

清肝泻胆法对老年痴呆模型小鼠学习记忆能力及海马 M 受体亚型的影响

吴正治¹ 唐春艳¹ 卢汉平²

摘要 以特异性 M₁ 和 M₂ 受体亚型抗体检测模型小鼠海马 M₁ 和 M₂ 受体含量,观察清肝泻胆法对模型小鼠的作用效果。结果表明,模型小鼠海马 M₁ 和 M₂ 含量显著降低,清肝泻胆法可显著提高模型小鼠的学习记忆能力,并显著增加其海马 M₁ 受体亚型的含量,但对 M₂ 无明显影响。

主题词 痴呆,老年性/中医药疗法 记忆/药物作用
@ 清肝泻胆法

本文观察清肝泻胆法对铝中毒老年痴呆模型小鼠学习记忆功能及相关脑区 M 受体亚型的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及分组:昆明种纯系雄性小鼠(中山医科大学实验动物中心提供),16 月龄,随机分为 5 组,第 1 组为正常对照组,第 2~5 组以 AlCl₃ 制造痴呆模型。

1.2 药物配制:M₁ 和 M₂ 单克隆抗体由中山医科大学博士后流动站赵树进博士后惠赠,临用前按 1:400 及 1:100 稀释。清肝泻胆法方药由黄连、钩藤、郁金、水蛭、牛黄、冰片等组成,按确定的工艺制成胶囊,去胶囊外壳,加适量蒸馏水(DW)反复研磨,双层纱布过滤,药渣加 DW 煎煮 2 次,过滤,合并 3 次药液,水浴浓缩至所需浓度。喜得镇(Hydergine)由瑞士山德士药厂、天津华津制药厂合作生产(批号 960923),以 DW 配制。以注射用水溶解配制 AlCl₃。

1.3 给药及造模:第 3 组每鼠每天给 Hydergine 0.6mg/kg,第 4 组每鼠每天给清肝泻胆法方药 6.23g/kg,第 5 组每鼠每天给清肝泻胆法方药 18.69g/kg,以上药量均配成 0.5ml 液体灌胃给药,连续 60 天,第 1~2 组灌以等量 DW。灌胃给药第 5 天开始造模,第 2~5 组动物以 AlCl₃ 100mg/kg 腹腔注射,隔日 1 次,连续 50 天,以复制慢性铝中毒老年痴呆模型^[1,2]。

1.4 学习记忆功能测试^[3]:腹腔注射最后一次 AlCl₃ 及灌胃给药 50 分钟后,依跳台法以 MR-921 型小鼠

跳台实验自动记录仪检测其学习记忆能力。首先将其置于跳台仪中,适应环境 5 分钟后,轻放于平台上,当动物从跳台上跳下四肢接触铜栅时,即给予 40V 电压刺激,记录小鼠逃避至平台上的潜伏期,并记录 5 分钟内的触电次数(错误次数),以此作为学习成绩。24 小时后进行测试,将小鼠置于平台上,记录其第一次跳下受电击的时间(潜伏期)及 3 分钟内受电击的次数(错误次数),以此做为记忆功能的评价指标。测试时,若小鼠停留在平台上超过 3 分钟,其潜伏期以 180 秒计。

1.5 M 受体亚型检测:给药结束后,迅速断头取脑,在冰台上分离海马组织,加入经预冷的含 0.32mol/L 蔗糖的磷酸盐缓冲生理盐水(PBS, pH7.4)适量,以 Teflon 匀浆器匀浆 1.0 分钟,1000g、4℃离心 10 分钟,取上清以 20000g、4℃离心 30 分钟,弃上清,沉淀以 1.0ml 包被液(Na₂CO₃ 1.7g, NaHCO₃ 2.83g 加 DW 溶解至 1000ml, pH9.6)分散得粗膜混悬液,取 0.1ml,以 Lowry 法测其蛋白含量(Folin-酚试剂为 Sigma 公司产品),据粗膜蛋白含量以稀释为 0.2mg/L 包被液测 M₁,以 2.0mg/L 包被液测 M₂,取待测标本 100μl 包埋在 96 孔进口酶标板中 4℃过夜,以 PBS-Tween20 液充分洗涤后,加 1%牛血清白蛋白进行封闭,37℃孵育 1 小时,充分洗涤后各分别加入 1:400 兔抗 M₁ 受体 IgG 或 1:100 兔抗 M₂ 受体 IgG(以正常血清为空白对照),37℃温育 1 小时,洗涤 3 次后各加入 1:500HRP 标记羊抗兔 IgG,37℃温育 1 小时,洗涤 3 次。加 DAB 显色液 50μl,37℃30 分钟后,加 2mol/L 硫酸 50μl 终止显色。以 PYNATECH MR-5000 型酶标仪在 490nm 波长下测量 M₁ 和 M₂ 受体的含量^[4]。

2 实验结果

2.1 各组学习记忆能力比较:与正常对照组相比,模型组学习记忆能力明显降低($P<0.01$)。除 Hydergine 组记忆错误次数较高以外,与模型组相比,Hydergine 组及清肝泻胆大小剂量组学习记忆能力均有明显改善($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。清肝泻胆大剂量组学习潜伏期时间较小剂量组及 Hydergine 组明显缩短($P<0.01$)。见表 1。

2.2 各组海马 M 受体亚型含量的比较:结果示,模型组海马 M₂ 受体含量明显低于正常对照组($P<0.01$),

1 深圳市红十字会医院深圳市中西医结合研究所,深圳市笋岗西路(518035)。

2 中山医科大学基础学院

收稿日期:1998-04-27;修回日期:1998-10-30

表1 各组学习、记忆能力比较($\bar{X} \pm S$)

组别	例数	错误次数		潜伏期(秒)	
		学习	记忆	学习	记忆
正常对照组	15	2.93±1.16	1.13±0.92	17.4±6.1	120.1±44.7
模型组	15	8.93±2.79 Δ	3.07±1.44 Δ	30.3±8.5 Δ	48.3±22.3 Δ
Hydergine 组	15	6.14±3.48*	3.07±1.22	23.0±8.3*	89.5±34.8**
清肝泻胆小剂量组	15	6.73±2.05* $\blacktriangle$	1.73±0.96**	20.4±5.1** $\blacktriangle$	91.5±32.6**
清肝泻胆大剂量组	15	4.33±1.88**	1.27±0.88**	14.9±4.2*** $\#$	104.7±40.7**

与正常对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Hydergine 组比较, # $P < 0.01$; 与大剂量组比较 $\blacktriangle P < 0.01$

表2 各组海马 M 受体亚型含量比较($\bar{X} \pm S$)

组别	例数	M ₁ 受体亚型含量 (OD)	M ₂ 受体亚型含量 (OD)
正常对照组	10	1.323±0.818	0.558±0.071
模型组	10	0.885±0.145	0.436±0.053 Δ
Hydergine 组	10	1.024±0.133*	0.477±0.043
清肝泻胆小剂量组	10	1.062±0.130*	0.462±0.046
清肝泻胆大剂量组	10	1.136±0.196**	0.486±0.061

与正常对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Hydergine 及清肝泻胆方均能提高模型动物海马 M₁ 受体亚型的含量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但对 M₂ 无明显影响。见表 2。

3 讨论

研究表明, M 受体参与大脑的唤醒、选择性注意力、情绪和运动协调等功能的调节, 特别在学习、记忆和认知等方面被认为是关键环节之一^[4]。目前对 M 受体的测定, 通常采用放射配基法, 放射配基法不能准确区分 M₁ 和 M₂ 受体量的差异。本文以特异性抗 M₁、M₂ 受体抗体, 用 ELISA 法测量脑组织 M₁ 及 M₂ 受体量。该方法具有特异性高、样品用量少、无放射性污染等优点^[5]。

目前研究 AD 所用的模型大多为以各种理化方法所致学习记忆障碍模型, 如 M 受体阻滞剂、蛋白质或 DNA 合成抑制剂等。上述动物模型的病理生理和神经生化变化大多与 AD 相去甚远, 电或化学损毁法亦只能造成局部区域神经细胞的急性死亡, 病变范围有限。而 AD 的形成是缓慢渐进性的, 其病理变化范围广泛, 涉及到多种神经递质系统。研究表明, AD 患者脑中有相当多的铝沉积, 其皮质神经元核内 DNA 中铝的含量为正常人的 9 倍。铝中毒脑病在引起记忆障碍的同时, 还导致神经元染色质衰变而变性死亡, 诱导神经纤维退行

性变出现神经纤维缠结, 抑制 Ach 的转运, 并引起 CAT 活性降低, 5-HT、NA 等含量下降等与 AD 相似的广泛的病理变化^[1,2,6]。

我们认为, 本病与肝胆密切相关。肝主谋虑, 胆主决断, “十一脏皆取决于胆”。清肝泻胆方由黄连、钩藤、郁金等组成, 功能清肝泻火、解郁开窍。该方系根据本病火郁型的病机特点, 在古今相关文献整理、临床观察及实验研究的基础上优化筛选而成, 适用于老年性痴呆肝郁化火、证属实热者。以往研究表明, 该方对 M-胆碱受体阻滞剂东莨菪碱认知障碍模型有明显的拮抗效果^[7]。本文进一步观察到清肝泻胆方能显著提高铝中毒老年痴呆小鼠的学习记忆功能及海马 M₁ 受体亚型的含量。清肝泻胆方及 Hydergine 均能提高模型小鼠海马 M₁ 的含量, 其中与清肝泻胆方呈现出明显的量效关系, 其大剂量组 M₁ 含量显著高于小剂量组。海马 M₂ 受体含量模型组与各给药组之间则均无明显差异。

4 参考文献

- Schupf N, Silverman W, Zigman WB, et al. Aluminium and Alzheimer's disease. Lancet, 1989, 1: 267.
- Murphy EJ, Roberts E, Horrocks LA. Aluminum silicate toxicity in cell cultures. Neurosci, 1993, 55: 597.
- 裘月, 杜冠华, 屈志伟, 等. 小鼠暂时性脑缺血引起学习记忆障碍模型的制备及人参皂甙的保护作用. 中国药理学通报, 1995, 11: 299.
- 赵树进, 李辉, 江悦华, 等. M 胆碱受体亚型特异性抗体用于测定铝中毒小鼠脑 M 受体量. 中国药理学与毒理学杂志, 1996, 10: 215.
- 胡雅儿, 赵爱红, 胡贤洪, 等. 老年大鼠脑 M 受体亚型的变化及知母的调整作用. 中药药理与临床, 1993, 1: 15.
- 万金花, 杨翰仪. 铅在阿茨海默病中的作用. 国外医学老年医学分册, 1994, 15: 11.
- 吴正治. 泻火、豁痰、逐瘀法对小鼠记忆障碍改善作用的比较研究. 中国中医药科技, 1998, 5: 127.