

益智饮对阿尔茨海默病大鼠学习记忆能力的影响及抗氧化作用

段灿灿¹, 许建阳^{2*}, 陈牛艳³, 荆慧娟⁴, 李东红¹, 张建永⁴

(1. 贵阳中医学院研究生部, 贵阳 550001; 2. 武警总医院中西医结合科, 北京 100039;
3. 中国医药研究开发有限公司, 北京 102206; 4. 辽宁医学院研究生学院, 辽宁 锦州 121001)

[摘要] 目的: 观察益智饮对 β -淀粉样肽(A₁₋₄₂)致阿尔茨海默病(AD)模型大鼠学习记忆能力的影响及抗氧化作用。方法: A₁₋₄₂注射建立 AD 大鼠模型, 分别给予不同剂量益智饮治疗。采用 Morris 水迷宫检测学习记忆能力、免疫组化检测大鼠脑组织 A_β 蛋白表达情况; 并测定脑组织超氧化物歧化酶(SOD) 含量、羟自由基抑制率。结果: 与模型组相比, 益智饮高、中、低剂量组的逃避潜伏期缩短($P < 0.01$); 以高剂量组最优; 高、中剂量组脑组织内 A_β 聚集表达减少。益智饮各剂量组及阳性对照组大鼠脑组织 SOD 活性均高于模型组($P < 0.01$); 高、中剂量组的羟自由基抑制率显著升高($P < 0.01$)。结论: 益智饮能较好改善 AD 大鼠的学习记忆能力, 减少脑内 A_β 的聚集。其机制可能与通过升高 SOD 的活性和抑制羟自由基的生成有关。

[关键词] 益智饮; 阿尔茨海默病; 学习记忆能力; 抗氧化

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0135-04

Effect of Yizhiyin on Learning, Memory Ability and Antioxidation for Alzheimer's Disease Rats Induced by A₁₋₄₂ in Rat

DUAN Can-can¹, XU Jian-yang^{2*}, CHEN Niu-yan³, JING Hui-juan⁴, LI Dong-hong¹, ZHANG Jian-yong⁴

(1. Department of Graduate, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China;

2. Department of Chinese and Western Medicine, the General Hospital of Chinese

People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China;

3. Department of Pharmacology, Chinese Medicine Research and Development Co. Ltd, Beijing 102206, China;

4. Department of Graduate School, Liaoning Medical College, Jinzhou 121001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Yizhiyin on learning and memory ability in the rats with Alzheimer's disease induced by A₁₋₄₂ and the effect of antioxidation. **Method:** The rat model of AD were established by A₁₋₄₂ injection into hippocampus, then those rats were treated by three different doses of Yizhiyin. Morris watermaze test was used for detecting learning and memory ability. Immunohistochemistry was used for detecting the expression of β -Amyloid, and the superoxide dismutase (SOD) and the hydroxy radical inhibition of brain were measured. **Result:** Compared with model group, the ability of learning and memory in high, middle and low doses group were improved ($P < 0.01$). The results of immunohistochemistry showed that there were a lot of β -Amyloid deposition in the brain of model rats and a sprinkle expression in high and middle doses group. The activity of SOD was increased compared to those in model group in brain in each treatment group ($P < 0.01$), the inhibition of hydroxy radical was increased ($P < 0.01$) in each treatment group except the low dose group. **Conclusion:** The

[收稿日期] 2009-11-17

[基金项目] 中国科学院高能物理所重点实验室开放课题(B0902)

[通讯作者] * 许建阳, Tel: (010) 88276843; Email: xujianyang@sina.com

Yizhiyin could improve the learning and memory capability in AD rats efficiently, and decrease the β -Amyloid deposition. The mechanism of the Yizhiyin should be related to the increase in SOD and the inhibition of hydroxy radical.

[Key words] Yizhiyin; Alzheimer's disease; learning and memory ability; antioxidation

阿尔茨海默病 (Alzheimer's diseases, AD) 即老年性痴呆, 是一种原发性进行性神经系统变性型疾病, 以隐匿起病, 记忆力逐渐减退, 认知障碍、行为异常和社会障碍等为主要临床表现。它以细胞外出现 β -淀粉样肽 (A β) 聚集形成的神经斑亦称老年斑 (senile plaque, SP)、细胞内 tau 蛋白异常聚集形成的神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT) 及神经细胞和突触数量减少为主要病理特征^[1-3]。AD 发病机制十分复杂, 现有多种病因学说, 且目前尚无有效的西药进行治疗。该文观察石菖蒲远志药对对 A β ₁₋₄₂ 致老年痴呆模型大鼠的学习记忆能力的影响, 并探讨其是否具有抗氧化作用。

1 材料

1.1 动物 选用健康 SPF 级 SD 大鼠 80 只, 体重 (280 ± 20) g, 由北京维通利华实验动物中心提供 (合格证号 SCXK (京) 2007-0001)。

1.2 药品与试剂 A β ₁₋₄₂ (博奥森生物技术有限公司); 石菖蒲、远志 (北京市志诚堂药业有限公司), 益智饮为石菖蒲、远志按 1:1 的比例混合, 常规水煮, 将两次滤液混合, 分别配制含 3.6, 1.8, 0.9 g·mL⁻¹ 生药的水煎剂, 作为高、中、低剂量组备用, 4℃ 保存; 盐酸多奈哌齐片 (卫材中国药业有限公司, 批号 H20070181), 配成 0.045 g·mL⁻¹ 生理盐水混悬液。超氧化物歧化酶 (SOD)、羟自由基及考马斯亮兰测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所产品, 批号分别是 20090506, 20090510, 20090512); A β ₁₋₄₂ 兔抗鼠单克隆抗体 (博奥森生物技术有限公司), 用 pH = 7.4 PBS 液稀释成 2 μg·μL⁻¹, 37℃ 孵育 1 周, 使其为聚集状态备用。

1.3 仪器与设备 Morris 水迷宫 (成都泰盟科技有限公司, 型号 MT-200); 脑立体定位仪 (西安西北光电仪器厂, 型号 XBOE); 紫外分光光度计 (中国, 型号 UV-1601PC); 高速匀浆组织机 (Germany, 型号 ULTRA-TU)。

2 方法

2.1 动物分组与造模 SD 雄性大鼠 80 只经水迷宫测验筛选出合格大鼠 72 只, 大鼠随机分成: 正常

对照组、模型组、阳性药盐酸多奈哌齐片 0.45 mg·kg⁻¹ 对照组、益智饮高剂量组、中剂量组、低剂量组各 12 只。除正常对照组外其他组均以 3.5% 水合氯醛 ip 麻醉, 放在脑立体定位仪上用耳针、牙套固定大鼠, 常规备皮消毒, 颅顶部正中切开皮肤; 选择双侧海马为注射靶区, 参照 Paxinos & Watson 大鼠脑立体定位图谱^[4] 定位坐标, 取前囟后 3.30 mm, 中线旁开 2.0 mm, 门齿钩平面低于耳间线平面 3.3 mm 处钻开颅骨, 暴露硬脑膜, 微量进样器自脑表面缓慢垂直进针至硬脑膜下 3.0 mm; 各组每侧予以 5 μL A β ₁₋₄₂ 液缓慢注入 (1 μL·min⁻¹), 留针 5 min 以保证溶液充分弥散, 然后缓慢撤针。所有操作均在无菌条件下进行, 注射完后用牙托粉填补针孔, 缝合切口并以庆大霉素处理防止感染 (3~5 点滴, 2.50 × 10⁴ μg·kg⁻¹)。实验前用台盼蓝代替 A β ₁₋₄₂ 验证注射部位的正确性。等苏醒后继续饲养。6 d 后开始给药。益智饮高、中、低剂量组每天分别按 3.6, 1.8, 0.9 g·kg⁻¹ ig。阳性对照组按 0.45 mg·kg⁻¹ 给予盐酸多奈哌齐混悬液 ig; 正常对照组、模型组分别以相同体积的生理盐水 ig, 连续 30 d。

2.2 学习记忆能力的检测 应用 Morris 水迷宫, 所有大鼠分别于给药后 25 d 进行定位航行学习记忆试验, 检测其学习记忆能力。从 2, 3, 4 象限的池壁入水点将实验大鼠面向池壁放入水池, 自动录像记录大鼠 2 min 内找到站台的时间 (潜伏期), 连续测试 4 d, 取其平均值。

2.3 脑内自由基代谢指标的检测 末次给药后 30 min, 每组随机取 8 只大鼠在冰台上迅速断头, 取脑, 4℃ 生理盐水冲洗残血, 滤纸吸干。精确称取脑组织, 加入 9 倍的 4℃ 生理盐水, 制备成 10% 的组织匀浆, 2 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液置 4℃ 备用。SOD 活力、羟自由基抑制率及考马斯亮兰等含量测定应用紫外分光光度计严格按照试剂盒说明书操作。

2.4 免疫组化检测 每组剩余的大鼠 4 只末次给药后灌注取海马。大鼠 3.5% 水合氯醛 ip 麻醉, 仰卧固定后立即开胸充分暴露心脏, 灌注管经左心室

插进主动脉,同时剪开右心耳,快速灌注生理盐水,至肝脏由红变苍白色,静脉流出无色生理盐水时,改灌注液为 4% 的多聚甲醛,灌注时间约 30 min,见大鼠肌肉震颤,继尾巴变直,四肢僵硬视为灌注到位;灌注完毕后断头取脑,投入 4% 多聚甲醛溶液中过夜,石蜡包埋, A₁₋₄₂ 免疫组化染色,具体步骤按免疫组化试剂盒操作说明书进行。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,数据用均数 ± 标准差 (̄±s) 表示。方差齐时采用 LSD,方差不齐采用 Tamhans T2。

3 结果

3.1 各组 Morris 水迷宫定位航行学习记忆能力的比较 如表 1 所示,通过水迷宫定位航行测试:与正常对照组相比,模型组的逃避潜伏期时间明显延长 ($P < 0.01$)。与模型组相比,益智饮高、中、低剂量组的逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$);高剂量组与中、低剂量组比较逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$)。

3.2 各组脑组织 SOD 活性和羟自由基抑制率的比较 结果见表 2。益智饮各剂量组 SOD 活性均高于模型组 ($P < 0.01$);与模型组比较,除益智饮低剂量组差异不明显 ($P > 0.05$),其余各组的羟自由基抑制率显著升高,其中高剂量组又高于其他组 ($P < 0.01$)。

3.3 各组脑组织中 A₁₋₄₂ 沉积的比较 如图 1,免疫组化染色显示:空白对照组示阴性无 A₁₋₄₂ 沉积表

达,而其他各组脑组织具有不同程度的 A₁₋₄₂ 沉积形成的老年斑。从整体切片观察,与模型组比较,高、中剂量组及盐酸多奈哌齐组老年斑沉积明显减少。其中高剂量组又较中剂量组的 A₁₋₄₂ 表达量少。

表 1 益智饮对 A₁₋₄₂ 致老年痴呆模型大鼠逃避潜伏期的影响 (̄±s, n = 12)

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	逃避潜伏期 / s
正常对照	-	10.89 ± 2.71 ¹⁾
模型	-	99.93 ± 10.77
盐酸多奈哌齐	0.45 × 10 ⁻³	16.69 ± 2.98 ¹⁾
益智饮	3.6	18.13 ± 3.54 ¹⁾
	1.8	32.30 ± 5.13 ^{1,2)}
	0.9	34.88 ± 5.18 ^{1,2)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与高剂量组比较²⁾ $P < 0.01$

表 2 益智饮对脑组织 SOD 活性和羟自由基抑制率的影响 (̄±s, n = 8)

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	SOD / U·mgprot ⁻¹	OH ⁻ / U·mgprot ⁻¹
正常对照	-	93.81 ± 4.43 ¹⁾	60.05 ± 4.16 ^{1,2)}
模型	-	65.21 ± 6.03	39.37 ± 3.71
盐酸多奈哌齐	0.45 × 10 ⁻³	84.33 ± 5.68 ¹⁾	50.83 ± 4.24 ¹⁾
益智饮	3.6	85.65 ± 4.54 ¹⁾	303.02 ± 7.25 ^{1,2)}
	1.8	84.10 ± 2.81 ¹⁾	83.06 ± 6.16 ¹⁾
	0.9	77.64 ± 7.54 ^{1,2)}	42.26 ± 3.21 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与中剂量组比较²⁾ $P < 0.01$

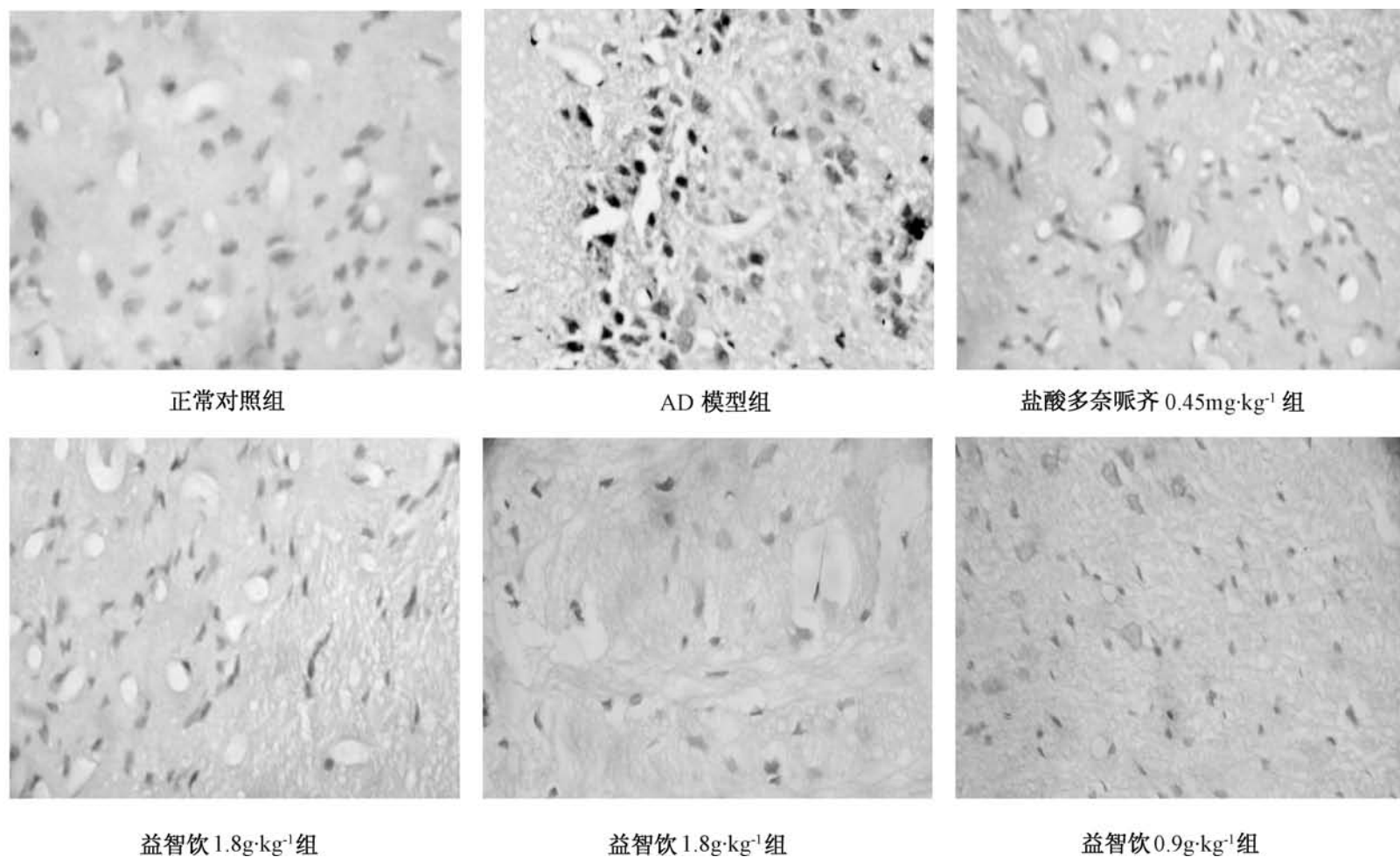


图 1 益智饮对 AD 大鼠脑组织中 A₁₋₄₂ 沉积的影响 (×400)

4 讨论

AD 归属于中医痴呆、呆病、健忘等范畴。从中医学的角度, AD 的发病病位在脑, 病因病机多为肾虚痰凝, 为本虚标实证。

益智饮采用的石菖蒲、远志为临床常用药对。近代名医施今墨用远志石菖蒲治疗神经衰弱、眠差、记忆力减退者确有疗效。石菖蒲具有开窍豁痰, 化湿和中的功效, 主治痰厥、健忘、热病神昏等疾病。现代药理研究: 其具有抗老年痴呆、促进学习与记忆、镇静等作用。裘昌林妙用石菖蒲治疗老年性痴呆疗效颇佳^[5]; 有研究表明^[6] 石菖蒲挥发油对神经细胞损伤具有一定的保护作用, 高剂量石菖蒲兴奋和保护中枢神经系统的作用最强^[7]。远志具有益智安神、祛痰消肿和散瘀的功效, 主治健忘惊悸、神志恍惚、失眠多梦等疾病。现代药理研究: 其具有抗衰老、抗痴呆和脑保护等作用。远志、石菖蒲水煎合剂在清除自由基、延缓脑组织衰老方面有独特的功效^[8], 但具体机制尚不明确。

目前, 有研究表明 A β 的聚集是 AD 发病的始发事件^[9]。所以, 动物脑内注射 A β 是 AD 造模的重要方法^[10]。为此该文在实验中运用 A β_{1-42} 注射脑内海马区, 免疫组化结果提示模型组有较多 A β 沉积, 定位航行学习记忆试验又提示模型组较正常对照组逃避潜伏期明显延长, 表明模型组学习记忆能力差, 说明造模成功。

在实验中发现, 与模型组相比, 益智饮高、中、低剂量组的逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$), 高剂量组尤为明显, 表明益智饮可增强大鼠学习记忆能力, 且有一定的量效关系。A β 蛋白沉积是 AD 的重要病理表现, 益智饮高、中剂量 A β_{1-42} 的沉积表达均明显低于模型组, 说明益智饮可能具有治疗 AD 的作用。

但益智饮如何减少 A β_{1-42} 的沉积? 有研究发现异常 A β 的神经毒性会产生大量的氧自由基, 而这些氧自由基又反作用于脑中的 A β 促使产生更多沉积和神经毒性, 同时又诱导神经细胞变性、神经细胞凋亡和中枢神经系统炎症反应。为此该文检测了 SOD 活性及羟自由基的抑制率, 以研究益智饮是否具有抗氧化作用及具体途径。实验结果提示, 模型组大鼠脑组织中的 SOD 活性明显降低, 羟自由基的抑制率亦明显降低, 说明 AD 模型组大鼠脑内自身的抗氧化防御系统酶 SOD 活性降低, 同时产生大量

的羟自由基; 益智饮组分别与盐酸多奈哌齐组比较, 在 SOD 活性方面除中药低剂量组升高不明显, 余均升高明显; 在抑制羟自由的生成率方面, 高、中剂量组的抑制率明显升高。提示不同剂量组益智饮能增强 SOD 的活性, 有效地直接地抑制脑内的氧自由基——羟自由基的生成, 提高机体的抗氧化能力, 在高、中剂量时效果更强, 更明显。因此, 有理由推测益智饮治疗 AD 的作用机制可能是其通过直接抑制羟自由基的生成和增强细胞内抗氧化防御系统酶 (SOD) 来减少 A β 的沉积, 保护神经细胞, 增强记忆, 延缓痴呆。

综上, 益智饮治疗 AD 的疗效可能是通过抗氧化作用实现的, 为临床 AD 治疗提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] Leclerc E, Sturchler E, Vetter SW, Heizmann CW. Crosstalk between calcium, amyloid beta and the receptor for advanced glycation endproducts in Alzheimer's disease [J]. *Rev Neurosci*, 2009, 20(2): 95.
- [2] Nimmrich V, Ebert U. Is Alzheimer's disease a result of presynaptic failure? Synaptic dysfunctions induced by oligomeric beta-amyloid [J]. *Rev Neurosci*, 2009, 20(1): 1.
- [3] Dimou E, Booij J, Rodrigues M, et al. Amyloid PET and MRI in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2009, 6(3): 312.
- [4] Paxinos G, Watson C. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 38.
- [5] 林祖辉, 裘昌林. 妙用石菖蒲治脑系顽疾经验浅识 [J]. *中医药学刊*, 2005, 23(2): 231.
- [6] 方永奇, 魏刚, 等. 石菖蒲醒脑开窍作用物质基础及其作用机制研究 [J]. *医学研究杂志*, 2007, 36(9): 60.
- [7] 吴启端, 方永奇, 李瓴, 等. 不同剂量石菖蒲对中枢神经系统影响的实验研究 [J]. *中国药房*, 2005, 16(9): 656.
- [8] 郑良朴, 范廷效, 林久茂, 等. 远志、石菖蒲水煎合剂对 D-半乳糖导致小鼠衰老作用的实验研究 [J]. *福建中医药*, 2002, 33(4): 35.
- [9] 盛树力. 老年性痴呆从分子生物学到临床诊治 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1999: 353.
- [10] Miguel-Hidalgo JJ, Alvarez XA, Cacabelos R, et al. Neuroprotection by metnantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40) [M]. *Brain Res*, 2002, 958(1): 210.