

益肾化浊法对多发梗塞性痴呆大鼠学习记忆力的影响^{*}

陈婷婷, 谢颖桢[△]

(北京中医药大学东直门医院, 北京 100029)

摘要:目的 研究益肾化浊法(复方苁蓉益智胶囊)对多发梗塞性痴呆大鼠学习与记忆能力的作用。方法 选择多发梗塞性痴呆大鼠模型,分为给药组和模型组,另设假手术组,治疗组提前 3d 给药,运用 morris 水迷宫评价大鼠认知能力,HE 染色评价模型病理结果。结果 ①在 Morris 水迷宫隐平台训练中,从第 3 次训练 3 组开始出现差异,假手术组的逃避潜伏期最短,治疗组的逃避潜伏期比模型组明显缩短,第 5 次训练 3 组相当,模型组学习记忆时间明显延长。②探索试验中假手术组穿越平台次数最多,治疗组穿越平台次数显著多于模型组。结论 益肾化浊法可显著改善痴呆大鼠记忆学习能力。

关键词: 血管性痴呆; 益肾化浊法; Morris 水迷宫

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)04-0006-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.04.002

随着社会老龄化和脑血管病发病率的逐步增高,我国老年人血管性痴呆(vascular dementia, VD)的患病及发病人数越来越多。迄今为止,国内外仍缺少有效治疗痴呆的方法和药物。王永炎院士在长期治疗中风及防治中风后痴呆的临床实践中,形成了血管性痴呆“毒损脑络”的病机新认识,并总结提出益肾化浊解毒通络治疗方法,据此研究出中药“复方苁蓉益智胶囊”临床疗效可靠,特别对轻中度痴呆的效果尤其显著。本项研究拟从神经血管单元的角度探讨益肾化浊法防治血管性痴呆的疗效机理。本文谨就益肾化浊法对血管性痴呆大鼠行为学影响进行初步分析研究。采用大鼠左侧颈内动脉注射栓子的多发脑梗塞模型作为血管性痴呆模型。行为学实验采用 Morris 水迷宫研究方法,观察益肾化浊法对 VD 大鼠学习记忆能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

中老年雄性 SD 大鼠,月龄 6 个月,体质量 350~450g,由中国医学科学院动物实验室提供。

1.2 分组方法

分为假手术组(n=8)、模型组(n=7)及给药组

(n=7)。给药组给予益肾化浊法成药复方苁蓉益智胶囊,提前 3d 给药,给药剂量为 33mg/100g,假手术组和模型组给予等量生理盐水灌胃,不同时点分批取材,取材前连续每天定时给药。

1.3 模型制作方法

参考陈俊抛^[1]并采用梅建勋、张允岭改良的多发梗塞方法造梗死性痴呆模型。

1.3.1 栓子的制备

取同种大鼠腹主动脉采血,于 65℃温箱内无菌条件下烘干,研碎,分别用 100 目和 200 目筛孔过筛,筛取大小在 100~200 之间的栓子备用,应用时取血栓栓子 10mg 加生理盐水 6 mL,配制成 3.3mg/mL 的混悬液。

1.3.2 模型的制作

予 5%的水合氯醛溶液按 35mg/100g 体重腹腔注射麻醉,将大鼠置于固定板上,修剪颈部毫毛,组织剪将其颈部皮肤正中剪开,形成从颌下到胸腔上口约 2cm 纵型手术切口;逐渐剥离左侧胸骨舌骨肌、胸骨乳突肌与肩胛舌骨肌,后进行钝性分离左侧颈总动脉和颈外动脉;在颈外动脉近心端及远心端各穿一 4 号线,将颈外动脉远心端尽量靠上结

^{*} 基金项目: 国家中医药管理局中医脑病重点学科;王永炎“3+3”薪火传承工作室

收稿日期: 2016-04-20

作者简介: 陈婷婷(1986-),女,山东济宁人,主治医师,在读博士研究生,研究方向:中医药防治脑血管疾病。

[△]通信作者: 谢颖桢, E-mail: xyz_3191@aliyun.com

扎,用微动脉夹夹持颈外接扎处;将含有栓子溶液的4号半静脉输液针于颈外动脉近心端穿刺,并逆行插至颈总动脉分叉处,均匀缓慢(约30s)推注栓子溶液0.45mL,同时避免注入空气栓子;将颈外动脉近心端丝线结扎,同时缓慢抽出穿刺针头;腹腔注射青霉素40IU,用4/0丝线缝合皮肤,术后青霉素连续注射3d防感染,灌胃方法同前。

1.4 学习记忆能力的检测^[2]

行为学测验选择造模后2周作为测评时点。造模后第8天进行Morris水迷宫实验,对大鼠进行空间记忆训练。将平台放在第二象限正中距池壁22cm处,迷宫中含墨汁液面高于安全平台1.5cm,水温22℃,室温25℃,训练期间保持环境安静,迷宫外参照物不变。

1.4.1 定位航行实验

定位航行实验历时5d,受试动物按照I、Ⅲ、IV象限的顺序每天选一个象限作为入水点依次进行训练,每天1次,先将大鼠放于安全平台上10s,熟悉平台位置,再将大鼠面向池壁放入水中,记录其从入水至找到安全平台的游泳轨迹,测试时限定为60s,若60s内未找到平台者,将其牵引至平台,10s后放回。

1.4.2 空间搜索实验

第6天撤除平台,进行空间搜索实验。由IV象

限入水点将大鼠面向池壁放入水中,观察并记录其在60s内的游泳轨迹。

1.5 动物取材

不同时间点,用4%的多聚甲醛液灌注固定脑组织。剖出大脑,取视交叉后1~4mm部分置于多聚甲醛液中继续固定24h,石蜡固定,冠状切片(厚约5μm),苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察皮质及海马细胞形态变化。

1.6 实验数据处理

数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS10.0统计软件进行非参数检验,以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果

2.1 组织形态学观察

正常大鼠脑组织外观光洁,两侧大脑半球基本对称等大,脑组织无萎缩;海马区细胞排列紧密、整齐,细胞核圆而大,核仁清晰。模型组显示:其右侧大脑半球较左侧偏小,HE染色镜下可见各脑区细胞肿胀变性,局部脑区可见散在多发梗死灶;亦可见少量散发出血点,梗死灶周围部分细胞核发生固缩,局部细胞数目减少,出现筛网状结构;梗死侧海马区细胞破坏,细胞排列较正常侧稀疏、紊乱,存在细胞脱失现象,细胞核固缩为三角形或多角形,部分呈现细胞凋亡现象,该结果从影像的角度印证了模型制作的成功,为后续研究提供了基础支持。见图1。

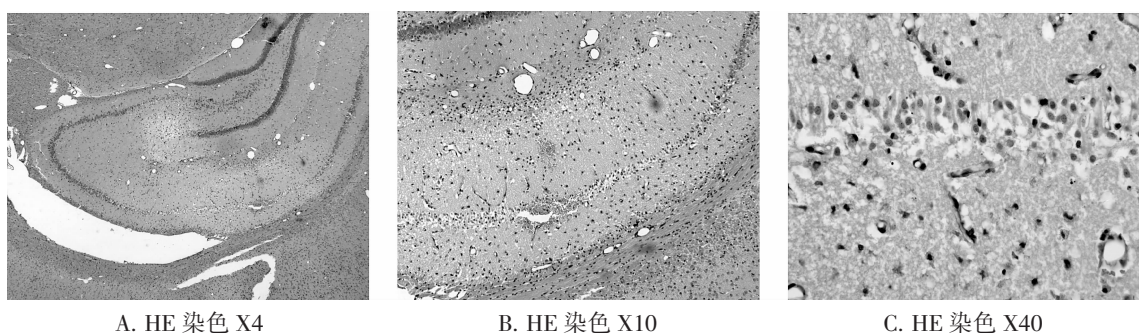


图1 多发梗死性痴呆模型海马区HE染色

2.2 Morris水迷宫测试结果

2.2.1 隐匿平台搜索实验结果

经5d训练,各组大鼠之间的游泳速度无显著性差异,提示各组运动功能相同,模型未对动物运动功能造成损害。从训练第3次开始假手术组动物的逃避潜伏期明显较模型组和治疗组缩短($P < 0.05$)。治疗组动物的逃避潜伏期又显著短于模型组($P < 0.05$),假手术组与模型组差异不显著($P > 0.05$),

见表1、图2。第5次3组数据相当,说明模型组大鼠学习记忆时间明显延长。

2.2.2 探索实验结果

模型组动物出现定位记忆障碍明显,平均每分钟穿越隐匿平台位置的次数最少($P < 0.05$),而治疗组大鼠的平均探索次数较假手术组明显减少($P < 0.05$),假手术组与模型组差异无统计学意义。见表2、图3。

表 1 Morris 水迷宫实验结果

组别	潜伏期 1/s	潜伏期 2/s	潜伏期 3/s	潜伏期 4/s	潜伏期 5/s
假手术	59.97±0.076	46.18±17.98609	43.1±23.58613***	21.375±20.71533***	36.38±22.31551
给药组	59.84±0.282	52.61±16.154	42.10±18.933**	40.57±16.662**	43.64±16.5479
模型组	59.99±0.043	56.434±7.8137	60.00±0.015*	57.71±6.057*	45.02±15.028

注:与假手术相比 * $P<0.05$,与模型组相比 ** $P<0.05$,与给药组相比 *** $P>0.05$

表 2 穿越平台次数结果

组别	穿越平台次数	穿越平台大鼠个数	穿越平台总次数
假手术	1.75±1.388***	7	14
给药组	1.86±1.676**	5	13
模型组	0.14±0.378*	1	1

注:与假手术相比 * $P<0.05$,与模型组相比 ** $P<0.05$,与给药组相比 *** $P>0.05$

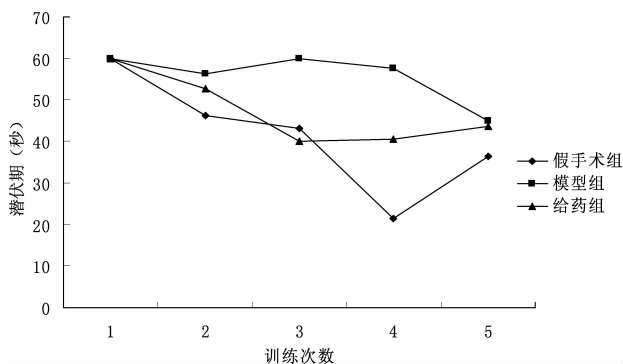


图 2 逃避潜伏期

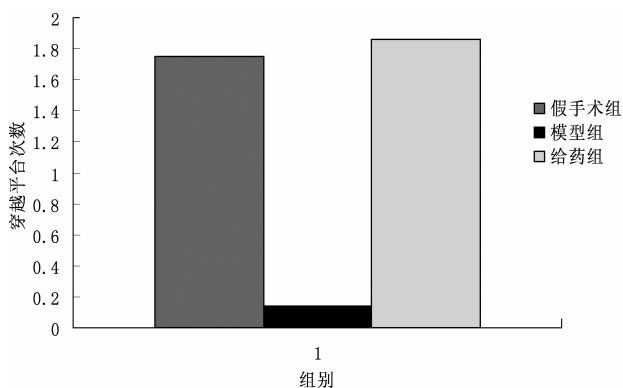


图 3 穿越平台次数

3 讨论

随着脑血管病发病轻型化趋势的发展,由多发性脑梗塞、无症状腔隙性梗塞引起的血管性痴呆类型日益增多。本项研究采用中老龄大鼠、多发脑梗塞痴呆模型,尽可能模拟了中老年血管性痴呆的发病情况,对探索益肾化浊法治疗机理提供病机支持。

3.1 益肾化浊治疗轻中度血管性痴呆临床疗效显著

在全国多家单位合作完成国家“九五”攻关课题“益肾化浊法治疗血管性痴呆的临床与实验研究”中,所完成的多中心随机对照双盲安慰剂临床研究显示:益肾化浊法治疗轻中度血管性痴呆取得较好疗效。曹晓岚^[3]等报道益肾化浊法组方的聪圣胶囊治疗轻中度老年期血管性痴呆的随机双盲临床试验研究结果。采用简易精神状态检查量表(MMSE)和 Blesd 行为量表(BBS)于治疗前后测评,结果显示聪圣胶囊不仅对老年期 VaD 患者智能障碍的改善有较好疗效,同时对其社会生活能力、日常生活自理能力及个性方面都有较好的改善作用。张伯礼^[4]等进行益肾化浊为法组方的健脑益智颗粒治疗血管性痴呆的多中心随机双盲临床研究结果显示,中药治疗组总有效率为 58.4%,较安慰剂组及西药对照组治疗效果为优。该药在整体调节、改善全身机能状况方面优势明显。复方苁蓉益智胶囊是在益肾化浊治则的理论指导下,研制而成的防治血管性痴呆的中成药,由制首乌、肉苁蓉、地龙、荷叶、漏芦组成,方显益肾化浊,活血通络之意,从药理水平分析,制何首乌可以明显提高学习记忆能力,降低脑内单胺氧化酶活性及脂褐质含量,提高海马一氧化氮合酶活性,具有神经保护作用^[5];肉苁蓉可以增加自由基清除酶的活性,防止脂质过氧化,防止脑萎缩,保护神经功能,相关超微结构的研究表明,肉苁蓉能够延缓脑组织衰老退化^[6];漏芦有显著的抗缺氧作用,保护对缺氧状态下的脑功能,其改善记忆障碍的作用可能与调节胆碱能神经系统功能有关^[7]。陈福勤^[8]等人对复方苁蓉益智胶囊预防缺血性中风后认知损害进行临床研究,发现复方苁蓉益智胶囊预防给药能够降低缺血性中风后认识损害患者注意力和计算力的损害。高磊、张宪忠^[9]等对复方苁蓉益智胶囊治疗中风后

轻度认识障碍进行临床研究,发现治疗组治疗后3、6个月,中医证候疗效改善明显高于对照组,MMSE评分MACO各子项及总评分改善程度也显著优于对照组,且疗程6个月较3个月疗效更佳,进而得出复方苁蓉益智胶囊能有效治疗中风后轻度认知障碍患者,改善其认知功能的结论。二人进一步从分子水平进行探索,发现复方苁蓉益智胶囊能有效改善中风后轻度认知障碍患者脑血流及血管内皮功能,从而发挥改善认知功能的作用^[10]。

3.2 益肾化浊法在已完成的血管性痴呆模型动物实验研究已取得肯定成果

在既往的实验研究中,益肾化浊法组方的中药进行了从改善能量代谢、减轻钙离子超载、降低兴奋性氨基酸毒、抗氧自由基、促进神经营养因子等多方面神经保护的研究。采用高效液相层析法(HPLC)测定脑缺血模型脑匀浆中三种腺苷酸含量计算出脑能量负荷。可明显减轻模型小鼠乳酸中毒程度,改善能量代谢。钙离子超载方面:研究发现聪圣胶囊可减轻小鼠脑缺血再灌注后突触体内钙超载程度。神经营养因子方面:研究表明聪圣胶囊可能激活提高大鼠皮质、海马等部位神经元脑源性生长因子(BDNF)、TrkB及其mRNA的表达,可以通过靶源性作用的方式激活大细胞基底核的胆碱能神经元,保护海马、皮质、大细胞基底核神经元。大量行为学研究结果表明聪圣胶囊对血管性痴呆模型动物的学习记忆功能有明显改善作用。马涛^[11]等人研究益肾化浊解毒法对D-半乳糖致痴呆小鼠学习记忆及氧化应激的影响,给予高、中、低剂量组复方苁蓉益智胶囊,对对照药物为安理申组,发现复方苁蓉益智胶囊可显著增加D-半乳糖致痴呆小鼠进入暗室的潜伏期和减少错误次数,提高模型小鼠脑组织SOD、GSH-PX活性,降低脂质过氧化产物MDA含量和8-ohdG表达量。从而得出结论:复方苁蓉益智胶囊可改善D-半乳糖致痴呆小鼠的学习记忆能力,抑制脑组织内氧化应激,保护线粒体。苏芮^[12]等人研究复方苁蓉益智胶囊对痴呆老龄大鼠海马MARCKSmRNA表达的影响发现,它能够降低脑室注射 β -淀粉样蛋白致痴呆老龄大鼠海马MARCKSmRNA的表达,并改善痴呆老龄大鼠学习记忆功能。

3.3 本项实验行为学研究表明益肾化浊法改善了中老龄多发梗塞痴呆大鼠受损的学习记忆能力

Morris水迷宫是目前公认的进行痴呆行为学测试的经典方法。该水迷宫(MWM)是20世纪80年代初由英国心理学家Morris设计的用于研究大鼠空间学习记忆能力的装置^[13],该系统分为定位航行试验(place navigation)和空间探索试验两部分。实验提供了较多的参数,例如逃避潜伏期、各象限游泳距离、穿越平台次数、原平台象限游泳距离与总距离之比、原平台象限游泳时间与总时间之比以及平台偏离角等。

Morris水迷宫定位航行实验利用啮齿类动物天性会水但又怕水的特性作为原始驱动力,迫使动物找到隐匿平台,避水上岸,寻找平台的过程中通过空间学习记忆来完成,啮齿类动物完成空间学习和记忆任务的过程,涉及了不同脑区和神经传导路径^[14],包括海马、纹状体、基底前脑、小脑等的参与。而这些脑区的损伤则都会表现出水迷宫学习成绩的障碍^[15]。从信息的加工和提取方式来看,这种空间参考记忆储存提取的方式又属于陈述性记忆(declarative memory)。而临床上健忘和痴呆的病人,是陈述性记忆首先受损为主^[16]。所以从检测的记忆属性来说,运用Morris水迷宫来进行痴呆行为学方面的测试研究是比较合理的。

本项研究结果显示多发梗塞痴呆模型大鼠学习记忆能力减退,给予益肾化浊法(复方苁蓉益智胶囊)显著改善了大鼠的学习记忆能力,说明益肾化浊法治疗多发梗死性痴呆疗效显著,以期进一步从神经血管单元的角度探索作用分子学机制。

致谢:感谢北京中医药大学东直门医院动物及病理实验室赵明镜、朱陵群、戴欣老师,脑病科马大勇博士,李文娟、徐栋、高兴慧、王一战、啜阿丹硕士在整个实验过程给予的支持与帮助。

参考文献:

- [1] 陈俊抛,田时雨,于薇薇,等. 多发性脑梗塞痴呆动物模型的研究. 中华神经精神科杂志,1994,27(5):311.
- [2] Morris R. Developments of a water maze procedure for studying spatial learning in rat[J]. J Neurosci Meth,1984,11(1):47-60.
- [3] 曹晓岚,宋晓霞,胡志强. 聪圣胶囊治疗老年期血管性痴呆临床研究[J]. 中国中医急症,2002,11(2):80-81.
- [4] 张伯礼,王永炎,陈汝兴. 健脑益智颗粒治疗血管性痴呆

- 的随机双盲临床研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(8): 577-580.
- [5] 高淑红, 苏珍枝, 肖学凤. 制首乌化学成分及药理作用研究进展 [J]. 山西中医学院学报, 2012, 13(2): 77.
- [6] 胡佳琦, 冯佳媛. 肉苁蓉的化学成分和药理作用 [J]. 中医临床研究, 2012, 4(15): 26-27.
- [7] 张强, 苏黎红. 漏芦药理及实验性研究 [J]. 时珍国医国药, 2000, 11(6): 567.
- [8] 陈福勤, 于海默. 复方苁蓉益智胶囊预防缺血性中风后认知损害的临床研究 [J]. 北京中医药, 2014, 33(5): 330-333.
- [9] 高磊, 张宪忠. 复方苁蓉益智胶囊治疗中风后轻度认知障碍的临床研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(1): 65-68.
- [10] 张宪忠, 高磊等. 复方苁蓉益智胶囊对中风后轻度认知障碍患者脑血流及血管内皮功能的影响研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(4): 533-537.
- [11] 马涛. 益肾化浊解毒法对 D-半乳糖致痴呆小鼠学习记忆及氧化应激的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(7): 895-897.
- [12] 苏芮. 复方苁蓉益智胶囊对痴呆老龄大鼠海马 MAR-CKSmRNA 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(4): 620-622.
- [13] Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv*, 1981; 12: 239-260.
- [14] Cain DP, Saucier D. The neuroscience of spatial navigation: focus on behavior yields advances [J]. *Rev Neurosci*, 1996, 7(3): 215-231.
- [15] Fredrik C, Anders L, Niklas M. Correlation of hippocampal morphological changes and morris water maze performance after cortical contusion injury in rats [J]. *Neurosurgery*, 2005, 57(1): 154-163.
- [16] Squire LR, Zola-Morgan S. Memory: brain systems and behavior [J]. *Trends in Neurosci*, 1988, 11(4): 170-175.
- (编辑: 徐建平)

Influence of Yishen Huazhuo Method on Learning and Memory Ability in Dementia Rats due to Multiple Cerebral Infarction

CHEN Tingting, XIE Yingzhen

(Dongzhimen Hospital to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

ABSTRACT: **Objective** To research the influence of Yishen Huazhuo method on learning and memory ability in dementia rats due to Multiple cerebral infarction. **Methods** Select the model of dementia rats due to multiple cerebral infarction, divided into the administration group, the model group and the false surgery group, give drug to the administration group 3 days in advance. Use water morris labyrinth to evaluate the rats' cognitive, use the method of HE staining to evaluate the pathology results. **Results** ① In the training of the morris water labyrinth of misprision of platforms, At the third training, the three groups begin to vary, For the incubation period of escape, false operating team use the shortest time, and the administration group use more shorter time than the model group. The three groups use the same time in the Fifth Train, but the model group takes more times for learning. ② In the exploration temp, the false surgery group cross platform most times The number of treatment group across platforms significantly more than model group. **Conclusion** The method of Yishen Huazhuo can dramatically improve the dementia rats' memory and learning ability.

KEY WORDS: vascular dementia; Yishen Huazhuo method; Morris water labyrinth