

山楂叶总黄酮对血管性痴呆大鼠学习记忆 及海马 AChE, ChAT 活性的影响

毛晓霞, 苗光新, 吴晓光*, 陈志宏

(河北省中药研究与开发重点实验室, 承德医学院, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的: 探讨山楂叶总黄酮(total flavone of Hawthorn leaf, TFHL)对血管性痴呆大鼠空间学习记忆障碍的治疗作用及机制。方法: 健康雄性 SD 大鼠 64 只, 随机分为假手术组(sham control group)、模型组(model group)、TFHL 70, 140 mg·kg⁻¹及银杏叶片组(3.5 mg·kg⁻¹), 每组 16 只。采用永久性双侧颈总动脉结扎法制备血管性痴呆大鼠模型, TFHL 70, 140 mg·kg⁻¹组连续给药 36 d。采用 Morris 水迷宫评价大鼠的空间学习记忆能力, 分光光度比色法检测大鼠海马乙酰胆碱酯酶(AChE)和乙酰胆碱转移酶(ChAT)活性。结果: 与假手术组比较, 血管性痴呆模型组大鼠学习记忆能力显著降低, 大鼠逃避潜伏期明显延长($P < 0.05$), 穿越平台区次数显著减少($P < 0.05$), 平台象限游泳距离百分比显著降低($P < 0.05$); ChAT 活性明显降低($P < 0.05$), AChE 活性显著增强($P < 0.05$)。TFHL 及银杏叶片能改善血管性痴呆大鼠学习记忆能力, 缩短大鼠逃避潜伏期($P < 0.05$), 增加大鼠穿越平台次数及平台象限游泳距离百分比($P < 0.05$), 增强 ChAT 活性($P < 0.05$), 降低 AChE 活性($P < 0.05$)。结论: TFHL 可通过提高海马 ChAT 活性、降低 AChE 活性改善血管性痴呆大鼠海马胆碱能神经系统的功能, 从而改善血管性痴呆大鼠的学习记忆功能。

[关键词] 山楂叶总黄酮; 血管性痴呆; 乙酰胆碱转移酶; 乙酰胆碱酯酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0167-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170167

Effect of Total Flavone of Hawthorn Leaves on Activity of Learning and Memory and AChE and ChAT in Brian of Vascular Dementia Rat Model

MAO Xiao-xia, MIAO Guang-xin, WU Xiao-guang*, CHEN Zhi-hong

(Hebei Province Key Laboratory of Research and Development for Chinese Materia Medica,
Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the total flavone of Hawthorn Leaves (TFHL) on the therapeutic effect and mechanism of spatial learning and memory impairment of the vascular dementia rat. **Method:** Sixty-four SD male rats were randomly divided into sham control group, model group, TFHL 70, 140 mg·kg⁻¹ group, Sixteen in each group. Permanent bilateral carotid artery ligation was used to prepare vascular dementia model. TFHL 70, 140 mg·kg⁻¹ group were given for consecutive 36 days. Morris water maze was used for evaluation of learning and memory abilities of rats. Colorimetric detection was used to detect hippocampus acetyl cholinesterase (AChE), choline acetyltransferase (ChAT) content. **Result:** Compared with the sham control group, in vascular dementia model group learning and memory capacity significantly reduced, escape incubation period extended significantly ($P < 0.05$), the number of crossing the platform area significantly reduced ($P < 0.05$), significantly reduced percentage of target quadrant distance ($P < 0.05$); ChAT activity was significantly decreased ($P < 0.05$), AChE activity was significantly increased ($P < 0.05$). TFHL and Yinxingye pian could improve learning and memory

[收稿日期] 20130605(008)

[基金项目] 河北省卫生厅重点课题(20120160);河北省教育厅高等学校科学研究计划(QN2014103)

[第一作者] 毛晓霞, 讲师, 从事中药研究与开发, Tel:0314-2291908, E-mail:mao0505@163.com

[通讯作者] * 吴晓光, 高级实验师, 从事中药治疗脑血管病的基础研究, Tel:0314-2291217, E-mail:ewxg@qq.com

ability, shorten the the rats escape latency ($P < 0.05$), increase the number of across the platform and the platform quadrant percentage of swimming distance ($P < 0.05$), enhance ChAT activity ($P < 0.05$), reduce AChE activity ($P < 0.05$). **Conclusion:** TFHL can improve learning and memory impairment of vascular dementia rat, may enhance ChAT activity, reduce the activity of AChE, increase the acetylcholine content of brain tissue, restore cholinergic nerve system function related to chronic cerebral ischemia in rats.

[**Key words**] total flavone of hawthorn leaves; vascular dementia; choline acetyltransferase; acetylcholinesterase

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是各种脑血管病常见的后遗症, 临床主要表现为严重的认知和记忆功能减退, 同时伴有进行性记忆、智力、语言障碍, 严重影响患者身心健康, 给家庭和社会带来沉重的负担。乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 是与学习记忆密切相关的神经递质, 海马组织内乙酰胆碱含量持续性减少是血管性痴呆发生、发展的主要原因^[1]。山楂叶总黄酮 (total flavone of Hawthorn leaf, TFHL) 是从山楂树叶中提取分离的黄酮类化合物, 具有较强的抗氧化、抑制细胞凋亡的作用^[2-3]。但 TFHL 对血管性痴呆导致的学习记忆障碍是否具有保护作用尚不清楚。本研究采用永久性双侧颈总动脉结扎法建立大鼠血管性痴呆模型, 观察 TFHL 对模型大鼠学习记忆能力及海马乙酰胆碱酯酶 (acetyl cholinesterase, AChE)、乙酰胆碱转移酶 (choline acetyltransferase, ChAT) 的影响, 探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级成年雄性 Spague-Dawley 大鼠 80 只, 体质量 250 ~ 300 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号 SCXK (京) 2006-2009。饲养于承德医学院二级实验动物中心, 室温维持在 18 ~ 24 °C, 相对湿度 40% ~ 60%, 自然光照, 自由进食进水。

1.2 药物 摘采承德本地山楂树叶 *Crataegus pinnatifida*, 由河北省中药研究与开发重点实验室商亚珍研究员鉴定, 采用水煎醇沉法提取 TFHL: 山楂树叶粉碎后, 加入 8 倍体积的 60% 乙醇, 80 °C 回流提取 3 h, 过滤; 残渣另用 60% 乙醇清洗 3 遍, 同滤液合并后浓缩成 35 g · L⁻¹ 备用 (TFHL 的纯度为 65.3%)。

1.3 试剂与仪器 AChE, ChAT 试剂盒 (南京建成生物工程有限公司), Morris 水迷宫 (中国医学科学院药物研究所), Multiskan MK3 型酶联仪 (芬兰 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备及分组给药 大鼠适应性喂养 1

周后, 随机分为假手术组、模型组、TFHL 70 mg · kg⁻¹ 组、TFHL 140 mg · kg⁻¹ 组和银杏叶片 3.5 mg · kg⁻¹ 组, 每组 16 只。30 mg · kg⁻¹ 戊巴比妥钠 ip 麻醉, 颈部正中矢状切口, 钝性分离双侧颈总动脉, 模型组、TFHL 组分别双结扎双侧颈总动脉, 并用电刀从中间切断。假手术组除不结扎双侧颈总动脉外, 其余操作同模型组。术后第 14 天开始, 2 个 TFHL 组和银杏叶片组大鼠分别 ig 给予不同剂量的 TFHL ig 36 d, 假手术组 ig 及模型组给予等量生理盐水。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 Morris 水迷宫试验

2.2.1.1 定位航行试验^[4] 在 TFHL 给药第 30 天, 将大鼠依次放入 Morris 水迷宫进行适应性游泳训练 1 次, 共计 60 s, 不放平台, 不记录成绩行。给药第 31 天, 将平台放入任一象限中央, 进行定位航行实验, 用于检测大鼠对空间记忆的获得能力: 将大鼠从 A, B, C, D 4 个人水点面向池壁依次放入水中, 观察在 60 s 内大鼠找到并爬上平台所用的时间 (逃避潜伏期)。若 60 s 内未能找到平台, 则将其引导到平台并在平台上停留 15 s, 潜伏期记为 60 s, 每天 1 次, 共 6 d。

2.2.1.2 空间探索试验^[4] 用于检测大鼠对平台区域的准确记忆能力: 第 6 天, 定位航行实验结束后, 撤去平台, 由第 2 象限入水点面向池壁放入大鼠, 观察大鼠在 60 s 穿越平台区域的次数及平台象限游泳路程比。

2.2.2 海马神经元形态及密度检测 行为学实验结束后, 每组随机选取 8 只大鼠, 30 mg · kg⁻¹ 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 4% 多聚甲醛左心室插管灌注固定, 取脑组织常规石蜡包埋, 5 μm 连续冠状切片, 每隔 5 片选取 1 张切片, 常规 HE 染色, 光镜观察海马神经元的形态结构, MiVnt 图像分析系统计算神经元密度及细胞脱失率。

2.2.3 海马组织 AChE, ChAT 活性的检测 行为学实验结束后, 每组余下的 8 只大鼠在冰台上断头、取脑, 分离海马组织, 4 °C 生理盐水冲洗残留血液,

分析天平称重,加入 9 倍体积的预冷生理盐水,组织匀浆器匀浆,制备 10% 的海马组织匀浆液,3 500 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液备用。按试剂盒说明书测定 AChE,ChAT 活性。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠定位航行实验 与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期延长,寻找平台游泳路程明显延长 ($P < 0.01$);与模型组比较,TFHL 70,140 mg·kg⁻¹ 给药干预后,大鼠的逃避潜伏期及寻找平台游泳路程明显缩短 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 TFHL 对血管性痴呆大鼠 Morris 水迷宫测试潜伏期及游泳距离的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	逃避潜伏期 /s	游泳距离 /m
假手术	-	5.86 ± 2.43	1.13 ± 0.36
模型	-	19.54 ± 6.12 ¹⁾	3.65 ± 0.62 ¹⁾
山楂叶总黄酮	70	13.43 ± 2.79 ²⁾	2.39 ± 0.46 ²⁾
	140	9.14 ± 2.94 ³⁾	1.83 ± 0.39 ³⁾
银杏叶片	3.5	9.64 ± 3.01 ³⁾	1.85 ± 0.43 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 各组大鼠空间探索实验 与假手术组比较,模型组大鼠在 60 s 内穿越平台区次数减少,平台象限游泳路程百分比明显降低,差异具有统计学意义

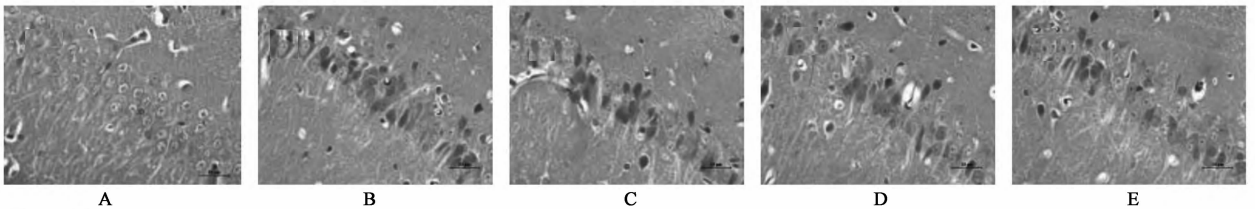
($P < 0.01$);与模型组比较,TFHL 70,140 mg·kg⁻¹ 给药干预后大鼠穿越平台区次数增多,平台象限游泳路程百分比显著增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 TFHL 对血管性痴呆大鼠 Morris 水迷宫测试穿越平台次数及平台象限游泳距离的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	穿越平台数 /次	距离比 /%
假手术	-	12.40 ± 4.26	69.43 ± 10.53
模型	-	3.96 ± 1.34 ¹⁾	33.42 ± 5.32 ¹⁾
山楂叶总黄酮	70	5.92 ± 1.98 ²⁾	43.68 ± 6.14 ²⁾
	140	7.22 ± 2.23 ³⁾	49.56 ± 7.46 ³⁾
银杏叶片	3.5	7.64 ± 2.51 ³⁾	48.87 ± 7.34 ³⁾

3.3 各组大鼠海马 CA1 区神经元的形态和密度 假手术组海马 CA1 区神经元排列整齐紧密,可见 3~4 层细胞,染色均匀,结构完整,细胞核大而圆,染色浅,核仁清晰。模型组大部分神经元变性坏死,排列紊乱,细胞周围间隙加大,细胞核浓缩、深染,溶解、消失,细胞胞质结构不清。与模型组比较,TFHL 各剂量组及银杏叶片组给药物干预后神经元损伤减轻明显,神经元固缩脱失现象明显减少,排列趋于规则,细胞结构清晰。见图 1。

与假手术组比较,模型组大鼠正常神经元密度降低 57.53% ($P < 0.01$),细胞脱失 39.24% ($P < 0.01$);与模型组比较,TFHL 70,140 mg·kg⁻¹ 药物干预后正常神经元密度升高 ($P < 0.05, P < 0.01$),细胞脱失率降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3,图 1。



A. 假手术组;B. 模型组;C. TFHL 140 mg·kg⁻¹组;D. TFHL 70 mg·kg⁻¹组;E. 银杏叶片 3.5 mg·kg⁻¹组

图 1 TFHL 对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区神经元形态的影响(HE 染色,×400)

表 3 TFHL 对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区神经元密度及脱失率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	神经元密度 /mm ²	神经元脱失率 /%
假手术	-	62.49 ± 8.27	0
模型	-	26.54 ± 6.35 ¹⁾	39.24 ± 6.12 ¹⁾
山楂叶总黄酮	70	31.61 ± 5.18 ²⁾	31.34 ± 4.38 ²⁾
	140	38.56 ± 6.73 ³⁾	20.34 ± 3.56 ³⁾
银杏叶片	3.5	37.94 ± 6.51 ³⁾	19.85 ± 3.47 ³⁾

3.4 TFHL 对大鼠海马 ChAT, AChE 活性的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马组织 AChE 活性明显升高、ChAT 活性明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);TFHL 70,140 mg·kg⁻¹ 药物干预后,AChE 活性降低、ChAT 活性升高,与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)。见表 4。

4 讨论

血管性痴呆是缺血性脑血管病临床常见的后遗

表 4 TFHL 对血管性痴呆大鼠海马 ChAT, AChE 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	ChAT /U·g ⁻¹	AChE /U·mg ⁻¹
假手术	-	226.83 ± 39.76	0.66 ± 0.17
模型	-	119.84 ± 46.52 ¹⁾	1.32 ± 0.35 ¹⁾
山楂叶总黄酮	70	174.34 ± 39.61 ²⁾	0.86 ± 0.28 ²⁾
	140	186.53 ± 37.79 ²⁾	0.82 ± 0.23 ²⁾
银杏叶片	3.5	191.94 ± 36.51 ²⁾	0.90 ± 0.37 ²⁾

症,主要表现为获得性、认知性功能障碍。海马是参与学习记忆的主要脑区,与海马胆碱能系统密切相关^[5]。海马血供单一,少有侧支循环,对缺血缺氧极为敏感。有证据表明,缺血导致海马 CA1 区神经元脱失是血管性痴呆的主要病理基础^[6]。本研究结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠海马 CA1 区神经元变性坏死,排列紊乱,神经元密度显著降低,逃避潜伏期延长,穿越平台次数明显减少,平台象限游泳距离百分比显著降低,学习记忆障碍明显。

乙酰胆碱是中枢胆碱能神经系统重要的神经递质,在脑组织内广泛分布,与学习记忆功能密切相关^[1]。ChAT 是合成乙酰胆碱的关键酶,主要存在于胆碱能神经元内,在胞体内合成,通过轴突运输到神经末梢的胞浆中,是衡量胆碱能神经元功能的主要标志。AChE 的作用是分解乙酰胆碱,与 ChAT 共同调节乙酰胆碱的动态平衡。研究发现,血管性痴呆患者脑组织乙酰胆碱含量减少,ChAT 的活性降低,阻断胆碱能神经的信息传递,可造成动物获得性记忆障碍^[7]。有研究显示,大鼠脑缺血再灌注后,脑组织乙酰胆碱浓度下降,含量降低,给予拟胆碱能药物能增强 ChAT 的活性,增加脑组织内乙酰胆碱含量,改善大鼠的学习记忆功能^[8]。本研究结果显示,模型组大鼠海马 ChAT 活性显著降低,AChE 活性明显升高。TFHL 药物干预后,ChAT 活性增强,

AChE 活性明显降低。

本研究表明 TFHL 可通过抑制海马 CA1 区神经细胞脱失,提高海马 ChAT 活性、降低 AChE 活性改善血管性痴呆大鼠海马胆碱能神经系统的功能,从而改善血管性痴呆大鼠的学习记忆功能。

[参考文献]

[1] 王玉梅,曹凯,刘永平,等.黄芩茎叶黄酮对大鼠缺血性记忆障碍的改善作用及对胆碱乙酰转移酶和一氧化氮合酶蛋白表达的影响[J].首都医科大学学报,2011,32(40):494.

[2] 吴晓光,郭园园,董荣芳.TFHL 预处理对脑缺血再灌注小鼠脑组织抗氧化酶的影响[J].承德医学院学报,2007,24(2):119.

[3] 刘俊芳,连建学,李昌俊,等.TFHL 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用研究[J].中国药房,2011,22(35):3277.

[4] 陈乔,李征峰,李青,等.六味地黄丸对老年大鼠学习记忆及脑内 M1 胆碱受体阳性神经元的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(3):205.

[5] Berkeley J L, Gomeza J, Wess J. M1 muscarinic acetylcholine receptors activate extracellular signal-regulated kinase in CA1 pyramidal neurons in mouse hippocampal slices[J]. Mol Cell Neurosci,2001,18(5):512.

[6] 赵雅宁,吴晓光,李建民,等.中药补阳还五汤对沙鼠脑缺血再灌注损伤及微循环障碍的治疗作用[J].四川大学学报:医学版,2010,41(1):53.

[7] Meck W H, William C L, Cermak J M, et al. Developmental period of choline sensitivity provide an ontogenetic mechanism for regulating memory capacity and age-related dementia [J]. Fornt Integr Neurosci, 2007,1(1):1.

[8] 刘永惠,李少为,郑清莲.补肾健脑方对血管性痴呆大鼠皮质和海马血流量及乙酰胆碱含量的影响[J].西安交通大学学报:医学版,2011,32(4):5112.

[责任编辑 聂淑琴]