

# 补肾活血化瘀中药复方对 D-半乳糖诱发衰老模型大鼠中枢神经递质及 $\beta$ -淀粉样蛋白的影响

熊平, 蒋灵芝<sup>1\*</sup>, 黄兆胜<sup>2</sup>

(华南农业大学制药工程系 510642; 1. 深圳大学生命科学学院 518060; 2. 广州中医药大学 510405)

[摘要] 目的: 研究补肾活血化瘀中药对皮质乙酰胆碱酯酶(AchE)活性和  $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -AP)含量的影响, 阐释传统中药复方改善老年性痴呆的作用机制。方法: 腹腔注射 D-半乳糖合并脑内双侧 Meynert 基底核注射鹅膏蕈胺酸(IGBO)建立 AD 大鼠模型, 用放射免疫技术、免疫组化检测皮质 AchE 的活性和脑内  $\beta$ -AP 蛋白含量。结果: 补肾活血化瘀中药大剂量组皮质 AchE 的活性显著较模型组高( $P < 0.01$ ), 而脑内  $\beta$ -AP 含量低于模型组( $P < 0.05$ )。结论: 中药大剂量组通过降低海马  $\beta$ -AP 含量( $P < 0.05$ ), 提高 AchE 活性来恢复记忆能力。

[关键词] 补肾; 活血化瘀; 胆碱酯酶;  $\beta$ -淀粉样蛋白

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)02-0042-04

## Influences of the Chinese Prescription of Reinforcing the Kidney, Activating Blood Circulation and Resolving Phlegm on Brain Neurotransmitters and $\beta$ -AP in Senile Dementia Model of Rat Induced by D-galactose

XIONG Ping, JIANG Ling-zhi<sup>1\*</sup>, HUANG Zhao-sheng<sup>2</sup>

[收稿日期] 2006-06-13

[基金项目] 校基金 2005K151

[通讯作者] \* 蒋灵芝, Tel: 13528453030; E-mail: jianglingzhi1964@yahoo.com.cn

(College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, China;  
1. College of Life Sciences, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;  
2. College of Pharmacy, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[ **Abstract** ] **Objective:** To investigate the influences of the Chinese prescription of reinforcing the kidney, activating blood circulation and resolving phlegm on cerebral AchE and  $\beta$ -AP in senile dementia model of rat induced by D-galactose. **Method:** Senile dementia model of rat was established by intraperitoneal injection of D-galactose combined with injection of goose paste gill fungus amino acid( IBO) at bilateral Meynert basal nucleus. AchE and  $\beta$ -AP were determined by radio-immunological and histo-immunological techniques. **Results:** Compared with the model group, AchE in cerebral cortex was significantly increased in the large dose group of the Chinese prescription ( $P < 0.01$ ), while the  $\beta$ -AP was decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The Chinese prescription may enhance AchE activity to restore the memory ability by reducing  $\beta$ -AP level.

[ **Key words** ] Reinforcing the kidney; activating blood circulation and resolving phlegm; Cholinesterase;  $\beta$ -AP

阿尔茨海默氏病(AD)多发生在 60 岁以后,临床表现为智力、记忆力、定向思维和判断能力出现不可逆的退化和丧失。近年来患病率呈上升趋势,且有年轻化的倾向。由于发病机理复杂,国内国外尚无特效药。我们采用传统中医“益肾填精、活血化瘀、化痰通络”的基础理论,用补肾活血化瘀中药复方来治疗 AD 取得较好疗效。本文探讨补肾活血化瘀中药复方改善老年性痴呆的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

10 月龄 250~350 g SPF 级 SD 大鼠 70 只,雌雄各半,由南方医科大学实验动物中心提供,实验动物合格证号:粤检证字第 2002A040,饲养环境合格证号:粤检证字第 20028020。

### 1.2 药物制备

全方药味组成:丹参、当归、巴戟天、何首乌、肉苁蓉、枸杞子、白术、茯苓、远志、石菖蒲,各药用量比例为 6:3:2:3:3:2:3:4:2:2,临床上成人日剂量 50 g。将药加水煎煮两次混合,石菖蒲后下,两次煎液混合后浓缩至每毫升含 1.4 g 生药为大剂量,新鲜蒸馏水稀释一倍成每毫升含 0.7 g 生药为小剂量,药液于 4℃低温保存备用。

### 1.3 试剂

鹅膏蕈胺酸( IBO) Ibotenic acid, ALEXIS 公司;石杉碱甲片, 0.05 mg/片,上海医科大学红旗制药厂,批号:020601;乙酰胆碱酯酶测定试剂盒,南京建成生物研究所,批号:20030625。D-半乳糖(D-galactose), AMRESO 0637,纯度 99.9%,类淀粉样蛋

白  $\beta$  放免药盒,解放军总医院科技开发中心放免所。

## 1.4 仪器设备

大鼠立体定位仪, SN-2 型(日本);牙科钻, 307-6 型,上海医用分析仪器厂;微量注射器;高速冷冻离心机, BECKMAN 公司;超声波细胞破碎机,宁波新芝生物科技有限公司;岛津 UV-120-02 紫外可见分光光度计。N-695B 型放免  $\gamma$  计数器,上海日环仪器厂。

## 2 方法

### 2.1 大鼠 AD 模型的建立

取 SD 大鼠 70 只,雌雄各半,预留 10 只作假手术对照组,其余大鼠腹腔注射(ip) D-半乳糖  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,连续 3 周,第 4~6 周改为皮下注射,第 7 周开始手术,将大鼠麻醉(ip 3%戊巴比妥  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),消毒后头顶皮肤作正中竖切口,然后固定在立体定位仪上,暴露前囟中央和顶骨,定位后在两侧冠状缝后钻出小孔,给大鼠脑内双侧 Meynert 基底核注射鹅膏蕈胺酸( IBO), Meynert 基底核定位坐标<sup>[1]</sup>:前囟中央为原点,前囟后 AP(-0.8 mm),中线外侧 ML(2.6 mm),深 DV(8.2 mm)。每侧用微量注射器分别缓慢推注 1  $\mu\text{L}$  IBO(用生理盐水稀释成  $5 \text{ Hg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ),速度 0.2  $\mu\text{L}/\text{min}$ ,微量注射针停留 10 min 以使药物从针头内完全注入到前脑基底。术后缝合皮肤,肌肉注射青霉素 4 d 抗感染。

假手术对照组脑内双侧 Meynert 基底核注射 1  $\mu\text{L}$  生理盐水。将注射 D-半乳糖和脑内双侧 Meynert 基底核注射 IBO 的存活大鼠随机分为模型组、石杉碱甲组、中药大剂量组、中药小剂量组。石杉碱甲组

按  $2.3 \times 10^{-5}$  g/kg 灌胃给药, 中药大、小剂量组分别按 7 g/kg、3.5 g/kg 灌胃给药, 每天给药 1 次, 连续给药 40 d。

### 2.2 学习记忆能力测试

分组给药 40 d 后, 用经典的避暗箱法测试学习记忆及判断能力。第 1 天训练也即是获得实验, 训练前将大鼠置于明箱内适应 90 s, 大鼠放在距离洞口最远处并背对洞口, 当大鼠后腿进入暗室后接通电源短暂电击大鼠一次, 然后放回鼠笼。第 2 d 进行保留实验, 观测记录大鼠进入暗室的潜伏期和 5 min 内大鼠进入暗室的次数。

### 2.3 样品的测定

**2.3.1  $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -AP)含量的测定** 给药 40 d 后, 处死大鼠, 冰台上快速分离大鼠海马组织 0.3 g, 加入 2.5 倍量的冰生理盐水, 冰浴下超声波破碎制成 40% (w/v) 匀浆, 离心 10 000 r/min, 4 °C, 10 min, 取上清液, 用放免法测  $\beta$ -AP 的含量。自动  $\gamma$ -计数器相关参数为  $\gamma = 0.996$ ,  $CV = 2.5\%$ ,  $B_0/T = 41.6\%$ ,  $NSB = 1.1$ 。

### 2.3.2 乙酰胆碱酯酶的活性测定 各组大鼠同期

表 1 避暗保留实验大鼠进入暗室潜伏期及 5 min 内进入次数( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别     | 给药剂量(g/kg)           | 平均体重(g)       | 大鼠入暗箱的潜伏期(s)               | 大鼠 5 min 内遭受电击次数          |
|--------|----------------------|---------------|----------------------------|---------------------------|
| 假手术对照组 | —                    | 402.0 ± 104.6 | 7.80 ± 1.75                | 1.50 ± 0.53 <sup>1)</sup> |
| 模型组    | —                    | 344.4 ± 92.1  | 7.56 ± 4.03                | 3.78 ± 2.16               |
| 石杉碱甲组  | $2.3 \times 10^{-5}$ | 337.1 ± 71.6  | 10.28 ± 5.09               | 2.86 ± 1.07               |
| 中药大剂量组 | 7                    | 361.4 ± 58.7  | 9.86 ± 5.40                | 2.51 ± 1.27 <sup>2)</sup> |
| 中药小剂量组 | 3.5                  | 331.4 ± 58.7  | 12.25 ± 9.50 <sup>1)</sup> | 2.57 ± 1.50 <sup>2)</sup> |

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

表 2 各组大鼠海马  $\beta$ -AP 含量( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别     | 给药剂量(g/kg)           | $\beta$ -AP(pg/mL)          |
|--------|----------------------|-----------------------------|
| 假手术对照组 | —                    | 42.62 ± 16.56 <sup>1)</sup> |
| 模型组    | —                    | 64.55 ± 12.70               |
| 石杉碱甲组  | $2.3 \times 10^{-5}$ | 56.89 ± 15.04               |
| 中药小剂量组 | 3.5                  | 46.29 ± 5.15 <sup>1)</sup>  |
| 中药大剂量组 | 7                    | 45.19 ± 8.24 <sup>2)</sup>  |

表 3 大鼠大脑额叶匀浆组织胆碱脂酶(AChE)活性测定结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

| 组别     | 给药剂量(g/kg)           | 左脑皮质重量(mg)    | 蛋白含量(mgprot/mL)            | AChE 活力(U/mgprot)               |
|--------|----------------------|---------------|----------------------------|---------------------------------|
| 假手术对照组 | —                    | 98.65 ± 8.83  | 17.93 ± 2.91 <sup>1)</sup> | 0.108 8 ± 0.037 2               |
| 模型组    | —                    | 97.11 ± 10.44 | 14.72 ± 2.28               | 0.084 8 ± 0.039 3               |
| 石杉碱甲组  | $2.3 \times 10^{-5}$ | 99.14 ± 11.71 | 17.52 ± 3.14 <sup>1)</sup> | 0.099 7 ± 0.055 7               |
| 中药大剂量组 | 7                    | 99.24 ± 14.93 | 16.52 ± 3.83               | 0.144 5 ± 0.031 0 <sup>2)</sup> |
| 中药小剂量组 | 3.5                  | 96.89 ± 11.82 | 15.08 ± 5.47 <sup>1)</sup> | 0.118 3 ± 0.555 7               |

处死, 在冰台上快速取出左额叶皮质, 置于低温 - 80 °C 下保存。测定时取脑组织 0.1 g, 用 0.1 mmol/L 冰 HCl 超声粉碎制成 10% (w/v) 匀浆, 12 000 r/min, 4 °C, 离心 10 min。上清液用紫外分光光度法定量水解产物胆碱, 计算胆碱酯酶活性, 波长 412 nm、光径 0.5 cm, 测各管吸光度(OD)值。

### 2.3.3 统计方法

对测定的实验数据用 SPSS11.5 软件进行处理。统计数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 检查方差齐性, 再选用  $t$  或  $t'$  检验。

## 3 结果

**3.1 避暗实验结果** 结果见表 1。模型组与假手术对照组比较, 大鼠入暗箱的潜伏期缩短, 且 5 min 进入暗箱遭电击的次数明显增加, 提示 AD 造模成功。中药小剂量组大鼠进入暗室的平均潜伏期长于模型组大鼠( $P < 0.05$ ), 中药大剂量组和剂量组大鼠 5 min 内进入暗室遭电击的平均次数显著低于模型组( $P < 0.05$ )。

### 3.2 海马 $\beta$ -AP 含量检测结果 结果见表 2。

**3.3 大脑皮质 AChE 活性测定结果** 各实验组两两比较脑组织平均重量无显著差异; 模型组大鼠脑皮质匀浆每毫升蛋白含量明显低于假手术对照组、石杉碱甲组和中药小剂量组( $P < 0.05$ ); 中药大剂量组 AChE 活性显著高于模型组( $P < 0.01$ )。如表 3。

#### 4 讨论

AD病理上是以脑海马回和皮质出现淀粉样斑块(俗称老年斑,SP或NP)、神经元内出现神经纤维缠结(NFTs),进而神经死亡为特征,AD病人的痴呆程度与淀粉样斑块的发展呈正相关<sup>[2,3]</sup>。淀粉样斑块的主要成分是 $\beta$ -AP,位于脑实质细胞外间隙及血管壁内。它是4 kD的小肽,为 $\beta$ 淀粉样前体蛋白( $\beta$ -APP)上酶切下来的片段。已经证实APP分解或过表达产生的 $\beta$ -AP聚集后对神经元具有明显的细胞毒性作用,表现为导致细胞凋亡并促进神经元在兴奋性毒素诱导下的凋亡。

胆碱能神经系统损害是AD患者的另一病理表现,中枢神经系统的AChE活性和ACh合成与释放及胆碱摄取等多种胆碱能系统的功能均有缺陷<sup>[2,3]</sup>,AChE活性及其代谢酶胆碱乙酰化转移酶和ACh在AD患者脑皮层、皮层下组织及海马均显著降低,形态学上证实AD患者基底核(NBM)神经元严重的缺失及变性,而NBM正是胆碱能神经元的主要分布区域<sup>[4]</sup>,Meynert基底核神经元数目减少使M受体、N受体数目减少,因此中枢神经系统功能障碍,学习记忆能力下降。Nesulam I等<sup>[5]</sup>研究也认为AChE活性在AD患者脑皮层、皮层下组织及海马均显著降低,其变化程度与痴呆等级相关,Fibiger HC.等<sup>[6,7]</sup>认为Alzheimer型老年性痴呆患者大脑皮质、基底前脑以及海马等部位乙酰胆碱酯酶纤维、含AChE以及胆碱乙酰基转移酶(ChAT)的细胞均明显减少;李氏等<sup>[8]</sup>对痴呆患者尸解证实Alzheimer型老年痴呆海马和额叶ChAT纤维密度比非Alzheimer型痴呆老年人明显降低。

根据以上AD的病理变化,本研究主要测定了反映中枢胆碱能系统功能的重要标志酶胆碱酯酶和病理特征产物 $\beta$ 淀粉样蛋白。

本实验采用了D-半乳糖合并双侧Meynert基底核注射鹅膏蕈胺酸诱导的AD模型,检测发现AD模型大鼠脑内AChE活性偏低,这与秦氏等报道AD大鼠模型脑内AChE活性降低<sup>[9]</sup>一致,也与王氏<sup>[10]</sup>用兴奋性神经毒素鹅膏蕈氨酸(IBA)定位损伤大鼠脑右侧Meynert基底核,检测到脑AChE活性显著低于实验对照组的的结果一致。

从本实验看出,中药组大鼠避暗试验犯错率显著降低,同时胆碱酯酶活力升高,海马 $\beta$ -AP含量明显降低,说明补肾活血化瘀中药复方对D-半乳糖合并双侧Meynert基底核注射鹅膏蕈胺酸诱导的海马和皮质损伤有改善作用。其改善这种AD模型大鼠的中枢神经功能障碍和记忆功能下降与改善受损的胆碱能神经系统功能和抑制 $\beta$ -AP形成有关。

#### [参考文献]

- [1] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M].人民卫生出版社,1991.
- [2] 韩济生.中枢神经介质概论[M].北京:科学出版社,1990.221.
- [3] Zhao X Z. Effects of Astragalus membranaceus and Tripterygium hypoglancum on natural killer cell activity of peripheral blood mononuclear in systemic lupus erythematosus [J]. Chin J Integrated Tradit Chin West Med. 1992; 12: 669-671.
- [4] Darzynkiewicz Z, Li X, Gong J P, et al. Analysis of Cell Death by Flow Cytometry, in Cell Growth and Apoptosis [M]. ( Studzinski GP ed ), Oxford: Oxford University Press, 1995.
- [5] Nesulam I. Some cholinergic themes related to Alzheimer's disease: synaptology of the nucleus basalis, location of m<sub>2</sub> receptors, interactions with amyloid metabolism, and perturbations of cortical plasticity [J]. J Physiol Paris, 1998: 92(3-4): 293.
- [6] Fibiger H C. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence [J]. Trends Neurosci, 1991, 14: 220-223.
- [7] Collerton D. Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease [J]. Neuroscience. 1986, 19: 22-28.
- [8] 李卫平,杨晓枫,刘晓加,等.大脑皮质及海马乙酰胆碱酯酶纤维分布及其与痴呆关系的研究 [J]. 中华老年医学杂志, 1997, 16(4): 226-228.
- [9] 秦海强,李亚,田苏平. $\beta$ 淀粉样蛋白及D-半乳糖对大鼠学习记忆及胆碱酯酶活性的影响 [J]. 南京医科大学学报, 2000, 20(3): 195-197.
- [10] 王墨林,崔行,张群业,等. IBA损伤老化鼠脑Meynert核的AD模型动物研究 [J]. 山东医科大学学报. 2001, 39(6): 503-509.