

二苯乙烯苷对胆碱能损伤拟老年性痴呆大鼠学习记忆功能和兴奋性的影响

叶翠飞 张兰 李斌 艾厚喜 李雅莉 张丽 李林*

[摘要] 目的 研究何首乌有效成分二苯乙烯苷(2,3,5,4'-四羟基-二苯乙烯- β -D-葡萄糖苷, TSG)改善胆碱能损伤拟老年性痴呆大鼠学习记忆功能的作用及对中枢兴奋性的影响。方法 采用鹅膏蕈氨酸基底前脑注射建立拟老年性痴呆大鼠模型,实验动物分为假手术、模型、阳性对照药盐酸多奈哌齐(1.2 mg/kg)、TSG小剂量(0.03g/kg)、中剂量(0.06g/kg)和大剂量(0.12g/kg) 6组,灌胃给药1个月后,分别用 Morris 水迷宫、通道式水迷宫、避暗反应及旷场分析对动物的学习记忆功能及兴奋性进行评价。结果 TSG小、中剂量组均能显著缩短 Morris 水迷宫游出时间($P < 0.05$);TSG3个剂量组均减少通道式水迷宫的错误次数($P < 0.01$)。避暗反应显示,TSG各剂量组的成绩均优于模型组。旷场分析发现该药对模型大鼠兴奋性无显著影响。结论 TSG具有改善胆碱能损伤拟老年性痴呆大鼠学习记忆功能,小、中剂量 TSG对动物中枢兴奋性有一定的促进作用,而大剂量可能对动物中枢兴奋性有一定抑制作用。

[关键词] 二苯乙烯苷;老年性痴呆;动物模型;学习记忆功能;中枢兴奋性

Effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside, on learning and memory function and excitability in Alzheimer's disease rat induced by model cholinergic damage YE Cui-fei, ZHANG Lan, LI Bin, et al. Department of Pharmacology, Xuan-Wu Hospital of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100053, China

[Abstract] **Objective** To investigate effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (TSG), on learning and memory function and excitability in Alzheimer's disease rat model induced by cholinergic damage. **Methods** Basal forebrain of rats were injured by ibotenic acid injection of 10 μ g each side. Rats were divided into six groups as the operation, model, positive control drug donepezil hydrochloride, TSG low (0.03g/kg), middle (0.06g/kg) and high (0.12g/kg) dose groups. These drugs were intragastrically administrated for 1 month. The learning and memory function were determined with Morris water maze, channel water maze and step through tests, and the excitability was evaluated by open field analysis. **Results** TSG (low, middle and high dose) significantly decreased the swimming time and error times ($P < 0.05$) in water maze test and TSG high dose improved the ability of passive avoidance response at step through test. Open field test showed that there was no significant difference on excitability between each group. **Conclusion** TSG can improve learning and memory abilities of Alzheimer's disease rat induced by cholinergic damage, TSG (low and middle dose) improve excitability of central nervous system in Alzheimer's disease rat model, but TSG dose maybe inhibit excitability of central nervous system.

[Key words] 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (TSG); Alzheimer's disease; animal model; learning and memory function; excitability of central nerve

中图分类号:R285.5, R749.1 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2003)10-0593-03

老年性痴呆(Alzheimer disease, AD)是一种神经退行性疾病。随着我国人口的老龄化,防治老年性痴呆药物的寻求和研究成为当前医学界的紧迫问题。二苯乙烯苷(2,3,5,4'-四羟基-二苯乙烯- β -D-葡萄糖苷, TSG)是何首乌的主要有效成分之一^[1,2]。该药对神经系统的作用以往研究甚少。本实验观察了该成分对老年性痴呆模型大鼠的学习记忆功能及中枢兴奋性的影响,以期发现防治老年性痴呆的中药新药。

1 材料与方

1.1 动物 SD雄性大鼠,2月龄,体重(250 \pm 20)g,由

基金项目:首都二四八重大创新工程项目(H010210130113);国家重点基础研究发展计划“973”项目(No. G2000057010);北京市中医药重点学科项目(2001);北京市自然科学基金资助项目(No. 7982006);北京市科技新星计划项目(H020821390190);首都医学发展基金项目(No. 2002-3002)。

作者单位:100053 北京市,首都医科大学宣武医院药理研究室。作者简介:叶翠飞(1954),女,主管技师,主要研究方向:神经药理。*通讯作者:李林。

北京维通利化华实验动物技术有限公司提供,批准号:SCXKI-DO-008。

1.2 药品 二苯乙烯苷是根据宣武医院药理研究室自行研制的提取工艺,委托中国医药研发中心从何首乌中提取分离的干粉,批号:020823,实验时用水溶解,小剂量为 0.03g/kg,中剂量为 0.06g/kg,大剂量为 0.12g/kg,动物灌胃量 10 ml/kg。鹅膏蕈氨酸(ibotenic acid)购自 Sigma 公司。阳性对照药盐酸多奈哌齐由英国 Boots 公司生产,卫材(中国)药业有限公司分装,分包装批准文号:国药准字 J20030014。

1.3 方法

1.3.1 基底前脑损伤模型制作 将大鼠用 10%水合氯醛麻醉,脑立体定位仪固定,平颅头位,参照大鼠脑定位图谱^[3],在前凶前(AP)0.8 mm、中线旁开(ML)3.0 mm 处,距颅骨表面深度(DV)7.5 mm,双侧各注射 1 μ l ibotenic acid(10 g/L,溶于 0.5 M PBS 中),对照组(假手术组)注射等量 PBS。本次实验共用 100 只动物,造模死亡率约 30%。造模后 14 天开始灌胃给药。

1.3.2 分组与给药 实验动物分为假手术、模型、阳性对照药盐酸多奈哌齐(1.2 mg/kg)、TSG 小剂量

(0.03/kg)、中剂量(0.69g/kg)和大剂量(1.2g/kg)共 6 组,每日灌胃给药 1 次,连续灌胃 1 个月之后,进行 Morris 水迷宫、通道式水迷宫、避暗反应及旷场分析。

1.3.3 Morris 水迷宫测定 Morris 水迷宫由中国医学科学院药物研究所研制^[4],主要由圆形水池和自动录像及分析系统两部分组成。水池高 50cm,直径 120 cm。有机玻璃平台高 29cm,直径 9cm。水池被分为 SW、NW、SE 和 NE 四个象限;测试前将水注入池中,并放入奶粉使之成为乳白色,平台位于水下 2cm,水温控制在 22℃—25℃之间,实验时要求各种实验条件保持不变。实验前一天,将每只大鼠头部染黑。每只动物第一天训练 2 次使之学习并产生记忆,入池位置为站台所对象限及所邻象限,于象限边 1/2 弧度处将动物头朝池壁入水,120 秒未找到站台者,将其引致站台,放置 30 秒引导其学习与记忆。第 2、3 和 4 天重复测试,数据采集及图像分析均由图像自动监视和处理系统完成。

1.3.4 通道式水迷宫实验 水迷宫参照中国医学科学院药物研究所小鼠水迷宫按比例放大^[4],由黑色有机玻璃制成(2.1m×1.7m×0.6m),水深 40 cm,水温控制在 22℃—25℃之间。本装置共设四个盲端,终点有台阶,动物可通过台阶上岸躲避溺水威胁。各组动物依次进行水迷宫实验,第 1 天路径包括 2 个盲端;第 2 天有 3 个盲端;第 3、4、5 天均为 4 个盲端。每天训练 2 次,记录每只动物的游出时间(如果 120 秒内未上岸按 120 秒记录)及在游泳中进入盲端的次数(即错误次数)。第 1、2 天为训练,后 3 天的数据作为学习和记忆成绩。

1.3.5 避暗反应实验 本实验根据张均田等^[5]小鼠一次性避暗法改进。第 1 天进行训练,将大鼠头向外

放入避暗箱明室,动物一般会进入暗室受到 1—2 次电击,如动物不进入,则驱入暗室,使之产生记忆,共 5 min。第 2 天开始进行测试,数据记录为学习成绩。采用分级记分法记录动物进入暗室的情况。两前肢进计 1 分,四肢全部进入计 2 分。同时,以四肢全部进入暗室的时间为潜伏期,如未进入按 300 秒记录。

1.3.6 旷场分析 旷场分析箱^[6]由浅兰色胶合板及铝合金框架构成(1m×1m×0.4m),箱底划分为 25 个方格(每个 20×20cm),沿四壁为外周格,其余为中央格。将动物放入正中方格中,观察 3 min 内动物的跨格次数(三爪以上跨入邻格)、中央格停留时间、站立次数(两前肢离地 1cm 以上)和排便粒数。其中跨格次数及站立次数均反映动物的兴奋性,中央格时间是动物对空间认知的反映,排便为动物的紧张反射。

1.4 统计学处理 数据以($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS 8.0 软件对两种水迷宫实验采用多因素方差分析,对避暗及旷场实验进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 TSG 对基底前脑胆碱能神经元损伤大鼠两种水迷宫试验学习记忆功能的影响 水迷宫试验是检测动物学习记忆能力的有效方法。本实验中,模型组动物的 Morris 水迷宫游出时间明显长于假手术组,在通道式水迷宫中的错误次数也显著增加,成功模拟了老年性痴呆学习记忆能力下降的表现;阳性对照药盐酸多奈哌齐及小、中剂量 TSG 组动物在 Morris 水迷宫中游到安全岛的时间明显短于模型组,通道式水迷宫错误次数也均显著少于模型组,显示 TSG 能够改善基底前脑胆碱能神经元损伤大鼠的学习记忆功能(见表 1、表 2)。

表 1 二苯乙烯苷对胆碱能神经元损伤大鼠 Morris 水迷宫试验的影响

分组	n	day1	day2	day3	3 day 平均	P 值
假手术组	12	47.07 ± 29.90	28.96 ± 19.69	18.91 ± 15.67	31.23 ± 25.06	0.000
模型组	11	66.32 ± 40.87	83.62 ± 47.62	73.07 ± 38.48	74.34 ± 41.64	-
多奈哌齐组	12	49.97 ± 31.11	32.61 ± 33.48	27.95 ± 43.35	36.85 ± 36.59	0.000
TSG 小剂量组	10	64.89 ± 30.82	60.20 ± 30.61	43.65 ± 22.11	56.25 ± 28.77	0.037
TSG 中剂量组	11	65.76 ± 33.41	61.12 ± 34.00	43.18 ± 41.8	56.68 ± 37.37	0.041
TSG 大剂量组	12	74.32 ± 34.69	62.69 ± 39.85	53.31 ± 42.46	63.44 ± 38.99	0.197

表 2 二苯乙烯苷对胆碱能神经元损伤大鼠通道式水迷宫错误次数的影响

分组	n	day1	day2	day3	3 day 平均	P 值
假手术组	12	1.17 ± 1.05	0.39 ± 0.53	0.46 ± 0.60	0.7625 ± 0.88	0.000
模型组	11	2.82 ± 0.98	2.50 ± 1.52	2.09 ± 1.14	2.47 ± 31.23	-
多奈哌齐组	12	1.96 ± 1.42	1.75 ± 0.94	0.96 ± 1.03	1.56 ± 1.19	0.000
TSG 小剂量组	10	1.20 ± 0.71	1.10 ± 1.29	0.30 ± 0.54	0.85 ± 0.95	0.000
TSG 中剂量组	11	1.55 ± 0.85	0.86 ± 0.92	0.36 ± 0.64	0.92 ± 0.93	0.000
TSG 大剂量组	12	1.29 ± 0.58	1.13 ± 1.03	0.83 ± 0.88	1.08 ± 0.85	0.000

2.2 TSG 对基底前脑胆碱能神经元损伤大鼠避暗学习记忆功能的影响 避暗实验可反映动物的被动学习记忆能力。本实验中,模型组动物潜伏期缩短,错误积

分显著高于假手术组,表明基底前脑胆碱能神经元损伤大鼠被动学习记忆功能减弱;阳性对照药盐酸多奈哌齐及 TSG 各剂量组动物的潜伏期均有延长,其中 TSG

大剂量组有显著性差异,错误积分也明显降低,说明 TSG 有改善基底前脑胆碱能神经元损伤大鼠被动物学

表 3 二苯乙烯苷对胆碱能神经元损伤大鼠避暗反应的影响

分组	n	潜伏期(秒)	P 值	错误积分	P 值
假手术组	12	277.85 ± 63.51	0.073	0.15 ± 0.36	0.028
模型组	11	209.09 ± 130.36	-	0.91 ± 1.30	-
多奈哌齐组	12	255.75 ± 84.40	0.077	0.25 ± 0.45	0.042
TSG 小剂量组	10	244.30 ± 117.60	0.263	0.40 ± 0.84	0.085
TSG 中剂量组	11	227.45 ± 113.54	0.364	0.73 ± 1.10	0.362
TSG 大剂量组	12	288.08 ± 21.58	0.025	0.33 ± 0.65	0.061

2.3 TSG 对实验动物兴奋性、新异环境感知、紧张性的影响(旷场分析) TSG 小、中剂量组大鼠与模型组相比,反映空间感知能力的中央格时间略有减少,反映探索能力的站立、理毛次数略有增加,说明 TSG 小、中

剂量的作用(见表 3)。TSG 不仅未改善动物的中央格时间,还使跨格、站立、理毛次数等减少(见表 4)。

表 4 二苯乙烯苷对胆碱能损伤大鼠模型旷场分析实验结果

分组	n	中央格时间(秒)	跨格次数	站立次数	理毛次数	粪便粒数
假手术组	12	30.1 ± 55.8	14.4 ± 13.5	3.8 ± 4.1	0.21 ± 0.61	2.36 ± 2.3
模型组	11	57.5 ± 65.6	16.6 ± 22.3	2.9 ± 3.2	0.09 ± 0.31	1.45 ± 1.6
多奈哌齐组	12	19.7 ± 21.4 ^a	32.4 ± 29.5 ^a	8.8 ± 8.7 ^a	0.17 ± 0.41	2.81 ± 2.1
TSG 小剂量	10	19.6 ± 23.8	16.0 ± 12.3	6.8 ± 6.4 ^a	0.31 ± 0.42	2.80 ± 1.8
TSG 中剂量组	11	32.0 ± 51.6	16.3 ± 18.4	4.2 ± 5.7	0.64 ± 0.51 [*]	1.64 ± 2.6
TSG 大剂量组	12	57.6 ± 74.7	3.9 ± 3.4 ^a	2.3 ± 3.0	0.00 ± 0.00	1.25 ± 3.1

注:a:与模型组比较, P < 0.05。

3 讨论

老年性痴呆是一种神经退行性病变,临床表现为进行性的记忆丧失和其他认知功能障碍^[7],病理特征为脑萎缩、神经元纤维缠结及老年斑沉积和神经元数量减少,尤以胆碱能神经元丢失最为严重。二苯乙烯苷(TSG)是我室自行研制的抗老年痴呆新药参乌胶囊中君药何首乌的主要有效成分。2000 年药典将测定二苯乙烯苷类化合物的含量作为何首乌及其制剂的质控标准。然而对 TSG 药理活性的研究很少,尤其是关于该药对神经系统的药理作用未见报道。因此,研究何首乌主要有效成分 TSG 的神经保护作用,对阐明何首乌及其为主要成分的中药复方的功效机理有重要意义。我室以往的研究表明:TSG 可明显保护体外培养的神经细胞抵抗 β-淀粉样蛋白及 H₂O₂ 所致的细胞存活率下降和 LDH 漏出率增多,动物实验也表明 TSG 对缺血再灌注模型具有明显的脑保护作用^[8,9],并能改善动物的学习记忆和认知功能。

本研究采用鹅膏蕈氨酸(IGO)基底前脑注射,破坏模型动物脑内胆碱能神经系统,造成胆碱能神经元丢失,以模拟老年性痴呆。Morris 水迷宫、通道式水迷宫、避暗实验显示,小、中剂量 TSG 可明显改善模型动物的学习记忆功能。旷场分析主要反映动物中枢兴奋性的改变。IGO 基底前脑损伤模型动物中央格时间略有增加,站立、理毛次数略有减少,表明中枢兴奋性略有下降。小、中剂量 TSG 缩短实验动物中央格时间,增加站立、理毛次数,对动物中枢兴奋性有一定的改善

和促进,可能与提高学习记忆能力有一定关系。大剂量 TSG 未改善模型动物中央格时间,还使跨格、站立、理毛次数等减少,可能对动物中枢兴奋性有一定的抑制作用。TSG 大剂量组在避暗实验中使潜伏期延长,错误积分降低,也可能与动物中枢兴奋性下降有关。

对老年性痴呆目前尚缺乏有效治疗手段。脑内胆碱能神经系统损伤及胆碱能神经元丢失是老年性痴呆最主要的病理改变,也是造成学习记忆能力下降的直接原因。TSG 能明显改善老年性痴呆模型动物的学习记忆能力,为开发防治老年性痴呆等神经系统退行性疾病的新药提供了良好前景。

[参考文献]

- [1] 李斌,李林,王育琴,等.中药复方 962 对基底前脑损毁大鼠学习记忆及兴奋性的影响[J].中国新药杂志,2000,9(11):755-758.
- [2] 李林,李斌,叶翠飞,等.中药复方 962 对老年大鼠学习记忆功能及兴奋性的影响[J].中国老年学杂志,2000,20(6):364-366.
- [3] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M].北京:人民卫生出版社,1991.31-32.
- [4] 张均田,石成璋,梅保幸,等.“水迷宫”自动控制仪的研制及在神经药理研究中的应用[J].药物分析杂志,1991,11:23-26.
- [5] 张均田,斋滕洋.十二种化学药品破坏小鼠被动回避性行为-跳台实验与避暗实验的作用比较观察二苯乙烯苷[J].药学报,1986,21(1):12-15.
- [6] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].第 2 版.北京:人民卫生出版社,1994.641-650.
- [7] 盛树力,郑礼耀,李林,等.老年性痴呆:从分子生物学到临床诊治[M].北京:科学文献出版社,1998.93-125.
- [8] 张兰,李林,李雅莉.何首乌有效成份二苯乙烯苷拮抗 β-淀粉样蛋白及过氧化氢致神经细胞损伤[J].中国临床康复杂志,2003,(待发表).
- [9] 刘治军,李林,叶翠飞,等.二苯乙烯苷对脑缺血啮齿类动物 NMDA 及细胞内钙离子的影响[J].中国药理学通报,2003,(待发表).

(收稿日期:2003-08-15)