

生慧汤对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠下丘脑区 生物钟基因 Bmal1 及海马 IL-6, TNF- α 的影响

张美娅, 王平, 游秋云, 丁莉*
(湖北中医药大学, 武汉 430065)

[摘要] **目的:** 通过观察生慧汤对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠学习记忆、下丘脑区生物钟基因 Bmal1 及海马白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的影响, 探索生慧汤改善学习记忆和睡眠障碍的可能机制。**方法:** 将实验小鼠随机分为模型组、正常组、褪黑素组、生慧汤高剂量组和生慧汤低剂量组。采用自主活动分析系统检测各组小鼠自主活动; 采用 Morris 水迷宫检测各组小鼠学习能力及空间记忆能力; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测各组小鼠下丘脑区生物钟基因 Bmal1 mRNA 表达, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测各组小鼠 Bmal1 蛋白表达; 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测小鼠海马区 IL-6、TNF- α 含量; 采用皮尔森 (Pearson) 分析方法分析 IL-6、TNF- α 与 Bmal1 的相关性。**结果:** 自主活动结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠活动次数和活动路程显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠活动次数和活动路程均明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$), 生慧汤低剂量组无显著性差异。Morris 水迷宫结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠上平台潜伏期与游泳总路程显著延长 ($P < 0.01$), 穿越平台次数与目标象限时间显著减少 ($P < 0.01$), 第 1 次抵原平台时间明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组小鼠上平台潜伏期与游泳总路程明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$), 穿越平台次数与目标象限时间明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$), 第 1 次抵原平台时间明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$)。Real-time PCR 结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠 Bmal1 mRNA 表达上调; 与模型组比较, 各给药组小鼠 Bmal1 mRNA 表达下调。Western blot 结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠 Bmal1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 褪黑素组、生慧汤高、低剂量组 Bmal1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。ELISA 结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠 IL-6、TNF- α 含量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 IL-6、TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.01$)。Pearson 分析结果显示, IL-6、TNF- α 与 Bmal1 具有相关性, 且呈负相关关系。**结论:** 生慧汤可能通过上调下丘脑区 Bmal1 基因的表达来降低海马区炎症因子 IL-6、TNF- α 蛋白含量, 从而改善阿尔兹海默症 (AD) 和昼夜节律紊乱。

[关键词] 生慧汤; 阿尔兹海默症 (AD); 生物钟基因 1 (Bmal1); 炎症因子

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)20-0007-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192001

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190701.1648.001.html>

[网络出版时间] 2019-07-02 17:12

Effect of Shenghuitang on Bmal1 in Hypothalamus and IL-6 and TNF- α in Hippocampus of APP/PS1 Double Transgenic Dementia Model Mice

ZHANG Mei-ya, WANG Ping, YOU Qiu-yun, DING Li*
(Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Shenghuitang on learning and memory, biological clock gene [brain and muscle arnt-like 1 (Bmal1)] in hypothalamus and interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in hippocampus of APP/PS1 double transgenic dementia model mice, in order to explore the possible mechanism of Shenghuitang to improve learning and memory and sleep disorders. **Method:** The experimental mice were randomly divided into model group, blank control group, melatonin group, high-dose Shenghuitang group and low-dose Shenghuitang group. Autonomic activity analysis system was used to detect the

[收稿日期] 20190301(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703972)

[第一作者] 张美娅, 硕士, 从事中药药理学和毒理学研究, E-mail: 545357895@qq.com

[通信作者] * 丁莉, 博士, 副教授, 从事老年病防治及失眠药物研究, E-mail: 17767153@qq.com

autonomic activities of mice in each group. Morris water maze was used to detect the learning ability and spatial memory ability of each group. quantitative real-time fluorescence polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the expression of Bmal1 mRNA in the hypothalamic area of mice. Western blot was used to detect the expression of Bmal1 protein in each group. The content of inflammatory factors IL-6 and TNF- α in hippocampus of mice was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The correlation between inflammatory factors IL-6, TNF- α and Bmal1 gene was analyzed by Pearson analysis. **Result:** The results of voluntary activities showed that compared with the control group, the number of activities and activity distance of the model group were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the number of activities and activity distance of the mice in each drug group increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$), there was no significant difference in the low dose group of Shenghuitang. Morris water maze results showed that compared with the control group, the platform latency and swimming total distance were significantly prolonged in the model group ($P < 0.01$), and the number of crossing platforms and target quadrant time was significantly reduced ($P < 0.01$). The original platform time increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the platform latency and total swimming distance were significantly decreased in each group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the number of crossing platforms and target quadrant time increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the time to the original platform was significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Real-time PCR results showed that the expression of Bmal1 mRNA was up-regulated in the model group compared with the control group. Compared with the model group, the mRNA expression of Bmal1 gene was down-regulated in each group. Western blot results showed that compared with the control group, the expression of Bmal1 protein in the model group was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, Bmal1 protein expression was significantly decreased in each group ($P < 0.01$). The results of ELISA showed that the levels of IL-6 and TNF- α in the model group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of IL-6 and TNF- α in the drug group were significantly lower ($P < 0.01$). Pearson analysis showed that IL-6, TNF- α and Bmal1 were correlated and negatively correlated. **Conclusion:** Shenghuitang may reduce the levels of inflammatory factors IL-6 and TNF- α in hippocampus by up-regulating the expression of Bmal1 gene in hypothalamic region, thus improving Alzheimer's disease (AD) and circadian rhythm disorders.

[**Key words**] Shenghuitang; Alzheimer's disease (AD); Bmal1; inflammatory factor

阿尔兹海默症(AD)是一种常见的神经退行性疾病,该病起病隐匿,呈慢性不可逆性,且随着年龄的增长发病率逐渐增高。随着全球人口老龄化发展,尤其是中国的人口老龄化,AD的发病率逐渐上升,给家庭和社会带来极大的负担。大量研究表明,一系列AD动物模型和AD患者均有不同程度的昼夜节律紊乱^[1]。AD患者早期出现轻微的睡眠-觉醒周期紊乱,随着AD病程的加快、病情的发展,在中、晚期会出现严重的睡眠障碍^[2]。睡眠障碍可能是AD发病的危险因素,并加快AD的病理进程^[3]。褪黑素作为机体调节睡眠-觉醒周期的重要内源性物质,具有调节生物钟,重建和稳定机体生物节律的作用^[4],越来越多的研究证实,褪黑素能通过调节睡眠相关的神经元细胞和脑分泌物来改善失眠^[5],目前已广泛应用于睡眠障碍的治疗。

研究表明,生慧汤可改善睡眠障碍和学习记忆障碍^[6-7]。生慧汤出自清代名医陈士铎《辨证录·健

忘门》,具有交通心肾、滋补肝肾、化痰开窍、调养心神的功效,主治健忘与失眠^[5]。本实验采用自主活动实验视频分析系统检测各组小鼠自主活动, Morris水迷宫检测小鼠学习记忆能力,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测下丘脑区生物钟基因Bmal1 mRNA表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Bmal1蛋白含量,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测海马区炎症因子白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量,皮尔森(Pearson)方法分析Bmal1基因与炎症因子IL-6, TNF- α 的相关性,探讨生慧汤改善AD的作用机制,为中医药防治AD提供实验依据和思路方法。

1 材料

1.1 动物 5月龄SPF级雄性APP/PS1双转基因AD模型小鼠,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK(京)2014-0004。实验动物均饲养在湖北中医药大学老年医学研究所,所有动物

均自由摄食、饮水,饲料和垫料均经紫外线照射灭菌,饲养房间温度 23 ~ 26 ℃,相对湿度 50% ~ 70%,房间设置独立通风系统。本研究所有动物实验经湖北中医药大学伦理委员会批准,所有实验操作过程严格按照实验动物管理与保护相关准则进行。

1.2 药物与试剂 生慧汤由熟地黄、山茱萸、远志、酸枣仁、柏子仁(去油)、茯神、人参片、石菖蒲、白芥子组成,购于湖北中医药大学附属医院药房,所有药材经湖北中医药大学游秋云教授鉴定均为正品。将药材加 8 倍量水浸泡于圆底烧瓶 1 h 后,加热煮沸 1 h,滤取药液后将再加 5 倍量水继续煮沸 1 h,滤取药液,合并 2 次药液,用旋转蒸发仪浓缩制成相当于生药 2.7 g·mL⁻¹,置 4 ℃ 冰箱储存备用。褪黑素(汤臣倍健股份有限公司,批号 20180102D);逆转录试剂盒(宝生物工程有限公司,批号 00395268);trizol(美国 Life Technology 公司,批号 15596026);SYBR Premix Ex Taq^[TM](大连 TaKaRa 公司,批号 AK8603);RIPA 裂解液(碧云天股份有限公司,批号 P0013B);蛋白 marker(北京全式金生物技术有限公司,批号 DM111);PVDF 膜(美国 Millipore 公司,批号 IPVH00010);兔甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(杭州贤至生物有限公司,批号 AB-P-R001);兔 ARNTL 多克隆抗体(美国 ABclonal 公司,批号 A17334);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BA1054);ECL 底物液(美国 Thermo 公司,批号 NCI5079);小鼠白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子(TNF)-α ELISA 试剂盒(伊莱瑞特生物科技有限公司,批号分别为 E-EL-M0044c, E-EL-M0049c);小鼠 β-肌动蛋白(β-actin),Bmal1 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成并经质量检测,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列	长度/bp
β-actin	上游 5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3'	171
	下游 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'	
Bmal1	上游 5'-CACTGACTACCAAGAAAGTATG-3'	344
	下游 5'-ATCCATCTGCTGCCCTGAGA-3'	

1.3 仪器 自发活动分析系统(淮北正华生物仪器设备有限公司);DMS-2 型 Morris 水迷宫(中国

医学科学院药物研究所);LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械有限公司);KDC-2046 型低速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);CFX96 型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(联想生物技术有限公司);DYY-7C 型电泳仪, DYCZ-40 型转膜仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 5 月龄 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠 40 只, C57BL/6J 小鼠 10 只,适应性饲养 1 周后,按照随机数表将 AD 模型小鼠随机分为 4 组,分别为模型组,褪黑素组(0.78 mg·kg⁻¹·d⁻¹),生慧汤高、低剂量组(27.0, 13.5 g·kg⁻¹·d⁻¹),每组 10 只。正常组为 10 只同月龄相同背景的 C57BL/6J 小鼠。适应性饲养结束后,分别对各组小鼠进行实施灌胃治疗,每日给药 1 次,连续灌胃 4 周。以上所有剂量均根据人与动物体表面积折算的等效剂量(70 kg 的人与 20 g 的小鼠等效剂量比值为 0.002 6)换算而来。

2.2 自主活动检测 末次给药结束后 24 h,进行小鼠自主活动检测。自主活动分析系统是用于检测小鼠进入陌生密闭环境中的自发活动及状态,整个系统由实验箱、图像采集卡及视频分析系统等组成,实验箱箱体为边长 25 cm 的正方体密闭箱体。实验前打开自主活动分析系统,设置好程序,实验时将小鼠放入实验箱内,让其适应 2 min,适应后点击分析系统,记录 3 min 内小鼠的活动次数及活动路程。

2.3 Morris 水迷宫检测 Morris 水迷宫系统主要由圆形水池、圆形平台、自动录像及分析系统 3 部分组成。水池分为 4 个象限,将小平台放入目标象限为第 3 象限的中间。实验前预先将水池中灌入温水,使水面高出平台 2 cm,由于本实验小鼠皮毛为黑色,故需在水池中加入奶粉并搅拌均匀,池水呈乳白色,使自动录像及分析系统能准确识别小鼠的游泳轨迹。训练时,每天分别将小鼠从第 1 象限、第 2 象限、第 4 象限中间点使其头部面向池壁放入水中,若小鼠未在设定的 90 s 内找到平台,则将其引至平台,待 10 s。每天训练 3 次,连续训练 5 d,第 6 天为定位航行实验,记录小鼠上平台潜伏期。第 7 天为空间探索实验,将平台撤除,记录 90 s 内小鼠的游泳轨迹,并记录小鼠在第 1 次抵达原平台的时间和 90 s 内穿越平台的次数及目标象限时间。

2.4 Real-time PCR 检测 Bmal1 mRNA 的表达 行为学检测结束后将小鼠断头处死,于冰上取出大脑,剥离下丘脑和海马,置于超低温冰箱 -80 ℃ 保存。

将下丘脑研碎后按照文献方法^[8]进行总 mRNA 提取,再按逆转录试剂盒中说明书的步骤进行逆转录,反应条件为 42 ℃ 60 min,70 ℃ 5 min。每个步骤均在超净台上操作,保证整个操作过程处于无菌环境。将逆转录后的 cDNA 按 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒添加完试剂后放入 Real-time PCR 仪中进行反应,反应条件为 95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,95 ℃ 10 s,共进行 40 个循环。计算 ΔC_t 值及 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行数据分析。

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Bmal1 蛋白的表达 取下丘脑组织,经 RIPA 裂解液裂解 30 min,4 ℃ 下 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液,测蛋白浓度,计算上样量。制备电泳胶,200 mA 恒流转 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉的 TBST 浸泡 PVDF 膜,封闭 2 h。加入一抗 GAPDH (1 : 1 000),Bmal1 (1 : 2 000),4 ℃ 孵育过夜。TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5 次,每次 5 min,加入二抗 (1 : 5 万),37 ℃ 摇床孵育 2 h,洗涤 PVDF 膜,方法同上,ECL 显色,放入显影液显影,定影液定影,冲洗胶片,晾干胶片,扫描胶片,用 BandScan 分析胶片灰度值,得到 Bmal1 蛋白条带。

2.6 ELISA 检测 IL-6, TNF- α 含量 将超低温冰箱中的海马和 IL-6, TNF- α 试剂盒取出,恢复至室温。将海马研碎后加入 9 倍组织质量的 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (PBS) 后迅速匀浆,取上清液,严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测步骤进行操作,将待测样品放入酶标仪中测定吸光度 A。

2.7 Pearson 相关性分析 采用 Pearson 相关性分析 IL-6, TNF- α 含量与 Bmal1 基因的相关性。

2.8 统计学处理 各实验所测数据均采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析进行检验,t 检验做显著性比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。Pearson 相关性分析 IL-6, TNF- α 含量与 Bmal1 基因的相关性,把 $P < 0.05$ 作为检验标准,表示他们之间的差异具有显著性差异。

3 结果

3.1 对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠自主活动的影响 与正常组比较,模型组小鼠活动次数和活动路程显著减少 ($P < 0.01$);与模型组比较,褪黑素组、生慧汤高剂量组小鼠活动次数和活动路程均明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$),但生慧汤低剂量组无显著性差异。见表 2。

表 2 生慧汤对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠自主活动的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Shenghuitang on autonomic activity of APP/PS1 double transgenic AD model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	活动次数/次	活动路程/cm
正常	-	17.10 ± 3.53	602.20 ± 72.80
模型	-	8.30 ± 3.35 ¹⁾	331.64 ± 88.24 ¹⁾
褪黑素	7.8 × 10 ⁻⁴	15.14 ± 3.52 ³⁾	533.31 ± 84.78 ³⁾
生慧汤	27	14.30 ± 3.10 ³⁾	411.63 ± 58.30 ²⁾
	13.5	10.60 ± 2.76	357.49 ± 63.93

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 3,4,6,7 同)。

3.2 Morris 水迷宫实验

3.2.1 对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠定位航行实验的影响 与正常组比较,模型组上平台潜伏期与游泳总路程显著延长 ($P < 0.01$);与模型组比较,褪黑素组、生慧汤高、低剂量组上平台潜伏期与游泳总路程明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 生慧汤对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠定位航行实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Shenghuitang on navigation test of APP/PS1 double transgenic AD model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	上平台潜伏期/s	游泳总路程/cm
正常	-	38.56 ± 10.70	338.58 ± 68.39
模型	-	65.11 ± 14.70 ¹⁾	893.01 ± 58.29 ¹⁾
褪黑素	7.8 × 10 ⁻⁴	37.49 ± 11.27 ³⁾	446.58 ± 72.21 ³⁾
生慧汤	27	48.23 ± 10.04 ³⁾	779.10 ± 98.27 ³⁾
	13.5	50.92 ± 12.27 ²⁾	817.95 ± 45.98 ²⁾

3.2.2 对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠空间探查实验的影响 与正常组比较,模型组穿越平台次数与目标象限时间显著减少 ($P < 0.01$),第 1 次抵原平台时间明显增加 ($P < 0.05$);与模型组比较,褪黑素组、生慧汤高、低剂量组穿越平台次数与目标象限时间明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$),第 1 次抵原平台时间明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

3.3 对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠下丘脑 Bmal1 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠 Bmal1 mRNA 表达下调;与模型组比较,褪黑素组、生慧汤高、低剂量组小鼠 Bmal1 mRNA 表达上调。见表 5。

3.4 对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠下丘脑 Bmal1 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组

表 4 生慧汤对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠空间探查实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Shenghuitang on space exploration test of APP/PS1 double transgenic AD model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

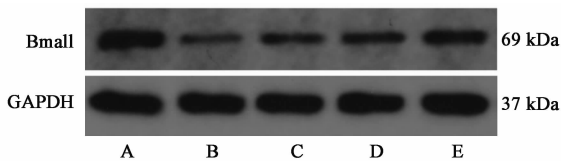
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	穿越平台次数 /次	目标象限时间 /s	第 1 次抵原平台时间/s
正常	-	8.20 ± 1.64	35.10 ± 5.85	8.91 ± 3.54
模型	-	2.50 ± 1.17 ¹⁾	10.32 ± 3.95 ¹⁾	40.01 ± 6.71 ¹⁾
褪黑素	7.80 × 10 ⁻⁴	6.30 ± 1.27 ³⁾	28.57 ± 5.12 ³⁾	20.76 ± 4.49 ³⁾
生慧汤	27	4.30 ± 0.7 ³⁾	20.42 ± 3.69 ²⁾	27.26 ± 3.61 ³⁾
	13.5	4.02 ± 0.94 ²⁾	20.20 ± 2.98 ²⁾	34.39 ± 4.81 ²⁾

表 5 生慧汤对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠下丘脑 Bmal1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Shenghuitang on mRNA expression of Bmal1 mRNA in hypothalamus of APP/PS1 double transgenic AD model mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bmal1
正常	-	6.77 ± 0.46
模型	-	7.66 ± 0.31
褪黑素	7.8 × 10 ⁻⁴	6.82 ± 0.49
生慧汤	27	6.90 ± 0.45
	13.5	7.09 ± 0.46

小鼠 Bmal1 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，褪黑素组、生慧汤高、低剂量组 Bmal1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。见图 1 和表 6。



A. 正常组；B. 模型组；C. 生慧汤低剂量组；D. 生慧汤高剂量组；E. 褪黑素组

图 1 小鼠 Bmal1 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of expression of Bmal1 in mice

表 6 生慧汤对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠下丘脑 Bmal1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 6 Effect of Shenghuitang on contents of expression of Bmal1 protein in hippocampus of APP/PS1 double transgenic AD model mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bmal1/GAPDH
正常	-	1.203 ± 0.152
模型	-	0.211 ± 0.087 ¹⁾
褪黑素	7.8 × 10 ⁻⁴	0.399 ± 0.093 ³⁾
生慧汤	27	0.510 ± 0.124 ³⁾
	13.5	0.657 ± 0.147 ³⁾

3.5 对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠海马 IL-6 和 TNF- α 含量的影响 与正常组比较，模型组小鼠 IL-6、TNF- α 含量显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，褪黑素组、生慧汤高、低剂量组 IL-6、TNF- α 含量显著降低 ($P < 0.01$)。见表 7。

表 7 生慧汤对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠海马 IL-6 和 TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effect of Shenghuitang on contents of IL-6 and TNF- α in hippocampus of APP/PS1 double transgenic AD model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-6	TNF- α
正常	-	942.54 ± 89.88	421.95 ± 66.11
模型	-	2 039.66 ± 125.35 ¹⁾	868.19 ± 54.19 ¹⁾
褪黑素	7.8 × 10 ⁻⁴	1 177.74 ± 69.62 ³⁾	579.62 ± 54.86 ³⁾
生慧汤	27	1 568.81 ± 43.00 ³⁾	689.53 ± 61.47 ³⁾
	13.5	1 844.62 ± 83.66 ³⁾	743.84 ± 76.88 ³⁾

3.6 Pearson 相关性分析结果 散点图无直线趋势，Spearman 相关系数 $r_1 = -0.864, r_2 = -0.881, P_1 = 0.026, P_2 = 0.020$ ，可以认为炎症因子 IL-6、TNF- α 与生物钟基因 Bmal1 具有相关性，且呈负相关关系，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

4 讨论

迄今为止，大量的研究发现，睡眠节律紊乱与 AD 具有密不可分的联系，存在紧密的交互作用。有研究学者对 AD 模型小鼠进行慢性睡眠剥夺，检测发现睡眠剥夺可加速小鼠脑内的 tau 蛋白磷酸化^[9]和 β 淀粉样蛋白 ($A\beta$) 异常沉积，还可损伤神经突触，导致学习记忆障碍^[10-11]。还有文献报道，睡眠障碍与 AD 之间存在密切的神经发生关联^[12]。故在研究 AD 的发病机制时也应该探讨与睡眠障碍的相互作用机制。

本实验选用的 AD 模型为 5 月龄的 APP/PS1 双转基因小鼠模型，主要用于研究昼夜节律紊乱的 AD 模型。实验结果显示，APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠中枢神经受到抑制，生物钟节律基因 Bmal1 表达降低，而生慧汤可改善痴呆小鼠的昼夜节律紊乱，其机制可能与上调 Bmal1 基因的表达量有关。

慢性炎症反应是 AD 的重要病理特征之一。炎症反应是机体应对损伤、感染等多种刺激而产生的一种分子、细胞保护机制。当机体出现外伤刺激或炎症反应时，小胶质细胞被激活，不仅与神经元直接接触，发挥吞噬细胞的作用，还会分泌一些炎症因

子,如 IL-1,IL-6,TNF- α ,NO 等^[13-15],这些炎症因子会激活星形胶质细胞,产生更多的促炎因子^[16]。本课题组前期研究发现,睡眠剥夺后小鼠脑中的炎症反应会加重^[17]。本实验结果表明,APP/PS1 双转基因小鼠的炎症因子 IL-6,TNF- α 的蛋白含量显著升高,褪黑素和生慧汤均可降低炎症因子的蛋白含量,说明生慧汤可能是通过降低脑内的炎症因子含量来改善睡眠障碍和 AD。

研究发现,海马小胶质细胞中的生物钟基因是呈现节律性的,其释放的炎症因子也是呈现节律性的表达^[18]。文献表明,敲除小鼠体内的 Bmal1 基因会激活星形胶质细胞,加重炎症反应,多种促炎细胞因子增加,还可发现海马和皮质会出现严重的星形胶质细胞增生^[19]。本实验采用 Pearson 相关性分析,结果表明炎症因子 IL-6,TNF- α 与生物钟基因 Bmal1 具有相关性,且呈负相关关系,进一步说明生慧汤可能是通过上调 Bmal1 基因的表达,改善昼夜节律紊乱,从而降低炎症因子 IL-6,TNF- α 含量,起到脑保护的作用,改善 AD 的症状。

[参考文献]

[1] 方凌燕,刘衍宇,关俊文.阿尔茨海默病与生物节律相互关系的研究进展[J].中国老年学杂志,2011,31(8):1486-1487.

[2] Mortimer J A, Ebbitt B, JUN S P, et al. Predictors of cognitive and functional progression in patients with probable Alzheimer's disease [J]. Neurology, 1992, 42(9):1689-1696.

[3] Lee D, Heo S H, Yoon S S, et al. Sleep disturbances and predictive factors in caregivers of patients with mild cognitive impairment and dementia [J]. J Clin Neurol, 2014, 10(4):304-313.

[4] 张天宝,侯鹏高.褪黑素生理活性及其作用机制的研究进展[J].齐齐哈尔医学院学报,2015,36(11):1671-1673.

[5] 张如意,王平,张舜波,等.褪黑素治疗睡眠障碍的作用机制探讨[J].中华中医药学刊,2018,36(2):308-310.

[6] 丁莉,游秋云,王平.生慧汤对 APP/PS1 双转基因痴呆小鼠自主活动昼夜节律的影响及对下丘脑生物钟基因的调节[J].时珍国医国药,2017,28(2):301-304.

[7] 周敏,白兰,周丽娜,等.生慧汤对学习记忆障碍模型

小鼠的影响[J].中医药信息,2009,26(6):54-55.

[8] 丁莉.昼夜节律的中医理论探讨及生慧汤对 APP/PS1 痴呆小鼠昼夜节律的影响[D].武汉:湖北中医药大学,2016.

[9] 于修芳,雷霞,曹玲,等.补阳还五汤对阿尔茨海默病小鼠海马凋亡因子及学习记忆能力的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(3):109-113.

[10] Rothman S M, Herdener N, Frankola K A, et al. Chronic mild sleep restriction accentuates contextual memory impairments, and accumulations of cortical $A\beta$ and pTau in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Brain Res, 2013, 1529:200-208.

[11] Di Meco A, Joshi Y B, Praticò D. Sleep deprivation impairs memory, tau metabolism, and synaptic integrity of a mouse model of Alzheimer's disease with plaques and tangles [J]. Neurobiol Aging, 2014, 35(8):1813-1820.

[12] 游秋云,姜霞,黄攀攀,等.阿尔茨海默病与睡眠障碍的神经发生关联机制研究进展[J].中华中医药杂志,2017,31(10):235-238.

[13] Streit W J, Mrak R E, Griffin W S T. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective [J]. J Neuroinflammation, 2004, 1(1):14-20.

[14] 李娟,姚遥,韩怀钦,等.苦参碱对 LPS 诱导的阿尔茨海默病小鼠模型学习记忆功能和脑内神经炎症的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(24):134-139.

[15] 顾欣如,方思月,任维,等.黄连解毒汤在阿尔茨海默病模型大鼠体内药代动力学及对脑内炎症微环境改善的研究[J].中国中药杂志,2018,43(14):3006-3011.

[16] 张茹兰,黄秀芳,陶彦谷,等.黄连解毒汤对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 HT22 细胞 NF- κ B 活化及炎症因子水平的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(13):159-165.

[17] 尹超,游秋云,张美娅,等.生慧汤对慢性睡眠剥夺小鼠学习记忆及海马 IL-6, TNF- α , COX-2 基因表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(1):96-100.

[18] Fonken L K, Frank M G, Kitt M M, et al. Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock [J]. Brain Behav Immun, 2015, 45:171-179.

[19] Musiek E S, Weaver D R, Holtzman D M, et al. Circadian clock proteins regulate neuronal redox homeostasis and neurodegeneration [J]. J Clin Invest, 2013, 123(12):5389-5400.

[责任编辑 周冰冰]