

智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠学习记忆及大脑皮层和海马结构区胆碱能神经递质的影响

杨文明¹, 韩明向¹, 李泽庚¹, 张国梁¹, 鲍远程¹, 邵正斌¹,
胡兵², 刘爱平², 丁锦东²

(1 安徽中医学院第一附院, 合肥 230031; 2 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230035)

摘要: 观察智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠学习记忆及大脑皮层和海马结构区胆碱能神经递质的影响。方法: 在采用 β -淀粉样蛋白 β -AP 大鼠侧脑室注射联用转移生长因子 β 1(TGF β ₁) 脑内注射改进制作出实验性 AD 大鼠模型的基础上, 应用避暗法和水迷路法测定 AD 模型大鼠学习记忆功能, 并采用放射免疫法测定实验性 AD 模型大鼠大脑皮层和海马结构区乙酰胆碱含量、乙酰胆碱转移酶和乙酰胆碱酯酶活性。结果: 经改进由 β -AP 联用 TGF β 1 诱导的实验性 AD 模型大鼠表现有明显的学习记忆障碍, 同时模型大鼠大脑皮层和海马结构区 Ach 含量降低、ChAT 活性下降、AChE 活性升高。智脑胶囊能有效地改善实验性 AD 模型大鼠学习记忆功能, 提高模型大鼠大脑皮层和海马结构区 Ach 含量和 ChAT 活性, 降低 AChE 活性。结论: 智脑胶囊可通过调节脑内胆碱能神经递质明显提高实验性 AD 模型大鼠学习记忆能力。

关键词: 智脑胶囊; Alzheimer 病; 动物模型; 学习记忆; 胆碱能递质

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)02-0021-04

Effect of Zhinao Capsule on Learning and Memory, and Cholinergic Transmitters in Cerebral Cortex and Hippocampus in Experimental AD Model Rats

YANG Wen-ming¹, HAN Ming-Xiang¹, LI Ze-gen¹, ZHANG Guo-liang¹,
HU Bing², LIU Ai-ping², DING Jin-dong²

(1. *st* Affiliated Hospital of Anhui College of TCM, Hefei 230031, China;

2. School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei, 230035, China)

Abstract: Object: To observe the effect of Zhinao capsule on learning and memory, and cholinergic transmitter in cerebral cortex and hippocampus in experimental AD model rats. Methods: β -amyloid protein (β -AP) injection into lateral ventricle in rats and transforming growth factor β 1(TGF β 1) injection into the rat's brain tissue were applied to successfully make experimental rat model of AD on the basis of the document's experiment method improved. Stereothrough test and water-maze test were employed to investigate the function of learning and memory in AD model rats, and radioimmunoas-

say was used to assay the activity of choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE), and content of acetylcholine (ACh) in cerebral cortex and hippocampus of AD model rats. Results: There obviously are impairment of learning and memory in rats of AD model induced by β -AP and TGF β 1. The activity of ChAT and content of ACh was lower, and activity of AChE was higher in AD model rats than that of normal rats. Zhinao capsule could improve the impairment of learning and memory, increase the content of ACh by raising the activity of ChAT and reducing the activity of AChE in the cerebral cortex and hippocampus of AD model rats. Conclusions: Zhinao capsule can markedly enhance the function of learning and memory of rats of AD model induced by β -AP and TGF β 1 by regulating cholinergic transmitter in the cerebral cortex and hippocampus of AD model rats.

Key words: Zhinao capsule; Alzheimer disease; animal model; learning and memory; cholinergic transmitter

随着世界人口的老齡化, Alzheimer 病(AD) 发病率急骤上升, 现已成为中老年人的常见病和多发病。因而对 AD 开展有效防治研究已成为世界医学界的热点课题。智脑胶囊是临床治疗 AD 较为有效的复方中药, 由党参、黄精、菖蒲、川芎等药组成, 具有健脾益肾、益气养阴、豁痰化瘀、开窍健脑作用, 为进一步观察该复方中药治疗 AD 的作用机理, 我们根据文献, 改进并制作出实验性 AD 大鼠模型, 并观察了该药对模型大鼠学习记忆和其大脑皮层和海马结构区胆碱能神经递质乙酰胆碱(ACh)、乙酰胆碱转移酶(ChAT)、乙酰胆碱酯酶(AChE) 的影响。

1 实验材料

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠, 体重 250~300g, 购于安徽省医学研究所医学实验动物中心。

1.2 药物 智脑胶囊由安徽中医学院第一附院制剂室提供, 配制成水溶液, 实验时稀释至所需浓度。对照组药物脑复康为上海信谊药厂产品, 配制成 100mg/ml 溶液, 4℃保存, 灌胃时温服。

1.3 主要试剂 β -淀粉样肽(1~40) (批号: 089H0065) 和兔抗 β -淀粉样肽(1~40) 单克隆抗体(批号: 089H4839), 均由美国 Sigma 公司提供; 抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶标准试剂盒(ABC 标准试剂盒) (批号: 19991125) 及 TGF β 1 (批号: 20000108) 由华美公司提供; ACh、ChAT、AChE 测定试剂盒(批号: 20000123) 由 ALPHABETIC 公司提供; 二氨基联苯胺(DAB) (批号: 20000212) 由吉泰公司提供; 其它试剂均为市售分析纯或化学纯。

1.4 主要仪器 恒冷箱切片机, 美国 DAMON/IEC DIVISION 制造; 高速台式离心机, 上海医疗器械厂生产; 721 分光光度计, 上海第三分西仪器厂出品; Beckman LS-8501 液体闪烁计数器, 美国 Beckman 公司制造; Nikon E800 显微图像分析系统, 日本 Nikon 公司生产。

2 实验方法

2.1 分组 Wistar 大鼠, 随机分为正常组、假注射组、模型组、模型+ 脑复康对照组(简称“对照组”)和模型+ 智脑胶囊 I 组(2g/kg·d⁻¹) 和 II 组(4g/kg·d⁻¹)(简称智脑 I 组、智脑 II 组) 计 6 组。大鼠学习记忆能力测试每组 10 只, 大鼠大脑皮层和海马结构区胆碱能神经递质测定每组 8 只。

2.2 造模 参照 Nabeshima 和 Frautschy 的方法^[1-2] 并对其改进, 采用 β -AP 大鼠侧脑室注射并联合 TGF β 1 脑内注射制作出既有大鼠行为学改变(学习记忆障碍), 又有典型病理学特征(β -AP 沉积斑) 的实验性 AD 大鼠模型^[3]。

2.3 给药方法 在造模成功后(通过行为学测试及病理学观察证实), 开始给药。智脑胶囊两组大鼠分别给予智脑胶囊水溶液 2.0g/kg·d、4.0g/kg·d 灌胃, 正常组、模型组均给予等容积的生理盐水灌胃; 而对照组灌胃脑复康混悬液 100mg/kg·d, 连续 28d。

2.4 观察指标

2.4.1 学习记忆指标测试 在侧脑室 β -AP 末次注射 7d 后, 分别采用避暗法和水迷路法(避暗箱和水迷路箱两者均为参照文献^[4] 并作改进自制而成), 观察大鼠学习记忆能力, 以大鼠在明室记忆获得时间超过 300s 判定标准, 观察大鼠在有灯的明室内的记忆获得率, 每天训练 10 次, 连续 5d, 第 6d 测试。水迷路实验中, 大鼠训练以 90s 为限, 若在此时限内动物不能到达平台, 则训练停止并记录成绩为 90s, 每天 2 次, 连续 5d。以大鼠自放入水中至找到平台时间作潜伏期, 灌胃 28d 后, 重复上述方法进行复测。

2.4.2 实验性 AD 模型大鼠大脑皮层和海马结构区 ACh 含量、ChAT 和 AChE 活性测定 参照文献采用放射免疫法进行测定^[5-7]。

2.4.3 数据处理 实验结果用“ $\bar{x} \pm s$ ”或“%”表示。计量资料统计用 Tukey's test, 率的比较用 Chisquare

test。

3 实验结果

3.1 智脑胶囊对实验性 AD 模型鼠学习记忆的影响

3.1.1 智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠空间辨别学习记忆能力的影响 连续灌胃智脑胶囊 28d 后,用水迷路法测定智脑胶囊对大鼠空间辨别学习记忆的影响。结果显示,模型组与正常组比较,有显著的空间辨别学习记忆能力障碍,随着测定天数的后延,其表现得更为明显。与模型组相比,对照组对大鼠空间学习记忆有一定改善作用,但以第 5d 明显 ($P < 0.05$)。而智脑胶囊两剂量组均可明显改善实验性

AD 模型大鼠空间辨别学习记忆障碍,差异显著或非常显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且作用优于对照组,但智脑胶囊两组间无统计学差异。见表 1。

3.1.2 智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠被动回避反应的影响 连续灌胃 28d 后,用避暗法观察智脑胶囊对实验性 AD 模型鼠被动回避反应的影响。结果表明,智脑胶囊能明显提高大鼠明室记忆获得率,与模型组相比,差异显著或非常显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),与正常组相比,其跳台记忆获得率虽不及正常组,但无明显统计学差异,智脑 II 组与对照组相比,差异显著 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠空间辨别学习记忆能力的影响(水迷路法)($\bar{x} \pm s$; $n = 10$)

组别 Id	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	平均潜伏期(Sec)				
		2d	3d	4d	n	5d
正常组	NS	75.2 ± 13.8	61.4 ± 10.5	41.3 ± 11.2	31.6 ± 8.7	32.2 ± 11.2
模型组	NS	89.3 ± 0.7	88.4 ± 0.6*	86.5 ± 3.5*	84.1 ± 5.9**	83.4 ± 6.6**
对照组	0.1	80.3 ± 9.7	78.5 ± 11.5	76.4 ± 13.6	58.2 ± 10.3	52.6 ± 11.4#
智脑 I 组	2.0	72.1 ± 8.5#	61.5 ± 11.2#	42.7 ± 12.1##	36.1 ± 11.6##△	30.4 ± 10.7##△
智脑 II 组	4.0	76.4 ± 13.6#	61.4 ± 15.3#	41.6 ± 11.2##	32.6 ± 10.5##△	30.5 ± 11.4##△

注:与正常组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与对照组比较△ $P < 0.05$ (下同)

表 2 智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠被动回避反应的影响(避暗法%)($n = 10$)

明室记忆获得率(%)	剂量($g \cdot kg^{-1}$)	n
正常组	NS	92.6
模型组	NS	28.7*
对照组	0.1	60.5#
智脑 I 组	2.0	73.3#
智脑 II 组	4.0	86.0##△

3.1.3 智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠大脑皮层和海马 ChAT、AChE 活性及 Ach 含量的影响 实验性 AD 模型大鼠大脑皮层和海马结构区的 Ach 含量降低,ChAT 活性下降,AChE 活性上升,与正常组比较,差异非常显著 ($P < 0.01$)。治疗后,对照组、智脑 I 组和 II 组均能提高实验性 AD 模型大鼠大脑皮层和海马结构区 Ach 含量,与模型组相比,均有显著或非常显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),三组中以智脑 II 组提高 Ach 含量更为明显,智脑 II 组与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$);智脑 I 组、II 组能明显提高实验性 AD 模型大鼠大脑皮层和海马结构区下降的 ChAT 水平,两剂量组间无明显差异。对照组虽有提高,但与模型组相比,无显著差异,且智脑 II 组作用强于对照组 ($P < 0.05$)。智脑胶囊两剂量

组均可使实验性 AD 模型大鼠大脑皮层和海马结构区升高的 AchE 活性下降,并有统计学差异 ($P < 0.05$)。而对照组虽能使升高的 AchE 活性有所下降,但与模型组比较,差异无显著性,且智脑 II 组效应优于对照组 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠大脑皮层和海马 Ach 含量、ChAT 和 AchE 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	n	Ach	ChAT(Ach pmol/	AchE(nmol/
			(pmol/mg brain)	min·mg brain)	min·mg brain)
正常组	NS	8	16.2 ± 3.82	318.31 ± 22.36	8.1 ± 4.5
模型组	NS	8	8.31 ± 2.14*	212.46 ± 25.48**	12.3 ± 4.2**
对照组	0.1	8	12.10 ± 2.23#	254.32 ± 27.81	9.2 ± 5.1
智脑 I 组	2.0	8	12.12 ± 2.41#	285.34 ± 29.13#	8.8 ± 5.1#
智脑 II 组	4.0	8	15.76 ± 2.35##△	292.41 ± 28.11#△	8.6 ± 4.8#△

4 讨论

AD 是以大脑皮层获得性高级功能的全面损害,出现记忆、感觉、运动、语言等功能的慢性进行性障碍为特征的一种神经变性病。中医认为其病机责之虚、痰、瘀,而以肾虚为本,痰瘀为标,我们在大量的文献研究的基础上,通过临床和相关的实验研究证实,脾肾亏虚,气阴不足,痰瘀内阻是 AD 的病机关键,脾肾痰瘀是 AD 发病的基本模式,据此创制出具

有健脾补肾, 益气养阴, 豁痰化瘀、开窍健脑作用并主要有党参、黄精、菖蒲、川芎等药组成的智脑胶囊, 在临床应用取效的基础上开展了该药对动物学习记忆功能更为广泛的药理研究。

研究表明, 学习记忆障碍是 AD 最基本的不可缺少的临床表现, 是 AD 脑功能损害的主要内容。现已证实, 通过促进学习记忆功能的提高可大大改善 AD 病人的智能状况, 达到延缓疾病的发展进程, 控制临床症状, 提高病人生活质量的目的。本文在参考国外文献的基础上, 采用 β -AP 大鼠侧脑室注射联用 TGF β 1 大鼠脑内注射, 改进并成功地制作出既有行为学改变, 又有脑内 β -AP 沉积的典型神经病理学特征的实验性 AD 大鼠模型, 并以此为研究对象, 运用目前公认的学习记忆实验方法—避暗法和水迷路法, 观察了智脑胶囊对 β -AP 诱导的实验性 AD 模型大鼠一次性被动回避反应和空间辨别学习记忆能力的影响, 并和促智药脑复康作对照。结果显示, 智脑胶囊能明显缩短实验性 AD 模型大鼠平均潜伏期, 提高实验性 AD 模型大鼠明室记忆获得率。与 AD 模型组相比, 差异显著或非常显著。表明智脑胶囊有较好的改善实验性 AD 模型大鼠学习记忆障碍的作用。

自 70 年代初发现胆碱能神经系统与学习记忆密切相关以来, 经过大量的研究证实 AD 病人均有不同程度的 ChAT、AChE 和 Ach 合成、释放、摄取等功能障碍, 并伴胆碱能神经元的变性和缺失。现已公认, Ach 是中枢胆碱能系统重要的神经递质, 它由 ChAT 合成, AChE 分解, 通过 Ach 受体发挥生物学功能, ChAT 和 AChE 两者共同维持着 Ach 的动态平衡, 而升高 ChAT 活性, 降低 AChE 活性则是保持体内 Ach 水平的唯一途径。早期和近期的研究证实, AD 患者大脑皮层和海马 ChAT 减少, Ach 丢失, AChE 活性升高^[8-9]。本文观察到的实验性 AD 模型大鼠上述指标的改变与文献报道一致, 表明 β -AP 侧脑室注射后, 可直接损伤胆碱能神经功能。其可能机制

与 β -AP 抑制 Ach 的合成, 减少刺激海马和皮层引起的 Ach 释放, 增加细胞内胆碱由细胞漏出, 抑制高亲和力的胆碱摄入和葡萄糖的摄取等有关^[10]。智脑胶囊能提高 AD 模型大鼠的皮层和海马 chA 活性, 抑制过高的 AChE 活性, 从而提高脑组织内 Ach 含量, 达到改善学习记忆的目的, 这是智脑胶囊取得较好临床疗效的重要的药理学基础。

参考文献:

- [1] Nabeshima T, Nitta A. Memory impairment and neuronal dysfunction induced by β -amyloid protein in rats[J]. *Tohoku J Exp Med*, 1994; 174(3): 241-249.
- [2] Frautschy S, Yang F, Calderon L, et al. Rodent models of Alzheimer's disease: rat A β infusion approaches to amyloid deposits[J]. *Neurobiol Aging*, 1996; 17(2): 311-321.
- [3] 杨文明. 老年性痴呆的理论和实验研究[D]. 北京中医药大学博士研究生学位论文. 2000; 93-107.
- [4] 徐叔云, 卞如镰, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 660.
- [5] Bao ZQ, Ling SG, Liu FM, et al. Radioimmunoassay for acetylcholine[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1982; 3(3): 166-169.
- [6] Ling SG, Wang GY, Li L, et al. Radioimmunoassay for choline acetyltransferase[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1984; 5(2): 73-5.
- [7] Ling SG, Bao ZQ, Li L, et al. Radioimmunoassay for acetylcholinesterase[J]. *Bull Acad Milit Med Sci*, 1984; 2(2): 22.
- [8] Lea thwood PD, Mauron J, Lecithin J, et al. eds. *Senile dementia: outlook for the future*[J]. 1st ed, NY: Alan Rliss, 1984; 9-19.
- [9] Berger PA, Davls KL, Hollister LE. Chol inometics in mania schizophremla and memory disorders. In: Barbeau A, Growdon JH, Wurtman RJ. eds. *Nutrition and the brain*. Vol 5 NY. Rven, 1979; 425-441.
- [10] 李琳. 阿尔采未病发病机制的若干问题[J]. *生理科学进展*, 1998, 29(4): 345-348.