

桑椹首乌补脑颗粒对老年性痴呆模型大鼠血清 SOD、MDA 含量及脑组织 β 淀粉样蛋白表达的影响

张会平 刘 宇 高 睿 赵 月

(济南市中医医院肿瘤科, 济南, 250012)

摘要 目的:研究桑椹首乌补脑颗粒防治老年性痴呆的作用机制,为指导临床用药提供实验依据。方法:观察服用桑椹首乌补脑颗粒后,老年性痴呆模型 Wistar 大鼠学习记忆功能、血管活性物质(SOD、MDA)及脑组织 β 淀粉样蛋白含量的变化。结果:桑椹首乌补脑颗粒能够促进学习记忆功能的恢复,升高 SOD、降低 MDA 含量,降低海马区 β 淀粉样蛋白的表达。结论:桑椹首乌补脑颗粒防治老年性痴呆可能是通过下调脑组织 β 淀粉样蛋白的表达,升高 SOD 水平、降低 MDA 含量,减少脑组织损伤有关。

关键词 老年性痴呆;桑椹首乌补脑颗粒;学习记忆;血管活性物质; β 淀粉样蛋白

Effects of Sangshen Shouwu Bunao Granule on the Level of SOD, MDA and the Expression of β -amyloid in Dementia Model Rats Serum

Zhang Huiping, Liu Yu, Gao Rui, Zhao Yue

(1 Jinan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250012, China)

Abstract Objective: To explore the mechanism of Sangshen Shouwu Bunao granule on preventing dementia and provide data support on clinical treatment. **Methods:** To detect the changes of SOD, MDA and β -amyloid on Alzheimer Wistar rats after giving Sangshen Shouwu Bunao granule. **Results:** Sangshen Shouwu Bunao granule can promote the learning and memory capabilities of rats, increase SOD, decrease MDA level and down regulate amyloid β expression. **Conclusion:** Sangshen Shouwu Bunao granule can prevent Alzheimer's disease. This is possibly because it can reduce β -amyloid in brain tissue, increase levels of SOD, and decrease MDA levels; thus to repair brain tissue damage.

Key Words Alzheimer's disease; Sangshen Shouwu Bunao granule; Learning and memory capability; Vasoactive substances; β -amyloid

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.02.029

桑椹首乌补脑颗粒具有补肾填精、益心安神、化痰祛瘀开窍的作用,临床上用于治疗老年性痴呆,为了进一步揭示其对老年性痴呆的药效学作用与机制,我们通过实验观察了桑椹首乌补脑颗粒对老年性痴呆模型 Wistar 大鼠学习记忆功能、血管活性物质(SOD、MDA)及脑组织 β 淀粉样蛋白含量的影响。总结如下。

1 资料与方法

1.1 受试药物 桑椹首乌补脑颗粒由江阴天江药业有限公司制备,批号:0709310。成人 1 d 用量:3 包/d $\times$ 3 g/包 = 9 g/d;大鼠临床等效量:9 g $\times$ 0.018/0.2 kg = 0.81 g/kg;拟给药剂量为临床等效量的 2 倍、1 倍,即 1.62 g/kg 和 0.81 g/kg。分别配制成 16.2% 和 8.1% 的水溶液,以 10 mL/kg 灌胃给药。对照组药:抗脑衰胶囊为吉林本草堂制药有限公司产品,批号:20070210。大鼠临床等效量:4.5 g

$\times$ 0.018/0.2 kg = 0.41 g/kg;拟给药剂量为临床等效量,即 0.41 g/kg。

1.2 实验仪器 GB-303 型电子天平(上海梅特勒公司产品),YXQ-SG46-280A 型压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司产品),圆形水池(直径为 1 m,高 60 cm)(济南器具锻造厂产品),DDL-5 低速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂产品),Unic-2100 型分光光度计(上海联华仪器厂产品)。

1.3 实验试剂 SOD 试剂盒、MDA 试剂盒(南京建成生物工程研究所产品); β 淀粉样蛋白免疫组化试剂盒(武汉博士德生物有限公司产品)。

1.4 实验动物 体重(220 $\pm$ 20)g Wistar 大鼠 60 只雄性,由山东大学医学院实验动物中心提供。

2 方法

2.1 造模 参照文献方法^[1],大鼠腹腔注射 D-半乳糖 50 mg/kg,1 次/d,连续 6 周。造成衰老大鼠模

型,其中阴性对照组注射同体积的生理盐水。于第 7 周以鹅膏蕈氨酸(Ibotenic, IBO)损伤双侧 meynert 核,阴性对照组注射同等量的生理盐水。

2.2 分组与给药 动物分组:大鼠造模后按照体重均衡随机分为模型对照组,阳性药对照组,桑椹首乌补脑颗粒高、低两个剂量组。给药剂量与途径:阴性对照组、模型对照组给予纯净水,抗脑衰胶囊 0.41 g/kg 组,桑椹首乌补脑颗粒 1.62 g/kg、0.81 g/kg (简称桑椹高剂量组、桑椹低剂量组),配成 16.2% 和 8.1% 的水溶液,各组按 10 mL/kg,每天给药,连续 4 周。

2.3 Morris 水迷宫试验 用于测定大鼠学习记忆功能的状况。参照文献方法^[2],在大鼠给药第 3 周后进行 Morris 水迷宫训练,在圆桶的上边等距离设置东、南、西、北 4 个标记点,以 4 个点分别在水面上和水桶底部的投影点,把水面和水桶共分成 4 个象限。根据试验的要求,把平台设置在东北象限,试验时水桶内加水至 40 cm,水的温度控制于 23~25℃,站台顶端平面比水平面低 1~2 cm,每天把动物按东、南、西、北四个入水点放进水池内。分别记录试验动物的入水时间,同时记录试验动物从入水至找到平台且爬到平台上面所需的时间,作为逃避潜伏期。最大潜伏期取 60 s,如果大鼠在 60 s 时间内没能找到水池内的站台或者没能爬到站台上,把大鼠放到站台上休息 10 s,10 s 后把大鼠从站台上取下来,休息 30~60 s 后,再进行下一轮训练。此训练 1 次/d,共 6 d,第 4 周进行测试,并记录各组大鼠经过平台的次数,t 检验进行组间比较。

2.4 SOD、MDA 含量测定^[3] 观察对模型大鼠血清 SOD、MDA 的影响。上述试验测定完毕后,经颈静脉抽血 2 mL。分离上层液(血清)。测定 SOD、MDA 含量(按试剂盒说明操作)。

2.5 免疫组化法测定脑组织中 β 淀粉样蛋白表达的变化 参照文献方法^[4],大鼠采血后,迅速断头取脑组织,4% 多聚甲醛浸泡,免疫组化法制备脑组织中性树胶封片,光学显微镜下观察,以细胞浆出现鲜艳的棕黄色染色为阳性细胞,计数每高倍镜视野下(40×)的阳性细胞数及光密度值,观察大脑组织海马 CA1 区 β 淀粉样蛋白表达情况。

2.6 统计学方法 所有数据经过 SPSS 13.0 软件处理,均以($\bar{x} \pm s$)表示,t 检验进行组间比较。

3 结果

3.1 对 Morris 水迷宫试验逃避潜伏期、平台象限内活动的影响 由表 1 可见:用药高低剂量组均能明

显缩短潜伏期,通过平台的次数明显高于模型对照组($P < 0.01, P < 0.05$),且高剂量组优于抗脑衰胶囊组。提示本品对模型大鼠 Morris 水迷宫的空间学习记忆功能有明显的恢复作用。

表 1 对模型大鼠水迷宫平均逃避潜伏期和通过平台次数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	药后潜伏期 (s)	通过平台次数 (次)
阴性对照组	--	6.40 ± 3.46 **	8.40 ± 2.62 **
模型对照组	--	18.39 ± 6.82	2.70 ± 1.97
抗脑衰胶囊组	0.41	15.35 ± 5.16	4.63 ± 2.45
桑椹高剂量组	1.62	10.75 ± 2.88 **△	7.13 ± 2.65 **△
桑椹低剂量组	0.81	12.72 ± 3.02 *	5.00 ± 2.38 *

注:与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,与抗脑衰胶囊组比较, △ $P < 0.05$ 。

3.2 对模型大鼠血清 SOD、MDA 的影响 由表 2 可见,与模型对照组比较,用药高、低剂量组血清总 SOD 活力水平明显升高($P < 0.01$),高剂量组血清 MDA 含量明显降低($P < 0.05$)。

表 2 对模型大鼠血清 SOD、MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	SOD (NU/mL)	MDA (nmol/L)
阴性对照组	--	235.04 ± 46.73 **	3.25 ± 1.53 **
模型对照组	--	156.62 ± 36.85	6.58 ± 2.12
抗脑衰胶囊组	0.41	195.25 ± 35.43 *	5.15 ± 1.94 *
桑椹高剂量组	1.62	206.46 ± 31.58 **	4.36 ± 1.98 *
桑椹低剂量组	0.81	208.74 ± 43.12 **	4.77 ± 2.65

注:与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.3 对模型大鼠脑组织 β 淀粉样蛋白表达的影响 由表 3 可见,2 个桑椹首乌补脑颗粒用药组不同程度降低脑组织不同部位 β 淀粉样蛋白的表达。

表 3 对模型大鼠海马 CA1 区 β 淀粉样蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g/kg)	细胞数 (个/标准视野)	积分光密度值
阴性对照组	--	19.4 ± 4.2 **	3.4 ± 1.2 **
模型对照组	--	41.5 ± 4.8	7.7 ± 1.6
抗脑衰胶囊组	0.41	35.8 ± 5.1 *	6.2 ± 2.1 *
桑椹高剂量组	1.62	30.1 ± 3.9 **△	5.4 ± 1.1 **
桑椹低剂量组	0.81	32.6 ± 3.6 **	5.6 ± 0.8 **

注:与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,与抗脑衰胶囊组比较, △ $P < 0.05$ 。

3.4 各组大鼠海马 CA1 区 β 淀粉样蛋白表达阳性神经元表达图 1-3 (×400) 对照组大鼠海马 CA1 区细胞层次清晰,细胞排列整齐、紧密,有很少的 β 淀粉样蛋白阳性神经元。模型组海马 CA1 区细胞层次紊乱,细胞排列稀疏、无序,可见大量的 β 淀粉样蛋白阳性神经元。高剂量组海马 CA1 区细胞层次

较清晰,细胞排列较整齐,有少量的阳性神经元。

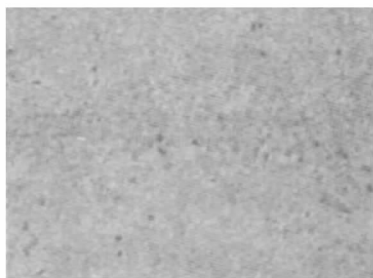


图1 阴性对照组



图2 模型对照组

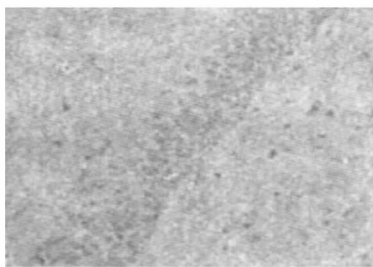


图3 高剂量组

4 讨论

现代医学研究证实在脑组织老化过程中,神经元细胞膜上的不饱和脂肪酸被氧化而产生大量氧自由基,这些氧自由基能够损伤细胞膜、细胞器,诱导神经元发生凋亡,导致其功能破坏,认为氧自由基损伤是引起老年性痴呆患者脑损伤的重要机制之一。其中丙二醛(MDA)是脂质过氧化反应的降解产物,其含量可以反映机体氧自由基产生和脂质过氧化反应程度^[5]。MDA会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,且具有细胞毒性,因而MDA在体内含量增加,能够加速衰老过程。而超氧化物歧化酶(SOD)是一种源于生命体的活性物质,能消除生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质。对人体不断地补充SOD具有抗衰老的特殊效果。SOD检测对老年性痴呆等老年性患者的诊断和预后监测有重要临床价值^[6]。此外,神经细胞外老年斑的形成是老年性痴呆病理的主要特征。20世纪80年代Master等发现老年性痴呆患者脑的老年斑中主要成分是细胞外淀粉样蛋白(A β)的沉积。A β 能引起线粒体损伤,引起氧化应激和Ca²⁺超载,环氧酶COX的表达

和活性下降可以导致细胞色素C的释放和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶的活化,启动神经元的凋亡过程^[7]。崔玉琴等研究证实^[8],老年性痴呆患者血清中A β 含量升高,表明老年性痴呆患者可引起淀粉样蛋白异常变化。因此A β 沉积可导致老年性痴呆的发病,减少A β 在脑组织中的沉积可延缓或减轻老年性痴呆的症状。

“桑椹首乌补脑颗粒”主要由桑椹、制何首乌、白首乌、生酸枣仁、熟酸枣仁、柏子仁、红景天、银杏叶、虫草粉、黄精、天麻、九节菖蒲、枸杞子、炙龟甲、淫羊藿、当归、熟地黄、五味子、丹参等组成,是我国著名老中医刘惠民及其嫡孙刘宇先生治疗老年性痴呆的经验方,该方针对老年性痴呆本虚标实,肾虚、心肾不交为本,痰阻血瘀为标的病机特点,从肾从心论治,以补肾填精、益心安神、化痰祛痰开窍法为主要治疗方法。现代药理研究证实,方中多种中药提取物具有一定清除自由基、改善神经系统损伤、延缓衰老、增强记忆力及改善睡眠等作用。张文娜等^[9]通过研究发现,桑椹多糖具有一定清除自由基活性的作用。含二苯乙烯苷(TSG)70%的何首乌提取物、蒽醌类和水提取物,能改善高胆固醇血症模型大鼠的学习记忆障碍^[10],具有益智^[11]和抗抑郁作用^[12]。陈金峰等^[13]通过研究发现,酸枣仁-五味子药对醇水双提物中、高剂量均具有一定的镇静催眠作用。贺改英等^[14]研究表明,银杏叶提取物(GBE50)可通过调节衰老大鼠前额叶皮层和海马IL-1 β 、IL-6及TNF- α 以及恢复海马神经胶质细胞超微结构破坏,以抑制神经炎症反应,从而改善神经系统损伤。李弋等^[15]通过研究从神经系统的病理学角度,证实了黄精对AD大鼠海马组织CA1区的形态学有显著的改善作用。

本研究证实:桑椹首乌补脑颗粒能够促进衰老模型大鼠学习记忆功能的恢复,升高SOD、降低MDA含量,下调脑组织 β 淀粉样蛋白的表达,减少自由基的生成,加速衰老模型大鼠脑功能的恢复。由此证明,中药制剂桑椹首乌补脑颗粒通过升高SOD、降低MDA含量,下调脑组织 β 淀粉样蛋白的表达,减少自由基的生成,降低其损伤作用,从而发挥抗衰老作用。

参考文献

- [1]胡镜清,赖世隆,王奇,等. D-半乳糖加速衰老合并Meynert核损毁大鼠学习记忆能力变化的初步观察[J]. 中华老年医学杂志, 2000, 19(2): 5-6.
- [2]李斌,谢淑玲,彭丽燕,等. 3种拟痴呆动物模型在Morris水迷宫

- 行为学测试中学习记忆行为的差异[J]. 医学研究生学报, 2014, 27(7): 683-685.
- [3] 张晓琳, 刘智艳, 刘娟, 等. 电针对老年性痴呆大鼠记忆功能减退的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(3): 706-709.
- [4] 王锋, 韩柏, 郭建红, 等. 脑内 A β 沉积与 AD 模型大鼠学习记忆能力关系的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(3): 584-586.
- [5] Liu H, Zhang X, Du Y, et al. Leonurine protects brain injury by increased activities of UCP4, SOD, CAT and Bcl-2, decreased levels of MDA and Bax, and ameliorated ultrastructure of mitochondria in experimental stroke[J]. Brain Res, 2012(1474): 73-81.
- [6] 李泽文. 超氧化物歧化酶(SOD)检测对老年性疾病病情和预后监测的临床意义[J]. 实验与检验医学, 2013, 31(4): 396-397.
- [7] Nelson TJ, Alkon DL. Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and beta - amyloid peptide[J]. J Biol Chem, 2005, 280(8): 7377-7387.
- [8] 崔玉琴, 卢建华, 李晓风, 等. 血清中 β 淀粉样蛋白检测对老年性痴呆的临床意义[J]. 内蒙古医学杂志, 2004, 36(7): 499-500.
- [9] 张文娜, 陆敏, 姚清国, 等. 桑椹多糖的抗氧化活性研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(1): 156-157, 173.
- [10] 赵玲, 李雅莉, 靳洪涛, 等. 何首乌提取物对高胆固醇血症大鼠学习记忆及血脂的影响[J]. 中草药, 2004, 35(11): 1277-1279.
- [11] 龚彦胜, 张亚因, 黄伟, 等. 与功效、毒性相关的何首乌化学成分研究进展[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(8): 472-475.
- [12] 王君明, 朱新瑞. 何首乌提取物抗抑郁活性研究[J]. 北京中医药大学学报, 2012, 5(7): 449-452.
- [13] 陈金锋, 高家荣, 季文博, 等. 酸枣仁一五味子药对镇静催眠作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(4): 128-131.
- [14] 贺改英, 张志雄, 徐颖, 等. 银杏叶提取物对衰老大鼠前额叶皮层和海马炎症细胞因子及胶质细胞超微结构的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(8): 1064-1068.
- [15] 李弋, 马凤巧. 黄精对阿尔茨海默病大鼠海马组织形态学的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 9(33): 2099-2100.

(2015-01-13 收稿 责任编辑: 张文婷)

世界中医药学会联合会络病专业委员会中俄络病学术论坛通知 (第一轮)(2016·莫斯科)

为按照中医学自身发展规律, 推动中医络病理论发展, 促进其基础与临床应用研究, 增进世界各国(地区)从事络病研究专家学者的交流与合作, 加强世界各国(地区)络病研究学术交流, 提高络病相关重大疾病及疑难疾病的中医药防治水平, 加快中医药现代化和国际化的进程。世界中医药学会联合会络病专业委员会拟于 2016 年 04 月 19 日 - 24 日在俄罗斯莫斯科举办世界中医药学会联合会络病专业委员会中俄络病学术论坛, 本次会议拟对心血管病、脑血管病的中医药特色疗法为主题展开研讨和交流, 并介绍近年来络病研究取得的成果。本次会议将以主题发言、大会交流等形式进行研讨, 具体内容如下:

一、会议主题: 络病理论传承创新国际化

二、参会对象: 世界中联络病专业委员会会员及从事络病理论研究的有关专家

三、会议须知: 1. 会议时间: 2016 年 04 月 19 日至 24 日 2016 年 04 月 19 日报到 20 - 23 日会议、医院参观访问交流; 2. 会议地点: 莫斯科。

四、会议筹备: 主办单位: 世界中医药学会联合会络病专业委员会; 承办单位: 俄罗斯圣彼得堡中医医院; 联系方式: E-mail: luobinglab@sina.com

五、学分登记与发放: 本次会议将授予国家级继续教育学分二类证书。

世界中医药学会联合会络病专业委员会
2016 年 2 月 15 日