

实验研究

加味当归芍药散对 AD 模型小鼠记忆能力和脑组织
白介素 1 β 、白介素 6 及一氧化氮含量的影响刘孟渊^{*} 肖柳英^{*} 潘竞锵^{*} 吴维城^{*} 刘广南^{*} 庆方^{*}

摘要 目的:探讨加味当归芍药散(口服液)治疗阿尔茨海默病(AD)的作用机理。方法:灌服三氯化铝($AlCl_3$)制作小鼠拟 AD 模型,观察该复方对小鼠学习记忆能力、脑组织白介素 1 β (IL-1 β)、白介素 6(IL-6)及一氧化氮(NO)含量的影响。结果:该复方能提高模型小鼠的记忆能力,降低模型小鼠的 IL-1 β 、NO 含量;各组间脑组织的 IL-6 含量差异无显著性。结论:加味当归芍药散具有对抗 AD 的作用,其作用机制可能是通过降低脑组织 IL-1 β 含量,抑制脑组织的慢性炎症;另外,降低脑组织 NO 含量,从而延缓脑内神经元的凋亡或坏死亦可能是其对抗 AD 的作用机制之一。

主题词 记忆/药物作用 脑/代谢 当归芍药汤/药理学

阿尔茨海默病(AD)是一种多原因引起涉及多种病理机制、出现多种病理变化的多因异质性疾病,其特征性病理学改变是大脑皮质和海马出现大量老年斑(SP)和神经原纤维缠结(NFT),并伴有选择性神经元变性缺失。近年研究表明,免疫炎症机制及一氧化氮(NO)在 AD 发生发展中起着重要作用^[1]。本课题应用加味当归芍药散治疗 AD,初步观察显示了该中药制剂具有一定的改善轻、中度 AD 患者智力及精神症状的作用^[2]。因此,本实验拟观察三氯化铝($AlCl_3$)诱导的 AD 模型小鼠的学习记忆能力和脑组织中的白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6(IL-6)及 NO 含量的变化,并观察加味当归芍药散对该痴呆模型小鼠的记忆能力及脑组织 IL-1 β 、IL-6 及 NO 含量的影响,进一步探讨加味当归芍药散治疗 AD 的作用机制。

1 材料

1.1 动物分组、造模与给药:选用 2 月龄 NIH 小鼠 126 只,雌雄各半,体重 18~22g,均由广东医学实验动物中心提供,常规分笼饲养,自然照明,随意取食和饮水。小鼠随机分为 6 组,正常对照组 26 只,其余各组 20 只,雌雄各半。正常对照组以蒸馏水灌胃,每鼠 0.6ml,每天 1 次,连续 9 周;AD 模型组每天以 $AlCl_3$ 200mg $\cdot$ kg⁻¹ 灌胃,上午给药,每日 1 次,连续 9

周;双益平组(阳性对照组)自 $AlCl_3$ 灌胃第 7 天始,除上午给予 $AlCl_3$ 灌胃外,每日下午给予双益平 0.4 mg $\cdot$ kg⁻¹ 灌胃,每日 1 次,连续 8 周;中药高、中、低剂量组亦同样上午予 $AlCl_3$ 灌胃,下午分别予高、中、低剂量的加味当归芍药散灌胃,每日 1 次,连续 8 周。

1.2 药物与试剂:加味当归芍药散由党参、当归、川芎、赤芍、白芍、泽泻、茯苓、白术等中药组成,由本所剂型室制成口服液供临床及实验使用(均为同批药品)。将该口服液组成药物(如上所述)加水浸泡半小时后,煎煮 1 小时,药液用 500 目筛网过滤,药渣加水煎煮 2 次,每次半小时,药液用 500 目筛网过滤,合并 3 次滤液静置过夜,浓缩后加入防腐剂,灌封,灭菌,备用。该口服液卫生学检查、重金属含量及 pH 值等符合国家药典口服液标准。本实验加味当归芍药散低剂量组(简称中药低剂量组)剂量用临床等效剂量的 1.5 倍,相当于 27.5g 生药/kg;加味当归芍药散中剂量组(简称中药中剂量组)剂量用低剂量的 2 倍,相当于 55g 生药/kg;加味当归芍药散高剂量组(简称中药高剂量组)剂量用中剂量的 2 倍,相当于 110g 生药/kg。实验所用结晶三氯化铝($AlCl_3 \cdot 6H_2O$)由广东台山化工厂出产(批号 C60641),用蒸馏水配制成 20mg/ml 的溶液;双益平片由上海医科大学红旗制药厂生产(批号 000501),每片含石杉碱甲 0.05mg,用蒸馏水配制成 0.0192mg/ml 溶液。IL-1 β 、IL-6 测定试剂盒购自美国 Endogen 公司,NO 测定试剂盒购自南京建成生物试剂公司。

1.3 主要仪器:YSD-4G 药理生理实验多用仪、贝克曼 GS-15R 台式冷冻高速离心机、岛津 UV-1601 紫外-可见分光光度计、Clini Bio128C 酶标仪。

2 方法

2.1 检测指标及方法:(1)记忆功能测试:最后 1 次灌胃给药 50 分钟后,以跳台法用 YSD-4G 药理生理实验多用仪检测小鼠的学习记忆功能。方法如下:先将小鼠放入激怒盒内适应环境 3 分钟,然后通以 40V 交流电,小鼠受到电击即应跳回平台以躲避电击,如此训练 5 分钟,24 小时后重作测验,将小鼠置激怒盒铜栅上,记录其遭受电击后第 1 次跳上平台的时间(潜伏

基金项目:广州市科委新星计划立项课题(98-K-003-01)

^{*} 广州市中医中药研究所,广州市珠玑路 16 号(510130)

收稿日期:2002-09-03;修回日期:2002-10-20

期)及3分钟内从平台跳至铜栅上受电击的次数(错误次数),以此作小鼠记忆能力的评价指标。(2)IL-1 β 、IL-6及NO含量的测定:小鼠记忆能力测试后次日,即断头取脑,冰冻下用玻璃匀浆器研磨,加生理盐水成20%脑匀浆,其后,以4500r/min,4℃离心15分钟,取上清测定AchE,其余部分以10000r/min 4℃离心15分钟,取上清,分别测定IL-1 β 、IL-6及NO含量,IL-1 β 、IL-6用夹心式酶联免疫吸附法(ELISA法)测定,NO用硝酸还原酶法测定。

2.2 实验数据的统计学处理:采用SPSS 8.0统计软件包进行数据处理,计量资料采用独立样本 t 检验。

3 结果

3.1 各组小鼠记忆能力比较:表1示,AD模型组小鼠的记忆成绩明显低于正常对照组,而中药组和双益平组均能提高模型小鼠的学习记忆能力($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。加味当归芍药散各剂量组和双益平组改善小鼠记忆能力的作用差异无显著性($P>0.05$),这与临床观察结果是一致的。

表1 各组小鼠记忆能力比较($\bar{x}\pm s$)

组别	潜伏期(s)	错误次数
正常对照组	10.917 $\pm$ 13.011(24)**	3.689 $\pm$ 2.821(25)*
AD模型组	37.816 $\pm$ 31.368(13)	8.308 $\pm$ 6.486(13)
双益平组	15.600 $\pm$ 13.219(15)*	2.733 $\pm$ 3.159(15)*
中药高剂量组	16.938 $\pm$ 21.079(16)*	2.250 $\pm$ 2.955(16)*
中药中剂量组	11.178 $\pm$ 9.305(19)*	2.700 $\pm$ 2.055(20)*
中药低剂量组	12.167 $\pm$ 7.726(15)*	2.375 $\pm$ 2.527(16)**

与AD模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;括号内数值为样本数

3.2 各组小鼠脑组织IL-1 β 、IL-6及NO含量的比较:表2示,AD模型组小鼠脑组织IL-1 β 含量明显高于正常对照组,加味当归芍药散高、中剂量和双益平均能降低模型小鼠IL-1 β 含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$),加味当归芍药散和双益平对IL-1 β 的作用差异无显著性($P>0.05$),前者高、中、低剂量对IL-1 β 的影响显示一定的量效关系,其作用依次减弱;AD模型组、正常对照组及中药各剂量组间小鼠脑组织IL-6含量的差别无

统计学意义。模型组NO含量明显高于正常对照组($P<0.01$),加味当归芍药散中、低剂量组均能降低模型小鼠NO含量($P<0.05$ 或 $P<0.01$),中药高、中、低剂量对NO含量的影响显示一定的量效关系,却为高、中、低剂量作用渐次增强,高、低剂量相比,差别有非常显著意义($P<0.01$),但双益平组未显示降低NO的作用。

3.3 模型组小鼠脑组织IL-1 β 和NO含量的相关分析:经直线相关分析,模型组小鼠脑组织IL-1 β 和NO含量相关无显著性意义($r=0.035$, $P=0.924$),因此模型组小鼠脑组织IL-1 β 和NO含量无相关关系。

4 讨论

AD归于中医老年呆病,中医对老年呆病多从肾虚论治。我们以往应用加味当归芍药散治疗AD取得了初步疗效,本实验观察了既能益气健脾、利湿化痰,又能养血、活血、祛瘀的加味当归芍药散对AlCl₃诱导的AD模型小鼠的影响,结果表明,加味当归芍药散能缩短跳台记忆实验中AD模型小鼠从通电铜栅跳至平台上的潜伏期,减少模型小鼠从平台跳至通电铜栅的错误次数,改善模型小鼠的记忆能力,其作用与双益平的差异无统计学意义,这与临床治疗观察结果是一致的,高、中、低剂量加味当归芍药散改善模型小鼠的记忆能力的作用未见明显的量效关系。

炎症反应一直是AD发病值得关注的因素。近年的免疫组化研究表明,AD患者脑内有强烈的局限性炎症反应,细胞因子在AD患者大脑皮质和海马内老年斑(SP)附近大量表达,在AD的发病过程中起着重要作用^[1]。我们曾检测了28例AD患者脑脊液中IL-1 β 和IL-6含量,发现二者含量均升高,这与其他学者研究所见是一致的,尤其是IL-1 β 含量的增加对AD的诊断有一定意义,对AD和MID的鉴别诊断有一定参考价值^[2]。国外的临床研究发现长期服用非甾体类抗炎药物(NSAID)的RA患者AD发病率明显低于不用药的对照组,应用过NSAID的AD患者亦显示出明显的病程延缓,提示AD的发生发展确有炎症机制的

表2 各组小鼠脑组织IL-1 β 、IL-6及NO含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	IL-1 β (pg/ml)	IL-6(pg/ml)	NO(μ mol/L)
正常对照组	6.653 $\pm$ 3.196(11)**	142.909 $\pm$ 65.898(11)	8.881 $\pm$ 1.589(19)**
AD模型组	12.929 $\pm$ 6.368(13)	149.055 $\pm$ 73.382(13)	23.268 $\pm$ 6.609(10)
双益平组	8.141 $\pm$ 3.366(15)*	131.881 $\pm$ 79.920(15)	18.887 $\pm$ 9.658(10)
中药高剂量组	6.817 $\pm$ 3.038(16)**	169.271 $\pm$ 80.228(15)*	20.553 $\pm$ 5.631(10)
中药中剂量组	7.145 $\pm$ 3.080(11)**	190.030 $\pm$ 113.139(11)	16.590 $\pm$ 6.727(10)*
中药低剂量组	9.753 $\pm$ 2.930(11)	160.755 $\pm$ 62.643(16)	12.791 $\pm$ 1.115(10)**▲

与AD模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与中药高剂量组比较,▲ $P<0.01$;括号内数值为样本数,各指标含量均以20%脑匀浆计

参与^[4,5]。目前,大多数学者认为, β 淀粉样蛋白(A β)沉积激活小胶质细胞引起的炎症反应是 AD 的核心病理机制^[6]。目前研究认为,A β 是各种原因诱发 AD 的共同通路,是 AD 形成和发展的关键因素。A β 能直接激活中枢小胶质细胞释放 IL-1 β 、IL-6 含量、TNF- α 、干扰素等,IL-1 和星形胶质细胞表面的 IL-1 β 受体结合,使星形胶质细胞被激活、增殖、释放炎性蛋白,这些炎性蛋白促使散在的可溶性 A β 转化为丝状的具有神经毒作用的不溶性沉淀,后者又可引起小胶质细胞的激活,释放 TNF- α 、氧自由基,这些释放物进一步激活小胶质细胞产生 IL-1,IL-1 再次激活星形胶质细胞产生炎性蛋白,这样在 AD 脑内就形成一个不断增强的自身毒性环路,使炎症的反应不断增强,最终导致神经元变性坏死,神经元的死亡又可引起小胶质细胞活化和 IL-1 的分泌^[1,2]。IL-6 也是一种急性炎症因子,在中枢主要由小胶质细胞和星形胶质细胞产生,具有神经元毒性作用,能诱导蛋白酶抑制剂如 α_2 巨球蛋白酶,后者能抑制淀粉样蛋白前体(β -APP)正常酶解,导致 A β 的生成与沉积异常增加^[8,9]。

本实验结果发现,AD 模型小鼠脑组织的 IL-1 含量明显高于正常对照组,这提示灌服 AlCl₃ 诱导的 AD 模型脑内亦存在慢性炎症的病理改变,这可能因于铝在脑内的异常蓄积可引起 β -APP 过度表达,引起 A β 的产生和沉积,从而引起慢性炎症过程。钱亦华等证明铝在脑内的异常蓄积可引起 β -APP 的过度表达,引起 β -AP(A β)的产生和在背海马结构内神经元的沉积,即 AlCl₃ 诱导的 AD 模型出现了与 AD 相似的病理改变^[10,11]。本实验显示,加味当归芍药散高、中剂量和双益平组均能降低模型小鼠 IL-1 β 含量,提示加味当归芍药散和对照药双益平均有一定的抑制 AD 模型小鼠脑内的慢性炎症的作用,这可能是二者对抗 AD 的作用机制之一。加味当归芍药散高、中剂量组和双益平组对 IL-1 β 的作用均无显著性差异;加味当归芍药散高、中、低剂量对 IL-1 β 的作用显示一定的量效关系,其作用依次减弱。本研究同时发现 AD 模型组与正常对照组、加味当归芍药散各剂量组间小鼠脑组织的 IL-6 含量的差异无统计学意义,这表明 AD 脑内慢性炎症的病理过程中,起关键作用是 IL-1 β ,这与其他文献报道相一致。而 IL-1 β 与 IL-6 间无明显的联动性,这亦与笔者检测脑脊液 IL-1 β 和 IL-6 含量的变化时所见一致。提示加味当归芍药散通过降低脑组织 IL-1 β 含量,从而抑制脑神经元 β -APP 的合成、A β 的沉积及老年斑的形成;同时 IL-1 β 含量的降低,亦可抑制 IL-1 β 引起的自身毒性环路,减轻 A β 的沉积及其引起的慢性炎症。

NO 是一种非经典的神经递质。研究表明,NO 是记忆形成过程中主要的神经递质之一。NO 由一氧化氮合酶(NOS)合成,在 AD 的形成过程中,NO 和 NOS 的增高与学习记忆的减退密切相关,如苗建亭等的研究发现 A β 诱导的 NO/NOS 途径在 AD 的形成过程中有一定作用。另外,研究表明,IL-1 还可通过刺激小胶质细胞和星形胶质细胞而增加脑内 NO 和谷氨酸的含量,过多的 NO 和谷氨酸可导致神经元尤其是海马神经元退变、凋亡,最终导致学习记忆障碍^[12]。

参考文献

- 1 余上才,李晓玉. Alzheimer 病与细胞凋亡. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 1999,6(1):54.
- 2 刘孟渊,王达平,刘玉平,等. 加味当归芍药散治疗老年性痴呆的疗效观察. 广州中医药大学学报,2001,18(1):30.
- 3 刘孟渊,王达平,郭阳波,等. 阿尔茨海默病患者脑脊液 IL-1 β 及 IL-6 含量的变化. 中国神经精神疾病杂志,2000,26(5):316-317.
- 4 曾琦,葛立松综述. 阿尔茨海默病的炎症机制与抗炎治疗. 国外医学老年医学分册,1998,19(4):176-179.
- 5 尹兆宝,吴洪梅,林松华,等编译. 炎症与阿尔茨海默病. 国外医学老年医学分册,1998,19(6):247-250.
- 6 韦道祥综述. 小胶质细胞与阿尔茨海默病. 国外医学老年医学分册,2000,21(6):248-250.
- 7 金涛综述. 星形胶质细胞与阿尔茨海默病. 国外医学老年医学分册,2001,22(4):185-187.
- 8 Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, et al. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. Proc Natl Acad Sci USA, 1993,90:10061-10065.
- 9 戴庆棠,郭敏茹. 白细胞介素-6 与老年病. 中华老年医学杂志, 1995,14(5):317-319.
- 10 钱亦华,杨杰,任惠民,等. 痴呆模型大鼠背海马结构内淀粉样蛋白沉积的免疫细胞化学研究. 西安医科大学学报,1997,18(3):304-307.
- 11 杨杰,钱亦华,胡海涛,等. 维生素 E 抑制痴呆模型大鼠海马结构内淀粉样前体蛋白表达的实验研究. 中国老年学杂志,1999,19(4):234.
- 12 苗建亭,李柱元,林宏,等. β -淀粉样肽对 AD 大鼠脑 NO、NOS 和氧自由基的影响. 中国神经免疫学和神经病学杂志,2002,9(1):9-11.

病毒性肝炎及肝病诊疗手册 书讯

- 本书是由北京大学第一医院感染科具有 50 多年临床经验的田庚善教授主编。
- 本书是专门为基层医生编辑的肝病治疗指导手册,读者在遇到肝炎或肝病的患者时,随时可以在本书中找到相应的诊断与鉴别诊断要点,相应的治疗方法有哪些。
- 本书突出的特点是:一般以某种常见的临床表现为主,探讨其诊断与治疗。例如:在临床上遇到一个慢性肝病病人,应当考虑到哪些疾病,对这些疾病如何诊断、诊断清楚后如何治疗。
- ◆本书适合对象:本书适合基层医生、全科医生及肝病、传染病专业的年轻医生
- ◆本书定价:精装本 55.00 元/册,另加邮费 5 元 出版社:中国科学技术出版社
- ◆汇款地址:北京市三源里邮局 24 号信箱 邮政编码:100027
- ◆收款人:袁慧玲 电话:010-84485247, 010-84485248