

养寿丹对阿尔茨海默病肾阳虚大鼠脑神经递质的影响

黄兆胜¹, 刘明平¹, 孙维广², 韦品清¹, 廖慧丽³, 萱垣昇⁴

(1 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405; 2 广州星群(药业)股份有限公司, 广东 广州 510120;

3 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 4 日本第一药产株式会社医生物学研究所, 日本)

摘要: 实验用 D-半乳糖腹腔注射致亚急性衰老、醋酸氢化可的松肌肉注射致肾阳虚为基础, 合并 Meynert 核损毁所致 Alzheimer 型痴呆肾阳虚大鼠模型。通过 Y-电迷宫进行大鼠行为测试, 并检测脑神经递质。结果表明养寿丹能明显提高该模型大鼠的学习记忆能力, 并能增加萎缩的肾上腺重量, 提高血清皮质醇含量; 对不同脑区降低的单胺类神经递质含量也有不同程度的提高, 其中以海马、额叶去甲肾上腺素(NE)、5-羟色胺(5-HT)更为明显($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

关键词: 养寿丹; 阿尔茨海默病; 肾阳虚; 单胺类神经递质

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)01-0026-03

Effect of Yangshou Dan on neurotransmitters in Rats with Alzheimer's Disease Combining Yang Deficiency of Kidney

HUANG Zhao-sheng¹, LIU Ming-ping¹, SUN Wei-guang², WEI Pin-qing¹, LIAO Hui-li³, XUAN Yuan-sheng⁴

(¹ Chinese Materia Medica College, Chuangzhou University of Traditional Chinese Medicine,

Guangzhou 510405, China; ² Guangzhou Xingqun Pharmaceutical Stock Corporation, Guangzhou 510120, China;

³ The First Affiliated Hospital, Chuangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

⁴ Biology Institute of Japan Business Corporation of the First Pharmaceutical Corporation, Japan)

Abstract: The protective effect of Yangshou Dan (YSD) on central nervous system in rat with AD was studied. Y-electric maze was used to test the ability of learning and memory of rats, and inspect the content of monoamine neurotransmitters by fluorospectrophotometry. The results showed that YSD could significantly improve the learning and memory ability and increase the weight of adrenal, especially, the level of norepinephrine, 5-hydroxytryptamine in hippocampus and cerebral cortex. It's suggested that YSD have the protective against the injuring in rat brain through adjusting the level of monoamine neurotransmitters in brain.

Key words: Yangshou Dan; Alzheimer's disease; Yang Deficiency of Kidney; Monoamine neurotransmitters

近年来, 记忆障碍的脑生化机理研究认为阿尔茨海默病(AD)与中枢神经递质代谢有密切关系, 且累及多种神经递质。为了进一步探讨养寿丹对 Alzheimer 病肾阳虚大鼠的益智作用机理, 我们观察了其模型大鼠脑神经递质 NE、DA、5-HT 等含量的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 15 月龄 SD 大鼠 50 只, 雌雄各半, 由广东省卫生厅实验动物中心提供, 合格证号码: 99A032。

1.2 主要药物与试剂 养寿丹由何首乌、枸杞子、

熟地、巴戟、川断、牛膝、肉苁蓉、菟丝子、茯苓、白术、远志、石菖蒲等药组成(方中各药比例为 3: 1.5: 1.5: 1.5: 1.5: 1.5: 2: 1.5: 1.5: 1.5: 1: 1)。主要制备工艺: 诸药洗净, 浸泡 1h, 加水煎煮两次, 第一次 3h, 第二次 2h, 合并煎液, 滤过, 滤液在 80℃以下减压浓缩成稠膏, 并在 80℃以下干燥, 粉碎, 过筛, 即得寿丹浸膏粉(每 g 浸膏粉含生药 10g, 批号 991206), 冰箱保存, 临用时稀释成不同浓度。

脑复康(Piracetam Tablets, PT): 东北制药厂生产(批号: 991006); D-半乳糖(D-galactose): 上海试剂二厂产品(批号: 960926); 鹅膏蕈氨酸(Ibotenic acid, IBO): Sigma 公司生产; 醋酸氢化可的松: 浙江医药股份有限公司生产(批号: 991015); 正丁醇: 广州化学试剂厂, 批号: 990321-2; 亚硫酸钠: 广州化学试剂二

收稿日期: 2001-06-25

基金项目: 国家中医药管理局课题(98-02-A)

厂,批号:981207;冰醋酸:广州化学试剂厂,批号:991206;半胱氨酸:天津市化学试剂二厂,批号:950302;正庚烷:天津市东方化工厂,批号:980805;均为分析纯。

去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)、5-羟吲哚醋酸(5-HIAA)标准品均由中国药品生物制品检定所提供,批号分别为169-9402 0070-9404 169-9405 0070-9406,供含量测定用。

1.3 实验方法

1.3.1 AD病肾阳虚大鼠模型建立:根据文献^[1~3]方法改进。实验前1~40d,对造模组大鼠每日1次,腹腔注射D-半乳糖50mg/kg,造成亚急性衰老;然后用大鼠后腿肌肉发达处注射醋酸氢化可的松混悬液15mg/kg,连续10d,每天1次,停药10d,造成肾阳虚。假手术组按上述操作分别注射等量生理盐水。从第61d起,对造模大鼠行脑内双侧Meynert核(参照大鼠脑立体定位图谱^[34],定位坐标为AP-0.8mm, ML2.6mm, DV8.2mm)。脑内Meynert核注射时,大鼠先经3%的戊巴比妥钠(30mg/kg)经腹腔麻醉后,将其固定在立体定位仪上,头顶部正中切口,暴露前囟,精确定位,用微量注射器将生理盐水溶解的IBO,每侧注射1 μ L(含IBO5 μ g/ μ L)缓慢注入Meynert核,注射时间每侧持续5min,留针10min。假手术组按上述操作分别注射等量生理盐水。

模型建立成功后,将存活动物随机分成老年性痴呆组(6只)、养寿丹高剂量组18g/kg组(7只)、养寿丹低剂量组4.5g/kg组(8只)、脑复康组7g/kg(8只);假手术组(9只),各给药组按上述剂量灌胃给药,假手术组灌胃等量生理盐水,每日1次,连续2个月。末次灌胃1h后进行Y-电迷宫测试。

1.3.2 学习记忆能力的测定方法 采用Y-电迷宫法^[4],大鼠“Y”型电迷宫(自制):该装置体积为150cm $\times$ 40cm $\times$ 40cm,从中部分支,一侧用黑色有机玻璃遮住光线,称为暗道,另一侧支路用25W日光灯照明,标为明道,测试开始在暗室中进行。将大鼠移至暗室中适应30min后开始训练,开始时先将大鼠放入I臂端部,给予灯光信号使之适应60s,然后在另外两臂中任一臂给予灯光信号,示为安全区,操纵电击控制器予以90V,10次/s的电刺激,以大鼠直接逃至安全区为正确反应,否则为错误。待大鼠逃至安全区后灯光继续亮15s再熄灭,结束一次训练。此时该安全区作为一次训练的起步点,如此连续训练15次。记录正确与错误次数,用药前及用药后分

别测试。

1.3.3 单胺类神经递质测定方法 进行学习能力测验完毕后,眼眶取血,3000rpm离心10min,制备血清,按免疫药盒测定皮质醇含量。然后处死动物,断头取脑,并在冰玻璃板上分出皮层(额叶)、海马,放于硫酸纸上称重。将待测部位100mg放入装有3ml预冷的正丁醇中,冰浴条件下制备匀浆。将匀浆倒入带塞离心管中,震荡5min,以3000rpm离心10min,取1.5ml正丁醇上清液,以化学荧光法^[5]进行NE、DA、5-HT及5-HIAA的提取和测定;激发波长EX=397nm,发射波长EM=496nm条件下测量NE、5-HT及5-HIAA;激发波长EX=316nm,发射波长EM=372nm条件下测量DA;狭缝长度slit=5.0nm。

1.4 统计学分析方法 所有的实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,各组之间用 t 检验判断比较差异的显著性。

2 结果

2.1 养寿丹对AD肾虚大鼠学习记忆能力的影响 如表1,大鼠学习记忆行为的变化及成绩以大鼠Y-电迷宫的正确次数计,结果显示:造模前大鼠的学习成绩比较无显著性差异($P > 0.05$);造模后模型组的正确次数明显低于假手术组,有显著性差异($P < 0.01$);与模型组比较,养寿丹两个剂量组正确次数显著升高,其中高剂量组更明显($P < 0.001$),但仍显著低于假手术组($P < 0.05$)。脑复康组的正确反应数也有所增加,有显著性差异;但与假手术组比较仍有显著性差异($P < 0.01$)。

表1 养寿丹对AD大鼠学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	正确反应次数
假手术组	—	11.43 $\pm$ 1.20***
模型组	—	6.85 $\pm$ 1.66
养寿丹高剂量组	18	9.00 $\pm$ 1.23***
养寿丹低剂量组	4.5	8.21 $\pm$ 2.07**
脑复康组	7.0	8.15 $\pm$ 1.16*

注:与模型组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ (下同)。

2.2 养寿丹对AD肾虚大鼠肾上腺重量及血浆皮质醇含量的影响 从表2可以看出,模型组大鼠肾上腺重量及血浆皮质醇含量较假手术组大鼠均明显下降,有显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.001$);给药后养寿丹两个剂量组大鼠肾上腺重量及皮质醇含量均有所增加,而养寿丹高剂量组更明显;脑复康组大鼠皮质醇含量较模型组亦有明显升高($P < 0.05$),但肾上腺重量增加不明显($P > 0.05$)。

表 2 养寿丹对肾上腺重量和皮质醇含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	肾上腺重量 (mg)	皮质醇含量 (nmol/L)
假手术组	—	31.4 ± 7.0***	46.0 ± 10.5**
模型组	—	19.8 ± 1.6	18.3 ± 10.0
养寿丹高低剂量组	18	31.0 ± 7.0***	33.7 ± 10.3**
养寿丹低剂量组	4.5	26.0 ± 5.7**	33.6 ± 6.8*
脑复康组	7	22.4 ± 4.6	31.0 ± 9.4*

2.3 对 AD 大鼠脑组织不同脑区 NE、DA 及 5-HT、5-HIAA 的影响

表 3 养寿丹对大鼠脑组织额叶 NE、DA、5-HT、5-HIAA 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	NE ($\mu\text{g/g}$)	DA ($\mu\text{g/g}$)	5-HT ($\mu\text{g/g}$)	5-HIAA ($\mu\text{g/g}$)
假手术组	0.33 ± 0.02***	0.28 ± 0.02**	1.37 ± 0.27***	1.22 ± 0.09**
模型组	0.23 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.87 ± 0.11	0.97 ± 0.08
养寿丹高剂量组	0.30 ± 0.03**	0.27 ± 0.05**	1.25 ± 0.21**	1.19 ± 0.11**
养寿丹低剂量组	0.28 ± 0.03*	0.24 ± 0.04*	1.18 ± 0.26*	1.11 ± 0.13*
脑复康组	0.26 ± 0.04	0.22 ± 0.02	1.09 ± 0.03*	1.02 ± 0.11*

表 4 养寿丹对大鼠脑组织海马 NE、DA、5-HT、5-HIAA 含量的影响($\mu\text{g/g}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	NE	DA	5-HT	5-HIAA
假手术组	0.45 ± 0.06**	3.23 ± 0.06**	1.67 ± 0.17**	1.63 ± 0.11**
模型组	0.32 ± 0.03	2.66 ± 0.27	1.17 ± 0.24	1.04 ± 0.12
养寿丹高剂量组	0.43 ± 0.03**	3.17 ± 0.37**	1.59 ± 0.20**	1.52 ± 0.18**
养寿丹低剂量组	0.38 ± 0.03*	2.97 ± 0.35*	1.49 ± 0.17*	1.44 ± 0.26*
脑复康组	0.34 ± 0.02	2.89 ± 0.40*	1.45 ± 0.11*	1.33 ± 0.14*

从表 3、表 4 可见,模型组 AD 大鼠额叶、海马 NE、DA 及 5-HT 水平明显下降,与假手术组比较有显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.001$)。养寿丹能明显升高额叶、海马 NE、DA 及水平,与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$),其中以高剂量作用更明显。脑复康组在升高额叶及海马 5-HT、5-HIAA 及海马 DA 水平上与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。

3 讨论

中枢神经递质与 AD 及肾阳虚的关系越来越受到重视。单胺类物质代谢改变,5-HT 系统活性改变与衰老、AD 相关^[6,7],近年来研究发现,NE 活性降

低,能引起与年龄相关的记忆障碍;另外,在 AD 患者存在 5-HT 系统严重损坏,表现为 5-HT 和 5-HIAA 浓度下降,其结合位点减少。

本研究首次采用复合因素制备大鼠 AD“病-证”动物模型(即在 D-半乳糖致亚急性衰老、醋酸氢化可的松致肾阳虚基础上,合并 Meynert 核损毁致 Alzheimer 型痴呆肾阳虚大鼠模型),并从学习记忆、中枢胆碱能神经系统、海马 CA₃ 超微结构改变等多方面对该模型进行了系统的评价,结果证实了该模型更接近 AD 的病理改变,值得进一步研究和推广。

上述研究表明,养寿丹能增加大鼠脑内额叶、海马等重要脑区的 NE、DA、5-HT 的含量,增加肾上腺重量和皮质醇含量,具有明显改善模型大鼠的学习记忆能力的作用。分析其改善学习记忆功能可能与对单胺类神经系统的调节,增强肾上腺皮质功能及改善肾阳虚作用有关。AD“病-证”动物模型病理生化指标的变化与肾虚,以及补肾方剂在改善 AD 病理生化指标与改变肾虚的相关性方面,仍需要进一步研究问题。

参考文献:

- [1] 陈可冀,李春生.新编抗衰老中药学[M].人民卫生出版社,1998.4:153,162.
- [2] Connor D J, Langlais O J, Leon J. Behavioral impairments after lesions of the nucleus basalis by ibotenic acid and quisqualic acid[J]. Brain Res, 1991, 555: 84.
- [3] 秦路平,张家庆,石汉平,等.蛇床子香豆素对肾阳虚模型大鼠腺垂体-肾上腺皮质轴功能的影响[J].中国中西医结合杂志,1997,17(4):228.
- [4] 尹兆宝,王健,周如倩,等.补肾方对老年性痴呆大鼠学习记忆和细胞因子的影响[J].中国老年学杂志,2000,20(1):33-34.
- [5] 李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,1991.173,186.
- [6] 马涤辉,刘晓亮,张昱,等.实验性 Alzheimer 模型鼠脑组织 5-羟色胺含量改变的研究[J].中风与神经疾病杂志,1996,13(3):150-151.
- [7] 张志军,黄欣.中医药治疗老年性痴呆的近况[J].国外医学·中医中药分册,1994,16(4):1-7.