

表 3 地黄对缺氧肾线粒体呼吸功能的保护作用 (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	ST ₃ (nmol/m in·mg)	ST ₄	RCI
正常对照	-	233 ± 20	61 ± 11	3.9 ± 0.7
模型对照	-	117 ± 26* [#]	53 ± 9	2.2 ± 0.3* [#]
Bep	5 × 10 ⁻³	280 ± 96 [#]	71 ± 24 [#]	3.1 ± 0.8 [#]
Reh	2	197 ± 41 [#]	61 ± 8	3.3 ± 0.9 [#]
	4	231 ± 60 [#]	67 ± 14	3.5 ± 0.6 [#]

与正常对照组相比: ** P < 0.01

与模型对照组相比: # P < 0.05 ## P < 0.01

线粒体是细胞产能和储存能量的细胞器,是细胞进行生物氧化反应的主要场所,因其结构及功能特点,线粒体对缺氧及其敏感。缺血缺氧时,线粒体内氧自由基活力异常增高,致使内膜通透性改变,酶活力下降,电子传递系统受损^[2,3]。有氧代谢功能障碍,高能化合物生成减少,细胞因能量缺乏而不能维持正常功能及周围环境的稳定,进而诱发细胞损害。最新研究显示,线粒体在细胞损伤及凋亡、坏死的发生机制中有着非常重要的意义^[4,5]。因此,保护线粒体结构及活力,已成为研究药物抗缺血、缺氧作用的

重要指标。本实验采用器官断流 15 min 造缺氧模型,操作简单,条件易控,动物的饮食状态及体内神经、血流等系统的影响均可减到最小。在此模型上,心、脑、肾组织的线粒体最大呼吸速率(ST₃受到损害,预先给予地黄浸膏,可有效保护缺氧而致的线粒体功能下降,能量供应系统受损较小。中医传统理论认为,地黄性味甘苦,凉,归心肝肾经,滋阴退热,养血,为滋补肝肾要药。本实验结果显示,地黄浸膏有明显的肾缺血保护作用,与中医的传统用法相符。参考文献:

[1] 汤依群,戴德哉,赵健,等. 氯苯四氢小檗碱对小鼠大脑线粒体的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1996, 10(1): 31-33.
 [2] Jeniugs R B, Moore C B, Shen A C, et al. Electrolytes of damaged myocardial mitochondria [J]. Proc Soc Exp Bio Med, 1970, 135(2): 515-522.
 [3] 张桦,焦选茂,刘树森,等. 缺血/再灌注对大鼠心肌线粒体电子传递与质子泵出偶联的影响[J]. 中国病理生理学杂志, 1993, 9(5): 561-564.
 [4] Koremer G, Zamzami N, Susin S A. Mitochondria control of apoptosis [J]. Immunol Today, 1997, 18(1): 44-51.
 [5] 钱令嘉,弓景波,程素琦. 热应激心肌细胞损伤的线粒体机制探讨[J]. 中国应用生理学杂志, 2001, 16(2): 133-135.

补肾益智方对老年性痴呆模型动物定位航行学习记忆功能的改善作用

张魁华¹, 赖世隆², 王奇², 程淑意², 陈云波^{2*}

(1. 广州军区军事医学研究所, 广东 广州 510507; 2. 广州中医药大学 DME 中心, 广东 广州 510507)

摘要: 目的 观察补肾益智方改善老年性痴呆(AD)模型大鼠定位航行学习记忆功能的作用强度。方法 用 15 月龄老年 Wistar 大鼠 80 只, ip D-半乳糖 4 周加上鹅膏蕈氨酸(ibtogenic acid, IBO) 脑内 Meynert 核注射制造 AD 模型, 随机分成 AD 模型组, 双益平治疗对照组, 补肾益智方高、低剂量治疗组, 正常老年组和正常青年组。动物经治疗处理 4 周后, 应用 Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆的改善情况。结果 模型组 5 d 的平均定位航行试验逃避潜伏期比正常(青年、老年)组明显延长(P < 0.05), 与模型组比较, 正常青年组、正常老年组、补肾益智方高剂量组明显缩短(P < 0.05), 而补肾益智方低剂量组、双益平对照组缩短差异不显著(P > 0.05); 随着行为训练的进行, 各组逃避潜伏期都有一定程度的下降, 但模型组的逃避潜伏期下降速率要慢于其它组, 表明模型组学习记忆能力较差, 而正常青年组、正常老年组、补肾益智方高剂量组逃避潜伏期下降的速率较快, 其次是补肾益智方低剂量组和双益平组。经每日两两比较发现: 正常青年组、正常老年组、补肾益智方高剂量组与模型组在第 2、3、4 天有显著性差异(P < 0.05 或 P < 0.01); 而补肾益智方低剂量组和双益平组虽然有差异, 但无统计学意义(P > 0.05)。结论 补肾益智方能明显改善 AD 大鼠定位航行学习记忆功能。

关键词: 补肾益智方; 老年性痴呆; 学习记忆功能; 定位航行

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)10-0917-04

Improving effects of BUSHEN YIZHI RECIPE* on orientation sail learning and memory in model rat with Alzheimer's disease

ZHANG Kui-hua¹, LAI Shi-long², WANG Qi², CHENG Shu-yi², CHEN Yun-bo²

* 收稿日期: 2002-03-15

基金项目: "九五"国家攻关课题(No. 96-906-09-02); 科技部博士创新课题(No. 98-B-13)

作者简介: 张魁华(1966-, 男, 副研究员, 医学博士(后); 主要从事(中药)抗衰老和老年性痴呆的药理学与毒理学研究及其新药开发。

(1. Guangzhou Military Medical Institute, Guangzhou Military Region, Guangzhou 510507, China;

2. DME Center, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510507, China

Key words: BUSHEN YIZHI RECIPE; Alzheimer's disease; learning and memory function; orientation sail

* BUSHEN YIZHI RECIPE consists of *Fructus Cnidii*, *Fructus Lycii*, *Fructus Ligustri Lucidi*, etc.

老年性痴呆 (AD) 是一种老年人神经系统进行性、退变性疾病, 临床上主要有记忆、理解、判断及定向等认知功能障碍, 精神行为异常, 智力降低及生活能力减退等表现。自 Alois Alzheimer 于 1907 年发表第一例临床病理报告以来, 已有 90 多年的研究历史, 但病因至今仍不完全清楚^[1]。根据各方面资料表明, 其发病与遗传、环境、代谢诸因素有关。AD 的发病率及死亡率仅次于肿瘤、心脏病和脑卒中而位居第四, 因此, 已经成为当今医学界研究的新领域, 同时也是一个严峻的社会学热点问题^[2]。由于其病因和发病机制尚不清楚, 给临床治疗带来许多困难; 目前在临床上多采用胆碱能替代疗法、钙通道阻断剂和神经营养因子等治疗, 但都不令人满意, 且副作用大^[3,4]。因此, 国内外学者认为, 企图用单一因素治疗 AD 可能性不大, 必须采取多因素多靶点的综合治疗措施。中药复方则是从多方位多靶点—整体调节调理机体的机能状态, 具有其独特的治疗优势, 开发中药复方新药对治疗 AD 具有广泛的前景。本研究室以前的研究工作证明补肾益智方对 D-半乳糖致亚急性衰老合并鹅膏蕈酸 (IBO 损伤 Meynert 基底核的 AD 模型大鼠学习记忆有改善作用^[5-7]。本试验应用中国科学院心理研究所开发的大鼠行为学软件系统从多个方面观察补肾益智方对 D-半乳糖致亚急性衰老合并鹅膏蕈酸 (IBO 损伤 Meynert 基底核的 AD 模型大鼠定位航行学习记忆改善作用, 并对其强度进行定量分析。

1 材料和方法

1.1 动物: 15 月龄初老年雄性 Wistar 大鼠 100 只, 体重 450~500 g, 5 月龄青年雄性 Wistar 大鼠 10 只, 体重 200~250 g; 均由广州中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂: 补肾益智方由蛇床子、枸杞子、女贞子、首乌、丹参等组成, 经提取制成浓缩液。双益平片购自上海红旗制药厂 (批号为 99010, 每片含石杉碱甲 (Hup-A) 0.05 mg。D-半乳糖 (上海试剂二厂, IBO (Sigma 公司)。

1.3 造模、分组与给药: 用 80 只 Wistar 大鼠 ip D-半乳糖 (48 mg/kg·d) 4 周后, 脑内双侧 Meynert

核注射 IBO 造成 AD 模型。设 AD 模型组、双益平片治疗对照组, 补肾益智方高、低剂量治疗组, ig 补肾益智方浓缩液, 相当生药量 12.6 g/kg·d, 共 6 周; 10 只老年正常对照组, ip 生理盐水 6 周后, 脑内 Meynert 核注射生理盐水; 10 只正常青年对照组。所有动物经过处理后灌流取脑。取脑前, 各组大鼠分别存活 6, 8, 8, 8 和 10 只。

1.4 水迷宫的组成: 由圆形水池、无色平台和记录系统三部分组成。水池直径 120 cm, 高 50 cm, 水深 30 cm; 水池内壁涂成乳白色, 水温保持在 22~26℃; 水池放在一间小屋的中央。池壁上随意挂两个物体作为近距离视觉暗示, 室内的门、窗、柜组、摄象头等构成远距离视觉暗示。平台由透明的有机玻璃做成, 圆形, 直径 5 cm, 高 28 cm, 没于水下 2 cm, 上面有几个小孔以提供一个大鼠容易站稳的表面。

1.5 定位航行试验 (place navigation: 试验前 1 d 将大鼠放入水池中 (不放入平台) 自由游泳 2 min, 使其熟悉迷宫内的环境。试验历时 5 d, 每天分上、下午两个时间段, 每个时间段测试 4 次, 每天共 8 次。测试开始时, 将平台放在近端的象限中点, 沿水池的四个象限中部的池壁将大鼠轻巧地放入水池, 自动摄象系统记录大鼠寻找平台的时间 (逃避潜伏期) 和游泳途径 (过程), 电脑自动记录上述数据; 设定 60 s 为最长逃避潜伏期, 60 s 后自动停止记录。

1.6 统计方法: 所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS6.12 统计软件包分别进行方差分析。

2 结果

2.1 对大鼠定位航行试验逃避潜伏期的影响: 模型组 5 d 的平均定位航行试验逃避潜伏期比正常 (青年、老年) 组明显延长 ($P < 0.05$; 与模型组比较, 正常青年组、正常老年组、补肾益智方高剂量组 5 d 的平均定位航行试验逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$, 而补肾益智方低剂量组、双益平对照组 5 天的平均定位航行试验逃避潜伏期缩短差异不显著 ($P > 0.05$, 见表 1)。

2.2 对大鼠定位航行试验游泳距离的影响: 与模型组比较正常青年组、正常老年组 5 d 的平均游泳距离明显缩短 ($P < 0.05$, 而补肾益智方 (高、低剂量

组、双益平组 5 d 的平均游泳距离缩短的差异不显著 ($P > 0.05$, 见表 2)。

表 1 各组大鼠定位航行试验逃避潜伏期的平均值

组别	n	平均潜伏期 (s)
正常青年组	10	34.17 ± 20.76*
正常老年组	8	35.89 ± 22.67*
补肾方高剂量组	8	34.98 ± 22.05*
补肾方低剂量组	7	42.37 ± 21.39
双益平对照组	8	42.97 ± 21.76
AD 模型组	6	47.10 ± 19.91

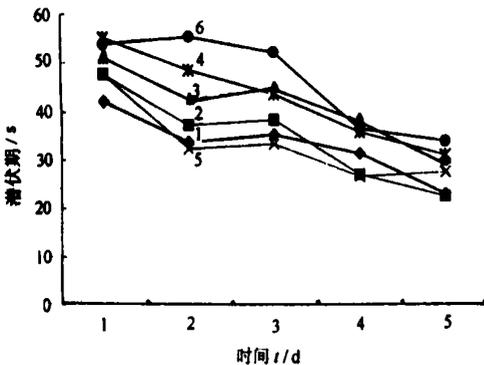
与模型组比较: * $P < 0.05$; 与正常老年组比较: $P < 0.05$

表 2 各组大鼠定位航行试验 5 d 的平均游泳距离

组别	n	平均游泳距离 (cm)
正常青年组	10	605.60 ± 372.31*
正常老年组	8	664.15 ± 402.60*
补肾方高剂量组	8	723.20 ± 451.73
补肾方低剂量组	7	813.27 ± 429.44
双益平对照组	8	860.77 ± 453.14
AD 模型组	6	974.87 ± 438.09

与模型组比较: * $P < 0.05$

2.3 各组大鼠每天平均逃避潜伏期的变化情况: 随着行为训练的进行, 各组逃避潜伏期都有一定程度的下降, 但模型组的逃避潜伏期下降速率要慢于其他组, 表明模型组学习记忆能力较差, 而正常青年组、正常老年组、补肾益智方高剂量组逃避潜伏期下降的速率较快, 其次是补肾益智方低剂量组和双益平组。经每日两两比较发现: 正常青年组、正常老年组、补肾益智方高剂量组与模型组在第 2, 3, 4 天有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而补肾益智方低剂量组和双益平组虽然有差异, 但无统计学意义 ($P > 0.05$, 见图 1)。

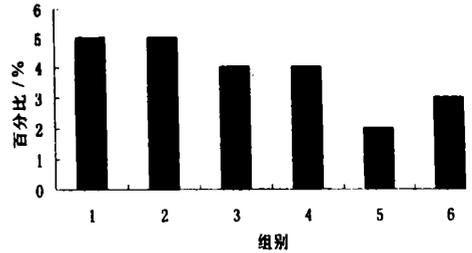


1-正常青年组; 2-正常老年组; 3-补肾方低剂量组; 4-补肾方高剂量组; 5-双益平组; 6-AD 模型组

图 1 各组大鼠 5 d 逃避潜伏期的变化曲线

2.4 各组大鼠 5 天游泳直线式的策略(即大鼠直线游向平台的概率)的情况: 从图 2 中可以看到正常青年组和正常老年组的游泳直线式的策略达到 5% 左右, 补肾益智方高、低剂量组为 4.5%, 而双益平

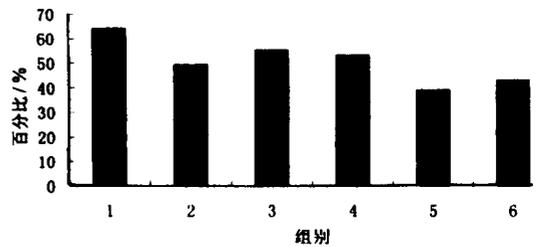
组只有 2.5%, 模型组 3.5%; 说明各组间进行直线式游泳的策略是有区别的, 这从一个方面反映各组大鼠进行定位航行的记忆功能的差别; 补肾益智方高、低剂量组要好于模型组和双益平组, 差于正常青年组和正常老年组。



1-正常青年组; 2-正常老年组; 3-补肾方高剂量组; 4-补肾方低剂量组; 5-双益平组; 6-AD 模型组

图 2 各组大鼠 5 d 游泳直线式的策略直方图

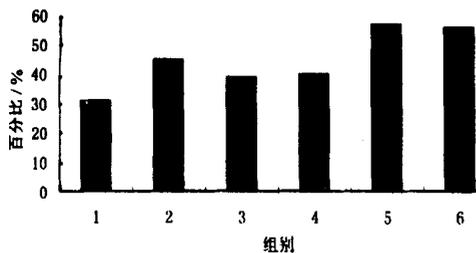
2.5 各组大鼠 5 d 游泳趋向式策略(即大鼠有目的地游向平台的概率)的情况: 从图 3 中可以看到正常青年组游泳趋向式的策略高达 65%, 正常老年组为 50%, 补肾益智方高、低剂量组为 55% 左右, 而双益平组则为 40%, 模型组为 43% 左右; 说明各组大鼠在定位航行时寻找平台的趋向式的策略是有较大区别的, 这也是从一个侧面反映大鼠的学习记忆功能情况, 补肾益智方高、低剂量组要好于模型组和双益平组, 甚至好于正常老年组, 而略低于正常青年组。



1-正常青年组; 2-正常老年组; 3-补肾方高剂量组; 4-补肾方低剂量组; 5-双益平组; 6-AD 模型组

图 3 各组大鼠 5 d 游泳趋向式的策略的直方图

2.6 各组大鼠 5 d 游泳随机式的策略(即大鼠无目的地游向平台的概率)的情况: 从图 4 中可以看到正常青年组游泳随机式的策略只有 30%, 正常老年组为 42% 左右, 补肾益智方高、低剂量组为 40%, 而双益平组和模型组则为 55% 左右; 说明它们在定位航行试验中随机游泳的形式有区别, 这从有意地找平台的侧面反映各组大鼠的学习记忆情况; 补肾益智方高、低剂量组要好于模型组和双益平组, 甚至好于正常老年组织, 但与正常青年组比较还是要差些。



1-正常青年组; 2-正常老年组; 3-补肾方高剂量组;
4-补肾方低剂量组; 5-双益平组; 6-AD 模型组

图 4 各组大鼠 5 天游泳随机式的策略的直方图

4 讨论

每一种习得性行为都包括着某种学习和记忆过程,但不是每种类型的学习和记忆过程都可以在任意一种行为模型上来进行研究的,实验者必须恰当地选择适合于自己所研究课题的行为模型,而对行为模型内涵的深入了解应是选择模型的依据。水迷宫是 Morris 报道的^[8]。训练开始时把动物放在盛水的圆盆内,为逃避水淹动物就需要寻找平台,平台略低于水面。Morris 的水迷宫行为模型是一种空间记忆的模型,与海马的学习记忆功能有关。近年来常利用这种模型来研究海马的记忆功能。观察的指标主要是计算动物找到平台所需要的时间(或称潜伏期)以及动物游泳的轨迹,并计算动物游动通过平台所在象限的次数和时间。这种水迷宫方法常用于研究大鼠的空间记忆能力。

记忆是复杂的生理过程,在多重记忆系统中不同记忆系统有着不同的机能定位、神经环路、递质系统和分子生物学机制。AD 患者的临床表现为智力减退、近期记忆缺损;病理变化主要是海马结构及边缘系统的胆碱能神经系统变性丢失,相关神经递质代谢减退。因此我们研究所采用的 D-半乳糖致亚急性衰老合并 IBO 损毁 Meynert 核制作的 AD 复合模型,其多因素的复合模型设计可能更接近 AFD 病理变化的复杂特征。AD 复合模型大鼠表现出明显的学习记忆障碍和多种神经系统的病理变化^[9, 10]。因此,我们所选择的 AD 模型是能比较好地反映其病理特征。我们所选择的 Morris 水迷宫来观察检测 AD 模型及治疗效果是符合学习记忆的神经理生化原理和 AD 的病理特征。

中医学认为 AD 等疾病的主要病机为肾虚髓亏、脑脉失养。补肾益智方就是针对 AD 肾精不足、气血亏虚的病机而设计的组方;全方具补肾填精、益气养血、开窍醒神等功效,临床试用于 AD 病人已显示了较好的疗效。为了进一步明确补肾益智方改

善 AD 学习记忆功能的作用强度和作用环节,本实验在以往采用 Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆能力的基础上,引用中国科学院心理学研究所研制开发的水迷宫实验软件系统,形成较为系统全面的学习记忆功能检测方案。试验结果发现:模型组大鼠在 Morris 水迷宫检测中 5 d 的逃避潜伏期明显延长、原平台象限游泳时间显著缩短、随机式游泳的策略明显增加,而趋向式游泳的策略和直线式游泳的策略明显减少,盲目地游泳经历明显增加;说明模型组大鼠的学习记忆能力受到较严重的损伤。补肾益智方高、低剂量治疗组大鼠在 Morris 水迷宫的上述各项检测指标都明显优于模型组,并表现为高剂量组要略好于低剂量组的趋势;表明补肾益智方对 D-半乳糖加速衰老加上 IBO Meynert 核损毁的 AD 模型大鼠的学习记忆功能有明显的改善作用。试验结果还显示:补肾益智方高、低治疗剂量组对 AD 大鼠学习记忆的改善作用与正常青年组和正常老年组还有一定的差距;说明补肾益智方只能部分改善 AD 的学习记忆障碍,而不能全愈;这也与临床表现相类似。

参考文献:

- [1] Comings J L, Benson D F. Dementia-A clinical approach [M]. Boston: Butterworths, 1983.
- [2] 陈可冀. 跨世纪脑科学老年性痴呆发病机理与诊治[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [3] Hohmann C, Antuono P, Coyle J T. Basal forebrain cholinergic neurons and Alzheimer's disease. Handbook of Psychopharmacology of the Aging Nervous System [M]. New York: Plenum, 1993.
- [4] Geula C, Mesulam M M. Cholinergic system and related neuropathological predilection patterns in Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease [M]. New York: Raven, 1994.
- [5] 林水森. 中药药理与临床研究进展(第四册[M]). 北京:军事医学科学出版社, 1996.
- [6] 赖世隆,胡镜清,王奇,等. 补肾益智方对老年性痴呆大鼠学习记忆保护作用的观察[J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(2): 106-108.
- [7] 赖世隆,饶燕,高洁等. 补肾益智改善 Alzheimer 病模型大鼠的学习记忆能力[J]. 中药新药与临床药理, 2000, 11(6): 337-339.
- [8] Morris R G M, Garrud P, Rawlins T N P, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesion [J]. Nature, 1982, 297(24): 681-683.
- [9] 饶燕,赖世隆,胡镜清,等. 补肾益智方对老年性痴呆大鼠突触长时程增强的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(2): 109-112.
- [10] 胡镜清,赖世隆,王奇,等. 补肾益智方对老年性痴呆大鼠突触病理性重构的研究[J]. 广州中医药大学学报, 2000, 17(2): 113-116.