

复方颐神养脑胶囊对多发性脑梗死痴呆大鼠的影响

周青罡¹, 李俊^{2,3*}, 舒心莹¹, 朱伟², 陈筱², 陈兰英^{2,3}

(1. 江西汇仁药业有限公司, 南昌 330000; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006;
3. 江西中医药大学, 南昌 330006)

[摘要] 目的: 观察中药复方颐神养脑胶囊(YSYN)对大鼠多发性脑梗死痴呆(MID)的疗效及作用机制。方法: 3月龄SD大鼠90只, 于左侧颈外动脉注入复合血栓诱导剂, 复制多发性脑梗死痴呆模型, 动物随机分为模型组、YSYN高剂量组(960 mg·kg⁻¹)、YSYN中剂量组(480 mg·kg⁻¹)、YSYN低剂量组(240 mg·kg⁻¹)、西药阳性组(易倍申)(0.5 mg·kg⁻¹)以及YSYN合西药阳性药组(480 mg·kg⁻¹ + 0.5 mg·kg⁻¹), 另设10只动物为假手术组, 造模后第3天, 各组均以10 mL·kg⁻¹灌胃给药, 1次/d, 连续4周, 模型组和假手术组给予等量蒸馏水。采用Morris水迷宫法进行学习记忆测试; 采用酶联免疫法测定海马组织去甲肾上腺素(NE)水平; 采用比色法测定海马组织乙酰胆碱酯酶(AchE)、乙酰胆碱转移酶(CHAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠学习记忆能力显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 海马组织AchE含量显著升高($P < 0.05$), 海马组织CHAT、NE以及GSH-Px含量显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, YSYN能够显著提高多发性脑梗死痴呆大鼠学习记忆能力($P < 0.05$); 显著降低多发性脑梗死痴呆大鼠海马组织AchE含量, 提高多发性脑梗死痴呆大鼠海马组织CHAT、NE及GSH-Px含量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: YSYN对MID具有良好的保护作用, 其作用机制可能是通过调节海马组织内去甲肾上腺素、乙酰胆碱及谷胱甘肽的活性来实现的。

[关键词] 多发性脑梗死痴呆; 颐神养脑胶囊; 乙酰胆碱; 谷胱甘肽过氧化物酶; 去甲肾上腺素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0107-04

[doi] 10.11653/syjf2014040107

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131217.1235.002.html>

[网络出版时间] 2013-12-17 12:35

[收稿日期] 20130618(006)

[基金项目] 国家科技重大专项: 重大新药创制(2011ZX09101-003-02)

[通讯作者] *李俊, 讲师, 博士学位, 从事中药药理研究工作, Tel: 18070090101, E-mail: lj19820806@163.com

- [8] Wicha M S. Cancer stem cells and metastasis: lethal seeds[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(19): 5606.
- [9] 张倩倩, 李春伶, 王运平, 等. 树突状细胞转染绿色荧光蛋白基因后生长特性和表型的变化[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(24): 2607.
- [10] Hsu D H, Paz P, Villaflor G, et al. Exosomes as a tumor vaccine: enhancing potency through direct loading of antigenic peptides [J]. Immunother, 2003, 26(5): 440.
- [11] Tao Yang, Ying Xiang, Yucheng Li, et al. Clinical study of co-treatment with DC-CIK cells for advanced solid carcinomas [J]. Chinese-German J Clin Oncol, 2011, 10(6): 354.
- [12] 张介宾, 孙玉信, 朱平生. 景岳全书[M]. 上海: 上海第二军医大学出版社, 2006: 621.
- [13] 陈谦. 六味地黄丸的药理作用与临床应用探讨[J]. 中国医药指南, 2011, 7(21): 251.
- [14] 祝和成, 吴尚辉, 黄柏英, 等. 人DC与黑色素瘤细胞融合疫苗体外诱导特异性抗肿瘤CTL[J]. 中南大学学报, 2008, 33(11): 1012.
- [15] Alexander K, Gernot S, Peter W, et al. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. [J]. Nature Medicine, 2000; 6(3): 332.
- [16] Chiang C L, Ledermann J A, Aitkens E, et al. Oxidation of ovarian epithelial cancer cells by hypochlorous acid enhances immunogenicity and stimulates T cells that recognize autologous primary tumor[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(15): 4898.

[责任编辑 邹晓翠]

Influence of Compound Yishen Yangnao Capsule on Multi-infarct Dementia Rats

ZHOU Qing-gang¹, LI Jun^{2,3*}, SHU Xin-ying¹, ZHU Wei², CHEN Xiao², CHEN Lan-ying^{2,3}

(1. Jiangxi Huiren Pharmaceutical Co. Ltd., Nanchang 330000, China; 2. The National Pharmaceutical Engineering Center (NEPC) for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of compound Yishen Yangnao capsule (YSYN) on multi-infarct dementia (MID) rats and its mechanism. **Method:** The multi-infarct dementia model, were induced by injecting compound thrombosis inducer into the external carotid artery. Sixty SD rats were randomly divided into model group, YSYN high dose group ($960 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), middle dose group ($480 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), low dose group ($240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), western medicine positive group (Ebixa, $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), YSYN + Ebixa group ($480 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} + 0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), sham operation group. From 3 days after modeling, corresponding drugs were given once daily, lasting four weeks. The Morris water maze was used to test the abilities of learning-memory, enzyme-linked immunosorbent was used to assay the levels of norepinephrine (NE) of hippocampal tissue, and chemocolorimetry was used to assay the levels of acetylcholinesterase (AChE), cholinacetyltransferase (CHAT), glutathione peroxidase (GSH-Px). **Result:** Compared with sham operation group, learning memory abilities of model group rats were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the content of AChE significantly rose ($P < 0.05$) and CHAT and GSH-Px significantly decreased. Compared with model group, the YSYN could significantly improve the abilities of learning memory in MID rats ($P < 0.05$); decreased the level of AChE increased the level of CHAT, NE and GSH-Px ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The YSYN could significantly improve the abilities of learning memory in MID rats, and has a good protective effect on MID rats. Its mechanism may adjust the level of NE, AChE, CHAT and GSH-Px of hippocampus tissue.

[Key words] multi-infarct dementia; YSYN; Ach; GSH-Px; NE

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是指由各种脑血管疾病引起的脑功能障碍而产生的一种获得性智能损害综合征, 是一种慢性的进行性疾病, 属于中医学的痴呆范畴^[1]。而引起 VD 的原因较多^[2]: 包括多发性脑梗死痴呆 (multi-infarct dementia, MID), 大面积脑梗死性痴呆, 皮层下动脉硬化性脑病, 出血性痴呆以及其他原因引起的痴呆。而其中以 MID 最为常见, MID 是由多发的梗死灶所致的痴呆, 可累及脑皮质、脑皮质下及基底节区。本实验观察中药复方颐神养脑胶囊 (YSYN) 对大鼠多发性脑梗死痴呆的保护作用, 为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠, 雄性, 体重 $180 \sim 220 \text{ g}$, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 动物许可证号 SCXK(湘)2009-0004。动物于实验室适应性喂养 1 周, 自由饮食、饮水。

1.2 药物 颐神养脑胶囊 (YSYN, 专利号 ZL031211763, 由人参、枸杞子、远志、骨碎补、何首乌、黄精、石菖蒲、荷梗、郁金、紫苏子、鹿茸、肉苁蓉 12 味中药材组成, 江西汇仁药业有限公司提供, 批号 1202001; 易倍申 (盐酸美金刚片, 丹麦灵北药厂生产, 批号 154390)。

1.3 仪器及试剂 Morris 水迷宫 (淮北正华生物仪器设备有限公司), UV-1800 型分光光度计 (北京瑞利分析仪器公司), 酶标仪 (美国赛默飞思尔科技公司)。水合氯醛 (中国医药上海化学试剂公司, 批号 120509), 青霉素钠盐 (华北制药有限公司, 批号 120302), 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 试剂盒 (批号 20121203), 乙酰胆碱转移酶 (CHAT) 试剂盒 (批号 20121203), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒 (批号 20121203) 均为南京建成生物工程研究所产品, 去甲肾上腺素 (NE) ELISA 试剂盒 (西塘生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 模型制备^[3-4] 大鼠随机分为两组,即假手术组(10只)和造模组(90只),大鼠术前12h禁食,不禁水,用10%水合氯醛(350 mg·kg⁻¹)ip麻醉大鼠,仰卧位固定于手术台上,颈前部手术区域去毛,碘酒消毒,切口位于颈正中线左侧旁开0.5 cm处,长约1 cm。钝性分离皮下组织后,于切口正下方的斜方肌与气管夹角处可见颈总动脉搏动。分离左颈总动脉和颈外动脉,将复合血栓诱导剂1 mL·kg⁻¹(ADP 1.25 mmol·L⁻¹;凝血酶 12.5 U·mL⁻¹;肾上腺素 1 g·L⁻¹,按100:200:5比例混合)注入颈外动脉,术后缝合肌层、皮肤。假手术组注射等量生理盐水。术后注射青霉素,连续3 d,防止伤口感染。

2.2 动物分组及给药 于造模后第3天,将所有造模大鼠随机分组,即模型组、YSYN高、中、低剂量组(960,480,240 mg·kg⁻¹)、西药阳性组(易倍申0.5 mg·kg⁻¹)以及YSYN合西药易倍申组(480+0.5 mg·kg⁻¹),各组药物均用蒸馏水配制,以10 mL·kg⁻¹灌胃给药,1次/d,连续4周,模型组和假手术组给予等量蒸馏水。

2.3 Morris水迷宫实验 于给药4周后进行Morris水迷宫实验,Morris水迷宫法^[5-6]:用于测量大鼠对水迷宫学习获取能力。平台位于水下2 cm,实验时把大鼠每次随机面朝池壁放入水池,由于大鼠的求生本能,

大鼠将在水池内游泳直到找到隐匿在水面下的平台为止,120 s未找到平台者,将其引至平台。大鼠熟悉平台2次后,每只大鼠每天上、下午各训练1次,连续训练3 d,记录第4天寻找平台的时间(逃避潜伏期)和游泳途径(过程),该数据反映大鼠的学习记忆能力。

2.4 海马组织匀浆制备 于Morris水迷宫测试后第2天,股动脉放血处死全部动物,取大鼠海马组织,分析天平上准确称取海马组织0.2 g,按质量体积1:9加入生理盐水1.8 mL,在冰浴中进行匀浆,获得海马组织匀浆,匀浆于4℃保存待测。

2.5 指标检测 取脑海马组织匀浆,采用比色法测定海马组织中AchE,AHAT的含量;采用酶联免疫法测定海马组织中NE的含量;采用比色法测定海马组织中GSH-Px的含量。

2.6 统计方法 所用计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0 for windows统计软件进行数据分析,计量资料组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对学习记忆能力的影响(Morris水迷宫) 与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期和逃避总路程显著延长($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,YSYN能够显著缩短模型大鼠逃避潜伏期和逃避总路程($P < 0.05$)。见表1。

表1 YSYN对多发性脑梗死痴呆大鼠学习记忆能力(Morris水迷宫)的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	逃避潜伏期/s	逃避总路程/cm
假手术	-	10	18.5 ± 15.6	240.6 ± 209.7
模型	-	10	51.3 ± 37.2 ²⁾	790.0 ± 572.0 ²⁾
YSYN	960	9	25.2 ± 20.6 ³⁾	395.3 ± 339.1 ³⁾
	480	10	26.2 ± 22.7 ³⁾	402.7 ± 406.7 ³⁾
	240	9	35.3 ± 37.1	432.8 ± 390.5
易倍申	0.5	10	19.6 ± 19.1 ³⁾	227.8 ± 246.1 ⁴⁾
YSYN+易倍申	480+0.5	10	16.4 ± 14.2 ⁴⁾	219.6 ± 299.9 ⁴⁾

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⁾ $P < 0.01$, (表2同)。

3.2 对中枢胆碱能系统的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马组织AchE含量显著升高($P < 0.05$),CHAT含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,YSYN能够显著降低模型大鼠海马组织AchE含量($P < 0.05$),升高模型大鼠海马组织CHAT含量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表2。

3.3 对单胺类神经递质NE及GSH-Px的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马组织NE和GSH-Px含量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,YSYN能够显著升高模型大鼠海马组织NE和GSH-Px含量($P < 0.01$, $P < 0.05$)。见表2。

4 讨论

VD是指由各种脑血管疾病引起的脑功能障碍而产生的一种获得性智能损害综合征,主要表现为持续性的认知功能障碍,包括记忆力、语言功能、视空间能力、认知功能(计算、理解、判断、抽象思维、学习能力等)障碍。胆碱能神经递质失调是VD患者认识能力障碍产生的病理生理学机制之一,通过调节胆碱能神经递质含量防治VD也成为了可能^[5]。单胺类神经递质在缺血性脑损伤的发生发展过程中发挥着重要作用,急性脑缺血后单胺类递质在脑组织中含量的降低主要是由于突触体对神经

表 2 YSYN 对多发性脑梗死痴呆大鼠海马组织 AchE, CHAT, NE, GSH-Px 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	AchE/U·mg ⁻¹	CHAT/U·g ⁻¹	NE/ng·L ⁻¹	GSH-Px/U·L ⁻¹
假手术	-	10	1.65 ± 0.36	271.42 ± 29.77	342.21 ± 85.26	698.82 ± 68.07
模型	-	10	2.12 ± 0.60 ¹⁾	205.60 ± 65.37 ²⁾	185.61 ± 78.83 ²⁾	492.63 ± 57.06 ²⁾
YSYN	960	9	1.68 ± 0.43 ³⁾	264.83 ± 25.10 ⁴⁾	248.77 ± 55.67 ³⁾	598.98 ± 70.99 ⁴⁾
	480	10	1.72 ± 0.42 ³⁾	257.35 ± 24.70 ³⁾	242.99 ± 68.19 ³⁾	557.97 ± 79.11 ³⁾
	240	9	1.61 ± 0.51 ³⁾	259.75 ± 28.36 ³⁾	194.03 ± 57.37	499.15 ± 87.73
易倍申	0.5	10	1.76 ± 0.52	226.92 ± 48.93	248.03 ± 68.67 ³⁾	625.37 ± 95.03 ⁴⁾
YSYN + 易倍申	480 + 0.5	10	1.92 ± 0.50	259.64 ± 44.50 ³⁾	314.12 ± 77.44 ⁴⁾	640.43 ± 109.99 ⁴⁾

递质再摄取障碍及脑细胞受损后递质外漏所致,同时兴奋性氨基酸释放增加,激活 N-甲基-D-天门冬氨酸受体, Ca²⁺ 内流增加,促进单胺类递质的进一步释放。细胞外液蓄积的单胺类递质已证实具有细胞毒性作用,反过来进一步引起脑组织损伤^[6-8]。

血管性痴呆是多种因素参与的复杂病理过程,而氧自由基引起的组织脂质过氧化损伤是其中重要的因素之一。在生理条件下,体内自由基的产生和清除处于生理性低水平的平衡状态,但在大脑遭受缺血性损伤是,动态平衡遭到破坏,自由基连锁反应发生,引起细胞膜脂质过氧化反应,造成细胞进一步损伤。SOD 和 GSH-Px 是机体内广泛存在的两种自由基清除剂,他们可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用^[9-10]。

中医认为肾虚是衰老的基础^[11-12],是许多老年性疾病的主要发病根源所在,而血管性痴呆则是最常见的老年性疾病。肾虚无以生髓充脑,神失所养,肾虚不能蒸化水湿,温煦推动气血运行则为痰为瘀痹阻清窍,神机失统,记忆匮乏,发为痴呆。因此本病的特点是因虚致实,虚实夹杂,而肾虚是血管性痴呆发生发展的根本原因。YSYN 是由江西汇仁药业有限公司开发的具有自主知识产权的中药新药复方制剂,处方由人参(生晒)、枸杞子、远志(蜜炙)、骨碎补、何首乌、黄精、石菖蒲、荷梗、郁金、紫苏子(炒)、鹿茸、肉苁蓉等 12 味中药材组成,具有补益肝肾,复智健脑的功效。本方在组方中紧紧抓住了血管性痴呆的发病原因,能够从根源上改善血管性痴呆的病理表现。

本实验研究结果发现,YSYN 能够显著缩短多发性脑梗死痴呆大鼠的逃避潜伏期和逃避总路程($P < 0.05$),能够显著降低多发性脑梗死痴呆大鼠脑组织 AchE 含量($P < 0.05$),提高脑组织 CHAT、NE 及 GSH-Px 含量($P < 0.05, P < 0.01$)。以上研究结果表明,YSYN 主要是通过增强中枢胆碱能神经系统分泌乙酰胆碱的功能,提高海马及下丘脑区单胺类神经递质含量,减轻脑组织脂质过氧化损伤来实现对血管性

痴呆的保护作用。这为 YSYN 治疗轻、中度血管性痴呆的临床应用提供了良好的理论基础。

[参考文献]

- [1] 陈俊抛,林煜,徐宾. 痴呆治疗学[M]. 北京:人民军医出版社,2002:63.
- [2] Staekenborg S S, van de Flier W M, van Straaten E C, et al. Neurological signs in relation to type of cerebrovascular disease in vascular dementia [J]. Stroke, 2008, 39(2):317.
- [3] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2006.
- [4] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006.
- [5] Amenta F, Di Tullio M A, Tomassoni D. The cholinergic approach for the treatment of vascular dementia: Evidence from pre-clinical and clinical studies [J]. Clin Exp Hypertens, 2002, 24(7):697.
- [6] 余恩欣,王芳,常永志. 脑复康软胶囊对血管性痴呆大鼠学习记忆功能的影响[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(1):33.
- [7] 郭荣惠. 老年性痴呆研究进展[J]. 国外医学情报, 2005, 26(1):4.
- [8] 张爱林,徐秋萍,孙建宁,等. 多发性脑梗死痴呆大鼠行为学和生化学改变及 CO-GBE 的保护作用[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(6):531.
- [9] 李子清,喻凯,赵焕英,等. 四物汤对血管性痴呆大鼠的认知功能与脑组织中 AchE、SOD、GSH-Px 活性的影响[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(3):4.
- [10] 王群,商永华,刘海云. 步长倍通对血管性痴呆大鼠脑组织丙二醛、谷氨酸及 GSH-Px 的影响[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(8):1472.
- [11] 张魁华,赖世隆,王奇,等. 补肾益智方对老年性痴呆模型动物空间探索学习记忆能力的改善作用[J]. 中草药, 2002, 33(12):1093.
- [12] 皋聪,王传社,巫冠中,等. 苁蓉总苷对血管性痴呆大鼠学习记忆的影响及机制研究[J]. 中草药, 2005, 36(12):1852.

[责任编辑 聂淑琴]