

补肾中药对拟痴呆小鼠胆碱能 M-受体功能及胆碱酯酶活性的影响*

莫启忠 马 骏 宫 斌 宁 炼 王宝妹

内容提要 选用氯化铝溶液制备拟痴呆小鼠动物模型, 研究补肾中药对拟痴呆小鼠大脑皮层组织(Cer)中胆碱能 M-受体结合容量(Rt)和胆碱酯酶(AchE)活性的影响。结果表明, 拟痴呆小鼠 Cer 中 AchE 活性比正常青年小鼠明显提高($P < 0.01$), 而 M-受体 Rt 值显著降低($P < 0.001$)。补肾中药可明显降低拟痴呆小鼠 Cer 中 AchE 活性($P < 0.05 \sim 0.01$), 增加 M-受体 Rt 值($P < 0.001$)。提示补肾中药能通过降低拟痴呆小鼠 Cer 中 AchE 活性, 增加 M-受体 Rt 值, 明显提高记忆能力。补肾中药有防治脑功能减退和防治老年性痴呆的作用。

关键词 补肾中药 拟痴呆小鼠 M-受体 胆碱酯酶

Effect of Chinese Herbal Medicine of Tonifying Kidney on M-Cholinergic Receptor and Acetylcholinesterase Activity in Dementia Mimetic Mice MO Qi-zhong, MA Jun, GONG Bin, et al *Nuclear Medicine Laboratory of Shanghai University of TCM, Shanghai* (200032)

Dementia mimetic mouse model was formed with aluminum chloride solution in order to study the effect of Chinese herbal medicine of tonifying Kidney (TK) on the M-cholinergic receptor (Rt) and the acetylcholinesterase (AchE) activity in the model's cerebral cortex. Results showed that the M-cholinergic receptor Rt lowered and the AchE increased in the model evidently as compared with the healthy young mice. The TK could markedly reduce the increased AchE and elevate the lowered M-cholinergic receptor Rt in cerebral cortex of the dementia mimetic mice, it also could improve the memory. These results suggested that TK is effective in preventing the degeneration of cerebral function and presenile dementia.

Key words Tonifying Kidney, dementia mimetic, acetylcholinesterase, M-cholinergic receptor

学习记忆的衰退是脑衰老的主要表现之一。记忆功能与脑组织中胆碱能系统功能密切相关。老年鼠大脑皮层组织(Cer)中胆碱乙酰化转移酶(CAT)活性, M-受体结合容量(Rt)值比正常青年鼠低, 而胆碱酯酶(AchE)活性则升高。补肾类中药可以明显使老年鼠 Cer 中 CAT 活性升高、M-受体 Rt 值增加、AchE 活性降低^(1~6)。本实验选用氯化铝溶液($AlCl_3$)塑造小鼠痴呆模型用以研究补肾中药对模型小鼠胆碱能神经系统的影响, 以探讨补肾中药延缓脑功能衰老的机理。

材料与方法

1 材料

* 国家自然科学基金资助课题

上海中医药大学核医学研究室(上海 200032)

1.1 药物 以喜德镇(Hydergine, Chemical Works of Geden Richter LTD, Budapest Hungary)和首乌片(上海中药制药一厂)分别为西药和中药对照组用药。补肾中药由何首乌、肉苁蓉、熟地等中药组成, 按确定的工艺加工成口服液, 每毫升含生药 1.0 g。临床成人用量 20 ml/d, 为补肾组动物用药。

1.2 动物 选取昆明种封闭群正常青年 2 月龄小鼠 112 只(由本校实验动物中心提供), 体重 20~25 g; 随机分成 8 组, 分别为正常对照、模型对照、中药对照、西药对照、补肾 I (按体重计算的临床成人用量 10 倍, 下同)、补肾 II (临床成人用量 20 倍)、补肾 III (临床成人用量 30 倍)及预防组(临床成人用量 20 倍), 中、西对照药用量均为临床成人量的 30 倍。每组 14 只, 雌雄各半。除正常对照组外, 其

余各组均预先灌喂 AlCl_3 (浓度为 8 mg/ml, pH 值 6.5) 0.5 ml/只·d, 两周后分别按分组喂药液, 预防组在喂 AlCl_3 同时喂以补肾药。每两周称体重 1 次, 按体重调整各组小鼠喂药量。喂养 90 天后处死小鼠, 取 Cer 备用。

1.3 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (取 KH_2PO_4 20.41 g, NaOH 5.1 g, 溶于 3000 ml 蒸馏水中, 待充分溶解后再加入 2.85 g MgCl_2 , 用 10% NaOH 或 KH_2PO_4 调 pH 7.7), 该液称为 B_1 液。取 B_1 液 250 ml, 加入 21.5 g 蔗糖, 溶解后称 B_2 液。取 B_1 液 200 ml, 加入维生素 C 0.4 g, 溶解后用 10% NaOH 调 pH 7.7, 称 B_3 液。

2 方法

2.1 小鼠记忆能力检测 采用避暗法的改进方法^(7, 8)。记录每次小鼠由暗室到明室的反应时间, 以比较小鼠避暗记忆能力, 各组小鼠每隔 24 h 实验 1 次, 第 1 次为初步反应, 第 2 次为回忆反应, 第 3 次为记忆能力。

2.2 M-受体样本的制备 喂药 90 天时, 将小鼠断头取脑, 分离出 Cer 约 100 mg, 迅速加入制备缓冲液 B_2 , 用高速分散器匀浆。然后将匀浆用超速离心机先以 5500 rpm/min 离心 10 min, 取上清液, 再以 27000 rpm/min 离心 15 min, 取沉淀, 加反应缓冲液 B_3 , 用高速分散器制成悬浮液备用。同时采用微量 Lowry 法⁽⁹⁾改进法测蛋白含量。以上操作均在

0~4℃ 进行。按受体放射性配基结合分析法^(10, 11), 测定小鼠 Cer 中 M-受体 Rt 值。

按下列公式计算 M 受体结合容量 (Rt):

$$Rt = \frac{(\text{总结合 cpm} - \text{NSBcpm})}{(\text{仪器测量效率} \times \text{配体比活度} \times \text{样本蛋白含量})}$$

注: NSB 为非特异性结合

2.3 乙酰胆碱酯酶样本的制备 喂药 90 天时, 将小鼠断头取脑, 分离 Cer 10~30 mg, 称重后加 1 ml 67 mmol/L 磷酸缓冲液, 制成匀浆, 然后以 1500 rpm/min 离心 15 min, 上清液即为酶样本。按羟胺比色法⁽¹²⁾, 略加改进测定小鼠 Cer 中 AchE 活性, 测得光密度值 (OD) 后, 以下列公式计算 AchE 活性: 已知 37℃ 时反应 30 min, 每管加入的酶液相当于 0.1 mg 湿组织, Ach 加入量为 0.014 mol/L × 100 μl = 1.4 μmol , 以每克湿组织温育 1 h, 水解 Ach 的 μmol 数, 表示 AchE 活性, 故 AchE 在 37℃ 时活性为:

$$\frac{(\text{非酶对照管 OD} - \text{一样本管 OD})}{\text{标准管 OD} \times 0.5 \times 0.0001} \times 1.4 (\mu\text{mol/h} \cdot \text{g})$$

结 果

1 补肾中药对拟痴呆小鼠模型小鼠记忆能力的影响 见表 1。通过 3 次避暗实验, 使小鼠建立了对光的条件反射。模型组第 2 和第 3 次实验, 其反应时间、每鼠错误率和错鼠率均明显高于正常对照组

表 1 拟痴呆小鼠记忆能力测定结果

组别	鼠数	第 1 次			第 2 次			第 3 次		
		反应时间 (min, $\bar{x} \pm S$)	每鼠错率 (%)	错鼠率 (%)	反应时间 (min, $\bar{x} \pm S$)	每鼠错率 (%)	错鼠率 (%)	反应时间 (min, $\bar{x} \pm S$)	每鼠错率 (%)	错鼠率 (%)
正常对照	14	1.96 ± 1.69	0.56	33.33*	1.73 ± 0.64*	0.63	33.33*	1.47 ± 1.35*	0.28*	16.67*
模型对照	14	2.08 ± 1.73	1.07	61.54	2.43 ± 1.52	0.95	53.85	2.64 ± 0.99	0.71	53.85
中药对照	14	1.59 ± 0.73	0.18**	23.08*	2.25 ± 1.20	0.59	30.77*	1.58 ± 0.86*	0.24*	30.77
西药对照	14	2.62 ± 1.50	0.56	50.00	1.52 ± 0.59*	0.49	25.00*	1.05 ± 0.72***	0.28*	16.67*
补肾 I	14	3.01 ± 2.41	1.24	53.85	2.25 ± 0.91	0.71	46.15	1.40 ± 0.67***	0.41*	38.46
补肾 II	14	2.40 ± 1.19	0.36*	23.08*	1.55 ± 0.55*	0.24**	30.77*	1.28 ± 0.67***	0.41*	23.08
补肾 III	14	2.03 ± 1.07	0.66	54.55	1.72 ± 0.91*	0.83	45.45	1.29 ± 0.60***	0.99	45.45
预防	14	1.85 ± 0.74	0.49	45.45	1.83 ± 0.68*	0.17**	9.09**	1.67 ± 1.19*	0***	0***

注: 与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

($P < 0.05 \sim 0.01$), 表明该方法造成小鼠拟痴呆模型基本成功。灌喂不同剂量补肾中药的各组小鼠每鼠错误率和错鼠率都呈降低趋势, 其中预防组记忆能力最好, 第 2 次测试错误率已明显降低 ($P < 0.01$), 第 3 次错误率已降低为零 ($P < 0.001$)。从反应时间上看, 灌胃补肾中药的每组小鼠都有降低趋势, 但差异不明

显。对各组小鼠综合分析: 西药、中药、补肾药均可改善小鼠的学习记忆功能, 基本达到正常组水平, 其中灌胃补肾中药预防组作用更好。

2 补肾中药对拟痴呆小鼠 Cer 中 M-受体 Rt 值积 AchE 活性的影响 见表 2。模型对照小鼠 Cer 中 M-受体 Rt 值比正常鼠明显降低, 差异显著 ($P <$

0.001)。而中药、西药、补肾中药均可提高拟痴呆小鼠 Cer 中 M-受体 Rt 值,与正常对照鼠比较,无明显差异。尤其是补肾 II 组效果更好。提示:补肾中药能通过提高小鼠 Cer 中 M-受体 Rt 值,产生防治老年性痴呆的作用。

模型小鼠 Cer 中 AchE 活性比正常对照组明显升高,差异显著($P < 0.01$)。而中药、西药、补肾药均可降低拟痴呆小鼠 Cer 中 AchE 的活性,与正常鼠比较,已无显著差异。其中预防组、补肾 III 组的作用更加显著($P < 0.001$, $P < 0.01$),而补肾 I 组和补肾 II 组也有明显作用($P < 0.05$)。提示:补肾中药能通过降低小鼠 Cer 中 AchE 活性,产生防治老年性痴呆症的作用。

表 2 补肾中药对拟痴呆小鼠 Cer 组织中 M-受体 Rt 值和 AchE 活性的影响 ($\bar{x} \pm S$)

组别	鼠数	M-受体的 Rt 值 (fmol/mg 蛋白)	AchE 活性 ($\mu\text{mol/h} \cdot \text{g}$)
正常对照	14	1249.34 $\pm$ 225.30***	267.04 $\pm$ 117.72**
模型对照	14	676.31 $\pm$ 170.07	516.99 $\pm$ 248.26
中药对照	14	1105.05 $\pm$ 166.89***	347.56 $\pm$ 143.41*
西药对照	14	1064.14 $\pm$ 121.25***	278.35 $\pm$ 115.87*
补肾 I	14	1267.52 $\pm$ 250.76***	305.23 $\pm$ 118.71*
补肾 II	14	1336.42 $\pm$ 324.18***	301.24 $\pm$ 92.59*
补肾 III	14	1090.99 $\pm$ 179.91***	228.69 $\pm$ 93.46**
预防	14	1298.54 $\pm$ 200.69***	213.86 $\pm$ 74.28***

注:与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

讨 论

胆碱能神经系统的变化与学习记忆功能密切相关。我们用 AlCl_3 造成小鼠痴呆模型为研究对象,测定了小鼠 Cer 中 M-受体 Rt 值和 AchE 活性,发现拟痴呆模型小鼠 Cer 中 M-受体 Rt 值和 AchE 活性变化与老年动物脑组织中的变化相一致^[3, 5, 8],都有胆碱能神经系统功能低下、行动迟缓、记忆力减退等症状。表明以 AlCl_3 造成的拟痴呆小鼠可作为一种研究脑功能减退的动物模型。补肾益精、调理心肾中药可通过抑制脑组织内线粒体单胺氧化酶活性^[4];提高脑组织内某些神经递质受体 Rt 值^[1~3, 5]来改善脑功能,延缓脑组织衰老。本实验结果表明:补肾中药亦能使拟痴呆小鼠 Cer 中 AchE 活性明显降低, M-受体 Rt 值显著增加,并恢复接近正常水平。其作用与中药首乌片以及治疗老年性痴呆的西药喜德镇比较,

经过综合分析,补肾中药的治疗作用效果更好。

补肾中药防治脑功能减退的作用有其理论依据。我们以调补心肾中药为基本治法,选择了补益精血中药何首乌,补肾助阳中药肉苁蓉及养血滋阴、补精益髓的熟地等药组成补肾方,使该方具有阴阳兼补、气血双调、补而不腻的优点。中医学认为:“肾主骨生髓”、“脑为髓之海”,补肾中药可通过“补肾”而“生髓”健脑,增加其记忆功能。

参 考 文 献

1. 官 斌, 莫志红, 莫启忠, 等. 补肾中药对 SRBC 免疫后大鼠脑和免疫组织中 β 和 M 受体功能的影响. 中国免疫学杂志 1993; 9(6): 377—380.
2. 官 斌, 莫启忠, 方 军, 等. 用放射性受体结合分析法研究补肾填精中药对老年大鼠脑组织中神经递质受体的影响. 核技术 1990; 13(2): 120—123.
3. 莫启忠, 官 斌, 方 军, 等. 调理心肾中药对拟痴呆大鼠脑组织中 M 和 GABA 受体功能的影响. 核技术 1992; 15(5): 295—297.
4. 莫启忠, 官 斌, 方 军, 等. 用放射酶分析法研究补肾填精中药延缓脑组织衰老的机理. 核技术 1987; 10(1): 47—49.
5. 莫启忠, 官 斌, 方 军, 等. 固真胶囊延缓老年大鼠脑组织衰老的实验研究. 上海中医学院上海中医药研究院学报 1990; 4(1): 15—18.
6. 赵伟康, 章 连. 固真方对老年大鼠脑内胆碱能神经系统的影响. 上海中医学院上海中医药研究院学报 1990; 4(1): 19—21.
7. 李文彬, 张炳烈, 马向晨, 等. 吡乙酰胺对三氯化铝中毒大白鼠回避反应受损的对抗作用. 中国药理学与毒理学杂志 1988; 5(2): 132—134.
8. 刘祖贻, 杨运高, 郑 兵, 等. 益气温阳法对小鼠记忆行为和脑胆碱酯酶活性的影响. 中国中西医结合杂志 1993; 13(11): 675—676.
9. 施莱夫 RF 主编(章静波等译). 分子生物学实用方法. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 83.
10. 周延冲. 受体生化学. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 57—65.
11. Heny I. Yanmamura. Neurotransmitter Recertor Bioding. New York: Raven Press 1978: 57—91.
12. 李凤珍, 孙曼芳. 微量羟胺比色法测量胆碱酯酶活性. 军事医学科学院院刊 1986; 10(3): 211—214.

(收稿: 1995—05—24 修回: 1995—11—25)