鼠和体质量 180~220 g 的健康成年 SD 大鼠,雄性,SPF 级,均购自广州中医药大学实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)-20180034。实验动物质量合格证号:44005800008278。

**1.2 药物及试剂** 逍遥散,组方为柴胡、当归、白术、白芍、茯苓、甘草、薄荷、生姜,药材均购自广州至信中药饮片有限公司,自行煎煮制备水提液,浓度  $2.106 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存。按柴胡:当归:白术:白芍:茯苓:甘草:生姜:薄荷为 2:2:2:2:2:1:1:1 的比例称取饮片,6 倍量水浸泡 30 min,加热回流,微沸 2 h 后纱布滤取药液;药渣再加 4 倍量水同上提取;合并两次提取液,水浴锅浓缩即得。

叠氮化钠( $\text{NaN}_3$ ),北京普博欣生物科技有限责任公司,批号:C190385000;皮质酮,日本 TCI 公司,批号:C0388;水合氯醛,天津市大茂化学试剂

厂,批号:2820;CCK8试剂盒,广州赛国生物科技有限公司,批号:CK04-500T;四季青胎牛血清,浙江天杭生物科技股份有限公司,批号:A3160801;脱脂奶粉,美国BD公司,批号:232100;DMSO,美国MP公司,批号:196055;PBS缓冲液,美国Thermo公司,批号:G0002;APP抗体,英国Abcam公司,批号:ab32136;线粒体膜电位检测试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒、化学发光法EMSA试剂盒、ECL化学发光试剂盒、抗荧光猝灭封片液、免疫荧光染色一抗稀释液、免疫荧光染色二抗稀释液、TBS,上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为:C2006、P0011、P0027、GS002、P0018AS、P0126、P0175、P0108、P0228;米非司酮、多聚赖氨酸、多聚甲醛固定液,美国Sigma公司,批号分别为:M8046、P1274、G1101;青霉素-链霉素、DMEM/F12培养基、B27、谷氨酰胺、胎牛血清、Neurobasal-A培养液、胰酶消化液,美国Gibco公司,批号分别为:15140-122、41061-037、17504-044、25030-081、16000-044、10888-022、25200-056;MAP-2抗体、抗兔IgG(H+L)抗体、GR抗体、 $\beta$ -actin抗体、HRP标记IgG抗体,美国CST公司,批号分别为:8707、4412、12041、4970、7074;山羊血清、DAPI染液、Triton X-100,福州飞净生物技术有限公司,批号分别为:BMS0050、C0065、T8200。

**1.3 试剂配制及保存** 神经元取材液为添加10%胎牛血清与1%青链霉素的DEME/F12培养基,种植液为添加10%胎牛血清的DEME/F12培养基,维持液为添加2% B27和1%谷氨酰胺的Neurobasal-A培养基,以上3者均于4℃冰箱保存。多聚赖氨酸溶液:以PBS溶解至 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,-20℃冰箱保存,使用前以PBS稀释至 $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。叠氮化钠溶液:以PBS稀释至 $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,4℃冰箱保存,使用前以维持液稀释至所需浓度。皮质酮溶液:以DMSO稀释至 $0.25\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,-20℃冰箱避光保存,使用前以维持液稀释至所需浓度。TBST(1 $\times$ ):在100 mL TBS(10 $\times$ )中加入900 mL纯水稀释,再加1 mL吐温-20,4℃冰箱保存。

**1.4 仪器** HF90 CO<sub>2</sub>培养箱,上海力申科学仪器有限公司;68001标准型单臂脑立体定位仪,深圳市瑞沃德生命科技有限公司;EnVision多功能酶标仪,美国Perkin Elmer公司;Tannon-5200全自动化学发光成像分析系统,上海天能科技有限公司;742BR1669荧光显微镜、PowerPac HC垂直电泳仪,美国Bio-Rad

公司。

## 1.5 慢性应激复合阿尔茨海默病体外模型的建立

**1.5.1 海马神经元原代培养**<sup>[12-13]</sup> 取新生乳鼠以酒精浸泡消毒,开颅取脑,剥离海马。将组织置于3 mL取材液中剪碎,加3 mL 0.25%胰酶消化液,37℃培养箱消化,每5 min摇匀1次,30 min后加1 mL胎牛血清终止消化。转入离心管吹打后取2 mL上清液,重复3次,所得6 mL细胞悬液于4℃下以 $1\ 100\times g$ 离心5 min;弃上清,加2 mL种植液,并吹打至细胞悬液。细胞计数板计数,以种植液稀释至所需细胞密度(96孔板每孔 $4\sim 5\times 10^4$ 个,24孔板每孔 $3\sim 4.5\times 10^4$ 个,12孔板每孔 $7\sim 9\times 10^4$ 个,6孔板每孔 $1\sim 1.5\times 10^4$ 个),接种至包被好的培养板中( $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 多聚赖氨酸覆盖底部,CO<sub>2</sub>培养箱过夜,使用前PBS清洗两次,超净台晾干)。培养箱培养4 h后,将种植液更换为维持液。此后每60 h换液1次,直到用于相应实验。每次换液前观察神经元生长情况。

**1.5.2 叠氮化钠干预条件筛选** 神经元培养至状态较佳时,分为正常组(仅神经元)、空白组(仅培养基)、不同浓度叠氮化钠给药组(以20、30、40、50、60、70、80 mmol·L<sup>-1</sup>的叠氮化钠进行干预),每组5个复孔,于37℃培养箱中培养。于给药后12、24、36、48 h进行CCK8实验检测神经元活性,以筛选合适的干预浓度与时间。CCK8实验方法:弃去干预药液,每孔加100  $\mu\text{L}$  PBS溶液清洗,弃去后加CCK8工作液(按试剂盒说明配制),培养箱中孵育1~2 h后,酶标仪检测450 nm处吸光度值。细胞存活率=(给药组OD-空白组OD)/(正常组OD-空白组OD) $\times 100\%$ 。

**1.5.3 皮质酮干预条件筛选** 不同浓度皮质酮给药组分别以12.5、25、50、100、200、400、600  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的皮质酮对神经元进行干预,通过CCK8实验检测神经元活性,以筛选合适的干预浓度及时间。对照组设置和其他实验设计均同“1.5.2”所述。

**1.5.4 复合模型建立条件筛选** 依据叠氮化钠和皮质酮的筛选结果,神经元先以不同浓度(30、40、50 mmol·L<sup>-1</sup>)的叠氮化钠干预12 h,再以不同浓度的(100、200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )皮质酮干预24 h,通过CCK8实验检测神经元活性,筛选最适于建立模型的干预浓度。对照组设置和其他实验设计均同“1.5.2”所述。

**1.5.5 复合模型线粒体膜电位的检测** 按“1.5.4”中筛选结果建立复合模型,其中叠氮化钠组仅以叠氮化钠干预,皮质酮组仅以皮质酮干预,复合模型组

完成全部干预, 正常组无干预。将细胞培养板中培养液弃去, PBS 清洗后加入维持液, 按试剂盒说明进行操作。完成后于荧光显微镜下观察, 并用酶标仪对 JC-1 单体(激发光 490 nm, 发射光 520 nm)和 JC-1 聚合物(激发光 525 nm, 发射光 590 nm)进行检测。

### 1.6 逍遥散对慢性应激复合阿尔茨海默病体外模型的影响

**1.6.1 动物分组给药及脑脊液制备方法** 成年 SD 大鼠在适应性饲养 7 d 后随机分为空白组与逍遥散组, 每组 20 只。逍遥散组连续 7 d 灌胃给予逍遥散水煎液  $21.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 空白组灌胃等体积生理盐水。末次给药 2 h 后, 以 10%水合氯醛  $3.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射麻醉, 于两耳连线中点做纵向切口, 在枕骨凸起部位下方凹陷处进针, 用 1 mL 注射器吸取 100~150  $\mu\text{L}$  清亮透明脑脊液, 同组合并后于 4  $^{\circ}\text{C}$  下以  $10\,000 \times g$  离心 10 min, 收集上清液, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除菌, -80  $^{\circ}\text{C}$  冻存备用。

**1.6.2 脑脊液干预及分组** 神经元接种于培养板后分为 9 组: 正常组(无干预); 复合模型组(按“1.5”方法建立模型); 5%、10%、20%逍遥散含药脑脊液组(分别以 5%、10%、20%逍遥散含药脑脊液干预复合模型); 5%、10%、20%空白脑脊液组(分别以 5%、10%、20%空白脑脊液干预复合模型); 米非司酮组(以  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  含药培养液干预复合模型)。

**1.6.3 CCK8 实验检测神经元存活率** 以“1.6.2”中方法分组干预后, 按“1.5.2”中所述 CCK8 实验方法进行实验, 以检测各组神经元存活率。

**1.6.4 免疫荧光法检测神经元 MAP-2 蛋白表达** 以“1.6.2”中方法分组干预后, 弃去培养基, 加 4%多聚甲醛溶液固定 15 min 后弃去; 室温下以 0.2% Triton X-100 溶液破膜打孔 10 min 后弃去, 加 5%山羊血清(PBS 稀释)37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 30 min 后弃去; 加 1:200 的兔抗 MAP-2 单克隆抗体(一抗稀释液稀释)4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。弃去一抗, 加 1:500 抗兔 IgG(H+L) Alexa Fluo 抗体(二抗稀释液稀释), 室温避光孵育 1 h。弃去二抗, 加 DAPI 染液, 室温避光孵育 5 min 后弃去。以上步骤中每次换液均以 PBS 清洗 5 min  $\times$  3 次。取出爬片置于加 20  $\mu\text{L}$  抗荧光淬灭封片液的载玻片上, 用荧光显微镜观察拍摄, 检测 MAP-2 阳性细胞数占总细胞数比例。

**1.6.5 免疫印迹法检测神经元中 GR 及 APP 蛋白表达** 以“1.6.2”中方法分组干预后, 6 孔板每孔加细胞裂解液 50~80  $\mu\text{L}$ , 冰上摇床裂解 30 min, 刮下细胞转

移至 1.5 mL EP 管同上裂解 30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  下  $13\,500 \times g$  离心 25 min, 取上清液即为所得总蛋白样品。按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明操作, 酶标仪测定 562 nm 处吸光度值, 计算样品蛋白浓度, 加入相应比例 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5 $\times$ ), 沸水浴 5~10 min 使蛋白变性。进行 SDS-PAGE 电泳(分离胶 80 V、积层胶 100 V), 电泳结束后 120 V 湿法转膜, 以含 5%脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 2 h。弃去封闭液, 加 GR、APP、 $\beta$ -actin 一抗抗体(1:1 500), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。弃去一抗, 加 HRP 标记的 IgG 二抗, 室温孵育 1 h。以上步骤中每次换液均以 TBS 清洗 10 min  $\times$  3 次。暗室内膜上滴加显影液(按 ECL 试剂盒说明配制)后曝光, 获取所需蛋白条带并分析灰度值。

**1.7 统计学处理方法** 采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析。若在 Shapiro-Wilk 检验中符合正态分布, 则进行方差同质性检验, 方差齐即进行单因素方差分析并采用 LSD 法两两比较, 方差不齐则进行 Dunnett's T3 法分析, 实验数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。若不符合正态分布则采用 Kruskal-Wallis 法进行非参数秩和检验, 实验数据以  $M(P_{25} \sim P_{75})$  表示。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 模型建立条件的筛选结果

**2.1.1 叠氮化钠对神经元存活率的影响** 结果见表 1, 该浓度梯度的叠氮化钠干预后, 神经元存活率随时间延长而降低。考虑到叠氮化钠与皮质酮同时作用会造成神经元损伤加剧, 因此叠氮化钠干预后的存活率应以 70%~80%为佳。由于 24 h 后存活率普遍低于 60%且下降速率较快, 不宜进行后续实验, 因此综合考虑后选择 30、40、50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  3 个浓度干预 12 h 来进一步筛选模型建立条件。

表 1 叠氮化钠对海马神经元存活率的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

Table 1 The effect of  $\text{NaN}_3$  on the survival rate of hippocampal neurons( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

叠氮化钠/ ( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	12 h 存活 率/%	24 h 存活 率/%	36 h 存活 率/%	48 h 存活 率/%
0	$100.0 \pm 2.1$	$100.0 \pm 8.7$	$100.0 \pm 6.5$	$100.0 \pm 11.4$
20	$81.4 \pm 3.6$	$61.9 \pm 7.4$	$56.5 \pm 6.5$	$54.5 \pm 4.4$
30	$76.0 \pm 5.5$	$57.0 \pm 10.3$	$45.6 \pm 5.5$	$45.8 \pm 4.1$
40	$72.1 \pm 6.2$	$58.3 \pm 10.2$	$38.5 \pm 4.8$	$34.4 \pm 5.7$
50	$69.0 \pm 5.5$	$55.5 \pm 9.2$	$31.8 \pm 3.5$	$18.7 \pm 3.8$
60	$60.8 \pm 4.5$	$38.0 \pm 5.1$	$16.6 \pm 2.1$	$11.4 \pm 0.4$
70	$50.0 \pm 4.7$	$27.0 \pm 6.9$	$13.3 \pm 2.3$	$7.6 \pm 0.7$
80	$38.7 \pm 5.0$	$19.7 \pm 8.7$	$9.0 \pm 1.6$	$5.6 \pm 0.6$

**2.1.2 皮质酮对神经元存活率的影响** 结果见表 2, 该浓度梯度皮质酮干预后, 神经元存活率先随时间延长而降低, 但超过一定时限后, 即维持在一个相对稳定的水平。同样考虑到复合给药加剧细胞损伤的问题, 皮质酮干预后存活率应以 50%~75% 为佳。鉴于干预 36 h 后存活率普遍低于 70%, 而干预 12 h 的影响又相对较小, 因此综合考虑后选择 100、200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  两个浓度干预 24 h 来进一步筛选模型建立条件。

表 2 皮质酮对海马神经元存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  
Table 2 The effect of corticosterone on the survival rate of hippocampal neurons( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

皮质酮/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	12 h 存活 率/%	24 h 存活 率/%	36 h 存活 率/%	48 h 存活 率/%
0	100.0 $\pm$ 3.8	100.0 $\pm$ 4.0	100 $\pm$ 6.5	100.0 $\pm$ 3.8
12.5	84.3 $\pm$ 4.5	81.8 $\pm$ 6.9	70.3 $\pm$ 6.8	69.8 $\pm$ 4.1
25	80.0 $\pm$ 3.9	78.5 $\pm$ 2.5	66.9 $\pm$ 5.9	66.7 $\pm$ 4.6
50	78.3 $\pm$ 1.3	77.3 $\pm$ 2.4	64.0 $\pm$ 5.9	64.6 $\pm$ 3.0
100	74.6 $\pm$ 0.6	72.6 $\pm$ 3.2	61.7 $\pm$ 2.9	63.9 $\pm$ 4.4
200	61.4 $\pm$ 1.6	56.2 $\pm$ 3.8	55.2 $\pm$ 7.7	49.9 $\pm$ 1.4
400	42.5 $\pm$ 3.0	43.5 $\pm$ 5.8	39.4 $\pm$ 4.2	38.9 $\pm$ 1.6
600	39.8 $\pm$ 2.2	37.0 $\pm$ 4.2	26.9 $\pm$ 3.3	29.8 $\pm$ 3.8

**2.1.3 复合干预对神经元存活率的影响** 结果见表 3, 当叠氮化钠浓度为 30  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 皮质酮浓度为 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 神经元存活率接近 50%, 为模型最佳建立条件。因此, 复合模型最终建立方法是先以 30  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的叠氮化钠干预 12 h, 再更换为 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的皮质酮干预 24 h。

表 3 复合干预对海马神经元存活率的影响( $\bar{x} \pm s, \%$ ;  $n=4$ )  
Table 3 The effect of multiplex intervention on the survival rate of hippocampal neurons( $\bar{x} \pm s, \%$ ;  $n=4$ )

皮质酮/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	叠氮化钠/( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )		
	30	40	50
100	50.2 $\pm$ 2.4	39.3 $\pm$ 3.5	41.0 $\pm$ 3.0
200	40.5 $\pm$ 0.6	41.5 $\pm$ 8.1	32.7 $\pm$ 10.7

**2.1.4 线粒体膜电位检测结果** 结果见图 1 和表 4, 与正常组比较, 叠氮化钠组和复合模型组 JC-1 单体绿色荧光明显增强, 而 JC-1 聚合物红色荧光明显减弱, 荧光比值明显降低( $P < 0.01$ ); 皮质酮组的 JC-1 单体绿色荧光有增强趋势, JC-1 聚合物红色荧光和荧光比值无明显变化( $P > 0.05$ )。可见, 叠氮化钠组与复合模型组的干预均对细胞线粒体造成损伤。

**2.2 不同浓度逍遥散含药脑脊液干预对复合模型的影响**

**2.2.1 神经元存活率检测结果** 结果见表 5, 与正常组比较, 复合模型组存活率明显降低( $P < 0.01$ )。与复合模型组比较, 5%空白脑脊液组和 5%逍遥散含药脑脊液组无明显变化( $P > 0.05$ ); 10%空白脑脊液组存活率增加( $P < 0.05$ ); 米非司酮组、20%空白脑脊液组和 10%、20%逍遥散含药脑脊液组存活率明显增加( $P < 0.01$ )。与同浓度的空白脑脊液组比较, 5%逍遥散含药脑脊液组无明显变化( $P > 0.05$ ); 10%、20%逍遥散含药脑脊液组存活率增加( $P < 0.05, P < 0.01$ )。可见, 逍遥散含药脑脊液可以在一定程度上恢复神经元活力, 增加神经元存活率。

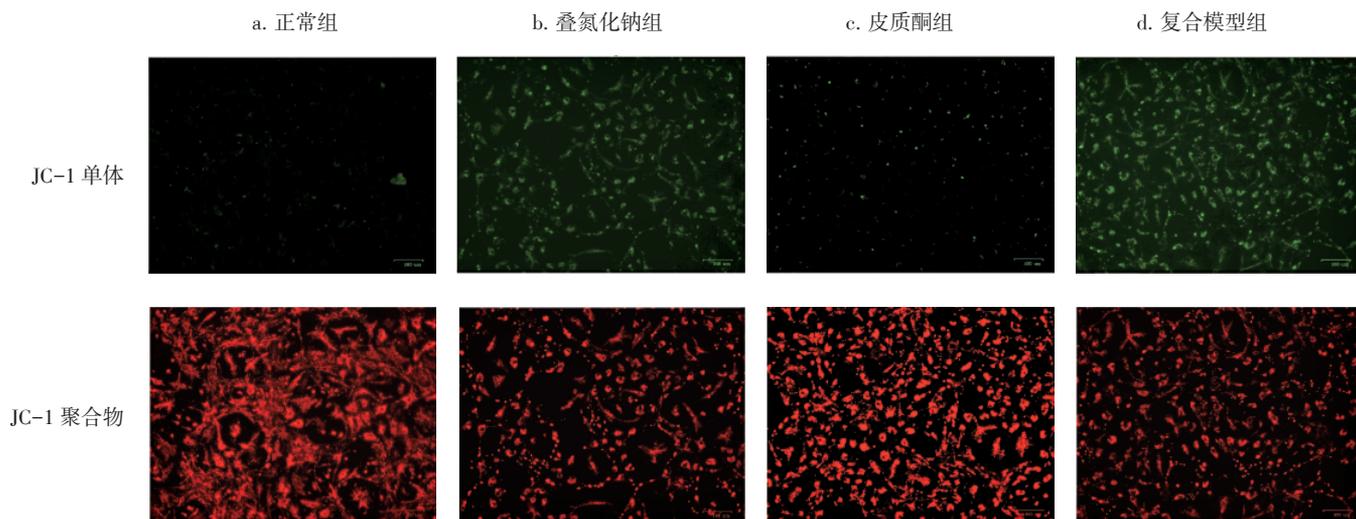


图 1 各组线粒体膜电位荧光图( $\times 100$ , 标尺为 100  $\mu\text{m}$ )  
Figure 1 Fluorescence of mitochondrial membrane potential( $\times 100, 100 \mu\text{m}$ )

表 4 各组线粒体膜电位检测结果[M(P<sub>25</sub>~P<sub>75</sub>), n=6]

Table 4 Detection results of mitochondrial membrane potential [M(P<sub>25</sub>~P<sub>75</sub>), n=6]

组别	荧光比值(JC-1 聚合物/JC-1 单体)
正常组	0.988(0.957~1.058)
叠氮化钠组	0.631(0.605~0.683)**
皮质酮组	0.942(0.885~0.981)
复合模型组	0.631(0.603~0.645)**

注: 与正常组比较, \*\*P < 0.01

**2.2.2 MAP-2 免疫荧光检测结果** 结果见图 2 和表 6。与正常组比较, 复合模型组荧光强度明显减弱, 光密度比值明显降低(P < 0.01), 神经元突触减少。与复合模型组比较, 5%、10%空白脑脊液组和 5%逍遥散含药脑脊液组荧光强度和光密度比值均无明显变化(P > 0.05), 且无神经元网络; 20%空白脑

表 5 逍遥散含药脑脊液对神经元存活率的影响( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

Table 5 The effect of Xiaoyao san drug-containing CSF on the survival rate of neurons( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

组别	存活率/%
正常组	100.00 ± 6.36
复合模型组	56.88 ± 1.31**
米非司酮组	77.66 ± 5.11**
5%空白脑脊液组	60.32 ± 3.97
5%逍遥散含药脑脊液组	65.94 ± 4.51
10%空白脑脊液组	66.07 ± 3.32*
10%逍遥散含药脑脊液组	76.76 ± 3.19** <sup>▼</sup>
20%空白脑脊液组	67.92 ± 2.57**
20%逍遥散含药脑脊液组	79.49 ± 3.19** <sup>△△</sup>

注: 与正常组比较, \*\*P < 0.01; 与复合模型组比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; 与 10%空白脑脊液组比较, <sup>▼</sup>P < 0.05; 与 20%空白脑脊液组比较, <sup>△△</sup>P < 0.01

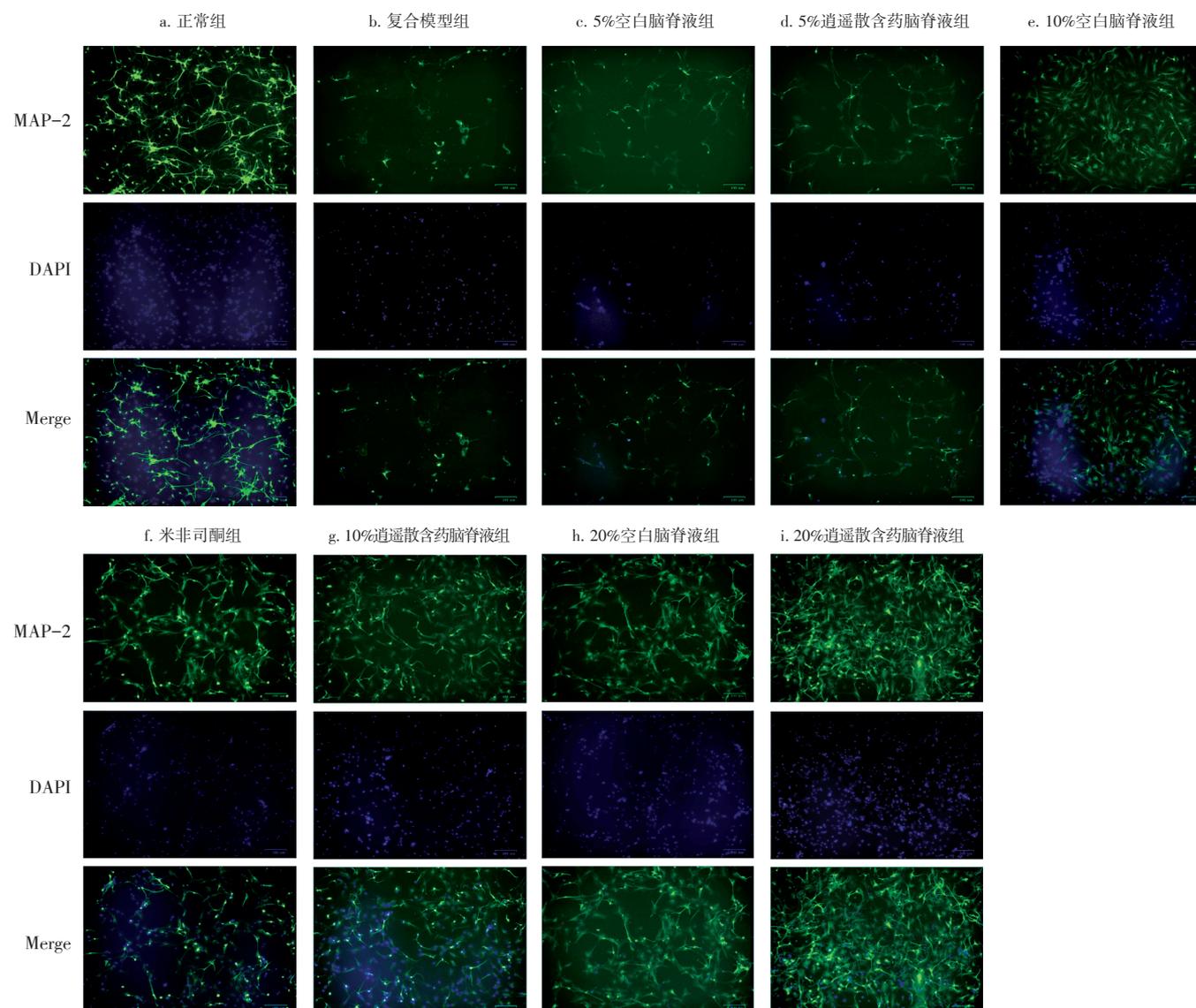


图 2 逍遥散含药脑脊液对 MAP-2 免疫荧光的影响效果图(×100, 标尺为 100 μm)

Figure 2 The effect pictures of Xiaoyao san drug-containing CSF on MAP-2 fluorescence(×100, 100 μm)

表 6 逍遥散含药脑脊液对 MAP-2 免疫荧光的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

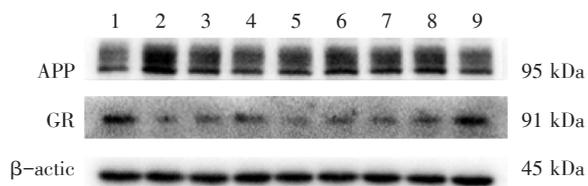
Table 6 The effect of *Xiaoyao san* drug-containing CSF on MAP-2 fluorescence( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	荧光比值
正常组	1.00 ± 0.07
复合模型组	0.20 ± 0.02**
米非司酮组	0.49 ± 0.05##
5%空白脑脊液组	0.24 ± 0.03
5%逍遥散含药脑脊液组	0.21 ± 0.02
10%空白脑脊液组	0.26 ± 0.02
10%逍遥散含药脑脊液组	0.42 ± 0.01##**
20%空白脑脊液组	0.30 ± 0.03*
20%逍遥散含药脑脊液组	0.48 ± 0.05### <sup>△△</sup>

注: 与正常组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与复合模型组比较, \* $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; 与 10%空白脑脊液组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 20%空白脑脊液组比较, <sup>△△</sup> $P < 0.01$

脊液组光密度比值升高( $P < 0.05$ ); 10%、20%逍遥散含药脑脊液组和米非司酮组荧光强度明显增强, 光密度比值明显升高( $P < 0.01$ ), 神经元突触增多。分别与同浓度的空白脑脊液组比较, 5%逍遥散含药脑脊液组光密度比值无明显变化( $P > 0.05$ ); 10%、20%逍遥散含药脑脊液组光密度比值均明显升高( $P < 0.01$ )。可见, 该模型可造成海马神经元损伤, 而 10%和 20%的逍遥散含药脑脊液对此损伤具有一定的修复作用。

**2.2.3 APP 和 GR 蛋白表达检测结果** 见图 3 和表 7。与正常组比较, 复合模型组 APP 蛋白表达量明显增加而 GR 蛋白表达量明显减少( $P < 0.01$ )。与复合模型组比较, 5%、10%空白脑脊液组 APP 蛋白表达量减少( $P < 0.05$ ); 20%空白脑脊液组、米非司酮组和 5%、10%、20%逍遥散含药脑脊液组 APP 蛋白表达量均明显减少( $P < 0.01$ ); 各用药组 GR 蛋白表达量均明显增加( $P < 0.01$ )。分别与同浓度空白脑脊液组比较, 5%、10%、20%逍遥散含药脑脊液组



注: 1. 正常组; 2. 复合模型组; 3. 5%逍遥散含药脑脊液组; 4. 10%逍遥散含药脑脊液组; 5. 20%逍遥散含药脑脊液组; 6. 5%空白脑脊液组; 7. 10%空白脑脊液组; 8. 20%空白脑脊液组; 9. 米非司酮组

图 3 各组 APP 蛋白和 GR 蛋白条带图

Figure 3 The band diagram of APP and GR protein

表 7 逍遥散含药脑脊液对 APP 和 GR 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 7 The effect of *Xiaoyao san* drug-containing CSF on APP and GR protein expression( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	APP	GR
正常组	1.40 ± 0.11	1.22 ± 0.05
复合模型组	2.57 ± 0.26**	0.54 ± 0.04**
米非司酮组	1.67 ± 0.14##	1.02 ± 0.03##
5%空白脑脊液组	2.28 ± 0.07*	0.69 ± 0.02##
5%逍遥散含药脑脊液组	1.99 ± 0.14## <sup>△</sup>	0.82 ± 0.02## <sup>△</sup>
10%空白脑脊液组	2.20 ± 0.15*	0.69 ± 0.04##
10%逍遥散含药脑脊液组	1.83 ± 0.12## <sup>▽</sup>	0.94 ± 0.08## <sup>▽▽</sup>
20%空白脑脊液组	2.06 ± 0.06##	0.79 ± 0.04##
20%逍遥散含药脑脊液组	1.77 ± 0.03## <sup>△</sup>	1.04 ± 0.07## <sup>△△</sup>

注: 与正常组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与复合模型组比较, \* $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ; 与 5%空白脑脊液组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与 10%空白脑脊液组比较, <sup>▽</sup> $P < 0.05$ , <sup>▽▽</sup> $P < 0.01$ ; 与 20%空白脑脊液组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$

APP 蛋白表达量均明显减少( $P < 0.05$ ); 5%逍遥散含药脑脊液组 GR 蛋白表达量增加( $P < 0.05$ ); 10%、20%逍遥散含药脑脊液组 GR 蛋白表达量明显增加( $P < 0.01$ )。可见, 逍遥散脑脊液可减少该模型的 APP 蛋白表达量, 增加 GR 蛋白表达量, 且具有一定的剂量依赖性, 以 20%逍遥散含药脑脊液的药理效果较好。

### 3 讨论

海马是中枢神经系统的重要组织, 主要参与学习、记忆、情感等高级生理功能, 适用于进行神经元相关研究<sup>[4]</sup>。海马神经元损伤可影响海马功能, 最终演变为学习障碍、记忆功能障碍、抑郁和颞叶癫痫等, 是阿尔茨海默病表现出的病理特征之一。通过抑制海马损伤, 改善海马神经可塑性, 一定程度上可达到缓解阿尔茨海默病症状的效果<sup>[15]</sup>, 因此本实验选择海马作为模型供体组织。

叠氮化钠为线粒体呼吸链复合体IV的抑制剂, 会对细胞内线粒体造成损伤, 从而影响神经元功能的正常发挥, 甚至造成其死亡<sup>[16]</sup>。已有研究<sup>[17]</sup>表明, 叠氮化钠可对大鼠造成记忆损伤, 从而使其出现阿尔茨海默病病理变化。本课题组前期<sup>[18]</sup>采用海马区注射叠氮化钠的方法建立阿尔茨海默病动物模型, 模型大鼠记忆功能下降且海马组织中出现 A $\beta$  蛋白沉积, 因此本实验选择叠氮化钠作为干预药物之一, 模拟细胞的阿尔茨海默病病理变化。相关研究<sup>[19]</sup>表明, 高浓度皮质酮会造成 HPA 轴反馈失调, 这与机体的慢

性应激状态类似,且皮质酮致海马神经元损伤的相关细胞模型现已广泛应用于抑郁、应激等相关研究领域。因此本实验选择皮质酮作为另一种干预药物,模拟细胞的应激状态。HPA 轴的持续亢进可使糖皮质激素浓度不断升高,从而降低其受体 GR 活性<sup>[20]</sup>。GR 作为海马神经中发生应激反应的主要介质,在海马区表达水平较高,且对皮质酮水平波动较为敏感,长期应激时 GR 活性降低,其对 HPA 轴的负反馈功能减弱或丧失,从而引发海马神经可塑性受损<sup>[21]</sup>,加剧阿尔茨海默病症状。研究<sup>[22]</sup>显示,低剂量米非司酮具明显抗孕激素效果,但大鼠给药剂量高达  $54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时具有明显的拮抗 GR 受体、恢复应激大鼠行为和神经可塑性的作用。因此,本实验以 GR 受体拮抗剂米非司酮作为对照药物。

鉴于血脑屏障的存在,神经元存在的微环境实际上与其它细胞组织有较大差别,目前常见的血清药理学并不完全适用于中枢神经系统疾病的研究。中药含药脑脊液可明显诱导出星形胶质细胞的神经营养作用,尽可能地避免体外实验和血清中各种干扰因素的影响,同时其中含有真正可以通透血脑屏障的成分,更能反应中药作用的实际情况<sup>[23]</sup>。因此,本研究以逍遥散水煎液连续灌胃 SD 大鼠,收集其含药脑脊液来干预细胞。

线粒体损伤会导致其膜电位下降,膜电位较高时,JC-1 聚集在线粒体基质中形成聚合物,产生红色荧光,膜电位较低时则无法聚集,产生绿色荧光<sup>[24]</sup>,二者荧光比值的变化可用于体现线粒体膜电位的改变,由此可对模型进行评价。微管蛋白 MAP-2 对维持神经元的正常功能有着重要作用,且仅存在于中枢神经系统神经元的胞体和树突中,在胶质细胞中并不存在<sup>[25]</sup>,因此可作为神经元的特异性标志,利用荧光强度评价神经元的损伤程度。 $\text{A}\beta$  蛋白是由 APP 蛋白经过水解而产生的,其在细胞间沉积形成的老年斑是阿尔茨海默病的两大病理表现之一<sup>[26]</sup>,因此 APP 蛋白表达的增加在一定程度上可以反映阿尔茨海默病的病理表现。

综上,本实验以原代海马神经元为研究对象,选择叠氮化钠和皮质酮进行药物干预以建立体外损伤复合模型,选择 GR 受体拮抗剂米非司酮作为对照药物,检测其线粒体膜电位、细胞存活率、MAP-2 免疫荧光强度和 APP、GR 蛋白表达,评价模型特征并探究逍遥散含药脑脊液对该模型的干预作用。

本实验结果显示,模型建立的最佳方法为先以

$30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的叠氮化钠对海马神经元干预 12 h,再更换为  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的皮质酮干预 24 h。该模型的线粒体膜电位下降,MAP-2 荧光强度明显减弱,神经元突触减少,APP 蛋白表达增加而 GR 蛋白表达减少,同时表现出阿尔茨海默病和慢性应激的叠加损伤状态。实验中也发现皮质酮干预后,JC-1 单体绿色荧光有增强趋势,APP 蛋白表达增加,可见皮质酮可能具有加重叠氮化钠损伤的作用。由此可推测慢性应激可能会诱导或加重阿尔茨海默病症状,该模型的特征符合预期,建立的方法稳定性与可靠性较强。在进行空白脑脊液干预后,结果显示 10% 和 20% 的空白脑脊液对神经元活性、APP 蛋白和 GR 蛋白表达均有影响,可见空白脑脊液对细胞具有一定的保护作用,这可能与其本身所含有的物质相关。与复合模型组及相应浓度的空白脑脊液组比较,逍遥散含药脑脊液可以增加该模型神经元活性,缓解神经元损伤,改变 APP 和 GR 蛋白表达水平。其作用效果随浓度增加而升高,20% 浓度组的药理作用最为明显。综上,逍遥散含药脑脊液在一定程度上可以缓解该模型损伤,作用效果具有一定的剂量依赖性。逍遥散作为疏肝解郁代表方药,可能对伴有慢性应激的阿尔茨海默病患者具有较好的药理作用,这可为阿尔茨海默病的临床用药提供新思路,也为阿尔茨海默病的防治提供了一个新途径。

此外,实验中在 GR 受体拮抗剂米非司酮干预后,GR 蛋白表达量增加的同时 APP 的蛋白表达量明显下降,逍遥散干预后 GR 蛋白表达量也明显增加。由此推测,逍遥散含药脑脊液对该模型损伤的修复作用机制可能与米非司酮作用机制相似,可能通过拮抗 GR 受体而导致 APP 蛋白表达的降低,在后续实验中可针对此猜想进一步进行机制探究。

#### 参考文献:

- [1] COHEN M L, KIM C, HALDIMAN T, et al. Rapidly progressive Alzheimer's disease features distinct structures of amyloid- $\beta$ [J]. *Brain*, 2015, 138(4): 1009-1022.
- [2] VIOLA K L, KLEIN W L. Amyloid  $\beta$  oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis[J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 129(2): 183-206.
- [3] REITZ C, MAYEUX R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88(4): 640-651.
- [4] MACHADO A, HERRERA A J, DE PABLOS R M, et al. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease[J]. *Rev Neurosci*, 2014, 25(6): 785-804.

- [5] SOTIROPOULOS I. The neurodegenerative potential of chronic stress: a link between depression and Alzheimer's disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 822: 221-222.
- [6] LYKETSOS C G, OLIN J. Depression in Alzheimer's disease: overview and treatment[J]. *Bio Psychiatry*, 2002, 52(3): 243-252.
- [7] PARK J H, LEE S B, LEE T J, et al. Depression in vascular dementia is quantitatively and qualitatively different from depression in Alzheimer's Disease[J]. *Dement and Geriatr Cogn Disord*, 2007, 23(2): 67-73.
- [8] JOHANSSON L. Can stress increase Alzheimer's disease risk in women?[J]. *Expert Rev Neurother*, 2014, 14(2): 123-125.
- [9] WANG H X, WAHLBERG M, KARP A, et al. Psychosocial stress at work is associated with increased dementia risk in late life[J]. *Alzheimers Dement*, 2012, 8(2): 114-120.
- [10] 范耀耀, 刘文杰, 赵慧, 等. 逍遥散对慢性应激AD复合模型大鼠海马组织的作用及其机制[J]. *中药材*, 2019, 42(9): 2151-2156.
- [11] 刘文杰, 赵慧, 徐大量, 等. 逍遥散对慢性应激下AD复合模型大鼠行为学和海马组织的干预作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(6): 744-747.
- [12] KAECH S, BANKER G. Culturing hippocampal neurons[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(5): 2406-2415.
- [13] 仁德芳, 付裕, 王洪连, 等. 大鼠海马神经元的分离和原代培养[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(5): 660-663.
- [14] LAZAROV O, HOLLANDS C. Hippocampal neurogenesis: learning to remember[J]. *Prog Neurobiol*, 2016, 138-140: 1-18.
- [15] SHETTY A K. Hippocampal injury-induced cognitive and mood dysfunction, altered neurogenesis, and epilepsy: can early neural stem cell grafting intervention provide protection?[J]. *Epilepsy Behav*, 2014, 38: 117-124.
- [16] DELGADO-CORTES M J, ESPINOSA-OLIVA A M, SARMIENTO M, et al. Synergistic deleterious effect of chronic stress and sodium azide in the mouse hippocampus[J]. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28(4): 651-661.
- [17] 张兰, 张如意, 李雅莉, 等. 参乌胶囊对微泵恒速灌注叠氮钠致痴呆大鼠行为学及胆碱能系统的影响[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(9): 1300-1305.
- [18] 刘文杰. 逍遥散缓解慢性应激下AD有效部位的药效学研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [19] SAALTINK D J, VREUGDENHIL E. Stress, glucocorticoid receptors, and adult neurogenesis: a balance between excitation and inhibition?[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(13): 2499-2515.
- [20] BARIK J, MARTI F, MOREL C, et al. Chronic stress triggers social aversion via glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons[J]. *Science*, 2013, 339(6117): 332-335.
- [21] SANTOS T B, CESPEDES I C, VIANA M B. Chronic corticosterone administration facilitates aversive memory retrieval and increases GR/NOS immunoreactivity[J]. *Behav Brain Res*, 2014, 267: 46-54.
- [22] WU L M, HAN H, WANG Q N, et al. Mifepristone repairs region-dependent alteration of synapsin I in hippocampus in rat model of depression[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2007, 32(12): 2500-2510.
- [23] 梅建勋, 张伯礼, 陆融. 中药脑脊液药理学研究方法的初建—对中药影响星形胶质细胞神经营养作用的观察[J]. *中草药*, 2000, 31(7): 523-526.
- [24] 周越. 乙醇作用大鼠海马神经元后线粒体膜电位及钙离子浓度变化的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [25] 隋竹欣, 李珍, 刘昊, 等. 抑郁大鼠海马微管相关蛋白pMAP-2和p-Tau表达的研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2015, 31(2): 175-180.
- [26] O'BRIEN R J, WONG P C. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease[J]. *Annu Rev Neurosci*, 2011, 34: 185-204.

(编辑: 修春)