

· 论 著 ·

交泰丸对血管性痴呆模型大鼠学习记忆能力及脑组织胆碱能机制的影响

胡玉英,刘 泰,张青萍,以 敏,何乾超,梁 妮
(广西中医学院第一附属医院神经内科,南宁 530023)

摘 要:目的 研究交泰丸对血管性痴呆(VD)大鼠学习记忆及脑组织胆碱能机制的影响,探讨其对 VD 治疗的作用及机制。
方法 采用线栓法制备 VD 大鼠模型,MG-2Y 迷宫进行行为学测试,羟胺比色法测定脑组织乙酰胆碱(Ach)含量,分光光度法测定脑组织乙酰胆碱酯酶(AchE)活性,HE 染色观察海马区病理变化。**结果** 模型对照组大鼠学习记忆能力明显劣于假手术组,Ach 含量降低,AchE 活性升高,海马区病理改变严重;交泰丸治疗后,尤其是高剂量交泰丸组,学习记忆能力明显提高,Ach 含量升高,AchE 活性降低,海马区病理变化明显改善。**结论** 交泰丸对 VD 大鼠学习记忆能力下降有明显的保护作用,其作用机制可能与抑制 AchE 活性,提高 Ach 含量,修复及保护缺血再灌注 VD 大鼠海马区神经元密切相关。
关键词:交泰丸;痴呆,血管性;乙酰胆碱;乙酰胆碱酯酶;学习记忆
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.03.001 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2012)03-0209-02

The effects of Jiaotai pill on vascular dementia rat model of learning and memory ability and brain cholinergic mechanisms

Hu Yuying, Liu Tai, Zhang Qingping, Yi Ming, He Qianchao, Liang Ni

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical College, Nanning, Guangxi 530023, China)

Abstract: **Objective** Research the impact of Jiaotai pill on the ability of learning, memory and the mechanism of brain cholinergic. Discuss the function and mechanism of Jiaotai pill for VD therapy. **Methods** Use the intraluminal method of Gong Biao to prepare the model of VD rats. MG-2Y maze did the test of behavior science. Use Hydroxylamine colorimetric method to examine the content of Ach in brain. Use the spectrophotometric method to examine the activity of AchE in brain. After HE staining, observed the changes of Hippocampus pathological. **Results** Learning and memory ability of model control group rats obviously was inferior to surgery group, Ach proportion reduced, AchE activity rised, and pathological changes in hippocampus were serious. After Jiaotai pill treatment, especially group of the used high Jiaotai pill, the ability of learning and memory obviously increased, Ach proportion increases, AchE activity reduced, Hippocampus pathological changes obviously improved. **Conclusion** Jiaotai pill can protect the activity of learning and memory for VD rats clearly. The effect mechanism may be closely connect with restraining the activity of AchE, increasing the content of Ach, restoration and protection in neurons in hippocampus of rats with ischemia reperfusion VD.
Key words: jiaotai pill; dementia, vascular; acetylcholine; acetylcholinesterase; learning and memory

交泰丸源于《韩氏医通》,方名出自清朝王士雄《四科简效方》:“生川连五钱,肉桂心五分,研细,白蜜丸,空心淡盐汤下,治心肾不交,怔忡无寐,名交泰丸”。是中医著名常用方剂,黄连苦寒入心,清降心火以下交肾水;肉桂辛热入肾,温升肾水以上济心火,临床上目前主要用于治疗心肾不交所致失眠、心律不齐等症^[1-2]。近年来该方的应用范围不断拓展,本项目课题组在临床中已运用交泰丸治疗血管性痴呆(vascular dementia, VD)多年并取得满意疗效,但其确切的作用机理并不十分清楚。本研究采用龚彪等^[3]制备方法进行制备大脑中动脉(MCA)阻塞后再灌注 VD 大鼠模型,采用 MG-2Y 迷宫测试法观察交泰丸对 VD 大鼠学习记忆、脑组织乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)含量及乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE)活性变化、海马组织病理学改变的影响,探讨该方改善 VD 大鼠学习记忆的作用机制。

1 材料与方

1.1 材料

(1)动物:健康清洁级 SD 大鼠,雌雄兼用,体质量 250~300 g,由广西医科大学实验动物中心提供。(2)药物:交泰丸由黄连、肉桂(黄连:肉桂=10:1)组成,其有效部位群总提取物,由广西中医学院中药化学教研室提供,为棕黄色粉末,人日用量 0.02 g/kg,临床成人日用生药量为 16.5 g;喜得镇片(批准文号:国药准字 H1010054,产品批号:050177),天津华津制药厂和瑞士诺华制药有限公司合作生产产品,每片 1 mg,成人日用量 3~6 mg。以上药品实验前用蒸馏水配制成溶液,

4℃冰箱保存。(3)主要试剂:乙酰胆碱酯酶试剂盒、乙酰胆碱碘化物购自 Sigma 公司,其他试剂均为市售、分析纯。(4)主要仪器:F-2500 荧光分光光度计(日本日立公司),MG-2Y 型迷宫(三兴声电公司),台式低温离心机(日本 SYNYO 公司),冰冻切片机(德国),HM-200 型电子天平(日本)。

1.2 方法

1.2.1 动物筛选

大鼠适应性喂养 1 周后进行 Y 型迷宫训练 1 d。将大鼠置起步区适应环境 3 min,通电(40 V),I 臂为起点,II 臂为安全区(亮灯),若大鼠从起步区直接逃 III 区,为正确反应,而逃往 III 区或仍在 I 区徘徊,则为错误。当大鼠逃至安全区后,休息 1 min,然后进行下一次测试,起点和安全区变换,按 I→II→III→I 的顺序,依次重复,连续测 30 次,以连续 10 次中有 9 次正确反应为学会标准,筛选出达到学会标准的大鼠 120 只。

1.2.2 模型复制与分组

参照龚彪等^[1]线栓法模型制备方法进行制备 MCA 阻塞后再灌注 VD 大鼠模型。将模型组大鼠随机分为 5 组,即模型对照组,低、中、高剂量交泰丸组,喜得镇组,另设假手术组,麻醉和手术过程与模型组相同,但不阻断 MCA。模型复制大鼠第 4 天按神经病学评分标准筛选合格的 VD 大鼠^[4]。各组在手术造模后第 2 天给药,假手术组、模型对照组均予灌胃生理盐水 10 mL/kg,每日 1 次;低、中、高剂量交泰丸组分别予灌胃交泰丸 0.5、1、2 g·kg⁻¹·d⁻¹,喜得镇组予灌胃喜得镇 0.6 mg·kg⁻¹·d⁻¹,连续灌药 30 d。除去不

合格及死亡的动物,最后每组 16 只大鼠进行实验。

1.3 观察方法 (1)行为学检测:手术后第 29 天采用 Y 型迷宫测试,观察大鼠学习能力。实验方法同前,以其测试时达到连续 10 次中有 9 次正确反应所需的电击次数来表示大鼠认知功能的优劣,观测每只大鼠连续达到 9/10 标准的正确反应次数作为学习能力的指标。训练 1 d,24 h 后,以上述方法测试大鼠记忆能力。若记忆再现实验(30 d)的正确次数比学习实验(29 d)的多,说明被测定大鼠有记忆能力,反之,则表明记忆力下降或缺损。(2)脑组织 Ach 含量及 AchE 活性测定:迷宫测试结束后,每组取 8 只大鼠断头取脑,弃去嗅球和小脑,快速称质量后,加入预冷的生理盐水制成 10% 的匀浆液,4 ℃ 条件下 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液测定 Ach 含量及 AchE 活性。Ach 含量采用羟胺比色法测定,参考蔺心敬等^[5]方法用平行法计算 Ach 含量。AchE 活性测定采用分光光度法,蛋白含量测定采用考马斯亮兰法。具体操作按试剂盒说明书进行。(3)海马区病理改变的观察:每组另取 8 只大鼠断头取脑,放入预冷的生理盐水中,去除脑膜和血管,取视交叉至乳头体之间大脑,用冰冻切片机连续冠状切片,片厚约 5 μm,于-20 ℃ 保存,用 HE 染色,光镜下观察海马细胞形态学改变。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件对所得数据进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 学习记忆能力 与假手术组比较,模型对照组大鼠 Y 型迷宫正确次数明显减少($P < 0.01$),表明模型对照组大鼠学习记忆障碍;低、中、高剂量交泰丸组及喜得镇组与模型对照组比较,正确次数有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明各治疗组大鼠学习记忆能力均优于模型对照组,见表 1。

表 1 各组大鼠 Y 型迷宫实验正确次数比较($\bar{x} \pm s$,次)

组别	学习成绩第 29 天	记忆成绩第 30 天
假手术组	17.6±2.6	19.4±1.7
模型对照组	10.0±1.5▲	9.0±1.2▲
低剂量交泰丸组	12.1±1.8△	14.3±1.4△
中剂量交泰丸组	12.3±1.7△	14.6±1.5△
高剂量交泰丸组	15.5±1.3◆	17.4±1.7◆
喜得镇组	13.4±1.7△	15.3±1.2△

▲: $P < 0.01$,与假手术组比较;△: $P < 0.05$,◆: $P < 0.01$,与模型对照组比较。

表 2 大鼠脑组织 Ach 及 AchE 活性含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	ACh 含量(μg/g)	AChE(mol·h ⁻¹ ·g ⁻¹)
假手术组	4.17±0.15	350.26±46.50
模型对照组	1.61±0.37▲	501.54±30.29▲
低剂量交泰丸组	2.27±0.05△	420.06±29.71△
中剂量交泰丸组	2.55±0.15△	395.89±30.23△
高剂量交泰丸组	3.60±0.43◆	389.51±29.80◆
喜得镇组	3.31±0.17△	392.36±28.39△

▲: $P < 0.01$,与假手术组比较;△: $P < 0.05$,◆: $P < 0.01$,与模型对照组比较。

2.2 Ach 含量及 AchE 活性 模型对照组 Ach 含量明显降低,AchE 明显升高,与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);低、中、高剂量交泰丸组及喜得镇组 Ach 含量均升高,AchE 均降低,与模型对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表 2。

2.3 海马区病理变化 各组大鼠海马区 HE 染色后光镜下观察,可见假手术组海马区神经元排列整齐密集,形态正常(封 2 图 1);模型对照组海马区神经元排列紊乱,出现核固缩,胶质细胞增生明显,神经细胞数量明显减少(封 2 图 2);各治疗组海马区病理变化与模型对照组比较均有不同程度的改善(封 2 图 3~6)。

3 讨 论

VD 是各种脑血管疾病导致的脑功能障碍而产生的获得性智能损害综合征,是一种慢性进行性疾病,是危及老年人生活质量及寿命的最常见的疾患之一^[6]。随着社会人口的老龄化,VD 患病率呈上升趋势。研究表明,大于 65 岁人群中 VD 患病率,男 1.4%,女 1.2%,总患病率 1.3%^[7]。VD 患者的逐年增多,给家庭、社会造成严重负担^[8]。而 VD 若早期积极治疗干预则具有可逆性,故又称之为可治性痴呆。本课题组临床应用表明,交泰丸对 VD 患者具有改善脑功能状态、恢复智能的疗效。本实验显示,VD 大鼠迷宫测试出现明显的空间辨别学习记忆障碍,Y 迷宫正确次数明显减少,提示学习记忆能力下降;各交泰丸组正确次数明显增多,提示该药方能显著改善 VD 大鼠学习记忆能力及提高其智能。

喜得镇是 20 世纪 80 年代以来广泛应用于临床的经典促智药,是作用于多种神经递质系统的代谢增强剂^[9],临床研究表明,它具有改善 VD 患者智能的作用^[10],故本实验选其作为阳性对照药。本实验测定脑组织 Ach 含量及 AchE 活性,其结果显示,模型对照组大鼠的 Ach 含量降低,AchE 活性增加,与假手术组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),提示脑缺血时胆碱能神经元蜕变,AchE 释放过多,分解 Ach 增强,导致 Ach 含量降低促进痴呆发生,因此,通过抑制 AchE 活性,提高 Ach 含量有利于改善 VD 症状。现代医学研究认为,VD 发生常与大脑皮层病变,尤其是左侧大脑皮层及丘脑、海马的缺血缺氧密切相关。故有学者认为改善微循环、增加脑血流量的药物可能具有改善认知功能的作用^[11]。脑缺血后,引起与记忆有关的神经递质如 Ach、儿茶酚胺、NA、5-HT 等减少,中枢胆碱能系统明显受损,目前已有证据表明中枢胆碱能系统的受损参与了 VD 的形成^[12]。脑内的 Ach 是迄今为止发现的与学习、记忆关系最为密切的一种神经递质^[13]。其浓度升高有利于学习记忆的恢复,降低则促进痴呆的发生。Ach 由胆碱乙酰化酶(ChAT)合成,AchE 分解,通过 Ach 受体发挥生物学效应。本实验结果表明,各交泰丸组 AchE 活性有不同程度下降,Ach 含量有不同程度升高,与模型对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示交泰丸能抑制 VD 大鼠脑组织 AchE 活性,减少 Ach 的降解,增加 Ach 含量,通过中枢胆碱能通路,促进 VD 大鼠空间辨别学习记忆功能的恢复。

实验中发现,假手术组海马区神经元排列整齐密集,形态正常;模型对照组大鼠海马区神经元排列紊乱,出现核固缩,胶质细胞增生明显,神经细胞数量明显减少;各交泰丸组海马区病理变化与模型对照组比较均有不同程度改善。作为参与学习和记忆功能的重要结构^[14],海马直接参与信息的储存和回忆,它对缺血、缺氧损伤最为敏感。吕佩源等^[15]研究表明,VD 模型小鼠海马 CA1 区神经元严重受损,且持续进行性损害,伴学习、记忆能力障碍。本实验结果表明交泰丸对缺血再灌注 VD 大鼠海马区神经元有修复及保护作用,从而改善 VD 大鼠学习和记忆功能障碍。

参考文献:

[1] 吴志涛,曹秋菊.交泰丸加减治疗失眠 76(下转第 213 页)

管内膜增厚,促进动脉粥样硬化^[13]。在动脉粥样硬化斑块破裂标志物的检验中,方法较多,常用的有 ELISA、放射免疫试验、免疫比浊等^[14]。ELISA 法影响因素较多,而且存在着标准化问题^[14]。放射免疫法由于存在放射性污染问题,在临床上的应用也逐渐减少。免疫比浊法对抗体和增浊剂的质量要求很高,试剂和仪器较昂贵^[15]。近年来,流式细胞分析仪在临床不断普及,拓展流式细胞分析技术,延伸流式细胞仪应用领域,有着非常重要的意义。为此,本文建立的 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 的联合检测方法,具有检测速度快、采集数据量大、分析全面、方法灵活等特点,可实现多参数分析,大大降低成本。经对临床标本检测应用,结果显示,健康对照组、稳定型心绞痛组、不稳定型心绞痛组、急性心肌梗死组血清中 MMP-9、MPO、CD40L 和 t-PA 水平两两比较差异有统计学意义($P<0.05$),对冠心病的诊断、分层和疗效评价具有一定的意义,与 ELISA 法检测无差异。各标志物的诊断灵敏度、特异性、阳性似然比、阳性预测值、阴性预测值和 Youden 指数等指标均较为满意,值得在临床上推广使用。

参考文献:

- [1] 王继贵.急性冠脉综合征生物标志物研究的进展[J].实验与检验医学,2009,27(5):514-516.
- [2] 陈力量,王守力.急性冠脉综合征患者血清基质金属蛋白酶-2、-9 水平及其临床意义[J].安徽医学,2010,31(9):1087-1089.
- [3] Hojo Y, Ikeda U, Takahashi M, et al. Increased levels of monocyte related cytokines in patients with unstable angina[J]. Atherosclerosis, 2002, 161(2):403-408.
- [4] Aukrust P, Damas JK, Solum NO. Soluble CD40 ligand and platelets; self-perpetuating pathogenic loop in thrombosis and inflammation[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 43(12):2326-2328.
- [5] 黄山,许健,令狐颖,等.心脏标志物新分类概述[J].吉林

医学,2010,31(16):2559-2561.

- [6] 牟颖,金钦汉.荧光编码微球-流式细胞和生化分析技术及其最新发展[J].生命科学仪器,2003,1(1):31-36.
- [7] Vignali DAA. Multiplexed particle-based flow cytometric assays[J]. J Immunol Methods, 2000, 243:243-255.
- [8] 吴晓巍,金涌,田世民,等.玉米内州萎焉病菌免疫学检测方法的建立[J].微生物学通报,2010,37(6):929-934.
- [9] Pifarre R, Scanlon P. Evidence based management of the acute coronary syndrome[M]. Philadelphia Hanley & Belfus Inc, 2001:401-452.
- [10] 欧阳茂,杨侃,张梦玺,等.血浆髓过氧化物酶在急性冠脉综合征中的临床意义[J].中南大学学报,2006,31(6):901-905.
- [11] Cavusoglu E, Ruwende C, Eng C, et al. Usefulness of baseline plasma myeloperoxidase levels as an independent predictor of myocardial infarction at two years in patients presenting with acute coronary syndrome[J]. Am J Cardiol, 2007, 99(10):1364-1368.
- [12] 杨兆颖,李金梁,刘文娟,等. CHD 患者血清可溶性 CD40L 检测的临床意义[J].放射免疫学杂志,2011,24(2):163-165.
- [13] Steins MB, Padro T, Li CX, et al. Overexpression of tissue-type plasminogen activator in atherosclerotic human coronary arteries[J]. Atherosclerosis, 1999, 145:173-180.
- [14] 黄山,郑金鼎.流式微球分析技术检测人心肌钙蛋白 T 方法的建立[J].中国实验诊断学,2011,15(4):659-661.
- [15] 田禾,黄山,许健.流式微球分析技术检测人心肌钙蛋白 T 的方法学性能评价[J].贵州医药,2010,34(9):771-773.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2011-11-18)

(上接第 210 页)

- 例报道[J].时珍国医国药,2001,12(7):646-646.
- [2] 张文华.交泰丸治疗室性早搏 68 例[J].广西中医药,1994,17(1):7-9.
- [3] 龚彪,李长清,黄剑. SD 大鼠线栓法局灶性脑缺血/再灌注模型的改进[J].重庆医学,2006,35(4):313-315.
- [4] 周文泉,于向东.关于血管性痴呆研究的思考[J].中医杂志,2002,43(4):299-301.
- [5] 蔺心敬,胡常林,李正国,等.血管性痴呆大鼠模型海马乙酰胆碱和血小板激活因子含量变化的动态观察[J].中风与神经疾病杂志,2002,19(4):219-221.
- [6] 许吉生,李志军,刘慧英,等.盐酸多奈哌齐治疗血管性痴呆的临床疗效观察[J].中国老年保健医学,2008,6(1):31-33.
- [7] 张振馨, Zahner GE, Roman GC, 等.中国北京、西安、上海和成都地区痴呆亚型患病率的研究[J].中国现代神经疾病杂志,2005,5(3):156-157.
- [8] 朱江.尼莫地平结合醒脑胶囊治疗血管性痴呆 54 例临床观察[J].广东医学院学报,2005,23(2):152-154.
- [9] 张美增,谢安木,章政.老年神经病学[M].北京:科学技术出版社,2007:57-61.

- [10] Schneider LS, Olin JT. Overview of clinical trials of hupergerine in dementia[J]. Arch Neurol, 1994, 51:787-798.
- [11] 谢建平,吴承龙,孙新芳.安理申联合克林澳治疗早期血管性痴呆的临床研究[J].重庆医学,2008,37(4):498-500.
- [12] Grantham C, Geerts H. The rationale behind cholinergic drug treatment for dementia related to cerebrovascular disease[J]. Neurol Sci, 2002, 203(1):131-136.
- [13] Jia JP, Jia JM, Zhou WD, et al. Differential acetylcholine and choline concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. Chin Med J, 2004, 117(8):1161-1164.
- [14] 贾健民,贾健平,申玉,等.用 Morris 全自动水迷宫评价 Sprague-Dawley 鼠全脑反复缺血后学习记忆功能研究[J].卒中与神经疾病,2002,9(1):21-23.
- [15] 吕佩源,王天俊,王贺波,等.盐酸多奈哌齐对血管性痴呆小鼠学习和记忆能力的影响[J].脑与神经疾病杂志,2009,17(5):335-338.

(收稿日期:2011-07-23 修回日期:2011-09-22)