

左归丸对老年性痴呆模型大鼠海马与皮质神经细胞凋亡的影响

李美珍*, 曾姣飞, 孙必强, 袁晓红

(湖南中医药高等专科学校, 湖南 株洲 412012)

[摘要] 目的:研究左归丸对老年性痴呆(AD)模型大鼠海马与皮质神经细胞凋亡的影响。方法:以慢性铝中毒法复制 AD 大鼠模型,随机分为模型组、西药组、左归丸低、中、高剂量组,另设空白对照组;用 TUNEL 法观测大鼠海马和皮质内细胞凋亡水平,光镜下计数阳性表达细胞。结果:模型组大鼠海马和皮质具有典型的细胞凋亡特征,而左归丸组的海马和皮质神经细胞凋亡数减少,以中、高剂量组作用较强。与模型组比较,有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:左归丸具有抑制 AD 模型大鼠海马皮质与神经细胞凋亡的作用。

[关键词] 左归丸;老年性痴呆;海马神经细胞;皮质神经细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0170-02

细胞凋亡与老年性痴呆的关系越来越受到人们的重视。尸解研究发现,AD 患者脑组织有神经元凋亡,但使神经元易于发生凋亡的细胞学和分子原理还不清楚^[1-2]。左归丸源自《景岳全书》,具有益精填髓、补益肾阴的功效。本试验采用 ip *D*-半乳糖及 sc 三氯化铝复制 AD 模型,研究左归丸对模型大鼠海马与皮质神经细胞凋亡的影响。

1 材料

1.1 动物 健康 Wistar 大鼠,4 月龄,体重(250 ± 30)g,雌雄各半,共 70 只,由长沙市开福区东创实验动物科技服务部提供,许可证号 SCXK(湘)2006-0001。

1.2 药物与试剂 左归丸(由熟地黄、山萸肉、山药、枸杞、龟板胶、鹿角胶、菟丝子、川牛膝组成,河南省宛西制药股份有限公司,批号 090406,人剂量为:9 g/次,2 次/日);脑复康片(Pracetam tablets 吡拉西坦片,湖北华中药业有限公司,批号 20090104,人用剂量为 0.8 ~ 1.6 g/次,3 次/日);三氯化铝(分析纯,上海盛龙化工有限公司);TUNEL 法细胞凋亡检测试剂盒、即用型 SABC, DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 仪器 Motic Med 数码医学图像分析系统(四

川大学图象图形研究所);双目光学显微镜(江南光学仪器厂)。

2 方法

2.1 造模 参考 Fattoretti 等及国内外的相关文献^[3-4]造模:大鼠 ip *D*-半乳糖(用注射用水稀释成 1% 的溶液)60 mg · kg⁻¹,sc AlCl₃(用注射用水稀释成 1% 的溶液)100 mg · kg⁻¹造成亚急性衰老;正常组注射等量生理盐水。1 次/d,共 45 d,诱导复制 AD 模型。

2.2 分组与给药 大鼠适应性喂养 1 周后,经水迷宫测试去掉不符合条件者,包括先天愚型和超聪明型。然后对进入试验的 60 只大鼠进行称重排序,并采用随机数字表法将其分为空白对照组 10 只和造模组 50 只,在造模完毕后 50 只随机分为模型组、脑复康组、左归丸高、中、低剂量组,每组各 10 只。第 8 周开始给药干预,正常组与模型组予蒸馏水,左归丸高、中、低剂量组分别为 4,2,1 g · kg⁻¹,脑复康组 0.40 g · kg⁻¹,均 ig,体积均为 4 mL · kg⁻¹,共 30 d。

2.3 指标检测 给药结束后,迅速断头取脑、冰浴,称取脑湿重后,在冰台上分离剥取脑皮质及海马组织,置于多聚甲醛液中固定,常规脱水,石蜡包埋,切片。每个标本随机选取 1 张切片,切片常规脱蜡、脱水后,进行 TUNEL 染色。凋亡的细胞呈黄色,为阳性细胞^[5]。每张切片随机选取 5 个视野,每个视野选取 5 个阳性表达区域,在 400 倍光学显微镜下,通过 Biomias99 图像分析系统,检测平均灰度值,并计数阳性表达细胞,检测大鼠海马和皮质细胞凋亡水平。

[收稿日期] 2010-04-19

[基金项目] 湖南省教育厅立项课题(09C032)

[通讯作者] *李美珍, Tel: 0731-28203337, E-mail: lmzshuang123@Yahoo.com.cn

2.4 统计方法 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较, 先进行方差齐性检验, 如方差齐则按多样本两两比较的 LSD 检验, 如方差不齐则按 H 检验, 进而做秩和分析; 全部数据用 SPSS11.5 软件处理。

3 结果

左归丸对模型大鼠海马和皮质神经细胞凋亡的影响 见表 1~2。

TUNEL 法检测神经细胞结果表明, 与正常组比较, 模型组切片中神经细胞核内可见大量深染的棕黄色颗粒, 即凋亡小体, 平均灰度值明显减少, 阳性细胞数增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 左归丸组神经细胞染色较浅, 细胞结构较好, 平均灰度值明显增高, 阳性细胞数减少其中高、中剂量值 $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ 。提示左归丸组神经细胞凋亡减少, 对 $AlCl_3$ 引起的大鼠脑内神经细胞凋亡具有明显的抑制作用。

表 1 左归丸对老年性痴呆模型大鼠海马神经细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	灰度值	阳性表达细胞数
空白	-	183.4 ± 42.5 ²⁾	14.3 ± 1.8 ²⁾
模型	-	83.6 ± 32.6	23.7 ± 1.9
脑复康	0.40	158.7 ± 38.4 ²⁾	13.6 ± 1.3 ²⁾
左归丸	4.0	166.7 ± 41.3 ²⁾	15.6 ± 1.4 ²⁾
	2.0	135.5 ± 49.4 ¹⁾	21.9 ± 1.6 ¹⁾
	1.0	112.3 ± 36.6	22.3 ± 1.7

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)

表 2 左归丸对老年性痴呆模型大鼠皮质神经细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	平均灰度值	阳性表达细胞数
空白	-	179.3 ± 36.6 ²⁾	8.6 ± 1.7 ²⁾
模型	-	80.6 ± 28.7	21.5 ± 0.8
脑复康	0.40	161.3 ± 35.4 ²⁾	13.3 ± 1.6 ²⁾
左归丸	4.0	166.4 ± 32.2 ²⁾	15.0 ± 1.4 ²⁾
	2.0	123.3 ± 37.9 ¹⁾	20.3 ± 1.6 ¹⁾
	1.0	105.5 ± 32.6	21.0 ± 1.8

4 讨论

细胞凋亡又称细胞程序性死亡, 细胞凋亡过程有其复杂的分子机制, 受细胞自身基因调控。在 AD 的病理过程中, 存在着细胞凋亡这一病理机制。业已证明, 与 AD 关系最密切的神经递质是 Ach (乙酰胆碱), Ach 缺失的严重程度与痴呆程度密切相关^[6]。投射到皮质和海马皮层下的胆碱能神经元在

基底前脑形成条区带, 主要核团为 Meyncrt 核和内侧隔核, 这些核团为脑合成 Ach 的主要场所, 占皮质和海马释放 Ach 的绝大多数, 对 AD 大脑认知和记忆意义十分重要^[7]。

中医学认为 AD 是一种全身性疾病, 其主要病理基础是肾虚, 以肾中精气不足, 髓海空虚为本。治疗强调固本清源, 以补肾填精法治其本, 补肾为先, 精气并重。左归丸, 方中重用熟地黄为君药, 熟地黄甘温归肝肾经, 能养血滋阴, 补精益髓, 为滋肾填精益髓之要药。山萸肉养肝肾, 既能补精又能助阳, 为平补阴阳之品, 熟地黄与山萸肉相配, 补肾填精, 滋补肾阴; 山药补脾益阴, 滋肾固精; 枸杞补肾益精, 养肝明目; 龟、鹿二胶峻补精髓, 龟板胶偏于补阴, 鹿角胶偏于补阳, 均为臣药。菟丝子、川牛膝益肝肾, 为佐药。诸药合用, 共奏滋阴补肾, 填精益髓之效。

本试验结果显示, 左归丸组神经细胞凋亡减少, 对 $AlCl_3$ 引起的大鼠脑内神经细胞凋亡具有明显的抑制作用。其结果一方面从现代医学角度印证了左归丸对 AD 的作用机制; 另一方面从中医角度突出了左归丸补肾填精以抗衰老的功效。

[参考文献]

[1] Li W P, Chan W Y, Lai H W, et al. Terminal dUTP nick end labeling (TUNEL) positive cells in the different regions of the brain in normal aging and Alzheimer's patients [J]. J Mol Neurosci, 1997, 8(2): 75.

[2] Macgibbon G A, Lawlor P A, Walton M, et al. Expression of fos, Jun, and krox family proteins in Alzheimer's disease [J]. Exp Neurol, 1997, 147(2): 316.

[3] 尹宗宁. 中医药防治老年痴呆症的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2005, 25(3): 354.

[4] Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Bilietti M, et al. Aluminum administration to old rats results in increased levels of brain metal ions and enlarged hippocampal mossy fibers. [J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1019: 44.

[5] 张鹏霞, 朴金花, 欧芹, 等. 黄芪对老年小鼠脑线粒体 Mn-SOD、MDA 及脑细胞凋亡的影响的实验研究 [J]. 中国老年学杂志, 2003, 23(9): 596.

[6] Fibiger H C. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia; a review of recent evidence [J]. Trends Neurosci, 1991, 14: 220.

[7] 盛树力, 裴进京. 老年性痴呆的临床和分子学基础 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1998: 57.

[责任编辑 何伟]