

## · 博士之窗 ·

补肾方药对去卵巢大鼠端脑、海马晚期糖化终末产物及  $\beta$ -淀粉样肽含量的影响王悦芬<sup>1</sup> 王彦刚<sup>2</sup> 李 恩<sup>1</sup> 孔德娟<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨补肾方药对去卵巢大鼠端脑、海马晚期糖化终末产物(AGEPs)及  $\beta$ -淀粉样肽(A $\beta$ P)含量的影响。方法 将 30 只 9 月龄 SD 雌性大鼠随机分为假手术组、去卵巢组和补肾方药组。于卵巢切除 4 周后灌胃给药,连续治疗 16 周,分别用竞争性 ELISA 法、放免法检测端脑、海马 AGEPs 及 A $\beta$ P 的含量,荧光法检测血清、尿可溶性 AGE-肽的含量,并观察大鼠行为学及海马形态学变化。结果 与假手术组比较,去卵巢组逃避正确率明显降低( $P < 0.01$ ),端脑 A $\beta$ P、血清可溶性 AGE-肽的含量明显升高( $P < 0.05$ );端脑、海马 AGEPs 含量有升高的趋势,但无统计学意义,嗜银染色可见神经纤维增粗,大脑皮质颞叶出现老年斑。补肾方药组端脑 AGEPs、A $\beta$ P 含量及海马 A $\beta$ P 含量明显减少( $P < 0.05$ ),尿中可溶性 AGE-肽明显增加( $P < 0.05$ ),学习记忆以及神经元变性得到明显改善。结论 补肾方药能降低端脑 AGEPs 的积累及端脑、海马组织的 A $\beta$ P 含量,改善由雌激素缺乏所致的学习记忆下降,其机理可能是通过肾脏对 AGE-肽排泄增加实现的。

**关键词** 补肾方药;卵巢切除;学习记忆;晚期糖化终末产物; $\beta$ -淀粉样肽

Effects of Tonifying Shen Recipe on Advanced Glycation End Products, Amyloid- $\beta$  Peptide in Telencephalon and Hippocampus of Ovariectomized Rats WANG Yue-fen, WANG Yan-gang, LI En, et al *Institute of Integrated Chinese Traditional and Western Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050017)*

**Objective** To explore the effect of Tonifying Shen recipe (TSR) on advanced glycation end products (AGEPs), amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ P) in telencephalon and hippocampus of ovariectomized rats. **Methods** Female SD rats, 9 months old, were randomly divided into 3 groups: the sham operation (Sh) group, the ovariectomized (OV) group and the TSR group. Medication via gastrogavage 4 weeks was given after ovariectomy consecutively for 16 weeks. Competitive ELISA and radioimmunoassay (RIA) was used to detect AGEPs and A $\beta$ P level in rats' telencephalon and hippocampus; fluorescent assay was used to determine the serum and urinary soluble AGE-peptide level; and also the rats' behavioral alteration and hippocampal morphological change were observed. **Results** Compared with those in the Sh group, the correct escape rate in the OV group was significantly lower ( $P < 0.05$ ), content of A $\beta$ P in telencephalon and serum soluble AGE-peptide levels significantly higher ( $P < 0.05$ ), contents of AGEPs in telencephalon and hippocampal tissue showed an increased tendency, but without significance ( $P > 0.05$ ), argyrophil stain showed that nerve fiber thickened, senile plaques appeared in temporal cortex. In the TSR group after treatment, contents of AGEPs in telencephalon, A $\beta$ P in telencephalon and hippocampus significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the urinary soluble AGE-peptide level significantly increased ( $P < 0.05$ ) and with markedly improvement of learning memory capability and above-mentioned pathological changes. **Conclusion** TSR could reduce the accumulation of AGEPs in telencephalon and the contents of A $\beta$ P in telencephalon and hippocampal tissue, and improve the impaired ability of learning and memory caused by lack of estrogen. Its mechanism might be based on the elevation in excretion of AGE-peptide via kidney.

**Key words** Tonifying Shen recipe; ovariectomy; learning and memory; advanced glycation end products; amyloid- $\beta$  peptide

老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)在女性的患病率为男性的 1.5~3 倍,提示雌激素缺乏在女性 AD 发生发展中具有重要意义。AD 的发病学说较多,其中晚期糖化终末产物(advanced glycation end products, AGEPs)在老年性痴呆发病中的作用倍受国内外学者关注。糖尿病、氧化应激能加速 AGEPs 蓄积。绝经后由于雌激素水平下降,可导致抗氧化能力下降,糖耐量降低,能否加速 AGEPs 在脑内的形成,补肾中药具有抗衰老及益智作用,是否通过抑制脑内的非酶糖化,减少脑 AGEPs 积累而改善学习记忆,国内外均无报道。为此,本实验采用摘除大鼠卵巢,模拟绝经后状态,观察去卵巢大鼠学习记忆能力以及端脑、海马 AGEPs、 $\beta$ -淀粉样肽(amyloid- $\beta$  peptide, A $\beta$ P)含量,及补肾方药的调整作用,为中医补肾法治疗 AD 提供实验基础。

## 材料与方法

1 动物 选用 9 月龄 SD 雌性大鼠 30 只,体重 320~380g,由河北医科大学实验动物中心提供。

2 药物与试剂 补肾方药(简称中药)由熟地、淫羊藿、肉苁蓉、川芎等组成,由石家庄地区药材公司提供,经我校药用植物教研室鉴定为纯品,按成年人 60 kg 体重剂量的 6.5 倍水煎浓缩至含生药 1.05g/ml,高压灭菌,4℃ 保存备用。A $\beta$ P 试剂盒由解放军总医院科技开发中心放免所提供。

3 仪器 F-4500 荧光分光光度计为日本 Hitachi 公司产品;全自动酶标仪为奥地利产品;Y-电迷路箱为江苏张家港生物医学仪器厂产品;放免测定仪为三六一厂产品。

## 4 方法

4.1 造模及给药方法 将大鼠随机分为假手术组、去卵巢组和中药组,每组 10 只。去卵巢组及中药组行背部切口切除双侧卵巢,假手术组切除同样大小的脂肪。去卵巢 4 周后中药组每日灌服中药 1 次,剂量为 6.3 g(生药)/kg 体重,去卵巢组和假手术组灌服相应体积自来水。治疗 16 周后,测定 Y-迷路学习记忆功能后将全部大鼠股动脉放血处死,分离血清,分装, -20℃ 放置备用。于 4℃ 迅速剥离大脑,左半侧脑组织置于 4% 的多聚甲醛中,迅速剥离右侧端脑和海马组织,并置于 -70℃ 冰箱保存备用。

## 4.2 观察指标及测定方法

4.2.1 Y-迷路学习记忆能力检测 参照郭宗君方法<sup>[1]</sup>,实验采用 Y-电迷路箱在暗室中进行,训练 15 次,记录逃避潜伏期和逃避正确率。

4.2.2 端脑、海马组织 AGEPs 含量测定 多克

隆抗 AGEPs 抗体的制备,参照 Hourich 方法<sup>[2]</sup>。制备海马、端脑组织匀浆液,用竞争性 ELISA 法测定 AGEPs 含量,参照 Vitek 方法<sup>[3]</sup>。

4.2.3 血清、尿 AGE-肽水平测定 参考 Edelstein 方法<sup>[4]</sup>测定荧光强度(激发波长为 370nm,发射波长为 440nm,狭缝 5nm)。

4.2.4 脑组织 A $\beta$ P 的含量测定 脑组织匀浆参照 Howland 方法<sup>[5]</sup>,在 0.2ml 70% 的蚁酸中加 30mg 脑组织匀浆,超速离心(100 000g, 1h),上清液用 1 mol/L Tris-HCl 缓冲液按 1:10 稀释,放免法检测上清液中 A $\beta$ P 的含量。

4.2.5 蛋白测定 均采用 Lowry 法。

4.2.6 组织学观察 分别作 HE 常规染色和嗜银染色(采用改良的 Bielschow-sky 法)染色。

5 统计学方法 用 SPSS 软件进行统计学处理,两组间的数据采用 *t* 检验。

## 结 果

1 3 组大鼠 Y-电迷宫学习记忆能力检测结果比较 见表 1。与假手术组比较,去卵巢组逃避正确率明显降低( $P < 0.01$ ),逃避潜伏期差异无显著性,中药组逃避正确率明显提高( $P < 0.01$ ),逃避潜伏期显著缩短( $P < 0.01$ )。

2 3 组大鼠端脑、海马组织 AGEPs 及 A $\beta$ P 含量测定结果比较 见表 2。与假手术组比较,去卵巢组端脑、海马组织 AGEPs 含量有升高的趋势,但差异无显著性;端脑组织 A $\beta$ P 含量明显增加( $P < 0.05$ ),海马组织 A $\beta$ P 含量有升高的趋势,但差异无显著性。与去卵巢组比较,中药组端脑 AGEPs 含量显著降低( $P < 0.05$ ),海马组织 AGEPs 含量有降低的趋势,但差异无显著性;端脑、海马 A $\beta$ P 含量均显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。

表 1 3 组大鼠 Y-电迷宫学习记忆能力检测结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	逃避正确率 (%)	逃避潜伏期 (s)
假手术	10	65.00 $\pm$ 13.13	8.91 $\pm$ 8.71
去卵巢	10	38.33 $\pm$ 15.14 *	8.73 $\pm$ 7.91
中药	10	60.87 $\pm$ 15.54 $\Delta$	6.92 $\pm$ 4.35 * $\Delta$

注:与假手术组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与去卵巢组比较,  $\Delta$   $P < 0.01$

表 2 3 组大鼠端脑、海马组织 AGEPs 及 A $\beta$ P 含量测定结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	AGEPs (U/mg, pr)		A $\beta$ P (pg/mg, pr)	
		端脑	海马	端脑	海马
假手术	10	23.1 $\pm$ 4.5	8.4 $\pm$ 0.7	364.4 $\pm$ 120.5	18261.5 $\pm$ 7273.5
去卵巢	10	25.8 $\pm$ 6.3	8.9 $\pm$ 0.6	507.3 $\pm$ 148.0 *	33776.4 $\pm$ 10418.1
中药	10	17.7 $\pm$ 7.7 * $\Delta$	8.7 $\pm$ 0.4	176.7 $\pm$ 60.6 ** $\Delta$ $\Delta$	12637.1 $\pm$ 4364.1 $\Delta$

注:与假手术组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与去卵巢组比较,  $\Delta$   $P < 0.05$ ,  $\Delta$   $P < 0.01$

3 3 组大鼠血清、尿 AGE-肽含量测定结果比较见表 3。与假手术组比较,去卵巢组血清 AGE-肽含量明显增加( $P<0.05$ ),尿 AGE-肽含量差异无显著性;中药组血清 AGE-肽含量差异无显著性,尿 AGE-肽含量与假手术组及去卵巢组比较均显著增加( $P<0.05$ )。

表 3 3 组大鼠血清、尿 AGE-肽含量测定结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	AGE-肽(AU/mg·pr)	
		血清	尿
假手术	10	1.26±0.04	2641.10±425.42
去卵巢	10	1.73±0.59*	2429.11±950.83
中药	10	1.61±0.59	3430.33±680.00*△

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与去卵巢组比较,△ $P<0.05$

4 3 组大鼠脑组织病理形态学改变 假手术组大鼠海马锥体细胞排列整齐,层次清楚,胞膜核膜完整,顶树突突起直,粗而长;去卵巢组大鼠海马锥体细胞层、分子层、多形细胞层细胞浓缩,并且出现大小不同空泡,锥体细胞顶树突消失,细胞排列紊乱,嗜银染色可见神经纤维增粗,大脑皮质颞叶出现老年斑。中药组与去卵巢组相比海马组织锥体细胞、颗粒细胞核仁清楚可见,胞膜、核膜完整,细胞排列比较整齐,颗粒变性细胞减少但仍有空泡,嗜银染色神经纤维增粗现象得到改善(图略)。

讨 论

非酶糖化是指在无酶催化条件下,糖的醛基或酮基与蛋白质、脂类等含有自由氨基的物质首先形成可逆的希夫式碱,然后通过重排、氧化和脱水等反应,最后形成稳定的具有特征性荧光的晚期糖化终末产物(AGEPs)的过程。本实验大鼠去卵巢 20 周,去卵巢组学习记忆力明显下降,血清 AGEPs 含量明显增加,端脑、海马组织 AGEPs 含量有升高的趋势,端脑 AβP 含量明显增加,海马神经元出现颗粒空泡变性,嗜银染色可见神经纤维增粗,大脑皮质颞叶出现老年斑,这些与 AD 脑组织特征性病理改变有许多相似之处。AGEPs 在老年性痴呆发病中具有重要作用,AGEPs 可加速 AβP 沉积,Vitce 等<sup>[6]</sup>用体外制备的 AGEPs 修饰的 AβP 作为成核的种子(seed),与未被 AGEPs 修饰的成核 seed 相比,能明显加速可溶性 AβP 的聚集。AGEPs 修饰使 AβP 半衰期延长,致使 AβP 成分沉积增多,AGEPs 通过交联作用募集更多的 AβP,促使淀粉样纤维不断沉积<sup>[7]</sup>,加速老年斑形成。糖基化的 AβP 与晚期糖化终末产物受体(RAGE)的相互作用可激活和诱导小胶质细胞向 AβP 沉积部位移动,激活的“反应性

小胶质细胞”具有细胞毒性并可产生细胞因子而造成神经元的损伤。神经细胞内存在的微管结构主要蛋白 Tau 蛋白寿命较长,易于糖化,糖化的 Tau 蛋白失去其在神经细胞内输送营养物质的正常功能,神经纤维变性、增粗,导致学习记忆力下降。正常人体内 AGEPs 生成进行得很慢,通常只发生于某些转换率很低的蛋白质。本实验去卵巢后由于雌激素迅速下降,抗氧化作用降低<sup>[8]</sup>,可加速 AGEPs 的形成。形成后的 AGEPs 可通过巨噬细胞降解生成可溶性 AGE-肽,进入血液,导致血清 AGE-肽增加,并可通过肾脏及时清除,如肾脏功能受损,不能及时的清除,血液中可溶性 AGE-肽可再次形成 AGEPs<sup>[9]</sup>。

中医学认为“肾主藏精和生殖”,“肾主智,肾虚则智不足”,说明脑髓有赖于肾精不断化生和充养,如果肾中精气不足,气血两亏则脑失滋养而枯萎,萎则神机失用,愚笨呆痴,遇事遗忘。因此对于老年性痴呆患者,中医药多采用补肾壮阳、填补精血方法治疗,治疗机理的研究目前主要集中于提高胆碱能系统功能、提高抗氧化能力、免疫调节、类激素样作用等方面。本实验首次发现补肾中药能增加尿中可溶性 AGE-肽的含量,降低脑组织 AGEPs 积累,从而使脑组织 AβP 的含量减少,改善学习记忆,改善神经元的变性和神经纤维的缠结。

AGEPs 在许多老年性疾病的发病过程中起到了重要作用。随着老龄型社会的到来,越来越多的人致力于寻找有效阻断非酶糖基化反应,抑制 AGEPs 形成的药物。补肾方药可以抑制非酶糖化,将对老年性痴呆等老年退行性疾病的预防和治疗开辟新的途径。

参 考 文 献

1 郭宗君,郭云良,许贞峰,等. 药物诱导大鼠痴呆模型的初步研究. 中国老年学杂志 1999;19(5):295—297.

Guo ZJ, Guo YL, Xu ZF, et al. The experiment of drug induced dementia model of the rats. Chin J Gerontol 1999; 19 (5):295—297.

2 Horiuchi S, Araki N, Morino Y. Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the maillard reaction. J Biol Chem 1991; 266(12): 7329.

3 Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening MJ, et al. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci 1994; 91(5): 4766—4791.

4 Edelstein D, Brownlee M. Mechanistic studies of advanced glycation end products inhibition by aminoguanidine. Diabetes 1992; 41(1): 26—29.

5 Howland DS, Trusko SP, Savage MJ, et al. Modulation of se-

- creted  $\beta$ -amyloid precursor protein and amyloid  $\beta$ -peptide in brain by cholesterol. J Biol Chem 1998; 273(2): 16576—16582.
- 6 Vitce MP, Bhattacharya K, Glendening JM, et al. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 4766—4770.
- 7 Mund G, Mayer S, Michaelis J, et al. Influence of advanced glycation end products and AGE-inhibitors on nucleation-dependent polymerization of beta-amyloid peptide. Biochem Biophys Acta 1997; 1360: 17—29.
- 8 葛喜珍, 孔德娟, 李恩, 等. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠主动

脉晚期糖化终末产物(AGEs)及脂质过氧化的影响. 中药材 2003; 26(1): 26—28.

Ge XZ, Kong DJ, Li E, et al. Effects of isoflavone(ISO) on advanced glycation end products(AGEs) in aortae and serum levels of lipid peroxide in ovariectomized rats. J Chin Med Materials 2003; 26(1): 26—28.

- 9 Yanagisawa K, Makita Z, Shiroshita K, et al. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urina of diabetic patients. Metab 1998; 47(11): 1348—1353.

(收稿 2003-06-30 修回 2003-11-20)

## 胃安乐胶囊治疗慢性胃炎 68 例

刘 玫 刘英茹 刘 英 贾福奎<sup>△</sup>

1997 年 12 月—2002 年 3 月,我们用胃安乐胶囊治疗慢性胃炎 68 例,并与用胃苏冲剂治疗的 60 例作对照,现报告如下。

**临床资料** 观察病例均为本院住院及门诊患者,共 128 例,均经胃镜检查确诊为慢性胃炎,且符合中医脾胃虚弱型胃脘痛。用抽签法随机分为两组,治疗组 68 例,男 36 例,女 32 例,平均年龄  $(44.1 \pm 9.7)$  岁;平均病程  $(6.7 \pm 2.3)$  年;病情程度:轻度 26 例、中度 36 例、重度 6 例;慢性浅表性胃炎活动期 36 例,慢性萎缩性胃炎 32 例;HP 阳性 46 例,阴性 22 例。对照组 60 例,男 36 例,女 24 例;平均年龄  $(43.5 \pm 8.9)$  岁;平均病程  $(6.3 \pm 1.5)$  年;病情程度:轻度 22 例、中度 32 例、重度 6 例;慢性浅表性胃炎活动期 33 例,慢性萎缩性胃炎 27 例;HP 阳性 40 例,阴性 20 例。两组资料经统计学处理差异均无显著性 ( $P > 0.05$ ),具有可比性。

**治疗方法** 胃安乐胶囊是我院贾福奎主任医师 30 年治疗胃病的经验方,由党参、白术、陈皮、半夏、黄连、砂仁、木香、山萘组成,煎煮、浓缩出膏,干燥后装 0 号胶囊,每粒 0.4g (由西安市肇兴制药有限公司生产提供)。治疗组口服胃安乐胶囊 1 次 4 粒,每日 3 次。对照组服用胃苏冲剂(由紫苏梗、香附、陈皮、香橼、佛手、枳壳、槟榔、鸡内金组成,杨子江药业集团生产);每次 1 包(15g)冲服,每日 3 次。两组均连服 2 周为 1 个疗程,共用 2~5 疗程。两组患者在治疗期间均停用其它治疗胃病药物。停药后 3 个月复查胃镜,HP 测定(采用呼气试验),病理情况。统计学方法采用  $t$  检验, Ridit 分析。

### 结 果

1 **疗效判定标准** 根据中华人民共和国卫生部《中药新药临床研究指导原则》标准(中华人民共和国卫生部颁布, 1995:10—15)及胃镜检查等综合判定,分为临床控制、显效、有效及无效。

2 **两组总体疗效** 治疗组 68 例,临床控制 12 例

(17.6%),显效 24 例(35.3%),有效 28 例(41.2%),无效 4 例(5.9%);总有效率为 94.1%;对照组 60 例,临床控制 6 例(10.0%),显效 18 例(30.0%),有效 26 例(43.3%),无效 10 例(16.7%);总有效率为 83.3%。两组总有效率比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ ),治疗组优于对照组。

3 **两组患者治疗后 HP 转阴情况** 治疗组治疗前 HP 阳性 46 例,治疗后转阴 28 例,转阴率为 60.9%,对照组治疗前 HP 阳性 40 例,治疗后转阴 14 例,转阴率为 35.0%,两组 HP 转阴情况比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

4 **两组患者治疗前后胃镜检查情况比较** 见表 1。

表 1 两组患者治疗前后胃镜检查情况比较 (例)

组别	例数		重	中	轻	无
治疗	68	治疗前	6	36	26	0
		治疗后	4	14	38	12
对照	60	治疗前	6	32	22	0
		治疗后	6	26	22	6

5 **远期随访情况** 我们对两组近期临床控制及显效患者分别进行停药 6 个月后随访,治疗组 36 例中有不同程度复发 3 例,对照组 24 例中有复发 5 例,治疗组复发率比对照组低 ( $P < 0.05$ ),对复发者仍按原法治疗,症状亦有不同程度改善。

6 **两组不良反应情况** 两组服药期间均未发现不良反应。血、尿、粪常规,肝、肾功能及心电图检测治疗前后均未见异常。

**讨 论** 慢性胃炎属于中医“胃脘痛”的范畴,认为胃为水谷之海,如若饮食不节,情志失调,脾胃素虚或感受外邪则致胃脘痛,其共同病机为胃气阻滞,失于和降。该方以香砂六君子汤为基础加减化裁而成,方中党参、白术、陈皮、半夏、山萘健脾益气,芳香健胃是主药,木香、枳壳健脾理气,茯苓渗湿健脾,当归养血活血,黄连清热健胃,乌贼骨收涩除湿达到制酸的目的;砂仁燥湿健脾,以炙甘草甘缓和中。诸药合用共奏健脾益气,理气止痛,养血和胃之功,所以取得了较好的疗效。

(收稿 2003-01-15 修回 2003-08-30)