

# 黄精地龙提取液对老年痴呆大鼠脑内 烟碱型乙酰胆碱受体的影响

肖移生\*, 高萌, 侯吉华

(江西中医药大学基础医学院(生命科学学院), 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:**探讨黄精地龙提取液(EPP)对老年痴呆大鼠脑内 $\alpha 3$ 和 $\alpha 7$ 烟碱型乙酰胆碱受体( $\alpha 3, \alpha 7$ -nAChR)阳性神经元数量、蛋白及mRNA表达的影响。**方法:**SD大鼠40只,随机均分为正常组,模型组,脑复康(阳性药物,  $0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )组, EPP(相当生药量  $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )组。给大鼠颈背部皮下注射1% D-半乳糖( $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 连续3周)后,腹腔注射东莨菪碱( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 连续后2周)复制大鼠老年痴呆模型;造模1周后同时对脑复康组及EPP组大鼠每天灌胃给相应实验药物,正常组及模型组大鼠灌胃给生理盐水1 mL。实验结束,处死各组大鼠,取出脑组织,一半置于10%中性甲醛液浸泡固定待组织切片检查,另一半置于冰上匀浆,进行mRNA及蛋白提取;运用尼氏染色、免疫组化观察各大鼠大脑皮层第一躯体感觉区(SITr)和海马CA1与CA3区的阳性神经元数量;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR),蛋白质免疫印迹(Western blot)检测各大鼠大脑内的 $\alpha 3$ 和 $\alpha 7$ -nAChR mRNA及蛋白的表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠大脑SITr区和海马CA1及CA3区神经元数量显著减少,大脑内 $\alpha 3$ 和 $\alpha 7$ -nAChR mRNA和蛋白表达水平均降低( $P < 0.01$ );EPP能增加痴呆大鼠大脑SITr区和海马CA1及CA3区神经元数量,能升高痴呆大鼠大脑内 $\alpha 3$ 和 $\alpha 7$ -nAChR mRNA和蛋白的表达水平,与模型组比较差异有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:**EPP能保护大脑认知学习记忆有关重要区的神经细胞,同时触发 $\alpha 3$ 和 $\alpha 7$ -nAChR受体效应,提高中枢乙酰胆碱(ACh)含量,进而升高老年痴呆大鼠中枢胆碱能系统活性。

**[关键词]** 黄精地龙提取液; 老年痴呆大鼠; 大脑皮层; 海马; 神经元; 烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0140-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017140140

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1129.040.html>

**[网络出版时间]** 2017-04-27 11:29

## Effect of Extracts from Polygonati Rhizoma and Pheretima on Nicotinic Acetylcholine Receptor in Brain of Senile Dementia Rats

XIAO Yi-sheng\*, GAO Meng, HOU Ji-hua

(School of Basic Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of Extracts from Polygonati Rhizoma and Pheretima (EPP) on the number of  $\alpha 3$  and  $\alpha 7$ -nicotinic acid type acetylcholine receptors (nAChR) neurons, the expression of proteins and mRNA in brains of senile dementia rats. **Method:** The 40 SD rats were randomly divided into normal group, model group, piracetam (positive control drug,  $0.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) group, and EPP (equivalent raw drug dose,  $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) group. The senile dementia models were established by nuchal subcutaneous injection of 1% D-galactose ( $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 3 consecutive weeks) and intraperitoneal injection of Scopolamine ( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 2 consecutive weeks) in rats. 1 week after modeling, the rats in piracetam group and EPP group received corresponding drugs daily by intragastric administration, and the rats in control group and model group were given with normal saline 1 mL. At the end of the experiment, all the rats were sacrificed, and their brain tissues were

**[收稿日期]** 20170302(017)

**[基金项目]** 江西省教育厅2015年度科技项目(GJJ150868)

**[通讯作者]** \*肖移生, 硕士, 副教授, 从事中药神经保护研究, Tel: 0791-87118907, E-mail: xys760928@sina.com

taken out. Half of the brain tissues was fixed by 10% neutral formaldehyde solution for biopsy, and the other half was homogenated on ice to extract mRNA and protein. The count of positive neurons in hippocampal CA1, CA3 area and S1Tr areas were detected by Nissl staining and immunohistochemistry methods; The  $\alpha 3$  and  $\alpha 7$ -nAChR mRNA and protein expression levels in the brains of senile dementia rats were measured by Real-time PCR and Western blot respectively. **Result:** As compared with the normal group, the counts of neurons in hippocampal CA1 and CA3 area and S1Tr area were decreased, and the expression levels of  $\alpha 3$  and  $\alpha 7$ -nAChR mRNA and proteins in the brains were also decreased in model group ( $P < 0.01$ ); EPP could increase the count of neurons in hippocampal CA1 and CA3 area and S1Tr area; EPP could increase the expression of  $\alpha 3$  and  $\alpha 7$ -nAChR mRNA and protein in the brains of dementia rats as compared with the model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** EPP can protect the nerve cells in the brain's cognitive learning and memory related areas, and can simultaneously trigger  $\alpha 3$  and  $\alpha 7$ -nAChR receptors to increase central acetylcholine contents. Therefore, EPP could increase the activity of central cholinergic system in senile dementia rats.

[**Key words**] extracts from Polygonati Rhizoma and Pheretima; senile dementia rat; cerebral cortex; hippocampus; neuron; nicotinic acid type acetylcholine receptors (nAChR)

老年痴呆严重影响着老年人的生活质量,其病因非常复杂,发病机制尚未完全明确<sup>[1]</sup>。尽管目前临床上仍首选乙酰胆碱酯酶(acetylcho-linesterase, AchE)拮抗药<sup>[2]</sup>如他克林、多奈哌齐、加兰他敏等西药<sup>[1-3]</sup>进行治疗,阻断 AchE 水解乙酰胆碱(acetylcholine, ACh),增加 ACh 在中央突触的浓度和胆碱的功能,改善老年痴呆患者症状。其短期疗效较好,但均不能延缓或者是阻止疾病的进展,且患者的治疗效果也不稳定;另外由于其副作用大,患者往往难以长期坚持,药物依从性差<sup>[4]</sup>。中医中用于治疗老年痴呆的中药复方主要有补肾益气活血汤、益智醒脑汤、七十味珍珠丸、六味地黄丸、开窍益智方、清脑通络方等<sup>[1]</sup>,但其组方成分复杂、证型多样、标准不一<sup>[5]</sup>。因此,探索一种组方成分简单、疗效确切且药食两用的适合长期服用安全的中药组方治疗老年痴呆疾病十分必要。

本课题组长期研究黄精<sup>[6]</sup>和地龙<sup>[7-8]</sup>的神经保护药用机制,首次采用两药联合组方研究其抗老年痴呆作用及机制。前期研究发现黄精地龙提取液对体外培养的神经细胞有良好的保护作用<sup>[9-10]</sup>,动物实验也证实其有较好的抗大、小鼠老年痴呆、抗衰老作用,其主要通过增加脑内 ACh 含量,降低脑内 AchE 活性,影响脑组织胆碱能系统发挥作用<sup>[11-12]</sup>。故推测黄精地龙提取液对老年痴呆大鼠脑内的 ACh 相关受体系统也有影响,值得进一步研究。

本研究拟建立大鼠老年痴呆模型,观察黄精地龙提取液对老年痴呆大鼠脑内神经元数量, $\alpha 3$  和  $\alpha 7$  烟碱型乙酰胆碱受体( $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$ -nAChR) mRNA 和蛋白表达的影响,以期从 ACh 受体角度探索 EPP 的

抗老年痴呆作用机制,为开发其临床应用价值提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,体重(250 ± 20)g,常州卡文斯实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(苏)2016-0010。随机将大鼠分成正常组,模型组,脑复康(阳性药物,0.6 g·kg<sup>-1</sup>)组,黄精地龙提取液组(灌胃黄精地龙提取液,相当生药量 4 g·kg<sup>-1</sup>组),共 4 组,每组 10 只大鼠。实验过程严格按照江西中医药大学医学伦理学对动物进行处置(伦理审查编号 201609050260)。

**1.2 药物及试剂** 黄精地龙方由黄精、地龙 2 味中药按 1:1 组成。黄精与地龙均购自江西中医药大学附属中医院中药房,并经江西中医药大学中药鉴定教研室邓可众教授鉴定为正品、均符合国家中药临床应用标准。脑复康片(湖南迪诺制药有限公司,批号 20160820)。D-半乳糖(北京百灵威科技有限公司,批号 LT90057);东莨菪碱(美国 Sigma 公司,批号 PL1096858);白蛋白(国药集团化学试剂有限公司,批号 F0702228);TRIzol 试剂,RT 试剂盒,实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)试剂盒(日本 Toyobo 公司,批号分别为 655102,211600,453300);各种引物由美国 Invitrogen 公司合成;兔抗  $\alpha 3$ -nAChR 多克隆抗体及兔抗  $\alpha 7$ -nAChR 多克隆抗体(美国 Abnova 公司,批号分别为 07324-1B7,100722);免疫组化试剂盒,DAB 显色试剂(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 SP-9001,ZLI-9017);焦油紫染料(北京 Solarbio 公司,批号 G1430-2);蛋白提取试剂盒,BCA 蛋白定量试剂盒,

SDS-PAGE 凝胶试剂盒(碧云天公司,批号分别为 10007D,P0010S,P0012A);其余试剂均为国产分析纯级试剂。

**1.3 仪器** RE-52A 型旋转蒸发仪(上海定泰公司),RE-52A2016 型组织切片机(德国 Leica 公司),EEP102 型多功能电泳仪(碧云天公司产品),ABI7500 型 Real-time PCR 仪(美国 ABI 公司),BX-41 型显微照相仪(日本 Olympus 公司),Motic Image Advanced3.2 图像数据分析软件(德国 Motic 公司)。

## 2 方法

**2.1 中药汤液提取** 黄精地龙浓缩提取液制备<sup>[7]</sup>:将黄精 100 g,地龙 100 g 用超微粉碎机粉碎后,常温下将黄精、地龙粉以 1:1 比例混合,加蒸馏水 1 000 mL 浸渍,不时搅拌使其充分浸泡 12 h;回流 2 h,滤过,收集提取液,粗滤后的残渣内再加蒸馏水 1 000 mL(100 ℃),回流提取 1 h,滤过,收集提取液;合并 2 次提取液后离心(2 000 r·min<sup>-1</sup>,20 min),收集上清液,旋转蒸发浓缩形成 200 mL 浓缩液为实验用的黄精地龙组方浓缩提取液,每 1 mL 相当含生药 1 g。

**2.2 老年痴呆大鼠模型建立** 模型组及各试验药物组大鼠每天颈背部给予皮下 1% 的 D-半乳糖(5 mL·kg<sup>-1</sup>)注射,连续 3 周,造成动物亚急性衰老;第 4 周开始改为每天腹腔注射东莨菪碱(2 mg·kg<sup>-1</sup>),连续 2 周,造成大鼠老年痴呆<sup>[13]</sup>。正常组每天颈背部给予皮下生理盐水 1 mL 注射 3 周,第 4,5 周每天腹腔注射生理盐水 1 mL。造模 1 周后同时对脑复康组及黄精地龙提取液组大鼠每天灌胃给相应实验药物,正常组及模型组大鼠灌胃给生理盐水 1 mL,共 4 周。

**2.3 脑组织制备** 实验结束后,对各组动物进行行为学检测后,脱颈椎处死动物;在冰台上快速取出脑组织,置于 4 ℃ 生理盐水中漂洗,除去血迹,滤纸拭干;矢状面上将脑均分为两半,一半置于 10% 中性甲醛液(4 ℃)浸泡固定待组织切片检查,另一半取大脑置于冰上匀浆,进行 RNA 及蛋白提取。

**2.4 Real-time PCR 检测  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$ -nAChR mRNA 表达** 大脑组织匀浆后,取适量匀浆组织液加入 TRIzol 进行裂解,提取总 RNA;采用 RT 试剂盒配制 RT 反应液,在 PCR 仪上进行 RT 反应;按 Real-time PCR 试剂盒配制反应体系,应用 Real-time PCR 仪检测各实验组和正常组模板  $C_t$  值,阴性对照以 RNase-free H<sub>2</sub>O 为模板,反应条件为 95 ℃ 预变性 10 s,95 ℃ 变性 30 s,55 ~ 60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸

30 s,40 个循环;按文献<sup>[14]</sup>方法对所获得的  $C_t$  值进行相对定量分析,以  $Folds = 2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示实验组和正常组目的基因表达的倍比关系。待测基因扩增引物序列由 Invitrogen 公司合成,具体如下: $\alpha 3$ -nAChR 引物序列上游引物 5'-GACAAGACCAAAGC TCTACTCAAGTAC-3',下游引物 5'-GCACAGAG ATGCAGAGTGTACCTTCTC-3',产物长度 435 bp; $\alpha 7$ -nAChR 的上游引物 5'-GACATTCTCCTCTATA ACAGTGCTGAT-3',下游引物 5'-CTGAAATGAGTA CACAAGGGATGAGCAG-3',产物长度 405 bp;GAPDH 内参引物上游 5'-ACCACAGTCCATGCCA TCAC-3',下游 5'-GATGTGGATGAAGAAGTGTTC-3',产物长度 451 bp。实验重复 3 次,计算平均值。

**2.5 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$ -nAChR 蛋白表达** 用碧云天公司的蛋白提取试剂盒抽提各组大鼠组织的总蛋白,BCA 法定量蛋白。取组织总蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转到 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, $\alpha 3$ , $\alpha 7$ -nAChR 一抗(1:500)4 ℃ 孵育过夜,二抗(1:500)室温 1 h,用化学发光液在暗室内显影、曝光成像。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,在化学发光仪上分析结果。

**2.6 尼氏染色及免疫组化染色** 脑组织充分固定后,常规石蜡包埋,行冠状位切片,片厚 10  $\mu$ m,每隔 5 片取一张,每例动物相邻切片分为 3 套,每套各 5 张,选取其中 1 套进行神经元尼氏染色,另 2 套进行免疫组织化学染色。免疫组化染色步骤按试剂盒推荐的 SP 法操作。各切片染色结果观察大脑皮层第一躯体感觉区(S1Tr),海马 CA1,CA3 区 3 个部位的神经元数量及  $\alpha 3$ -nAChR, $\alpha 7$ -nAChR 阳性神经细胞数量。神经细胞计数方法:于 10 × 40 倍光镜下,每一脑片随机选取相邻 3 个视野,镜下面积为 4.5 × 10<sup>-2</sup> mm<sup>2</sup>,运用 Motic 数据分析软件计数  $\alpha 3$  和  $\alpha 7$ -nAChR 阳性细胞,结果取平均值。

**2.7 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 统计软件分析处理数据,数据以  $\bar{x} \pm s$  来表示,各组数据间采用单因素方差分析检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 各组大鼠一般状态比较** 正常组各大鼠饮食、行动等状态正常;模型组各大鼠随着造模时间延长食量减少,体型消瘦,体毛枯黄粗糙且逐渐稀疏,呆卧少动且行动迟缓,对外界刺激反应迟钝;药物组各大鼠的一般情况要好于模型组,对外界刺激反应要灵敏、行动要敏捷。

**3.2 对老年痴呆大鼠大脑  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$ -nAChR mRNA 表达的影响** 模型组大鼠大脑  $\alpha 3$  和  $\alpha 7$ -nAChR mRNA 表达水平较正常组显著下降 ( $P < 0.01$ ), 与模型组比较, 黄精地龙提取液能升高老年痴呆大鼠大脑内的  $\alpha 3$  和  $\alpha 7$ -nAChR mRNA 表达水平 ( $P < 0.01$ );  $\alpha 3$  与  $\alpha 7$ -nAChR mRNA 在各组表达水平变化相似。见表 1, 2。

表 1 黄精地龙提取液对老年痴呆大鼠大脑  $\alpha 3$ -nAChR mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of extracts from Polygonati Rhizoma and Pheretimaon (EPP)  $\alpha 3$ -nAChR mRNA expression in senile dementia rat's brain ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	$\alpha 3$ -nAChR ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
正常	-	1
模型	-	0.282 ± 0.042 <sup>1)</sup>
脑复康	0.6	0.765 ± 0.062 <sup>3)</sup>
黄精地龙提取液	4	0.857 ± 0.075 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~5 同)。

表 2 黄精地龙提取液对老年痴呆大鼠大脑  $\alpha 7$ -nAChR mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of EPP on  $\alpha 7$ -nAChR mRNA expression in senile dementia rat's brain ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	$\alpha 7$ -nAChR ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )
正常	-	1
模型	-	0.302 ± 0.048 <sup>1)</sup>
脑复康	0.6	0.846 ± 0.057 <sup>3)</sup>
黄精地龙提取液	4	0.887 ± 0.066 <sup>3)</sup>

**3.3 对老年痴呆大鼠大脑  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$ -nAChR 蛋白表达的影响** 老年痴呆大鼠大脑的  $\alpha 3$  和  $\alpha 7$ -nAChR 蛋白表达水平降低, 显著低于正常组 ( $P < 0.01$ ); 与模型

表 4 黄精地龙提取液对老年痴呆大鼠大脑  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$ -nAChR 阳性神经元数量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of EPP on  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$ -nAChR neurons in senile dementia rat's brain ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	S1Tr		CA1		CA3	
		$\alpha 3$ -nAChR	$\alpha 7$ -nAChR	$\alpha 3$ -nAChR	$\alpha 7$ -nAChR	$\alpha 3$ -nAChR	$\alpha 7$ -nAChR
正常	-	27.3 ± 4.7	26.5 ± 3.8	16.8 ± 2.2	18.4 ± 2.6	18.7 ± 3.2	17.4 ± 1.9
模型	-	12.6 ± 2.1 <sup>1)</sup>	16.8 ± 3.4 <sup>1)</sup>	8.7 ± 1.8 <sup>1)</sup>	10.5 ± 1.2 <sup>1)</sup>	8.9 ± 2.4 <sup>1)</sup>	10.8 ± 2.1 <sup>1)</sup>
脑复康	0.6	20.5 ± 2.8 <sup>3)</sup>	21.1 ± 2.4 <sup>2)</sup>	12.2 ± 1.7 <sup>2)</sup>	15.6 ± 1.4 <sup>3)</sup>	13.5 ± 2.0 <sup>3)</sup>	15.1 ± 1.6 <sup>3)</sup>
黄精地龙提取液	4	22.1 ± 2.8 <sup>3)</sup>	22.9 ± 2.5 <sup>3)</sup>	13.3 ± 2.4 <sup>3)</sup>	15.4 ± 2.2 <sup>3)</sup>	14.2 ± 2.6 <sup>3)</sup>	16.4 ± 2.2 <sup>3)</sup>

**3.5 对老年痴呆大鼠大脑神经元数量的影响** 模型组大鼠大脑皮层、海马区的锥体细胞(神经元)数量减少, 与正常组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。黄精地龙提取液组锥体细胞数量较模型组有所增加 ( $P <$

组比较, 黄精地龙提取液能升高痴呆大鼠大脑的  $\alpha 3$  和  $\alpha 7$ -nAChR 蛋白表达水平 ( $P < 0.01$ );  $\alpha 3$  与  $\alpha 7$ -nAChR 蛋白在各组表达水平变化相似。见图 1 及表 3。

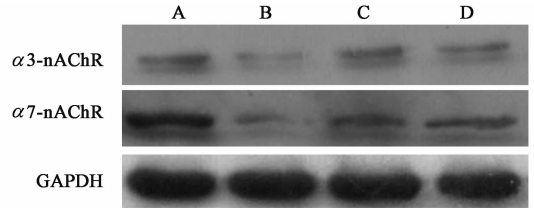


图 1 黄精地龙提取液对老年痴呆大鼠大脑  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$ -nAChR 蛋白表达的影响

Fig.1 Effect of EPP on  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$ -nAChR protein expression in senile dementia rat's brain

表 3 黄精地龙提取液对老年痴呆大鼠大脑  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$ -nAChR 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of EPP on  $\alpha 3$ ,  $\alpha 7$ -nAChR protein expression in senile dementia rat's brain ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	$\alpha 3$ -nAChR /GAPDH	$\alpha 7$ -nAChR /GAPDH
正常	-	1	1
模型	-	0.091 ± 0.005 <sup>1)</sup>	0.022 ± 0.007 <sup>1)</sup>
脑复康	0.6	0.898 ± 0.018 <sup>3)</sup>	0.535 ± 0.016 <sup>3)</sup>
黄精地龙提取液	4	0.817 ± 0.016 <sup>3)</sup>	0.596 ± 0.012 <sup>3)</sup>

**3.4 免疫组化染色结果** 模型组大鼠大脑 S1Tr 区, 海马 CA1 及 CA3 区的  $\alpha 3$  和  $\alpha 7$ -nAChR 受体阳性神经元数目减少, 与正常组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 黄精地龙提取液组大鼠 3 个区的  $\alpha 3$  和  $\alpha 7$ -nAChR 受体阳性细胞数目较模型组有所增加, 有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。见表 4, 图 2。

0.01), 在 S1Tr 区、海马 CA1 及 CA3 区内都有显著性差异。见表 5, 图 3。

#### 4 讨论

神经递质及其受体失常是老年痴呆病机的重要

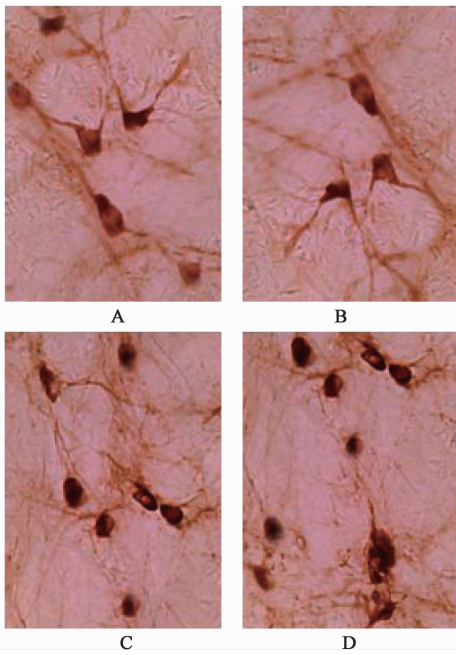


图 2 各组大鼠大脑皮层 S1Tr 区  $\alpha 3$ -nAChR 阳性细胞比较(免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 2 Comparison of 3-nAChR positive cells in cerebral cortex S1Tr area of rats in each group(IHC,  $\times 400$ )

表 5 黄精地龙提取液对老年痴呆大鼠大脑神经元数量的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Table 5 Effect of EPP on neurons in senile dementia rat's brain ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	S1Tr	CA1	CA3
正常	-	95.7 ± 8.5	35.3 ± 3.4	43.8 ± 4.6
模型	-	52.2 ± 4.5 <sup>1)</sup>	20.1 ± 2.7 <sup>1)</sup>	27.9 ± 3.6 <sup>1)</sup>
脑复康	0.6	81.3 ± 5.2 <sup>3)</sup>	27.4 ± 2.5 <sup>2)</sup>	36.1 ± 3.2 <sup>3)</sup>
黄精地龙提取液	4	83.6 ± 6.6 <sup>3)</sup>	29.5 ± 2.8 <sup>3)</sup>	36.2 ± 2.8 <sup>3)</sup>

因素之一。现代医学研究发现老年痴呆患者大脑内早期即有胆碱功能缺乏引发的学习记忆障碍等痴呆症状, ACh 减少和 nAChR 受体蛋白缺失程度与痴呆程度密切相关<sup>[15]</sup>, 临床上首选治疗药物就是通过抑制 AchE 活性来增加中枢神经系统 ACh 的含量, 从而改善老年痴呆患者的临床症状<sup>[3]</sup>。海马、大脑新皮层是大脑中参与学习、记忆过程的重要结构, 分布着丰富的 nAChR, 尤其是在海马 CA1 及 CA3 区内<sup>[16]</sup>。nAChR 属于离子通道偶联的受体家族, 其激活后主要通过对膜电位的调节而影响神经细胞功能活动<sup>[17]</sup>。在老年和与年龄相关的神经退行性变过程中出现 nAChR 亚型改变最明显的是  $\alpha 3$  和  $\alpha 7$ <sup>[18-20]</sup>。

本研究尼氏染色结果发现, 衰老痴呆大鼠大

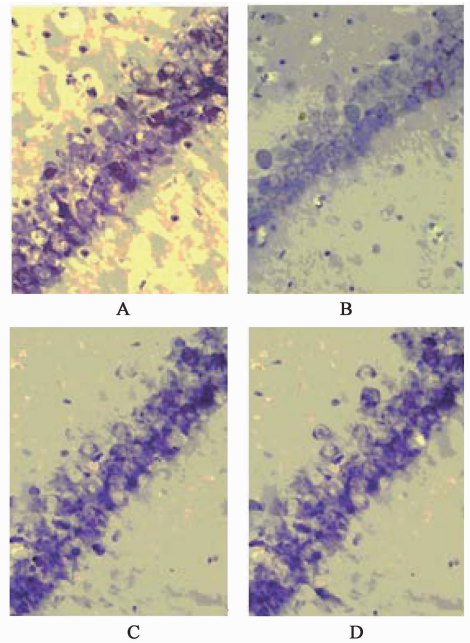


图 3 各组大鼠大脑海马 CA1 区神经细胞比较(尼氏染色,  $\times 400$ )

Fig. 3 Comparison of neurons in hippocampal CA1 area in each group rats(Nissl stain,  $\times 400$ )

脑皮层 S1Tr 区、海马 CA1 及 CA3 区内的神经元数量减少, 与正常组比较有显著性差异; 经黄精地龙提取液治疗后能增加痴呆大鼠大脑神经细胞数量, 在 S1Tr 区、海马 CA1 及 CA3 区内都有显著性差异。Real-time PCR 及 Western blot 检测结果均显示, 老年痴呆后大鼠大脑组织的  $\alpha 3$  和  $\alpha 7$ -nAChR mRNA 和蛋白的表达水平明显降低; 经黄精地龙提取液治疗后, 痴呆大鼠大脑内的  $\alpha 3$  和  $\alpha 7$ -nAChR mRNA 和蛋白的表达水平明显升高。免疫组化染色结果显示黄精地龙提取液组大鼠大脑  $\alpha 3$  和  $\alpha 7$ -nAChR 阳性细胞数显著高于模型组, 表明黄精地龙提取液能增加痴呆大鼠脑内  $\alpha 3$  和  $\alpha 7$ -nAChR 受体蛋白的表达水平。因此, 免疫组化检测结果与 Real-time PCR 及 Western blot 检测结果一致, 三者相互印证。

中医理论认为老年痴呆属“愚痴”、“痴症”等, 其发病与五脏虚损密切相关。当机体肾气虚衰, 肝郁气滞, 肝气犯胃, 损伤脾胃, 脾失健运, 聚湿生痰, 痰迷心窍, 心神错乱而发痴呆。虚以致痰, 虚以致瘀, 痰瘀互结, 此为老年痴呆的主要病机<sup>[21]</sup>。针对此病机, 中医采取健运脾胃、补肾填精、活血化瘀、化痰开窍等方法治疗老年痴呆。本课题组对黄精与地龙联合组方, 长期致力于研究其抗老年痴呆作用及机制。组方中黄精具有补气养阴、健脾益肾等功效, 常作食疗<sup>[22]</sup>; 地龙具有平肝祛

风、通经活络等功效,民间也可作食疗<sup>[23]</sup>。两者结合,符合中药组方原则,达到既补肾养阴防痴呆,又祛风活络治痴呆,防治结合,实现整体论治。

前期研究已发现黄精地龙提取液有改善老年痴呆鼠的学习记忆功能,具有较好的抗大、小鼠老年痴呆作用,能升高老年痴呆鼠脑组织 ACh 含量及 ChAT 活性,降低 AChE 活性<sup>[11-12]</sup>;体外实验也证实黄精地龙提取液有神经细胞保护作用,能升高细胞内  $Ca^{2+}$ -ATPase,  $Ca^{2+}$   $Mg^{2+}$ -ATPase 活性,降低  $Ca^{2+}$  浓度,防止神经细胞钙离子超载<sup>[9-10]</sup>。结合本次研究结果,故推测黄精地龙提取液可能通过保护大脑 S1Tr,海马 CA1 与 CA3 区神经细胞,调控神经细胞膜的离子通道,尤其是钙离子通道,触发  $\alpha 3$  和  $\alpha 7$ -nAChR 受体效应,进而升高老年痴呆大鼠中枢胆碱能系统活性,发挥抗老年痴呆作用。

[参考文献]

[1] 段磊,司继刚,刘萍.阿尔茨海默病药物治疗研究进展[J].河北医药,2015,37(7):1077-1080.

[2] ZHOU L, TAN S, SHAN Y L, et al. Baicalein improves behavioral dysfunction induced by Alzheimer's disease in rats[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2016, 12:3145-3152.

[3] 闫涛.治疗阿尔茨海默病的药物研究进展[J].天津药学,2016,28(3):46-49.

[4] Alzheimer's Association. 2012 Alzheimer's disease facts and figures[J]. Alzheimer's Dementia, 2012, 8(2):131-168.

[5] 罗小泉,郭琦丽,辜尊涛,等.中医药对老年性痴呆的认识及其防治研究思路探析[J].时珍国医国药,2011,22(8):1985-1986.

[6] 文珠,肖移生,唐宁,等.黄精多糖对神经细胞的毒性及抗缺氧性坏死和凋亡作用研究[J].中药药理与临床,2006,22(2):29-31.

[7] 肖移生,侯吉华,伍庆华,等.地龙对大鼠大脑局灶性脑缺血损伤保护作用研究[J].中药药理与临床,2009,25(6):62-64.

[8] 李青,肖移生,侯吉华,等.地龙对大鼠大脑局灶性脑缺血诱导的凋亡研究[J].江西中医学院学报,2010,22(2):63-66.

[9] 肖移生,曾元凤,侯吉华,等.黄精地龙方对体外培养分化的 SH-SY5Y 细胞  $A\beta_{25-35}$  损伤中的保护作用研究[J].现代中西医结合杂志,2016,25(20):2167-2169.

[10] 肖移生,曾元凤,侯吉华,等.黄精地龙方对体外培养分化的 SH-SY5Y 细胞  $A\beta_{25-35}$  损伤中的钙调节相关酶活性及钙离子浓度影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2016,11(20):2371-2374.

[11] 肖移生,曾元凤,徐玥璟,等.黄精地龙方抗老年痴呆小鼠的研究[J].中药药理与临床,2013,29(2):152-154.

[12] 肖移生,曾元凤,欧阳厚淦,等.黄精地龙方对老年痴呆大鼠行为认知及脑胆碱能系统的影响[J].中药药理与临床,2013,29(4):146-148.

[13] 张海燕,刘忠锦,廉洁,等.复方地黄对老年痴呆大鼠学习记忆及海马 GDNF mRNA 表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(10):280-283.

[14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT) Method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.

[15] Greig N H, Reale M, Tata A M. New pharmacological approaches to the cholinergic system; an overview on muscarinic receptor ligands and cholinesterase inhibitors[J]. Recent Pat CNS Drug Discov, 2013, 8(2):123-141.

[16] Albiñana E, Luengo J G, Baraibar A M, et al. Choline induces opposite changes in pyramidal neuron excitability and synaptic transmission through a nicotinic receptor-independent process in hippocampal slices[J]. Pflugers Arch, 2017,8:1939-1945.

[17] Taly A, Corringier P J, Guedin D, et al. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system [J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(9):733-750.

[18] Mousavi M, Nordberg A. Expression of the alpha7, alpha4 and alpha3 nicotinic receptor subtype in the brain and adrenal medulla of transgenic mice carrying genes coding for human AChE and beta-amyloid[J]. Int J Dev Neurosci, 2006, 24(4):269-273.

[19] Blake M G, Krawczyk M C, Baratti C M. Neuropharmacology of memory consolidation and reconsolidation: Insights on central cholinergic mechanisms[J]. J Physiol Paris, 2014, 108(4/6):286-291.

[20] LIAO Y, QI X L, CAO Y. Elevations in the levels of NF- $\kappa$ B and inflammatory chemotactic factors in the brains with Alzheimer's disease-one mechanism may involve  $\alpha 3$  nicotinic acetylcholine receptor[J]. Curr Alzheimer Res,2016,13(11):1290-1301.

[21] 闫敬来,陈燕清.老年痴呆病机的中医学认识概述[J].中华中医药杂志,2008,23(7):640-642.

[22] 吴柳花,吕圭源,李波,等.黄精对长期超负荷游泳致阴虚内热模型大鼠的作用研究[J].中国中药杂志,2014,39(10):1886-1891.

[23] 彭劲浦,杨得坡,黄世亮,等.地龙的药理作用与保健功能[J].中药材,2000,23(2):114-116.

[责任编辑 周冰冰]