

藏药旺拉提取物对胆碱能损伤大鼠的 神经保护作用

于彩媛^{1,2}, 石建功¹, 张建军^{1*}

(1. 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 中央广播电视大学, 北京 100039)

[摘要] **目的:** 研究藏药旺拉提取物(CE)对胆碱能损伤大鼠的神经保护作用。**方法:** 采用基底前脑注射鹅蒿蕈氨酸的方法建立胆碱能损伤大鼠模型。实验动物分为假手术组, 模型组, 阳性药吡拉西坦(400 mg·kg⁻¹), CE(0.31, 1.25, 5 mg·kg⁻¹)组, 连续灌胃给药 28 d。跳台法检测大鼠学习记忆能力, 尼氏染色法观察大鼠基底前脑尼氏小体的变化, 免疫组化法观察海马 CA1 区神经生长因子的表达水平。**结果:** 与假手术组大鼠相比, 模型组大鼠跳下平台的潜伏期明显缩短, 基底前脑尼氏小体数量减少, 海马 CA1 区神经生长因子表达水平明显下降。与模型组大鼠相比, CE 5 mg·kg⁻¹ 可改善记忆损伤大鼠在跳台试验中的表现($P < 0.05$), 使基底前脑病理改变部分恢复正常, 上调海马 CA1 区神经生长因子表达水平($P < 0.05$)。**结论:** CE 具有神经保护作用, 可改善胆碱能损伤大鼠学习记忆能力。

[关键词] 旺拉提取物; 基底前脑; 学习记忆; 尼氏小体; 神经生长因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0254-04

Neuroprotective Effect of Coeloglossum Extract on Cholinergic Impaired Rats

YU Cai-yuan^{1,2}, SHI Jian-gong¹, ZHANG Jian-jun^{1*}

(1. State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. The Open University of China, Beijing 100039, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of coeloglossum extract (CE), an exact isolated from a Tibetan traditional herb, against ibotenic acid (IBO) -induced cholinergic injury in rats. **Method:** Rats were randomly assigned into six groups: sham (NS), model (IBO), piracetam (IBO + 400 mg·kg⁻¹), and CE (IBO + 0.31, 1.25, 5 mg·kg⁻¹) groups. After 28 days, step-down test was employed to evaluate the learning and memory function, Nissl staining was adopted to detect the Nissl body changes in basal forebrain, and immunohistochemical staining was used to examine the expression of nerve growth factor (NGF) in hippocampus CA1. **Result:** Compared with the sham group, rats in model group exhibited a shorter latency to platform, and lower levels of nissl body in frontal cortexes and of NFG in hippocampus CA1. Compared with the model rats, CE (5 mg·kg⁻¹) prolonged significantly the latency of step-down test ($P < 0.05$), partly recovered the pathological changes in basal forebrain, and increased the level of NGF in hippocampus CA1 ($P < 0.05$). **Conclusion:** These results suggested that CE can improve the cholinergic impairment and the disability of learning and memory in IBO rats.

[收稿日期] 20120217(001)

[基金项目] NSFC 杰出青年基金项目(30825044); 科技部国际合作项目(2010DFB32900)

[第一作者] 于彩媛, 硕士, 讲师, 从事药理学远程教育工作, Tel: 010-57519224, E-mail: yu_caiyuan@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 张建军, 硕士, 研究员, 从事神经精神药理学研究工作, Tel: 010-63182392, E-mail: jjzhang@imm.ac.cn

[Key words] coeloglossum extract; basal forebrain; learning and memory; Nissl body; nerve growth factor

传统藏药旺拉,学名长苞凹舌兰,具有补气益血、安神增智等功效^[1]。前期的研究显示旺拉提取物(CE)可抑制凋亡相关蛋白的改变,具有抗氧化,改善能量代谢障碍等作用^[2-3];此外,CE可改善海马长时程增强(LTP)诱导及增强胆碱乙酰化酶(ChAT)活性^[4]。本研究观察CE对胆碱能损伤大鼠的神经保护作用。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠,清洁级,体重260~280 g,购自北京维通利华实验动物有限公司,合格证号SCXK(京)2002-0003,SPF级实验室中常规喂养。

1.2 药品、试剂和仪器 藏药旺拉植物样品采自青海互助北山,兰州大学生物系张国梁教授鉴定为兰科植物长苞凹舌兰 *Coeloglossum. viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Willd.) Richter,标本(No. 998204),保存于中国医学科学院药物研究所植物标本室。旺拉提取物(CE)由中国医学科学院药物研究所植化室石建功研究员提供,据其理化性质和波谱数据鉴定其中的主要化合物为 dactylorhin B, loroglossin, dactylorhin A, militarine 和藏药旺拉素甲(coelovirin A),本实验试品干燥品含量分别为26.1%,20.7%,38.9%,4.3%和4.5%^[5]。

鹅蒿蕈氨酸(ibotenic acid, IBO),Sigma公司, Cat. No. I2765; NGF 抗体,中杉金桥生物技术有限公司,批号07321710。DTT-2型大鼠跳台仪,中国医学科学院药物研究所。

2 方法

2.1 胆碱能损伤大鼠模型的建立及给药方法^[6]

雄性SD大鼠适应性喂养3 d后,随机分为6组,每组13~14只,即假手术组,模型组,吡拉西坦($400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,CE低、中、高剂量(0.31, 1.25, $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,灌胃给药1 h后,按 Paxinos 和 Watson 的大鼠脑立体定位图谱(以前囟为零点), $A = -1.4\text{ mm}$; $L = \pm 2.6\text{ mm}$; $H = 7.2\text{ mm}$ (自颅骨表面),双侧各注射 $1\ \mu\text{L}$ IBO($8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶于生理盐水中),注射2 min,停针2 min,再缓慢将微量注射器拔出。假手术组注射等量生理盐水。术后每天灌胃给予CE1次,各给药治疗组均按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 容积给药,模型组和假手术组给予等量水,连续28 d。以跳台试验中大鼠第一次跳下平台的潜伏期为衡量标准,模型组与假手术组比较 $P < 0.05$,说明造模成功。

2.2 学习记忆能力测试^[7] 跳台装置底面铺以可以通电的铜栅,电压强度为36伏。每间反应箱左下角置一橡胶平台。将大鼠面向角落放在橡胶台上,大鼠跳下平台立即受到电击,为躲避电击大鼠将寻找平台,跳回平台,如此反复训练3 min。如大鼠不跳下平台,趋赶其跳下平台,加强记忆。24 h后测试,记录5 min内大鼠第一次跳下平台的时间记为潜伏期,进行统计分析,并计算药物的改善率。

改善率(%) = (假手术组潜伏期 - 模型组潜伏期) / (各给药组潜伏期 - 模型组潜伏期) × 100%

2.3 灌注固定^[8] 大鼠腹腔注射水合氯醛,麻醉后,将大鼠固定在手术板上,剖开胸腔和腹腔,暴露心脏,将注射器针头从心尖部位插进左心室,然后将右心耳剪开一小口,使血液和灌注液流出,先用生理盐水约200 mL灌注,至右心耳无血液流出,再用4%多聚甲醛约250 mL灌注固定,至动物全身僵硬。取脑放入后固定液,组织下沉后待用。

2.4 尼氏小体染色 灌注固定后,取脑组织做石蜡切片。脱蜡至蒸馏水,进入已预热的 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1%甲苯胺蓝液染色,置 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱中40 min。取出后,蒸馏水洗。70%,80%乙醇洗2次,95%乙醇分化、脱色,镜下控制,以尼氏小体清晰,背景淡蓝色为宜。无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封固。光学显微镜下观察,尼氏小体呈蓝紫色斑块状,细胞核为清晰的蓝色。

2.5 免疫组织化学实验 灌注固定后,取脑组织做冰冻切片。常规方法进行免疫组化染色。免疫组织化学定量方法为每只大鼠海马CA1部位各切7张($40\ \mu\text{m}$),每隔两张取一张,即每只大鼠每个部位取3张,用于NGF抗体染色。在200倍下,采集所有切片的图像,用image-pro 5.1图像分析系统进行测量,设定固定的区域、同样大小的范围和其他一些适宜的颜色和滤值,分别进行阳性细胞数、染色面积和累积吸光度(IA)的测量。

2.6 统计学分析 采用Graph Pad Prism 4.0软件,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 one-way ANOVA 法, $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 对胆碱能损伤大鼠学习记忆的影响 跳台结果显示,假手术组大鼠3 min内跳下平台的潜伏期为(92 ± 29) s,模型组大鼠跳下平台的潜伏期明显

缩短为 (28 ± 10) s, 表明大鼠学习能力下降 ($P < 0.05$)。灌胃给予 CE $0.31, 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 明显延长大鼠跳下平台的潜伏期, 其中 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CE 作用最显著, 其改善率为 95%, 优于阳性药吡拉西坦的作用 (改善率为 47%) (表 1)。

表 1 跳台实验测试 CE 对胆碱能损伤大鼠学习记忆的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	潜伏期 $/\text{s}$	改善率 $/\%$
假手术	-	9	92 ± 29	-
模型	-	13	$28 \pm 10^{2)}$	-
CE	0.31	10	$87 \pm 25^{1)}$	93
	1.25	13	45 ± 18	28
	5.00	11	$88 \pm 23^{1)}$	95
吡拉西坦	400	12	58 ± 22	47

注: 与模型组比¹⁾ $P < 0.05$; 与假手术组比²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对胆碱能损伤大鼠基底前脑区尼氏小体的作用

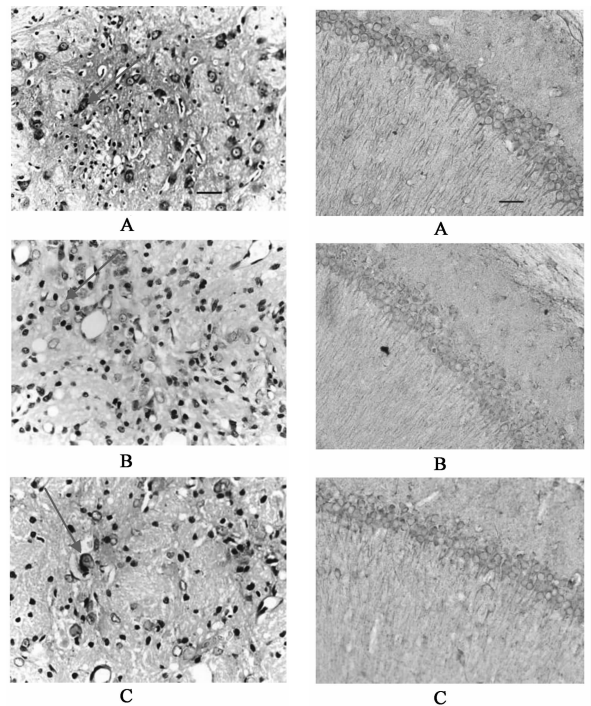
在大鼠脑的手术进针部位, 即基底前脑区, 可以明显看到进针路径及周围尼氏小体的变化。假手术组大鼠尼氏小体形态基本正常, 呈紫色颗粒或斑块, 细胞核呈浅蓝色, 针道部位胶质细胞轻微增生, 有少量的神经细胞内尼氏小体减少; 模型组大鼠针道部位出现明显的病理变化: 神经细胞内尼氏小体消失, 胞体肿胀, 出现大量的空泡区, 神经元数量减少, 大量的胶质细胞增生; CE $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组大鼠基底前脑区部分尼氏小体形态恢复正常, 呈紫蓝色颗粒, 神经元数量增多, 仍有大量的胶质细胞增生 (图 1) (CE $0.31, 1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组结果为阴性, 结果略去)。

3.3 对胆碱能损伤大鼠海马 CA1 区神经生长因子的影响

用 NGF 抗体进行免疫组化染色后, 观察大鼠海马 CA1 区 NGF 表达情况。结果显示, 假手术组可见深染的 NGF 阳性神经元, 数目较多; 与假手术组比较, 模型组神经元着色变浅, 阳性细胞数目减少 ($P < 0.05$), 面积缩小 ($P < 0.05$), IA 降低 ($P < 0.05$), 提示模型组 NGF 表达减少。与模型组比, CE $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组可见阳性细胞数目增加 ($P < 0.05$), 着色面积增大 ($P < 0.05$), IA 增强的趋势, 提示 NGF 表达水平增强 (表 2, 图 2) (CE $0.31, 1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组结果为阴性, 结果略去)。

4 讨论

基底前脑 Meynert 核 (nucleus basalis of Meynert, nbM) 的胆碱能细胞发出轴突广泛地投射到新皮质和海马等高级脑区, 阻断或损坏这一投射



A. 假手术组; B. 模型组;
C. CE $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

A. 假手术组; B. 模型组;
C. CE $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 CE 对胆碱能损伤大鼠基底前脑尼氏小体的影响 (尼氏染色, $200 \times$)

图 2 CE 对胆碱能损伤大鼠海马 CA1 区神经生长因子的影响 (免疫组化染色, $200 \times$)

表 2 CE 对胆碱能损伤大鼠海马 CA1 区神经生长因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	阳性细胞数 $/\text{个}$	Area $/\times 10^4$	IA $/\times 10^4$
假手术	-	88 ± 5	14.9 ± 0.5	8.2 ± 0.5
模型	-	$72 \pm 4^{2)}$	$13.1 \pm 0.4^{2)}$	$6.9 \pm 0.3^{2)}$
CE	5	$87 \pm 5^{1)}$	$14.8 \pm 0.5^{1)}$	7.6 ± 0.3

注: Area 阳性细胞染色面积; 与模型组比¹⁾ $P < 0.05$; 与假手术组比²⁾ $P < 0.05$ 。

系统可导致动物认知障碍和学习记忆能力的损害。应用兴奋性神经毒剂损毁 nbM 一直是国内外研究和应用较多的一种胆碱能神经损害的痴呆动物模型。与 AD 相关的记忆和学习障碍是由于 nbM 的胆碱能神经元变性所引起^[9]。一般认为在被动回避实验中, IBO 诱导的损害与基底核胆碱能神经元的破坏直接相关^[6]。本实验利用 IBO 定位损伤 nbM, 跳台实验结果显示, CE $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 改善学习记忆能力效果最好, 其改善率可达 95%。这提示 CE 可改善胆碱能损伤大鼠学习记忆能力。在行为学中 CE $0.31 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 表现出来的改善作用, 可能是 CE 对大鼠有一定的镇静作用, 需要进一步研究。

IBO 破坏基底前脑 nbM 胆碱能神经元,致使基底前脑功能损害,引起记忆过程中认知和非认知过程障碍,IBO 对位于基底前脑的其他非胆碱能神经元无影响^[6]。尼氏小体是表示神经细胞功能活性的形态指标。本实验采用甲苯胺蓝染色法对此部位的神经元尼氏小体进行染色,发现胆碱能损伤大鼠基底前脑出现明显的病理变化,尼氏小体减少、消失,胞体肿胀,出现大量的空泡,CE 可减轻这种病理变化。

已知神经营养因子与 AD 等神经退行性疾病中胆碱能神经元的退行性关系密切^[10-11],有实验证明 NGF 可减轻成年灵长类动物脑组织损伤引起的胆碱能神经元变性^[12]。NGF 是神经营养家族中发现最早的神经因子,分布于神经元的胞体和突起^[13],由海马和脑皮质产生的 NGF 可通过胆碱能神经逆行运输至前脑基底核,维持胆碱能神经元的存活和功能^[14]。NGF 除了主要作用于胆碱能神经元,可使相关脑区胆碱能神经元的环腺苷酸水平和 ChAT 活性明显提高,还能维持和促进交感神经元和神经嵴源感觉神经元的存活、分化、生长和成熟,保障基底前脑、尾壳核胆碱能神经元存活并防止其凋亡^[15]。应用 NGF 抗体对海马部位进行免疫组化染色,结果提示 CE 可能通过增强 NGF 表达水平,利用胞饮作用到达基底前脑胆碱能神经元,从而保护胆碱能损伤大鼠基底前脑神经元的病理变化。这提示 CE 对胆碱能神经元具有保护作用。增强海马区 NGF 的表达可能是 CE 改善胆碱能损伤大鼠学习记忆障碍的一条途径。

[致谢]宣武医院李林教授、张丽老师及其课题组成员给予了免疫组化方面的技术指导;本课题组的李宁、王悦、李敏、张莹、王杰等同学在动物实验中给予了协助。

[参考文献]

- [1] 杨永昌. 藏药志[M]. 西宁:青海人民卫生出版社, 1991: 247.
- [2] Zhang D, Liu G T, Shi J G, et al. Effects of *Coeloglossum. viride* var. *bracteatum* extract on memory deficits and pathological changes in senescent mice [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2006, 98(1):55.
- [3] Zhang D, Liu G T, Shi J G, et al. *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract attenuates d-galactose and NaNO₂ induced memory impairment in mice [J]. J Ethnopharmacology, 2006, 104(1/2):250.
- [4] 李敏,王亚芳,马波,等. 藏药旺拉提取物对东莨菪碱致动物学习记忆障碍的改善作用及机制研究[J]. 药学报,2009,44(5):468.
- [5] 黄胜阳,石建功,杨永春,等. 藏药旺拉化学成分研究[J]. 药学报,2002,37(3):199.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002:848.
- [7] 王树鹏,刘书宇. 龟鹿二仙胶颗粒对自然衰老小鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(18):142.
- [8] 侯永春,严孜. 葛根素对慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区 NGF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):184.
- [9] Muir J L, Page K J, Sirinathsinghi D J, et al. Excitotoxic lesions of basal forebrain cholinergic neurons: effects on learning, memory and attention [J]. Behav Brain Res, 1993, 57(2):123.
- [10] Perry E K. Nerve growth factor and the basal forebrain cholinergic system: a link in the etiopathology of neurodegenerative dementias [J] Alzheimer Dis Assoc Disord,1990, 4(1):1.
- [11] Dreyfus C F. Effects of nerve growth factor on cholinergic brain neurons [J]. Trends Pharmacol Sci, 1989, 10(4):145.
- [12] Lachyankar M B, Condon P J, Quesenberry P J, et al. Embryonic precursor cells that express Trk receptors: induction of different cell fates by NGF, BDNF, NT-3, and CNTF [J]. Exp Neurol, 1997, 144(2):350.
- [13] Blochl A, Thoenen H. Characterization of nerve growth factor (NGF) release from hippocampal neurons: evidence for a constitutive and an unconventional sodium-dependent regulated pathway [J]. Eur J Neurosci, 1995, 7(6):1220.
- [14] Maclnnis B L, Campenot R B. Retrograde support of neuronal survival without retrograde transport of nerve growth factor [J]. Science, 2002, 295(5559):1536.
- [15] Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity [J]. Science, 1995, 270(5236):593.

[责任编辑 李玉洁]