

实验研究

脑复明滴丸对血管性痴呆大鼠学习和记忆能力的影响

杜庆红 徐 雅 李卫红 狄 波 李雅洁

(北京中医药大学基础医学院, 北京, 100029)

摘要 目的:探讨脑复明滴丸对血管性痴呆大鼠学习记忆能力的影响。方法:采用双侧颈总动脉结扎建立血管性痴呆模型,以安理申作为阳性对照药物。60只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、脑复明滴丸高剂量组、脑复明滴丸中剂量组、脑复明滴丸低剂量组、阳性药对照组。采用Morris水迷宫试验和跳台实验检测大鼠的学习记忆能力。结果:在Morris水迷宫实验中,脑复明滴丸可显著缩短总路程与逃避潜伏期,并且显著延长痴呆大鼠在目标象限的停留时间。在跳台实验中,脑复明滴丸能够显著缩短痴呆大鼠的潜伏期。结论:脑复明滴丸对血管性痴呆大鼠学习和记忆功能有改善作用。

关键词 脑复明滴丸;血管性痴呆;学习记忆

Effect of Naofuming Pill on of Learning and Memorizing Abilities of Rats with Vascular Dementia

Du Qinghong, Xu Ya, Li Weinghong, Di Bo, Li Yajie

(Preclinical Medical School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To explore the effect of Naofuming pill (NFM) on abilities of learning and memorizing of rats with vascular dementia (VD). **Methods:** VD model of rats was induced by ligation of bilateral common carotid arteries. Aricept was as used positive control drug. Rats were randomly divided into sham operation group, model group, NFM high dose group, NFM middle dose group, NFM low dose group, as well as positive control group. The ability of learning and memorizing of rats were examined by Morris water maze test and step-down test. **Results:** In the Morris water maze test, NFM significantly shortened the total distance and the escape latency, and prolonged the residence time in the target quadrant. In the diving platform experiment, compared with model group rats, NFM significantly reduced latency. **Conclusion:** NFM can improve ability of learning and memorizing in rats with VD.

Key Words Naofuming pill; Vascular dementia; Learning and memorizing

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.04.019

脑复明滴丸是基于中医“毒损脑络”的病机理论,由栀子、三七有效部位制成的现代中药。前期研究显示,采用海马注射 $A\beta$ 的拟AD大鼠模型以及APPV717I转基因小鼠模型,三七和栀子有效成分均能够明显改善动物的学习记忆能力^[1]。在APPV717I转基因小鼠模型,预防性用药和早期用药,三七和栀子有效成分对学习和记忆能力都有很好的改善作用^[2]。本研究通过大鼠双侧颈总动脉结扎造成血管性痴呆(Vascular Dementia, VD)模型,观察脑复明滴丸对血管性痴呆大鼠学习记忆能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

清洁级SD大鼠60只,按照

随机的原则,分成假手术组、模型组、脑复明高剂量组、脑复明中剂量组、脑复明低剂量组、阳性药对照组(安理申),每组10只。术后15d给药组动物灌服不同剂量的脑复明滴丸(浸膏),早晚各1次,共治疗30d;假手术组和模型组给予同等剂量的生理盐水灌服;阳性对照组灌服安理申。

1.2 模型制作 大鼠腹腔注射10%水合氯醛($0.35\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉,固定,颈正中纵行切口,分离双侧颈总动脉,用1号丝线行永久性结扎。假手术组除不结扎双侧颈总动脉外,其他处理同模型组。

1.3 行为学检测

1.3.1 Morris水迷宫实验

参照Morris实验方法

进行。大鼠在完成给药时程后,适应性游泳 90 s。具体方法如下:每只大鼠每次测试时间为 90 s。测试前先将动物放置在平台上适应 10 s,令其进行空间定位。然后,将大鼠分别从未放置平台的三个象限轻放入水,并记录大鼠入水后 90 s 的运动状态。将大鼠从入水至找到平台所需时间定义为逃避潜伏期,记录大鼠逃避潜伏期及在逃避潜伏期时间内大鼠游泳总路程。若大鼠在规定 90 s 时间内能够找到平台,并在平台停留超过 5 s 者视为寻台成功,其潜伏期则为实际寻台所用时间;若大鼠在 90 s 内未能找到平台,视为寻台失败,其潜伏期设定为 90 s。此外,如果大鼠 90 s 内不能找到平台则由实验者用手牵引大鼠到平台上停留 10 s,再放回到笼中。每只动物测试完一个象限后休息 3 h 再进行下一次测试。每只动物测试 3 次/d。前 3 d 为适应性训练,第 4 天进行大鼠逃避潜伏期实验检测。每天动物测试顺序、入水象限、测试时段保持一致。空间探索实验:待连续 4 d 进行定位航行实验检测后,于第 5 天,撤除水池内隐匿平台,将大鼠从平台所对象限放入水中,记录 60 s 内大鼠在原平台所在象限的游泳时间(即:目标象限停留时间)。

1.3.2 跳台实验 跳台仪实验箱为长约 120 cm,宽 12 cm,高 30 cm 的有机玻璃箱,共分为 6 室,每室长 12 cm,宽 12 cm,高 30 cm。实验箱底面铺有铜栅,铜栅通过电线与电源相连,电流控制在 36 V。实验箱内铜栅上靠箱内一角置绝缘台(长径 5.7 cm,短径 4.5 cm,高 4.8 cm 的五边形木块)作为动物回避电击的安全区。试验装置与计算机自动记录系统相连。实验时将大鼠放入跳台仪实验箱内,适应环境 5 min,之后将大鼠轻放于跳台上,并将铜栅通电,当大鼠从跳台上跳下四肢接触铜栅时会受到电击,正常回避反应是跳上跳台返回安全区,逃避电击,如此学习 5 min,并记录此 5 min 内的触电次数(错误次数),以此为学习成绩。24 h 后进行记忆能力测试,将大鼠置于跳台上,记录大鼠从停留在跳台上至第 1 次跳下受电击的时间即潜伏期和 5 min 内的错误次数(大鼠四肢同时接触铜栅触电的次数),以此作为记忆功能的评价指标

1.4 统计学处理 应用 SPSS 11.5 中的 One - Way ANOVA 比较计量资料的组间差别,以($\bar{x} \pm s$)表示各组动物的指标计量数据,以 $P < 0.05$ 为表示有统计学意义, $P < 0.01$ 为有显著统计学意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫实验 在定位航行实验中,模型

组大鼠的总路程、以及逃避潜伏期与假手术组比较显著延长,有统计学意义($P < 0.01$),说明脑缺血诱导的痴呆模型大鼠学习记忆能力下降,造模成功。与模型组比较,脑复明滴丸各剂量组以及安理申组逃避潜伏期明显缩短,有显著的统计学意义($P < 0.01$)。与安理申组比较,脑复明各剂量组在逃避潜伏期方面没有统计学意义($P > 0.05$)。在总时间方面,与模型组比较,脑复明滴丸各剂量组以及安理申组均能缩短找到平台的时间,并有显著统计学意义($P < 0.01$)。脑复明高、中剂量组的效果优于低剂量组。并且,与安理申组比较,脑复明高、中剂量组潜伏期缩短,有统计学意义($P < 0.05$)。在空间探索实验中,与假手术组比较,模型组大鼠在目标象限停留时间显著缩短,有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,脑复明滴丸高、中剂量组以及安理申组目标象限停留时间延长,并有显著统计学意义($P < 0.01$)。脑复明高、中剂量组的效果优于低剂量组。与安理申组比较,脑复明各组大鼠目标象限停留时间无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 脑复明滴丸对血管性痴呆大鼠 Morris 水迷宫的影响

组别	例数	游泳总路程 /cm	逃避潜伏期 /s	目标象限停留 时间/s
假手术组	9	1078.5 ± 89.5	29.3 ± 7.9	60.1 ± 10.7
模型组	9	1603.7 ± 152.6**	48.5 ± 8.6**	45.7 ± 2.7**
低剂量组	9	1529.4 ± 297.3	40.4 ± 10.9 ^{△△}	50.8 ± 7.6 ^{△△}
中剂量组	9	1503.5 ± 128.5 [△]	38.7 ± 9.2 ^{△△}	53.2 ± 8.7 ^{△△▲}
高剂量组	9	1462.2 ± 177.2 [△]	35.1 ± 8.9 ^{△△}	53.4 ± 4.2 ^{△△▲}
安理申组	9	1505.5 ± 249.3 [△]	37.2 ± 9.3 ^{△△}	58.7 ± 8.5 ^{△△}

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与低剂量组比较,[▲] $P < 0.05$ 。

表 2 脑复明滴丸对大鼠跳台实验的影响

组别	例数	潜伏期/s	错误次数/n
假手术组	9	201.8 ± 40.30	16.3 ± 3.3
模型组	9	52.6 ± 13.45**	13.9 ± 2.1
低剂量组	9	120.55 ± 33.12 ^{△△}	16.3 ± 3.5
中剂量组	9	151.13 ± 23.69 [△]	13.9 ± 4.2
高剂量组	9	159.47 ± 32.15 [△]	14.8 ± 3.9
安理申组	9	149.37 ± 27.15 [△]	13.9 ± 3.7

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$ 。

2.2 跳台试验 在跳台实验中,与假手术组比较,模型组大鼠潜伏期明显延长,有显著的统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,脑复明滴丸各剂量组以及安理申组潜伏期明显缩短,有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。脑复明各剂量组与安理申组比较没有统计学意义($P > 0.05$)。在错误次数方面,

各组之间没有统计学意义。见表2。

3 讨论

血管性痴呆是由缺血、出血或急慢性脑缺氧等脑血管因素,导致脑组织损害,引起的脑组织血液循环障碍、脑功能减退的一种认知功能缺损综合征。患者多为慢性、进行性、持续性智能障碍综合征,临床表现为记忆及认知等功能障碍综合征。血管性痴呆已成为继阿尔茨海默病后的第二大痴呆疾病。随着人口的老齡化,血管性痴呆发病率逐年上升,严重影响患者的生存质量。研究表明,VD是迄今为止唯一可防治的痴呆,如早期治疗会具有可逆性^[3]。因此探索VD发病的相关因素及发病机制,开发有效的治疗药物,是该领域的研究热点。

脑复明滴丸是基于中医“解毒通络”理论,由三七、栀子有效组分组成的现代化中药。文献研究发现,三七皂苷 Rg1 能通过降低脑组织 AchE 活性,降低脑组织中脂质过氧化物、脂褐质等的含量,改善记忆损伤模型动物的学习记忆功能^[4]。在大脑中动脉栓塞导致的大鼠脑缺血,三七提取物能够明显改善大鼠的行为状态,缩小脑缺血面积^[5]。赵雪松等发现,三七总皂苷能够抑制 ICAM-1 和 TNF- α 的释放,促进脑出血后脑组织病理形态的恢复^[6]。研究表明,栀子苷能改善慢性低灌注导致的学习记忆能力受损,具有剂量依赖性,能明显减轻 VD 大鼠皮层及海马的病理变化,有一定的神经保护以及防治痴呆作用^[7]。栀子苷对缺血性脑神经损伤中的自由基损伤具有很好的拮抗作用,对缺血性脑神经损伤具有一定的保护作用^[8]。栀子粗提物有改善拟痴呆模型鼠学习记忆功能的作用。本文采用的颈总动脉结扎的方法制作大鼠血管性痴呆模型是一种公认的研究痴呆的动物模型^[9]。Morris 水迷宫实验包括定位航行试验和空间探索试验两个部分。定位航行试验利用大鼠天性会水但又怕水的特点,迫使大鼠找到隐匿于水下的平台上岸避水。通过数天反复训练,使大鼠形成条件反射,能够运用环境标记判断水下隐匿平台的位置,从而形成稳定的空间记忆。检测指标有逃避潜伏期、游泳总路程以及大鼠在逃避潜伏期内的平均速度等。其中逃避潜伏期是通过记录大鼠找到水下隐匿平台时间的长短反映学习能力,

是目前较为认可的指标。游泳总路程是大鼠捕捉到水下平台经过的轨迹,间接衡量其学习能力。空间探索试验是通过复合型学习,使大鼠形成空间参考记忆。空间探索试验是在定位航行试验后去除平台,在平台所对象限将大鼠放入水池中,记录其在规定时间内停留在原平台所在象限的时间,以此来考察大鼠对原平台位置的空间记忆能力。通过水迷宫实验发现,脑复明滴丸可显著缩短总路程与逃避潜伏期,说明脑复明滴丸对痴呆所致的学习障碍具有一定的改善作用。跳台试验是反映动物一次性被动回避,反映记忆功能的试验。在跳台实验中,脑复明滴丸能够显著缩短痴呆大鼠的潜伏期,可见治疗后大鼠记忆能力已经有所恢复。综上所述,行为学的结果显示,脑复明滴丸对血管性痴呆大鼠学习和记忆功能障碍有显著的改善作用。在后续的研究中,我们将深入探讨脑复明滴丸的药效机制。

参考文献

- [1] Liu Y, Hua Q, Lei H T, Li P T, et al. Effect of Tong Luo Jiu Nao on $A\beta$ - degrading enzymes in AD rat brains [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(2): 1035 - 1046.
- [2] 张颖, 林森相, 华茜, 等. 三七和栀子有效成分对 AD 转基因小鼠早期脑内淀粉样蛋白清除作用的研究 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(2): 173 - 179.
- [3] Gorelick PB. Status of risk factors for dementia associated with stroke [J]. Stroke, 1997, 28(2): 459 - 463.
- [4] 张小超, 何波, 陈鹏, 等. 三七皂苷 Rg1 对学习记忆功能障碍的影响 [J]. 中药药理与临床, 2008(3): 13 - 16.
- [5] 孙晓波, 徐惠波, 纪凤兰, 等. 三七叶提取物对大鼠脑缺血模型的影响 [J]. 中药药理与临床, 2004, 20(2): 17.
- [6] 赵雪松, 陈志刚, 徐枝芳, 等. 早期使用三七总皂苷对大鼠脑出血炎症反应的影响 [J]. 世界中医药, 2013, 8(7): 787 - 790.
- [7] 李利娟, 李宏霞, 吴欣桐, 等. 栀子甙对血管性痴呆大鼠行为学和脑组织病理改变的影响 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2009, 40(4): 604 - 607.
- [8] 袁拯忠, 朱陵群, 庞鹤, 等. 黄连解毒汤有效成分对缺氧/复氧时脑微血管内皮细胞的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(3): 249.
- [9] Peng Y, Xu S, Chen G, et al. 1-3-n-Butylphthalide improves cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 321: 902 - 910.

(2014-05-26 收稿 责任编辑: 张文婷)