

如意珍宝片对血管性痴呆模型大鼠的保护作用

陈维武^{1#}, 景小龙^{2#}, 刘 静², 田兴美², 申秀萍^{2*}

1. 西藏奇正藏药股份有限公司, 北京 100000

2. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

摘要: **目的** 研究如意珍宝片对血管性痴呆(VD)大鼠的保护作用。**方法** 采用改良双侧颈总动脉永久性结扎法制备大鼠VD模型,以Y迷宫为学习记忆评价指标,并测定VD大鼠脑内多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)、5-羟色胺(5-HT)3种单胺类神经递质水平。**结果** 如意珍宝片能显著的增加Y迷宫的正确次数和提高脑内3种单胺类神经递质水平。**结论** 如意珍宝片能提高VD大鼠学习记忆能力,升高脑内单胺类神经递质水平,从而改善大脑皮层的兴奋性,激活脑损伤后的学习记忆过程。

关键词: 如意珍宝片; 血管性痴呆; 单胺类神经递质; 学习记忆; Y迷宫

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2016)02-0220-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.02.013

Protective effects of Ruyi Zhenbao Tablet on vascular dementia in rats

CHEN Wei-wu¹, JING Xiao-long², LIU Jing², TIAN Xing-mei², SHEN Xiu-ping²

1. Xizang Cheezheng Tibetan Medicine Co., Ltd., Beijing 100000, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research Drug Safety Assessment Co., Ltd., Tianjin 300301, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects of Ruyi Zhenbao Tablet (RZT) on vascular dementia in rats. **Methods** The permanent bilateral common carotid artery ligation method was used to establish the rat model of vascular dementia (VD). The learning and memory abilities were evaluated by Y maze. Besides, the levels of three monoamine neurotransmitters including dopamine (DA), norepinephrine (NE), and 5-hydroxytryptamine (5-HT) within rat brain were also determined. **Results** The correct number of Y maze and the brain levels of three monoamine neurotransmitters can be significantly enhanced in the VD models treated by RZT compared to other controls. **Conclusion** RZT was able to enhance the learning and memory abilities of VD rats and protect the monoamine neurotransmitters, as a result the cerebral cortex excitability of the VD rats was improved and thereafter, the learning and memory procedure was exited in the rats with brain injury.

Key words: Ruyi Zhenbao Tablet; vascular dementia; monoamine neurotransmitters; learning and memory; Y maze

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是指在缺血性、出血性及急慢性缺血缺氧性脑血管疾病引起的脑组织损害基础上,产生的以高级神经认知功能障碍为主的一组临床综合征^[1],随着社会人口老龄化和脑卒中治疗存活率的提高,VD的发病率越来越高,是居于第2位的最常见痴呆^[2]。如意珍宝片是由珍珠母、水牛角、红花、麝香、牛黄、降香、沉香等30味名贵药材制成,具疏通经络、醒脑开窍、改善神经调理的功能^[3]。目前如意珍宝片对VD的

治疗作用尚未见报道,因此本文在这方面进行初步考察,为如意珍宝片的临床应用提供理论基础。

1 材料

1.1 药品和试剂

如意珍宝片(西藏奇正藏药股份有限公司),批号20101113;盐酸多奈哌齐片(卫材药业有限公司,商品名安理申),批号110110A;甲磺酸双氢麦角碱(天津华津制药有限公司,商品名喜得镇),批号9M862T;去甲肾上腺素(中国食品药品检定研究

收稿日期: 2015-09-23

作者简介: 陈维武(1972—),男,博士研究生在读,从事药物研发相关工作。Tel: (010)64942040 E-mail: weiwuchen@126.com

景小龙(1987—),男,助理研究员,从事药理毒理研究工作。Tel: (022)84845247 E-mail: jingxl@tjipr.com

***通信作者** 申秀萍(1964—),女,研究员,从事药理毒理研究工作。Tel: (022)84845247 E-mail: shenxp@tjipr.com

[#]并列第一作者

院), 批号 100169-201103; 多巴胺 (Augsburg), 批号 00714; 五羟色胺 (Sigma), 批号 1001156278; 戊巴比妥钠 (天津市天河化学试剂厂), 批号 100808; 磷酸二氢钾 (天津市化学试剂三厂), 批号 20041208; 甲醇 (天津市康科德科技有限公司), 批号 20111209; 青霉素钠 (哈药集团制药总厂), 批号 101214706; 美托洛尔 (阿斯利康制药有限公司), 批号 1108091。

1.2 动物

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 180~220 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 生产许可证号 SCXK (京) 2006-0009。

1.3 仪器

MG-3 型 Y 迷宫刺激器 (河南省原阳县振华教学仪器厂); 31200 series 高效液相色谱仪 (Agilent Technologies Co.); 413300 型低温离心机 (Thermo science Co.); PB-203 型电子天平 (Mettler-Toledo Group); G&G T2000 型电子天平 (美国双杰兄弟有限公司)。

2 方法

2.1 模型的制备、动物分组及给药

参照任莹^[4]的方法, 实验前大鼠经 MG-3 型 Y 型迷宫训练, 淘汰反应过于迟钝或对电刺激特别敏感的大鼠。随机挑选 10 只大鼠作为假手术组, 其余大鼠采用改良双侧颈总动脉永久性结扎法制作 VD 动物模型。术前 12 h 禁食, ig 美托洛尔 (0.5 mg/kg), 30 min 后 ip 1%戊巴比妥钠 (4.5 mL/kg) 麻醉, 眼眶取血 3 mL。大鼠仰卧固定, 备皮, 消毒, 颈部正中切口, 钝性分离胸骨舌骨肌和胸锁乳突肌后便可见到颈总动脉搏动, 钝性分离双侧颈总动脉, 0 号线结扎其远近心端, 并从中剪断, 缝合切口, 放回笼中保温饲养, 术后及次日注射 1%青霉素钠 4 mL/kg (6.4 万单位/kg), 术后 ig 给予美托洛尔 (0.5 mg/kg) 每日 1 次, 连续给予 1 周, 加强 VD 大鼠脑缺血效果。假手术组大鼠分离颈总动脉后缝合切口。

2.2 动物分组及给药

手术后 2 d, Y 迷宫测试所有存活的手术组大鼠学习记忆能力, 并根据其正确次数随机分为模型组、多奈哌齐组 (0.4 mg/kg)、甲磺酸双氢麦角碱组 (0.5 mg/kg) 及如意珍宝片高、中、低剂量 (生药剂量 1.6、0.8、0.4 g/kg) 组, 每组 10 只。假手术组的 10 只动物同样进行 Y 迷宫测试。分组完毕即开始 ig 给药, 每日 1 次, 连续给药 3 周。

2.3 行为学的检测方法

参照任莹^[4]的方法, 各组大鼠应用 MG-3 型 Y-型迷宫测试其记忆成绩。Y 迷宫由 3 个相同的臂组成, 分别称为 I 臂、II 臂、III 臂。迷宫底铺设直径 0.2 cm, 长 14 cm, 间距 1 cm 的电栅, 可以通电刺激。3 臂顶端各装有 15 W 信号灯, 灯光作为电击的信号, 以训练大鼠辨别灯光刺激及安全方位的能力。实验时其中有一条臂尽头的灯发出亮光, 此时该臂底部电栅无电流通过为安全区, 另两臂的灯不亮, 底部电网通电, 为非安全区。安全区与非安全区随机改变。实验前先将大鼠放入迷宫, 让其自由活动, 适应 5 min, 训练日大鼠在起步区予以电击致其逃至安全区, 灯光持续 10 s, 然后熄灯休息 5 s, 开始下一次操作, 共测试 15 次。次日为测试日, 同训练日操作, 记录 15 次测试中正确反应次数进行统计分析。实验在黑暗、安静环境下进行。规定大鼠受电击后从起步区直接逃至安全区的反应称为“正确反应”, 否则为“错误反应”。

2.4 对 VD 大鼠脑组织 3 种单胺类神经递质水平的影响

2.4.1 脑匀浆样品的制备^[5] 试验结束后大鼠直接断头, 在冰台上剥离出大鼠全脑 (保留大脑及间脑), 称重。每 0.1 g 脑 (湿重) 加入 1 mL 5%高氯酸, 放入玻璃匀浆管内, 冰浴下匀浆。将匀浆液收集于 1.5 mL 离心管中, 于 -4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液进样检测。

2.4.2 色谱条件^[5] ZORBAX Eclipse Plus-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.1 mol/L 的 KH₂PO₄ 缓冲液-甲醇 (9:1); 体积流量 0.7 mL/min; 进样体积 20 μL; 柱温 35 °C, 荧光检测器的激发波长 254 nm, 发射波长 338 nm。

2.4.3 线性范围 采用外标法, 以不同质量浓度的标准液进样测定, 以峰面积为纵坐标, 进样质量浓度为横坐标作图, 计算线性回归方程。结果见表 1。

表 1 NE、DA 和 5-HT 的线性回归方程
Table 1 Linear regression of NE, DA, and 5-HT

递质	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	回归方程	r
NE	500~8 000	$Y=12.94X-0.45$	1.000 0
DA	500~8 000	$Y=12.91X-0.49$	1.000 0
5-HT	1~16	$Y=6.07X-0.001$	1.000 0

2.5 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 软件进行

统计学分析。单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 对数据进行方差分析, 采用 t 检验进行组间比较。

3 结果

3.1 对 VD 大鼠行为学的影响

与假手术组比较, 给药前模型动物正确次数极显著减少 ($P < 0.001$), 表明记忆能力发生障碍, VD 模型制备成功。与模型组比较, 给药 2 周, 多奈哌齐、甲磺酸双氢麦角碱和如意珍宝片高剂量均能显著的提高学习记忆能力 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$),

给药 3 周, 多奈哌齐、甲磺酸双氢麦角碱和如意珍宝片高、中剂量也均能提高学习记忆能力 ($P < 0.05, 0.01$)。结果见表 2。

3.2 对 3 种单胺类神经递质水平的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠脑内 3 种单胺类神经递质 NE、DA、5-HT 水平均极显著降低 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 多奈哌齐、甲磺酸双氢麦角碱和如意珍宝片高、中、低剂量均能极显著提高 3 种单胺类神经递质的水平 ($P < 0.001$)。结果见表 3。

表 2 如意珍宝片对 VD 大鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of RZT on behavior of VD rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/(g·kg ⁻¹)	正确次数/次		
		给药前	给药 2 周	给药 3 周
假手术	—	12.7 ± 1.0	13.0 ± 1.5	14.1 ± 1.1
模型	—	6.0 ± 1.6***	8.3 ± 1.5***	10.4 ± 3.3**
多奈哌齐	4 × 10 ⁻⁴	6.0 ± 1.9	11.6 ± 2.4###	12.9 ± 1.4#
甲磺酸双氢麦角碱	5 × 10 ⁻⁴	6.2 ± 1.8	10.3 ± 3.8	11.8 ± 4.0
如意珍宝片	1.6	6.1 ± 1.8	12.9 ± 1.3###	14.0 ± 1.1##
	0.8	6.0 ± 1.8	8.4 ± 2.0	13.3 ± 2.2#
	0.4	5.9 ± 1.8	9.4 ± 3.6	12.1 ± 2.1

与假手术组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下同

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below

表 3 如意珍宝片对 VD 大鼠脑内 3 种单胺类神经递质水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of RZT on levels of three monoamine neurotransmitters within brain of VD rats ($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	NE/(μg·mL ⁻¹)	DA/(μg·mL ⁻¹)	5-HT/(ng·mL ⁻¹)
假手术	—	8	1.36 ± 0.12	2.83 ± 0.37	2.98 ± 0.23
模型	—	8	1.00 ± 0.02***	2.11 ± 0.03***	2.48 ± 0.07***
多奈哌齐	4 × 10 ⁻⁴	10	1.47 ± 0.04###	2.43 ± 0.02###	3.11 ± 0.07###
甲磺酸双氢麦角碱	5 × 10 ⁻⁴	10	1.72 ± 0.07###	2.63 ± 0.14###	4.21 ± 0.14###
如意珍宝片	1.6	10	1.33 ± 0.04###	2.38 ± 0.08###	4.95 ± 0.14###
	0.8	10	1.62 ± 0.09###	2.56 ± 0.14###	4.23 ± 0.21###
	0.4	10	1.35 ± 0.05###	2.46 ± 0.06###	3.14 ± 0.10###

4 讨论

VD 主要表现为高级神经活动的智能障碍, 特别是认知功能障碍, 包括学习、记忆、思维等障碍, 严重影响患者的生活质量。VD 是迄今为止唯一可以预防的痴呆, 早期治疗具有很好的治疗作用^[6]。

在 VD 的发病过程中, 出现学习记忆障碍的一个重要原因就是由于脑内单胺类神经递质的降低造成。单胺类神经递质是学习记忆形成和保持的重要递质, 主要包括 DA、NE、5-HT 等^[7]。在学习记忆的敏感化过程中, 中间神经元可释放 5-HT, 使中间神经元内的 cAMP 增加, cAMP 是细胞信息传递的

重要第二信使, 进一步可引起运动神经元的兴奋性突触后电位 (EPSP), 活化细胞内效应酶, 使蛋白激酶 A (PKA) 的催化亚单位暴露, 后者可使 K⁺ 通道蛋白磷酸化导致通道关闭, 延长动作电位, 从而促进 Ca²⁺ 内流增加, 使更多的突触囊泡结合于释放部位, 因而有更多的神经递质从感觉神经元释放出来, 运动神经元的兴奋型突触后电位增强从而促进学习记忆^[8]。NE 与中枢学习记忆密切相关, NE 活性降低能引起与年龄有关的记忆障碍。NE 的作用机制可能是调节广泛脑区的突触传入活动, 增大环境中意义的信息传入, 抑制其他刺激传入的干

扰,通过 NE 对信息的筛选功能,提高注意力,蓝斑区的 NE 活动提高大脑皮质的觉醒水平,也有利于信息的记录与保存^[9]。中枢 DA 系统的形成在人类智力起源中有着至关重要的作用,DA 被认为是调节左半球六种优势认知功能(动机、工作记忆、认知适应性、抽象思维、既时分析/排序和生殖力)的关键神经递质,也是人类语言及思维形成的关键所在。对啮齿类、猴及人(包括痴呆患者)的研究发现,边缘系统 DA 转运与认知力缺损、衰老及 AD 均明显相关,年龄因素显著影响边缘系统 DA 的生物合成、水平、代谢和受体数量^[10]。

如意珍宝片由珍珠母、水牛角、红花、麝香、牛黄、降香、沉香等 30 味中药组成,方中珍珠母、决明子、香旱芹平肝清热祛风;檀香、沉香、黄栀子理气健脾和胃;红花、乳香、降香活血化瘀以通血脉;豆蔻、肉豆蔻、高良姜、荜茇、草果、毛诃子、石灰华散寒利湿止痛;人工牛黄、人工麝香、黑种草子、藏木香开窍辟秽醒神;金礞石、诃子敛肺涩肺下气;余甘子、螃蟹清热祛风化痰;甘草膏调和诸药。因此如意珍宝片具有明显的疏通经络,醒脑开窍,改善神经调理的功能,诸药合用可改善脑的血供和氧供,改善脑缺血引起的功能障碍^[3]。

本实验结果表明,如意珍宝片能显著的增加 Y 迷宫的正确次数和提高 3 种单胺类神经递质水平,说明如意珍宝片能提高 VD 大鼠学习记忆能力,对脑内单胺类神经递质具有保护作用,从而改善大脑皮层的兴奋性,激活脑损伤后的学习记忆过程。

参考文献

- [1] Paul R H, Cohen R A, Moser D J, *et al.* Clinical correlates of cognitive decline in vascular dementia [J]. *Cogn Behav Neurol*, 2003, 16(1): 40-46.
- [2] 魏 瑞,何明大,刘石梅. 步长脑心通对改善血管性痴呆模型大鼠学习记忆行为的作用 [J]. 医学临床研究, 2007, 24(1): 17-18.
- [3] 顾林娟,张建军. 如意珍宝片对脑缺血大鼠后遗症的改善作用 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(6): 1288-1230.
- [4] 任 莹,刘 静,景小龙,等. 醒脑再造胶囊对血管性痴呆模型大鼠的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 242-245.
- [5] 田津斌,方 明,刘雪松,等. 大鼠脑脊液、脊髓灌流液和脊髓背部单胺类神经递质及其代谢产物的含量比较 [J]. 北京医科大学学报, 1998, 30(1): 5-8.
- [6] Martinez V E, Murie F M, Gallego P L. Neuroprotection in vascular dementia [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2006, 21(2): 106-117.
- [7] 蒋国军,伊 佳,邹丽华,等. 原花青素抗小鼠实验性血管性痴呆的研究 [J]. 解放军药科学, 2009, 25(5): 379-382.
- [8] 谭永霞,李 玲,陈景藻. 次声对大鼠学习记忆行为及海马和颞叶皮层 5-HT、5-HTR 的影响 [J]. 中国行为医学科学, 2004, 13(1): 17-19.
- [9] 鲍秀琦. 调心滋肾中药组方调治老年性痴呆的研究 [D]. 天津: 天津医科大学. 2002.
- [10] 侯海龙,陈晓蓉,胡祥友,等. 痴呆模型大鼠中脑腹侧被盖区多巴胺能神经元的形态学改变 [J]. 安徽医科大学学报, 2002, 37(6): 432-435.