

• 药理 •

复智散对阿尔茨海默病模型大鼠治疗作用的研究

王德生*, 李绪领, 汤颖

(哈尔滨医科大学第一临床医学院神经内科, 黑龙江 哈尔滨 150001)

[摘要] 目的: 观察复智散(FZS)对 β -淀粉样蛋白(A β 1-40)诱导的阿尔茨海默病(AD)模型大鼠的治疗作用。方法: A β 1-40 海马注射制作 AD 大鼠模型, 以不同剂量的 FZS 灌胃治疗, 通过 Morris 水迷宫检测大鼠的空间定向、记忆力, 采用比色法测定大鼠海马内胆碱乙酰基转移酶(ChAT)、乙酰胆碱酯酶(AChE)活性及乙酰胆碱(ACh)含量。结果: 不同剂量的 FZS 不仅对 AD 大鼠的定向、记忆力有明显的改善作用, 且能增加 AD 大鼠海马内的 ChAT 活性及 ACh 含量, 并降低 AChE 活性。结论: FZS 在(0.3~1.2)g·kg⁻¹剂量范围内均有改善 AD 大鼠认知功能, 增加海马区 ACh 系统功能的作用。

[关键词] 复智散; 阿尔茨海默病; 胆碱乙酰基转移酶; 乙酰胆碱酯酶; 乙酰胆碱; 认知功能

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)10-0028-03

Effect of Fuzhisan on Alzheimer's Disease Model Rats

WANG De-sheng*, LI Xu-ling, TANG Ying

(Department of Neurology, the First Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

[Abstract] **Objective:** To examine the effects of Fuzhisan (FZS) on the AD model rats induced by injection β -amyloid (A β 1-40) to the hippocampus. **Methods:** The AD model of rats was established by injection of A β 1-40 to the hippocampus. The cognitive ability of the AD model rats was detected by the Morris water amaze test. The activities of acetylcholinesterase (AChE) and choline acetyltransferase (ChAT) in the hippocampus were examined by the colorimetric method; the acetylcholine(ACh) content was examined by the alk aline hydroxylamine colorimetric method. **Results:** The Chinese herbal medicine FZS not only effectively improved the learning and memory abilities of the AD model rats, in the water maze test, but also ameliorated the decline ChAT activity and ACh content in the hippocampus, and decrease the elevated AChE activity, The FZS was dose-dependently effective in the therapy of AD in rats ranging from 0.3 to 1.2 g·kg⁻¹, however it allowed an optimal therapeutic effect at the dosage of 1.2 g·kg⁻¹. **Conclusion:** The FZS compounds regulate and ameliorate the cholinergic functions of the AD-model rats, thereby achieve its therapeutic effect.

[Key words] FZS; AD; ChAT; AChE; ACh; cognitive ability

随着人类寿命的延长和世界人口的快速老龄化, 老年认知功能障碍性疾病尤其是老年痴呆的患病率正逐年增高。而 Alzheimer's (AD) 是造成老年

痴呆的主要原因。65 岁以上的老年人中, AD 的患病率为 5%, 而 80 岁以上的老年人中, AD 的患病率可达 20%, 且到 2050 年 AD 的患病率将是现今的三倍^[1]。然而, 目前临床用于治疗 AD 的药物, 仍以对于早、中期 AD 有效的对症治疗药为主, 且因其价格昂贵且副作用较多, 仍未能被普遍接受。FZS 是一个中药复方, 已有临床及实验室研究证明 FZS 治疗 AD 有效^[2-5]。本研究应用 β -淀粉样蛋白(A β 1-40) 海马注射制作出 AD 大鼠模型, 旨在观察不同剂

[收稿日期] 2007-10-19

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30670726)

黑龙江省自然科学基金重点项目(ZJY03-5)

[通讯作者] * 王德生, Tel: (0451) 53603616; E-mail: hydwsd@hotmail.com

量的 FZS 对认知功能及海马内胆碱能系统的影响。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重(200±20)g,由北京军事医学科学院动物中心提供。自由食水,每天照明时间 12 h,室温(23±1)℃。

1.2 制剂 FZS 由人参、黄芩、芎藭蒲等 8 味中药组成,该复方中全部中药均购自哈尔滨市药材公司。按比例混合,加水浸泡 40 min,煎煮 1 h,滤出药汁,加水继续煎煮 1 h 后过滤,将两次滤出的药汁混合,冷冻抽干,-80℃保存。给药前配成 0.5 g·mL⁻¹的 FZS 水提液,4℃保存。实验中给药剂量以冻干粉的量计算。

1.3 主要试剂 Aβ1-40(Sigma 公司),ChAT 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20050721),AChE 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20050725),毒扁豆碱(ALEXIS 公司),氯化羟胺(北化公司)。

1.4 主要仪器 紫外-可见分光光度计:UV-250 型,日本岛津公司产品;高速冷冻离心机:20PR-5 型,日本日立公司;恒温水浴箱:DK-8AX 型,上海;Morris 水迷宫自动控制仪装置:中国医学科学院药物研究所研制。

2 方法

2.1 动物模型的制备 将 Aβ1-40 溶于无菌生理盐水中,浓度为 1 mg·mL⁻¹。密封后于 37℃培养箱内孵育 7 d,使之成为凝聚态,参照《大鼠脑立体定位图谱》,注射部位为前囟后 3.5 mm,旁开 2.0 mm,深度 3.0 mm,注射剂量为每只大鼠 10 μL,假手术组注射相同体积的生理盐水。

2.2 动物分组及给药方法 动物被随机分为正常对照组(对照组)、假手术组、模型组、FZS 0.3 g·kg⁻¹组(低剂量组)、FZS 0.6 g·kg⁻¹组(中剂量组)、FZS 1.2 g·kg⁻¹组(高剂量组)。每组 10 只大鼠。Aβ 注射后第 12 天开始 ig 给药,连续 30 d。

2.3 行为学检测 自给药起第 31 天即给药结束后,对大鼠进行 Morris 水迷宫检测,通过 Morris 水迷宫实验中记录潜伏期的长短测定大鼠的空间辨别记忆能力,设定搜索时间为 180 s,180 s 内找不到平台者按 180 s 计时。连续检测 5 d,实验结果进行统计学分析。

2.4 大鼠海马内 ACh 含量及 ChAT, AChE 活性检测 断头处死大鼠,于冰台上取双侧海马。用冰冷的

生理盐水冲净表面血迹,滤纸拭干,后以电子天平称重。在冰盒内使用玻璃匀浆器制备成 10% (1:9, w/v) 的脑组织匀浆,在 4℃离心(4 000 r·min⁻¹ × 10 min),取上清液进行实验。按 ChAT 及 AChE 试剂盒说明书测定 ChAT 及 AChE 活性。考马斯亮兰法测定蛋白含量。用碱性羟胺比色法测定 ACh 含量,取脑组织匀浆 0.8 mL 加 1.4 mL 蒸馏水混合,加 1.5 mmol·L⁻¹毒扁豆碱 0.2 mL,缓慢加入 1.84 mmol·L⁻¹三氯乙酸 0.8 mL,充分混合,离心(5 000 r·min⁻¹ × 5 min)后取上清液 1.0 mL,加入碱性羟胺(3.5 mol·L⁻¹氢氧化钠与 2.0 mol·L⁻¹氯化羟胺等体积混合而成) 1.0 mL,室温放置 15 min 后,依次加入 4 mol·L⁻¹盐酸 0.37 mol·L⁻¹三氯化铁各 0.5 mL。充分混匀,在 492 nm 处比色,计算 ACh 含量 μmol·mg⁻¹蛋白。标准管以 0.2 μmol·mL⁻¹的 ACh 代替脑组织匀浆。

2.5 统计分析 实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,行为学检测结果采用重复方差分析,其余组间差异采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

3 实验结果

3.1 行为学检测 Morris 水迷宫记录大鼠找到平台所需要的时间(潜伏期),潜伏期越长表明空间辨别能力越差。结果见表 1。

表 1 FZS 对 AD 大鼠空间学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	潜伏期(s)				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
对照组	-	117.2 ± 30.35	98.7 ± 32.14	78.4 ± 23.67	44.8 ± 12.59	31.4 ± 13.48
假手术组	-	119.1 ± 21.56	101.6 ± 23.16	78.1 ± 19.80	44.7 ± 16.85	33.9 ± 11.47
模型组	-	144.6 ± 15.68	112.1 ± 11.30	106.2 ± 8.35	77.5 ± 20.79	68.4 ± 14.52
FZS 组	0.3	141.5 ± 30.16	105.7 ± 17.71	95.5 ± 12.47	53.8 ± 16.61	39.3 ± 14.06 ²⁾
FZS 组	0.6	137.1 ± 19.31	106.8 ± 27.20	92.5 ± 12.75	49.1 ± 18.68	33.2 ± 12.58 ²⁾
FZS 组	1.2	129.9 ± 20.42	103.1 ± 19.33	79.9 ± 22.95	52.1 ± 11.82	28.7 ± 11.16 ^{2,3)}

注:与模型组比较:¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与低剂量组比较:³⁾ $P < 0.05$

3.2 胆碱能系统检测 ACh 含量测定结果见表 2。FZS 治疗组大鼠海马内 ACh 含量均明显增高,与模型组比较,有统计学意义,模型组大鼠海马内的 ACh 含量明显低于对照组,二者比较,有统计学意义,假手术组大鼠海马内 ACh 含量与对照组比较,无统计学意义。

ChAT 活性检测结果见表 2。FZS 治疗组大鼠海马内 ChAT 活性均明显高于模型组,两两比较,有统计学意义;模型组大鼠海马内的 ChAT 活性明显低于

对照组,二者比较,有统计学意义,假手术组大鼠海马内 ChAT 活性与对照组比较,无统计学意义。

AChE 活性检测结果见表 2。随 FZS 给药剂量增加,AChE 活性降低,中、高剂量组大鼠海马内 AChE 活性均明显低于模型组,两两比较,有统计学意义;模型组大鼠海马内的 AChE 活性明显高于对照组,二者比较,有统计学意义;假手术组大鼠海马内 AChE 活性与对照组比较,无统计学意义。

表 2 FZS 对 AD 模型大鼠海马内胆碱能系统的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	ACh (μmol·mg ⁻¹)	ChAT (IU·g ⁻¹)	AChE (U·mg ⁻¹)
对照组	—	8.84 ± 0.47	113.75 ± 3.68	0.48 ± 0.09
假手术组	—	8.81 ± 0.44	113.68 ± 3.44	0.48 ± 0.08
模型组	—	7.91 ± 0.51	101.72 ± 5.43	0.69 ± 0.09
FZS 组	0.3	8.29 ± 0.21 ¹⁾	105.99 ± 3.37 ¹⁾	0.68 ± 0.06
FZS 组	0.6	8.41 ± 0.30	107.33 ± 3.22	0.62 ± 0.07 ¹⁾
FZS 组	1.2	8.54 ± 0.38	109.22 ± 4.09	0.61 ± 0.07 ^{1,3)}

4 讨论

AD 是一种进行性神经系统变性疾病,其发病机制目前仍不清楚,但可以肯定的是其发病原因是多方面的,因此,单一方向的药物很难取得满意疗效。大量的研究资料表明,多种天然药物具有治疗认知功能障碍的巨大潜能^[7]。研究发现,FZS 能够对抗 Aβ 的细胞毒性^[2];改善 AD 模型鼠的空间学习和记忆能力^[3],改善 AD 患者的行为、情感及语言能力;SPECT 半定量法测定 AD 患者局部脑血流量的研究证实,FZS 对额叶、顶叶和扣带回的脑血流量有明显改善作用^[4]。最新研究发现 FZS 对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱发的 AD 模型小鼠脑内的胆碱能系统有明显的调节作用,且呈现出明显的量效关系^[5]。这些研究结果促使我们对 FZS 治疗 AD 的机理做进一步的研究。认知功能障碍是老年性痴呆的主要临床表现,本研究发现不同剂量 FZS 均能明显改善 AD 模型大鼠的空间学习和记忆力,再一次证明 FZS 具有改善认知功能障碍的作用。学者们证实 AD 患者脑内胆碱能神经受累,通过增加大鼠脑内胆碱能神经的数量或增加 ACh 受体的密度,可以改善其认知功能^[6-7]。本研究亦发现 AD 模型大鼠海马内 ACh 含量明显降低,各给药治疗组大鼠海马内 ACh 含量均明显增高,这可能是 FZS 治疗 AD 有效的重要原因之一。研究证实 AD 患者脑内 AChE 活性增高^[8],本研究中 AChE 活性检测结果显示,模型组大鼠海马内的 AChE 活

性明显高于对照组,FZS 高、中剂量组大鼠海马内 AChE 活性均明显低于模型组,我们认为 FZS 亦可能通过抑制胆碱酯酶活性来改善 AD 患者的认知功能。ChAT 是胆碱能神经元的特殊标志,也是催化乙酰胆碱合成的限速酶,常用来研究中枢神经系统胆碱能神经元的含量或用作乙酰胆碱含量的间接指标^[9]实验结果显示,模型组大鼠海马内的 ChAT 活性明显低于对照组,各给药治疗组大鼠海马内 ChAT 活性均明显增高,所以我们认为,FZS 可通过调节 AD 大鼠海马内由于 Aβ 的毒性造成的胆碱能系统的损害来改善其认知功能,从而达到治疗 AD 的效果。我们还将对 FZS 对胆碱能系统的影响做更进一步的研究。

[参考文献]

[1] Travis J. Saving the mind faces high hurdles[J]. Science, 2005 Jul 29, 309(5735): 731.

[2] Wen Shirong, Wang Desheng, Zhang Jingyan, et al. Effect and mechanism of fuzhisan on toxic reaction of amyloid beta 25~ 35 to neural cells[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2005, 9(13): 248-249.

[3] 王德生,徐晓云,温世荣,等.复智散与尼莫地平、神经节苷脂治疗老年痴呆的实验和临床研究[J]. 中医药信息, 1998, 6: 49-51.

[4] 刚宝芝,王德生,王春丽,等.复智散治疗老年性痴呆的临床疗效观察[J]. 中风与神经疾病杂志, 2005, 12, 22(4): 535-537.

[5] 李绪领,王德生,孙曼霁,等.复智散(FZS)对 Alzheimer's disease (AD) 模型小鼠治疗作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(10): 421-424.

[6] 赖红,赵海花,高杰,等.新型胆碱酯酶抑制剂 (NAI) 及水迷宫训练对 AD 大鼠海马结构胆碱能纤维的影响[J]. 中国药理学通报, 2005, 7, 21(7): 807-810.

[7] 王向兵,曾因明,段世明,等.海马 M2 受体调节杏仁核内谷氨酸的释放与学习记忆的研究[J]. 中国药理学通报, 2006, 5, 22(2): 244-247.

[8] Ulrich J., Meier-Ruge, W., Meier, E., Ipsen, S., Senile plaque: staining for acetylcholinesterase and A4 protein: a comparative study in the hippocampus and entorhinal cortex[J]. Acta neuropathologica, 1990, 80: 624-628.

[9] Oda Y. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system[J]. Pathol Int, 1999, 49(11): 921.