

醒脑益智胶囊不同配比 对阿尔茨海默病大鼠行为学的影响

张晓平, 侯林, 张龙霏, 聂克, 张召宝, 田景振*
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的: 观察醒脑益智胶囊各组成药物有效部位不同配比对阿尔茨海默病大鼠(AD)行为学的影响, 寻找药物最佳配伍比例。方法: 雄性 Wistar 大鼠随机分为假模型组、模型组、阳性药对照组(石杉碱甲 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、醒脑益智胶囊全方组及 8 种不同配比药物组。大鼠常规饲养 3 d 后, Morris 水迷宫训练 7 d, 进行 1.25% D-半乳糖腹腔注射($4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 连续 6 周, 联合 $A\beta_{1-40}$ 海马内注射 $2 \mu\text{L}$ ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 复合造模, 造模 1 周后, 连续 ig 给药 30 d, 采用 Morris 水迷宫实验观察不同配比药物改善学习记忆的作用。结果: 与模型组比较, 各给药组大鼠空间学习能力显著提高, 定向航行试验中搜索平台潜伏期缩短, 空间探索实验中跨台次数增加, 与模型组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中 4 组即冰片: 淫羊藿苷: 远志总皂苷: 三七总皂苷 45: 6.8: 32.6: 0 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 影响较为明显。结论: 醒脑益智胶囊各组成药物有效部位不同配比均具有改善大鼠空间学习记忆的能力, 但作用效果存在差异。

[关键词] 醒脑益智胶囊; 阿尔茨海默病; 行为学; Morris 水迷宫试验

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0221-04

[doi] 10.11653/syfj2013190221

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130807.1120.003.html>

[网络出版时间] 2013-08-07 11:20

Effect of Xingnao Yizhi Capsule with Different Proportions on Learning and Memory Abilities in Alzheimer's Disease Rats

ZHANG Xiao-ping, HOU Lin, ZHANG Long-fei, NIE Ke, ZHANG Zhao-bao, TIAN Jing-zhen*
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[收稿日期] 20130313(003)

[基金项目] 国家重大新药创制专项(2011ZX09102-003-06)

[第一作者] 张晓平, 硕士在读, 从事中药制剂研究, Tel: 0531-89628597, E-mail: xia_opingzhang@126.com

[通讯作者] * 田景振, 博士, 教授, 从事中药制剂研究, Tel: 0531-89628597, E-mail: tianjingzhen@163.com

- [7] 季旭明, 欧阳兵, 吴智春, 等. 温下方含药血清诱导 A549/DDP 细胞凋亡及对 Bcl-2, Bax, p53 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 123.
- [8] 陈武, 陈鹏英, 刘鹏, 等. 巴豆生物碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 17(11): 199.
- [9] 龙玲, 耿果霞, 李青旺, 等. 皂角刺抑制小鼠宫颈癌 U14 的生长及对增殖细胞核抗原和 p53 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(2): 150.
- [10] 袁丁, 熊正国, 张长城, 等. 皂角刺皂苷对前列腺癌 PC-3 细胞增殖抑制作用的研究[J]. 天津医药, 2008, 36(4): 280.
- [11] Oltvai Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74(4): 609.
- [12] 吕鸿燕. Bcl-2 家族与脑缺血/再灌注后神经细胞凋亡[J]. 中国现代医药杂志, 2008, 10(5): 141.
- [13] Craig R W. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis[J]. Leukemia, 2002, 16(4): 444.
- [14] Cole K A, Konhn E C. Calcium-mediated signal transduction: biology, biochemistry, and therapy[J]. Cancer Metastasis Rev, 1994, 13(1): 33.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: To study the effect of Xingnao Yizhi capsule with different proportions on learning and memory abilities in Alzheimer's disease rats and find the optimal proportion. **Method:** Male Wistar rats were randomly divided into 12 groups as following: sham operation group, model group, huperzine-A ($0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, Xingnao Yizhi capsule group and 8 effective parts with different proportions. After 3 days of routine breeding, Morris water maze was used to train the rats for 7 days. Alzheimer's disease model was reproduced by 1.25% *D*-galactose intraperitoneal injection ($4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) for six weeks, combined with β -amyloid protein 1-40 ($A\beta_{1-40}$) hippocampal injection $2 \mu\text{L}$ ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). One week after modeling, drugs were administered to rats by intragastric administration once every day for a month, evaluating rat learning and memory function with different proportions by Morris water maze test. **Result:** Compared with the model group, all groups improved the space learning ability. The mean escape latency was significantly shortened in place navigation test and the frequency of passing through the platform was obviously increased in spatial probe test, which showed an obvious difference in Morris water maze, more obviously in Xingnao Yizhi capsule (borneol: icariin: total polygala tenuifolia saponins: total Radix notoginseng saponins 45:6.8:32.6:0). **Conclusion:** Xingnao Yizhi capsule effective parts with different proportions have the effect of improving space learning and memory function, while the effect intensity may be different.

[Key words] Xingnao Yizhi capsule; Alzheimer's disease; ethology; Morris water maze test

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是老年人中常见的一种中枢神经系统退行性疾病,主要表现为慢性、进行性的认知功能障碍和学习记忆能力受损。随着人口老龄化的加剧,其发病率增高且随年龄的增加呈增长趋势,给患者及家庭带来很大负担^[1]。中医认为 AD 发病本质为本虚标实,气血阴阳衰少,病理产物堆积而致,治疗宜采用补肾益智、益气活血、开窍等法^[2]。因此中药治疗 AD 的研究也备受关注^[3-4]。“醒脑益智”方主要由远志、三七、淫羊藿、冰片 4 种药物配伍而成,具有活血醒脑,化痰开窍,补肾填髓的功效,是治疗 AD 的经验方。本实验将各种药材的有效部位制成胶囊,通过对各有效部位不同配比的研究观察其对 AD 大鼠行为学的影响,了解其对学习记忆能力的作用。

1 材料

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠 120 只,体重 180~220 g。由山东鲁抗医药股份有限公司质检中心实验动物室提供,动物合格证编号 SCXK(鲁)20080002。

1.2 药物

1.2.1 中药 醒脑益智方由远志、三七、淫羊藿、冰片组成。天然冰片 (江西吉安, GC, 95.17%)。除冰片外其他药材均购自于山东中医药大学门诊部,经山东中医药大学中药鉴定教研室李峰老师鉴定,符合《中国药典》2010 年版标准。各药材有效部位均为实验室自制,经提取、分离、纯化而得。远志总皂苷 (以细叶远志皂苷计 32.5%);三七总皂苷 (依照 2010 年版药典方法测定,三七皂苷 R_1 、人参皂苷

R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 、人参皂苷 R_e 、人参皂苷 R_d 的含量总计为 74.71%);淫羊藿苷 (HPLC, 93.61%)。正交试验设计的有效部位 8 种不同配比,见表 1。上述各组药品均使用蒸馏水配成溶液或混悬液,超声溶解,备用。

表 1 醒脑益智胶囊有效部位 8 种不同配比例量 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

配比组别	有效部位			
	冰片	淫羊藿苷	远志总皂苷	三七总皂苷
1	0	6.8	16.3	27.2
2	0	3.6	32.6	54.4
3	45	0	16.3	54.4
4	45	6.8	32.6	0
5	45	3.6	0	27.2
6	90	0	32.6	27.2
7	90	6.8	0	54.4
8	90	13.6	16.3	0

另按照醒脑益智原方的比例称取远志、三七和淫羊藿药材按传统方法制成水煎液,浓缩至适当浓度后放冷加入冰片,制成水煎剂药液,相当于生药 $0.49 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏放置。

1.2.2 试剂 *D*-半乳糖 (上海笛柏化学品有限公司,批号 p302003); $A\beta_{1-40}$ (Sigma 公司,批号 072K1289);石杉碱甲 (上海融禾医药科技发展有限公司,批号 121021);0.9% 氯化钠注射液 (辰欣药业股份有限公司,批号 1209268204)。

1.3 仪器 Morris 水迷宫系统 (淮北正华生物仪器

设备有限公司);数字型单臂脑立体定位仪(深圳瑞沃德生物仪器设备有限公司);Sartorius BT125D 电子天平;KQ-250E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组 将大鼠按体重随机分为 12 组,每组 10 只,分别为假造模组、模型组、阳性药物对照组(石杉碱甲 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、醒脑益智全方水煎剂组、表 1 中 8 种不同配比的实验药物,共 12 组。

2.2 阿尔茨海默病大鼠模型的建立^[5] 采用 D -半乳糖腹腔注射致衰老联合 $A\beta_{1-40}$ 海马内注射复合造模的方法。 D -半乳糖使用 0.9% 氯化钠注射液配制 1.25% 溶液,各模型组大鼠连续 ip ($4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 6 周,假模型组大鼠 ip 等体积的生理盐水。

$A\beta_{1-40}$ 以无菌生理盐水配制成 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温孵育 1 周,使其转变为凝聚态。大鼠麻醉后,固定于数字型单臂脑立体定位仪上,进行常规皮肤消毒后头部开口约 1.5 cm,前囟暴露,参照大鼠脑立体定位图谱,脑立体定位仪定位(以前囟点 Bregma 点为 0 点, AP 5.5 mm, ML 4.5 mm, DV-7.5 mm),标记后钻开颅骨,使用微量注射器向大鼠右侧海马区缓缓注入凝聚态的 $A\beta_{1-40}$ $2 \text{ } \mu\text{L}$,针停留 5 min,以使 $A\beta_{1-40}$ 充分弥散,然后缓缓起针,缝合皮肤,肌注青霉素抗感染,连续 7 d。假模型组按照同法注射等体积生理盐水,肌注青霉素抗感染。

2.3 给药 8 种不同配比组分别根据醒脑益智方中各药材比例以及各药中有效部位的含量确定成人应用各部位的中剂量,并根据等效剂量法换算为大鼠的剂量^[6]。石杉碱甲组给予等效剂量 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig(剂量按成人每日用量的 6 倍折算),正常水煎剂组 $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig,8 种不同配比给药组 ig 体积均为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,假模型组、模型组给予同等剂量的蒸馏水,各组每日 1 次,造模 1 周后,ig 给药,连续 30 d。

2.4 Morris 水迷宫试验^[7-8] 水迷宫为直径 150 cm,高 60 cm,水深 35 cm 的恒温圆形水池,水池分为 4 个象限,池壁上标有 4 个人水点,在第四象限置一圆形站台,平台低于水面 2 cm,水温 (25 ± 2) $^\circ\text{C}$ 。水池置于相对封闭空间内隔光,隔音,试验时水池周围参照物保持不变,灯光强度不变。试验包括:①定向航向试验:将大鼠分别从 4 个不同的人水点放入水中,记录 90 s 内大鼠寻找平台所需时间,即逃避潜伏期,若在规定时间内未找到平台,则逃避潜伏期记录为 90 s。②空间探索试验:在定向航向试

验结束后撤去平台,任选一入水点将大鼠面向池壁放入,记录在 90 s 内大鼠跨越原平台的次数。对每组实验大鼠造模后分别进行水迷宫学习记忆行为学测试,分别记录其逃避潜伏期和跨台次数。造模前对大鼠进行训练 Morris 水迷宫 7 d,记录 90 s 内逃避潜伏期及跨台次数,同法,ig 给药 30 d 后开始测试各组测试,分别记录各组逃避潜伏期和跨台次数。**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用双因素方差分析进行组间比较,认为 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对定向航行试验的影响 定向航行试验结果表明,与假模型组相比,模型组大鼠平均逃避潜伏期延长,说明造模成功。给药 30 d 后,醒脑益智胶囊不同配比的各剂量组与模型组比较,平均逃避潜伏期均缩短,均具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);各给药组之间比较,最佳配伍组合为配比 4 冰片:淫羊藿苷:远志总皂苷:三七总皂苷 45:6.8:32.6:0 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。见表 2。

3.2 对空间探索试验的影响 空间探索实验表明,与假模型组相比,模型组大鼠穿越平台次数减少。给药后醒脑益智胶囊不同配比的各剂量组与模型组相比,大鼠穿越平台的次数增加,具有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

4 讨论

阿尔茨海默病是老年人中常见病、多发病、疑难病,是老年机体特别是脑组织内多种因素失调所致,已经明确 β -淀粉样蛋白是老年性痴呆的主要神经病理特征之一老年斑的核心组成成分,在 AD 发病机制中具有关键作用^[9]。治疗老年性痴呆不是一个靶点、一种(个)药物成分所能解决的问题,需要针对病因病机采取多成分、多靶点、多途径的综合治疗,中药复方在延缓脑老化方面比单一药物治疗更有优势^[10]。由于理想的治疗老年性痴呆药物匮乏,对老年性痴呆的防治几乎束手无策,研制治疗老年性痴呆的药物已成为医药研发的紧迫而又重大的课题^[11]。

本研究从治疗老年性痴呆的经验方剂入手,通过行为学研究优选出中药最佳配方,通过组分配伍的方法产生一个治疗老年性痴呆疗效确切的中药创新药物。采用 D -半乳糖致衰老联合大鼠海马内注射凝聚态的 $A\beta_{1-40}$ 复合模型,模拟大鼠老年性痴呆的病理和行为学特征,以 Morris 水迷宫试验中的定向航行和空间探索试验作为行为学测试指标,实验

表 2 醒脑益智胶囊各有效部位不同配比对大鼠行为学测试的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	逃避潜伏期/s		跨台数/次	
		给药前	给药后	给药前	给药后
假模型	-	35.21 ± 10.74	34.62 ± 10.61	2.50 ± 0.85	2.80 ± 0.63
模型	-	41.65 ± 10.07	41.70 ± 12.48	2.30 ± 0.68	2.10 ± 0.74
石杉碱甲	5 × 10 ⁻⁵	41.18 ± 10.99	25.53 ± 6.03 ²⁾	2.10 ± 0.57	3.30 ± 0.82 ²⁾
醒脑益智水煎剂	1.96	41.344 ± 8.99	28.017 ± 6.88 ¹⁾	1.90 ± 0.73	3.00 ± 0.67 ¹⁾
配比 1	0.100 6	41.22 ± 15.75	28.40 ± 12.72 ¹⁾	2.40 ± 0.52	3.00 ± 0.82 ¹⁾
配比 2	0.181 2	42.74 ± 10.08	27.31 ± 13.30 ¹⁾	2.20 ± 0.63	2.90 ± 0.74 ¹⁾
配比 3	0.231 4	41.12 ± 18.74	20.94 ± 8.377 ²⁾	2.00 ± 0.67	3.30 ± 0.95 ²⁾
配比 4	0.168 8	41.03 ± 15.37	19.53 ± 6.594 ²⁾	2.20 ± 0.63	3.40 ± 0.97 ²⁾
配比 5	0.151 6	41.93 ± 10.01	29.30 ± 11.98 ¹⁾	2.10 ± 0.74	3.10 ± 0.99 ²⁾
配比 6	0.300 6	41.71 ± 9.58	27.54 ± 11.41 ¹⁾	2.20 ± 0.63	3.10 ± 0.75 ²⁾
配比 7	0.302 4	41.92 ± 21.11	22.64 ± 10.37 ²⁾	2.00 ± 0.67	3.40 ± 0.84 ²⁾
配比 8	0.239 8	41.89 ± 11.18	29.24 ± 14.21 ¹⁾	2.30 ± 0.67	2.90 ± 0.74 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01。

结果表明,各有效部位不同配比给药组大鼠逃避潜伏期缩短,平均跨台次数增多,对大鼠的空间学习记忆有一定的改善作用,给药后以 4 组即冰片:淫羊藿苷:远志总皂苷:三七总皂苷 45:6.8:32.6:0 (mg·kg⁻¹)影响较为明显,且大鼠定向航行和空间探索的结果具有一致性。

从有效部位最优配比组成来看,远志总皂苷和冰片对治疗效果有一定的影响,比较优选的处方与醒脑益智方原方水煎剂对大鼠老年性痴呆模型的治疗效果发现,通过对药材有效部位的提取纯化和比例筛选后,效果改善,达到了给药精炼化的目的。在醒脑益智方的基础上,将以药材入药转变为以药效部位和药效成分入药,使药物剂量更加精确可控,克服了以药材给药因药材质量不稳定造成的实际给药量不稳定的问题,为药物的筛选提供理论依据。

[参考文献]

[1] 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.
[2] 马宜明,李俊,金涌.中医药关于老年性痴呆的发病机制及治疗进展[J].安徽医药,2002,6(4):3.

[3] 张磊,杨苏蓓.老年痴呆症发病机制下的治疗药物研究[J].中国现代药物应用,2010,4(20):238.
[4] 卫泽武,郑笛,张梅玲,等.中药治疗老年痴呆症的实验研究近况[J].中医药信息,2005,10(16):14.
[5] 李林,夏保芦,茹立强.老年性痴呆模型大鼠学习记忆功能障碍的实验探讨[J].江汉大学学报:自然科学版,2009,37(1):77.
[6] 陈奇,王建华.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993:33.
[7] 吕诚,胡小令,祝高春,等.β-淀粉样蛋白所致模拟老年性痴呆动物模型的建立[J].江西医学院学报,2005,45(1):28,39.
[8] 袁电杰,张印发,姚春香.灵芝多糖对阿尔茨海默病模型大鼠海马内突触及突触素表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(3):151.
[9] 叶伟,唐孝威.老年性痴呆症发病机制及其防治措施的研究进展[J].国外医学:遗传学分册,2005,28(6):379.
[10] 杨斌.复方地黄对老年痴呆动物模型学习记忆能力的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(3):195.
[11] 唐洁.中医药治疗老年痴呆症的现状及展望[J].辽宁中医药大学学报,2008,10(8):169.

[责任编辑 聂淑琴]