

实验研究

加味当归芍药散对阿尔茨海默病模型小鼠记忆能力和脑组织 tau 蛋白及 Fas 抗原含量的影响

刘孟洲* 肖柳英* 潘竞锋* 吴维城* 刘广南* 韩超*

摘要 目的:探讨加味当归芍药散治疗阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)的作用机制。方法:采用灌服三氯化铝制作小鼠 AD 模型,观察加味当归芍药散对 AD 模型小鼠的学习记忆能力和脑组织湿重、脑组织胆碱酯酶(AChE)活性、tau 蛋白及 Fas 抗原含量的影响。结果:AD 模型组小鼠脑组织 tau 蛋白和 Fas 抗原含量呈直线正相关;加味当归芍药散能增加脑组织湿重,提高模型小鼠的记忆能力;同时降低模型小鼠脑组织的 AChE 活性及 tau 蛋白、Fas 抗原的含量。结论:加味当归芍药散具有对抗 AD 的作用,增强脑内胆碱能功能、降低脑组织 tau 蛋白及 Fas 抗原含量,从而减少双股螺旋丝(PHF)、神经原纤维缠结(NFT)的形成,抑制脑内神经细胞的凋亡,则可能是其对抗 AD 的作用机制。

主题词 阿尔茨海默病/中医药疗法 当归芍药汤/药理学 记忆/药物作用

异常磷酸化和异常糖基化的 tau 蛋白是脑内神经细胞内神经原纤维缠结(NFT)中双股螺旋丝(PHF)的主要成分之一,高磷状态下的 tau 蛋白连接微管的作用大为降低,且可自动聚集成成对的螺旋丝。PHF 聚集在阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)患者脑受累神经元中形成 NFT,成为 AD 特征性病理改变之一,同时,神经细胞凋亡也是 AD 发病的重要环节^[1,2]。而 AD 脑内神经生化最为严重、最为一致的改变是大脑胆碱能功能的低下。本课题应用加味当归芍药散治疗 AD,初步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^[3]。因此,本实验用灌服三氯化铝致 AD 模型,观察加味当归芍药散对 AD 模型小鼠的学习记忆能力及脑组织湿重、脑组织中胆碱酯酶(AChE)活性、tau 蛋白及 Fas 抗原含量的影响,探讨该中药制剂治疗 AD 的作用机理。

1 材料

1.1 动物:选用 2 月龄 NIH 小鼠 106 只,雌雄各半,体重 22~24g,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。

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)。主要制备工艺:将上述组成药物按古方用量(加党参 20g)加水浸泡后,煎煮、过滤 3 次,合并 3 次滤液静置过夜,浓缩至 4.4g 生药/ml 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。结晶三氯化铝($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)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。tau 蛋白测定试剂盒购自美国 Biosource 公司,Fas 抗原的测定试剂盒购自美国 Endogen 公司。

1.3 主要仪器:YSD-4G 药理生理实验多用仪、电子天平、贝克曼 GS-15R 台式冷冻高速离心机、岛津 UV-1601 紫外-可见光分光光度计、CliniBio128C 酶标仪。

2 方法

2.1 分组、造模及给药方法:106 只 NIH 小鼠按随机数字法分为 6 组,即正常对照组(25 只)、AD 模型组(14 只)、双益平组(阳性对照组,15 只)、中药加味当归芍药散高、中、低剂量组(分别为 16、20、16 只),每组雌雄各半。正常对照组以蒸馏水灌胃,每鼠 0.6ml,每日 1 次,连续 9 周;AD 模型组先以三氯化铝(AlCl_3) 200mg/kg 灌胃,上午给药,每日 1 次,连续 9 周;双益平组(阳性对照组) AlCl_3 灌胃第 7 天始,除上午给予 AlCl_3 灌胃外,下午给予双益平 0.4mg/kg 灌胃,每日 1 次,连续 8 周;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。中药低剂量组用临床等效剂量的 1.5 倍,为 27.5g 生药/kg;中药中剂量组用低剂量的 2 倍,为 55g 生药/kg;中药高剂量组用中剂量的 2 倍,为 110g 生药/kg。

2.2 检测指标及方法

2.2.1 记忆功能测试:最后 1 次灌胃给药 50 分钟后,

基金项目:广州市科委新星计划立项课题(98-K-003-01)

* 广东省广州市中医中药研究所,广州市珠玑路 16 号 (510130)

收稿日期:2003-02-20;修回日期:2003-04-29

表 1 各组小鼠脑组织湿重及记忆能力比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	脑湿重(g)	潜伏期(s)	错误次数
正常对照组	0.417±0.061(25)	10.917±13.041(24)**	3.680±2.824(25)**
AD 模型组	0.404±0.041(13)	37.846±34.368(13)	8.308±6.486(13)
双益平组	0.416±0.032(15)	15.600±13.249(15)*	2.733±3.150(15)*
中药高剂量组	0.431±0.049(16)	16.938±21.070(16)	2.250±2.955(16)**
中药中剂量组	0.438±0.027(20)**△	11.158±9.305(19)**	2.700±2.055(20)**
中药低剂量组	0.439±0.030(16)*△	12.467±7.726(15)**	2.375±2.527(16)**

与 AD 模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与双益平组比较, $\Delta P < 0.05$; 括号内为样本数。下表同

表 2 各组小鼠脑组织 AchE 活性、总 tau 蛋白及 Fas 抗原含量比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	总 tau 蛋白含量(pg/ml)	AchE 活性(IU/L)	Fas 含量(pg/ml)
正常对照组	1798.312±351.608(11)**	207.560±11.871(25)**	128.986±28.783(13)**
AD 模型组	2117.522±92.292(13)	240.539±17.193(13)	171.325±41.181(14)
双益平组	1778.982±189.129(10)**	196.067±6.239(15)**	120.159±7.423(15)**
中药高剂量组	1853.086±331.977(12)*	203.000±8.525(16)**△	86.169±53.796(15)**△
中药中剂量组	1765.873±371.169(14)**	212.250±6.569(20)**△△	39.358±11.867(14)**△△
中药低剂量组	1922.727±98.480(11)**△	224.188±17.971(16)**△△	36.010±14.093(15)**△△

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),以此作为小鼠记忆能力的评价指标。

2.2.2 tau 蛋白、Fas 抗原含量及脑组织湿重、AchE 活性的测定:小鼠记忆能力测试后次日断头取脑,电子天平称重后,冰冻下用玻璃匀浆器研磨,加生理盐水制成 20% 脑匀浆,其后以 4500r/min, 4℃ 离心 15 分钟,取上清用酶法测定 AchE,其余部分以 10000r/min, 4℃ 离心 15 分钟,取上清,用夹心式酶联免疫吸附法(ELISA)分别测定 tau 蛋白、Fas 抗原含量。

2.3 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 各组小鼠脑组织湿重及记忆能力比较:表 1 示,AD 模型组小鼠的脑组织湿重与正常对照组相比差异无显著意义,而中药中、低剂量组却能增加模型小鼠的脑组织重量,且与阳性对照组差异有显著性($P < 0.05$);AD 模型组小鼠的记忆能力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。加味当归芍药散各剂量组和双益平组改善小鼠记忆能力作用的差异无显著性意义,这与临床观察结果是一致的。

3.2 各组小鼠脑组织 AchE 活性、总 tau 蛋白及 Fas

抗原含量比较:AchE、Fas 以 20% 脑匀浆计,tau 蛋白以 2.6% 脑匀浆计,具体数值见表 2。结果表明,AD 模型组小鼠脑匀浆的 AchE 活性明显高于正常对照组,加味当归芍药散和双益平均能降低模型小鼠 AchE 的活性,双益平的作用似优于中药;中药高、中、低剂量组对 AchE 的作用显示一定程度的量效关系,其作用显示依次减弱的趋势。AD 模型组小鼠脑组织的总 tau 蛋白含量明显高于正常对照组,中药和双益平均能降低模型小鼠总 tau 蛋白含量;中药高、中、低剂量组对 tau 蛋白的影响未显示明显的量效关系;中药高、中剂量组与双益平组对 tau 蛋白作用差异无显著意义,但双益平组对 tau 蛋白作用与中药低剂量组差异有显著性($P < 0.05$)。结果亦显示,AD 模型组小鼠脑匀浆 Fas 抗原含量明显高于正常对照组,加味当归芍药散、双益平均能降低 Fas 抗原含量,前者作用似优于后者;中药高、中、低剂量组对于 Fas 抗原的影响亦呈现一定的量效关系,但其作用却表现为依次增强的趋势。

3.3 AD 模型小鼠脑组织 tau 蛋白和 Fas 抗原含量的相关分析:经直线相关分析,AD 模型组小鼠脑组织 tau 蛋白和 Fas 抗原含量的相关性具有显著性意义($r = 0.64, P < 0.025$),可以认为,AD 模型组小鼠脑组织 tau 蛋白和 Fas 抗原含量呈直线正相关。

4 讨论

基于应用加味当归芍药散治疗 AD 取得初步疗效,本实验观察了加味当归芍药散对 $AlCl_3$ 诱导的 AD 模型小鼠的影响,结果发现加味当归芍药散中、低剂量组都能增加模型小鼠的脑重量,提示该中药制剂可能促进脑组织的生长;同时,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,但以高剂量作用最强。

大脑的胆碱能功能与人的学习记忆能力有密切关系。脑内乙酰胆碱被认为与近事记忆密切相关,而近事记忆障碍正是 AD 早期的主要临床症状^[4]。本实验观察到灌服 $AlCl_3$ 诱导的 AD 模型小鼠,其脑组织胆碱酯酶活性增高,而加味当归芍药散能降低胆碱酯酶活性,这将抑制乙酰胆碱的降解,增强胆碱能功能,改善认识和记忆能力,这可能是加味当归芍药散治疗老年性痴呆的作用机理之一。本实验显示,加味当归芍药散对 AchE 的作用显示一定的量效关系,但双益平对 AchE 的作用似优于加味当归芍药散。

NFT 是 AD 脑内神经病理学特征之一,而与 NFT 发生有密切关系的神经蛋白是 tau 蛋白,异常磷酸化和异常糖基化修饰的 tau 蛋白的病理性沉积最终导致 NFT 的形成。在 AD 患者脑中 tau 蛋白总量多于正常人,且正常 tau 蛋白减少,而异常过度磷酸化 tau 蛋白大量增加^[5]。测定 AD 模型小鼠脑组织中 tau 蛋白的含量,可得到 NFT 形成范围、数量的间接信息。本实验观察到 AD 模型小鼠脑组织的总 tau 蛋白含量明显高于正常对照组,提示模型组小鼠脑内 NFT 形成增加;加味当归芍药散和双益平均能降低模型小鼠总 tau 蛋白含量,提示二者均能抑制模型组小鼠脑内 PHF/NFT 的形成,减轻其病理改变,这可能是加味当归芍药散对抗 AD 的作用机制之一,但本实验未能直接说明本方是否具有抑制 tau 蛋白过度磷酸化的作用,这有待于进一步研究。加味当归芍药散高、中、低剂量组对 tau 蛋白的影响未显示明显的量效关系,高、中剂量组与双益平组对 tau 蛋白的作用差异无显著性意义,但双益平组对 tau 蛋白的影响与中药低剂量组有显著性差异,提示中药高、中剂量组对 tau 蛋白的作用似与双益平组无明显差异,而低剂量组似劣于双益平组。

Fas 抗原(CD95)是介导凋亡的细胞表面蛋白,属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)家族,被活化后与 Fas 配体结合向细胞内传递死亡信号,导致细胞凋亡^[6]。神经细胞凋亡也是 AD 发病的重要环节。研究表明,Fas 介导的细胞凋亡参与了 AD 的发病过程,与 AD 脑内神经细胞的丢失密切相关^[7,8]。本实验结果显示,AD 模型小鼠脑组织 Fas 抗原含量比正常对照组明显升高,这反映了模型小鼠脑内 Fas 抗原的增量表达,提示 AD 模型小鼠脑内神经细胞的凋亡即神经细胞丢失增加,导致记忆减退,认知障碍;而加味当归芍药散能降低 AD 模型小鼠脑组织 Fas 抗原的含量,表明该方能抑制 AD 模型小鼠脑内 Fas 抗原的表达,提示其能抑制脑内神经细胞的凋亡,减少神经细胞的丢失,这可能是该方对抗 AD 的机制之一;其作用似优于双益平,且呈现一定的量效关系,但却表现为高、中、低剂量的作用依次增强,这可能因为低剂量的加味当归芍药散已达到最大作用,剂量再渐次增高,只能使其处于过饱和状态。

此外,直线相关分析表明,AD 模型组小鼠脑组织 tau 蛋白和 Fas 抗原含量呈直线正相关,提示模型组小鼠随着其脑组织 tau 蛋白含量的升高,脑组织 Fas 抗原含量亦增加,即模型组小鼠脑内 NFT 形成的增加,将促进脑内神经细胞的凋亡,加速神经细胞的丢失。

参考文献

- 1 胡凡. 用分子遗传学探索阿尔茨海默病病因. 美国医学会杂志中文版, 1998, 17(1): 39-42.
- 2 宋军, 马晓昌. 跨世纪脑科学: 老年性痴呆致病机理与防治. 中华老年医学杂志, 1998, 17(3): 133-134.
- 3 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): 30-33.
- 4 王瑛, 张海音, 陈生弟. 阿尔茨海默病的发病机制研究进展. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2002, 9(1): 42-43.
- 5 崔行. Tau 蛋白与老年性痴呆. 山东医药, 2000, 40(20): 51-52.
- 6 Nogata S, Golstein P. The Fas death factor. Science, 1995, 267(5203): 1449-1452.
- 7 Smale G, Nichols NR, Brady DR, et al. Evidence for apoptotic cell death in Alzheimer's disease. Exp Neurol, 1995, 133(2): 225-230.
- 8 李卫平, 刘晓加, 林宏川, 等. 老年期痴呆患者脑内细胞凋亡现象的研究. 中华神经科杂志, 1996, 29(6): 340-343.

(上接第 339 页)

/ml, 活动力 II 度, 畸形率 40%, FSH 上升, LH、T、 E_2 均下降。诊断为不育症。辨证为肾气亏虚。治当补肾益气生精。方药: 熟地黄 20g, 山药、山茱萸、泽泻、牡丹皮、覆盆子、菟丝子、车前子、鹿角胶各 10g, 茯苓、枸杞子、龟甲各 15g, 砂仁 8g, 5 剂, 水煎服。守方 1 年余, 生育一女。

按: 方中以六味地黄丸和五子衍宗丸加减而成。以六味地黄丸补肾以壮生精之源; 五子衍宗丸生精。阳胜则动, 精子活动力低是缺乏阳气推动, 以鹿角胶助之; 以龟甲补阴精, 促精子生成。鹿角胶善于温肾壮阳, 益精补血, 龟板长于填精补髓, 滋阴养血, 二味为血肉有情之品, 取龟鹿二仙胶之方义, 能峻补阴阳以生气血精髓, 益寿延年, 生精种子。