

实验研究

乌龙丹对多发性梗塞性痴呆大鼠学习记忆功能的影响及其机理

彭康¹ 郑文权² 臧坤堂¹ 谢炜¹ 刘传明¹

摘要 通过复制大鼠多发性梗塞性痴呆(MID)动物模型,观察乌龙丹对其学习记忆功能的影响和有关神经递质(单胺类 NE、DA、5-HT、5-HIAA 和 NOS1、AChE)的变化,探讨其影响机理。结果表明,通过乌龙丹的对抗治疗,MID 大鼠电击数明显减少,大脑海马区的胆碱能神经元明显增多,且对抗脑梗塞后单胺类神经递质紊乱。表明乌龙丹有防治大鼠栓塞后学习记忆下降的作用,而该作用可能是由于它阻止了缺血后海马区的胆碱能神经元减少和对抗栓塞后脑皮质单胺类神经递质的紊乱,保护了神经细胞。

主题词 痴呆,多发性梗塞/中医药疗法 @乌龙丹记忆/药物作用

多发性梗塞性痴呆(MID)是血管性痴呆(VD)的一种主要类型,在我国血管性痴呆占老年期痴呆的50%~70%。其临床表现包括记忆障碍,思维和判断力障碍,性格改变,情绪障碍。根据MID的成因和临床表现,中医辨证为:病位在脑,本虚标实。本虚为心脾肾亏损,精气血不足,脑失濡养;标实为痰瘀内阻,脑脉梗塞不通,两者互为因果。其治法应是益气健脾以化生气血,滋阴补肾以生髓充脑,活血通络以消除梗塞,化痰开窍以醒神。在此基础上,我们根据长期临床实践总结出来的经验方制成乌龙丹,用于MID的防治。本研究通过复制大鼠多发性梗塞性痴呆动物模型,观察乌龙丹的作用和有关神经递质的变化,从而为该方的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物:选用第一军医大学实验动物中心提供的封闭群纯种 Sprague-Dewley 雄性大鼠(清洁级)120只,体重200±20g。

1.2 乌龙丹的制剂方法:将何首乌、川芎、石菖蒲等处

方中植物药部分水提3次,浓缩,干燥,粉碎;地龙、水蛭等动物药低温干燥,研末;两部分混匀,消毒灭菌,装入0号胶囊,每粒0.45g。1g药粉相当于8g生药。

1.3 主要试剂与仪器:NOS1-抗(Santa Cruz Biotechnology, inc 分装),ABC试剂盒(华美生物工程公司),多聚甲醛(Parafarmaldehyde,上海溶剂厂),碱化乙酰硫代胆碱(Acetylthiocholineiodide, Sigma Co)。Y型迷宫(张家港生物医学仪器厂),BH-2型Olympus显微镜(日本Olympus光学工业株式会社),冰冻切片(上海宏宇仪器厂)。

1.4 实验步骤:将大鼠放入迷宫箱中,然后给予电击,致其对三臂探索,选择对电击反应较敏感的逃避者供实验用。合格动物随机分为MID模型、乌龙丹低剂量(WLD1组)、高剂量(WLD2组)、喜得镇(Hydorgine)、假手术等5组。

给药组动物均在制作模型前5天开始灌胃给药,每日1次。其给药时间分别为5、10、20天。乌龙丹给药量低剂量540mg/kg、高剂量2166mg/kg,喜得镇给药量0.6mg/kg,模型组和假手术组灌服等量生理盐水。

按陈俊抛等^[1]报道的方法进行颈内动脉栓塞术。术后观察大鼠的呼吸、肢体活动情况。假手术组大鼠除注入生理盐水外,其余处理均同梗塞鼠。术后10天和20天进行迷宫测验。

1.5 检测方法:

1.5.1 行为学方法:大鼠学习记忆测验测定法参照Stanley^[2]的方法,用三等分Y型迷宫箱进行测试。大鼠学习记忆成绩分别以其测试时达到连续10次中9次正确反应所需的电击次数表示大鼠的学习和认识功能的优劣。大鼠在迷宫箱静置3分钟,按顺时针方向给以灯光刺激5秒钟,继而施以电击至其逃避至安全区,灯光继续作用15秒钟,然后熄灯休息1分钟,再给第2次测试。重复测试至连续9/10正确。

1.5.2 单胺类神经递质测定:实验动物预先给药5天后造模,术后24小时,按文献报道的方法,动物断头取脑,分离左右半球称重,提取脑皮质荧光测定去甲肾上腺素。

1 中国人民解放军第一军医大学中医系,广州市同和(510515)

2 第一军医大学珠江医院

收稿日期:1998-06-09;修回日期:1998-11-17

腺素(NE)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)和 5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)的含量。

1.5.3 MID 大鼠脑中一氧化氮合成酶 1(NOS1)、乙酰胆碱酯酶(AChE)的检测:将 MID 大鼠随机分为 2 组,每组动物 10 只,治疗组灌服乌龙丹(540mg/kg/日),连续 10 天,模型组灌服等量生理盐水,并与假手术组对照观察大脑 NOS1、AChE 的变化。

AChE 组化染色:按照上述方法将大鼠灌注脱水,切片后,参照 Hedreen^[3]推荐的方法做 AChE 纤维酶化学染色,光镜下观察计数 AChE 阳性细胞及纤维。

NOS 免疫组化:大鼠麻醉后,手术剪开左心室将灌注针插入升主动脉起始部,用多聚甲醛酸缓冲液灌注固定。断头取脑组织再固定 2~4 小时,脱水,0.05M pH7.4 的磷酸缓冲液冲洗 3 次,切片。铬明矾贴片,干燥,PBS 冲洗 3 次后放入 0.3% triton-100 中 30 分钟,PBS 再冲洗 3 次。切片加 1:1000 的 NOS 一抗,4℃过夜,PBS 冲洗 3 次。加 1:200 的二抗,室温 3 小时,PBS 再冲洗 3 次。加 1:200 的三抗室温放置 3 小时,PBS 再冲洗 3 次,用硫酸镍氨法在显微镜控制下显色,中止反应后计数细胞。

2 结果

2.1 学习记忆功能检测:造模手术前各组迷宫成绩差异无显著性($P>0.05$)。术后 7 天除假手术组动物外,其余各组动物电击次数均有增加,但以模型组为显著。造模手术前后差值比较,乌龙丹低剂量(WLD1 组)、高剂量组(WLD2 组)与模型组差异有显著性($P<0.05$)。表明乌龙丹对大鼠梗塞性学习记忆下降有对抗和治疗作用。见表 1。

表 1 各组大鼠术后 7 天电击次数的变化($\bar{X} \pm S$)

组别	例数	术前(次)	术后(次)	差值
模型组	10	9.8±1.8	16.1±4.2*	6.3±3.8
假手术组	9	9.7±1.6	9.9±1.7	0.2±2.2△△
喜得镇组	10	9.9±1.4	12.8±3.1	3.1±2.7△
WLD1 组	9	9.9±1.7	11.5±2.7	1.6±2.4△
WLD2 组	8	9.6±1.9	12.1±2.8	1.8±2.3△

* 与术前比较, $P<0.05$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

2.2 大脑皮层内单胺类神经递质含量测定:术后 24 小时,模型组大鼠 NE、5-HT 的含量显著下降,而 5-HIAA 升高,DA 变化不明显。乌龙丹给药组 NE 含量显著升高,与模型组、假手术组比较差异均有显著性;5-HT 含量升高,与模型组差异有显著性,但与假手术组差异无显著性;5-HIAA 含量较假手术组升高,与模型组差异无显著性;DA 含量无变化。喜得镇组与模

型组差异无显著性。表明乌龙丹对大鼠梗塞术后大脑皮层 NE、5-HT 含量的降低和 5-HIAA 含量的增高有一定的对抗作用。见表 2。

2.3 MID 大鼠大脑海马区 AChE 阳性神经元的变化:海马区的 AChE 阳性神经元痴呆组比非痴呆组明显减少($P<0.01$),乌龙丹治疗后海马区 AChE 阳性神经元比非治疗组增多($P<0.01$)。见表 3。

2.4 MID 大鼠不同脑区 NOS1 阳性神经元的变化:痴呆组海马区 NOS1 阳性神经元的数量较非痴呆组明显减少($P<0.01$),在纹状体区、皮质、孤束核 NOS1 阳性神经元的数量痴呆组较非痴呆组比较则无明显变化。乌龙丹治疗组海马区 NOS1 阳性神经元的数量也无增多,与痴呆组比较差异无显著性($P<0.05$)。见表 3。

3 讨论

许多研究表明,多发性梗塞性痴呆(MID)的发生原因很多,主要与梗塞面积的大小、梗塞部位、梗塞的次数等有关。脑梗塞后脑血流持续低灌注是痴呆发生的重要因素。在本研究中,大鼠术后出现肢体不同程度的偏瘫,术后第 7 天进行迷宫实验,电击次数明显增加,学习记忆功能减退。

学习记忆的神经活动基础之一是神经的突触传递,神经递质在学习记忆过程中起着重要作用。多数研究提示,在持续性脑缺血期间,脑组织内单胺类神经递质含量降低,本实验结果表明,大鼠栓塞术后 24 小时,NE、5-HT 明显下降,5-HIAA 含量增高,说明单胺类神经递质代谢紊乱参与了脑缺血损害病理过程。这种变化不仅影响大脑循环、脑血管通透性、脑细胞代谢及神经功能,还将影响到外围神经内分泌系统的功能表达以及机体的内稳态,从而加重脑损伤。调整和改善中枢单胺类神经递质代谢,可以阻断脑内病理恶性循环,防止神经细胞的进一步损伤。乌龙丹对大鼠栓塞术后脑内 NE、5-HT 含量降低和 5-HIAA 含量增高显示出了一定的对抗和改善作用,但其机理有待探讨。

脑内乙酰胆碱与记忆、认识有密切关系。凡是胆碱乙酰转移酶(ChAT)免疫组化比较恒定的认为是胆碱能神经元,均显现强的 AChE 染色。目前研究认为,在中枢胆碱能神经通路中,基底前脑胆碱能系统与学习、记忆过程及痴呆的发病机理关系最密切,基底前脑胆碱能神经元严重退步,大脑新皮质广泛区域内的 AChE 纤维显著减少,ChAT 活性明显下降,而且海马区 AChE 纤维密度与智能水平有关^[4]。大鼠全脑反复缺血产生不可逆学习记忆障碍后,大脑的 AChE 显著

表 2 各组大鼠术后 24 小时大脑皮层内单胺类神经递质含量的变化($\bar{X} \pm S$)

组 别	例数	HE(ng/g)	DA(ng/g)	5-HT(ng/g)	5-HIAA(ng/g)
模型组	8	159.85±18.75 [☆]	409.18±38.25	231.85±18.73	425.87±27.93 [☆]
假手术组	8	207.14±15.32	412.83±35.17	396.67±28.59	230.33±16.81
喜得镇组	9	286.33±19.61 ^{☆☆}	418.38±10.15	224.88±21.63 ^{☆☆}	398.13±30.74 [☆]
WLD1 组	9	300.43±22.68 ^{☆☆} *	405.43±31.62	274.29±23.15*	406.27±25.44 [☆]
WLD2 组	8	288.59±20.42 ^{☆☆} *	423.75±51.31	279.56±25.08	374.13±28.19 ^{☆☆} △

与假手术组比较, ☆ $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.01$; 与 WLD1 组比较, △ $P<0.05$

表 3 各组大鼠不同脑区 AChE 阳性神经元和 NOS1 阳性神经元的比较 ($\bar{X} \pm S$)

组 别	例数	海马区 AChE 阳性神经元数	NOS1 阳性神经元数		
			海马	纹状体	皮质
痴呆组	8	87.5±11.4	10.4±1.3	23.3±2.0	24.4±2.1
非痴呆组	9	143.8±15.3 [*]	23.5±2.5 [*]	23.7±4.3	24.2±2.0
WLD 治疗组	8	121.3±12.9 [*]	10.7±2.1	22.9±3.5	24.6±2.4

与痴呆组比较, * $P < 0.01$

下降^[5]。本实验有类似结果,大鼠痴呆形成后,海马中 AChE 阳性神经元明显减少,提示长期缺血缺氧导致胆碱能神经元减少是产生 MID 的重要原因之一,乌龙丹显示了阻止缺血后海马区胆碱能神经元的减少。

一氧化氮(NO)是精氨酸在一氧化氮合成酶(NOS)的催化下生成的,而 NOS 在神经细胞中的存在形式是 NOS1。NO 与乙酰胆碱(ACh)一样,对记忆的产生及维持具有重要作用,它在长时间增强中担任着重要的信息传递功能。此外,NO 与血管舒缩功能有关。实验中显示出大鼠痴呆后,海马区 NOS1 阳性神经元明显减少,在皮质、纹状体则无明显变化。但乌龙丹对 NOS1 数量无明显影响,表明乌龙丹不能通过影响 NO 的活性改善脑血流和学习记忆功能。

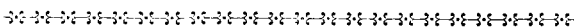
乌龙丹以何首乌、地龙为主药,配伍黄芪、川芎、石菖蒲、水蛭等,具有补肾益精、益气健脾、活血通络化痰的功效。从本实验中可以看出,通过乌龙丹的对抗治疗,MID 大鼠电击数明显减少,大脑海马区的胆碱能神经元明显增多,且对抗脑梗塞后单胺类神经递质紊乱,表明了乌龙丹有对抗大鼠栓塞后学习记忆下降的作用,而该作用可能是与它阻止了缺血后海马区的胆碱能神经元减少和栓塞后脑皮质单胺类神经递质的紊乱,保护了神经细胞有关。根据中医药理论,MID 的病位在脑,主要相关脏腑是心、脾、肾。“脑为元神之府”,“脑为髓海”,脑的正常结构和功能依赖于心主神明、心主血脉,气血流通,清阳上升,脑有所养;依赖于脾胃后天化生气血以充脑;依赖于肾藏精生髓濡脑。当先后天功能失调,心气不足,气虚无力推动血液运行而致血行瘀阻,脑脉梗塞,脑失濡养、髓海空虚,以致脑组织结构破坏功能失调。因此,在对 MID 治疗的立法处方中,应活血通络以治标,健脾益气、补肾生髓以治其

本，只有标本兼顾，才能取得满意结果。

参考文献

- 1 陈俊地,田时雨,陈志华,等.多发性梗塞性痴呆动物模型的制备.中华神经精神科杂志,1994,27(5):311.
- 2 Stanes MD, Brown CP. Effects of physostigmine on Y-Maze discrimination retention in the rat. psychopharmacologia, 1976, 46(3): 269.
- 3 Hedreen JC, Bacon SJ, Price DL. A modified histochemical technique to visualize acetylcholinesterase - containing axons. J Histochem Cytochem, 1985, 33(2): 134.
- 4 李卫平,姚志彬,陈以慈,等.老年期痴呆患者脑海马区胆碱能纤维的分布与临床病理研究.中华神经精神科杂志, 1995, 28(2): 76.
- 5 贾健民,贾健平.大鼠脑反复缺血不可逆性学习障碍的研究.心理学报, 1995, 27(1): 69.

注:本研究为国家中医药管理局青年基金课题(95Y2121)



• 书 讯 •

《中华药海》崔月犁、冉先德主编,16开,1300万字,全套4册,纸盒精装。在原卫生部长崔月犁同志的直接领导下,在全国范围内挑选有真才实学的中医专家、中西医结合专家任编委集体创作,分日编写,是中医中药史上划时代的里程碑。《中华药海》载药8000余种,参阅古代本草专著1500种,旁及医籍方书、经史百家有关书籍1000余种,并广收1820年至1991年的国内外有关本草中药文献资料,既有古代的传统经验,又有现代的科研成果。内容丰富,博古通今;药味众多,图文并茂;体例严谨,科学性强;文词优美,正确使用中医术语,注重趣味性,语言通俗流利;切合实用。本书经150余位有关专家论证,列为国家新闻出版署“八五”期间100项重点出版项目之一,是继明代李时珍《本草纲目》之后,有划时代意义的中药学巨著。该书每套定价:980.00元,优惠价:490.00元。欲购者请汇款至北京东直门内北新仓18号中医杂志医海林音像书店图书部收,邮编:100700,写清所购书名及数量。备有书目函索即寄。