

补肾益智方治疗老年性痴呆模型大鼠的行为学测试*

王怀星¹ 赖世隆² 孙景波² 胡镜清² 王 奇² 梁伟雄²

内容提要 目的:探讨补肾益智方对老年性痴呆(AD)模型大鼠神经行为学的改善作用。方法:用 Morris 水迷宫(MWM)技术对青年组、老年正常组(简称老年组)、AD 模型组(简称模型组)、石杉碱甲(Hup A)组和补肾益智方治疗组(简称治疗组)进行行为学测试。结果:治疗组平均逃避潜伏期(EL)变化曲线位于青年组、老年组和模型组、Hup A 组之间;中环游泳路程百分比、40cm 环游泳时间、跨平台次数治疗组与老年组比较差异无显著性,与模型组比较差异有显著性($P < 0.05$)。结论:补肾益智方对 AD 模型大鼠受损的神经行为学有明显的改善作用。

关键词 补肾益智方 老年性痴呆 行为学测试

Ethological Examination of Alzheimer's Disease Model Rats Treated with Bushen Yizhi Decoction WANG Huaixing, LAI Shilong, SUN Jingbo, et al. Department of Neurobiology, Faculty of Anatomy, Shandong Medical University, Jinan (250012)

Objective: To explore the ethological improving effect of Bushen Yizhi Decoction (BSYZD) in treating model rat of Alzheimer's disease (AD). **Methods:** Ethologic examination was carried out with Morris water maze on young, aged, AD model, Huperzine A treated and BSYZD treated groups of rats. **Results:** In the BSYZD treated group, the escape latency (EL) curve placed between that of the young, aged and AD model, Huperzine A treated group; the percentage of middle circle swim path, the 40 cm circle swimming time, and the platform-crossing times were not different from those in the normal aged group, but were different significantly as compared with the AD model group, $P < 0.05$. **Conclusion:** BSYZD could ameliorate the behavior deficits of AD model.

Key words Bushen Yizhi Decoction, Alzheimer's disease, ethological examination

目前对于老年性痴呆(AD)缺乏理想的治疗方法。自 80 年代中期,在我国中医及中西医结合领域对寻找改善 AD 患者记忆与认知障碍的防治措施进行了可贵的尝试。实验和临床表明人参、枸杞子、银杏叶提取物、绞股蓝、锁阳、淫羊藿、何首乌、女贞子、葛根、丹参、石杉碱甲(Hup A)、黄皮酰胺具有改善实验性记忆障碍、增加老年人记忆能力。AD 的临床研究多用复方形式,从补肾益髓、补气益血、祛痰开窍立法组方用药^[1-3]。本实验根据上述原则遣方用药,观察补肾益智方对 AD 模型大鼠的神经行为学的影响,探讨其作用机理,为 AD 的天然促智药治疗提供新的理论依据。

材料和方法

1 药物 补肾益智方由人参、丹皮、女贞子、何首乌、枸杞子组成,为水提浓缩液,含生药量为 1 mg/ml。由广东省中医医院制剂室提供;HupA 由上海红旗制药厂提供。

2 动物分组与模型制作

2.1 分组 选健康雄性 Wistar 大鼠,青年组(3 月龄)20 只,体重为 150~200g;老年大鼠(20 月龄)60 只,体重为 500~550g,由中山医科大学实验动物中心提供。60 只老年大鼠随机分为 4 组,即老年组、模型组、Hup A 组和治疗组,每组 15 只。

2.2 造模 模型组、Hup A 组和治疗组首先给予腹腔注射用生理盐水配制的 0.96% D-半乳糖,每天 5 ml/kg,共 6 周;之后行鹅覃膏酸(IGF)脑内注射,损毁双侧基底核神经元。基底核的定位坐标参照文献^[4,5]:Bregma - 0.8 mm,旁开 2.6 mm,纵深 7.4 mm。

* 国家科委“九五”攻关项目(No.99-906-09-02)、科技部生命科学技术中心博士基金(No.98-B13)、广东省科委博士基金资助(No.994514)

1. 山东医科大学解剖系神经生物研究室(济南 250012);2. 广东中医药大学第二临床医学院老年脑病研究所

青年组和老年组大鼠腹腔与脑内注射等体积的生理盐水。造模后 1 周给予药物治疗,其中治疗组给予补肾益智方浓缩液,每天 6g/kg 灌胃。Hup A 组给予 Hup A,每天 0.3 mg/kg 灌胃。青年组与老年组给予同体积的生理盐水灌胃。

3 行为学测试 水迷宫的组成、行为测试参照文献^[6,7]。空间探索试验改良为将大鼠在东南象限池壁中点,面向池壁放入水中,测量水面等宽度 3 个同心圆(外环、中环和内环)的游泳距离百分比,40cm 环游泳路程、平台偏离角及跨平台次数。

4 统计学处理 采用 SAS 统计软件,计算受试大鼠第 4、5 天的平均逃避潜伏期(EL)的均数、中环游泳路程百分比、40cm 环游泳路程、平台偏离角、跨平台次数,并做多组间的两两比较。对平均 EL 与中环游泳路程百分比、40cm 环游泳路程、平台偏离角、跨平台次数进行逐步回归、相关分析。

结 果

1 定位航行试验结果 见表 1。青年组和老年组平均 EL 在定位航行试验的前 3 天,逐渐减少,于第 3 天末趋于稳定,潜伏期不再缩短,直至定位航行试验结束。在前 3 天的每一天中,模型组在整个定位航行试验中,EL 一直处于较高水平。Hup A 组在前 3 天有下降的趋势,第 4、5 天其 EL 又趋于上升。治疗组的平均 EL 变化曲线位于青年组、老年组和模型组、Hup A 组之间,总体呈下降趋势。

2 空间探索试验结果 见表 1。

2.1 各组大鼠中环游泳路程百分比结果 按外、中、内 3 个环带测量,青年组、老年组和治疗组的游泳路程主要分布在中环,而模型组和 Hup A 组的游泳路程主要分布在外环。中环游泳路程百分比治疗组与老年组比较差异无显著性,与模型组比较差异有显著性($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠 40cm 环游泳路程测定结果 40cm 环游泳路程治疗组与青年组、老年组比较差异无

显著性,与模型组、Hup A 组比较差异有显著性($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠平台偏离角的测定结果 各组大鼠平台偏离角的比较差异无显著性。

2.4 各组大鼠跨平台次数测定结果 各组大鼠跨平台次数治疗组与青年组、老年组比较差异无显著性,与模型组和 Hup A 组比较差异有显著性($P < 0.01$)。

3 行为学相关和回归分析表明受试大鼠的平均 EL 与空间探索试验中环游泳路程百分比、40cm 环游泳路程、跨平台次数呈负相关($r_1 = -0.7663, P < 0.01; r_2 = -0.7594, P < 0.01; r_3 = -0.7185, P < 0.01$),与平台偏离角度呈正相关($r = 0.4631, P < 0.01$)。受试大鼠的平均 EL 与空间探索试验的中环游泳路程百分比、40cm 环游泳路程、平台偏离角度、跨平台次数的逐步回归分析显示:中环游泳路程百分比、跨平台次数被选入, $Y = 8.8964 + 0.8175 X_1 + 0.8075 X_2$;40cm 环游泳路程、平台偏离角被剔除。

讨 论

1 水迷宫测试为记忆量化的良好方法 认知地图理论是为测试临床退变性脑病(如 AD)动物模型高级神经功能提供理想工具引起的。经典的 Morris 水迷宫(MWM)试验分为两个步骤,先是定位航行试验,测量大鼠获取经验(学习)的能力,以潜伏期表示;第二是空间探索试验,测量大鼠保存经验(记忆)的能力,以跨平台次数及平台象限游泳路程表示。在 MWM 中大鼠需对迷宫周围物体的空间位置进行比较、评价,从而学会寻找和记住 MWM 中平台的位置,爬上平台,逃避溺死。我们曾以大鼠的 EL 为指标探讨记忆减退的神经机制^[6,7],旨在观察减退大鼠以视觉为基础的空间定向能力、定位能力及搜索策略的变化。各组受试鼠产生的记忆属于陈述性记忆,依赖于对信息的获得和回忆的意识表达,依赖于评价、比较和推理等认知过程,由此可见,MWM 实验是测试大鼠学习和记忆较为

表 1 各组大鼠行为学变化的参数测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	EL (s)	中环游泳路程百分比(%)	40cm 环游泳路程(任意单位)	平台偏离角度(度)	跨平台次数(次)
青年	10	22.44 ± 5.47	40.58 ± 7.01	18.59 ± 8.34 [△]	31.90 ± 28.64	6.00 ± 2.36
老年	10	33.89 ± 15.10 [*]	38.59 ± 13.03	18.07 ± 9.41 [△]	40.70 ± 30.16	7.20 ± 5.65
模型	9	53.45 ± 8.00 ^{**△}	14.82 ± 12.99 ^{**△}	3.49 ± 3.93 ^{**△}	57.44 ± 30.30	1.22 ± 1.20 ^{**△}
Hup A	9	50.60 ± 10.97 ^{**△}	20.08 ± 10.77 ^{**△}	6.25 ± 6.02 ^{**△}	59.00 ± 21.80	1.00 ± 0.88 ^{**}
治疗	9	36.04 ± 5.33 ^{△△★★}	32.32 ± 15.38 [△]	14.23 ± 4.59 ^{△★}	39.71 ± 35.20	5.43 ± 0.98 ^{△★★★}

注:与青年组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与老年组比较,[△] $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与 Hup A 组比较,[★] $P < 0.05$,^{★★} $P < 0.01$

可靠的方法。

2 AD 模型大鼠空间记忆和搜索策略的改变
AD 患者基底核胆碱能神经元出现溃变,使投射到大脑皮质的胆碱能神经纤维丢失,患者出现记忆的异常,主要表现为近期记忆障碍^[8-11]。根据此原理,我们用 IBO 损毁大鼠的基底核,破坏其与记忆有关的胆碱能系统,来制造 AD 模型。由于模型组大鼠胆碱能结构的损坏,故表现为整个定位航行试验的动态曲线一直处于高水平。提示不能通过获取的训练建立记忆,表现为严重的记忆减退。

3 补肾益智方行为学康复的机制 Hup A 抑制胆碱酯酶可提供去胆碱能末梢区域的乙酰胆碱的含量,可有一定的治疗作用,但对于基底核胆碱能神经元损毁的 AD 模型未必有明显的疗效,我们的实验结果也证明了这一点。补肾益智方可能通过调节与记忆有关的递质系统,增加其递质合成酶的活性,达到其学习记忆能力的恢复。

记忆能力正常或接近正常的大鼠其游泳轨迹主要分布于平台所在的中环,而记忆减退的大鼠由于以视觉为基础的空间定位记忆的减退,对平台位置不能产生记忆,仍盲目寻找逃生途径,故其游泳轨迹主要分布在无平台的外环。正常老年组大鼠与青年组大鼠之间差异无显著性,提示老年大鼠在总体水平上以视觉为基础的空间记忆能力无明显下降,而模型组大鼠运动轨迹主要分布在无平台的外环,其空间定位记忆能力受到严重损害;Hup A 组大鼠明显低于青年组和老年组大鼠,说明 Hup A 不是通过改善以视觉为基础的空间记忆而发挥作用的。治疗组大鼠空间记忆能力较模型组大鼠有明显地改善,与老年组大鼠差异无显著性。

跨平台次数涉及以视觉为基础的空间定向记忆和空间定位记忆的保持、损伤后的恢复,以及和各组大鼠搜索策略有密切关系。从我们的结果分析,治疗组和模型组大鼠有明显的差别,即补肾益智方有明显的疗效,而 Hup A 的疗效不明显。

40cm 环游泳路程也能显示出补肾益智方的疗效,且明显优于 Hup A。关于与 EL 的逐步回归中被剔除

可能是因为本次实验所选择的水迷宫的水池直径较大,而 40cm 环内的游泳路程在整个游泳路程的抽样太小所造成的。

补肾益智方可能使中枢神经系统中其他部位的与记忆有关结构出现可塑性变化,这种变化可出在不同水平,诸如基因表达、蛋白质的翻译、递质代谢酶的活性和突触可塑性改变。

参 考 文 献

1. 杨 军,魏守建,高丹屏,等.当归芍药散治疗老年性痴呆症的临床研究.安徽中医学院学报 1997;16(3): 61—64.
2. 刘孟渊,刘惠纯.益智中草药的研究概况.中国中西医结合杂志 1995;15(1): 59—61.
3. 陈 楷,陈可冀.中药治疗老年期痴呆初步研究进展.中国中西医结合杂志 1995;15(2): 120—123.
4. Riekkinen PJR, Jakala P, Sirvio J, et al. The effects of THA on scopolamine and nucleus basalis lesion-induced EEG Slowing. Brain Res Bull 1991;26(4): 633—637.
5. Riekkinen PJR, Riekkinen M, Sirvio J, et al. Comparison of the effects of acute and chronic ibotenic and quisqualic acid nucleus basalis lesioning. Brain Res Bull 1991;27(2): 199—206.
6. 王怀星,姚志彬,顾耀铭,等.老年性学习记忆减退大鼠基底前脑 NOS 神经元的形态变化.中山医科大学学报 1997;18(增刊): 1—4.
7. Wang Huaixing, Yao Zhibin, Gu Yaoming, et al. Quantitative changes of NOS and NGFR neuron in septum medialis-diagonal band complex of senile memory deficits rat. Chin J Neuroanat 1998;14(4): 340—344.
8. 马 春,王爱民主编.脑的老化和痴呆.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995: 71—111.
9. 乔治·阿德尔曼主编.神经科学百科全书.上海:上海科学技术出版社,1992: 422—424.
10. 北垣一,森悦朗.老年期痴呆 & MRI.临床精神医学 1997;26: 709—719.
11. 盛树力主编.老年性痴呆:从分子生物学到临床诊治.北京:科学技术文献出版社,1999: 1—22.

(收稿:2000-01-03 第2次修回:2000-06-12)

(上接 726 页)

3. 陈孟华,李丽英,潘辑圣,等.黄芪当归对肾病综合征大鼠肌肉蛋白质代谢的影响.中华肾脏病杂志 1997;13(3): 153.
4. 魏连波,叶任高,陈旭红,等.中西医结合治疗老年人原发性肾病综合征临床观察.中国中西医结合杂志 2000;20(2): 99—101.
5. 丁 炜,李惊子,邹万忠,等.黄芪当归合剂对肾病综合征鼠

转化生长因子 β_1 的影响.中华肾脏病杂志 1998;14(4): 229—232.

6. 胡仲仪,唐利群,陈以平,等.益气活血系列方对膜性肾炎模型基底膜影响的实验研究.中国中西医结合杂志 1999;19(2): 96—99.

(收稿:2000-01-10 修回:2000-06-12)