

## 脾阴虚痴呆大鼠不同脑区 Snk-SPAR 路径 及滋补脾阴方药调控作用研究\*

□战丽彬\*\* (大连医科大学附属第二医院 大连 116023)  
(大连医科大学中西医结合研究院 大连 116044)

宫晓洋 (大连医科大学附属第一医院 大连 116021)

刘 莉 (大连大学附属中山医院 大连 116001)

稽征鸿 (大连市第二人民医院 大连 116011)

隋 华 (大连医科大学中西医结合研究院 大连 116044)

**摘要:**目的:观察脾阴虚痴呆大鼠不同脑区树突棘相关的 Rap-特异性 GTPase-活化蛋白和血清诱导激酶 mRNA 表达的变化及滋补脾阴方药对其调控作用。方法:采用逆转录聚合酶链反应检测各脑区 SPAR、Snk mRNA 表达变化。结果:痴呆组和脾阴虚痴呆组大鼠各脑区 SPAR mRNA 表达明显减弱( $P<0.05$ ), Snk mRNA 表达呈上调趋势;脾阴虚痴呆+ZBPYR 组大鼠各脑区 SPAR mRNA 表达明显增强 ( $P<0.05$ ), Snk mRNA 表达呈下调趋势。结论:ZBPYR 能使脾阴虚痴呆组大鼠各脑区 SPAR mRNA 表达增强, Snk mRNA 表达下调,提示 ZBPYR 具有保护并维持突触和树突棘正常形态的作用,这一作用机制可能与 Snk-SPAR 信号途径传递有关。

**关键词:**脾阴虚痴呆 滋补脾阴方药 突触 Snk-SPAR 路径

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.05.019

学习记忆能力下降是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的主要临床表现,一般出现于 AD 特征性病理形成之前,与早期神经元和突触的丢失有关。研究表明, $\beta$ 淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ )在其中起到重要作用,A $\beta$ 可损伤突触的结构和功能<sup>[1]</sup>。在突触部位的诸多结构因素中,突触后致密区(Postsynaptic density, PSD)是一个非常敏感的区域。它由神经递

质受体、离子通道、脚手架蛋白、信号分子和细胞器等组成。而位于其中的树突棘相关的 Rap-特异性 GTPase-活化蛋白(Spine-associated Rap guanosine triphosphatase (GTPase) activating protein, SPAR)和血清诱导激酶(Serum-inducible kinase, Snk)受体在稳定突触结构、信息传递和记忆的形成中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。以往的研究表明,滋补脾阴方药(Zibu Piyin Recipe, ZBPYR)具有抗氧化,调节脑细胞膜磷脂代谢障碍,改善衰老个体及脾阴虚痴呆大鼠学习记忆能力的作用,

收稿日期:2010-11-16

修回日期:2011-09-26

\* 国家自然科学基金面上项目(30472255):滋补脾阴方药对兴奋性传递中树突棘调控的分子机制研究,负责人:战丽彬。

\*\* 通讯作者:战丽彬,本刊编委,教授,博士研究生导师,主要研究方向:中西医结合防治老年脑病研究, Tel:0411-86110191, E-mail:lib-inzhan@hotmail.com。

其含药血清具有抗兴奋毒损伤海马神经元、调控树突棘、保护神经细胞内质网应激损伤等作用<sup>[3-6]</sup>。为深入探讨 ZBPYR 的神经元突触保护作用,本实验建立了脾阴虚痴呆证病结合大鼠模型,观察模型大鼠不同脑区 SPAR 和 Snk mRNA 表达的改变及 ZBPYR 对其的影响,进一步探讨 ZBPYR 的作用机制。

## 一、材料和方法

### 1. 动物及分组

健康成年雄性 SD 大鼠,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2003-0002, SPF 级,体重  $200 \pm 20$  g。随机分为 5 组:空白对照组、痴呆组、脾阴虚组、脾阴虚痴呆组和脾阴虚痴呆+ZBPYR 组,每组 7 只。

### 2. 实验药物

滋补脾阴方药由清代吴澄《不居集》中资成汤加味而成,由红参 30 g,山药 15 g,茯神 15 g,白芍 15 g,丹参 12 g,白扁豆 15 g,莲肉 20 g,石菖蒲 10 g,远志 10 g,檀香 4.5 g,橘红 9 g,甘草 9 g 组成,均购自大连医药集团药材公司。中药常规水煎,每毫升中药液含生药 3.29 g,4℃保存备用。伤阴药由吴茱萸、附子、肉桂按照 1:1:1 比例组成,常规水煎,每毫升中药液含生药 1g。

### 3. 主要试剂和药品

$\beta$ 1-40, Sigma 公司;RNase OUT, Oligo (dt) 12-18 primer, SurperScript II, dNTP 均为 Invitrogen 公司产品;Expand High Fidelity PCR System, Roche 公司产品。

### 4. 主要仪器

Model 5000 Micro Injection Unit 脑立体定位仪, KOPF INSTRUMENTS 公司产品;DTT-2 跳台仪、DMS-2 Morris 水迷宫测试与记录系统(中国医学科学院药物研究所研制);凝胶成像分析系统, UVP 公司产品;温度梯度 PCR 扩增仪, Thermo Hybaid 公司产品;垂直电泳装置, Bio-Rad 公司产品;电动匀浆机 Art-Micra D-8。

### 5. 脾阴虚痴呆模型的建立

采用饮食不节、劳倦过度与耗伤阴液的方法建立脾阴虚模型,然后将符合脾阴虚标准的模型大鼠进行痴呆模型建立。大鼠经腹腔注射 2%戊巴比妥钠( $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )麻醉后,固定到脑立体定位仪,选择双侧海马为注射靶区,使用微量注射器将  $2 \mu\text{L} \beta$ 1-40( $5$

$\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )溶液缓慢注入,留针 5 min 以保证溶液充分弥散;其余组注入等体积 Milli Q 水。术后继续喂养, 1w 后进行行为学测试<sup>[9]</sup>。

### 6. 药物干预

实验的第 25~37d,对脾阴虚痴呆+ZBPYR 组给予 ZBPYR 灌胃,每日 1 mL/100 g。其它各组每日予生理盐水等体积量灌胃。

### 7. 样品制备

大鼠经 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(剂量  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )后,在冰台上从颈部断头,剥去头皮,充分暴露脑组织,快速取出海马、纹状体、大脑皮质和下丘脑,分别放于 1.5 mL 的冻存管中,速置液氮中,然后放到  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。

### 8. 逆转录酶聚合酶链式反应 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

使用 RT-PCR 方法检测各组大鼠海马、纹状体、大脑皮质和下丘脑 SPAR 和 Snk mRNA 表达情况。

#### (1) 总 RNA 的提取、定量。

将 1 mL TRI reagent 加入 10 mL 离心管中,放置冰上,将组织从液氮中取出后迅速倒入离心管中,并用电动匀浆机匀浆 90 s,静置后充分混匀移入 1.5 mL Ep 管;加入氯仿 200  $\mu\text{L}$ /管,漩涡振荡器混匀,室温静置 15 min 后,12000 g 4℃离心 15 min;取上清,加入异丙醇 500  $\mu\text{L}$ /管,室温 10 min,12000 g 4℃离心 10 min 沉淀 RNA;弃上清,加入 75%乙醇 1 mL/管洗涤沉淀;12000 g 4℃离心 5 min;弃上清并干燥,DEPC 水溶解沉淀。紫外分光光度计测定提取 RNA 的浓度及纯度。

#### (2) 逆转录反应(RT)

以上面提取的 RNA 为模板合成 cDNA,反应体系为 20  $\mu\text{L}$ 。取 2  $\mu\text{g}$  总 RNA,加二乙基焦磷酸胺(Diethyl pyrocarbonate, DEPC)至总体积为 9  $\mu\text{L}$ ,加 0.5  $\mu\text{L}$  Oligo (dt)12-18 引物混合后,置  $70^\circ\text{C}$  变性 10 min。然后加入下列成分:5 $\times$ 第一链缓冲液 5.875  $\mu\text{L}$ 、10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP 2  $\mu\text{L}$ 、0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT 2  $\mu\text{L}$ 、RNase 抑制剂 0.5  $\mu\text{L}$  和逆转录酶 0.125  $\mu\text{L}$ ,混合使反应总体积为 20  $\mu\text{L}$ 。放入  $46^\circ\text{C}$  反应 1.5 h,  $70^\circ\text{C}$  变性 15 min,冰上 5 min 后进行扩增。

#### (3) 引物序列(见表 1)。

#### (4) 聚合酶链式反应(PCR)。

以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系见表 2。按如上体系将各成份加入 PCR 管,混匀,离心后于温度梯度 PCR 扩增仪上进行 PCR 扩增。PCR 反应

扩增参数如下:

SPAR: 94℃、3 min; 94℃、45 sec, 54℃、45 sec, 72℃、45 sec, 循环 37 圈; 72℃、5 min。

Snk: 94℃、2 min; 94℃、30 sec, 60℃、30 sec, 72℃、50 sec, 循环 35 圈; 72℃、5 min。

$\beta$ -actin: 94℃、2 min; 94℃、30 sec, 55℃、45 sec, 72℃、1 min, 循环 35 圈; 72℃、7 min。

反应结束后, 对 PCR 产物进行聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳。装配好垂直电泳板, 取 6.9 mL 水, 1 mL 10×TBE, 2 mL 40% 丙烯酰胺, 75  $\mu$ L 10% 过硫酸铵, 6  $\mu$ L TEMED, 混匀后缓慢灌入玻璃板中, 插入梳子。室温聚合后, 将玻璃板插入电泳槽中, 用 1×TBE 缓冲液冲洗加样孔。将 12  $\mu$ L DNA 样品与 10% 体积比上样缓冲液混匀后, 加到加样孔内, 恒压 100 V 电泳 80 min, 电泳后取出凝胶 EB 染色 15 min, 在凝胶成像系统下观察结果。图像分析采用 LabWorks4.6 专业图像分析软件。

### 9. 统计方法

所有数据用  $\bar{x}+s$  表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行处理, 两组间均数比较采用 t 检验。

## 二、结果

双侧海马内注射  $A\beta_{1-40}$  后, 大鼠脑内不同部位 (海马、纹状体、大脑皮质、下丘脑) SPAR 和 Snk mRNA 表达的变化。与空白对照组比较, 痴呆组和脾阴虚痴呆组大鼠海马、纹状体、大脑皮质、下丘脑的 SPAR mRNA 表达明显下调 ( $P<0.05$ ); 而 Snk mRNA 表达呈上调趋势。见图 1~4。

ZBPYR 对脾阴虚痴呆组大鼠脑内不同部位 (海马、纹状体、大脑皮质、下丘脑) SPAR 和 Snk mRNA 表达的影响。与空白对照组比较, 脾阴虚+ZBPYR 组中大鼠脑内海马、纹状体、大脑皮质、下丘脑中 SPAR 和 Snk 表达水平没有明显差异 ( $P>0.05$ ); 与脾阴虚痴呆组比较, 脾阴虚+ZBPYR 组的大鼠海马、纹状体、大脑皮质、下丘脑的 SPAR mRNA 表达水平明显上调 ( $P<0.05$ ); Snk mRNA 表达呈下调趋势。见图 1~4。

## 三、讨论

中医学认为脾为后天之本, 气血生化之源。脾气

健旺则气血充足, 脏腑功能正常, 亦即人之后天代谢活动的正常进行, 全赖脾的功能正常才得以维持。脾阴是水谷所化的营血、津液、脂膏之类, 具有灌溉脏腑、营养肌肉、濡润筋骨、补益脑髓的作用。“脾为太阴, 乃三阴之长”, “脾阴不足水谷乃不化也”, “阴虚又不能滋生血脉”。水谷不化, 血脉不生, 则后天之本化生无源, 各脏腑组织无以濡养滋润, 气机郁滞, 功能失常, 最终因虚致病而衰。因而脾阴虚与衰老关系密切。针对上述病因病机, 我们提出了滋补脾阴的治疗大法, 设立了滋补脾阴方药。

记忆障碍为 AD 早期的突出表现, 它出现在 AD 的特征性标志—老年斑形成之前, 而与突触数目的减少有关。在 AD 早期, 突触的功能与结构受损主要由  $A\beta$  所致<sup>[1]</sup>。大脑的认知需要静态和动态突触连接的相互作用。静态突触维持神经元之间的联系, 促进信息有效传递。而新信息的获取、储存和加工则需要动态的重塑与连接。神经元的动态特征即突触的可塑性 (Synaptic plasticity)。突触的可塑性是多种学习形式的基础。突触可塑性的丧失可导致认知损害, 在神经退行性疾病病理中起重要作用<sup>[2]</sup>。

树突棘是位于树突上的小突起, 脑中大多数兴奋性突触都位于树突棘头部, 树突棘形态结构处于不

表 1 引物序列

Denomination	Sequence	Size of products
SPAR	Sense: 5'-CCGAATCCGTCAGCGTAG-3'	334 bp
	Anti-sense: 5'-TTCCCTTTCCTTGAATAGC-3'	
Snk	Sense: 5'-GGATGATAGTTAGAGGGACG-3'	699 bp
	Anti-sense: 5'-TGTCAGGGCGTATTCCA-3'	
$\beta$ -actin	Sense: 5'-AACCTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3'	241 bp
	Anti-sense: 5'-TCATGAGGTAGTCTGTTCAG-3'	

表 2 PCR 反应体系

添加物	添加量 ( $\mu$ L)
sdH <sub>2</sub> O 10 mM	9
10×PCR buffer	1.2
dNTP	0.24
Polymerase	0.12
Primer up (20 $\mu$ M)	0.12
Primer low (20 $\mu$ M)	0.12
cDNA	1.2
Total cDNA	12

断的调整变化过程中,与突触结构适应外界环境而发生的改变保持一致,而这种改变与突触后致密区 PSD 中的神经递质受体、离子通道、脚手架蛋白、信号分子和细胞器的关系非常密切<sup>[7-8]</sup>。因而树突棘可塑性是中枢神经系统突触功能可塑性的一个重要方面,与大脑的学习记忆功能也密切相关。

SPAR 是树突棘相关的 Rap-特异性 GTPase-活化蛋白<sup>[9]</sup>,有两个肌动蛋白调节域(Act1/Act2),一个

鸟苷酸激酶结合结构域(GKBD),一个 PDZ 结构域和一个 GTPase 活化结构域(GAP)。SPAR 通过其 GKBD 结构域与 PSD-95 的 GK 结构域相互作用,并与 NMDAR 一同形成 NMDAR-PSD-95-SPAR 复合体,维持树突棘的功能和形态。SPAR 通过其 Act1 结构域与 F-actin 相互作用,SPAR 的过度表达,能诱导 F-actin 的重新分布,导致树突棘头部的变大和形状不规则。另外,SPAR 的 GAP 结构域还能够和 Ras 家族 GTPase 的 Rap1 和 Rap2 结合。Rap 在调节肌动蛋白细胞骨架以及细胞与细胞、细胞与基质之间的相互作用方面发挥重要作用。

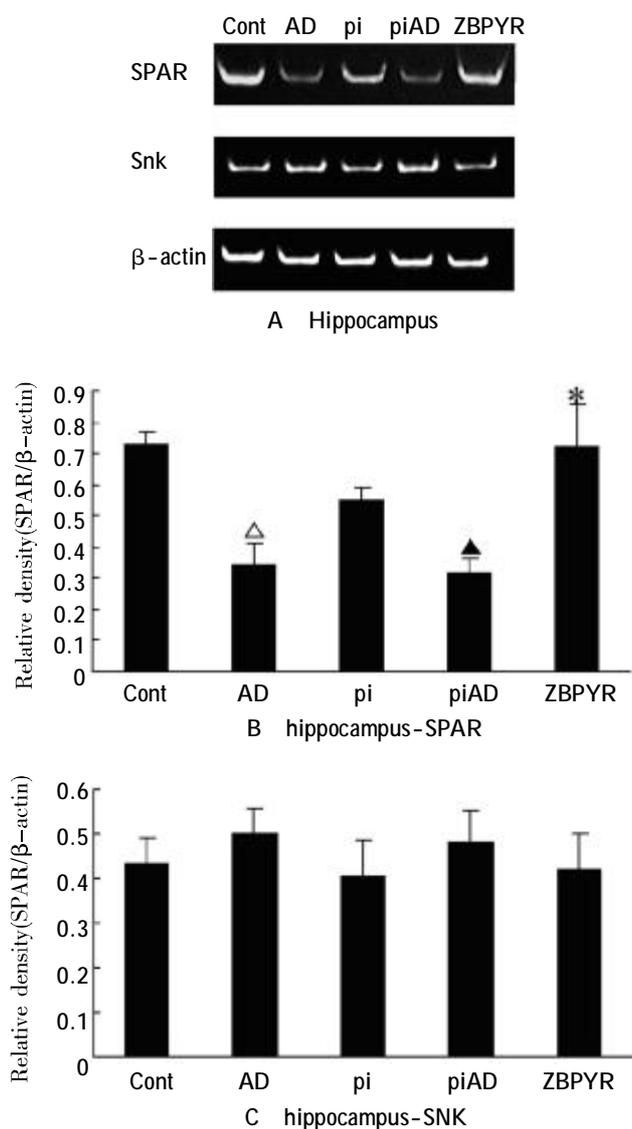


图1 各组大鼠海马 SPAR、Snk mRNA 的表达变化

注:A:RT-PCR 电泳结果,pi、piAD 分别为脾阴虚组和脾阴虚痴呆组;B、C:各组平均累积光密度值(OD)比较。与空白对照组比较,△P<0.05;与脾阴虚组比较,▲P<0.05;与脾阴虚痴呆组比较,\*P<0.05。(下同)

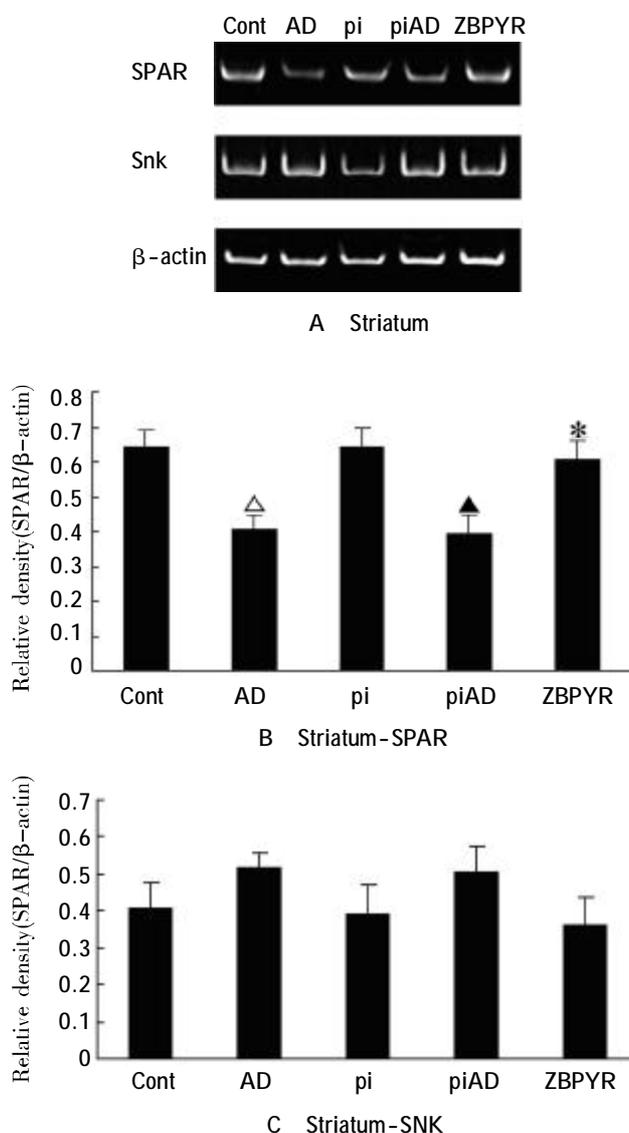


图2 各组大鼠纹状体 SPAR、Snk mRNA 的表达变化

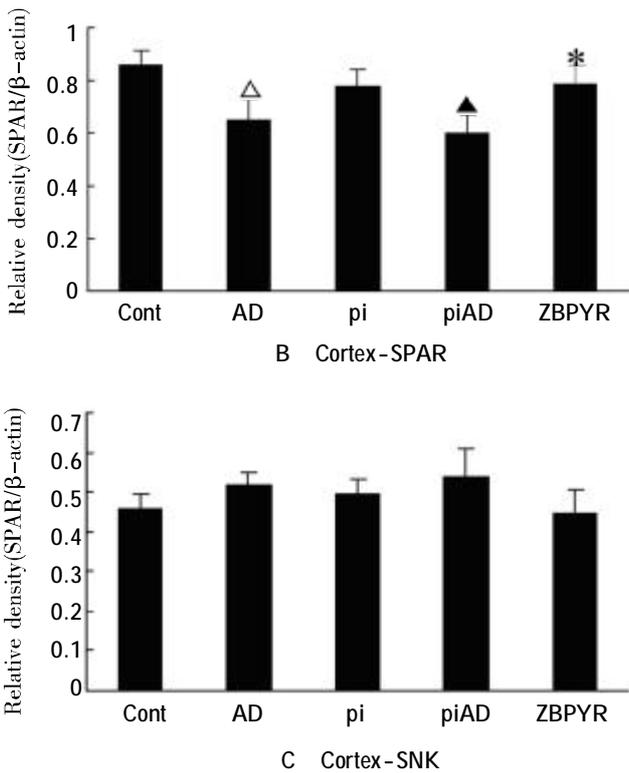
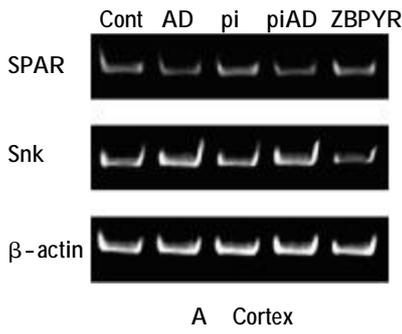


图3 各组大鼠皮质 SPAR、Snk mRNA 的表达变化

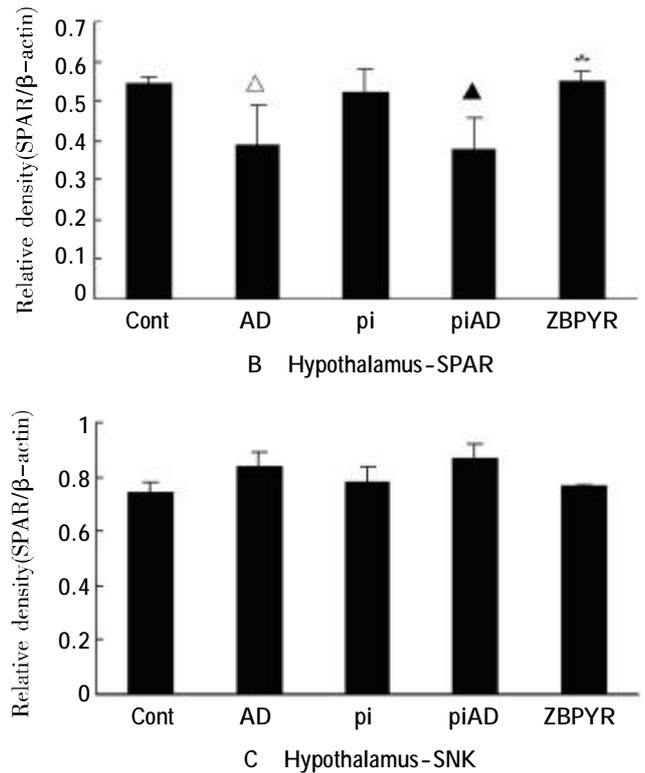
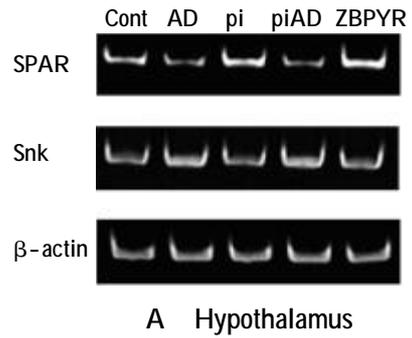


图4 各组大鼠下丘脑 SPAR、Snk mRNA 的表达变化

Pak and Sheng 指出 SPAR 能够和 Snk 相互作用。Snk 是丝氨酸/苏氨酸特异性马球样激酶家族成员之一，马球样激酶是细胞周期的一个重要调节因素。现在有研究证明神经元活化时能诱导 Snk 表达，Snk 靶向树突棘与 SPAR 的 Act2 调节域相结合使 SPAR 发生磷酸化，泛素连接酶识别磷酸化的 SPAR 后，SPAR 即被泛素修饰，随后 SPAR 经蛋白酶体途径发生降解，造成 PSD-95 等脚手架蛋白的丢失，引起树突棘形态学变化即由兴奋性高时的钝圆形变成兴奋性减弱时的狭长状，这就形成了 Snk 触发泛素化进而降解 SPAR 的 Snk-SPAR 途径<sup>[10-11]</sup>。

本实验表明海马内注射 A $\beta$ 1-40 可导致海马、纹

状体、大脑皮质和下丘脑 SPAR mRNA 表达明显下降，Snk mRNA 表达呈上调趋势。本课题组同时也进行了免疫荧光双重染色实验，结果表明，与空白对照组比较，脾阴虚痴呆组大鼠大脑 SPAR 蛋白表达明显减少，而 SNK 蛋白表达明显增加。当使用 ZBPYR 治疗后，治疗组大鼠大脑的 SPAR 蛋白表达明显增加，而 SNK 蛋白的表达明显减少(结果待发表)。说明  $\beta$  淀粉样蛋白的聚集损害了突触的功能和可塑性，其作用机制可能通过刺激神经元，诱导 Snk 表达增加，激活 Snk-SPAR 途径，使 SPAR 降解，最终导致树突棘结构和功能的异常。当使用 ZBPYR 治疗后，大鼠海马、纹状体、大脑皮质和下丘脑的 SPAR mRNA 表

达明显上调,而 Snk 的 mRNA 表达呈下调趋势,说明 ZBPYR 对突触的功能和可塑性具有改善作用,其作用机制可能通过降低神经元活性,抑制 Snk-SPAR 信号途径,从而保护树突棘使之不受  $\beta$  淀粉样蛋白的损害。这可能是 ZBPYR 防治阿尔茨海默病的机制之一。

另外,本实验发现 Snk-SPAR 信号途径不仅存在于海马,也存在于纹状体、大脑皮质和下丘脑,说明痴呆病变范围广泛,ZBPYR 通过多层次、多途径、多靶点发挥其神经元突触的保护作用。

### 参考文献

- Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, 2002, 298 (5594):789-791.
- Andrea de Bartolomeis, Germano Fiore. Postsynaptic density scaffolding proteins at excitatory synapse and disorders of synaptic plasticity: implications for human behavior pathologies. *Int Rev Neurobiol*, 2004, 59:221-254.
- 曲明阳, 战丽彬. 滋补脾阴方药对衰老大鼠学习记忆能力的影响及脑内机制. *中药药理与临床*, 2002, 18(6):32-35.
- 战丽彬, 姜婉贞, 路小光, 等. 滋补脾阴方药对大鼠树突棘保护作用的机制. *北京中医药大学学报*, 2007, 30(9):597-599, 610.
- 战丽彬, 钟军华, 路小光, 等. 滋补脾阴方药含药血清对内质网应激神经元损伤的保护作用及机制研究. *中西医结合学报*, 2007, 5(4): 445-450.
- 战丽彬, 刘莉, 宫晓洋, 等. 脾阴虚痴呆证病结合模型建立及滋补脾阴方药对其影响的实验研究. *中华中医药学刊*, 2008, 26(2):9-12.
- Tada T, Sheng M. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, 2006, 16(1):95-101.
- Ethell I, Pasquale E. Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog Neurobiol*, 2005, 75(3):161-205.
- Pak DT, Sheng M. Targeted protein degradation and synapse remodeling by an inducible protein kinase. *Science*, 2003, 302 (5649):1368-1373.
- Pak DT, Yang S, Rudolph-Correia S, et al. Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP. *Neuron*, 2001, 31(2):289-303.
- Wu LX, Sun CK, Zhang YM. Involvement of the Snk-SPAR pathway in glutamate-induced excitotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res*, 2007, 1168:38-45.

## Study on Snk-SPAR Signal Pathway in Different Brain Regions of Spleen-Yin Deficiency Alzheimer's Disease Model Rats and Neuroprotective Effects of Zibu Piyin Recipe

Zhan Libin<sup>1,5</sup>, Gong Xiaoyang<sup>2</sup>, Liu Li<sup>3</sup>, Ji Zhenghong<sup>4</sup>, Sui Hua<sup>5</sup>

(1. The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116023, China;

2. The First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116021, China;

3. Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, China;

4. Dalian Second People's Hospital, Dalian 116011, China;

5. Academy of Integrative Medicine of Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

**Abstract:** The study is aimed to observe the effect of Zibu Piyin Recipe (ZBPYR) on the expression of SPAR and Snk mRNA in different brain regions of spleen-yin deficiency Alzheimer's disease model rats. Levels of SPAR and Snk mRNA expression were detected by using RT-PCR method. The result showed that level of SPAR mRNA expression in different brain regions in AD group and spleen-yin deficiency AD group decreased significantly ( $P < 0.05$ ). And the level of Snk mRNA expression was up-regulated. The level of SPAR mRNA expression in different brain regions in ZBPYR treatment group increased significantly ( $P < 0.05$ ), while the level of Snk mRNA expression was down-regulated. It is concluded that the level of SPAR mRNA expression increased significantly while the level of Snk mRNA expression decreased after treated with ZBPYR. It indicates that ZBPYR has the function of protecting and maintaining morphology and structure of synapses and dendritic spines. The mechanism can be associated with its actions in the inhibition of the Snk-SPAR signal pathway.

**Keywords:** Spleen-yin deficiency AD, Zibu Piyin Recipe (ZBPYR), synapse, Snk-SPAR signal pathway

(责任编辑:李沙沙,责任译审:王 晶)