

怡心健脑颗粒对 AD 大鼠学习记忆能力与脑组织 AchE、LPO 的影响

叶俊杰¹, 杨明华², 陈六一³, 宋敏洁¹, 章曙丹²(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省中药研究所, 浙江 杭州 310012; 3. 浙江经济职业技术学院, 浙江 杭州 310018)

摘要: **目的** 观察怡心健脑颗粒对老年痴呆症(AD)大鼠学习记忆能力的影响, 并对其机制进行初步探讨。**方法** 运用 D-半乳糖合 β -AP₂₅₋₃₅ 复制大鼠 AD 模型, 水迷宫法观察怡心健脑颗粒对 AD 大鼠学习记忆能力的影响, 并测定大鼠脑组织中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、乙酰胆碱酯酶(AchE)、过氧化脂质(LPO)的含量; 通过制备脑组织切片观察怡心健脑颗粒对学习记忆障碍大鼠海马组织的影响。**结果** 与正常对照组比较, 模型组大鼠的学习记忆能力明显下降, 其脑组织中 MDA、AchE、LPO 含量明显升高, SOD 含量明显下降, 大脑海马 CA3 区神经细胞变性坏死; 与模型组比较, 怡心健脑组大鼠的学习记忆能力明显提高, 脑组织中 MDA、AchE、LPO 含量降低, SOD 含量明显升高, CA3 区神经细胞病变减轻。**结论** 怡心健脑颗粒可以提高 AD 大鼠的学习记忆能力, 并能降低脑中 MDA、AchE、LPO 的含量, 减轻 AD 大鼠脑组织海马神经细胞的病变。

关键词: 怡心健脑颗粒; 老年痴呆症大鼠; 学习记忆能力

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)02-0118-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.02.003

Effect of Yixin Jiannao Granule on Learning and Memory and Cerebral AchE and LPO Content in Alzheimer's Disease Rats

YE Junjie¹, YANG Minghua², CHEN Liuyi³, SONG Minjie¹, ZHANG Shudan²(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053 Zhejiang, China; 2. Zhejiang Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310012 Zhejiang, China; 3. Zhejiang Technical Institute of Economics, Hangzhou 310018 Zhejiang, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of Yixin Jiannao granule on the learning and memory abilities of Alzheimer's Disease(AD) rat model, and to explore its mechanism. **Methods** D-galactose and β -AP₂₅₋₃₅ were injected into rats to establish AD model. Morris water maze test was used to observe the effects of Yixin Jiannao granule on learning and memory abilities of AD rats, and cerebral malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), acetylcholinesterase (AchE) and peroxidative lipid (LPO) contents in the rats were also determined. Slices of brain tissue were prepared for the observation of the histology of AD rat hippocampus. **Results** Compared with the normal control group, the learning and memory abilities of the model group were decreased significantly, cerebral MDA, AchE, LPO contents significantly were increased, SOD content significantly was declined, and the neurons in hippocampal CA3 showed necrosis and degeneration. Compared with the model group, the learning and memory abilities were improved, MDA, AchE, LPO contents were decreased, SOD content was increased, and the necrosis and degeneration of CA3 neurons had also been relieved in the administration group. **Conclusion** Yixin Jiannao granule could improve the learning and memory abilities of AD rats, decrease the cerebral content of MDA, AchE and LPO, and relieve the necrosis and degeneration of nerve cells in the hippocampus.

Keywords: Yixin Jiannao granule; Alzheimer's Disease rats; Learning and memory abilities

收稿日期: 2012-09-25

作者简介: 叶俊杰, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药治疗代谢性疾病研究。Email: yejunjie1230@126.com。通信作者: 杨明华, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药治疗心脑血管系统疾病研究、中药治疗代谢性疾病研究。Email: ymh702@126.com。

基金项目: 浙江省科技厅重点科研社会发展项目(2007C23025)。

老年痴呆症(AD)是发生在老年期及老年前期的一种原发性退行性脑病,已成为继心脑血管疾病、肿瘤和脑卒中之后,死亡率排在第4位的疾病^[1]。随着我国人口老龄化,老年痴呆症病人日益增多,从中药中开发有自主知识产权、安全有效的抗痴呆药物具有重要意义。怡心健脑颗粒由黄芪、川芎、杜仲、益智仁、石菖蒲、远志等组成,原方名为“延寿丹”,临床应用显示具有防治老年痴呆的功效。本文在前期研究^[2]的基础上,着重观察其对D-半乳糖合 β -AP₂₅₋₃₅诱导的AD大鼠学习记忆能力与脑组织AchE、LPO的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性SD大鼠,体质量180~220 g,由浙江省实验动物中心提供,动物合格证号为:SCXK(浙)2008-0001。

1.2 药物及试剂 怡心健脑颗粒,由本所制剂室制备。临用时以食用色拉油配成适当的浓度;脑复康片,杭州民生药业集团有限公司,批号:20080512; β -AP₂₅₋₃₅,美国Sigma公司,以灭菌生理盐水溶解,浓度为1.0 mmol·L⁻¹,密封后置37℃培养箱中保存;D-半乳糖,上海试剂二厂产品,批号:20090504;过氧化脂质(LPO)试剂盒,美国Sigma公司;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、乙酰胆碱酯酶(AchE)试剂盒,均购于南京建成生物技术研究。

1.3 仪器 Cryotome E As620 冷冻切片机,英国SHANDON公司;XDS-1A倒置生物显微镜,重庆光电仪器总公司;DY89-II电动玻璃匀浆机,宁波新芝生物科技有限公司;722可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;J2-HsCentrifuge低温超速离心机,美国Beckman公司。

1.4 动物分组、模型复制及给药 设正常对照组,模型组,阳性对照组(脑复康组),怡心健脑高、中、低剂量组。除正常对照组外,其余各组大鼠均腹腔注射D-半乳糖(50 mg·kg⁻¹),连续12周,并于第6周侧脑室注射 β -AP₂₅₋₃₅复制AD大鼠模型。具体方法:大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)麻醉,固定于脑立体定位仪上,去毛、消毒,分离骨膜使头骨暴露,每只大鼠于侧脑室(前囟点后3 mm,旁开2.2 mm,深2.5 mm)注入 β -AP₂₅₋₃₅ 10 μ L,并留针5 min,使溶液充分弥散。术后立即消毒并缝合皮肤切口,每只大鼠腹腔注射青霉素钠 3.0×10^4 U,连续3 d。造模大鼠除高剂量组外,其余各组均有1只大鼠死亡。各给药组从造模第1天开始按体质量10 mL·kg⁻¹灌胃

给药,正常对照组与模型组灌胃给予等量生理盐水,每天1次,连续12周,怡心健脑高、中、低剂量组分别给予怡心健脑颗粒12, 6, 3 g·kg⁻¹,为生药量。

1.5 水迷宫构造 Morris水迷宫由圆形水池、无色平台和记录系统三部分组成。水池直径160 cm,高65 cm,水深50 cm;水池内壁涂成黑色,水温保持在26℃~28℃;水池放在一间小屋的中央。室内的门、窗、柜、摄像头等保持固定位置,构成远距离视觉暗示。记录系统将水池划分为4个象限,逆时针方向分别为第1~第4象限。平台为透明的有机玻璃,圆形,直径5 cm,高28 cm,没于水下2 cm,上面有几个小突点使大鼠容易站稳。

1.6 定位航行试验 于给药第12周进行定位航行试验。试验前1 d将大鼠放入水池中(不放入平台)自由游泳2 min,使其熟悉迷宫内的环境。试验历时5 d,前2 d为记忆训练,每天分上、下午两个时间段,每个时间段训练4次,每天共8次;后3 d测定药物对大鼠学习记忆能力的影响。训练开始时,将平台放在近端的象限(第1象限)中点,分别沿水池的4个象限中部的池壁将大鼠面向池壁轻巧地放入水池,直至其找到平台为止,以大鼠站立于平台超过5 s判定其找到平台;若大鼠在60 s内未寻到平台,则引导其至平台上,并使其站立15 s,熟悉平台位置形成记忆。测定时,沿平台所在右侧象限(第2象限)中部的池壁将大鼠面向池壁轻巧地放入水中,自动摄像系统记录大鼠游泳的全过程,设定60 s为最长逃避潜伏期,60 s后自动停止记录,通过计算机自动计算出大鼠游泳的路程、寻找平台的时间(逃避潜伏期)、游过平台所在象限的次数和在平台所在象限的时间占总时间的比率($t/t_{\text{总}}$)等。以大鼠后3 d的平均游泳路程、平均逃避潜伏期、游过平台所在象限的次数、 $t/t_{\text{总}}$ 作为观察指标。

1.7 空间探索试验 在迷宫试验的第6天进行空间探索试验。撤除平台,将大鼠从原放平台对面的象限(第三象限)中点面向水池壁轻巧地放入水中,记录60 s内大鼠在水池中的游泳过程。测量60 s内大鼠在4个象限内的游泳总路程和在原平台象限内游泳的时间占整个游泳时间的比率($t/t_{\text{总}}$)。

1.8 大鼠脑组织SOD、MDA、AchE、LPO含量测定 迷宫实验结束后,各组取6只大鼠,断头取大脑,用预冷生理盐水冲洗表面血液,滤纸擦干,以质量体积比1:9加入4℃生理盐水,制成10%匀浆,3000 r·min⁻¹低温离心15 min,取上清液,按试剂盒说明,用722分光光度计测定大鼠组织SOD、MDA、

AchE 含量;用酶联免疫吸附法(ELISA)法测定脑组织LPO含量。

1.9 大鼠海马组织病理学观察 大鼠在迷宫学习记忆测试结束后,各组取3只大鼠,用1 %戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,仰位固定在手术台上,开胸暴露心脏,将灌流穿刺针从心尖部位插入左心室,同时右心耳剪一小口,先用约200~300 mL 4 ℃生理盐水灌流,待右心耳流出的液体变成无色澄清时,换用300~400 mL 4 ℃ 4 %多聚甲醛灌流直至躯体僵硬。断头取脑,4 ℃ 4 %多聚甲醛中固定24 h后,置30 %蔗糖溶液中脱水直至标本下沉。用冷冻切片机在Bregma线-3.14~-3.80 mm处做连续冠状切片,片厚20 μm。贴片后自然晾干,蒸馏水漂洗,37 ℃烘干,1 %焦油紫溶液中染色30 min,70 %、80 %、90 %、100 %乙醇梯度脱水,二甲苯透明2次,每次10 min,中性树脂封片。显微镜下观察海马形态学改变。

1.10 统计学处理方法 所有数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用SAS6.12统计软件,以 t 检验进行组间差异分析。

2 结果

2.1 对AD大鼠定位航行试验的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠逃避潜伏期、游泳路程均明显延长($P < 0.01$)。与模型组比较,怡心健脑高剂量组、脑复康组大鼠逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$);怡心健脑低、中剂量组大鼠逃避潜伏期则无统计学意义($P > 0.05$);怡心健脑各剂量组及脑复康组大鼠游泳路程明显缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表1。

表1 怡心健脑颗粒对AD大鼠逃避潜伏期和游泳路程的影响($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Effects of Yixin Jiannao granule on escape latency and average swimming distance of AD rats

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	n	逃避潜伏期 / s	游泳路程 / cm
正常对照组		30	15.2 ± 6.1**	615.4 ± 371.3**
模型组		27	35.0 ± 18.9	987.5 ± 452.6
脑复康组	0.3	27	28.4 ± 15.6*	841.6 ± 458.7*
怡心健脑高剂量组	12	30	22.0 ± 13.4*	662.5 ± 402.6**
怡心健脑中剂量组	6	27	30.3 ± 20.2	723.1 ± 446.8**
怡心健脑低剂量组	3	27	33.1 ± 18.6	821.5 ± 431.4*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

与正常对照组比较,模型组大鼠游过平台所在象限的次数明显减少($P < 0.01$), $t/t_{总}$ 明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,怡心健脑各剂量组及脑复康组大鼠游过平台所在象限的次数明显增加($P <$

表2 怡心健脑颗粒对AD大鼠游过平台所在象限次数和 $t/t_{总}$ 的影响($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Effects of Yixin Jiannao granule on the frequency of passing over the quadrant of the platform fixed and $t/t_{总}$ of AD rats

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	n	游过平台所在象限次数 / 次	$t/t_{总} / \%$
正常对照组		30	4.90 ± 0.94**	18.10 ± 3.56*
模型组		27	1.52 ± 1.20	12.16 ± 2.35
脑复康组	0.3	27	2.84 ± 1.15*	16.20 ± 2.83*
怡心健脑高剂量组	12	30	3.90 ± 1.37*	17.72 ± 3.40*
怡心健脑中剂量组	6	27	3.50 ± 1.02*	16.30 ± 4.22*
怡心健脑低剂量组	3	27	2.40 ± 1.02*	15.69 ± 2.84

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

0.05);怡心健脑高、中剂量组及脑复康组 $t/t_{总}$ 明显上升($P < 0.05$),见表2。

2.2 对AD大鼠空间探索试验的影响 在第6天撤离平台后,与正常对照组比较,模型组大鼠60 s内的游泳总路程明显增加($P < 0.01$),说明模型大鼠寻找平台需要经历更长的游泳路程。与模型组比较,怡心健脑高、中剂量组及脑复康组大鼠游泳总路程明显缩短($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与正常对照组比较,模型组大鼠 $t/t_{总}$ 明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,怡心健脑各剂量组及脑复康组大鼠 $t/t_{总}$ 明显上升($P < 0.05$, $P < 0.01$),见表3。

表3 怡心健脑颗粒对AD大鼠游泳总路程和 $t/t_{总}$ 的影响($\bar{x}\pm s$)
Table 3 Effects of Yixin Jiannao granule on average swimming distance and $t/t_{总}$ of AD rats

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	n	游泳总路程 / cm	$t/t_{总} / \%$
正常对照组		30	902.8 ± 190.3**	53.60 ± 5.10**
模型组		27	1360.8 ± 192.7	33.10 ± 6.40
脑复康组	0.3	27	1056.3 ± 178.4*	38.60 ± 4.90*
怡心健脑高剂量组	12	30	902.5 ± 168.6**	46.30 ± 5.80**
怡心健脑中剂量组	6	27	1082.3 ± 193.5*	45.40 ± 6.30*
怡心健脑低剂量组	3	27	1114.9 ± 152.4	37.90 ± 5.70*

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

2.3 对AD大鼠脑组织内SOD、MDA水平的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠脑组织MDA含量明显增加($P < 0.05$),SOD含量明显下降($P < 0.01$)。与模型组比较,怡心健脑高、中剂量组及脑复康组大鼠脑组织中MDA的含量明显减少($P < 0.05$),SOD的含量明显增加($P < 0.05$),见表4。

2.4 对AD大鼠脑组织内AchE、LPO含量的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠脑组织AchE、LPO含量显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,怡心健脑高、中剂量组及脑复康组大鼠脑组织中AchE含量明显减少($P < 0.01$);怡心健脑高、中剂量组大鼠脑组织中

表4 怡心健脑颗粒对AD大鼠脑组织SOD、MDA含量的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 4 Effects of Yixin Jiannao granule on the content of SOD and MDA in the brain tissue of AD rats

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	SOD/ U·mg ⁻¹	MDA/ nmol·mg ⁻¹
正常对照组		9.23 ± 0.48**	1.46 ± 0.35*
模型组		5.02 ± 0.85	1.96 ± 0.51
脑复康组	0.3	7.78 ± 0.56*	1.63 ± 0.58*
怡心健脑高剂量组	12	7.85 ± 0.61*	1.57 ± 0.60*
怡心健脑中剂量组	6	6.79 ± 0.69*	1.65 ± 0.46*
怡心健脑低剂量组	3	6.70 ± 0.81	1.55 ± 0.99

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

表5 怡心健脑颗粒对AD大鼠脑组织AchE、LPO含量的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 5 Effects of Yixin Jiannao granule on the content of AchE and LPO in the brain tissue of the AD rats

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	AchE/ U·mg ⁻¹	LPO/ nmol·mg ⁻¹
正常对照组		5.52 ± 1.08**	0.0483 ± 0.0211**
模型组		14.61 ± 1.44	0.0751 ± 0.0274
脑复康组	0.3	7.89 ± 1.68**	0.0637 ± 0.0301
怡心健脑高剂量组	12	7.57 ± 1.26**	0.0482 ± 0.0238*
怡心健脑中剂量组	6	8.62 ± 1.75**	0.0559 ± 0.0241*
怡心健脑低剂量组	3	12.60 ± 1.93	0.0622 ± 0.0285

注：与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

LPO含量明显减少($P < 0.05$)，见表5。

2.5 对AD大鼠海马组织形态学的影响 模型组海马CA3区神经细胞变性坏死，表现为轴突消失、胞浆深染、空泡样变、核固缩、胞膜核膜界限不清。怡心健脑颗粒及脑复康可改善海马CA3区神经细胞病理改变，见图1。

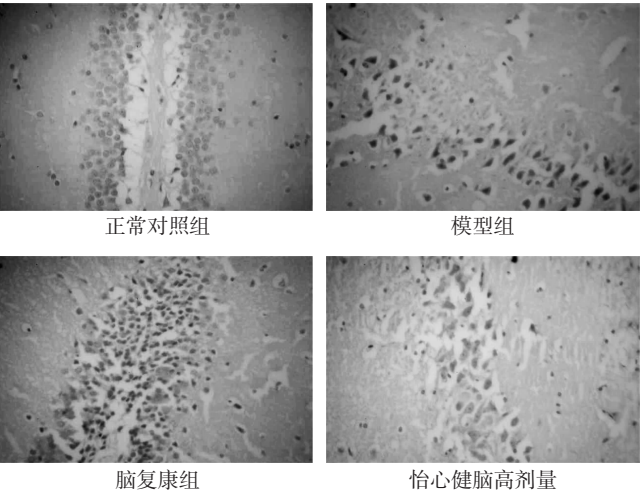


图1 怡心健脑颗粒对AD大鼠海马形态学的影响(尼氏染色×40)
Figure 1 Effect of Yixin Jiannao granule on hippocampus morphology of AD rats

3 讨论

我们曾以D-半乳糖与 β -AP₂₅₋₃₅联合诱导老年痴呆小鼠模型，行为学上具有明显的学习认知障碍和记忆减退的症状，脑组织中SOD活性明显下降，MDA、脂褐素含量显著升高，与临床痴呆表现比较接近^[2]。因此，本研究采用此法复制大鼠模型，以水迷宫行为学改变为宏观药效观察指标，脑组织SOD、MDA、AchE和LPO含量为微观观察指标，进一步考察验证怡心健脑颗粒的抗痴呆药效。结果表明，模型组大鼠的学习记忆能力明显下降，脑组织中SOD明显下降，MDA、AchE、LPO显著升高；怡心健脑颗粒能明显提升AD大鼠的学习记忆能力，显著增加大鼠脑组织中SOD含量，降低MDA、LPO、AchE含量。

氧化应激在AD的发病以及衰老的发生发展中起重要作用^[3]。AD的自由基假说认为过多的脂质过氧化物引起大量细胞内酶活性的改变，最终加速神经退行性病变的进程。SOD活力和MDA含量是公认的反映机体抗氧化能力的重要指标。怡心健脑颗粒能增加AD大鼠脑组织中SOD的含量，并减少MDA、LPO的含量，表明药物可以提高机体的抗氧化能力，是其抗痴呆作用的重要机制之一。

乙酰胆碱(Ach)是促进学习记忆的神经递质，它由胆碱乙酰化酶合成，通过Ach受体发挥生物学效应，老年痴呆的程度与Ach降低成正向关系，老化及AD患者脑组织中AchE活性明显增高^[4]，故药物可以通过抑制胆碱酶活性的途径改善学习记忆的功能^[5]。本实验结果表明，怡心健脑颗粒能显著改善AD大鼠模型的空间学习记忆能力和空间探测能力，降低AchE活力，说明抑制胆碱酯酶分解，增加脑内Ach含量，也是该药防治AD的作用机制之一。

参考文献：

[1] Sonkusare SK, Kaul CL, Ramarao P. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders—memantine, a new hope[J]. Pharmacological Research, 2005, 51: 1-17.
[2] 宋敏洁, 杨毅, 叶俊杰, 等. 怡心健脑颗粒对D-半乳糖合 β -AP₂₅₋₃₅诱导小鼠的药效研究[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(11): 977-980.
[3] Huang XD, Atwood CS, Hurtshom MA, et al. The amyloid- β -peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction[J]. Biochemistry, 1999, 38: 7609-7616.
[4] Dunbar GL, Rylett RJ, Schmidt BM, et al. Hippocampal choline acetyltransferase activity correlates with spatial learning in aged rats[J]. Brain Res, 1993, 604(12): 267-271.
[5] 迟天燕, 王力华, 纪雪飞, 等. 文冠果壳苷对侧脑室注射A β ₁₋₄₂致小鼠学习记忆障碍的改善作用[J]. 中国医科大学学报, 2009, 38(10): 734-736.

(编辑：梁进权)