

. 实验研究 .

黄芪多糖对颅脑损伤大鼠学习记忆能力及
海马BDNF表达的影响

袁红刚 黄书岚 刘华明 张纯伟

【摘要】目的 探讨黄芪多糖(APS)对颅脑损伤大鼠学习记忆能力及海马组织脑源性神经生长因子(BDNF)表达的影响。**方法** 将30只成年雄性SD大鼠按随机数字表随机分为3组:假手术组、TBI组、APS组,每组10只。TBI组和APS组建立颅脑损伤大鼠模型,假手术组不建模型。假手术组、TBI组分别给予生理盐水灌胃,APS组给予APS悬液(100 mg/kg)灌胃;每天1次,持续8周。采用Morris水迷宫实验测试大鼠学习记忆能力。水迷宫实验结束后,RT-PCR与Western blot测定海马组织BDNF mRNA和蛋白表达水平。**结果** 与假手术组比较,TBI组大鼠逃避潜伏期明显延长($P<0.05$),平台象限路径百分比和平台象限时间明显缩短($P<0.05$),海马组织BDNF mRNA和蛋白表达水平明显降低($P<0.05$);与TBI组比较,APS组大鼠逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$)、平台象限路径百分比和平台象限时间明显延长($P<0.05$),海马组织BDNF mRNA和蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。**结论** APS能够减轻颅脑损伤所致的大鼠学习记忆能力减退,可能与提高BDNF表达水平有关。

【关键词】 颅脑损伤;认知功能障碍;学习;记忆;黄芪多糖;脑源性神经生长因子;大鼠

【文章编号】 1009-153X(2017)06-0419-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.1+5

Effects of astraglaus polysaccharide on learning and mermory and hippocampal BDNF expression in rats with traumatic brain injury

YUAN Hong-gang, HUANG Shu-lan, LIU Hua-ming, ZHANG Chun-wei. Department of Neurosurgery, Renming Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】 Objective To explore effects of astraglaus polysaccharide (APS) on learning and mermory and expression of brain-derived neutrotrophic factor (BDNF) in the hippocampi of rats with traumatic brain injury(TBI). **Methods** Sixty rats were randomly divided into three groups of 10 animals each3, i.e. sham operation group, ASP group, in which TBI model was established and the rats were treated by oral administration of ASP for 8 weeks and control group, in which TBI model was established and the rats were treated by oral administration of 0.9% saline solution. The learning and memory function were determined by morris water maze after the treatment and then the expression of BDNF protein and mRNA in hippocampal tissues were determined by western-blot and RT-PCR in all the rats. **Results** The escape latent period was significantly longer platform retention time and platform distance percentage were significantly shorter and the expression of BDNF in the hippocampal tissues was significantly lower in the control group than those in the sham operation group ($P<0.05$). The escape latent period was significantly shorter and platform retention time and platform distance percentage were significantly longer and the expression of BDNF in the hippocampal tissues was significantly higher in ASP group than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** It is suggested that APS can improve learning and memory functions in the rat with TBI and its mechanism may be related to upregulation of the expression of BDNF in the hippocampal tissues.

【Key words】 Traumatic brain injury; Astraglaus polysaccharide; Learning and memory; Brain-derived neutrotrophic factor

颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)致残率高,表现为认知功能障碍,且长期存在,严重影响病人的康复治疗及生活和工作^[1,2]。目前,TBI所致认知障碍的治疗尚缺乏科学有效的方法,因此开发新型药物显得尤为重要。黄芪多糖(astraglaus polysaccharide, APS)具有抗病毒、抗肿瘤、抗衰老、抗氧

化等作用^[3],对多种神经系统疾病具有改善认知功能障碍的作用^[4,5]。本文探讨APS对TBI大鼠学习记忆能力及海马组织脑源性神经生长因子(brain-derived neutrotrophic factor, BDNF)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 清洁级SD大鼠,雄性,30只,体重为150~250 g,购于武汉大学实验动物中心(生产合格证号为鄂检证字2014A0811)。按随机数字表随机分为3组:假手术组、TBI组、APS组,各10只。TBI组与APS组参照文献[6]制备TBI模型,假手

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2017.06.018
作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院神经外科(袁红刚、黄书岚、刘华明、张纯伟)
通讯作者:黄书岚, E-mail: huang-shulan@msn.com

术组不造模。假手术组、TBI 组分别给予生理盐水灌胃,APS 组给予 APS 悬液(100 mg/kg)灌胃;每天 1 次,连续持续 8 周。

1.2 大鼠学习记忆能力的检测 灌胃 8 周后,采用 Morris 水迷宫(WMT-100 型)测试大鼠的学习、记忆能力。测试包括以下内容:①定位航行试,从入水至找到安全平台的时间,测试时限定为 90 s。若大鼠在 60 s 内尚未找到平台,则将大鼠拿到平台上并使其在上面停留 30 s;若大鼠在 60 s 内找到平台,也让其在平台上停留 30 s,这样才结束一次训练。水池上空通过摄像机与监视器和计算机连接,采用水迷宫检测软件系统自动跟踪池内,连续 4 d。②空间探索试验,第 4 d,撤除平台,在原平台象限的对侧象限入水,记录其原平台所在象限的游泳距离占总距离的百分比(%),时间百分比(%)。

1.3 海马组织 BDNF mRNA 检测 水迷宫试验结束后,大鼠断头取脑,分离海马组织,加入 Trizol 裂解液(购于 Takara 公司)后匀浆,提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 的浓度。按反转录试剂盒说明书进行 cDNA 的合成:取 1 g 总 RNA,以随机引物为引物购自南京依贝仪器设备有限公司,进行逆转录反应,反应条件为 67 ℃、6 min,30 ℃、15 min,43 ℃、35 min,99 ℃(逆转录酶加热失活)、6 min。采用 RT-PCR 分别扩增 BDNF 和 β -actin,在 PCR 管中依次加入 2×Taq PCR MasterMix 25 μ l,cDNA 2 μ l,目的引物上游、下游各 1 μ l(上游引物 5'-GCA GCC TTC TTT TGT GTA ACC-3',下游引物 5'-AGA GTG ATG ACC ATC CTT TTC-3'由上海英俊生物公司合成),焦碳酸二乙酯水 21 μ l,使总体积为 50 μ l。扩增条件为 95 ℃、6 min,94 ℃、30 s,59 ℃、30 s,73 ℃、30 s,30 个循环;72 ℃、7 min。 β -actin 扩增条件为 94 ℃、5 min,94 ℃、30 s,57 ℃、30 s,72 ℃、30 s;33 个循环,72 ℃、10 min。每个样品重复 3 次。用 1%琼脂糖凝胶电泳来鉴定 PCR 扩增产物,使用成像系统照相并保存,软件进行半定量分析,以 BDNF/ β -actin 灰度比值描述。

1.4 海马组织 BDNF 蛋白表达的检测 取海马组织,加入 RIPA 裂解液(购于 Takara 公司)后匀浆,提取蛋

白后离心,取上清用于 Western blot 检测。点样后进行垂直电泳和电转膜;5%脱脂牛奶封闭,而后分别在 4 ℃中孵育 12 h;取出硝酸纤维素膜洗涤后,孵育种属特异性的第二抗体,洗涤后进行化学显影。以 BDNF/ β -actin 灰度比值描述。

1.5 统计学方法 用 SPSS 13.0 软件处理,定量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 *t* 检验,*P*<0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 APS 对 TBI 大鼠空间学习记忆能力的影响

2.1.1 水迷宫定位航行实验 各组大鼠随着训练时间延长逃避潜伏期逐渐变短,TBI 组大鼠逃避潜伏期较假手术组明显延长(*P*<0.01),APS 干预后,逃避潜伏期显著变短(*P*<0.01),见表 1。

2.1.2 水迷宫空间探索实验 TBI 组大鼠在平台象限路径百分比与平台象限停留时间较假手术组明显减少(*P*<0.01);APS 干预后,平台象限路径百分比与平台象限停留时间明显增高(*P*<0.01),见表 2。

2.2 APS 对 TBI 大鼠海马组织 BDNF 表达水平的影响 TBI 组海马组织 BDNF mRNA 和蛋白表达水平明显低于假手术组(*P*<0.05);APS 干预后,海马组织 BDNF mRNA 和蛋白表达水平明显增高(*P*<0.05),见表 3。

3 讨论

TBI 常常因为脑组织损伤及神经元坏死,导致大脑功能衰退,尤其是高级功能,主要表现为学习记忆能力下降。Morris 水迷宫^[8]最早由英国心理学家 Morris 设计,是一种通过强迫实验动物游泳来学习寻找隐藏于水中的平台的操作过程,是目前世界公认的较为客观的学习记忆功能评价方法。本文通过 Morris 水迷宫实验发现,与假手术组比较,TBI 组水迷宫平均逃避潜伏期延长,平台象限路径百分比、平台象限停留时间变短(*P*<0.05);与 TBI 组比较,APS 组水迷宫平均逃避潜伏期缩短,平台象限路径百分比、平台象限停留时间变长(*P*<0.05),提示 APS 可改

表 1 APS 对 TBI 大鼠逃避潜伏期的影响(s)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
假手术组	47.35±2.35	45.25±3.95	40.51±2.85	40.68±5.26
APS 组	54.16±2.36 [#]	51.22±2.38 [#]	45.35±3.54 [#]	42.19±4.85 [#]
TBI 组	63.65±4.28 [*]	60.34±4.19 [*]	59.43±4.16 [*]	57.43±6.46 [*]

注:与假手术组相应值比较,**P*<0.05;与 TBI 组相应值比较,#*P*<0.05;
TBI:颅脑损伤;APS:黄芪多糖

表2 APS对TBI大鼠空间探索能力的影响

组别	平台象限路径百分比	平台象限时间(s)
假手术组	(49.36±3.21)%	30.54±4.86
APS组	(42.45±5.48)% ^{*#}	25.58±5.76 ^{*#}
TBI组	(33.46±3.76)% [*]	12.75±3.23 [*]

注:与假手术组相应值比较,**P*<0.05;与TBI组相应值比较,#*P*<0.05;TBI:颅脑损伤;APS:黄芪多糖

表3 APS对TBI大鼠海马组织BDNF表达的影响

组别	RNA含量	蛋白含量
假手术组	0.96±0.02	0.98±0.09
APS组	0.69±0.06 ^{*#}	0.71±0.08 ^{*#}
TBI组	0.25±0.01 [*]	0.27±0.03 [*]

注:与假手术组相应值比较,**P*<0.05;与TBI组相应值比较,#*P*<0.05;TBI:颅脑损伤;APS:黄芪多糖;BDNF:脑源性神经营养因子

善TBI大鼠空间学习记忆能力。

BDNF是脑组织合成的多肽激素^[8],为脑内分布最为广泛的神经营养因子,以海马最为丰富,是突触可塑性的主要调节蛋白。在神经系统受到病理性损伤后,BDNF可通过调节Bax/Bcl-2蛋白的表达而抑制细胞凋亡^[9],可稳定细胞内Ca²⁺浓度^[10],以及修复受损神经元,促进神经元再生等保护神经元。TBI早期,机体通过短暂性地上调内源性BDNF,来提高神经元的抗缺血能力,促进神经元的修复和再生,调节神经结构的重建;但是这种上调尚不足以防治脑损伤及以后的细胞凋亡,随着时间的延长,内源性BDNF表达会逐渐降低^[11]。

APS药理作用包括增强免疫功能、改善心功能、抗衰老、调节血糖等多种作用^[12]。有研究表明APS对全脑缺血再灌注损伤、血管性痴呆大鼠都有一定的保护作用^[13],同时对体外培养的缺血缺氧的海马神经元也具有保护作用^[14]。文献报道APS可通过上调BDNF表达,提高老年大鼠的学习记忆水平^[15]。本研究APS干预后,海马组织BDNF mRNA及蛋白表达水平明显增高,说明APS可促进BDNF表达。

总之,APS能够减轻TBI所致的大鼠学习记忆能力减退,可能与提高BDNF表达水平有关。

【参考文献】

[1] Corrigan JD, Selassie AW, Orman JA. The epidemiology of traumatic brain injury [J]. J Head Trauma Rehabil, 2010, 25

(2):72-80.

[2] Dean PJ, Sterr A. Long-term effects of mild traumatic brain injury on cognitive performance [J]. Front Hum Neurosci, 2013, 7: 30.

[3] Horneman G, Emanuelson I. Cognitive outcome in children and young adults who sustained severe and moderate traumatic brain injury 10 years earlier [J]. Brain Inj, 2009, 23 (11): 907-914.

[4] 万朋,高俊涛,刘志洋. 黄芪多糖药理作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2010,31(6):351-355.

[5] 费洪新,高音,孙丽慧. 黄芪多糖对阿尔茨海默病小鼠海马组织的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(16):4426-4429.

[6] Luo T, Qin J, Liu M, et al. Astragalus polysaccharide attenuates lipopolysaccharide induced inflammatory responses in microglial cells: regulation of protein kinase B and nuclear factor B signaling [J]. Inflamm Res, 2015, 64(3-4): 205-212.

[7] 郭新荣,王瑞辉,李娜,等. 颅脑损伤动物模型制备及脑组织中神经生长因子、脑源性神经营养因子变化的实验研究[J]. 创伤外科杂志,2015,25(3):256-259.

[8] Morris C. The evolution of flying animals [J]. Science, 1881, 2(74): 552-554.

[9] 谭永星,李雪梅,文素芳,等. 不同时间脑室注射BDNF对大鼠脑缺血再灌注损伤氧化应激及神经细胞凋亡的影响[J]. 第四军医大学学报,2009,30(18):1681-1684.

[10] Cheng B, Mattson MP. NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insult [J]. Brain Res, 1994, 640(1-2): 56-67.

[11] 王敏,邓世雄. 大鼠脑外伤后BDNF的表达及其死后稳定性的研究[J]. 重庆医科大学学报,2009,34:1521-1523.

[12] 郭琰,魏玉苗. 黄芪在脑血管病中的应用研究进展[J]. 山西中医,2007,23(1):72-74.

[13] 王振富,杨付明. 黄芪多糖对大鼠全脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国老年学杂志,2016,36(5):1059-1060.

[14] 郑龙,武胜昔,许杰华. 黄芪对原代培养海马神经元的作用及其对抗缺血缺氧损伤的机制[J]. 第四军医大学学报,2009,30(16):1452-1456

[15] 姚惠,顾丽佳,郭建友. 黄芪多糖改善大鼠的学习记忆水平及其机制研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(11):2071-2075.

(2016-12-24收稿,2017-03-22修回)