

复圣散对拟痴呆大鼠学习记忆能力影响的实验研究

雷 燕¹ 黄启福² 王永炎³

摘要 通过喂饲大鼠高脂饮食建立高脂血症动物模型,在此基础上采用反复脑缺血再灌注方法诱发学习、记忆功能障碍,从行为学方面观察了复圣散对拟痴呆大鼠学习、记忆能力的改善作用,并进一步利用神经生化及受体研究方法考察了该药改善智能的中枢机制。结果:复圣散可明显减少术后大鼠水迷宫实验的错误次数,并缩短游全程时间($P<0.05$)。脑生化及受体结合实验表明,脑缺血再灌注后大鼠 EAA 释放异常,而 NMDA 受体持续激活,经复圣散预防和治疗性给药后,大鼠 NMDA 受体活性与同期模型组比较分别下降了 34.94% 和 34.20% (P 均 <0.01),同时发现用药后 CAT 的活性明显提高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。揭示中药复圣散对脑缺血性损伤所致学习记忆功能障碍具有显著的改善作用。

主题词 痴呆/中医药疗法 记忆/药物作用 @ 复圣散

随着社会老龄化发展和脑血管病发病率的提高,血管性痴呆(VD)已成为严重的社会问题之一,而在增智抗呆的药物研究中,中医药学受到普遍重视。本研究在食饵性高脂血症大鼠模型的基础上采用反复脑缺血再灌注方法复制智能低下动物模型,从行为学方面观察了中药复圣散对拟痴呆大鼠学习记忆能力的改善作用,并通过检测脑缺血再灌注后大鼠海马区兴奋性氨基酸(EAAs)及其 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体变化和胆碱乙酰化转移酶(CAT)的活性,探讨了该药改善智能的神经生化机理,以期今后缺血性痴呆的中医临床防治提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂:复圣散由人参、地龙和漏芦组成,方中地龙冻干粉由清华大学生物系研制并提供,余药由北京中医药大学制剂室经醇提制成。试验用烟碱、乙晴、四苯硼钠和谷氨酸(Glu)、天门冬氨酸(Asp)标准品均为 Sigma 公司产品; ^3H -MK801(20.3Ci/mmol)为 Dupont-NEN 公司产品; ^3H -乙酰 CoA(185mCi/mmol)为 Amersham Life Science 公司产品;其余均为国产分析纯试剂。

1.2 实验动物及分组:实验选用雄性 Wistar 大鼠,由中国药品生物制品检定所动物中心提供,体重 200~

230g,随机分为 7 组:(1)模型 I 组 9 只,高脂饮食喂养加脑缺血再灌注手术,术后 1 天活杀;(2)假手术 I 组 8 只,高脂喂养和分离血管同模型 I 组,但不进行缺血再灌注,术后 1 天活杀;(3)中药 I 组 8 只,造模方法同模型 I 组,术前 7 天预防性灌胃给中药,药量为每日 10g/kg,术后 1 天活杀;(4)模型 II 组 9 只,造模方法同模型 I 组,术后 7 天活杀;(5)假手术 II 组 8 只,术后 7 天活杀,余同假手术 I 组;(6)中药 II 组 8 只,造模方法同模型 I 组,术前和术后各给药 7 天,于末次给药后 2 小时活杀;(7)正常对照组 8 只,仅饲以普通饮食,不加任何处理,与其它组动物同期喂养。

1.3 动物模型的制备:实验用鼠先以高脂饲料^[1]喂养 4 周,经检测证实血脂异常增高后,行脑缺血再灌注手术造模。大鼠以 10%水合氯醛腹腔麻醉(0.4ml/100g),颈部正中切口,分离左右颈总动脉并套以 0 号丝线扣,向上提起丝线扣以阻断双侧颈总动脉血流,10 分钟后放松丝线扣恢复灌流 10 分钟,反复 3 次,最后恢复血供,缝合皮肤。假手术组同上处理,但只游离双侧颈总动脉而不进行缺血再灌注手术。手术次日和术后 7 天,各组动物在麻醉下断头取脑,分别进行神经生化学测定。

1.4 自发性活动测定及水迷宫实验:部分大鼠于术后第 6 天进行自发性活动测定和学习记忆试验。将自制的 25cm×25cm×25cm 的自发活动箱底部划十字线分为四等份,置于安静环境中,实验前先抚摸动物 2 分钟,使其熟悉实验者,然后将大鼠置于测定箱的一角,观察 3 分钟内动物横向和直向活动,以跨越划线次数为横向活动指标,以前肢抬起或后肢站立的次数为直向活动指标。大鼠水迷宫实验装置共设 4 个盲端(中国医学科学院药物研究所制),终点有一高出水面的安全台,水深 22cm,水温 25±1℃,实验前分区段各训练大鼠 3 次,休息 2 小时后,进行测试,记录动物从起点到登上终点安全台所需的时间及进入盲端的错误次数,5 分钟内不能游出者按 5 分钟计,以此表示大鼠的学习成绩,24 小时重复测试,作为判断动物记忆成绩的指标。行为学测试毕,立即杀检。

1.5 大鼠海马 EAAs 测定^[2]:大鼠解剖取脑,分离一侧海马,立即称湿重,速以 4%磺基水杨酸 3ml 于冰浴中制成匀浆,4℃离心 15 分钟($1.5\times 10^4\text{rpm/min}$),取上清液在日立 L-8500 型氨基酸自动分析仪上行氨

1 中国中医研究院西苑医院老年科,北京市海淀区西苑(100091)

2 北京中医药大学脑病研究室

3 中国中医研究院

收稿日期:1999-01-25

表 1 复圣散对 VD 模型大鼠水迷宫学习记忆功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	学习试验		记忆测验	
		游全程时间(s)	错入盲端数(次)	游全程时间(s)	错入盲端数(次)
正常对照组	8	21.69±6.07	2.33±1.21	28.50±9.24	1.17±0.41
假手术 I 组	8	30.50±9.70 $\Delta\Delta$	3.14±1.25 $\Delta\Delta$	37.17±12.68 $\Delta\Delta$	1.86±0.99 $\Delta\Delta$
中药 I 组	8	35.18±10.01 Δ	4.25±1.48 Δ	62.86±18.31 $\Delta\Delta$	2.13±1.13 Δ
模型 I 组	9	46.38±13.21 $\Delta\Delta$	6.38±1.92 $\Delta\Delta$	122.81±25.99 $\Delta\Delta$	3.29±0.95 $\Delta\Delta$

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与同期模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。下同

表 2 各组大鼠海马区 EAAs、NMDA 受体和 CAT 活性的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	EAAs ($\mu\text{mol/g}$ wt)		NMDAR	CAT
		Glu	Asp	(fmol/mg)	(pmol/mg)
正常对照组	8	12.83±1.14	2.36±0.29	117.30±32.69	16.29±1.29
假手术 I 组	8	11.90±0.91	2.28±0.17 Δ	125.50±26.26 $\Delta\Delta$	15.01±1.17 Δ
中药 I 组	8	11.06±1.04 $\Delta\Delta$	2.16±0.29 Δ	154.92±73.76 $\Delta\Delta$	14.87±1.71 $\Delta\Delta$
模型 I 组	9	10.95±1.16 $\Delta\Delta$	1.82±0.37 $\Delta\Delta$	245.66±66.05 $\Delta\Delta$	12.69±1.65 $\Delta\Delta$
假手术 II 组	8	12.63±1.49 Δ	2.18±0.17	133.51±26.51 $\Delta\Delta$	15.56±1.74 Δ
中药 II 组	8	12.27±0.52 Δ	2.21±0.13	145.30±28.89 $\Delta\Delta$	15.19±2.06 Δ
模型 II 组	9	11.08±1.11 Δ	2.03±0.20 Δ	220.83±33.80 $\Delta\Delta$	13.20±1.21 Δ

氨基酸微量测定,结果以 $\mu\text{mol/g}$ 脑组织湿重表示。

1.6 大鼠海马区 NMDA 受体活性测定:大鼠神经元受体膜制备和放射配基结合试验,方法详见文献[3]。取新鲜鼠脑海马组织,按 1:20(w/v)经匀浆、洗膜等过程提取富含受体的脑突触粗膜。以 50mM Tris-(TAB)洗涤膜标本,并调整蛋白浓度为 100~200 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$,加入 0.1 $\mu\text{Ci}^3\text{H}$ -MK801(MK801 为 NMDA 受体离子通道拮抗剂),非特异结合管中加入 0.1mmol/L 非标记 MK801,于 30℃水浴中孵育 30 分钟,将反应后的样品负压抽滤于纤维素膜上,再用预冷的 TAB 液洗涤 3 次。滤膜烘干后加入甲苯闪烁液,于液闪计数仪上测定放射活性(cpm),结合突触膜蛋白浓度,计算出 ^3H -MK801 的特异性结合量(fmol/mg 蛋白),以此表示 NMDA 受体活性。

1.7 CAT 测定:采用文献[3]的方法,于反应系统中加入 20 μl 新鲜突触膜匀浆和 10 μl ^3H -乙酰 CoA(终浓度 1.35 μM),37℃反应 30 分钟,以 3ml 4℃的 10mmol/L Tris-HCL(pH7.4)终止反应,再加入 2ml 乙晴(含 10mg 四苯硼钠)和 5ml 甲苯闪烁液,轻轻振荡,使生成的 ^3H -Ach 移向有机溶媒层,静置 10 分钟后测其放射活性,结合匀浆液的蛋白浓度和反应时间,计算出 CAT 活性(pmol/mg 蛋白/min)。

1.8 统计分析:统计学处理采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠自发性活动的变化:经脑缺血再灌术后,各组大鼠自发性活动测定表明,不论横向或直向活动差异均无显著性($P > 0.05$),排除了由于运动障碍影响学习记忆成绩的可能性。

2.2 各组大鼠学习记忆功能的比较:表 1 示,脑缺血再灌后 6~7 天,大鼠水迷宫试验结果表明,模型 I 组动物无论学习或记忆测验的成绩都最差,即游迷宫时间最长,错误次数最多,与正常对照组和同期手术组相比,有显著或非常显著差别($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明脑缺血再灌后大鼠学习记忆能力显著降低,提示造模基本成功。复圣散预防及治疗性给药后,各项指标与模型组比较有明显好转($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明复圣散对脑缺血性损伤所致学习记忆功能障碍具有显著改善作用。

2.3 各组大鼠海马 EAAs 含量和 NMDA 受体活性的比较:表 2 示,脑缺血再灌后第 1 天,模型组大鼠海马区 Glu、Asp 含量显著降低($P < 0.01$),至术后第 7 天虽渐呈回升趋势,但仍明显低于正常对照组($P < 0.05$)。复圣散预防和治疗两组 Glu、Asp 含量术后也趋于降低,但程度较模型组轻,术后 7 天已恢复至正常水平,与正常对照组和假手术组比较,差异已无显著性($P > 0.05$)。同时,脑损伤后模型 I、II 组海马部位的 ^3H -MK801 结合明显增强,比正常对照组和同期假手术组分别增高 109.43%、95.75%和 88.26%、65.40%,均有显著的统计学意义($P < 0.01$),表明缺血一再灌术导致 NMDA 受体通道大量开放,从而介导了兴奋性神经毒性损伤。经过复圣散预防和治疗的两组,NMDA 受体活性与同期模型组比较分别下降 36.94%和 34.20%,差异显著($P < 0.01$),提示该药有对抗脑缺血引起的兴奋性神经毒性作用。

2.4 各组大鼠海马 CAT 活性的比较:表 2 示,脑缺血再灌后,两个模型组 CAT 活性明显降低,与正常对照

组、同期假手术组和同期中药组相比,差异均有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明复圣散可增强海马部位的 CAT 活性,具有促进乙酰胆碱合成的作用。

3 讨论

Glu 和 Asp 是哺乳动物脑内含量最多、分布最广的兴奋性神经递质,简称兴奋性氨基酸,对中枢神经系统有着广泛而强烈的兴奋作用,正常情况下 Glu 和 Asp 释放并作用于受体后,主要参与学习和记忆活动,但高浓度 EAAs 具有很强的神经毒性作用,在神经组织培养中, Glu 大约 $100\mu\text{mol/L}$ 浓度即可引起细胞损伤^[4]。目前认为兴奋性毒性机制可能有两方面:EAAs 大量释放,致神经细胞渗透性改变, K^+ 外流, Cl^- 、 Na^+ 及水内流,引起神经细胞急性肿胀;另一方面,EAAs 可介导受体依赖性钙大量内流,导致细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的异常升高,从而诱发神经细胞迟发性损害^[5]。

已知 Glu 主要通过受体活化方式而起兴奋性介导作用,尽管涉及到各种 Glu 受体亚型,但其特异性 NMDA 受体活化离子通道可能起重要作用。近来研究表明^[6],EAAs 递质主要通过激活 NMDA 受体启动 Ca^{2+} 通道和加强电压敏感性 Ca^{2+} 通道的活化状态来发挥其延迟性细胞毒性作用。所谓 EAAs 的神经兴奋毒性作用实际上特指 EAAs 通过其受体(主要为 NMDA 受体)介导细胞外钙内流,从而影响细胞内、外环境离子浓度而导致神经元坏死与崩解的反应过程。海马结构作为大脑边缘系统的重要组成部分,它在学习、记忆等高级神经活动中的作用受到了广泛的重视。然而海马也是脑缺血中最为敏感的部位之一,由于海马是 Glu 受体含量丰富的脑区之一,所以易于出现选择性神经元的缺血性损伤^[7],而海马缺血性损害可能是血管性痴呆的重要病理基础之一。本研究表明,脑缺血再灌后 24 小时海马区 EAAs 急剧下降,并可持续数日,与文献报道一致^[8],这可能是由于脑组织受到缺血缺氧的刺激,递质短期内瀑布式释放而耗竭,同时也由于脑的自身保护机制使这两种氨基酸的细胞内再摄取减少,使得因缺血缺氧而大量释放到细胞外间隙的 Glu 和 Asp 继而不断丢失入血液及脑脊液中所致。多组活体脑内微透析技术的研究证实,EAAs 表现为大量释放的状态仅出现在大鼠脑缺血再灌后短时间内,其高峰约在缺血后 40~60 分钟^[9,10]。黎红华等的实验结合形态学变化发现,缺血再灌注时间越长,脑组织 EAAs 递质含量越低,脑细胞超微结构改变也越严重,证实了 EAAs 递质在缺血性损伤中的重要作用^[8]。我们的研究还表明,复圣散可明显对抗由脑缺血引起的海马部位 NMDA 受体活性的激增,缓解 EAAs 的异常释放,

这可能是复圣散重要的脑保护机制之一。

实验结果进一步证实,无论在脑缺血术前给药预防还是手术前后防治性给药治疗,中药复圣散均可明显改善由脑缺血损伤所致学习记忆障碍,使大鼠游迷宫错误次数明显减少,而对自发活动无明显影响。此外,复圣散还可通过明显增强脑内 CAT 活性,促进海马中胆碱能神经元合成乙酰胆碱(ACh)的水平而影响海马胆碱活动,这一作用也与其改善学习记忆的行为变化相吻合。

VD 为本虚标实之证,其发病机理为肾精亏虚,痰瘀阻络,积久蕴毒,浊毒致呆,病变重在虚、瘀、毒作祟。在治疗上,选用具有祛瘀解毒作用的古方复圣散加补益药人参组成,以扶助正气、化解瘀毒,防治痴呆。本方以大补元气,宁神益智的人参为主药,辅以活血通络的地龙和祛瘀解毒的漏芦,驱邪不伤正,扶正不留邪,达到补益脏腑、排解瘀毒,健脑益智之目的。本研究表明,复圣散可通过抑制脑缺血再灌后 EAAs 及受体活性,以及兴奋中枢胆碱能神经而起到学习记忆的作用,这与方中人参、漏芦等药物的现代药理研究相符。

志谢 本研究得到中国医学科学院基础医学研究所左萍萍教授的指导和帮助,谨谢。

参考文献

- 1 李仪奎. 中药药理实验方法学. 上海:上海科学技术出版社,1991:398-401.
- 2 徐淑云,卞如濂,陈修. 实验药理方法学. 北京:人民卫生出版社,1991:433-435.
- 3 左萍萍,刘娜,维蓬秩,等. 还少丹的脑保护机制研究. 中国中西医结合杂志,1997,17(7):420-422.
- 4 Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. Ann Neurol 1986,19(2):105-111.
- 5 Collins RC, Dobkin BH, Choi DW. Selective vulnerability of the brain: new insights into the pathophysiology of stroke. Ann Intern Med 1989,110(12):992-1000.
- 6 MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, et al. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. Nature 1986,321(6069):519-522.
- 7 Jorgensen MB, Diemer NH. Selective neuron loss after cerebral ischemia in the rat: possible role of transmitter glutamate. Acta Neurol Scand 1982,66(5):536-546.
- 8 黎红华,郑彩梅. 兴奋性氨基酸在缺血性海马神经元损害的作用研究. 中国神经精神疾病杂志,1993,19(4):197-199.
- 9 李宁,吴建中,蒋京生. 脑缺血时海马细胞外液中兴奋性氨基酸的变化. 中国病理生理杂志,1993,9(6):740-743.
- 10 Miyashita K, Abe H, Nakajima T, et al. Glutamate release in the gerbil hippocampus after middle cerebral artery occlusion. Neuroreport 1994,5(8):945-948.