

地黄饮子对慢性脑低灌注大鼠学习记忆及 海马 AChE, ChAT 的影响

白黎明, 张晓双, 武苗, 杨瑞
(陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的:探讨地黄饮子对慢性脑低灌注大鼠学习记忆及海马乙酰胆碱酯酶(AChE)、乙酰胆碱转移酶(ChAT)的影响。方法:采用双侧颈总动脉结扎制作大鼠慢性脑缺血模型,通过 Morris 水迷宫试验测定地黄饮子对慢性脑低灌注大鼠学习记忆功能改善情况,并测定大鼠海马脑组织 AChE, ChAT 的含量。结果:地黄饮子组(10, 20 g·kg⁻¹)与模型对照组比较, Morris 水迷宫试验逃避潜伏期缩短,跨越平台次数增加,海马 AChE 和 ChAT 含量显著升高($P < 0.05$)。结论:地黄饮子能改善慢性脑低灌注大鼠学习记忆功能,可能与保护胆碱能系统有关。

[关键词] 地黄饮子;慢性脑低灌注;乙酰胆碱酯酶;乙酰胆碱转移酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0207-03

Influence of Dihuangyinzi on Learning and Memory and AChE, ChAT of Hippocampal in Chronic Cerebral Hypoperfusion Rats

BAI Li-ming, ZHANG Xiao-shuang, WU Miao, YANG Rui
(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate influence of Dihuangyinzi on learning and memory and AChE, ChAT of Hippocampal in chronic cerebral hypoperfusion rats. **Method:** Using the model of chronic cerebral ischemia by two-vessel occlusion, Learning and memory memory improvement was measured by Morris water maze test in rats of chronic cerebral hypoperfusion of Dihuangyinzi, and AChE, ChAT content were measured in hippocampus of rats. **Result:** Compared with the control group, Morris water maze test, Dihuangyinzi group escape latency Shortened, the number of cross platform increased, AChE and ChAT Content in the hippocampus were significantly increased. **Conclusion:** Dihuangyinzi can improve learning and memory function in rats of chronic cerebral hypoperfusion, which may protect the cholinergic system.

[Key words] Dihuangyinzi; chronic cerebral hypoperfusion; AChE; ChAT

慢性脑低灌注(慢性脑缺血)是由于血容量不足,管腔狭窄或者其他原因引起的脑长期供血、供氧不足状态,是许多神经系统疾病共同的病理基础。

随着年龄的增长全脑或局部脑区慢性低灌注状态是一种较常见的状态。在临床中脑低灌注状态得到了越来越多的认识和重视。地黄饮子具有滋肾阴,补肾阳,化痰开窍的功能,临床上观察到地黄饮子能够有效改善患者慢脑血流灌注不足症状,作者观察了地黄饮子对大鼠慢性脑低灌注的作用效果及机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠, SPF 级, 西安交通大学医学院实验动物中心提供[许可证号 SCXK(陕)2007-001]。

[收稿日期] 20101118(015)

[基金项目] 陕西省教育厅科学研究计划(2010JK488); 陕西中医学院校级课题(2009XJ-26); 陕西省痰瘀论治中医脑病重点实验室重点项目

[第一作者] 白黎明, 讲师, 学士, 研究方向: 中西医结合治疗脑血管病临床与实验研究, E-mail: bailiming1977@163.com

1.2 药品及试剂 地黄饮子水煎液由陕西中医药大学中药药理研究室制备,地黄饮子按原方比例(熟地黄 18 g,巴戟天、山茱萸、石斛、肉苁蓉各 9 g,炮附子、五味子、肉桂、茯苓、麦冬、石菖蒲、远志各 6 g,薄荷、生姜、大枣各 3 g)配伍,加 10 倍量水浸泡 2 h,煎煮 40 min 后过滤煎液,再加 8 倍量水煎煮 40 min,过滤煎液,合并两次滤液,用旋转蒸发器浓缩至(含生药) $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液后,无菌条件装瓶,置 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。养血清脑颗粒(批号 20100516),天津天士力制药股份有限公司生产。乙酰胆碱酯酶(AChE)试剂盒(批号 20100818),乙酰胆碱转移酶(ChAT)试剂盒(批号 20100812)均由南京建成生物工程中心提供。

1.3 仪器 Morris 水迷宫由中国医学科学院治疗所生产。

2 方法

2.1 造模、分组、给药 成年雄性 SD 大鼠,适应性喂养 1 周,术前 12 h 禁食,4 h 禁水。用水合氯醛 $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉,仰卧位固定,颈正中去毛,碘伏消毒,颈正中切开,仔细分离出双侧颈总动脉并结扎,缝合切口。假手术组同样分离双侧颈总动脉,但不予结扎。缝合后回笼饲养,青霉素抗感染 4 d。4 周后进行 Morris 水迷宫试验筛选出现学习记忆障碍趋势的大鼠,将造模成功的大鼠随机分为模型对照组、地黄饮子大剂量组、地黄饮子小剂量组、养血清脑颗粒组及假手术组。每日灌胃给药 1 次,给药体积 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续 8 周。假手术组和模型对照组灌胃等体积蒸馏水。

2.2 指标检测 于给药后 4,8 周采用 Morris 水迷宫法进行大鼠学习记忆功能的测定。测试程序为①

定位航行试验:历时 4 d,每天上下午各 2 次,将大鼠面向池壁分别从 4 个人水点放入水中,记录其在 3 min 内寻找到并爬上平台的时间即逃避潜伏期。如果大鼠在 3 min 未找到平台,则由实验者用手牵引其至平台上,让大鼠停留 10 s,再放回笼中,潜伏期记为最高分 180 s。分别在给药后 4 周,8 周重新进行游泳实验,大鼠每次在 3 min 内寻找到并爬上平台的时间为大鼠的记忆成绩,每日 2 次,连续 4 d,计算平均成绩。②空间探索实验:第 5 天撤除平台,将大鼠任选 1 个人水点放入水中,测其 2 min 内跨越原平台所在位置的次数。上下午各 1 次,计算平均成绩。实验结束(造模 12 周)行为学测试后大鼠断头取脑海马组织,在冰冷的生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干,称重后,加入冷生理盐水,于匀浆管中充分研碎,制成 10% 的脑匀浆,以 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 取上清液,测定海马组织匀浆中 AChE 和 ChAT 的活性。

2.3 统计学方法 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 统计软件分析,采用方差分析,组间采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 具有显著性差异。

3 结果

3.1 Morris 水迷宫法测定学习记忆功能 结果见表 1。以大鼠逃避潜伏期和跨越平台次数代表学习记忆能力,逃避潜伏期越短,跨越平台次数越多,记忆能力越强。与假手术组比较,模型对照组逃避潜伏期延长,跨越平台次数减少($P < 0.01$),说明结扎双侧颈总动脉模型可导致学习记忆功能下降。与模型对照组比较,地黄饮子组、养血清脑颗粒组逃避潜伏期均缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$),跨越平台次数增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 地黄饮子对慢性脑低灌注大鼠学习记忆功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	潜伏期/s		跨越平台次数/次	
		4 周	8 周	4 周	8 周
假手术	-	17.63 ± 3.67	16.33 ± 2.44	7.40 ± 1.71	7.70 ± 1.64
模型对照	-	47.30 ± 7.66 ²⁾	53.50 ± 3.34 ²⁾	3.00 ± 1.41 ²⁾	2.50 ± 1.27 ²⁾
地黄饮子	10	39.00 ± 8.47 ³⁾	44.50 ± 7.41 ⁴⁾	4.30 ± 1.16 ³⁾	4.00 ± 1.05 ³⁾
	20	34.30 ± 7.35 ⁴⁾	36.30 ± 8.12 ⁴⁾	4.80 ± 1.23 ³⁾	4.50 ± 1.27 ⁴⁾
养血清脑颗粒	2	31.60 ± 8.02 ⁴⁾	34.60 ± 9.73 ⁴⁾	5.00 ± 1.49 ³⁾	4.70 ± 1.42 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型对照组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 测定海马组织 AchE 和 ChAT 活性 结果见表 2。与假手术组相比,模型对照组的海马中 AChE 和

ChAT 活性均显著降低($P < 0.01$)。与模型对照组比较,养血清脑颗粒组、大剂量地黄饮子组海马的

AChE 和 ChAT 活性均显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。提示结扎双侧颈总动脉手术后由于神经元数量减少导致了胆碱能活性下降。

表 2 地黄饮子对慢性脑低灌注大鼠海马组织 AChE 和 ChAT 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	AChE/U·g ⁻¹	ChAT/U·g ⁻¹
假手术	-	562.18 ± 73.22	47.95 ± 10.91
模型对照	-	334.25 ± 60.68 ²⁾	30.06 ± 5.36 ²⁾
地黄饮子	10	392.38 ± 70.77	33.56 ± 6.15
	20	430.37 ± 79.74 ³⁾	36.96 ± 4.46 ³⁾
养血清脑颗粒	2	425.42 ± 72.31 ³⁾	38.26 ± 9.58 ³⁾

4 讨论

慢性脑低灌注是阿尔茨海默病和血管性痴呆等神经系统疾病的常见病理状态,越来越多的研究开始关注慢性脑低灌注的发病机制及其治疗。通过大鼠双侧颈总动脉结扎(two-vessel occlusion, 2VO)模型模拟慢性脑低灌注状态是目前普遍认同的用于慢性脑低灌注研究的动物模型。海马、前额叶、颞叶、大脑皮层的神经元对缺血十分敏感,而这些区域神经元功能和结构的损害会造成与学习记忆相关的神经递质紊乱^[1],引起学习记忆能力下降,甚至痴呆。研究证实,大鼠双侧颈总动脉结扎 4 周后,ACh 水平明显降低^[2],12 周后前皮层、纹状体和海马 M 型乙酰胆碱受体结合力下降,获得性学习记忆等行为学出现明显障碍^[3]。ACh 是进行及维持中枢胆碱能神经系统功能的一种重要介质,它传导的信号与认知、学习及记忆有关,阿尔茨海默病患者脑脊液中 ACh 含量显著降低^[4],这可能与血管因素造成水解 ACh 的 AChE 异常有关。大脑反复缺血使中枢胆碱能神经元受损,导致脑内海马环路(学习记忆神经生化基础)损害,AChE 活性降低^[5]。至于脑缺血后 ChAT 和 AChE 活性的降低原因还不太清楚^[6]。两者均是 ACh 的代谢酶,由神经元胞体合成,推测脑缺血后血氧供应下降,抑制三羧酸循环,使 ChAT 和 AChE 合成减少;也可能由于支配海马的基底前脑胆碱能神经元受缺血损害,突触数量减少所致。AChE 活性部位是 ACh 的阳性部位,故其活性的改变可直接反映

ACh 的代谢情况,从而在一定程度上体现胆碱能系统的功能状况,即脑缺血时胆碱能受损,ACh 减少,因此 AChE 活性降低。

地黄饮子出自《黄帝素问·宣明论方》,由熟地黄、巴戟天、山茱萸、石斛、肉苁蓉、五味子等组成,具有滋肾阴,补肾阳,化痰开窍的功能。本方中熟地黄、山茱萸肉滋补肾阴;肉苁蓉、巴戟天温补肾阳,为君药;附子、肉桂之辛热,协上药以温养真元,摄纳浮阳;麦冬、石斛、五味子滋阴敛液,使阴阳相配,均为臣药;石菖蒲、远志、云茯苓交通心肾,开窍化痰,是为佐药;大枣、生姜、薄荷调和营卫,为使药。诸药合用,共成滋肾阴,补肾阳,开窍化痰之功。本研究结果表明双侧颈总动脉永久性结扎可导致脑低灌注大鼠学习记忆能力减退,海马胆碱能损害,海马 AChE、ChAT 活性明显减少,地黄饮子对慢性脑低灌注引起的认知障碍的改善作用可能与保护胆碱能系统有关。

[参考文献]

- [1] 刘汇波,叶翠飞,李斌,等. 双侧颈总动脉结扎对大鼠学习记忆功能和海马组织形态学的影响[J]. 基础医学与临床,1998,18(4): 54.
- [2] Ni J W, Matsumoto K, Li H B, et al. Neuronal damage and decrease of central acetylcholine level following permanent occlusion of bilateral common carotid arteries in rat[J]. Brain Res,1995,673(2):290.
- [3] Tanaka K, Wada N, Hori K, et al. Chronic cerebral hypoperfusion disrupts discriminative behavior in acquired learning rats [J]. J Neurosci Methods,1998,84(122):63.
- [4] 贾建平,贾健民,周卫东,等. 阿尔茨海默病和血管性痴呆患者脑脊液中乙酰胆碱和胆碱检测及其临床意义[J]. 中华神经科杂志,2002,35(3):168.
- [5] 周永翠,王玉良. 脑内胆碱能系统与血管性痴呆的关系[J]. 中国临床康复,2004,22(8):4568.
- [6] 郑莹,闫福岭. 脑低灌注对大鼠海马胆碱能神经功能指标的变化[J]. 中国实用神经疾病杂志,2008,11(5):11.

[责任编辑 邹晓翠]