

氧化损伤类阿尔茨海默病大鼠模型的建立 及调心方的作用*

邱 宏¹ 金国琴¹ 赵伟康² 张学礼¹ 戴薇薇¹ 段艳霞¹ 尤银珍¹ 林水森²

摘要 目的:建立一种简便、经济、实用的氧化损伤类阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)大鼠模型,探讨调心方对该模型大鼠空间学习记忆能力和 β -淀粉样蛋白质(β -amyloid protein, $A\beta$)沉积的影响。方法:采用二羟延胡索酸(DHF)加三氯化铁-二磷酸腺苷($FeCl_3$ -ADP)左侧脑室注射的方法,建立氧化损伤型类AD大鼠模型。Morris水迷宫法观察大鼠空间学习记忆能力;免疫组化法观察大脑皮层 $A\beta$ 沉积及调心方的作用。结果:与对照组比较,模型鼠空间学习记忆能力显著下降,皮层 $A\beta$ 广泛沉积,皮层 $A\beta$ 阳性细胞数和免疫组化着色平均光密度显著增高,调心方对模型鼠上述指标变化有明显的改善作用。结论:氧化损伤模型既能较好地表达AD的临床特征(近期记忆损害),又能部分反应AD的病理变化($A\beta$ 沉积),是一经济实用的氧化损伤类AD大鼠模型,调心方具有改善氧化损伤类AD大鼠空间学习记忆障碍、降低 $A\beta$ 沉积的作用。

关键词 阿尔茨海默病大鼠模型 氧化损伤 空间记忆能力 β -淀粉样蛋白质沉积 调心方

Establishment of Analogous Oxidative Damaged Alzheimer's Disease Rat Model and Effect of Tiaoxin Recipe on It QIU Hong, JIN Guo-qin, ZHAO Wei-kang, et al Basic Medical College, Shanghai University of TCM, Shanghai (200032)

Objective: To establish a convenient, economical and practical analogous oxidative damaged Alzheimer's disease rat model (AD model) for exploring the effect of Tiaoxin Recipe (TXR) on the spatial memory capacity and β -amyloid protein ($A\beta$) deposition in the model. **Methods:** The AD model was established by left ventricular injection of DHF- $FeCl_3$ -ADP. Spatial memory and learning capacity of the model rat was observed by Morris water maze method, $A\beta$ deposition in its cerebral cortex was observed by immunohistochemistry, and the effect of TXR was analysed. **Results:** Compared with the normal group, the spatial memory capacity in the model group was obviously decreased, with $A\beta$ widely deposited in cortex, immunohistochemical examination showed that the number of $A\beta$ positive cells and their mean optic density significantly increased. TXR displayed significantly improving effect on the above-mentioned changes. **Conclusion:** The oxidative damaged model could not only express the clinical characteristics (short-term memory impairment), but also partially reflex the pathological changes ($A\beta$ deposition) of AD, is an economical and practical analogous AD model. TXR has the effects of improving spatial memory impairment and lowering $A\beta$ deposition in the AD model rats.

Key words Alzheimer's disease rat model, oxidative damage, spatial memory capacity, β -amyloid protein deposition, Tianxin Recipe

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性记忆减退、语言和行为障碍为主要临床表现、发病率随年龄逐渐增高的退行性神经疾病,其脑内最明显的病理特征为老年斑和神经元纤维缠结(NFT),其中老年斑主要由 β -淀粉样蛋白质(β -amyloid protein, $A\beta$)沉积而成。我们以二羟延胡索酸(DHF)和三氯化

铁-二磷酸腺苷($FeCl_3$ -ADP)这一自由基生成体系左侧脑室注射的方法,造成氧化损伤型类AD大鼠模型,并以西药胆碱酯酶抑制剂Donepezil(又名Aricept)为对照,观察中药调心方对AD大鼠空间学习记忆能力和脑 $A\beta$ 沉积变化的影响,以进一步探讨调心方治疗AD的作用机理。

* 本课题为国家自然科学基金重点项目(No. 39830450)

1. 上海中医药大学基础医学院(上海 200032); 2. 上海中医药大学老年医学研究所

通讯作者: Tel: 021-54231881 E-mail: qiu_hong@hotmail.com
万方数据

材料与方法

1 动物分组及给药方法 88只SD雄性大鼠,体重(200 ± 10)g,由上海中医药大学实验动物中心提供。大鼠随机分设5组:正常对照组(简称正常组,16只),

手术对照组(12只)、AD模型组(简称模型组,20只)、模型加中药调心方组(简称调心方组,20只)和模型加西药 Aricept 组(简称 Aricept 组,20只)。中药组以相当于成人每天每公斤体重用药剂量的10倍(3.3ml/kg)给药,西药组以成人每天每公斤体重的等效剂量(0.083mg/kg)给药,均由造模前1周给药,每天灌胃1次,连续3周。期间大鼠自由摄食与饮水。

2 药物 调心方由党参、桂枝、茯苓、石菖蒲、远志、炙甘草等中药组成。由上海中医药大学老年医学研究所研制。每毫升调心方口服液含生药7.45g。Aricept,又名 Donepezil,为美国FDA认证的临床用于治疗AD的新一代胆碱酯酶抑制剂,由英国BCM公司生产,批号:HK-42885,每片5mg。

3 试剂与仪器 DHF、抗 β A1-40片段多克隆抗体 Sigma 公司产品;SABC试剂盒、DAB染色试剂盒:武汉博士德(Boster)公司产品。Morris水迷宫:上海中医药大学老年医学研究所研制;P型半导体致冷冰冻切片:德国产:HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文分析系统:同济医科大学千屏影像工程公司生产。

4 实验方法

4.1 氧化损伤大鼠模型的制作 大鼠以2%戊巴比妥钠(40mg/kg体重)腹腔注射麻醉,立体定向仪固定头部,剪去头皮,暴露头骨,于左侧脑室部位(P0.9 L1.4 H3.9)^[1]埋置内径约0.8mm的外套管,以牙脱粉和502胶水固定,不锈钢钢丝制成活套内芯封闭管口。给药时,拔除内芯,以恒速推进泵经外套管向脑室内注射。从手术日起,模型组和药物治疗组各注射DHF(2.4mmol/L)-FeCl₃(43nmol/L)-ADP(1.56 μ mol/L)5 μ l/次,每隔两日注射1次,共3次。手术对照组以等量生理盐水注射。

4.2 空间学习记忆力测试 采用Morris水迷宫法^[2]。平台设于迷宫西南象限正中,水面高出平台1.5cm,水温保持在19~20℃,大鼠连续测试5天,每天2次,分别从正北、正东两个起始点投放,设定最长游动时限为70s,以秒表计时,记录大鼠找到平台所需的时间,或称潜伏期。

5 免疫组织化学法测大脑皮层A β 沉积

表1 氧化损伤AD大鼠空间学习记忆能力变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	潜伏期				
		第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
正常	16	20.8 \pm 8.3	17.3 \pm 8.5	14.1 \pm 9.3	10.3 \pm 5.8	9.9 \pm 6.7
手术对照	12	30.1 \pm 12.9 Δ	19.0 \pm 7.1 Δ	16.4 \pm 8.9 Δ	10.9 \pm 5.7 Δ	8.3 \pm 5.5 Δ
模型	20	43.9 \pm 17.9*	33.1 \pm 23.4*	31.8 \pm 25.1*	25.9 \pm 24.3*	22.2 \pm 24.9*
调心方	20	27.6 \pm 14.1 Δ	18.4 \pm 15.5 Δ	15.9 \pm 9.1 Δ	11.4 \pm 5.4 Δ	11.3 \pm 10.2 Δ
Aricept	20	31.8 \pm 16.8 Δ	21.5 \pm 17.0 Δ	17.2 \pm 13.6 Δ	10.0 \pm 7.1 Δ	8.4 \pm 3.6 Δ

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

5.1 脑组织冰冻切片的制备 大鼠迷宫测试完毕后,以2%戊巴比妥钠(40mg/kg体重)腹腔注射麻醉,开胸,在左心室插入灌注针头,同时剪开右心耳,先用300ml消毒生理盐水冲洗,再以400ml多聚甲醛固定液(4%多聚甲醛,0.1mol/L磷酸缓冲液,pH7.2)灌注固定,维持30min。然后迅速剥取大脑,浸入上述固定液3~6h,再浸入含20%蔗糖的磷酸缓冲液(0.1mol/L,pH7.2),置于4℃冰箱,待组织块下沉后,移入含30%蔗糖的磷酸缓冲液(0.1mol/L,pH7.2),4℃保存。脑组织块在半导体冰冻切片机上连续切片。切片厚30 μ m,收集于原位杂交保护液(蔗糖300g,乙二醇300ml,0.1mol/L PBS 500ml,加DEPC水至1000ml),储存于-20℃。

5.2 A β 沉积测定 采用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法(SABC法)^[3]。一抗为兔抗多克隆抗体,稀释度为1:100,具体步骤按药盒说明操作,略加改进。为鉴别免疫反应信号的特异性,设立阴性对照。取部分脑切片不加一抗,仅放入抗体稀释液中,其他反应步骤相同。

6 图像分析与统计学方法 所有图片采用HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文分析系统,调用细胞测量程序进行图像分析,并选用阳性细胞计数和平均光密度作为评价指标。水迷宫数据采用重复测量设计的方差分析,其余数据采用单因素方差分析,运用SAS 6.12在PC机上进行处理,并采用SNK法进行多组之间的两两比较。

结 果

1 空间学习记忆能力变化 见表1。与正常组比较,手术对照组大鼠潜伏期无显著变化,提示假性手术对大鼠空间学习记忆能力无明显影响;AD模型鼠潜伏期则显著延长($P<0.05$),提示AD模型鼠空间学习记忆能力出现障碍,调心方和Aricept对AD模型鼠延长的潜伏期有明显改善作用($P<0.05$)。

2 大脑皮层A β 沉积变化 见表2。与正常组和手术对照组比较,氧化损伤AD大鼠大脑皮层A β 广泛沉积,皮层A β 阳性细胞数和免疫组化着色平均光密

度显著增高($P<0.05$)。调心方对上述指标变化有明显改善作用($P<0.05$) ,而 Aricept 作用不明显。

表 2 氧化损伤 AD 大鼠大脑皮层 A β 沉积变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	A β 阳性细胞计数	平均光密度(A)
正常	6	58.5 \pm 8.2	0.067 \pm 0.004
手术对照	6	64.5 \pm 10.3 Δ	0.079 \pm 0.008 Δ
模型	8	159.6 \pm 36.1*	0.134 \pm 0.014*
调心方	8	98.3 \pm 39.9 Δ	0.096 \pm 0.011* Δ
Aricept	8	141.9 \pm 41.1*	0.131 \pm 0.008*

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

讨 论

理想的动物模型 ,不仅可以为阐明 AD 的病理机制提供有利的实验手段 ,而且对筛选 AD 的有效治疗药物具有重要意义。根据近年来国外研究提出的 AD 有害网络假说^[4]以及脑组织富含不饱和脂肪酸 ,耗氧量大 ,而抗氧化酶活性相对较低等特点 ,我们认为脑组织极易遭受自由基的氧化损伤。大量自由基一方面引起线粒体结构与功能受损 ,使糖的氧化分解发生障碍 ,乙酰胆碱合成不足 ,影响胆碱能神经元功能 ,引起 AD 患者学习、记忆能力呈渐进性减退 ,另一方面大量自由基使细胞膜脂质过氧化 ,膜通透性增加 ,使大量 Ca²⁺ 内流而失衡 ,而氧自由基的作用和 Ca²⁺ 超载又可促进 AD 脑内 β -淀粉样蛋白沉积及神经元纤维缠结的形成 ,导致神经元功能的退化甚至死亡^[4,5]。因此 ,可以认为氧化损伤是 AD 形成的重要病理因素。

我们参照国外有关文献^[6,7] ,采用 DHF 加 FeCl₃-ADP 这一氧自由基发生系统左侧脑室多次注射的方法 ,造成自由基氧化损伤模型 ,经 Morris 水迷宫测试结果显示 ,氧化损伤大鼠潜伏期明显延长 ,存在明显的空间学习记忆障碍。免疫组化结果显示皮层 A β 广泛沉积。基于得到的实验结果 ,可以认为自由基氧化损伤模型是一经济实用的类 AD 大鼠模型 ,它既能较好地表达 AD 的临床特征(近期记忆损害) ,又能部分反应 AD 的病理变化 ,而且该模型还复制出了能量代谢障碍和钙稳态失衡等病理改变^[8,9] ,尤其是更适用于研究中药的多靶点作用机制和整体调节特点。

中医学把健忘、神志恍惚、心悸、怔忡、癫狂等都纳入“神病”范畴 ,应当从中医学“心主神明”理论出发论治。调心方以党参补中益气、养心增智 ,辅以远志振奋心阳、石菖蒲涤痰通窍、茯苓利窍去湿 ,全方共奏益心气、振心阳、化痰浊、通心窍之功效。用之于临床 ,本方确能有效改善 AD 患者记忆力、智力及认知功能、生活

能力^[10]。现代研究认为 ,中枢胆碱能系统与学习记忆关系密切 ,本实验胆碱酯酶抑制剂 Aricept 对 AD 模型鼠的潜伏期延长有显著的抑制作用亦反证了这一结论 ,中药调心方能明显改善 AD 模型鼠记忆障碍 ,与 Aricept 比较差异无显著性 ,可能与其改善胆碱能系统功能有关^[11] ,而且调心方还能有效降低 AD 大鼠大脑 A β 沉积 ,胆碱酯酶抑制剂 Aricept 则无此作用 ,初步显示了调心方对 AD 病理特征的改善作用 ,其详细机制有待于进一步研究。

参 考 文 献

1 Nitta A , Itoh A , Hasegawa T , et al. β -amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett* 1994 ;179(1): 63—66.

2 Morris R. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984 ;11 (1): 47—60.

3 方福德 ,周 吕.现代医学实验技巧全书.北京 :北京医科大学中国协和医科大学联合出版社 ,1995:165—189.

4 Weihai Ying. Deleterious network : A testable pathogenetic concept of Alzheimer's disease. *Gerontolo* 1997 ;43(4): 242—253.

5 Mattson MP , Lovell MA , Ehmann WD , et al. Comparison of the effects of elevated intracellular aluminum and calcium levels on the neuronal survival and tau immunoreactivity. *Brain Res* 1993 ;603(1): 21—31.

6 Todoki K , Okabe E , Kiyose T , et al. Oxygen free radical-mediated selective endothelial dysfunction in isolated coronary artery. *Am J Physiol* 1992 ;263(3 Pt 2): H806—H812.

7 Sugawara H , Tobise K , Kikuchi K. Antioxidant effects of calcium antagonists on rat myocardial membrane lipid peroxidation. *Hypertens Res* 1996 ;19(4): 223—228.

8 邱 宏 ,金国琴 ,张学礼 ,等.调心方对氧化损伤类 AD 大鼠空间记忆能力和神经元钙稳态的影响. *中药药理与临床* 2001 ;17(5): 22—24.

9 邱 宏 ,金国琴 ,张学礼 ,等.调心方对氧化损伤类 AD 大鼠能量代谢的影响. *中药药理与临床* 2002 ;18(1): 18—21.

10 林水淼 ,杨柏灿.补气活血、调心、补肾、化痰开窍改善早老性痴呆的临床研究. *中药药理与临床研究进展* 1996 ;10: 202—210.

11 周 晖 ,赵伟康.调心方对 β A 大鼠痴呆模型空间学习记忆障碍和胆碱能系统的影响. *中药药理与临床* 1998 ;14(3): 29—31.

(收稿 2002-04-29 修回 2002-12-18)