

清心开窍方对老年痴呆小鼠脑自由基代谢及 海马 CA1 区神经细胞形态的影响

朱未名¹, 胡海燕^{2*}

(1. 温州市鹿城精神病医院, 浙江 温州 325003;

2. 温州医学院第二临床医学院中医教研室, 浙江 温州 325003)

[摘要] 目的: 探讨清心开窍方对老年痴呆模型小鼠脑内自由基代谢及海马 CA1 区神经细胞形态学的影响。方法: 将 150 只小鼠随机分为五组, 即空白对照组、模型组、模型+ 中药大剂量组(14.82 g·kg⁻¹)、模型+ 中药小剂量组(7.41 g·kg⁻¹)、模型+ 脑复康对照组(0.42 g·kg⁻¹)。除空白对照组外, 其余各组均每日灌服 AlCl₃ 造模(200 mg·kg⁻¹), 用药各组自造模第 7 d 起, 每日上午给予 AlCl₃ 灌胃, 下午给予相应的药物, 每日 1 次, 连续 8 周, 9 周后评定疗效。测小鼠学习记忆功能和脑内自由基代谢指标(SOD、MDA、LF)及对海马 CA1 区神经细胞形态学观察。结果: 中药各组能明显减少海马神经细胞的破坏, 提高 SOD 活性, 降低 MDA 及 LF 含量($P < 0.01$), 学习记忆能力明显改善。结论: 清心开窍方能改善 AD 小鼠学习记忆的能力, 对海马神经细胞具有保护作用, 提高痴呆小鼠的抗氧化能力, 降低氧自由基对机体的损伤, 而对 AD 具有很好治疗作用。

[关键词] 阿尔茨海默病; 学习记忆能力; 清心开窍方; 实验研究

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)09-0057-04

Effect of the Qing xin KaiqiaoFang on Contents of Free Radicals Metabolism in Brain and Morphology of Hippocampal Nerve Cells in AD Mice

ZHU Wei-ming, HU Hai-yan^{2*}

(Wenzhou Lu Cheng Mental Disease Hospital, Wenzhou, Zhejiang 325003, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of the Qing Xin KaiqiaoFang(QXKQF) on contents of free radicals metabolism in brain and shape hippocampal nerve cells in Alzheimer disease (AD) mice. **Methods:** One hundred fifty mice were divided into five groups: blank group, model group, two groups of treatment by QXKQF (14.82 g·kg⁻¹, 7.41 g·kg⁻¹), Piracetan comparison group(0.42 g·kg⁻¹). The model group was orally given AlCl₃ (200 mg·kg⁻¹) every day. For QXKQF and Piracetan groups, AlCl₃ treatment was given 6 days at the beginning, followed by giving orally AlCl₃ in the morning and drug in the afternoon for 8 weeks. Then, learning and memory ability, free radicals metabolism in brain(SOD、MDA、LF) and morphology of hippocampal nerve cells were investigated. **Results:** QXKQF can prevent hippocampal nerve cells from damage obviously. The SOD increased, the contents of MAD and LF were lowered compared with model group($P < 0.01$). Learning and memory ability of QXKQF groups is improved, compared with model group($P < 0.05 \sim 0.01$). **Conclusion:** QXKQF can improve learning and memory ability of AD mice, protect hippocampal nerve cells, resist oxidation and reduce free radicals injure for AD mice.

[Key words] alzheimer disease; learning and memory ability; Qing Xin Kai-qiao Fang; animal test

老年痴呆症(Alzheimer's disease, AD)是老年人的常见病、多发病。AD 目前已成为继心脏病、肿瘤和中风之后的第四位死亡原因, 由于其隐匿性和不可逆性, 给家庭和社会带来很大负担与危害。现代

[收稿日期] 2006-09-12

[通讯作者] * 胡海燕, Tel: 13867707082; E-mail: wyzhongyixi@

163.com

医学对本病尚缺乏理想的治疗方法,而中医对老年痴呆的治疗却有其独到之处。清心开窍方已运用临床多年,疗效确定。现将其对 AD 模型小鼠学习记忆能力、脑组织内自由基代谢和对海马细胞形态学的影响总结如下。

1 材料

1.1 动物 2 月龄 NTH 清洁级小鼠,雌雄各半,体重(18~22)g,由湖南中医药大学动物实验中心提供(合格证号:湖医动字第 20-001 号)。

1.2 药物 清心开窍方生地 6 g,麦冬 6 g,白芍 6 g,石菖蒲 6 g,石斛 6 g,川丹皮 6 g,茯神 6 g,苦参 6 g,陈皮 4 g,知母 5 g 等。取药 10 剂,共 570 g,煎成 1 500 mL(浓度 $0.38 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。浓缩成 750 mL 为大剂量浓度,小剂量给药时再稀释 2 倍。批号:20060321。脑复康(吡拉西坦片),批号:20051001,每片 400 mg,由威海亚太药业有限公司生产。取 30 片配制成 600 mL 的药液,浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,备用。 AlCl_3 ,批号:20050513,天津市大茂化学试剂厂生产。配制成 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,备用。

1.3 试剂 超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、脂褐素(LF)、考马斯亮兰测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,批号分别是:20060510,20060513,20060515,20060515。

2 方法

2.1 动物分组 取 2 月龄 NTH 清洁级小鼠 150 只,雌雄各半,体重(20.3 ± 2.3)g,雌性(20.2 ± 2.1)g,雄性(20.5 ± 2.6)g,按照完全随机设计,遵照均衡性原则,先将动物雌雄分开,再按体重分层,然后查随机数字表将动物随机分成空白对照组,模型组,模型+清心开窍方大剂量组($14.82 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、模型+清心开窍方小剂量组($7.41 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),模型+脑复康对照组($0.42 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)共 5 组,每组 30 只。清心开窍方动物的小、大剂量按动物体表面积折算分别相当于临床等效剂量的 2,4 倍。

2.2 AD 选模与给药 用 AlCl_3 灌胃造模。正常对照组以蒸馏水灌胃,每天 1 次,连续 9 周;造模组以 AlCl_3 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃,每日上午 1 次,连续 9 周;用药各组,自 AlCl_3 灌胃第 7 d 起每日上午给予 AlCl_3 灌胃,下午给予相应的药物,每日 1 次,连续 8 周。灌胃体积为 $0.04 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 体重。

2.3 观测指标

2.3.1 AD 模型小鼠记忆功能测试 小鼠跳台试

验,包括记忆获得性障碍(东莨菪碱)、记忆巩固障碍(亚硝酸钠)和记忆再现障碍实验(乙醇)。方法:于实验的 63 d 进行跳台试验,训练前 1 h 灌胃给药,即进行本试验。各组再按随机数字表法分成 3 区,每区 10 只,分别接受 3 个试验。试验方法参照徐氏等^[1]文献记载进行。利用小鼠对电击的记忆能力进行实验,采用 DT-200 跳台自动测试仪(成都泰盟科技有限公司)。每批实验各组分别有 1 只小鼠,平行操作。10 min 后再给第 2 只小鼠注射,以此类推。

2.3.1.1 记忆获得性障碍试验 每组各取第 1 区 10 只, I 组按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射生理盐水, II~V 组分别给予氢溴酸东莨菪碱 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射。注射后 15 min 进行跳台试验(各组小鼠平行操作)。实验分为训练和测试。训练前让小鼠置于跳台仪中,先适应环境 5 min,轻放于平台上,当动物从跳台上跳下四肢接触铜栅时,即给予 24 V 电压刺激,使小鼠受电击 3 次,小鼠受到电击后的正常回避反应为逃避到平台上,记录小鼠逃避至平台上的潜伏期,并记录 5 min 内的触电次数(错误次数),以此为学习成绩。24 h 后进行测试,记录小鼠第一次跳下的时间(潜伏期)及其 3 min 内受电击的次数(错误次数),以此作为记忆功能的评价指标。

2.3.1.2 记忆巩固障碍实验 每组各取第 2 区 10 只。学习能力测试方法同前。训练完后除对照组外各组立即腹腔注射 NaNO_2 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,以复制记忆巩固障碍模型。24 h 后进行记忆能力测试。方法为将小鼠放在平台上,箱底通电,小鼠从台上跳下为错误反应,记录从放上平台到跳下的时间为潜伏期。并记录 3 min 内的错误次数。

2.3.1.3 记忆再现障碍实验 每组各取第 3 区 10 只,测试学习能力。于训练后 24 h,记忆测试前 20 min,除对照组外,各组灌胃 40% 乙醇 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 复制记忆再现障碍动物模型,然后测试记忆成绩。记录潜伏期及 5 min 内的错误次数。

2.3.2 脑内自由基代谢指标的影响(SOD、MDA、LF)

2.3.2.1 组织匀浆制备: 末次给药后 1 h,各组动物脱臼处死,取脑,冷生理盐水冲洗残血,拭干。精确称取脑组织,剪碎,置超声波组织匀浆器中,加入 9 倍预冷的生理氯化钠溶液或根据需要加入蒸馏水,制取 10% 的水相组织匀浆待测。

2.3.2.2 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒测试法(羟胺法): 取 10% 的脑组织匀浆液再稀释 10 倍,制成

1% 的脑组织匀浆。与试剂用旋涡混匀器混匀, 置 37 °C 恒温水浴 40 min, 室温静置 10 min, 于 550 nm 处, 1 cm 光径, 蒸馏水调零, 用 U-3010 紫外分光光度计测各管吸光度。

2.3.2.3 丙二醛(MDA)测定试剂盒测试法(硫代巴比妥酸TBA法):取 10% 的脑组织匀浆液 0.2 mL 与试剂旋涡混匀器混匀, 试管口用薄膜扎紧, 刺一小孔, 95 °C 水浴 40 min, 取出后流水冷却, 然后 3 500~4 000 r·min⁻¹, 离心 10 min。取上清, 532 nm 处, 1 cm 光径, 蒸馏水调零, 用 U-3010 紫外分光光度计测各管吸光度值。

2.3.2.4 脂褐素(LF)测定(荧光比色法):取水相组织匀浆 1 mL, 加入经 50 °C 预热后的氯仿甲醇混合液 2 mL; 在旋涡混匀器上抽提 30 s 间歇 10 s, 共抽提 3 次。30 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 此时样品分 3 层, 上层为水相, 中层为组织沉淀层, 下层为氯仿甲醇相。吸取上层水相, 再用带长麻醉针头的针筒沿管壁穿透中层, 吸取下层氯仿甲醇液。向氯仿甲醇提取物中加入 0.1 mL 的试剂, 轻轻摇匀, 使之澄清透明。将上述液体置紫外灯下放置 60 s, 倒入石英比色杯中, 取有机相用 U-3010 紫外分光光度计测其荧光强度。以 0.1 μg·mL⁻¹ 的奎宁标准液, 氯仿甲醇混合液为空白, 发射波长 420 nm, 激发波长 360 nm 测定荧光强度。

2.3.3 海马细胞形态学观察 动物末次灌胃 2 h 后, 参考杨氏方法^[2], 用水合氯醛 350 mg·kg⁻¹ 腹腔注射麻醉后, 迅速剖开胸腔暴露心脏, 将静脉穿刺针经左心室插入升主动脉, 灌注生理盐水, 待血色变淡后, 继以多聚甲醛灌注固定, 直至动物呈僵硬状态。原位静置 1 h 后取脑, 剥离海马, 常规石蜡包埋, 冠状切片, 厚度 8 μm, 每隔 2 张取 1 张, HE 0.1 硫堇染色^[2], 光学显微镜下观察海马 CA1 区细胞形态变化。

2.4 统计学方法 本实验全部数据采用 SPSS12.0 版统计软件包处理。潜伏期及 5 min 内的错误次数结果均用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较用单因素方差分析, 两两比较用 *q* 检验, 检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 对东莨菪碱所致小鼠学习记忆获得性障碍的影响 结果表明, 清心开窍方各组均可使小鼠错误次数低于模型组, 低、高剂量组均可使潜伏期明显延长($P < 0.01$ 或 0.05), 与脑复康组比无显著差异。见表 1。

表 1 清心开窍方对东莨菪碱所致小鼠学习记忆获得性障碍的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	学习		记忆	
		潜伏期(s)	5 min 错误次数	潜伏期(s)	3 min 错误次数
空白组	—	168.4 ± 7.10 ²⁾	2.0 ± 0.05 ²⁾	182.3 ± 9.2 ²⁾	1.5 ± 0.85 ²⁾
模型组	—	270.7 ± 5.75	4.1 ± 0.20	78.1 ± 6.5	3.4 ± 0.43
脑复康组	0.42	234.0 ± 9.66 ²⁾	2.4 ± 0.07	183.8 ± 6.7 ²⁾	1.6 ± 0.52 ²⁾
清心开窍方组	14.82	233.9 ± 3.31 ²⁾	1.7 ± 0.67 ²⁾	186.8 ± 6.9 ²⁾	1.6 ± 0.70 ²⁾
清心开窍方组	7.41	234.9 ± 10.07 ²⁾	2.4 ± 0.97 ²⁾	184.9 ± 2.3 ²⁾	1.5 ± 0.71 ²⁾

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

3.2 对亚硝酸钠致小鼠记忆巩固障碍的影响 模型组测试潜伏期缩短, 错误次数增多, 与正常组比较差异显著, 说明模型组小鼠学习记忆巩固出现障碍。与模型组比较, 各清心开窍方组小鼠测试潜伏期均明显延长($P < 0.05 \sim 0.01$), 错误次数明显减少, 与脑复康组比差异不显著。结果见表 2。

表 2 清心开窍方对亚硝酸钠致小鼠记忆巩固障碍的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	记忆	
		潜伏期(s)	3 min 错误次数
空白组	—	168.4 ± 17.10 ²⁾	0.7 ± 0.48 ²⁾
模型组	—	85.9 ± 3.09	2.2 ± 0.92
脑复康组	0.42	188.8 ± 11.74 ²⁾	1.1 ± 0.74 ²⁾
清心开窍方组	14.82	209.0 ± 7.88 ²⁾	0.8 ± 0.63 ²⁾
清心开窍方组	7.41	183.2 ± 6.71 ²⁾	1.3 ± 0.67 ²⁾

3.3 对乙醇致小鼠记忆再现障碍的影响 结果显示, 与模型组相比, 对照组、脑复康组、清心开窍方组各组的潜伏期明显延长($P < 0.01 \sim 0.05$), 错误次数明显减少($P < 0.05$), 与脑复康组比较差异无显著性。结果见表 3。

3.4 对脑内自由基代谢指标的影响(SOD、MDA、LF)

模型组小鼠 SOD 活性明显降低, MDA 及 LF 含量明显升高, 与正常组比较差异显著($P < 0.01$), 说明模型组抗氧化作用明显减弱, 自由基明显增多。与模型组比较, 各清心开窍方组 SOD 活性明显升高, MDA 及 LF 含量明显下降($P < 0.01$); 与脑复康组比较差异无显著性。结果见表 4。

表 3 清心开窍方对乙醇致小鼠记忆再现障碍的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

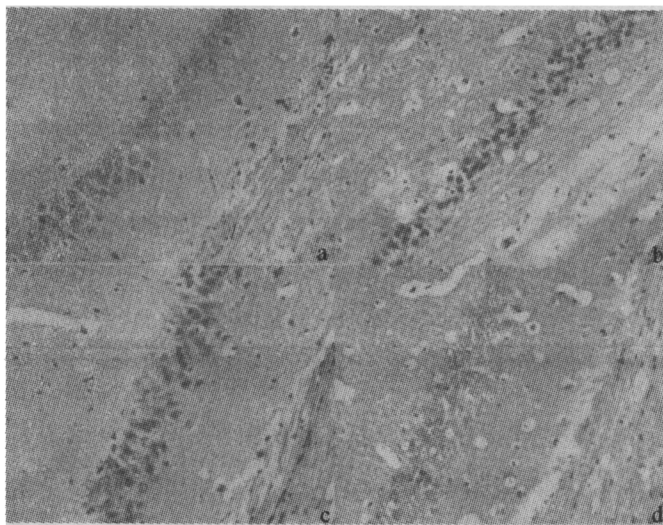
组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	记忆	
		潜伏期(s)	3 min 错误次数
空白组	—	149.0 ± 4.01 ²⁾	1.6 ± 0.84 ²⁾
模型组	—	61.9 ± 5.52	2.6 ± 0.52
脑复康组	0.42	109.8 ± 7.08 ²⁾	1.4 ± 0.52 ²⁾
清心开窍方组	14.82	110.1 ± 8.33 ²⁾	1.4 ± 0.70 ²⁾
清心开窍方组	7.41	90.7 ± 6.87 ²⁾	1.3 ± 0.48 ²⁾

3.5 对海 CA1 区神经细胞形态学的影响 结果显示, 正常组海马 CA1 区锥体细胞排列整齐, 未见炎细胞浸润, 未见细胞空泡变性坏死。模型组海马

表 4 清心开窍方对脑内自 SOD、MDA 和 LF 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	SOD (U·mgprot ⁻¹)	MDA (nmol·mgprot ⁻¹)	LF(μg·g ⁻¹)
空白组	—	4 446.55 ± 446.54 ²⁾	4.84 ± 2.40 ²⁾	1.057 ± 0.15 ²⁾
模型组	—	2 241.08 ± 399.24	10.34 ± 1.43	2.076 ± 0.21
脑复康组	0.42	3 990.79 ± 474.24 ²⁾	6.66 ± 1.23 ²⁾	1.231 ± 0.20 ²⁾
清心开窍方组	14.82	3 852.33 ± 618.98 ²⁾	6.39 ± 0.95 ²⁾	1.115 ± 0.22 ²⁾
清心开窍方组	7.41	3 931.29 ± 411.21 ²⁾	6.24 ± 0.94 ²⁾	1.129 ± 0.14 ²⁾

CA1 区锥体细胞排列紊乱, 部分细胞出现空泡变性, 大量细胞出现固缩坏死。脑复康组海马 CA1 区锥体细胞排列较整齐, 少量细胞出现空泡变性、固缩坏死。清心开窍方组海马 CA1 区锥体细胞排列整齐, 部分细胞出现空泡变性, 未见细胞坏死, 中药各组之间则变化不明显。结果见附图。



附图 清心开窍方对海 CA1 区神经细胞形态学的影响
Effects of medicine herbs in shape hippocampal nerve cells. a: blank group; b: model group; c. model and Piracetan comparison group; d: model and medicine herbs group × 400

4 讨论

祖国医学将 AD 病归属于呆病、文痴、善忘、郁证、癫证等范畴, 认为其病位在脑, 与心肾肝脾关系密切。其主要病机分为虚实两端。虚证以肝肾阴亏、心脾气虚及阳虚为主; 实证以痰、瘀、火、郁为主。临床治疗多以补肾填精、活血通窍、益气养血、清热涤痰开窍等为治疗大法。清心开窍方具有清心凉血开窍清脑作用, 本次实验研究也证实了其治疗 AD 的良好作用。

记忆过程通常分为获得、巩固和再现 3 个阶段。其动物模型的制备方法较多, 主要有用某些化学药品、电休克、脑部缺血、缺氧, 应激, 剥夺睡眠等。近年来, 多采用化学药品致记忆障碍模型。本实验选用中枢 M-胆碱受体阻滞剂氢溴酸东莨菪碱, 该药能特异性阻滞由第一级记忆向第二级记忆转移过程;

采用训练前给药以破坏动物识记过程, 造成记忆获得障碍; 选用亚硝酸盐大量进入机体后, 可使正常的血红蛋白变为高铁血红蛋白, 失去携带氧的功能, 引起组织缺氧, 损害学习和记忆过程^[3]; 用乙醇抑制大脑皮层的神经功能活动抑制动物的条件反射过程, 使脑内蛋白质和 RNA 合成受阻, 胆碱能和多巴胺等系统发生改变, 破坏学习记忆功能, 在测试前给药, 造成记忆再现障碍。跳台测试结果显示: 各组能明显减少东莨菪碱所致学习记忆获得性障碍; 对亚硝酸钠所致小鼠学习记忆巩固障碍有明显的改善作用; 具有拮抗乙醇所致的小鼠学习记忆再现障碍的作用。表明清心开窍方对小鼠具有相当的增强学习记忆的作用。

当机体处于正常生理状态时, 自由基不断产生, 同时不断地被清除, SOD 可以催化超氧化物自由基歧化, 有效地被清除, 发挥抗氧化作用^[4-6]。自由基的毒副作用可引起与痴呆及机体的衰老进程相关的机体组织、细胞的退行性变化, 能引起脂代谢异常而产生过多的脂褐素及 MDA 等, 从而损害细胞膜、细胞器和酶的功能, 并使 DNA 发生突变、交联、单链断裂等结构和功能改变, 进而致使细胞退化、变性、凋亡。自由基在脑内可通过脂质过氧化物等作用造成组织细胞和器官的退行性变化, 从而加速痴呆进程。显示清心开窍方能有效清除脑内的氧自由基, 减少了自由基对神经系统的损害, 阻抑过多脂褐素的堆积。从而从自由基方面证明了清心开窍方对痴呆动物的改善作用, 减少海马 CA1 区神经细胞的破坏, 对海马 CA1 区神经细胞具有保护作用, 提示了提高痴呆小鼠的抗氧化能力可能是治疗 AD 的重要机理之一。

[参考文献]

- [1] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 826-827.
- [2] 杨天祝. 经心脏灌注固定动物组织的技术研究[J]. 河北医学院学报, 1992, 13(2): 83-84
- [3] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991. 71.
- [4] 周车正. 医学技术实用全书[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1995. 941-942.
- [5] Morimoto K, Yoshimi K, Tonohiro T, et al. Coinjection of β amyloid with ibotenic acid induces synergistic loss of rat hippocampal neurons[J]. Neuroscience, 1998, 84: 479-487.
- [6] Gabbita SP, Butterfield DA, Hensley K, et al. Aging and caloric restriction affect mitochondrial respiration and lipid membrane status: an electron paramagnetic resonance investigation[J]. Free Radical Biol Med, 1997, 23: 191-201.