

猪胎盘替代紫河车防治老年性痴呆的实验研究

余 宙¹ 梁迎春² 范青生¹ 付金衡¹ 黄立山³

(1. 南昌大学中德联合研究院, 江西省南昌市南京东路 235 号, 330047;

2. 北京成志科为生物科技有限公司; 3. 南昌大学生命与食品科学学院)

[摘要] 目的 观察猪胎盘替代紫河车用于防治老年性痴呆的效果。方法 将 70 只昆明种小鼠分为空白组、模型组、阳性对照组、紫河车低剂量组、紫河车高剂量组、猪胎盘低剂量组、猪胎盘高剂量组, 每组 10 只。以 D-半乳糖皮下注射法制备老年痴呆动物模型, 空白组不给任何药物, 模型组以生理盐水代替受试药, 阳性对照组灌胃给予脑复康, 紫河车低剂量组、高剂量组分别灌胃给予紫河车 28g/kg、4g/kg, 猪胎盘低剂量组、高剂量组分别灌胃给予猪胎盘 4g/kg、8g/kg。给药 6 周后, 分别运用行为学实验避暗法、跳台法, 测定两药对小鼠造模后学习记忆的影响, 并测定脑中乙酰胆碱酯酶和单胺类神经递质的含量。结果 猪胎盘和紫河车抗老年痴呆作用无统计学差异 ($P < 0.05$), 在避暗潜伏期试验中, 猪胎盘高剂量组的效果明显好于紫河车高剂量组 ($P < 0.01$)。两者对单胺类神经递质的影响相近。结论 猪胎盘有可能替代紫河车用于防治老年痴呆。

[关键词] 紫河车; 猪胎盘; 老年痴呆

Experimental Study on the Effect of Pig Placenta Instead of Placenta Hominis for the Treatment of Senile Dementia

YU Zhou¹, LIANG Yingchun², FAN Qingsheng¹, FU Jinheng¹, HUANG Lishan³

(1. China-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047; 2. Beijing Chengzhi Kewei Biology Science and Technology Co. Ltd; 3. School of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of pigplacenta instead of Ziheche (Placenta Hominis) for the treatment of senile dementia. **Methods** Seventy Kunming mice were divided into blank group, model group, positive control group, Ziheche low and high dosage groups, and pigplacenta low and high dosage groups, with 10 in each. The senile dementia models were established with the D-Galactose subcutaneous injection. The blank group was not administered any medicines. The model group was prescribed normal saline instead of the tested medicine; the positive control group was given Naofukang by gavage; the Ziheche low and high dosage groups were given 2g/kg and 4g/kg Ziheche respectively by gavage; while the pigplacenta low and high dosage groups were treated with pigplacenta 4g/kg and 8g/kg respectively by gavage. After treatment for 6 weeks, the behavior experimental dark-avoiding test and step-down test were applied to test the effect of the medicines on the learning memory of mice, and acetylcholinesterase and monoamine levels in brain tissues. **Results** There was no significant difference between the effect of pigplacenta and Ziheche in resisting senile dementia. In the latency of dark-avoiding test, the effect of high dosage of pigplacenta was significantly better than that of Ziheche ($P < 0.01$). The effect of pigplacenta and Ziheche on monoamine was similar with each other. **Conclusion** It's possible to use pigplacenta instead of Ziheche for the treatment of senile dementia.

Key Words Ziheche (Placenta Hominis); Pigplacenta; Senile dementia

紫河车为健康产妇的干燥胎盘,是将新鲜胎盘除去胎膜及脐带,反复冲洗至去净血液,蒸或置沸水中略煮后干燥而成。性味甘、咸、温,归心、肺、肾经,温肾补精,益气养血,是一类温补的传统贵重中药。目前存在来源困难、用药安全性等诸多问题。而与人类一样同是哺乳类动物的猪胎盘却来源丰富。有学者报道,猪胎盘与紫河车化学成分与药理作用有很多相似之处,有可能成为我国紫河车新的药用资源^[1-2]。本研究以小鼠为实验对象,探讨猪胎盘是否有可能代替紫河车用于防治老年痴呆。

1 材料与方法

1.1 动物

昆明种小鼠,雌雄各半,体重 18~22g,由江西医学院动物中心提供。动物许可证号:02196002。

1.2 仪器与试剂

乙酰胆碱酯酶(AChE)测定试剂盒由南京建成生物制品公司提供,批号:20011105;脑复康片,由天津金世药业有限公司提供,批号:991111;去甲肾上腺素(noradrenalin, NE),批号:9903,多巴胺(dopamine, DA)标准品,批号:9905。中国生物药品制品检定所产品。723 分光光度计,由上海第三分析仪器厂生产。RF530XPC 荧光分光光度计,日本岛津公司生产。

1.3 药物

紫河车购自江西中医学院附属医院,猪胎盘为普通市售品,分别以 95℃水提取 3 次,合并提取液后,浓缩为 2g/ml,浓稠液体状置于冰箱中备用。

1.4 动物分组及给药

采用成组实验设计法^[3],70 只昆明小鼠按体重差异,随机分为空白组、模型组、阳性对照组、紫河车低剂

量组、紫河车高剂量组、猪胎盘低剂量组、猪胎盘高剂量组, 每组 10 只。采用 D-半乳糖注射法建立衰老模型。空白组不给予任何药物, 与模型组同时每天颈背皮下注射生理盐水 0.5ml/20g, 6 周后给予生理盐水; 模型组于每天颈背皮下注射 5%D-半乳糖 0.5ml/20g; 6 周后, 给予生理盐水。其余均于实验前 6 周开始每天颈背皮下注射 5%D-半乳糖 0.5ml/20g, 6 周后, 紫河车低剂量组每天灌胃 2g/kg 紫河车, 猪胎盘低剂量组每天灌胃 4g/kg 猪胎盘, 紫河车高剂量组每天灌胃 4g/kg 紫河车, 猪胎盘高剂量组每天灌胃 8g/kg 猪胎盘。阳性对照组每天灌胃 1.6g/kg 脑复康片。

1.5 观测指标及方法

1.5.1 小鼠的被动回避能力测试 避暗箱是由大小相同的明暗两室组成, 明室为监测室, 暗室为通电室, 其体积为 18cm×25cm×20cm, 两室之间有一直径为 5cm 的通道。明室上方悬挂 1 个 60W 的白炽灯。暗室底部由间隔 1cm 的铜丝组成, 通 36V 电压, 实验开始后, 首先关闭电击电源, 将小鼠背朝通道放入监测箱, 任其自由活动 3min, 使其熟悉环境。随后, 进行记忆获得训练, 打开电击开关将小鼠背对洞口, 小鼠因嗜暗习性进入暗室, 受到电击后, 立即逃离暗室。24h 后, 再次进行测试, 将小鼠重新放入监测室, 小鼠第 1 次进入暗室的时间为潜伏期, 小鼠进入的次数为错误次数。

1.5.2 小鼠跳台实验 将动物放置反应箱中适应 3min, 然后通上 36V 交流电, 动物受到刺激后, 反应是立即跳到平台上, 多数可能再次或多次跳到通电的铜栅上, 受到电击后, 又快速跳回平台上, 如此训练 5min。24h 后, 重新测试, 为记忆保持试验, 第 1 次跳下平台的时间记为潜伏期, 5min 内跳下的次数为错误次数^[4]。

1.5.3 脑中 AChE 活性测定 取动物左侧大脑, 制成 10% 脑匀浆, 离心取上清。按照试剂盒的要求依次加入底物缓冲液和显色应用剂, 混匀后, 37℃ 准确反应 6min, 再依次加入抑制剂、透明剂、显色应用剂, 混匀, 放置 15min, 测定在 412nm 波长下吸光度(A 值), 以蒸

馏水调零比色。按下列公式计算得脑匀浆内 AChE 含量($\mu\text{mol}/\text{mg}$):

$$\frac{\text{测定管 OD} - \text{测定空白管 OD}}{\text{标准管 OD} - \text{标准空白管 OD}} \times \frac{\text{标准管浓度}}{\text{蛋白含量}}$$

同时用考马斯亮蓝试剂盒测定脑匀浆内蛋白含量。

1.5.4 脑中单胺类神经递质含量测定 取动物右侧大脑, 匀浆后吸取上清液, 振荡离心后吸取下层水相(即为单胺类提取液), 制成反应液后在荧光分光光度计上以 385nm 激发, 在 485nm 处测得的荧光强度值即为 NE 的含量, 以 310nm 激发, 在 390nm 处测得的荧光强度为 DA 的含量。标准管的测定: 取标准溶液 0.5ml, 用预冷酸性正丁醇补足至 5ml, 其余操作与相应测定管相同。空白管的测定: 取重蒸水 0.5ml, 用预冷酸性正丁醇补足至 5ml, 其余操作与相应测定管相同。单胺类递质含量(ng/g 脑湿重)计算公式如下:

$$\frac{\text{测定管 OD} - \text{测定空白管 OD}}{\text{标准管 OD} - \text{标准空白管 OD}} \times 20\mu\text{g}/\text{ml} \times 0.5\text{ml}/\text{脑湿重}$$

1.6 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 方差不齐时, 用 Tamhane 检验。

2 结果

2.1 猪胎盘与紫河车对模型小鼠被动回避能力的影响

表 1 示, 小鼠在给予受试药物后, 除猪胎盘低剂量组外, 其他各给药组的被动回避错误次数与模型组比较均有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中紫河车高剂量组与猪胎盘高剂量组均明显改善($P < 0.01$)。

2.2 猪胎盘与紫河车对模型小鼠跳台实验的影响

表 1 示, 小鼠在给予不同剂量的紫河车与猪胎盘后, 其错误次数与模型组比较均有所减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中紫河车与猪胎盘高剂量组更为明显($P < 0.01$), 潜伏期除紫河车低剂量组与猪胎盘低剂量组外, 与模型组比较均有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中猪胎盘高剂量组更为明显($P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠被动回避能力和跳台能力比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	被动回避能力		跳台	
		错误次数(次)	潜伏期(s)	错误次数(次)	潜伏期(s)
空白组	10	1.20±1.13	172.50±98.07	1.70±1.41	195.50±94.45
模型组	10	4.10±1.72 ^{△△}	84.10±55.79 [△]	4.60±2.31 [△]	54.86±75.26 [△]
阳性对照组	7	1.71±1.80 [*]	182.86±70.75 [*]	1.71±1.11 ^{**}	178.86±100.73 [*]
紫河车低剂量组	10	1.90±1.78 [*]	123.29±103.37	2.40±2.17 [*]	133.50±86.67
猪胎盘低剂量组	10	1.75±1.90 [*]	118.87±75.71	2.12±1.64 ^{**}	146.12±98.55 [*]
紫河车高剂量组	8	1.75±1.90 ^{**}	118.87±75.71	2.12±1.64 ^{**}	146.12±98.55 [*]
猪胎盘高剂量组	9	2.28±1.82 ^{**}	158.66±84.97	1.88±1.26 ^{**}	177.48±102.16 ^{**}

注: 与空白组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 模型组比较, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$

表 2 各组小鼠脑中 AChE 活性、DA、VE 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	AChE 活性(U/mg)	DA(ng/g)	NE(ng/g)
空白组	10	3.40±0.76	398.13±122.79	235.11±111.04
模型组	10	5.45±1.09 Δ	224.54±104.25 $\Delta\Delta$	133.59±69.26 Δ
阳性对照组	7	4.10±0.40*	336.92±104.30*	223.40±55.98*
紫河车低剂量组	10	5.05±0.75	245.68±72.39	182.61±85.44
猪胎盘低剂量组	10	4.56±0.70*	266.83±122.07	189.20±86.81
紫河车高剂量组	8	4.42±0.80*	327.90±97.87*	207.61±100.50*
猪胎盘高剂量组	9	4.51±0.67*	328.53±113.19*	216.68±78.71**

注:与空白组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.3 猪胎盘与紫河车对模型小鼠脑中 AChE 活性的影响

表 2 示,小鼠在给予受试药物后,其脑中 AChE 的活性有不同程度的改善。与模型组比较,除紫河车低剂量组外,其他受试药物组均有统计学差异($P < 0.05$)。

2.4 猪胎盘与紫河车对模型小鼠脑中单胺类神经递质含量的影响

表 2 示,小鼠在给予不同剂量的紫河车与猪胎盘后,除紫河车低剂量组、猪胎盘低剂量组外,其他各给药组 DA、NE 含量与模型组比较均有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

《本草纲目》称人胎盘为紫河车,其具有“安神养血、补气、益精、解毒、补血的作用”,“久服者,耳聪目明,须发黑,延年益寿,有夺造化之功”。近年来,紫河车常用于治疗老年痴呆^[5],已经取得较好的疗效。但是目前由于伦理问题和交叉感染问题,紫河车的应用受到限制。所以寻找替代品是当务之急。猪与人类一样是哺乳类动物,其胎盘成分与紫河车有一定的相似性,均含有多种激素、生长因子、酶类、干扰素、脂多糖,只是含量上有差别,故本研究以小鼠为实验对象,初步探讨猪胎盘能否替代紫河车用于抗老年痴呆,而有效成分含量的差别也是本研究猪胎盘的使用剂量比紫河车剂量大的原因^[6-8]。

本研究结果显示,在小鼠的被动回避能力测试中,紫河车低剂量组与猪胎盘低剂量组均能有效减少动物被动回避的错误次数。在潜伏期试验中,猪胎盘高剂量组的效果还明显好于紫河车高剂量组。在小鼠跳台能力测试中,虽然猪胎盘低剂量组没有达到紫河车低剂量组同样的效果,但是猪胎盘高剂量组与紫河车高剂量组的效果是接近的。

研究表明,老年痴呆患者脑中的乙酰胆碱含量减少,而补充乙酰胆碱能改善老年痴呆患者的症状。临床上补充乙酰胆碱也是治疗老年痴呆的主要方法。而 AChE 是消除乙酰胆碱的专有酶,是影响乙酰胆碱含量的主要因素。本研究发现,猪胎盘低剂量组动物脑中

的乙酰胆碱酯酶的含量大大高于紫河车低剂量组,高剂量组中二者的效果接近,从本试验来看,猪胎盘完全可能代替紫河车成为治疗老年痴呆的药物。

单胺类神经递质包括儿茶酚胺与吲哚胺二类,前者包括 DA 与 NE,后者为 5-羟色胺(5-HT)。NE 在记忆保持方面起重要作用,而改善记忆与促进 DA 释放有关,5-HT 系统则参与调节情绪、动机和食欲等。出现学习记忆能力的下降时,脑内单胺类神经递质含量会大大下降,故单胺类神经递质的含量与学习记忆密切相关。从实验结果来看,紫河车与猪胎盘高剂量组均能够增加脑中 DA 的含量,而且猪胎盘增加脑中 NE 含量的效果还优于紫河车,说明猪胎盘在一定剂量的前提下,有可能达到甚至超过紫河车促进学习记忆的药效^[9]。从目前的实验结果来看,猪胎盘有可能代替紫河车成为治疗老年痴呆的药物,但是量效关系还需进一步研究。

参考文献

- [1] 吴凌,李金香,王国良,等.人和动物胎盘药理作用和临床应用的研究进展[J].黑龙江八一农垦大学学报,2001,13(2):68-71.
- [2] 吕鹏月,李定格,石俊英,等.中药紫河车与猪、牛、羊胎盘补血作用的药理实验研究[J].山东医药工业,2002,21(5):51-52.
- [3] 陈奇.中药药效研究思路与方法[M].北京:人民卫生出版社,2005:939.
- [4] 程敏.紫河车生物活性物质的药理作用及炮制方法研究进展[J].陕西农业科技,2008,54(3):113-115.
- [5] 袁梦石,陈向良,周德生,等.紫河车对阿尔茨海默病模型大鼠脑组织内 β 淀粉样蛋白及 β 淀粉样前体蛋白 mRNA 表达的影响[J].中国医师杂志,2007,9(5):43-47.
- [6] 袁梦石,陈向良,曹友平,等.紫河车蜜丸对老年期痴呆患者脑脊液 β 淀粉样蛋白的影响[J].湖南中医学院学报,2004,24(4):39-40.
- [7] 徐红.紫河车与猪胎盘促进产后乳汁分泌效果比较[J].实用医学杂志,2006,7(9):11-12.
- [8] 张淑二,陶勇,张运海,等.胎盘的有效成分及其应用[J].动物医学进展,2007,28(9):193-197.
- [9] 曹艳花,吕鹏月.紫河车及其代用品对小鼠学习记忆的影响[J].食品与药品,2007,9(9):18-20.

(收稿日期:2009-04-27;修回日期:2009-08-25)

[编辑:行 之]