

清心开窍方 3 种提取部位改善阿尔茨海默病大鼠学习记忆能力的机制研究

胡海燕 陈志裕 徐冬梅 张益慧 王逸如 王文花 张晓艳

摘要 **目的** 探讨清心开窍方 3 种提取部位(皂苷成分、挥发油成分、多糖成分)改善阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)大鼠学习记忆能力及其机制研究。**方法** 动物实验采用对照观察法。雄性 SD 大鼠 56 只,称体重后按随机数字表法分为 7 组:正常组、假手术组、模型组、安理申组、皂苷组、挥发油组及多糖组,每组 8 只。采用双侧海马注射 $A\beta_{1-40}$ $2 \mu\text{L}$ ($2.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) 制备 AD 大鼠模型,造模后第 2 天开始灌胃,连续灌胃 2 周(每天上午 10:00 开始),皂苷组、挥发油组、多糖组剂量分别为 $9 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ($2.1 \text{ g}/\text{mL}$)、 $3.33 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ($5.7 \text{ g}/\text{mL}$)、 $8.33 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ($2.28 \text{ g}/\text{mL}$),安理申组给药剂量为 $1.67 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,对照组和模型组予等体积生理盐水。2 周后,采用水迷宫检测各组大鼠学习记忆能力,采用免疫组化法检测 AD 大鼠皮层及海马区突触结合蛋白-1(Syt-1)、白介素-1 β (IL-1 β)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)及 β -淀粉样蛋白前体蛋白(β -APP)表达。**结果** 清心开窍方 3 种提取部位能改善 AD 大鼠学习记忆能力;定位航行试验(逃避潜伏期),多糖组大鼠逃避潜伏期与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),其余治疗组大鼠逃避潜伏期均缩短($P < 0.05$);与安理申组比较,各有效成分组大鼠逃避潜伏期均延长($P < 0.05$, $P < 0.01$)。空间搜索试验(穿台次数),与模型组比较,安理申组及皂苷组大鼠平均穿台次数显著增加($P < 0.05$);与安理申组比较,有效成分组大鼠平均穿台次数显著减少($P < 0.01$)。与假手术组比较,模型组皮层及海马区 Syt-1、IL-1 β 、GFAP 及 β -APP 表达水平升高($P < 0.01$);与模型组比较,皂苷组、挥发油组皮层 Syt-1 表达增加,挥发油组、多糖组皮层 IL-1 β 表达增加,3 种提取部位组海马区 GFAP 表达增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),其余治疗组皮层及海马区 Syt-1、IL-1 β 、GFAP 及 β -APP 表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与安理申组比较,皂苷组、挥发油组、多糖组皮层与海马区 Syt-1、IL-1 β 、GFAP 及 β -APP 表达显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 清心开窍方 3 种提取部位可能是通过降低大鼠皮层及海马区 Syt-1、IL-1 β 、GFAP 及 β -APP 表达发挥抗 AD 的作用。

关键词 阿尔茨海默病;清心开窍方;突触结合蛋白-1;白细胞介素-1 β ;胶质纤维酸性蛋白; β -淀粉样蛋白前体蛋白

Study on the Mechanism of Three Kinds Extracts of Qingxin Kaiqiao Recipe in Improving Learning and Memory Capabilities of AD Rats HU Hai-yan, CHEN Zhi-yu, XU Dong-mei, ZHANG Yi-hui, WANG Yi-ru, WANG Wen-hua, and ZHANG Xiao-yan *Second Clinical College of Wenzhou Medical University, Zhejiang (325003), China*

ABSTRACT **Objective** To explore the mechanism of three kinds extracts (saponins, volatile components, polysaccharide components) of Qingxin Kaiqiao Recipe (QKR) in improving learning and memory capabilities of Alzheimer's disease (AD) rats. **Methods** A controlled comparison method was used. Totally 56 male SD rats were randomly divided into seven groups, i.e., the normal control group, the sham-operation group, the model group, the Aricept group, the saponin group, the benzene group, and the polysaccharide group, 8 in each group. AD rat model was established by bilateral hippocampus injection of $A\beta_{1-40}$ ($2 \mu\text{L}$, $2.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$). The next day after modeling rats in the saponin group, the benzene

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30973780);浙江省自然科学基金资助项目(No.Y2080273);温州市科技局资助项目(No.Y20080106)

作者单位:温州医科大学第二临床学院(浙江 325003)

通讯作者:胡海燕, Tel:13867707082, E-mail:wyzhongyixi@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.05.0595

group, and the polysaccharide group, the saponin group, the Aricept group were intragastrically administered with saponin (at the daily dose of 9 mL/kg, 2.1 g/mL), benzene (at the daily dose of 3.33 mL/kg, 5.7 g/mL), polysaccharide (at the daily dose of 8.33 mL/kg, 2.28 g/mL), Aricept (at the daily dose of 1.67 mg/kg), respectively, once a day for 2 consecutive weeks from 10 am every day. Equal volume of normal saline was intragastrically administered to rats in the normal control group and the model group. Learning and memory capabilities were detected using water maze 2 weeks later. Expression levels of synaptotagmin-1 (Syt-1), interleukin-1 β (IL-1 β), glia fibrillary acidic protein (GFAP), and β -amyloid precursor protein (β APP) in the cortex and hippocampus of AD rats were detected using immunohistochemistry. Results Learning and memory capabilities could be improved by three kinds extracts of QKR. There was no statistical difference in the escape latency between the polysaccharide group and the model group ($P > 0.05$). The escape latency was shortened in the rest treatment groups ($P < 0.05$). The escape latency was obviously prolonged in three kinds extracts of QKR groups, when compared with the Aricept group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, times for crossing platforms were significantly increased in the saponin group and the Aricept group ($P < 0.05$). Compared with the Aricept group, average times for crossing platforms were significantly lessened in three kinds extracts of QKR groups ($P < 0.01$). Compared with the sham-operation group, expression levels of Syt-1, IL-1 β , GFAP, and β APP in the cortex and hippocampus were increased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of cortical Syt-1 increased in the saponin group and the benzene group; the expression of cortical IL-1 β increased in the benzene group and the polysaccharide group; the expression of hippocampal GFAP increased in the three kinds extracts of QKR groups; expression levels of Syt-1, IL-1 β , GFAP, and β APP in the cortex and hippocampus decreased in the rest treatment groups (all $P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the Aricept group, expression levels of Syt-1, IL-1 β , GFAP, and β APP in the cortex and hippocampus were significantly increased in three kinds extracts of QKR groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion Three kinds extracts of QKR might play roles in anti-AD possibly by decreasing expression levels of Syt-1, IL-1 β , GFAP, and β APP in the cortex and hippocampus.

KEYWORDS Alzheimer's disease; Qingxin Kaiqiao Recipe; synaptotagmin-1; interleukin-1 β ; glia fibrillary acidic protein; β -amyloid precursor protein

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年人常见的一种神经退行性疾病,表现为进行性的记忆能力和认知功能下降,并常伴有性格改变。其发病率随年龄增长而增加,由于 AD 的发病原因不明,现代医学对本病尚缺乏理想的治疗方法。本实验所采用方药源自明代著名医学家张景岳《景岳全书》中的“服蛮煎”,去木通,加苦参组成。服蛮煎广泛运用于临床已数百年,疗效稳定,尤其对早期出现症状者效果更佳。临床治疗 AD 能明显改善患者的认知功能障碍、行为和精神症状等^[1-4]。研究表明清心开窍方水煎剂具有改善由杏仁核注射 A β 25-35 所致 AD 大鼠学习记忆能力,其机制与其抗大脑海马和皮层神经细胞凋亡、抗炎性反应等作用有关^[5]。本实验研究其对海马注射 A β ₁₋₄₀所致 AD 模型大鼠学习记忆能力的影响及其皮层及海马区突触结合蛋白-1(synaptotagmin-1, Syt-1)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、胶质纤维酸性蛋白(aglia fibrillary acidic protein,

GFAP)及 β -淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein, β -APP)表达。

材料与方法

1 动物 SPF 级 SD 大鼠 56 只,雄性,3 月龄,体重(250 $\pm$ 20)g,购买于上海斯莱克实验动物有限公司,许可证号:SCXK(沪)2012-002。

2 药物 A β ₁₋₄₀由 Sigma 公司提供,聚集态 A β ₁₋₄₀按说明书配置;清心开窍方由生地 6 g 麦冬 6 g 白芍 6 g 石斛 6 g 丹皮 6 g 茯神 6 g 陈皮 4 g 知母 5 g 石菖蒲 6 g 苦参 6 g 组成,由温州医科大学附属第二医院药剂科提供。盐酸多奈哌齐片(安理申),卫材(中国)药业有限公司生产,批号:100223A,蒸馏水制成浓度 50%的混悬液。

3 试剂与仪器 IL-1 β 免疫组化试剂盒、A β 免疫组化试剂盒、GFAP 免疫组化试剂盒、SABC 试剂盒、DAB 显色剂由北京中杉生物有限公司提供。

BMJ-1 生物组织包埋机(天津航空机电公司)。
Shandon325 型石蜡切片机(英国 Shandon 公司)。
LEICA DM LB2 型双目显微镜(德国 LEICA 公司)。
Morris 水迷宫(上海吉量软件科技公司)。Motic B5
显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司)。

4 清心开窍方 3 种提取部位提取

4.1 皂苷成分提取 经水提醇沉法得到浓度
80%的初提药液,然后采用乙醚、乙酸乙酯、正丁醇等
提取分离,得到含 70%总皂甙成分的清心开窍方有效
部位^[6]。

4.2 挥发油成分的提取 采用 CO₂ 超临界萃取
法分离清心开窍方挥发性成分^[7]。

4.4 多糖成分的提取 采用水提醇沉法得清心
开窍方总多糖^[8]。清心开窍方药材 10 倍水量,煎煮
1 h,过滤,滤渣再加 8 倍量水煎煮 1 h,合并过滤液,
浓缩至 2 倍体积。冷却后,加入 95%乙醇使含醇量达
到 60%,静置 24 h。过滤,沉淀冻干后 Seavage 除蛋
白即可。

5 AD 模型制备及分组 借助脑立体定位仪和
微量注射泵给予大鼠双侧海马注射 Aβ₁₋₄₀ 片段以建
立 AD 模型。具体方法为:大鼠经环境适应性饲养 1
周后,于造模前进行 Morris 水迷宫训练^[9] 3 天,剔除
差异明显者。选取 56 只,称体重后按随机数字表法
分为 7 组:正常组、假手术组、模型组、安理申组、皂苷
组、挥发油组及多糖组,每组 8 只。正常组不进行任何
手术处理,剩余组经 10%水合氯醛(3~4 mL/kg 体重)
麻醉后固定在备有加热垫的大鼠脑立体定位仪上,去毛
备皮,用 75%酒精消毒后,切开颅骨外皮肤,去除骨膜,
寻找前囟(Bregma)位置,然后参照 George P 等^[10]
编写的大鼠脑定位图谱,以 Bregma 为 0 点,后 3 mm,
左右旁开 1.5 mm 钻颅骨打孔,之后使用连接微量注射
器的微量泵,经打孔处进针,深入颅内 3 mm 后,假手术
组大鼠双侧海马内注射 2 μL ddH₂O,剩余 5 组大鼠双
侧海马内注射浓度为 2.5 μg/μL 的老化的 Aβ₁₋₄₀
2 μL,注射速度均为 0.5 μL/min,注射结束后留针
10 min。退针缝合头皮,使用碘伏棉球对切口消毒。

6 干预方法 造模后第 2 天开始灌胃,连续灌
胃 14 天(每天上午 10:00),皂苷组、挥发油组、多糖
组剂量分别是 9 mL/(kg·d)(2.1 g/mL)、
3.33 mL/(kg·d)(5.7 g/mL)、8.33 mL/(kg·d)
(2.28 g/mL),安理申组给药剂量为 1.67 mg/(kg·d),
对照组和模型组予等体积生理盐水,给药剂量参照陈
奇主编的《中药药理研究方法学》书籍中人与实验用
动物给药剂量换算公式^[6]。

7 观察指标及方法

7.1 行为学检测方法 采用 Morris 水迷宫法。
本实验采用上海吉量软件科技有限公司研制开发的
Morris 水迷宫视频分析系统进行信息处理,该系统动
态记录大鼠在水迷宫中游泳的录像资料,设定相关的
分析参数,进行数据分析,并提供大鼠上台潜伏期、靶
象限活动时间百分比、穿台次数、游泳路程、游泳速度
等多个指标。实验开始前 1 天,先撤掉水池中的平台,
于任一象限投入点投放大鼠,自由地游泳 2 min 使其
熟悉水迷宫环境,并观察大鼠游泳的速度和姿势以剔
除差异显著的大鼠。Morris 水迷宫测试内容:定位航
行试验、空间搜索试验。水迷宫实验全部是在给药结
束后开始,在水池中注入清水,水面高出平台 2 cm,水
温控制在(21±1.5)℃。

7.1.1 定位航行试验(逃避潜伏期) 此试验造
模前训练 3 天,造模后训练 4 天,每天训练 4 次,共
16 次。平台置于某一象限中间,在其他 3 个象限中任
选一入水点,将大鼠面向池壁放入水中,观察并记录大
鼠在水中游泳寻找并爬上平台的路线图、所需的时间
(即潜伏期),潜伏期的时间长短作为学习记忆能力的
指标。设定最长游动时限为 60 s,如果大鼠在 60 s
内未找到平台,需将其引至平台并停留 10 s 以强化记
忆,这时所需时间记为 60 s。

7.1.2 空间搜索试验(穿台次数) 造模前后定
位航行试验结束后第 2 天进行空间搜索试验。撤去平
台,大鼠投入水中的方法及次数同前,记录大鼠 60 s 内
穿越原平台位置的次数,作为空间探索能力的指标。

7.2 大鼠皮层和海马区 Syt-1、IL-1β、GFAP 及
β-APP 免疫组织化学检测 末次给药结束后第 2 天
处死动物,冰台上迅速取出大脑组织,放入 4%多聚甲
醛固定液中固定,将固定好的大脑组织取出,室温下经
梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,切片厚度
5 μm。按照免疫组化试剂盒说明书进行染色与检测,
采用图像分析系统,每组选取 6 张切片,每张切片随机
观察 5 个视野,精确选取视野内所有阳性颗粒,计算机
自动计算出面密度(阳性目标总面积/统计场总面积),
用于定量表达免疫组化阳性反应程度。

8 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件处
理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数比较采用单
因素方差分析,组间方差分析用 F 检验,组间两两比较
用 SNK-q 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠各时间点逃避潜伏期及跨越平台次

数比较(表 1、2) 造模后前 3 个训练日同一组大鼠逃避潜伏期逐渐缩短;第 4 日开始趋于平稳。造模后正常组与假手术组大鼠逃避潜伏期差异无统计学意义($P>0.05$);与假手术组比较,模型组大鼠各时间点逃避潜伏期显著延长($P<0.01$);与模型组比较,多糖组大鼠逃避潜伏期差异无统计学意义($P>0.05$),其余治疗组大鼠各时间点逃避潜伏期均缩短($P<0.05$);与安理申组比较,各有效成分组大鼠各时间点逃避潜伏期均延长($P<0.05$, $P<0.01$)。空间搜索试验(穿台次数)造模前,各组大鼠之间平均穿台次数比较差异无统计学意义($P>0.05$)。造模后,正常组与假手术组比较,平均穿台次数比较差异无统计学意义;与假手术组比较,模型组大鼠平均穿台次数显著减少($P<0.01$);与模型组比较,安理申组及皂苷组大鼠平均穿台次数显著增加($P<0.05$),而挥发油组及多糖组大鼠平均穿台次数与模型组大鼠平均次数比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与安理申组比较,有效成分组大鼠平均穿台次数显著减少($P<0.05$, $P<$

0.01)。
2 大鼠皮层和海马区 Syt-1 及 β -APP 表达水平比较(表 3,图 1、2) 正常组与假手术组皮层与海马区 Syt-1 及 β -APP 表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与假手术组比较,模型组皮层与海马区 Syt-1 及 β -APP 表达显著增加($P<0.01$);与模型组比较,挥发油组海马区与皮层 β -APP 表达及多糖组皮层 Syt-1 与 β -APP 海马区及皮层表达比较差异无统计学意义($P>0.05$),其余各治疗组皮层与海马区 β -APP 表达及海马区 Syt-1 表达减少($P<0.05$, $P<0.01$),安理申组皮层 Syt-1 表达减少,皂苷组及挥发油组皮层 Syt-1 表达增加($P<0.01$);与安理申组比较,皂苷组、挥发油组及多糖组皮层与海马区 Syt-1 及 β -APP 表达显著增加($P<0.05$, $P<0.01$)。
3 大鼠皮层和海马区 IL-1 β 及 GFAP 表达水平比较(表 4,图 3、4) 正常组与假手术组皮层与海马区 IL-1 β 及 GFAP 表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$);与假手术组比较,模型组皮层与海马区 IL-1 β

表 1 造模前各组大鼠各时间点逃避潜伏期及穿台次数比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	逃避潜伏期(s)			穿台次数 (次)
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	
正常	8	46.22 $\pm$ 6.17	30.05 $\pm$ 3.07	20.81 $\pm$ 2.51	5.13 $\pm$ 1.03
假手术	8	47.65 $\pm$ 7.85	29.79 $\pm$ 2.95	21.69 $\pm$ 2.72	4.97 $\pm$ 0.89
模型	8	47.59 $\pm$ 8.09	31.02 $\pm$ 4.44	20.84 $\pm$ 1.35	5.10 $\pm$ 1.12
安理申	8	46.15 $\pm$ 5.33	28.78 $\pm$ 3.06	20.04 $\pm$ 2.77	5.01 $\pm$ 1.11
皂苷	8	45.38 $\pm$ 8.55	31.11 $\pm$ 5.85	21.73 $\pm$ 5.69	5.12 $\pm$ 1.37
挥发油	8	47.21 $\pm$ 8.79	30.45 $\pm$ 7.01	19.74 $\pm$ 5.11	5.06 $\pm$ 1.29
多糖	8	46.02 $\pm$ 9.31	29.81 $\pm$ 7.84	21.18 $\pm$ 4.31	5.03 $\pm$ 1.39

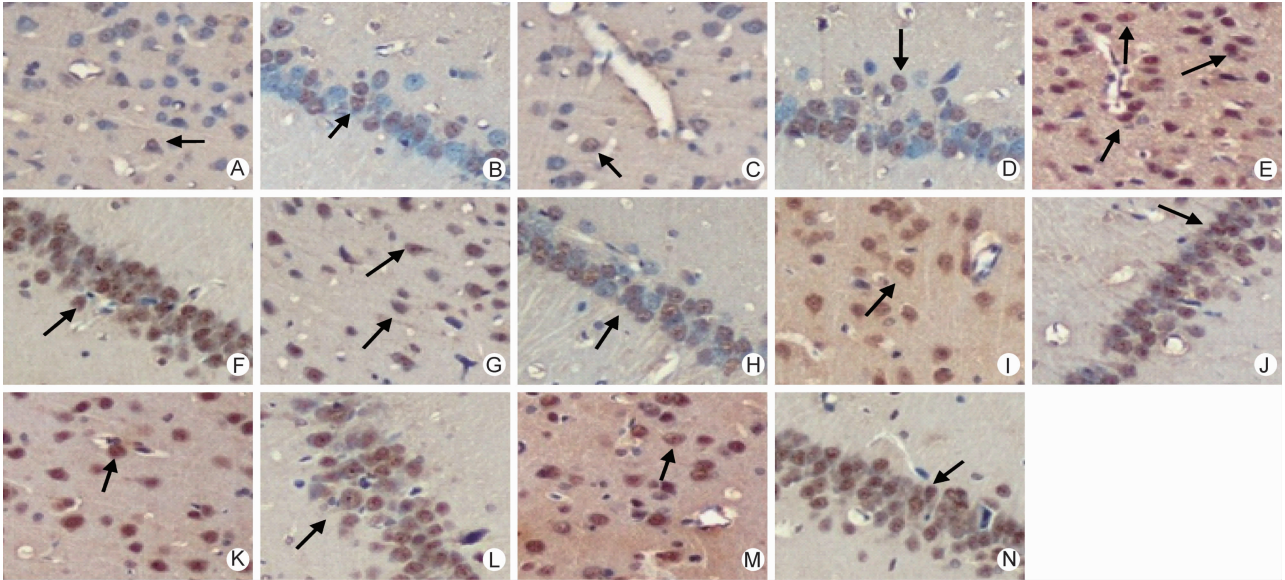
表 2 造模后各组大鼠各时间点逃避潜伏期及跨越平台次数比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	逃避潜伏期(s)				穿台次数(次)
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	
正常	8	30.17 $\pm$ 9.21**	19.18 $\pm$ 5.17**	9.31 $\pm$ 3.15**	8.26 $\pm$ 2.35**	5.09 $\pm$ 1.33**
假手术	8	31.61 $\pm$ 10.12**	22.35 $\pm$ 5.63**	10.17 $\pm$ 4.22**	8.09 $\pm$ 3.13**	4.82 $\pm$ 1.21**
模型	8	38.44 $\pm$ 12.36	32.16 $\pm$ 6.20	18.33 $\pm$ 4.26	14.72 $\pm$ 4.33	2.59 $\pm$ 0.52
安理申	8	34.89 $\pm$ 10.98*	29.25 $\pm$ 5.33*	10.06 $\pm$ 3.18*	10.09 $\pm$ 2.92*	4.28 $\pm$ 0.97*
皂苷	8	35.86 $\pm$ 9.57* Δ	30.01 $\pm$ 6.80* Δ	13.04 $\pm$ 3.40* Δ	11.09 $\pm$ 3.06* Δ	3.46 $\pm$ 0.98* Δ
挥发油	8	37.14 $\pm$ 10.15* Δ	31.13 $\pm$ 6.83* Δ	14.60 $\pm$ 2.76* Δ	12.98 $\pm$ 2.49* Δ	2.76 $\pm$ 0.92 $\Delta\Delta$
多糖	8	38.23 $\pm$ 10.73 Δ	32.17 $\pm$ 5.72 Δ	18.19 $\pm$ 3.86 $\Delta\Delta$	13.94 $\pm$ 2.79 Δ	2.69 $\pm$ 0.74 $\Delta\Delta$

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与安理申组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;下表均同

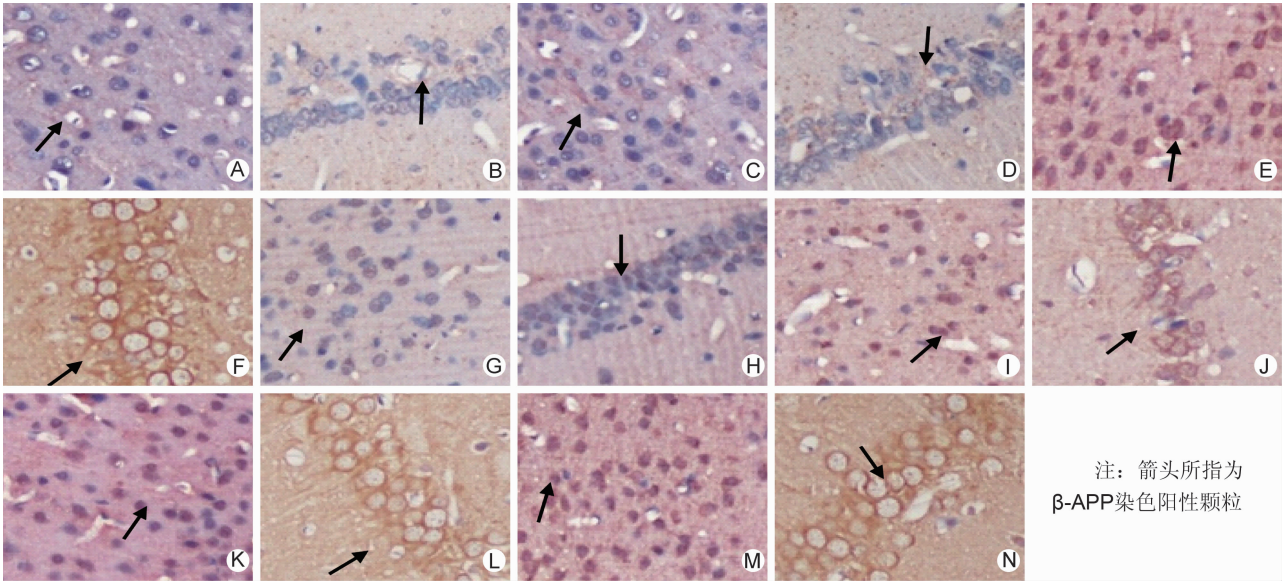
表 3 各组大鼠皮层与海马 Syt-1 及 β -APP 表达水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Syt-1 (面密度)		β -APP (面密度)	
		海马	皮层	海马	皮层
正常	6	0.051 $\pm$ 0.003 1**	0.119 $\pm$ 0.008 3**	0.059 $\pm$ 0.003 7**	0.098 $\pm$ 0.003 8**
假手术	6	0.056 $\pm$ 0.004 1**	0.118 $\pm$ 0.007 6**	0.061 $\pm$ 0.003 8**	0.099 $\pm$ 0.007 3**
模型	6	0.226 $\pm$ 0.010 1	0.174 $\pm$ 0.007 0	0.212 $\pm$ 0.016 4	0.218 $\pm$ 0.014 1
安理申	6	0.146 $\pm$ 0.005 8**	0.143 $\pm$ 0.004 4**	0.187 $\pm$ 0.007 3**	0.190 $\pm$ 0.009 0**
皂苷	6	0.170 $\pm$ 0.002 2** $\Delta\Delta$	0.220 $\pm$ 0.017 8** $\Delta\Delta$	0.198 $\pm$ 0.006 1* Δ	0.204 $\pm$ 0.004 8* $\Delta\Delta$
挥发油	6	0.176 $\pm$ 0.004 9** $\Delta\Delta$	0.251 $\pm$ 0.006 8** $\Delta\Delta$	0.209 $\pm$ 0.008 4 $\Delta\Delta$	0.216 $\pm$ 0.009 3 $\Delta\Delta$
多糖	6	0.200 $\pm$ 0.005 1** $\Delta\Delta$	0.274 $\pm$ 0.012 4 $\Delta\Delta$	0.210 $\pm$ 0.015 6 Δ	0.217 $\pm$ 0.016 9 $\Delta\Delta$



注:A、B 为正常组,C、D 为假手术组,E、F 为模型组,G、H 为安理申组,I、J 为皂苷组,K、L 为挥发油组,M、N 为多糖组;A、C、E、G、I、K、M 为大脑皮层区,B、D、F、H、J、L、N 为大脑海马区;下图均同;箭头所指为 Syt-1 染色阳性颗粒

图 1 各组大鼠大脑皮层及海马区 Syt-1 表达 (免疫组化,皮层:×200,海马:×400)



注:箭头所指为
β-APP染色阳性颗粒

图 2 各组大鼠大脑皮层及海马区 β-APP 表达 (免疫组化,皮层:×200,海马:×400)

表 4 各组大鼠皮层与海马 IL-1β 及 GFAP 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1β (面密度)		GFAP (面密度)	
		海马	皮层	海马	皮层
正常	6	0.097 ± 0.006 3 **	0.064 ± 0.004 5 **	0.049 ± 0.003 0 **	0.053 ± 0.002 8 **
假手术	6	0.101 ± 0.006 5 **	0.066 ± 0.004 1 **	0.053 ± 0.002 4 **	0.052 ± 0.003 5 **
模型	6	0.160 ± 0.004 9	0.155 ± 0.005 7	0.286 ± 0.028 4	0.313 ± 0.019 5
安理申	6	0.121 ± 0.002 2 **	0.125 ± 0.003 7 **	0.179 ± 0.017 5 **	0.133 ± 0.013 4 **
皂苷	6	0.126 ± 0.002 8 **△	0.140 ± 0.006 3 **△△	0.291 ± 0.013 6 **△	0.161 ± 0.002 6 **△△
挥发油	6	0.132 ± 0.005 5 **△△	0.175 ± 0.004 3 **△△	0.325 ± 0.009 5 **△△	0.223 ± 0.025 5 **△△
多糖	6	0.140 ± 0.002 3 *△△	0.220 ± 0.015 9 *△△	0.344 ± 0.015 5 *△△	0.279 ± 0.023 1 *△△

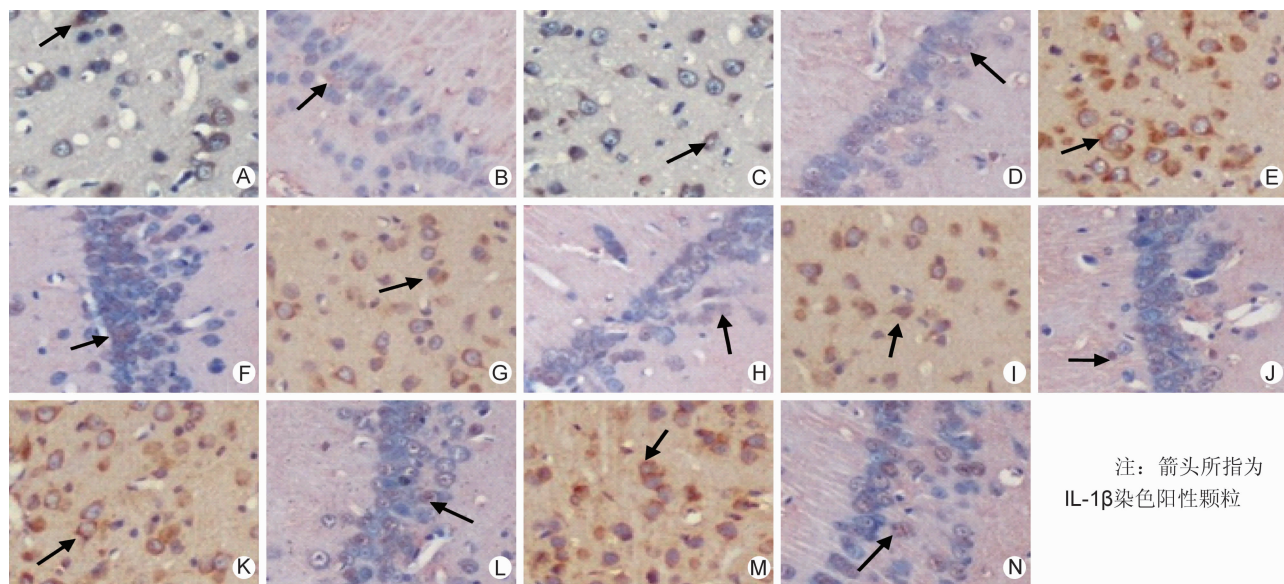


图3 各组大鼠大脑皮层与海马区 IL-1 β 表达 (免疫组化, 皮层: $\times 200$, 海马: $\times 400$)

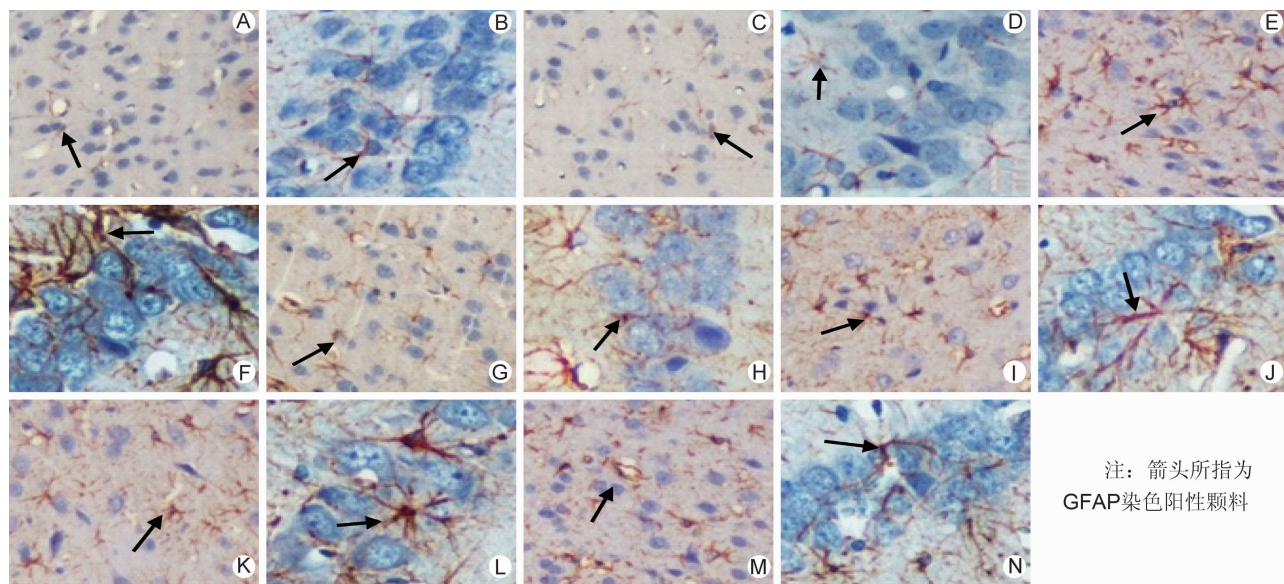


图4 各组大鼠大脑皮层与海马区 GFAP 表达 (免疫组化, 皮层: $\times 200$, 海马: $\times 400$)

及 GFAP 表达显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各治疗组海马区 IL-1 β 及皮层 GFAP 表达减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 安理申组、皂苷组皮层 IL-1 β 及安理申组海马区 GFAP 均表达减少 ($P < 0.01$), 挥发油组、多糖组皮层 IL-1 β 与皂苷组、挥发油组、多糖组海马区 GFAP 表达增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与安理申组比较, 皂苷组、挥发油组、多糖组皮层与海马区 IL-1 β 及 GFAP 表达显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨 论

AD 是老年人中最常见的中枢神经系统退行性疾病, 其首要症状是智力、记忆力、感官定向力、判断力、

语言思维能力不可逆的进行性退化, 常伴有性格改变。据不完全统计, 全世界超过 3 700 万罹患 AD^[11]。来自我国的流行病学研究表明, AD 在我国老年人群的发病率逐年上升, 并且与患者的年龄呈线性关系, 在我国大约 400 万老年痴呆患者中, AD 占了一半及以上^[12]。该病的发病阶段与年龄有一定关系, 在 65 岁及以上的痴呆患者占人群的 5.4%, 85 岁及以上老年人群中, 患病率超过 50%, 随着我国平均人口寿命的延长, 这一数字的绝对值将成倍的增长^[13]。由于 AD 主要病理特征是老年斑 (senile plaque, SP), 神经元纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT), 神经元大量丢失。而 SP 的核心成分为 β -淀粉样蛋白 (β -am-

lyoid, A β), A β 来源于淀粉样蛋白前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP), 是 APP 经 β -分泌酶水解的产物。目前普遍认为聚集状的 A β 具有神经毒性, 越来越多的证据证明 A β 在脑内沉积是 AD 早期的主要病理变化^[14,15]。

学习记忆是人和动物生存和进化所必须的, 学习是接受外界环境信息的神经过程, 而记忆则是脑内储存、加工和提取所获得的信息或经验的过程。学习记忆是一个极其复杂的神经过程, 它的顺利执行依赖于神经元之间精确的信息交流能力, 这种信息交流往往通过突触传递, 即神经末梢突触囊泡 (synaptic vesical, SV) 快速释放神经递质来实现, 突触囊泡和突触前膜融合是突触传递的基础^[16]。

Syt 和 SNARE 是突触传递过程中的两种重要蛋白质。其中前者属于突触前囊泡蛋白, 是涉及神经递质释放过程和脑的学习记忆等生理功能的关键蛋白之一^[17]。在脊椎动物中已经发现有 16 种 Syt 亚型^[18], Synaptotagmin-1 (Syt-1) 是 Syt 家族中含量最为丰富的主要组成部分^[19], 主要分布在大脑皮质和海马^[20]。Syt-1 通过调节神经递质释放进一步影响突触可塑性, 进而影响学习记忆^[21,22]。APP 和 Syt-1 共定位于突触前膜, 病理状态下 APP 经 β -分泌酶水解生成的 A β 可能直接通过 Syt-1 影响学习记忆^[23]。

中枢免疫过程的主要介体是胶质细胞, 尤其是星形胶质细胞和小胶质细胞, 两者的激活是 AD 发病的一个重要环节。GFAP 是星形胶质细胞的标志物。AD 患者大脑中 GFAP 水平可提高 8~16 倍。已证实 A β 的神经毒性作用机制之一是通过 A β 激活胶质细胞活化, 分泌大量炎性细胞因子, 如 IL-1, IL-6 等, 促进脑内炎症反应, 增加 A β 的前体 β -APP 的表达, 提高 A β 水平, 加速 A β 在脑内的沉积, 导致神经元损伤, 促使 AD 的病理过程^[24-26]。由于其提高 A β 水平, 加速 A β 在脑内的沉积, 因此通过 Syt-1 影响学习记忆。

本实验采用方药源自明代医学家张景岳所著《景岳全书》中的“服蛮煎”, 由生地、麦冬、芍药、石菖蒲、石斛、牡丹皮、茯神、陈皮、知母、去木通, 加苦参而成, 具有清心凉血开窍功效。景岳在书中写到: “痴呆症凡平素无痰而或以郁结, 或以不遂, 或以思虑, 或以疑惑, 或以惊恐而渐致痴呆, 言辞颠倒, 举动不经, 或多汗, 或善愁, 其证则千奇万怪, 无所不至, 脉必或弦或数, 或大或小, 变易不常。此其逆气在心, 或肝胆二经气有不清而然, 但察其形体强壮, 饮食不减, 别无虚脱等证, 则悉宜服蛮煎治之, 最稳最妙”, 并谓此方: “性

味极轻极清, 善入心肝两脏, 行滞气, 开郁结, 通神明, 养正泻邪, 大有奇效”^[27]。清代名医徐灵胎认为: “苦参以苦为治也, 苦入心, 寒治火, 故苦参专治心经之火”与黄连功用相近^[1]。现代研究发现苦参能明显抑制小鼠的自主活动, 拮抗苯丙胺和咖啡因的中枢兴奋作用, 增强戊巴比妥钠及水合氯醛的中枢抑制作用^[3]。服蛮煎是用于治疗 AD 的有效方剂, 已广泛运用于临床多年, 且疗效显著, 尤其对早期出现症状者效果更佳, 临床治疗 AD 能明显改善患者的认知功能障碍、行为和精神症状等^[1-3]。

在本实验结果显示: 模型组及各治疗组皮层与海马 Syt-1 的表达较对照组明显增多, 与王龙海等^[28]研究结果一致。同时模型组及各治疗组皮层与海马 IL-1 β 、GFAP 及 β -APP 的表达较对照组也明显增多, 提示脑内炎性反应的存在可能是导致 Syt-1 增加的原因之一, 从而影响学习记忆能力。而 Counts SE 等^[29]和 Byong CY 等^[30]发现中晚期认知功能障碍的 AD 患者中 Syt-1 的表达较少, 与本研究的结果不符, 可能由于本实验模型是急性发病模式, 并且仅检测了造模后第 15 天的 Syt-1 表达, 而不能充分探明 Syt-1 的表达与 AD 学习记忆的时间相关性。目前, 不同研究对学习记忆过程中脑内 Syt-1 表达量的变化结论尚不一致, 这可能与研究部位及疾病阶段不同有关, 其具体机制还有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王宇锋, 颜乾麟. 运用清法治疗阿尔茨海默病的经验[J]. 江苏中医药, 2004, 25(3): 10-11.
- [2] 洪文, 张景岳关于痴呆病的学术思想[J]. 河北中医, 2000, 22(7): 551-552.
- [3] 颜乾麟, 邢斌. 阿尔茨海默病中医治疗目的和方法的拓展[J]. 中医杂志, 2003, 44(10): 725-726.
- [4] 黄建, 郭丽娃. 张景岳中医心身医学思想辨析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(2): 153-155.
- [5] 朱未名, 胡海燕, 陈翔, 等. 大鼠双侧杏仁核注射 A β 25-35 对学习记忆与皮质区 Bax、Bcl-2 表达的影响及清心开窍方皂苷的干预作用[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(6): 1208-1212.
- [6] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 69-71.
- [7] 谭晓梅, 陈龙飞. 超临界 CO₂ 萃取法与水蒸气蒸馏法提取的北五味子挥发油成分分析[J]. 中药材, 2002, 25(11): 796-797.
- [8] 吴枫, 朱丹妮, 林志宏, 等. 当归芍药散防治老年期痴呆的物质基础与作用机理研究 IX—当归芍药散精简方多糖部位的抗氧化作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,

- 2007, 13(7): 23-26.
- [9] 陈罗西, 郭玲玲, 李亮. Morris 圆形水迷宫的应用及其相关检测指标分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(8): 55-57.
 - [10] George P, Charles W. The rat brain in stereotaxic coordinates[M]. 3rd ed. Beijing: People's Health Publishing House, 2005: 30-36.
 - [11] Salloway S. Introduction: the prevalence of Alzheimer's disease: a growing crisis[J]. CNS Spectr, 2008, 13(Suppl): 1-3.
 - [12] 屈秋民. 西安地区中老年人的痴呆患病率调查[J]. 中华老年医学杂志, 2001, 20(4): 283-286.
 - [13] 闫国立. 阿尔茨海默病危险因素 Logistic 回归分析[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(9): 1903-1904.
 - [14] Malin DH, Crothers MK, Lake JR, et al. Hippocampal injections of amyloid β -peptide₁₋₄₀ impair subsequent one-trial/day reward learning [J]. Neurobiol Learn Mem, 2001, 76(2): 125-137.
 - [15] Moir RD, Tanzi RE. LRP-mediated clearance of A β is inhibited by KPI-containing is form of APP[J]. Curr Alzheimer Res, 2005, 2(2): 276-280.
 - [16] Neher E, Sakaba T. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release[J]. Neuron, 2008, 59(6): 861-872.
 - [17] Yoshiharz M, Montana ES. The synaptotagmins: calcium sensors for vesicular trafficking [J]. Neuroscientist, 2004, 10(6): 566-574.
 - [18] Bhalla A, Chicka MC, Chapman ER. Analysis of the synaptotagmin family during reconstituted membrane fusion. Uncovering a class of inhibitory isoforms [J]. J Biol Chem, 2008, 283(31): 21799-21807.
 - [19] Tucker WC, Chapman ER. Role of synaptotagmin in Ca^{2+} -triggered exocytosis [J]. Biochem J, 2002, 366(Pt 1): 1-13.
 - [20] Hilfiker S, Pieribone VA, Nordstedt C, et al. Regulation of synaptotagmin I phosphorylation by multiple protein kinases[J]. J Neurochem, 1999, 73(3): 921-932.
 - [21] 王静, 汪青松. 突触结合蛋白-1 与学习记忆的研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2011, 27(2): 231-234.
 - [22] Sun JY, Südhof TC. Syntaxin-1 functions as a SNARE partner and beyond[J]. J Acta Biophysica, 2011, 29(10): 821-827.
 - [23] Kohli BM, Pflieger D, Mueller LN, et al. Interactome of the amyloid precursor protein (APP) in brain reveals a protein network involved in synaptic vesicle turnover and a close association with Synaptotagmin-1[J]. J Proteome Res, 2012, 11(8): 4075-4090.
 - [24] Cotman CW, Tenner AJ, Cummings BJ. β -amyloid converts an acute phase injury response to chronic injury[J]. Neurobiol Ageing, 1996, 17(5): 723-731.
 - [25] Neary JT, Kang Y. Signaling from P_2 nucleotide receptors to protein kinase cascades induced by CNS injury implications for reactive gliosis and neurodegeneration[J]. Mol Neurobiol, 2005, 31(1-3): 95-103.
 - [26] Markiewicz I, Lukomska B. The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system[J]. Acta Neurobiol Exp, 2006, 66(4): 343-358.
 - [27] 张景岳原著, 孙玉信, 朱生平主校. 景岳全书[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2006: 685.
 - [28] 王龙海, 陈贵海, 江伟, 等. 昆明小鼠学习记忆能力的年龄效应及其与海马突触囊泡相关蛋白的相关性[J]. 动物学杂志, 2010, 45(3): 30-36.
 - [29] Counts SE, He B, Nadeem M, et al. Hippocampal drebrin loss in mild cognitive impairment [J]. Neurodegener Dis, 2012, 10(1-4): 216-219.
 - [30] Byong CY, Nigel C, Michael F, et al. Synaptosomal proteins, β -soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein (Beta-SNAP), γ -SNAP and synaptotagmin I in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease [J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 2001, 12(3): 219-225.

(收稿: 2014-10-19 修回: 2015-02-09)