

加味五子衍宗方有效部位对 β -淀粉样肽致大鼠行为学改变的影响

富 宏, 王学美*, 刘庚信

(北京大学第一医院中西医结合研究室, 北京 100034)

[摘要] 目的: 观察加味五子衍宗颗粒及其有效组分对 β -淀粉样肽所致老年性痴呆(AD)模型鼠空间学习记忆能力的影响。方法: 采用大鼠侧脑室立体定向注射 $A\beta_{25-35}$ 的方法建立 AD 动物模型, 服用加味五子衍宗颗粒及其总黄酮、总多糖 15 d 后以全自动 Morris 水迷宫实验检测大鼠定位航行试验及空间探索试验, 来评价大鼠空间学习记忆功能。结果: 加味五子衍宗颗粒及其有效组分总黄酮、总多糖均能明显缩短模型大鼠在 Morris 水迷宫定位航行试验中的逃避潜伏期和搜索距离 ($P < 0.05$), 显著增加空间探索试验中原平台所在象限搜索时间和距离占总时间和总距离的百分比 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 加味五子衍宗颗粒及其总黄酮、总多糖能改善由 β -淀粉样肽所致 AD 模型鼠的空间学习记忆能力。

[关键词] 加味五子衍宗颗粒; 黄酮类; 多糖类; 学习记忆; β -淀粉样肽; 迷宫学习

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)06-0044-04

Effect of Modified Wuzi Yanzong Prescription and its Components on Spatial Behavior in Rats Induced by β -amyloid Peptide 25-35

FU Hong, WANG Xue-mei*, LIU Geng-xin,

(Institute of integrated Chinese and Western Medicine, The First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Modified Wuzi Yanzong Prescription and its components on spatial behavior in the rats with Alzheimer's disease(AD) by $A\beta_{25-35}$. **Methods:** The animal model of AD was established by $A\beta_{25-35}$ stereotactic injection into the lateral cerebral ventricle of rats. Rats were treated with Modified Wuzi Yanzong Prescription and its components (total flavonoids and total polysaccharodes) for 15 days, Morris water maze with the video record and computer system and the spacial exploration experiment were used to assess the behavior performances of the rats. **Results:** Significant differences were observed between model group and Modified Wuzi Yanzong Prescription and its components treated groups ($P < 0.05$). Compared with the model group, the escape latency and the searching distance were markedly reduced ($P < 0.05$), the percentage of the rats swimming time and distance in platform quadrant of the spacial experiment were markedly higher ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in Modified Wuzi Yanzong Prescription and its components treated groups. **Conclusion:** Modified Wuzi Yanzong Prescription and its component can improve learning and memory disorders of the model rats induced by $A\beta_{25-35}$.

[Key words] Modified Wuzi Yanzong Prescription; flavonoids; polysaccharides; learning and memory; β -amyloid peptide 25-35; maze learning

[收稿日期] 2008-09-01

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30672760)

[通讯作者] * 王学美, Tel: (010) 83573053; E-mail: wangxuemr@bjmu@163.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD) 又称老年性痴呆, 是大脑退行性变性疾病, 其主要病理特征是神经细胞外的老年斑形成和神经纤维缠结以及神经元的大量丧失。 β 淀粉样肽($A\beta$) 不仅是 AD 脑内

老年斑的主要结构物质,而且 A β 的毒性作用还是 AD 病理机制中的重要环节,已有的研究表明 β 淀粉样肽的沉积可导致神经元及其突触的丢失,使患者出现认知功能减退与记忆障碍等痴呆症状^[1]。国外相继报道,脑内定位注射 A β 能导致实验动物的学习记忆障碍,可引起体外培养神经元细胞的死亡。因此,在大鼠脑内和培养的神经细胞中加入 A β 片断制作 AD 模型的方法被广泛采用^[2-3]。以往的研究结果显示加味五子衍宗颗粒治疗轻度认知障碍有良好的临床疗效,能有效地防止向 AD 发展^[4-6]。此次,我们采用大鼠侧脑室立体定向注射 A β_{25-35} 的方法建立 AD 动物模型,通过大鼠定位航行及空间探索实验,评价大鼠服用加味五子衍宗颗粒及有效组分总黄酮、总多糖后,空间学习记忆功能的变化。

1 材料

1.1 动物 SD 雄性大鼠(SPF 等级),体重 285~315 g,由中国军事医学科学院科学实验动物中心提供(许可证号 SCXK-军-2007-004)。

1.2 药品与试剂 加味五子衍宗颗粒,药物组成:在药典配方五子衍宗丸的基础上加淫羊藿,即:枸杞子 400 g,菟丝子(炒) 400 g,覆盆子 200 g,五味子(蒸) 50 g,车前子(盐炒) 100 g,淫羊藿(羊油脂炙用) 400 g,药物由江苏省江阴市江阴天江药业生产,批号:0412101;总黄酮(得率 0.735%)及总多糖(得率 3.7%)由北京大学药学院采用醇提法提取;阳性对照药选用石杉碱甲片,河南太龙药业产品,批号:H10940156;A β_{25-35} 为 Sigma 产品,批号:115K4778。将 A β_{25-35} 溶于无菌生理盐水配成浓度为 10 mmol·L⁻¹,置 37 °C 恒温箱内孵育 7 d,进行老化备用。

1.3 仪器与设备 Morris 全自动水迷宫系统(水池直径 1.5 m)由中国医学科学院药物研究所研制。

2 方法

2.1 AD 动物模型的制备 大鼠适应性喂养 3 d 后,用 2% 戊巴比妥钠 ip 麻醉(40~50) mg·kg⁻¹ 体重,固定于脑立体定位仪上,剪去顶部毛发,碘酊消毒后切开皮肤,参照包新民的《大鼠脑立体定位图》,选择右侧侧脑室为注射靶区,于前凶向后 1.0 mm、中线旁开 1.7 mm 处,用三棱针钻开颅骨,暴露硬脑膜,再用 5 号微量注射器自脑表面垂直进针 4.0 mm,将 10 mmol·L⁻¹ A β_{25-35} 溶液 5 μ L 缓慢注入(注入时间不少于 5 min),留针 2 min 后缓慢撤针,缝合伤口;对照组注入等体积无菌生理盐水。

2.2 分组和给药 分组采用随机数字表法将大鼠分为 6 个组:空白对照组,模型组,加味五子衍宗颗粒复方组,加味五子衍宗总黄酮组,加味五子衍宗总多糖组,石杉碱甲片为阳性药对照组。每组 10 只。用药量为成人临床剂量的 20 倍;各组剂量见表 1。其中总黄酮和总多糖用量按原复方药量的得率折算,含生药量与复方组相同。诸药均以蒸馏水配成溶液给大鼠 ig,1 次/d,每次 2 mL,空白对照和模型组则以等体积蒸馏水 ig,连续 15 d 后进行水迷宫实验。

2.3 检测指标及方法

2.3.1 定位航行实验(space navigation) 选取泳池壁 4 个象限的中点作为实验动物的 4 个入水点,将其随机由该 4 点中 1 点面向池壁放入泳池,寻找逃避平台。找到并爬上平台则结束此次训练,不能找到者持续记录 120 s 后将其引至平台并停留 30 s,连续 3 d,每日训练 4 次。第 4 天记录成绩,摄像机拍摄实验全过程,记录实验动物游泳轨迹并通过软件分析计算给出总游泳时间(逃避潜伏期)和轨迹长度(搜索距离)。

2.3.2 空间探索实验(space probe) 完成定位航行实验后,从泳池中撤去逃避平台,将实验动物从原平台所在象限的对侧放入水中,连续记录实验动物游泳轨迹 120 s,软件分析计算其在各象限所用时间和轨迹长度,给出实验动物在原平台所在象限游泳时间和轨迹长度占逃避潜伏期和搜索距离的百分比。

2.4 统计学方法 全部数据采用 SPSS 10.0 中文版统计软件进行处理。计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 定位航行实验 观察大鼠搜索并找到逃避平台的逃避潜伏期及搜索距离 结果见表 1。模型组较空白对照组逃避潜伏期明显延长($P < 0.05$),搜索距离明显增加($P < 0.05$);加味五子衍宗颗粒复方组、总黄酮组、总多糖组及石杉碱甲组逃避潜伏期和搜索距离均较模型组明显缩短($P < 0.05$)。

3.2 空间探索实验 观察大鼠在原平台所在象限搜索时间及距离占逃避潜伏期和轨迹长度的百分比 结果见表 2。每只试验大鼠在原平台所在象限的搜索时间占逃避潜伏期时间的百分比与搜索距离占轨迹长度的百分比数值十分接近。模型组大鼠在原平台所在象限搜索时间及距离占总时间及总距离的百

分比均较空白对照组明显下降 ($P < 0.01$); 加味五子衍宗颗粒复方组、总黄酮组、总多糖组及石杉碱甲组大鼠在原平台所在象限搜索时间及距离占总时间及总距离的百分比均较模型组显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但均未恢复至正常水平。总黄酮组比总多糖组的功效更强, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。

表 1 加味五子衍宗颗粒及有效组分对 AD 大鼠定位航行实验中逃避潜伏期和搜索距离的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	逃避潜伏期(s)	搜索距离(cm)
空白对照组	—	40.20 ± 6.92 ¹⁾	414.21 ± 80.03 ¹⁾
模型组	—	58.74 ± 15.02	654.42 ± 237.39
加味五子衍宗组	4 000	42.22 ± 11.48 ¹⁾	448.39 ± 118.98 ¹⁾
总黄酮组	29.4	41.74 ± 14.29 ¹⁾	430.29 ± 136.90 ¹⁾
总多糖组	148	44.25 ± 14.18 ¹⁾	477.43 ± 145.78 ¹⁾
石杉碱甲组	20	41.76 ± 13.87 ¹⁾	437.19 ± 148.24 ¹⁾

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$

表 2 加味五子衍宗颗粒及有效组分对 AD 大鼠空间探索实验中在原平台所在象限搜索时间及距离的百分比的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	搜索时间百分比(%)	搜索距离百分比(%)
空白对照组	—	42.36 ± 5.39 ²⁾	42.36 ± 5.39 ²⁾
模型组	—	18.32 ± 6.21	18.31 ± 6.21
加味五子衍宗组	4 000	29.06 ± 5.05 ^{2,3)}	29.06 ± 5.05 ^{2,3)}
总黄酮组	29.4	34.01 ± 6.53 ^{2,3)}	34.00 ± 6.53 ^{2,3)}
总多糖组	148	24.62 ± 6.42 ^{1,3,4)}	24.62 ± 6.41 ^{1,3,4)}
石杉碱甲组	20	32.32 ± 6.10 ^{2,3)}	32.32 ± 6.10 ^{2,3)}

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与空白对照组比较³⁾ $P < 0.01$; 总多糖与总黄酮组比较⁴⁾ $P < 0.01$

4 讨论

我们采用大鼠侧脑室立体定向注射 $\text{A}\beta_{25-35}$ 的方法建立 AD 动物模型, 经过大鼠定位航行及空间探索实验, 得出 AD 模型鼠比正常大鼠定位航行实验中的逃避潜伏期及搜索距离要长得多; 而空间探索实验中在原平台所在象限搜索时间及距离占搜索总时间及总距离的百分比却短得多, 说明用此方法建立 AD 鼠模型是成功的, 同时也说明脑内 β 淀粉样肽的沉积确实能造成大鼠空间学习记忆功能的障碍。

对于脑部疾病而言, 尽管许多药物有中枢神经活性, 但由于血脑屏障的存在阻碍了这些物质进入病变部位而无法发挥作用。长期以来, 中外学者深入研究能穿透血脑屏障治疗中枢神经系统疾病的有效药物, 但进展缓慢^[7]。2004 年邹纯朴^[8] 等报道了地黄引子含药脑脊液对海马神经元损伤的影响, 结

果表明地黄引子有效成分能穿透血脑屏障, 对抗 β 淀粉样蛋白诱导的海马神经元损伤。为我们深入研究加味五子衍宗颗粒及有效组分改善学习记忆功能提供了实验思路。我们根据中医补肾益智理论并结合临床经验, 选用由古方五子衍宗丸加淫羊藿组成的加味五子衍宗颗粒进行了多年的实验研究, 结果表明加味五子衍宗颗粒不仅能提高轻度认知障碍 (MCI) 患者血清超氧化物歧化酶活性, 降低血清过氧化脂质的代谢产物丙二醛量、乙酰胆碱酯酶水平和 β 淀粉样蛋白的含量, 减少白细胞线粒体 DNA 缺失, 还能改善 MCI 患者海马体积的萎缩, 提高 MCI 患者记忆商, 对记忆功能的指向记忆、联想学习、图像自由回忆、无意义图形再认、人像特点联系回忆的 5 个方面均有明显提高作用, 且能有效地防止向 AD 发展^[4-6,9]。

本次实验结果显示: 服用加味五子衍宗颗粒复方组、总黄酮组、总多糖组及石杉碱甲组的 AD 模型鼠在定位航行实验中逃避潜伏期和搜索距离均较模型组明显缩短, 空间探索实验中在原平台所在象限搜索时间及距离占总时间及总距离的百分比也均较模型组显著增加, 说明加味五子衍宗颗粒及有效组分能改善由 β 淀粉样蛋白所致 AD 模型鼠的空间学习记忆能力, 有拮抗 β 淀粉样蛋白的神经毒性的作用。从实验结果中看出加味五子衍宗颗粒复方组和总黄酮组药效相仿, 总多糖组功效不如复方组和总黄酮组。这提示我们加味五子衍宗方中改善学习记忆功能的有效组分可能更多的是在黄酮类物质中, 而它的作用途径是什么还有待于结合脑脊液药理学的实验来进一步研究。

[参考文献]

- [1] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. Science, 2002, 297: 353-356.
- [2] Tohda C, Matsumoto N, Zou K, et al. A beta (25-35)-induced memory impairment, axonal atrophy, and synaptic loss are ameliorated by MI, A metabolite of protopanaxadiol-type saponins [J]. Neuropsychopharmacology, 2004, 29(5): 860-868.
- [3] 方芳, 晏勇. 老年性痴呆动物模型研究 [J]. 国外医学神经病学神经外科学分册, 2004, 31(5): 474-477.
- [4] 富宏, 王学美, 刘庚信, 等. 加味五子衍宗颗粒对轻度认知障碍患者记忆功能及海马体积的磁共振研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(12): 1066-1069.

- [5] 富宏,王学美,刘庚信,等. 加味五子衍宗颗粒对轻度认知障碍患者记忆功能及血 β 淀粉样蛋白的影响[J]. 中国老年学杂志, 2007, 27(4): 715-717.
- [6] 富宏,王学美,刘庚信,等. 加味五子衍宗颗粒治疗轻度认知障碍的随访研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(2): 67-70.
- [7] Pardridge WM. The blood brain barrier: bottleneck in brain drug development[J]. NeuroRx, 2005, 2(1): 3-14.
- [8] 邹纯朴,谢宁,宋诚挚,等. 地黄饮子含药脑脊液对海马神经元损伤的影响[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2004, 24(1): 1-3.
- [9] Wang XM, Fu H, Liu GX, *et al.* Effect of Modified Wuzi Yanzong Granule on Patients with Mild Cognitive Impairment from Oxidative Damage Aspect [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2007, 13(4): 258-263.