

天泰Ⅱ号对老年小鼠学习记忆及胆碱能受体的影响*

吴正治 唐春艳(深圳市红会医院中西医结合研究所 深圳 518029)

卢汉平(广东中山大学基础学院)

老年性痴呆(Alzheimer's disease 简称AD)是严重危害老年人身心健康的重大疾病之一,现代医学尚缺乏有效的治疗方法^[1,2]。随着社会人口的老化,本病将带来日益严重的社会和医疗问题。老年性痴呆与M胆碱能系统功能减弱关系密切^[3]。本文观察了中药复方天泰Ⅱ号对老年铝中毒认知障碍小鼠学习记忆功能及相关脑区M受体亚型的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 昆明种纯系雄性小鼠(中山医科大学实验动物中心提供),16月龄,随机分为5组,第1组为正常对照组,第2~5组以AlCl₃制造痴呆(学习记忆障碍)模型。

1.2 药物配制 M₁和M₂单克隆抗体由中山医科大学博士后流动站赵树进博士后惠赠,临用前按1:400及1:100稀释。天泰Ⅱ号(以下简称Ⅱ号由黄连、钩藤、郁金、水蛭、牛黄、龙脑等组成,按确定的工艺制成胶囊),去胶囊外壳,加适量蒸馏水(DW)反复研磨,双层纱布过滤,药渣加DW煎煮2次,过滤,合并3次药液,水浴浓缩至所需浓度。Hydergine(喜得镇)由瑞士山德士药厂、天津华津制药厂合作生产(批号960923),以DW配制。AlCl₃以注射用水溶解配制。

1.3 给药及造模 第3~5组每鼠每天分别给Hydergine 0.6mg/kg,Ⅱ号6.23,18.69g/kg,以上药量均配成0.5ml液体ig(灌胃)给药,连续60d,第1~2组灌以等量DW。灌胃给药第5d开始造模,第2~5组动物以AlCl₃

100mg/kg腹腔注射(ip),隔日1次,连续50d,以复制慢性铝中毒老年痴呆模型^[4,5]。

1.4 学习记忆功能测试^[6] 最后1次ip AlCl₃及灌胃给药50min后,依跳台法以MR-921型小鼠跳台实验自动记录仪检测其学习记忆能力。首先将其置于跳台仪中,适应环境5min后,轻放于平台上,当动物从跳台上跳下四肢接触铜栅时,即给予40v电压刺激,记录小鼠逃避至平台上的潜伏期(Escape Latency,EL),并记录5min内的触电次数(错误次数),以此作为学习成绩。24h后进行测试,将小鼠置平台上,记录其第1次跳下受电击的时间(潜伏期)及其3min内受电击的次数(错误次数),以此做为记忆功能的评价指标。测试时,若小鼠停留在平台上超过3min,其潜伏期以180s计。

1.5 M受体亚型检测 给药结束后,迅速断头取脑,在冰台上分离海马组织,加入经预冷的含0.32mol·L⁻¹蔗糖的PBS(PH7.4)适量,以Teflon匀浆器匀浆1.0min,1000g4℃离心10min,取上清以20000g、4℃离心30min,弃上清,沉淀以1.0ml包被液(Na₂CO₃ 1.7g,NaHCO₃ 2.83g加DW溶解至1000ml,pH9.6)分散得粗膜混悬液,取0.1ml以Lowry法测其蛋白含量(Folin-酚试剂为Sigma公司产品),据粗膜蛋白含量以包被液稀释为0.2mg/L(测M₁)及2.0mg/L(测M₂)的2种待测标本,取待测标本100μl包埋在96孔进口酶标板中4℃过夜,以PBS-Tween20液充分洗涤后,加1%牛血清白蛋白进行封闭,37℃孵育1h,充分

* 广东省优秀中青年专家科研目标责任项目

洗涤后分别加入 1 : 400 兔抗 M_1 受体 IgG 或 1 : 100 兔抗 M_2 受体 IgG (以正常血清为空白对照), 37℃ 温育 1h, 洗涤 3 次后各加入 1 : 500 HRP 标记羊抗兔 IgG, 37℃ 温育 1h, 洗涤 3 次。加 DAB 显色液 50 μ l, 37℃ 30min 后, 加 2mol/L 硫酸 50 μ l 终止显色。以 PY-NATECH MR-5000 型酶标仪在 490nm 波长下测量 M_1 和 M_2 受体的含量 (光密度)^[7]。

2 结果

2.1 II 号对老年铝中毒痴呆鼠学习记忆功能的影响 模型对照组学习记忆成绩明显低于正常对照组, Hydergine 及 II 号均能提高模型动物的学习记忆能力, II 号还呈现出一定的量效关系。见表 1。

表 1 各组学习、记忆成绩比较 (跳台法, $\bar{x} \pm s$)

组别	错误次数		潜伏期(s)	
	学习	记忆	学习	记忆
正常对照	2.9 $\pm$ 1.2**	1.1 $\pm$ 0.9**	17.4 $\pm$ 6.1**	120.1 $\pm$ 44.7**
模型对照	8.9 $\pm$ 2.8	3.1 $\pm$ 1.4	30.3 $\pm$ 8.5	48.3 $\pm$ 22.3
Hydergine	6.1 $\pm$ 3.5*	3.1 $\pm$ 1.2*	23.0 $\pm$ 8.3	89.5 $\pm$ 34.8**
II 号(小)	6.7 $\pm$ 2.0*	1.7 $\pm$ 1.0***	20.4 $\pm$ 5.1**	91.5 $\pm$ 32.6**
II 号(大)	4.3 $\pm$ 1.8**	1.3 $\pm$ 0.9***	14.9 $\pm$ 4.2***	104.7 $\pm$ 40.7**

与模型对照比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Hydergine 组比较 # $P < 0.05$, *** $P < 0.01$; $n = 15$

2.2 II 号对海马 M 受体亚型的影响 模型对照组海马 M_1 、 M_2 明显低于正常对照组, Hydergine 及天泰 II 号均能提高模型动物海马 M_1 受体亚型的含量, 但对 M_2 无明显影响。见表 2。

表 2 各组海马 M 受体亚型含量的比较 (OD, $\bar{x} \pm s$)

组别	M_1 受体亚型含量	M_2 受体亚型含量
正常对照	1.323 $\pm$ 0.318**	0.558 $\pm$ 0.071**
模型对照	0.885 $\pm$ 0.145	0.436 $\pm$ 0.053
Hydergine	1.024 $\pm$ 0.133*	0.477 $\pm$ 0.043
II 号(小)	1.062 $\pm$ 0.130*	0.462 $\pm$ 0.046
II 号(大)	1.136 $\pm$ 0.196**	0.486 $\pm$ 0.061

$n = 10$

3 讨论

目前中医对老年痴呆病多从肾虚论治。我们认为, 本病与肝胆密切相关。肝主谋虑, 胆主决断, 肝虚胆寒, 神明不用; 肝郁化火, 胆热痰扰, 闭阻清窍。均可导致老年痴呆病的发

生, 出现失忆、失认、失算、失断 (判断) 等临床表现。天泰 II 号功能清肝泻火、解郁开窍。研究表明该药对 M 受体阻滞剂东莨菪碱认知障碍模型有明显的拮抗效果^[8]。本文进一步观察到天泰 II 号能显著提高铝中毒老年痴呆小鼠的学习和记忆功能及海马 M 受体亚型的含量。海马 M 受体的含量与学习记忆密切相关^[9]。本研究发现铝中毒老年小鼠海马 M_1 、 M_2 受体亚型均明显降低, 与有关报道一致^[7]。天泰 II 号与 Hydergine 均能提高模型小鼠海马 M_1 的含量, 其中天泰 II 号还呈现一定的量效关系。海马 M_2 受体含量模型组与各给药组之间则均无明显差异。说明天泰 II 号能选择性地激活海马 M_1 受体亚型, 这可能是天泰 II 号对老年性痴呆的疗效机理之一。

参考文献

- Gottfries CG. Review of treatment strategies. Acta Neurol Scand, 1992, 139: 63
- 吴正治. Alzheimer's 病病因病理研究进展. 深圳中西医结合杂志, 1997, 7: 35
- Squires EA. Two forms of human amnesia: a analysis of forgetting. J Neurosci, 1981, 1: 635
- Yokel RA. Aluminum produces age related behavioral toxicity in the rabbit. Neurotoxicol Teratol, 1989, 11: 237
- Schupf N. Aluminum and Alzheimer's disease. Lancet, 1989, 1: 267
- 裘月, 杜冠华, 屈志伟, 等. 小鼠暂时性脑缺血引起学习记忆障碍模型的制备及人参皂甙的保护作用. 中国药理学通报, 1995, 11: 299
- Zhao SJ, Li H, Jiang YH, et al. Subtype-specific antibodies for muscarinic receptors content in aluminum chloride intoxicated mice. Chin J Pharm Toxic, 1996, 10: 215
- 吴正治. 泻火、豁痰、逐痰法对小鼠记忆障碍改善作用的比较研究. 中国中医药科技, 1998, 5: 127
- Bonner TI. The molecular basis of muscarinic receptor diversity. Trends Neurosci, 1989, 12: 148

(收稿: 1998-05-18)