

固本化痰健脑方对拟痴呆大鼠胆碱系统的影响

游秋云¹, 王平¹, 陈刚¹, 蒲小平^{2*}

(1. 湖北中医学院, 湖北 武汉 430061; 2. 北京大学药学院, 北京 100083)

[摘要] 目的: 观察中药固本化痰健脑方对拟痴呆(AD)模型大鼠胆碱能神经系统功能的影响。方法: 用鹅膏蕈氨酸建立大鼠 AD 模型, 用改良 Ellman 法测定大鼠组织乙酰胆碱酯酶(AchE)活性, 用组织化学染色及图像分析技术测定 AchE 纤维密度, 观察 AchE 在拟痴呆模型大鼠大脑海马和纹状体尾壳核内的不同分布及密度改变。结果: 模型组能显著增高脑 AchE 活性($P < 0.01$), 空白组、阳性对照组、固本化痰健脑方高剂量组和低剂量组的 AchE 活性显著性低于模型组($P < 0.01$); 在纹状体尾壳核 CPU 区和海马 CA 区, 空白组、阳性对照组、固本化痰健脑方高剂量组和低剂量组与模型组相比均具有较高的积分光密度($P < 0.01$)。结论: 固本化痰健脑方对鹅膏蕈氨酸所引起的脑内胆碱能神经元损伤具有一定的保护作用, 其作用机制与抑制乙酰胆碱酯酶活性和提高 Ach 递质的量有关。另外, 固本化痰健脑方高剂量较低剂量疗效佳。

[关键词] 阿尔茨海默氏病; 乙酰胆碱酯酶; 组织化学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)01-0028-04

阿尔茨海默氏病(AD, Alzheimer Dementia)俗称老年性痴呆, 结合古今医学家对本病的认识和临床实践, 我们认为肾虚痰瘀是本病发生的基本病机, 治疗应是补肾填精健脑、化痰活血开窍。固本化痰健脑方由制首乌、党参、天麻、石菖蒲、茯苓、陈皮、白芥子等组成, 具有补肾健脑开窍、化痰祛瘀益智之效。目前临床应用的抗老年性痴呆的许多药物具有抑制中枢乙酰胆碱酯酶活性的作用^[1]。我们采用鹅膏蕈氨酸致拟痴呆大鼠模型来评价固本化痰健脑方(GHJD)对胆碱能神经元的保护作用, 并以脑内 AchE 的活性, 以及海马、纹状体单位面积内的积分光密度为指标, 探讨固本化痰健脑方促进学习记忆作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性 SD 大鼠, 体重 240 ± 20 g, 北京大学医学部实验动物科学部提供。阳性对照药脑复康, 北京紫竹药业有限公司生产, 生产批号: 20030807。鹅膏蕈氨酸(Ibotenic acid, IBO)购自 Acros 公司。AchE 活性试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

碘化乙酰硫代胆碱, 购自 Acros 公司。LEICA&550CW 图像分析系统, 德国。固本化痰健脑方, 全方由制首乌 20g、党参 15g、天麻 15g、石菖蒲 15g、茯苓 15g、陈皮 1g、白芥子 6g 七味中药组成, 为深褐色颗粒状制剂, 由湖北中医学院附属医院制剂室生产。制备工艺为: 将上述七味中药材洗净, 粉碎, 加水浸泡 2h, 置提取罐中水煎煮两次, 第 1 次 2h, 第 2 次 1h, 合并煎液, 滤过, 滤液静置, 取上清液浓缩成稠膏(60℃时相对密度为 1.25~1.29), 加 4 份量蔗糖、1 份糊精, 制成颗粒, 干燥, 分装即得。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药 将雄性 SD 大鼠 60 只随机分成五组, 每组 12 只, 即(1)假手术组; (2)AD 模型组; (3)阳性对照组(脑复康), $5.04\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; (4)GHJD 大剂量组, $5400\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; (5)GHJD 小剂量组, $2700\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。假手术组和模型组给予等量的生理盐水, 待造模后连续灌胃给药 14d, 动物灌胃量 $10\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.2.2 AD 模型的建立 将大鼠以 10% 水合氯醛腹腔麻醉($4\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)后, 用脑立体定位仪固定, 参照大鼠脑立体定位图谱^[2], 确定 Meynert 核位置, 在脑正中中线旁侧 2.0mm, 前囟前 1.4mm, 硬脑膜下 7.0mm 处用电钻垂直颅骨钻孔后, 用 10 μL 微量注射器于双侧各缓慢注射溶于生理盐水的鹅膏蕈氨酸($5\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 1 μL 。假手术组每侧注射等量生理盐水。手术后用

[收稿日期] 2005-01-20

[基金项目] 湖北省教育厅优秀中青年团队项目资助(鄂教科 2003007)

[通讯作者] 蒲小平, Tel: (010) 82802431; E-mail: puxiaoping@263.net

20 万 $u \cdot kg^{-1}$ 青霉素肌肉注射消炎, 待清醒后放回笼中常规饲养。造模死亡率约 30%。造模手术后连续灌胃给药两周。

1.2.3 乙酰胆碱酯酶(Ache)活性的测定 试验方法参照文献的改良 Ellman 法测定组织 AchE 活性^[3]。处死大鼠, 于冰浴中迅速取脑组织, 称重, 加 9 倍体积的冷生理盐水, 匀浆, 4℃, 3500r·min⁻¹ 离心 10min, 取上清液, 试剂盒说明进行 AchE 活性检测。按规定组织匀浆中 AchE 的活性为每毫克组织蛋白在 37℃ 保温 6min, 水解反应体系中 1 μ mol 基质为 1 个活性单位(u)。

1.2.4 乙酰胆碱酯酶的组化 试验方法参照文献[4], ①用 4% 多聚甲醛溶液固定大脑, 做冰冻冠状切片, 厚度为 20 μ m; ②切片用 0.1mol·L⁻¹ 醋酸钠缓冲液(pH6.0) 浸洗两次, 室温下在孵化液中孵化 30min; ③0.1mol·L⁻¹ 醋酸钠缓冲液(pH6.0) 浸洗两次, 滴洗 5 次; ④1% (NH₄)₂SO₄ 处理 1min; ⑤0.1mol·L⁻¹ NaNO₃ 洗 5 次; ⑥0.1% AgNO₃ 溶液反应 1min; ⑦0.1mol·L⁻¹ NaNO₃ 洗 5 次; ⑧放入乙醇中梯度脱水, 二甲苯中透明, 用中性树胶封片。每组取纹状体尾壳核 CPU 区和海马 CA 区相同部位 3 张切片, 用显微镜及图像分析系统, 以单位面积内 AchE 阳性细胞积分光密度的平均值做统计分析。

1.3 统计学方法 所有结果按 SPSS 8.0 统计软件包作 *t* 检验处理。

2 结果

2.1 固本化痰健脑方对拟痴呆模型脑 AchE 活性的影响 实验结果显示, 模型组大鼠较假手术组大鼠 AchE 活性高($P < 0.01$), 阳性对照药组及固本化痰健脑方大剂量组、小剂量组较模型组大鼠 AchE 活性低($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 GHJD 对模型大鼠脑组织 AchE 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	n	AchE(μ mol·h ⁻¹ ·g ⁻¹)
假手术组	—	10	84.3 ± 5.4
模型组	—	7	173.5 ± 16.8 ¹⁾
脑康复组	5.04	8	89.3 ± 6.2 ³⁾
GHJD 低剂量组	2700	8	92.4 ± 4.5 ²⁾
GHJD 高剂量组	5400	9	85.5 ± 4.9 ³⁾

注: 与假手术组比较: ¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较: ²⁾ $P < 0.05$,

³⁾ $P < 0.01$, 下同。

2.2 固本化痰健脑方对拟痴呆模型大鼠脑 AchE 的阳性细胞分布、定量分析 脑组织切片染色后, 显微镜下观察海马 CA 区和纹状体 CPU 区染色。结果见

图 1~ 10。从图片中可见假手术组, 阳性对照组, 固本化痰健脑方大、小剂量组的大鼠 CPU 区染色呈明显红棕色, 可见清晰神经纤维, 表达 AchE 量较多; 而 IBO 造模组染色呈灰色, 表达 AchE 量很少。CA 区具有同样结果。测量海马 CA 区和纹状体尾壳核 CPU 单位面积内 AchE 的积分光密度, 定量参数分别为每 1680635.63 μ m² 及 6734786.00 μ m² 的 AchE 阳性细胞覆盖的面积与光密度的乘积。结果见表 2。

表 2 GHJD 对模型大鼠脑组织积分光密度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	n	CPU(μ m ²) × 1000	CA(μ m ²) × 1000
假手术组	—	10	214.08 ± 18.36	427.38 ± 30.31
模型组	—	7	80.04 ± 8.96 ¹⁾	137.19 ± 28.85 ¹⁾
脑康复组	5.04	8	105.27 ± 3.13 ³⁾	403.53 ± 47.82 ³⁾
GHJD 低剂量组	2700	8	112.96 ± 7.70 ³⁾	420.28 ± 64.53 ²⁾
GHJD 高剂量组	5400	9	195.94 ± 4.59 ³⁾	313.59 ± 28.97 ³⁾



图 1 假手术组



图 2 模型组 CA 区



图 3 阳性对照组 CA 区



图 4 CHJD 低剂量组 CA 区



图 5 CHJD 高剂量组 CA 区

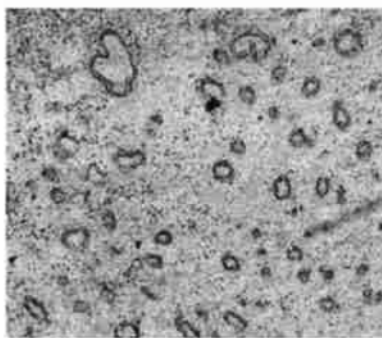


图 6 假手术组 CPU 区

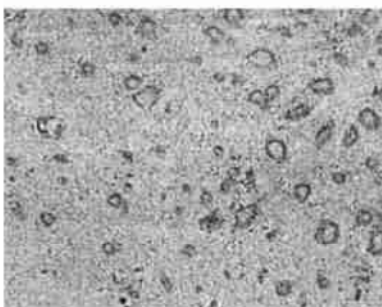


图 7 模型组 CPU 区

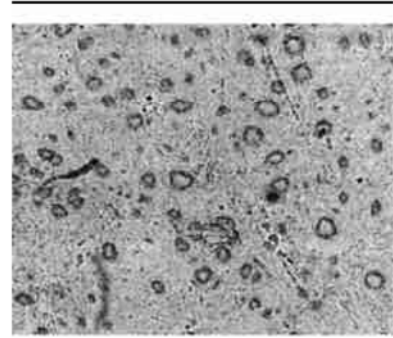


图 8 阳性对照组 CPU 区

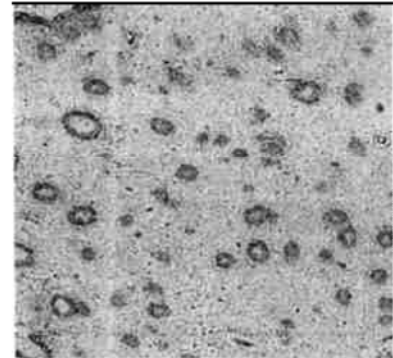


图 9 CHJD 低剂量组 CPU 区

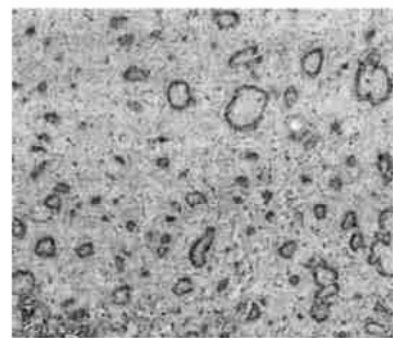


图 10 CHJD 高剂量组 CPU 区

3 讨论

大量证据表明,AD 发病机制的胆碱能假说为基底前脑神经元缺损,造成了中枢神经递质乙酰胆碱的合成,储存和释放减少,而 AchE 的活性增强,从而临床上表现了记忆、认知能力的减退。由于 Ach 是一种与记忆认知能力有关的神经递质,而且尚无有

效直接显示乙酰胆碱(Ach)的方法,AchE 酶组化可作为间接反映 Ach 的一个指标,特别是在基底前脑部,不失为一个很好的、可靠的指标^[5]。本实验结果表明固本化痰健脑方能明显地降低 AD 大鼠的 AchE 活性,使 AD 大鼠脑组织内乙酰胆碱降低,提示此作用是该方治疗 AD 的作用机制之一。

本试验的图像定量分析显示,和假手术相比,模型组的海马 CA 区和纹状体尾壳核 CPU 区的染色积分光密度均明显下降,且这种下降的程度和我们研究过的学习记忆能力呈正相关关系。同时也表明当用 IBO 损伤 Meynert 基底核后,造成投射区尾壳核和海马的 Ach 量减少,该结果与报道相一致^[6]。这一结果表明胆碱能神经元的退变是 AD 学习记忆能力减退的机制之一。固本化痰健脑方可有效拮抗鹅膏蕈氨酸引起的 AchE 活性增高和海马、纹状体单位面

积内 AchE 积分光密度的降低,提示固本化痰健脑方的作用可能与增强脑内中枢胆碱能神经系统有关,为开发防治老年性痴呆等神经系统退行性疾病的新药提供了良好前景。

[参考文献]

- [1] 韩鹏程. 痴呆药物治疗的全球进展[J]. 基础医学与临床, 1998, 18(5): 18.
- [2] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 31-32.
- [3] Chen Q. The Experimental Methods for Antiaging Research (抗衰老研究实验方法)[M]. Beijing: China Medicor-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1996. 108-110.
- [4] 扬杰, 钱亦华. 维生素 E 对 Alzheimer 病模型大鼠的影响[J]. 中国老年学杂志, 1998, 20(2): 89-91.
- [5] Geula C, Mesulam MM. Cortical cholinergic fibers in aging and Alzheimer's disease: a morphometric study[J]. Neuroscience, 1989, 33: 469-481.
- [6] 王平, 李平. 醒脑益智方对 SAM-P/10 老化痴呆鼠脑皮层、海马、纹状体 Ach、AchE 活性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2000, 20(2): 102-104.