

· 博士之窗 ·

补肾益智方对 Alzheimer 病模型大鼠脑内生长抑素及其 mRNA 表达阳性神经元的影响*

胡镜清¹ 王 奇¹ 梁伟雄¹ 吴根诚² 竺翠娣² 赖世隆¹

内容提要 目的:观察补肾益智方对 D-半乳糖加速衰老加上脑 Meynert 核损毁 Alzheimer 病(AD)模型大鼠脑内生长抑素(somatostatin, SS)的影响。方法:将 15 月龄初老年雌性 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、AD 模型组、双益平对照组和补肾益智方观察组。模型组大鼠以 D-半乳糖腹腔注射加上鹅膏蕈氨酸(ibotenic acid, IBO)脑内 Meynert 核注射造模,双益平对照组和补肾益智方观察组分别在造模的同时灌胃双益平和补肾益智方。运用免疫组织化学和 cRNA 探针原位杂交方法检测大鼠大脑顶叶皮质、海马 CA₁ 和齿状回门区 SS 免疫和 SS mRNA 表达阳性神经元数目。结果:补肾益智方组大鼠脑顶叶、海马 CA₁、齿状回门区 SS 免疫和 SS mRNA 表达阳性神经元的数目及其积分光密度较模型组有增加趋势,部分组间比较有显著性差异。结论:补肾益智方对 D-半乳糖加上 IBO 损毁 Meynert 核 AD 模型大鼠脑内 SS 能神经元有一定程度的保护作用。

关键词 Alzheimer 病 补肾益智方 大鼠生长抑素

Effects of Bushen Yizhi Recipe on Somatostatin-like Immunopositive and Somatostatin Messenger Ribonucleic Acid Expressed-Positive Neurons in Alzheimer's Disease Model Rats HU Jingqing, WANG Qi, LIANG Weixiong, et al *Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (510405)*

Objective: To observe the effect of Bushen Yizhi Recipe (BYD) on somatostatin-like (SS-like) immuno-reactivity and SS mRNA expressed-positive neurons in Alzheimer disease (AD) model rats induced by D-galactose intraperitoneal and ibotenic acid (IBO) intracerebral injection. **Methods:** Fifteen months Wistar rats were randomly divided into 4 groups: normal control; AD model control induced by D-galactose intraperitoneal injection and lesion of basal nucleus of Meynert with IBO; Huperzine A (Hup-A) treated group and BYD treated group fed with Hup-A or BYD respectively. The SS-like immunoreactivity and SS mRNA expressed-positive neurons in parietal lobe, hippocampal CA₁ field and hilus of the dentate gyrus in the brains of rats, which were detected with immunohistochemistry and DIG-labelling cRNA-probe in situ hybridization. **Results:** Counts and integrations of optic density of SS-like immuno-reactivity and SS-mRNA expressed neurons in parietal lobe, hippocampal CA₁ field and hilus of the dentate gyrus in BYD treated group increased compared with AD model rats. **Conclusion:** BYD might protect the SS-ergic system against impairment of D-galactose and IBO in the brains of the AD model rats.

Key words Alzheimer's disease, Bushen Yizhi Recipe, rat somatostatin

我们的前期研究工作表明:补肾益智方对 D-半乳糖加上鹅膏蕈氨酸(ibotenic acid, IBO)损毁脑 Meynert 核的 Alzheimer 病(Alzheimer's disease, AD)模型大鼠的学习记忆能力有一定的保护作用^[1]。为进一步探讨其可能存在的神经生物学机制,我们运用免疫组织

化学及 cRNA 探针原位杂交等方法结合图像分析观察了大鼠有关脑区生长抑素(somatostatin, SS)免疫阳性和 mRNA 表达阳性神经元的变化,现报告如下。

材料与方法

1 动物 15 月龄初老年雌性 Wistar 大鼠 48 只,体重 300~450g,由第一军医大学实验动物中心提供。

2 药物与试剂 补肾益智方由蛇床子、枸杞子、

* 国家“九五”老年性痴呆重点医疗攻关专题(96-906-09-02);国家医药技术创新博士项目(98-B-13)

1. 广州中医药大学(广州 510405);2. 上海医科大学

女贞子、人参等组成,由广东省中医院制剂室制成相当生药 120% (W/V) 浓缩液。双益平片购自上海红旗制药厂(批号: 970101), 每片含石杉碱甲(Hup-A) 0.05mg。D-半乳糖(上海试剂二厂), IBO(Sigma 公司), 多克隆兔抗大鼠 SS 抗体(美国 Pharmingen 公司), DIG 标记大鼠 SS_cRNA 探针(第二军医大学), ABC 免疫组织化学检测药盒(华美公司), DIG 标记核酸检测药盒(德国宝灵曼公司)。

3 分组、造模与给药 大鼠随机分成 4 组, 每组 12 只。其中初老年正常对照组(简称正常组), 腹腔注射生理盐水 6 周及脑内双侧 Meynert 核注射生理盐水; AD 模型组(简称模型组), 腹腔注射 D-半乳糖(48mg/(kg·d)) 6 周和脑内双侧 Meynert 核注射 IBO; 双益平片对照组(简称双益平组), 造模同模型组, 但在腹腔注射半乳糖同时给予双益平片灌胃 6 周(0.3mg/(kg·d)); 补肾益智方观察组(简称补肾方组), 造模亦同模型组, 在腹腔注射半乳糖同时给予灌胃补肾益智方浓缩液 6 周[相当生药量 6g/(kg·d)]。脑内注射在腹腔注射后进行。参照大鼠脑立体定位图谱^[2], Meynert 核定位坐标为 AP - 0.8mm, Lat ± 2.6mm, DV 8.2mm。注射时, 大鼠经戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔注射麻醉后固定在脑立体定位仪上, 每侧 Meynert 核缓慢注射 1μl 的生理盐水或以生理盐水溶解的 IBO(1μl 含 IBO 5μg), 注射时间每侧持续 5min。脑内注射 1 周后处死大鼠灌流取脑。处死取脑前, 正常组、模型组、双益平片组和补肾方组大鼠分别存活 8、8、7 和 9 只。

4 实验方法 大鼠经左心室多聚甲醛灌流取脑, 恒温冰冻连续切片, 片厚 40μm, 含 30% 蔗糖的 0.01mol/L PBS 保护液落片, 然后按有关文献分别进行免疫组织化学和原位杂交反应^[3,4]。

5 图像分析及统计 应用显微图像分析系统(德国 KONTRON 公司, 型号: IBAS Rel 2.0)对各组大鼠顶叶皮质、海马 CA₁ 区和齿状回门区的 SS 免疫阳性和 mRNA 表达阳性神经元分别进行图像分析。测定阳性神经元的积分光密度(积分光密度 = 平均胞体截面积 × 平均光密度); 神经元的数目用显微镜用测微尺

数出(个/mm²)。所得结果均采用 SAS 6.11 统计软件包进行单因素方差分析(ANOVA)。

结 果

1 各组大鼠大脑各脑区 SS 免疫阳性神经元定量分析结果比较 见表 1。结果表明: 大鼠脑内 SS 免疫阳性和 SS_mRNA 表达阳性神经元主要位于下丘脑、大脑皮质如顶叶以及海马结构 CA₁、CA₃ 和齿状回门等区域, 与既往的报道大致相同^[5,6]。

模型组与正常组比较, 顶叶皮质、海马 CA₁ 区和齿状回门区的神经元数目和积分光密度减少均有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。双益平组与模型组比较, 各观察脑区的免疫阳性神经元数目和积分光密度均有增加趋势, 其中顶叶和齿状回的神经元数目增加有显著性差异($P < 0.05$); 但与正常组比较, 各项观察值仍有降低趋势, 其中顶叶积分光密度下降有显著性差异($P < 0.01$)。补肾方组神经元数目和积分光密度均较模型组有所升高, 其中顶叶、CA₁ 区和齿状回神经元数目有显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。补肾方组与双益平组比较无明显差异($P > 0.05$)。补肾方组与正常组比较, 除顶叶积分光密度有显著性差异之外($P < 0.01$), 其余各观察值之间均无显著性差异($P > 0.05$)。

2 各组大鼠各脑区 SS_mRNA 表达阳性神经元定量分析结果比较 见表 2。模型组各观察脑区 SS_mRNA 表达阳性神经元数目和积分光密度均较正常组明显下降($P < 0.01$)。双益平组与模型组比较, 各观察指标均无显著性差异($P > 0.05$), 而与正常组比较则均有下降趋势, 其中顶叶和海马 CA₁ 区的神经元数目和积分光密度与正常组比较均有显著性差异($P < 0.01$)。补肾方组与模型组比较, 各脑区神经元数目和积分光密度均有增加, 其中海马 CA₁ 和齿状回门区的神经元数目和积分光密度的增加有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但与正常组比较, 补肾方组在顶叶和海马 CA₁ 区的细胞数和积分光密度有显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠各脑区 SS 免疫阳性神经元定量分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	顶叶		CA ₁		齿状回	
		细胞数(个/mm ²)	积分光密度	细胞数(个/mm ²)	积分光密度	细胞数(个/mm ²)	积分光密度
正常	8	208.89 ± 54.58	22.97 ± 6.32	256.60 ± 77.60	28.22 ± 8.00	308.92 ± 91.58	23.39 ± 7.17
模型	8	136.19 ± 28.32*	10.87 ± 4.48**	128.64 ± 19.59**	16.04 ± 4.97*	144.26 ± 22.38**	14.26 ± 8.23*
双益平	7	187.43 ± 46.95 [△]	11.72 ± 4.57**	183.90 ± 47.90	23.86 ± 10.26	267.27 ± 96.97 [△]	18.71 ± 2.80
补肾方	9	189.35 ± 57.31 [△]	13.95 ± 3.14**	225.26 ± 70.45 ^{△△}	23.92 ± 5.56	305.51 ± 75.95 ^{△△}	19.94 ± 5.08

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

表 2 各组大鼠各脑区 SSmRNA 表达阳性神经元定量分析结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	顶叶		CA ₁		齿状回	
		细胞数(个/mm ²)	积分光密度	细胞数(个/mm ²)	积分光密度	细胞数(个/mm ²)	积分光密度
正常	8	160.53 ± 49.71	13.70 ± 5.34	191.29 ± 77.60	18.41 ± 5.15	266.80 ± 91.58	19.22 ± 6.45
模型	8	79.35 ± 25.92**	4.79 ± 2.42**	64.60 ± 18.01**	8.46 ± 2.90**	102.15 ± 22.38**	9.79 ± 3.87**
双益平	7	85.14 ± 49.56**	6.84 ± 3.70**	104.30 ± 41.89**	10.34 ± 2.60**	175.63 ± 62.85	13.90 ± 4.66
补肾方	9	82.46 ± 56.81**	7.17 ± 3.02**	133.52 ± 41.81* [△]	13.91 ± 3.86* [△]	248.95 ± 59.58 ^{△△}	18.12 ± 5.67 [△]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

讨 论

SS 作为一种脑肠肽,广泛地分布于中枢神经系统和胃肠道,具有多样而复杂的功能。已有的研究工作表明,中枢内 SS 与学习记忆和 AD 病理过程的关系甚为密切。如有学者在大鼠侧脑室内注射 SS 的特异耗竭剂——半胱氨酸(Cysteamine)后,发现实验大鼠出现活动减弱和明显的学习记忆障碍,同时大脑皮质、海马和下丘脑 SS 显著低于对照组⁽⁷⁾。Matsuka⁽⁸⁾和吴江⁽⁹⁾等观察到 IBO 破坏 Meynert 核后,该组(侧)额叶、顶叶及海马的 SS 水平较对照组(侧)明显下降,同时实验鼠的空间学习记忆能力明显下降。本研究从神经形态学的角度进行观察,结果提示 D-半乳糖亚急性损伤和 IBO 破坏 Meynert 核后,脑内 SS 含量下降除与 SS 能神经元的破坏有关外,还包括 SSmRNA 表达水平下降的病理过程。

补肾方组与模型组比较,各观察指标均有所增加,尤其是海马结构中的 CA₁ 和齿状回门区 SS 免疫阳性神经元与 SSmRNA 表达阳性神经元的数目和积分光密度增加尤为显著,提示补肾益智方对 D-半乳糖加速衰老加上 IBO 损毁脑 Meynert 核的 AD 模型大鼠脑内 SS 能神经元有较好的保护作用。我们推测补肾益智方既可能通过未知的机制部分保护 SS 能神经元免于 D-半乳糖和 IBO 的毒害,又可能通过促进 SSmRNA 的表达,增加 SS 的合成来维持脑内的 SS 浓度,但前者可能是其保护作用的主要方面。此前也有学者观察到某些中药对 AD 患者 SS 水平降低有明显的上调作用⁽¹⁰⁾。目前我们尚不清楚补肾益智方保护脑内 SS 能神经元的具体作用途径。有人对补肾益智方中主药之一蛇床子的主要成分蛇床子素和蛇床子香豆素改善肾阳虚模型大鼠的 SS 水平的作用进行了研究,发现它们均能提高模型大鼠下丘脑和血浆 SS 的水平,同时可以显著改善模型鼠在跳台试验中的成绩⁽¹¹⁾。此实验结果可能会为我们今后进一步探讨补肾益智方的作用环节提供有益的启示。对照药双益平对模型大鼠脑内的 SS 神经元也显示了一定程度的保护作用,但综合效果不及补肾方。其具体机制尚不清楚,是否与石

杉碱甲调节脑内乙酰胆碱的代谢,间接地促进 SS 的合成有关未为可知⁽¹²⁾。

参 考 文 献

1. 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能力保护作用的观察. 广州中医药大学学报 2000;17(2):106—109.
2. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Second edition. Sydney: Academic Press, 1984: Fig21.
3. 汪 谦主编. 现代医学实验方法. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 43—46.
4. 向正华. 应用反义 RNA 探针原位杂交显示大鼠下丘脑生长抑素 mRNA. 解剖学杂志 1990;(4):307—310.
5. Johansson O, Hö kfelt T, Elde RP, et al. Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. Neurosci 1994; 13 (2):265—339.
6. Sloviter RS, Nilaver G. Immunocytochemical localization of GABA-, cholecystokinin-, vasoactive intestinal polypeptide-, and somatostatin-like immunoreactivity in the area dentate and hippocampus of the rat. J Comp Neurol 1987;26:42—60.
7. Bakhit C, Swerdlow N. Behavioral changes following central injection of cysteamine in rats. Brain Res 1986;365:159—163.
8. Matsuka N, Maeda N, Yamaguchi I, et al. Possible involvement of brain somatostatin in the memory formation of rats and the cognitive enhancing action of FR121196 in passive avoidance task. Brain Res 1994;642:11—19.
9. 吴 江,张淑琴,饶明俐,等. Meynert 核破坏的 Wistar 大鼠脑内胆碱乙酰基转移酶和生长抑素活性的变化及其关系. 中风与神经疾病杂志 1995;3(12):130—132.
10. 蔡 琰,杜坤源,谢建钢,等. 中草药治疗 Alzheimer 型老年性痴呆的基础与临床研究. 中国老年学杂志 1994;14(4): 219—222.
11. 秦路平,石汉平,王洪武,等. 蛇床子香豆素对肾阳虚模型大鼠学习记忆和神经肽的影响. 第二军医大学学报 1997;18 (2):147—149.
12. Robbins RJ, Sutton RE, Reichin S et al. Effects of neurotransmitters and cyclic AMP on somatostatin release from cultured cerebral cortical cells. Brain Res 1982;234:377—386.

(收稿:1999-02-12 修回:2000-01-31)