

基于脑肠肽 Ghrelin 水平探讨远志散对 AD 大鼠学习记忆能力及进食量的影响

郝彦伟, 李斌*, 张怡*, 谢沛俊, 喻俊榕, 向劲松, 龚道银
(成都中医药大学附属医院, 成都 610075)

[摘要] 目的:通过制备阿尔茨海默病(AD)大鼠模型,观察远志散对模型大鼠胃促生长素(Ghrelin)表达水平的调控,探讨其防治AD的可能作用机制。方法:采用随机数字表法将120只SD大鼠分为6组,分别为假手术组,模型组,多奈哌齐组($1.02\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),远志散高、中、低剂量组($12, 6, 3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组20只,雌雄各半。除假手术组注射同等剂量生理盐水,其余各组大鼠双侧海马立体定向注射 β 淀粉样蛋白1-40($A\beta_{1-40}$)诱导AD大鼠模型。连续灌胃治疗10周,观察并记录各组大鼠进食量。灌胃结束后通过Morris水迷宫法检测大鼠学习记忆能力,留取全脑和胃体胃窦,苏木素-伊红(HE)染色观察海马CA1区病理改变,免疫组化法检测Ghrelin表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期显著延长($P<0.01$),穿越站台次数、有效区域停留时间及运动路程均显著减少($P<0.01$),海马CA1区细胞排列紊乱、数量减少、胞核固缩,雌雄大鼠进食量明显下降($P<0.05, P<0.01$),海马CA1区、胃黏膜组织中Ghrelin蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,远志散各剂量组大鼠逃避潜伏期均有不同程度的缩短($P<0.05, P<0.01$),穿越站台次数、有效区域停留时间及运动路程均增加($P<0.05, P<0.01$),海马CA1区细胞数目与形态有明显改善,远志散高、中剂量组雌雄大鼠每日进食量显著增加($P<0.05, P<0.01$);远志散各剂量组大鼠海马CA1区、胃黏膜组织Ghrelin蛋白表达明显增加($P<0.05, P<0.01$)。结论:远志散能够有效改善AD大鼠学习记忆能力,增加每日进食量,其机制可能与其上调海马CA1区及胃黏膜组织Ghrelin含量有关。

[关键词] 远志散; 阿尔茨海默病; 胃促生长素; 脾脑相关

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)21-0008-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202002

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200721.1444.010.html>

[网络出版日期] 2020-7-21 16:57

Effect of Yuanzhisan on Learning and Memory Abilities and Food Intake of AD Rats Based on Ghrelin Level of Cerebrointestinal Peptide

HAO Yan-wei, LI Bin*, ZHANG Yi*, XIE Pei-jun, YU Jun-rong, XIANG Jin-song, GONG Dao-yin
(Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** Through the preparation of Alzheimer's disease (AD) rat model, the effect of Yuanzhisan on the expression of Ghrelin was observed, and the possible mechanisms in preventing and treating AD were discussed. **Method:** A total of 120 SD rats were randomly divided into sham-operated group, model group, donepezil group ($1.02\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high, medium and low-dose Yuanzhisan groups ($12, 6, 3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 20 rats in each group, including half male and half female. The rats in sham-operated group were injected with normal saline (NS), and the rats in other groups were injected with β -amyloid 1-40 ($A\beta_{1-40}$) in hippocampus to induce the AD rat model. During the 10-week continuous gavage, the food intake of rats in each group was observed and recorded. After the end of gavage, learning and memory abilities of rats were tested by

[收稿日期] 20200217(020)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81704024, 81973821);成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划项目(QNXZ2019014)

[第一作者] 郝彦伟,在读硕士,从事中医脾胃系病证的实验与研究,E-mail:1584712988@qq.com

[通信作者] *李斌,博士,副教授,从事中医老年病的临床与基础研究,E-mail:libin@cdutcm.edu.cn;

*张怡,教授,硕士生导师,从事中医脾胃系疾病的防治与研究,E-mail:zhangyi2288@163.com

Morris water maze. The whole brain and the gastric body and antrum were collected, the pathologic changes in the CA1 area of hippocampus was assessed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the expression of Ghrelin was detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with the sham-operated group, the escape latency time of model group rats increased ($P<0.01$), while times across platform, retention time in effective area and movement distance decreased ($P<0.01$). The disorder of neurons, the decrease of the neuronal number, and the pyknosis of nucleus were observed in hippocampal CA1 area. The food intake of male and female rats decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). The expression of Ghrelin in hippocampal CA1 area and gastric mucosa decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the model group, the escape latency time of rats in each treatment group was significantly shortened ($P<0.05$, $P<0.01$), whereas times across platform, retention time in effective area and movement distance increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The pathologic change was improved markedly, and the daily food intake of rats in high and medium-dose Yuanzhisan groups increased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). The protein expression of Ghrelin in hippocampal CA1 area and gastric mucosa increased significantly in each Yuanzhisan group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Yuanzhisan can effectively improve the learning and memory abilities of AD rats and increase the daily intake, which may be related to its up-regulation of Ghrelin content in hippocampal CA1 area and gastric mucosa.

[Key words] Yuanzhisan; Alzheimer's disease; ghrelin; spleen brain correlation

阿尔茨海默病(AD)是一种以进行性认知功能障碍为主的神经系统退行性疾病,是老年期痴呆最常见的类型^[1]。痴呆是包括中国在内的全球65岁以上老年人的主要致残原因^[2],自1990年以来,中国痴呆症的患病率显著上升,目前中国痴呆症患者约占全球痴呆总人口的25%^[3],这给中国带来了沉重的经济负担,也给政策制定者、医疗保健专业人员和患病家庭带来了巨大的挑战。AD已成为全球最严重的健康和社会经济问题,但迄今尚无有效治愈的方法和疗效令人满意的治疗药物。近年来,中医药防治早期AD的机制研究已然成为国内外热点^[4-5]。

胃促生长素(Ghrelin)是一种多功能脑肠肽类激素,与其生长激素促分泌素受体(GHS-R)结合并调节食物的摄入^[6]。一系列研究显示,在几种AD动物模型中,生长素释放肽和生长素释放肽激动剂可改善多种AD相关的发病机制,如 β 淀粉样蛋白(A β)沉积,tau蛋白过度磷酸化,神经炎症和认知功能障碍^[7-8],但鲜有报道中医药调节Ghrelin治疗AD的相关研究。因此,探索中医药对Ghrelin表达水平的影响及中医药调控Ghrelin表达水平与脑肠肽调节机制的关系对于AD的研究和治疗具有重大意义。课题组基于脾脑相关理论及多年临床实践认为,老年患者脏腑功能衰退,脾虚无力运化,升降无权,致使津聚为痰,上蒙清窍发为痴呆^[9]。远志散出自宋代太医院所撰的《圣济总录》,具有益气化痰开窍的功效。前期实验研究发现,远志散能够提高脑

组织内抗氧化酶系活性,降低脂质过氧化水平,抑制脑内乙酰胆碱酯酶(AChE)活性,Morris水迷宫实验结果也显示远志散具有改善小鼠学习记忆的能力,但其疗效和机制有待进一步研究^[10-11]。本研究基于中医传统脾脑相关理论,通过观察具有益气化痰开窍功效的远志散对AD大鼠海马CA1区和胃黏膜组织Ghrelin含量的调控影响,探讨中医药干预AD的脑肠肽调节机制,以期为AD防治研究提供新的思路、开辟新的途径。

1 材料

1.1 动物 本实验选取SPF级SD大鼠120只,8周龄,雌雄各半,体质量200~240 g,由成都达硕生物科技有限公司提供,动物许可证号SYXK(川)2017-179,于成都中医药大学中医脏腑病证实验室动物房饲养。本研究动物实验获成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(审查备案编号2017-02)。

1.2 药物 远志散按照《圣济总录》原书记载的药物剂量比例进行配伍:远志12 g,人参9 g,黄连12 g,石菖蒲18 g,白茯苓15 g,饮片均购自四川康美药业有限公司,经成都中医药大学药学院中药资源与鉴定系陈江副教授鉴定为正品。按照上方剂量配比,加入10倍量水,浸泡30 min,分3次熬制,煎煮过程中将3次提取液粗滤,-80℃浓缩为1.2 g·mL⁻¹质量浓度,放入4℃冰箱备用。盐酸多奈哌齐片,陕西方舟制药有限公司,批号180602726。

1.3 试剂 A β ₁₋₄₀(1 mg/支,美国Sigma公司,批号077m4883v);苏木素-伊红(HE)染色液,DAB显色

试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1005,G1211);Ghrelin抗体(美国Santa Cruz公司,批号sc-293422);山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗(Servicebio公司,批号G1211)。

1.4 仪器 WMT-100 Morris水迷宫视频分析系统(成都泰盟科技有限公司);RM2016型切片机(上海徠卡仪器有限公司);KD-P型组织摊片机(浙江金华科迪仪器设备有限公司);XSP-C204型显微镜(美国CIC公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 120只SD大鼠,雌雄各半,按照随机数字表法分为6组,每组雌雄各10只,分别为假手术组、模型组、远志散高、中、低剂量组、盐酸多奈哌齐组。实验药物用量按体表面积比率换算^[12],远志散高、中、低剂量组分别配置以12,6,3 g·kg⁻¹灌胃,相当于临床成人日用剂量的12,6,3倍。多奈哌齐组将盐酸多奈哌齐片研碎成粉末,制成混悬液以1.02 mg·kg⁻¹灌胃,相当于临床成人日用剂量的6倍。假手术组与模型组大鼠每日予生理盐水灌胃。各组灌胃容积均为10 mL·kg⁻¹,连续灌胃10周。实验期间,观察并记录各组大鼠摄食量变化。

2.2 动物模型制备 参照文献^[13]方法,6组大鼠均用10%水合氯醛腹腔注射麻醉,剃去脑顶局部毛发,把大鼠平颅头部固定在脑立体定位仪上,碘伏常规皮肤消毒,用无菌手术刀在头皮正中线位置切一纵行切口,长约1.5 cm,充分暴露前囟,根据大鼠脑立体定位图谱在脑正中线左右旁开2.0 mm,前囟后3.0 mm两侧分别用无菌牙科钻钻孔,钻孔深度为3.0 mm,避免颅脑内出血。除假手术组,各组大鼠均缓慢注射凝聚态A β_{1-40} (1 μ L·min⁻¹)5 μ L,进针深度4.0 mm。假手术组注射等体积生理盐水溶液,注射完毕均留针5 min,之后缝合伤口,并于伤口处使用阿米卡星喷雾,预防伤口感染。术后常规饲养1周。

2.3 Morris水迷宫行为学实验 根据文献方法^[14],实验连续5 d,分为定位航行和空间探索实验。定位航行实验历时4 d,记录动物从投放入水至寻找并爬上站台所需时间,即逃避潜伏期。如120 s内未找到站台,潜伏期记录为120 s。第5天进行空间探索实验,撤下原有站台,记录大鼠120 s内穿越平台次数、有效区(站台直径2倍范围)停留时间及有效区游泳路程。

2.4 标本采集与处理 末次行为学测试后,禁食,

自由饮水24 h,各组大鼠雌雄各取5只,10%水合氯醛腹腔注射麻醉。开胸暴露出心脏,经左心室插入灌流针,固定,切开右心耳,灌注生理盐水直到肺与肝脏颜色转白,再灌注4%多聚甲醛,大鼠出现剧烈摆尾后出针,断头取脑;打开腹腔,分离胃组织,沿胃大弯剪开整个胃,冲洗干净后剪取胃体、胃窦处的黏膜组织,将剪取的脑组织和胃黏膜组织分别放入4%的多聚甲醛固定液中,常温保存。

2.5 HE染色观察海马CA1区病理形态学改变 将放置于多聚甲醛固定液中的脑组织常规脱水、透明、石蜡包埋,连续冠状切片,片厚约5 μ m。切片脱蜡,进行HE染色,风干后中性树胶封片,显微镜下观察各组大鼠海马CA1区组织结构的改变。

2.6 免疫组化法检测海马及胃黏膜组织Ghrelin蛋白表达 分别取大鼠脑和胃黏膜组织,石蜡包埋,切片5 μ m。采用SP法进行免疫组化染色,切片常规脱蜡至水,将组织切片进行抗原修复,3%BSA封闭液室温封闭30 min,加入一抗Ghrelin(1:100),4 $^{\circ}$ C孵育过夜,滴加山羊抗兔、山羊抗小鼠(Ig)G二抗,室温孵育50 min,以上各步骤均用PBS漂洗3次。DAB显色,苏木素复染3 min,采用中性树胶封片,光学显微镜镜检。采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件进行半定量分析,结果判定以淡黄至棕黄色颗粒为阳性细胞表达,每张切片均随机各选取5个海马CA1区和胃黏膜组织阳性表达不重复的高倍视野,计算每张切片阳性染色部分的平均积分吸光度IA,取均值进行结果分析。

2.7 统计学分析 采用SPSS 23.0进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),方差齐时,组间均值两两比较采用SNK法;若方差不齐,改用邓尼特T3(Dunnett T3)检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对AD大鼠Morris水迷宫定位航行实验逃避潜伏期的影响 第4天,与假手术组比较,模型组雌雄大鼠的逃避潜伏期显著延长($P<0.01$);与模型组比较,远志散各剂量组雌雄大鼠的逃避潜伏期明显缩短($P<0.05, P<0.01$)。见表1。

3.2 对AD大鼠Morris水迷宫空间探索实验的影响 与假手术组比较,模型组雌雄大鼠穿越平台次数、有效区域停留时间及运动路程均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,远志散各剂量组雌雄大鼠穿越平台次数、有效区停留时间及运动路程均增加($P<0.05, P<0.01$)。见表2。

表1 远志散对Aβ诱导的SD大鼠在水迷宫测试中逃避潜伏期的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Yuanzhisan on escape latency of Aβ induced SD rats in water maze test ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第1天	第2天	第3天	第4天
假手术	-	46.19±12.16	26.45±10.06	17.83±5.83	13.53±2.61
模型	-	55.12±10.23	35.61±7.02	24.94±10.99	22.67±6.34 ¹⁾
远志散	3	46.83±9.46	24.80±10.74	19.67±9.29	13.87±1.88 ³⁾
	6	51.51±19.16	34.27±20.12	19.76±7.20	13.78±2.69 ³⁾
	12	44.90±7.77	33.00±15.76	16.60±5.63	14.27±3.69 ²⁾
多奈哌齐	0.102	46.67±9.79	31.95±7.67	19.58±7.34	15.25±2.00 ²⁾

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同)。

表2 远志散对Aβ诱导的SD大鼠在水迷宫测试中空间探索的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

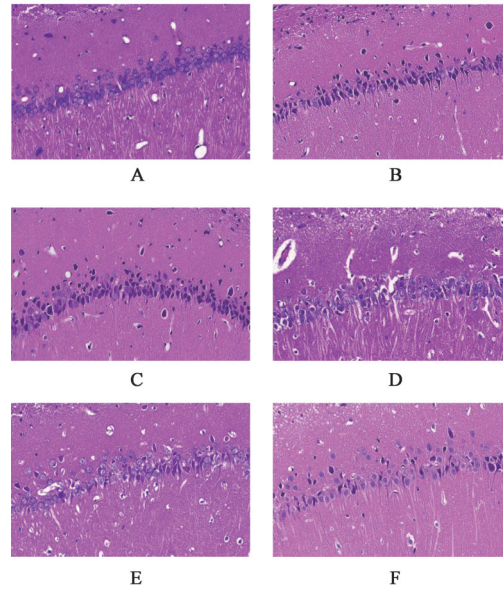
Table 2 Effect of Yuanzhisan on spatial search test of Aβ induced SD rats in water maze test ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	穿越平台数/次	有效区域停留时间/s	有效区域运动路程/mm
假手术	-	5.28±0.75	5.95±0.78	837.11±75.33
模型	-	3.35±0.72 ¹⁾	3.73±0.63 ¹⁾	624.84±82.51 ¹⁾
远志散	3	4.60±0.61 ³⁾	5.08±0.76 ³⁾	757.28±93.72 ³⁾
	6	4.63±0.87 ³⁾	4.92±0.86 ³⁾	732.21±64.28 ³⁾
	12	4.09±0.62 ²⁾	4.50±0.55 ²⁾	723.50±73.45 ³⁾
多奈哌齐	0.102	4.14±0.44 ³⁾	4.34±0.61 ²⁾	690.61±43.11 ²⁾

3.3 对AD大鼠海马CA1区病理形态学的影响

假手术组雌雄大鼠海马CA1区神经元结构正常,细胞排列整齐,形态完整,胞核与胞质界限清晰,核仁明显;模型组雌雄大鼠海马CA1区细胞排列紊乱,间隙增大,数量减少,且形态不完整,胞核深染固缩,呈三角或不规则形,核仁不明显;各给药组大鼠海马CA1区细胞排列较稀疏,形态结构较模型组有明显改善,胞核与胞质界限较清晰,但也存在胞核固缩。见图1。

3.4 对AD大鼠进食量的影响 给药第4周,与假手术组比较,模型组雌雄大鼠平均每日进食量明显减少($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,远志散高、中剂量组雌雄大鼠每日进食量明显增加($P<0.05, P<0.01$);与多奈哌齐组比较,远志散高、中剂量组雄鼠每日进食量明显增加($P<0.05$)。给药第8周,与假手术组比较,模型组雌雄大鼠平均每日进食量显著减少($P<0.01$);与模型组比较,远志散各剂量组雌鼠每日进食量显著增加($P<0.01$),高、中剂量组雄鼠每日进食量明显增加($P<0.05, P<0.01$);与多奈哌齐组比较,远志散高剂量组雌雄大鼠和中剂量组雌鼠每日进食量均增加($P<0.05$)。见表3。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 多奈哌齐组; D. 远志散低剂量组; E. 远志散中剂量组; F. 远志散高剂量组(图2~5同)

图1 远志散对AD大鼠海马CA1区病理改变的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Yuanzhisan on pathological changes in hippocampal CA1 area of AD rats (HE, ×400)

3.5 对AD大鼠海马CA1区Ghrelin表达的影响

假手术组雌雄大鼠海马CA1区Ghrelin阳性表达细胞染色均匀,核仁深染;模型组雌雄大鼠偶见Ghrelin表达;经远志散干预后,Ghrelin在海马CA1区的表达较模型组均有不同程度升高,阳性细胞染色数量增加、变深,见图2。与假手术组比较,模型组海马CA1区Ghrelin的平均IA值明显降低($P<0.01$);与模型组比较,远志散各剂量组海马CA1区Ghrelin表达明显增加($P<0.05, P<0.01$);与多奈哌齐组比较,远志散各剂量组海马CA1区Ghrelin平均IA值明显增加($P<0.05, P<0.01$),见表4。

3.6 对AD大鼠胃黏膜组织Ghrelin表达的影响

假手术组雌雄大鼠胃黏膜Ghrelin阳性表达细胞染色较深;模型组雌雄大鼠阳性细胞染色较假手术组明显减少;经远志散干预后,Ghrelin在胃黏膜的

表 3 远志散对各组大鼠进食量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Yuanzhisan on food intake of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 4 周雌鼠	第 4 周雄鼠	第 8 周雌鼠	第 8 周雄鼠
假手术	-	25.8±0.7	26.4±1.0	26.8±0.8	29.8±0.3
模型	-	21.8±1.9 ¹⁾	23.2±0.5 ²⁾	21.8±1.2 ²⁾	25.6±0.9 ²⁾
远志散	3	24.4±1.0	24.5±0.9	25.4±0.8 ⁴⁾	27.1±0.9
	6	25.4±1.1 ³⁾	25.7±0.6 ^{4,5)}	26.6±0.4 ^{4,5)}	28.5±1.8 ³⁾
	12	25.6±1.3 ³⁾	26.2±0.4 ^{4,5)}	26.7±1.0 ^{4,5)}	29.1±0.8 ^{4,5)}
多奈哌齐	0.102	23.2±0.6	24.2±0.4	24.4±0.7	26.5±0.2

注:与假手术组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型组比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01;与多奈哌齐组比较⁵⁾P<0.05。

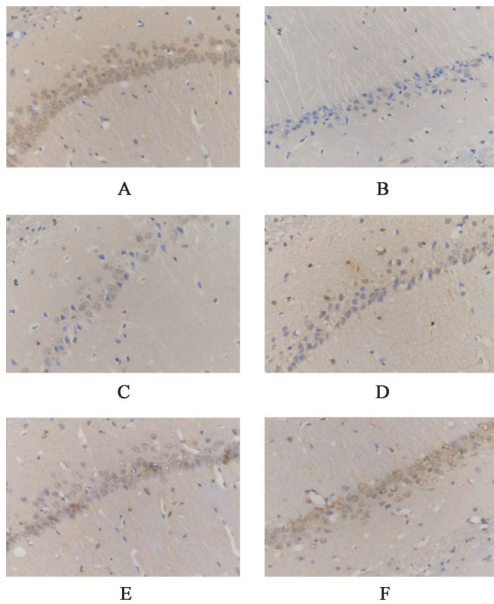


图 2 远志散对 AD 大鼠海马 CA1 区 Ghrelin 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of Yuanzhisan on expression of Ghrelin in hippocampal CA1 area of AD rats (IHC, ×400)

表达较模型组均有不同程度的升高,阳性细胞染色数量增加、变深,见图 3。与假手术组比较,模型组胃黏膜 Ghrelin 的平均 IA 值显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,远志散各剂量组胃黏膜 Ghrelin 表达显著增加 ($P<0.01$);与多奈哌齐组比较,远志散各剂量组胃黏膜 Ghrelin 平均 IA 值显著增加 ($P<0.05, P<0.01$),见表 4。

4 讨论

AD 属中医“健忘”“呆病”范畴,AD 的发生与衰老密切相关。中医认为 AD 发病在脑,与脾胃关系密切,脾为后天之本,在衰老及抗衰老过程中发挥着极为重要的作用^[15]。年老体虚之人,脏腑功能衰弱,脾虚无力运化,影响水液正常代谢,水津不化,聚而成痰,痰浊上蒙清窍,脑失所养,神机失用,发为呆病。脾胃为气血生化之源,脑为髓海,赖脾胃

表 4 远志散对 AD 大鼠海马 CA1 区和胃黏膜组织 Ghrelin 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Yuanzhisan on expression of Ghrelin in hippocampal CA1 area and gastric mucosa of AD rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	海马 CA1 区	胃黏膜
假手术	-	0.277±0.011	0.462±0.015
模型	-	0.162±0.015 ¹⁾	0.236±0.031 ¹⁾
远志散	3	0.222±0.012 ^{2,4)}	0.333±0.014 ^{3,4)}
	6	0.254±0.013 ^{3,5)}	0.377±0.018 ^{3,5)}
	12	0.260±0.015 ^{3,5)}	0.398±0.020 ^{3,5)}
多奈哌齐	0.102	0.198±0.020	0.301±0.017

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;与多奈哌齐组比较⁴⁾P<0.05,⁵⁾P<0.01。

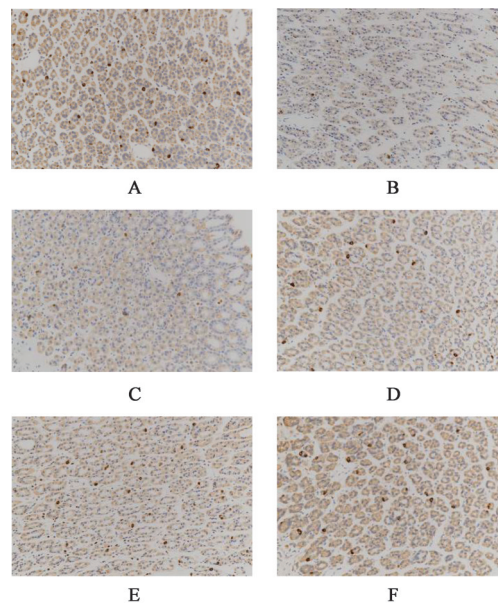


图 3 远志散对 AD 大鼠胃黏膜组织 Ghrelin 表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 3 Effect of Yuanzhisan on expression of Ghrelin in gastric mucosa of AD rats (IHC, ×200)

运化水谷,化生气血充养,脾虚失运致津聚为痰,痰浊易阻滞气机,气化失司,郁久化热,故本病以“虚、痰、火”为其基本病机,而脾胃功能失常贯穿 AD 整

个过程^[16-17]。脑为元神之府,主宰人体的生命活动,调控和统帅脏腑功能活动,故脾胃功能的发挥必然受脑的主宰。脾主运化,与体内糖代谢、脂代谢、能量代谢密切相关,而糖脂、能量代谢异常在AD发生发展的各个阶段皆有表现,与认知功能障碍关系密切^[18-19]。《黄帝内经》载“脾藏意主思”,记而不忘,可见脾的功能与记忆过程有关^[20-21],过思则伤脾,进一步说明脾胃与脑存在着双向调节机制,这与现代医学脑肠肽的概念相一致。

古方远志散出自宋代的《圣济总录·补益门》,书中载远志散“治健忘,补心气,强力益志”,具有益气化痰开窍的功效。本方由远志、石菖蒲、茯苓、人参、黄连组成,远志苦温,石菖蒲辛苦微温,均有化痰开窍,宁神益智之功,《本草经解》言远志“补不足,除邪气,利九窍,益智慧,耳目聪明不忘,强志”,《证类本草》言石菖蒲“聪耳目,不忘,不迷惑,延年,益心智,高志不老”;茯苓气味俱淡,性平,健脾化痰,宁心安神,《医学衷中参西录》解茯苓“性能化胃中痰饮为水液,引之输于脾而达于肺……有益于脾胃及肺”;人参味甘气微温,主补五脏,安定心神,《证类本草》言其“定魂魄,止惊悸,除邪气,明目,开心,益智”;黄连苦寒,清心泻火解毒,《本草经疏》言黄连“久服令人不忘,心家无火则清,清则明,故不忘”。五药相合,益气健脾,化痰开窍,同时兼有清心安神的功效,可针对AD认知功能障碍发挥较好作用。

脑肠肽是脾、脑之间共同存在的肽类激素,在调节胃肠功能、改善记忆能力等方面具有重要作用。作为一种脑肠肽,Ghrelin是生长激素促分泌素受体(GHS-R)的唯一内源性配体,主要由胃黏膜泌酸腺X/A样细胞产生和分泌^[22]。同时该肽在许多其他器官中也有表达,如结肠、盲肠、海马及大脑皮质,尽管表达水平远低于胃^[23]。Ghrelin具有众多生物学功能,主要通过胃肠道和中枢神经系统发挥作用。有研究显示,Ghrelin在消化道发挥着保护胃肠黏膜、促进胃酸分泌、调节饮食摄取及能量代谢等作用,而这些作用可以被阿托品或者切断迷走神经所阻断^[24]。在胃中合成的Ghrelin可以通过血脑屏障进入海马区域^[25],而海马CA1区是中枢神经系统中与学习记忆密切相关的区域,因此,Ghrelin被认为具有抑制海马神经元凋亡、保护神经元免受炎症、氧化应激及饥饿等影响的作用,能够在认知功能障碍中发挥有益作用^[26]。多项研究结果亦显示^[27-28],在AD动物模型中,腹腔注射Ghrelin可以增

加海马神经元突触数量,显著改善小鼠空间学习记忆能力,而海马注射Ghrelin或电刺激下丘脑弓状核可以激发胃扩张敏感神经元对海马Ghrelin的反应,促进胃运动,表明Ghrelin在脑和胃肠运动中起着相互促进的作用。此外,神经退行性疾病通常同时存在有代谢功能障碍,有研究将新陈代谢的改变与患AD和痴呆症的风险增加联系起来,而Ghrelin可能参与了调节衰老过程中代谢和神经退行性疾病之间的关系^[29],提示Ghrelin可能是将代谢和认知功能联系起来的一个重要枢纽,其机制可能通过调控机体物质、能量代谢,促进海马和胃黏膜组织Ghrelin的分泌,减轻海马神经元损伤,从而起到保护神经、改善记忆的作用。因此,阐明Ghrelin在AD中的潜在作用机制,有望发现可能对大脑有益的新的治疗靶点和生活方式因素。

在本研究中,以AD大鼠模型为基础,评估了远志散灌胃10周干预治疗对雌雄大鼠进食量的影响,并采用免疫组化法观察远志散对AD大鼠海马CA1区和胃黏膜组织脑肠肽Ghrelin表达水平的影响及其关联,结果显示经远志散干预的各治疗组AD大鼠进食量较模型组和多奈哌齐组明显增加,远志散可显著上调AD大鼠海马CA1区和胃黏膜组织脑肠肽Ghrelin的表达水平。由此推测,作为开窍益智的经典名方,远志散能较好改善AD模型大鼠学习记忆障碍,增加大鼠每日进食量,可能与其上调海马CA1区及胃黏膜组织Ghrelin含量有关。

综上所述,远志散通过调控Ghrelin表达能有效阻止AD的发生进展,改善大脑认知障碍和记忆损伤。脑肠肽Ghrelin作为研究中医脾脑相关理论的微观物质,为远志散通过调理脾胃功能治疗AD提供了客观依据,也为中医药从脾胃论治神经退行性疾病提供了必要的实验依据。然而本研究只是检测了远志散对AD大鼠改善学习记忆的能力及对海马CA1区和胃黏膜组织Ghrelin表达的影响,基于AD,代谢与脾脑之间的联系,下一步仍需就Ghrelin与机体物质、能量代谢之间的关系作进一步的研究揭示,为远志散及从脾论治AD在临床上的应用提供更为完善的理论依据和实验基础。

[参考文献]

- [1] 刘伯源,肖义泽.阿尔茨海默病诊断研究进展[J].现代医药卫生,2016,32(24):3796-3799.
- [2] CHARLSON F J, BAXTER A J, CHENG H G, et al. The burden of mental, neurological, and substance use

- disorders in China and India: a systematic analysis of community representative epidemiological studies[J]. *Lancet*, 2016, 388(10042):376-389.
- [3] GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(5):459-480.
- [4] JIA L, QUAN M, FU Y, et al. Dementia in China: epidemiology, clinical management, and research advances[J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(1):81-92.
- [5] 王国权,周鹏,谢道俊,等. 黄蒲通窍胶囊对阿尔茨海默病大鼠海马EGFR-PLC γ 信号通路的影响[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(9):2165-2171.
- [6] NOGUEIRAS R, TSCHÖP M H, ZIGMAN J M. Central nervous system regulation of energy metabolism: Ghrelin versus leptin[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1126:14-19.
- [7] ESLAMI M, SADEGHI B, GOSHADROU F. Chronic Ghrelin administration restores hippocampal long-term potentiation and ameliorates memory impairment in rat model of Alzheimer's disease[J]. *Hippocampus*, 2018, 28(10):724-734.
- [8] JEONG Y O, SHIN S J, PARK J Y, et al. MK-0677, a Ghrelin agonist, alleviates amyloid beta-related pathology in 5XFAD mice, an animal model of Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6):1800.
- [9] 郭微艺,蒋薇,赵思琪,等. 基于“脾不及则九窍不通”诠释益气开窍法防治痴呆的科学内涵[J]. *中医杂志*, 2019, 60(20):1798-1800.
- [10] 郭静,李斌,王智超,等. 远志散对D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆及氧化应激水平的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(9):2144-2147, 2314.
- [11] 李斌,孙中莉,陈冠儒,等. 远志散对东莨菪碱致记忆获得性障碍模型小鼠行为学和脑内AChE活性的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2017, 34(5):733-736.
- [12] 陈奇. *中药药理研究方法学*[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006:18.
- [13] YANG Z Q, YANG S F, YANG J Q, et al. Protective effects and mechanism of total coptis alkaloids on a beta 25-35 induced learning and memory dysfunction in rats[J]. *Chin J Integr Med*, 2007, 13(1):50-54.
- [14] 李斌,谢淑玲,彭丽燕,等. 3种拟痴呆动物模型在Morris水迷宫行为学测试中学习记忆行为的差异[J]. *医学研究生学报*, 2014, 27(7):683-685.
- [15] 杨靖,李德新. 论脾虚与衰老[J]. *中国中医药信息杂志*, 2004, 11(1):14-15.
- [16] 李瑞,胡玉萍,袁德. 从脾胃论治老年性痴呆[J]. *中医杂志*, 2017, 58(5):384-386, 393.
- [17] 李斌,张怡,潘怡. 基于“年长则求之于府”理论阐释老年性痴呆的防治思路[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(11):2303-2305.
- [18] 郑琴,罗俊,章德林. 基于糖代谢、脂代谢和能量代谢探讨脾脏与阿尔茨海默病的关系[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(5):178-185.
- [19] AN Y, VARMA V R, VARMA S, et al. Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer's disease [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(3):318-329.
- [20] 于迎,宁艳哲,贾竑晓. “脾藏意主思”的现代心理学内涵[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2018, 24(7):890-893.
- [21] 张辉,张先庚,王红艳. 论从丰富环境改善认知构建大鼠“思”模型:学习记忆与“脾主思”[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(1):21-23.
- [22] KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, 402(6762):656-660.
- [23] FERRINI F, SALIO C, LOSSI L. Ghrelin in central neurons[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2009, 7(1):37-49.
- [24] WANG L, MURPHY N P, STENGEL A, et al. Ghrelin prevents levodopa-induced inhibition of gastric emptying and increases circulating levodopa in fasted rats[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2012, 24(5):e235-e245.
- [25] RHEA E M, SALAMEH T S, GRAY S, et al. Ghrelin transport across the blood-brain barrier can occur independently of the growth hormone secretagogue receptor [J]. *Mol Metab*, 2018, 18:88-96.
- [26] JIAO Q, DU X, LI Y, et al. The neurological effects of Ghrelin in brain diseases: beyond metabolic functions [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, 73:98-111.
- [27] 王俊波,董静尹,徐麟浩. Ghrelin对小鼠空间记忆和海马神经元突触及生长激素促分泌素受体表达的影响[J]. *解剖学报*, 2012, 43(3):322-327.
- [28] 吴琼,杨丹丹,郭菲菲. 生长素对胃运动和对海马胃肠敏感神经元放电活动的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(5):832-838.
- [29] KAPOGIANNIS D, MATTSON M P. Disrupted energy metabolism and neuronal circuit dysfunction in cognitive impairment and Alzheimer's disease [J]. *Lancet Neurol*, 2011, 10(2):187-198.

[责任编辑 周冰冰]