脑康泰胶囊对阿尔茨海默氏病大鼠学习记忆作用的影响*

杨　军　王　静　陈荣芳[1]　陈贵海[1](合肥 230061 安徽省医学科学研究所省生物医药重点实验室;[1] 安徽医科大学第一附属医院)

摘要　目的:观察脑康泰胶囊对阿尔茨海默氏病模型大鼠学习记忆作用的影响。方法:采用脑立体定向颅内注射喹啉酸所致阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease,AD)大鼠模型的方法。结果:脑康泰胶囊可显著增强AD大鼠被动学习和主动学习的能力,调节脑组织中单胺类递质含量及血液中相关激素水平,并显著改善AD模型大鼠的脑电图。结论:脑康泰胶囊显著改善AD大鼠学习记忆能力的作用,其机制与其调节中枢递质及激素水平等相关。

关键词　脑康泰;阿尔茨海默氏病;喹啉酸;单胺递质;学习记忆;激素

Effects of Naokangtai capsule on the ability of learning and memory of rats with Alzheimer's disease induced by quinolinic acid

Yang Jun(Yang J),WangJing(Wang J),Cheng Rongfang(Chen RF),*et al*(*Biological & Medicinal Central Laboratory of Anhui, Hefei* 230061)

* 安徽省九五科技攻关项目,编号 9613010-1

http://www.chinjmap.com

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To investigate the effect of memory and learning of Naokangtai capsule on AD rats. **METHOD:** Experimental model of Alzheimer's disease was made with rats induced by intracranial injection of quinolinic Acid. **RESULTS:** Naokangtai capsule could increase the ability of memory and learning of AD rats, adjust the level of monoamine transmitters in the brain and hormones in the blood and improved electro-encephalogram of AD rats significantly. **CONCLUSION:** Naokangtai capsule possesses obvious effects of improving memory and learning of AD rats.

KEY WORDS naokangtai, Alzheimer's disease, memory, quinolinic acid, hormone, monoamine transmitters

脑康泰胶囊方药组成与汉代名医张仲景所著《金匮要略》中经典方当归芍药散处方一致,处方中药物包括当归、白芍、川芎、泽泻等,系经现代制剂工艺生产的中药新药制剂。近年来,基础及临床研究均发现当归芍药散对老年性痴呆症(阿尔茨海默氏病)具有显著的治疗作用。本实验观察了脑康泰胶囊对 AD 模型大鼠学习记忆能力的影响,并对其作用机制初步探讨。

1 材 料

1.1 动物

Wistar 雄性大鼠,由安徽省医学科学研究所实验动物研究室提供,具备安徽省实验动物管理委员会核发的皖医实动准字 03 号合格证。

1.2 药物

脑康泰胶囊(合肥神鹿集团公司,批号:971020)。使用时将内容物颗粒以蒸馏水配成不同浓度的药液,小、中、大剂量组分别相当于成人临床用量 1、3、10 倍。银可络(深圳海王药业有限公司,批号 970802,剂量为 12mg/kg,相当于临床量的 3 倍)。

1.3 试剂

喹啉酸(Sigma 公司),雌二醇和睾酮放射免疫分析药盒(DPC 公司);T3 和 T4 放射免疫分析药盒(中国原子能科学研究所)。其余所用试剂均为市售品,分析纯。

1.4 仪器

JZZ94 多功能回避条件反射仪(中国医学科学院北京药物研究所)。多导电生理记录仪(中美合资开封华南电子仪器公司)。SR-6N 小型哺乳类动物脑立体定位仪(日本成茂科学技术仪器研究所)。

1.5 统计学处理

各组实验数据分别以均数和标准差表示,以 $X \pm S$ 表示,组间统计采用 t 检验。

2 方法与结果

取健康雄性 Wistar 大鼠 72 只,体重 250±20g。将大鼠随机分为假损伤组、AD 模型组、AD 模型+脑康泰胶囊小、中、大剂量组和银可络组,每组动物 12 只。以 1.0ml/100g 体重,灌胃给药。假损伤组和 AD 模型组灌胃等容量饮用水,每日灌胃给药一次,连续灌胃 15d。

正式给药前一天,将大鼠用 1%戊巴比妥钠 3ml/kg 经腹腔麻醉,仔细剪去颅顶切口区毛,固定在脑立体定位仪上。取大鼠颅顶正中切口,参照大鼠的脑立体定位图谱(Ap-3.3mm, ML±1.4mm, DV3.5mm),对两侧海马 CA_1 区立体定位后,用牙科电钻,钻开颅骨,用微量注射器垂直进针,将用 0.01mol/L, PH7.4 PBS 缓冲液溶解的喹啉酸(QA) 2μl(含 150nmol 喹啉酸)缓慢注入海马 CA_1 区[1];假损伤组注入等量的 PBS 缓冲液。每侧注入时间为 5min,留针 5min。局部消毒后,以牙科水泥固定钻孔,缝合皮肤,并给大鼠腹腔注射庆大霉素注射液 120 000U/kg。

第 13 天起,给药后 1h,以 JZZ94 多功能回避反射条件仪,采用跳台法进行被动学习记忆训练,观察动物自平台跳下电栅的潜伏期及受电击错误次数,次日进行测试;第 13 日同天采用穿梭法进行主动学习记忆训练,观察主动回避期(Tl)、主动回避次数(Nl)、被动回避潜伏期(Ts)及被动回避次数(Ns),第 14 和 15 日,再连续测试 2 日[2]。神经行为学测试结束,进行脑电图测试;实验结束后,眼眶采血,以放射免疫分析法测定 T3、T4、睾酮和雌二醇;处死动物,解剖取大鼠脑海马组织和颞侧组织,分别置于硫酸纸上称重后,放入装有预冷的酸性正丁醇中,冰浴条件下,制备组织匀浆,以酸性正丁醇调整组织匀浆浓度为 0.1g/3ml。将匀浆倒入具塞离心管中,震荡 5min,以 3000rpm 离心 10min,取适当正丁醇液,以化学荧光测定法进行去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)和 5-羟吲哚醋酸(5-HIAA)的提取和测定。

2.1 脑康泰胶囊对 AD 模型大鼠学习记忆的影响

表 1 结果显示:与假损伤组相比,AD 模型组动物的测试阶段跳台错误次数明显增加,显示出显著意义,证明 AD 模型造型成功;与 AD 模型组相比,大、中剂量的脑康泰胶囊组和银可络组大鼠的跳台错误次数均有明显减少,表现极显著的统计学意义。这表明给药后,动物的被动学习记忆能力有显著提高。

表 1 脑康泰胶囊对 AD 模型大鼠被动学习记忆的影响($X \pm S$, $n=12$)

组 别	剂量/g·kg^{-1}	训练 5min 错误数/N	测试 5min 错误数/N
假损伤组		15.6±7.36	4.63±1.45
AD 模型		14.6±7.75	6.50±1.57*1
脑康泰组	0.06	9.25±6.20	5.75±2.67
脑康泰组	0.18	22.3±10.5	3.00±1.34*2
脑康泰组	0.60	6.75±3.20	2.50±0.76*2
银可络组	0.012	6.50±2.85	2.75±0.83*2

注:与假损伤组相比,*1 $P<0.05$;与 AD 模型组相比,*2 $P<0.01$

表 2 结果显示:与假损伤组相比,AD 模型组动物的测试阶段主动回避潜伏期(Tl)及主动回避次数(Nl)均明显减少,

表 2　脑康泰胶囊对 AD 模型大鼠主动学习记忆的影响/ $\bar{X}\pm S$, $n=12$

组　别	剂量 / g·kg⁻¹	测试第 1 天 Tl(sec)	测试第 1 天 Ts(sec)	测试第 1 天 Nl	测试第 1 天 Ns	测试第 2 天 Tl(sec)	测试第 2 天 Ts(sec)	测试第 2 天 Nl	测试第 2 天 Ns
假损伤组		2.12±0.53	3.05±0.28	1.20±0.29	9.45±0.64	2.93±0.63	3.65±0.18	1.42±0.32	10.3±0.54
AD 模型		1.70±0.40	3.81±0.10*1	0.90±0.22*1	10.3±0.57*1	1.69±0.55*1	3.86±0.21*2	0.68±0.22*1	10.6±0.49
脑康泰组	0.06	2.70±0.61*3	2.57±0.34*3	1.32±0.24*3	7.28±0.71*3	2.87±0.67*3	2.67±0.49*3	1.26±0.22*3	8.74±0.62*3
脑康泰组	0.18	2.45±0.56*3	2.86±0.20*3	1.05±0.20	9.00±0.74*3	3.58±0.72*3	3.09±0.28*3	1.37±0.23	9.10±0.60*3
脑康泰组	0.60	3.44±0.57*3	2.81±0.10*3	1.55±0.28*3	8.22±0.51*3	3.80±0.62*3	3.14±0.23*3	1.50±0.32*3	9.15±0.59*3
银可络组	0.012	2.16±0.61	2.92±0.22*3	1.90±0.34*3	6.59±0.85*3	2.00±0.41	2.36±0.20*3	1.90±0.40*3	8.25±0.49*3

注:与假损伤组相比:*1 $P<0.01$,*2 $P<0.05$;与 AD 模型组相比,*3 $P<0.01$

而被动回避潜伏期(Ts) 及被动回避次数(Ns) 均明显增加,表现出极显著意义,进一步证明 AD 模型造型成功;与 AD 模型组相比,各剂量脑康泰胶囊组和银可络组对 Tl 和 Nl 均有显著性增加的作用,对 Ts 和 Ns 有明显减少的作用,显示出极显著的统计学意义。表明给药后,动物的主动学习记忆能力得到显著提高。

2.2　脑康泰胶囊对 AD 大鼠激素水平的影响

表 3　脑康泰胶囊对 AD 大鼠激素水平的影响/ $\bar{X}\pm S$, $n=12$

组　别	剂量 / g·kg⁻¹	T3 / nmol·L⁻¹	T4 / nmol·L⁻¹	睾酮 / nmol·L⁻¹	雌二醇 / pmol·L⁻¹
假损伤组		0.87±0.18	64.6±7.44	5.16±0.94	37.1±4.38
AD 模型		0.99±0.23	64.1±5.15	6.19±1.58	46.5±4.10*1
脑康泰组	0.06	0.86±0.20	64.0±3.65	5.08±0.71	41.7±3.45*2
脑康泰组	0.18	0.86±0.10	60.3±6.52	5.48±0.41	40.3±3.51*2
脑康泰组	0.60	0.87±0.18	56.3±8.77*3	5.45±0.64	41.9±4.05*2
银可络组	0.012	1.01±0.12	59.0±6.27	5.29±0.48	42.4±3.75*3

注:与假损伤组相比,*1 $P<0.05$;与 AD 模型组相比,*2 $P<0.01$,*3 $P<0.05$

表 3 结果显示:与假损伤组相比,AD 模型组大鼠的雌二醇水平显著提高,睾酮水平也有一定升高,但未见统计学差异。给药后,各给药组大鼠的雌二醇水平显著降低,差异显著;各给药组睾酮的水平基本与假损伤组接近。此外,AD 模型组大鼠大剂量给服脑康泰胶囊后,其血清的 T4 含量有明显减少,统计学意义显著。

2.3　脑康泰胶囊对大鼠海马组织单胺递质含量的影响

表 4　脑康泰胶囊对 AD 模型大鼠海马组织单胺递质含量的影响/ $\bar{X}\pm S$

组　别	剂量 / g·kg⁻¹	NE / ng·g⁻¹	DA / ng·g⁻¹	5-HT / ng·g⁻¹	5-HIAA / ng·g⁻¹
假损伤组		342.1±28.5	505.6±54.8	782.0±36.6	283.0±47.3
AD 模型		311.1±28.0*1	511.9±36.1	745.2±42.8	292.6±29.5
脑康泰组	0.06	346.4±29.4*2	548.4±31.0*2	791.9±37.7*2	242.7±34.0*3
脑康泰组	0.18	342.6±34.0*2	537.6±20.8	768.2±45.8	254.4±29.8*2
脑康泰组	0.60	344.9±30.6*2	533.3±24.3	738.5±42.1	272.3±32.3
银可络组	0.012	346.3±31.4*2	524.4±38.9	749.6±54.7	262.0±37.7

注:与假损伤组相比:*1 $P<0.05$;与 AD 模型组相比,*2 $P<0.05$,*3 $P<0.01$

表 4 结果显示:与假损伤组相比,AD 模型组大鼠海马的 NE 含量有显著性减少,5-HT 含量也有较明显减少,但与假损伤组相比,未见显著统计学意义。给药后,各剂量脑康泰胶囊组和银可络组均可显著提高 NE 含量,显著差异;小剂量脑康泰组可显著提高 DA 和 5-HT 含量,降低 5-HIAA 含量;中剂量脑康泰组对 5-HIAA 含量也有显著降低;大剂量脑康泰胶囊组对 DA、5-HT 和 5-HIAA 虽有一定程度的调节作用,但统计学差异不显著。

表 5　脑康泰胶囊对 AD 模型大鼠颞侧组织单胺递质含量的影响/ $\bar{X}\pm S$

组　别	剂量/ g·kg⁻¹	NE/ ng·g⁻¹	DA/ ng·g⁻¹	5-HT/ ng·g⁻¹	5-HIAA / ng·g⁻¹
假损伤组		237.7±27.6	444.4±30.1	522.8±74.6	217.3±26.9
AD 模型		240.1±27.0	463.6±52.3	459.4±45.5*1	208.1±24.6
脑康泰组	0.06	245.3±43.3	444.7±47.7	508.8±43.9*2	192.7±25.1
脑康泰组	0.18	257.9±36.6	414.7±29.5	487.2±34.3	191.4±25.9
脑康泰组	0.60	258.0±28.4	425.1±48.0	485.8±66.3	193.0±20.3
银可络组	0.012	256.6±28.8	410.6±34.3	458.2±29.0	191.1±28.3

注:与假损伤组相比,*1 $P<0.05$;与 AD 模型组相比,*2 $P<0.05$

表 5 结果显示:与假损伤组相比,AD 模型大鼠颞侧脑组织 5-HT 含量明显减少,统计学意义显著。给药后,小剂量脑康泰组可显著提高 5-HT 含量;其余各剂量脑康泰组对 DA、5-HT 和 5-HIAA 虽有一定的程度的调节作用,但统计学差异不显著。

2.4　脑康泰胶囊对 AD 模型大鼠脑电图变化的影响

取大鼠颅顶正中位,矢状线方向,前后相隔约 1cm 颅骨内预先埋置脑电极两只。实验时,测试并记录大鼠脑电图变化。假损伤组大鼠的脑电图显示其基本活动为低-中电位的 8-10c/sα 波和快波;AD 模型组大鼠脑电图基本活动为 8-10c/sα 波和少量 4-7c/sθ 波,波幅为中-高电位。AD 模型大鼠给予脑康泰胶囊治疗后,其脑电图基本活动为低-中电位 8-10c/sα 波和 15-20c/sβ 波;个别大鼠脑电图中出现低-中电位的 6-7c/sθ 波。银可络组大鼠的脑电图基本活动变化同脑康泰胶囊组。

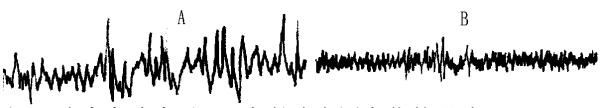

图 1　脑康泰胶囊对 AD 大鼠脑电图变化的影响

A-AD 模型大鼠脑电图;B-脑康泰胶囊治疗组

http://www.chinjmap.com

3 讨 论

阿尔茨海默氏病是一种慢性进行性脑功能衰退行疾病,为老年期痴呆的主要类型,占老年期痴呆的 50 % ~ 60 %。病理表现为大脑皮质萎缩,皮质神经细胞减少,大脑皮质和海马中大量神经元缠结和老年斑。其病因和发病机理仍不清楚,近年认为主要于超氧自由基代谢紊乱,皮质胆碱能神经元中乙酰胆碱转移酶活性降低,单胺类物质代谢改变,5- HT 系统活性改变,脑区神经肽水平降低等相关[3]。

现代研究发现谷氨酸(Glu) 能转运异常,引起 AD 特有的临床表现记忆缺失。Glu 为兴奋性神经递质,激动海马 CA_1 区 NMDA 受体,可产生长时程增强现象 - 学习记忆产生的神经元基础。但大量 Glu 对受体的过度激动作用,产生毒性损害,并参与脑缺血引起的继发性神经细胞坏死。喹啉酸是脑内潜在的内源性兴奋性毒素,海马是对喹啉酸最敏感的脑区,过量 Glu 引起神经元突触后去极化,并刺激 Glu 的释放,使 NMDA 受体激活,导致 Na^+ 内流和 Ca^{2+} 内流,使大量海马区神经元肿胀坏死,NMDA 受体遭破坏,表现出学习记忆功能障碍[3]。本实验中 AD 大鼠在行为学上完全表现出痴呆的基本表现。

有文献报道一次给予当归芍药散,对大鼠皮质和纹状体的 NE、DA、5- HT 系统有促进作用[4];大鼠服本方后,记忆获得、记忆消退有明显改善[5];另有文献证实当归芍药散对动物空间识别和报道回避反射有改善作用[6-8]。实验发现:脑康泰胶囊具有显著调节脑组织中单胺类递质含量的作用,AD 模型大鼠海马的 NE 含量有显著性减少,5- HT 含量也有较明显减少。给药后,脑康泰胶囊具有不同程度提高 NE、DA 和 5- HT 含量及降低 5- HIAA 含量的作用。在 AD 模型大鼠颞侧脑组织中也发现 5- HT 含量显著减少,给脑康泰后,5- HT 含量有一定提高。实验中所观察到的单胺类递质的变化与相关文献的报道基本一致。

文献中对当归芍药散对下丘脑- 垂体- 肾上腺轴系统的增强作用多有报道[9],实验中我们发现脑康泰胶囊显著降低雌激素水平,对雄激素无明显影响,因而脑康泰胶囊提高了雌雄激素水平比例,而表现出相对增强雄性激素的作用。与减少甲状腺激素水平作用相协同,脑康泰胶囊综合表现出壮阳和蛋白质正性合成的趋势。

实验还发现脑康泰胶囊的作用以小、中剂量组更为显著,大剂量组作用稍差,与文献[10]报道相一致,可能在大剂量给药条件下,某些具有免疫调节作用的药物如芍药等会表现出一定的双向调节作用,其机理尚待进一步研究。

参考文献

1 宋前流,宗瑞义.参归煎剂抗痴呆作用与谷氨酸的关系.中成药,1995,17(6):28.

2 王静,杨军,孙志国.脑康泰胶囊对痴呆小鼠学习记忆能力的影响.安徽医科大学学报,1999,34(1):22.

3 孟家眉主编.神经内科临床新进展.第 1 版.北京出版社,1994:504.

4 伊藤忠信.当归芍药散对小鼠脑内单胺类物质的影响.日本东洋医学杂志,1991,42(1):185.

5 鸟居豪和生.当归芍药散对摘除卵巢小鼠、大鼠的免疫功能以及记忆的作用.日本东洋医学杂志,1993,43(5):145.

6 藤原道弘.当归芍药散对大鼠空间识别和被动回避反射障碍的影响.和汉医学会志,1989,6(3):234.

7 道尻诚助.当归芍药散对小鼠垂直及水平运动的影响.日本东洋医学杂志,1990,40(4):162.

8 罗唤敏,姚志彬,陈以慈.当归芍药散水煎剂对老年痴呆小鼠空间学习记忆能力影响.中国老年学杂志,1995,15(5):283.

9 杨军,魏守建,高丹屏.当归芍药散治疗老年痴呆症的药理研究进展.安徽中医学院学报,1998,16(3):61.

10 张秋华,柳倩,鞠宝兆.当归益智方对三氯化铝造型的痴呆小鼠学习记忆的影响.中成药,1997,19(8):29

收稿日期:1999 - 07 - 12