

清开灵对 AD 小鼠学习记忆及脑组织 β -淀粉样蛋白水平的影响

王永丽^{1*}, 魏芳², 韩璇³, 李玉巧³, 问慧娟³, 周雅静³

(1. 河北大学药学院, 河北省药物质量分析控制重点实验室, 河北 保定 071000;

2. 河北大学公共卫生学院, 河北 保定 071000; 3. 河北大学基础医学院, 河北 保定 071000)

[摘要] 目的:研究清开灵对阿尔茨海默病(AD)模型小鼠脑组织 β -淀粉样蛋白($A\beta$)水平的影响。方法:选用雄性 KM 小鼠 60 只,随机分成 6 组:正常对照组、模型对照组、清开灵低、中、高剂量(20,40,80 g·kg⁻¹)组和阳性对照药尼莫地平 0.3 g·kg⁻¹组,每组 10 只。ig 给予等体积药物或生理盐水,每日给药 1 次,连续给药 30 d。末次给药 30 min 后,东莨菪碱造模,用 Morris 水迷宫测试行为学指标,采用双抗体夹心法测定脑组织 β -淀粉样蛋白水平。结果:Morris 水迷宫测试表明,清开灵能明显缩短模型小鼠游泳时间及游泳路程;脑组织 $A\beta$ 含量测定显示清开灵能显著降低脑组织 $A\beta$ 水平。结论:清开灵能改善造模小鼠的学习记忆功能,其机制可能与降低脑组织 $A\beta$ 水平有关。

[关键词] 清开灵;学习记忆; β -淀粉样蛋白($A\beta$)

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0191-03

Effect of Qinkailing on Learning and Memory Ability and Expression of β -amyloid Protein of Brain Tissue in Alzheimer's Disease Model Induced by Scopolamine in Mice

[收稿日期] 20100926(007)

[基金项目] 河北省科学技术研究与发展计划项目(10276105D-89)

[通讯作者] *王永丽,硕士学位,副教授,从事中药药理学研究,Tel:13930296611, E-mail:wangyongli_2000@163.com

表达或激活,可促进肿瘤细胞的凋亡,抑制其生长和转移,从而干预肿瘤演变的整个过程。本研究发
现,香蕉皮多糖作用 MCF-7 细胞 48 h 后,明显抑制
NF- κ B(p65)的表达,从而发挥对人乳腺癌细胞的
增殖抑制作用,但确切机制仍有待进一步探讨。

[参考文献]

[1] 徐光炜,胡永昇,阚秀.中国 10 万妇女乳腺癌筛查初探[J].中国肿瘤,2010,19(9):565.
[2] 王爱云,陈群,李成付,等.茯苓多糖修饰物抗肿瘤作用及其机制研究[J].中草药,2009,40(2):268.
[3] 李世刚,张永琦.红芪多糖诱导人肝癌 HEP-G2 细胞凋亡的作用机制研究[J].中药材,2009,32(8):1249.
[4] 吴晓忠,罗素琴,刘乐乐,等.中药多糖抗肿瘤作用的研究进展[J].内蒙古医学院学报,2009,31(1):81.
[5] 王君,胡霞敏.海藻提取物 Fucoidan 抗肿瘤作用的实验研究[J].时珍国医国药,2009,20(7):1757.

[6] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].2 版.杭州:浙江大学出版社,1999:317.
[7] 沈建林,余龙江,金文闻,等.香蕉多糖的分离纯化及其性质研究[J].食品科学,2004,25(8):73.
[8] 李俊,黄锡山,张艳军,等.超声波法提取罗汉果多糖的工艺研究[J].中药材,2007,30(4):475.
[9] 秦瑾,刘正湘.FRANK 抑制人乳腺癌细胞体外增殖及机制研究[J].肿瘤,2007,27(1):34.
[10] Reif S, Lang A, Lindquist J N, et al. The role of focal adhesion kinase-phosphatidylinositol 3-kinase-akt signaling in hepatic stellate cell proliferation and type I collagen expression [J]. J Biol Chem, 2003, 278(10):8083.
[11] See V, Rajala N K, Spiller D G, et al. Calcium-dependent regulation of the cell cycle via a novel MAPK-NF-kappaB pathway in Swiss 3 T3 cells [J]. J Cell Biol, 2004, 166(5):661.

[责任编辑 聂淑琴]

WANG Yong-li^{1*}, WEI Fang², HAN Xuan³, LI Yu-qiao³, WEN Hui-juan³, ZHOU Ya-jing³

(1. Pharmaceutical Sciences College, Hebei University, Baoding 071000, China;

2. Public Health College, Hebei University, Baoding 071000, China;

3. Basic Medicine College, Hebei University, Baoding 071000, China)

[**Abstract**] **Objective:** To study the effect of Qingkailing in model mice by measuring learning and memory ability and the expression of β -amyloid protein in brain tissue. **Method:** Male KM mice were randomly divided into 6 groups: Control group; Model group; L-QKL group ($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); M-QKL group ($40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$); H-QKL group ($80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Nim group ($0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). All the mice were administrated by ig with drugs or water in the same volume for 30 days. AD model of mice was established by ip scopolamine. The Morris water maze was used to observe the learning and memory ability for the model mice. Biochemical methods were used to determine the content of β -amyloid protein in brain tissue. **Result:** Qingkailing could significantly improve the memory of model mice compared with the control group, Qingkailing could decrease the content of β -amyloid protein in the brain tissue obviously. **Conclusion:** Qingkailing could improve the ability of learning and memory of model mice, and its mechanism might involve in reducing the level of β -amyloid protein in brain tissue.

[**Key words**] Qingkailing; learning and memory; β -amyloid protein

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 又称为老年性痴呆, 其主要病理学特征是老年斑、神经元纤维缠结和基底前脑胆碱能神经元蜕变^[1]。老年斑是阿尔茨海默病的主要病理性特征之一。 β -淀粉样蛋白 (A β) 是老年斑的主要成分, 并且在 AD 的发生发展中发挥着重要作用^[2]。本研究采用 ip 氢溴酸东莨菪碱所致记忆损伤的小鼠模型, 观察小鼠学习记忆能力及脑组织 A β 水平在胆碱 M 受体阻断条件下的异常改变; 并通过清开灵的干预, 观察其对模型小鼠学习记忆能力的影响及脑组织中 β -淀粉样蛋白水平的改变。

1 材料

1.1 药物 清开灵颗粒, 广州白云山明兴制药有限公司, 批号 100102; 尼莫地平, 河北医科大学制药厂, 批号 091203; 氢溴酸东莨菪碱, 上海禾丰制药有限公司, 批号 091201。

1.2 试剂 A β 酶联免疫分析试剂盒, 批号 201006 国外进口, 国内分装。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 动物 KM 小鼠, 健康、雄性、二级, 体重 (25 ± 3) g, 由河北省实验动物中心提供。合格证号 1006038。

1.4 仪器 Morris 水迷宫视频跟踪分析系统, 成都泰盟科技有限公司; TG-328A 电光分析天平, 上海天平仪器厂; 600 型三用水箱, 金坛市富华仪器有限公司; 快速混匀器 SK-1, 金坛市富华仪器有限公司;

X-22R 离心机, 美国 Beckman; Elx800 酶标仪。

2 方法

2.1 氢溴酸东莨菪碱所致记忆损伤小鼠模型的建立与药物干预 KM 小鼠 60 只, 按体重随机分成 6 组: 正常对照组 (Control)、模型对照组 (model)、清开灵 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 (L-QKL), 清开灵 $40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (M-QKL), 清开灵 $80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 (H-QKL) 和阳性对照药尼莫地平 $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 (Nim), 每组 10 只。各组动物适应性喂养 3 d 后, ig 给药, 正常对照组和模型对照组分别 ig 给予等体积生理盐水, 每日给药 1 次, ig 体积 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重, 连续给药 30 d。在第 30 天, 各组动物 ig 给药后 30 min, 开始造模: 参照叶翠飞^[3]等方法, 正常对照组 ip 等量生理盐水, 其余各组均 ip 东莨菪碱 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 直到实验全部结束。

2.2 Morris 水迷宫测试 各组于造模后 20 min 进行水迷宫测试。水池水深 25 cm (高出站台 1 cm), 水温控制在 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 有机玻璃站台放置其中一个象限中央, 训练 2 次/d, 入池位置为站台所对象限及所邻象限, 于象限边 1/2 弧度处将小鼠头朝池壁入水, 动物找到并爬上站台后, 让其停留 20 s, 若动物入水后 120 s 未找到站台者, 将其引至站台, 放置 20 s 引导其学习与记忆。第 1, 2 天为训练, 第 3~5 天按上述方法重复测试 (但不再对其进行引导), 将各组小鼠后 3 d 的平均游泳时间和平均游泳距离作为衡量其学习记忆能力的指标。

2.3 脑组织 $A\beta$ 含量测定 断头处死小鼠,冰盘上迅速取脑,置冰冷生理盐水中冲洗掉血液,滤纸吸干水份,分析天平称湿质量,用玻璃匀浆器在冰浴下加生理盐水研磨制成质量分数为 10% 的脑组织匀浆液,置于 4℃ 低温离心机中,4 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min,取上清低温分装保存,采用双抗体夹心 ELISA 法测定 $A\beta$ 含量。

2.4 统计学处理 各组计量资料结果,均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 InStat (ver3.0) 软件进行统计分析,各试验组之间比较,方差齐者采用单因素方差分析 q 检验;方差不齐者采用非参数检验。同组间给药前后比较采用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对东莨菪碱所致记忆损伤小鼠学习记忆的影响 由表 1 看出,在 Morris 水迷宫测试中模型组动物学习记忆成绩较正常对照组、阳性对照组和清开灵干预组明显下降。与模型对照组动物比较,阳性对照药物尼莫地平及灯盏花素均能明显缩短小鼠游泳时间及游泳距离,具有明显的统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 清开灵对东莨菪碱所致记忆损伤小鼠 Morris 水迷宫学习记忆的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	游泳时间/s	游泳距离/cm
正常对照	—	29.1 $\pm$ 22.7 ²⁾	773.6 $\pm$ 523.8 ²⁾
模型对照	—	113.6 $\pm$ 16.7	3 916.3 $\pm$ 567.2
尼莫地平	0.3	62.9 $\pm$ 44.8 ¹⁾	2 226.8 $\pm$ 1 587.1 ¹⁾
清开灵	20	59.2 $\pm$ 42.2 ¹⁾	1 271.4 $\pm$ 856.2 ²⁾
	40	83.6 $\pm$ 39.2	1 773.9 $\pm$ 841.3 ²⁾
	80	58.2 $\pm$ 50.4 ¹⁾	2 189.8 $\pm$ 1 946.2 ¹⁾

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

2.2 对东莨菪碱所致记忆损伤小鼠脑组织中 $A\beta$ 水平的影响 结果见表 2。

表 2 清开灵对东莨菪碱所致记忆损伤小鼠脑组织中 $A\beta$ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	β -淀粉样蛋白/ $\mu g \cdot L^{-1}$
正常对照	—	385.6 $\pm$ 18.7 ²⁾
模型对照	—	448.2 $\pm$ 47.5
尼莫地平	0.3	403.6 $\pm$ 23.6 ¹⁾
清开灵	20	399.9 $\pm$ 21.8 ¹⁾
	40	397.3 $\pm$ 14.1 ²⁾
	80	387.2 $\pm$ 43.6 ²⁾

由表 2 可以看出,正常对照组脑组织中 $A\beta$ 含量,明显低于模型对照组,具有统计学意义 ($P <$

0.05)。经过药物干预后,与模型组比较,阳性对照药物尼莫地平组及清开灵 3 个剂量组均能明显降低脑组织中 $A\beta$ 水平,具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

已有研究证实 AD 病理改变之一的老年斑,其中心的 $A\beta$ 沉积的主要成分是来自 β 淀粉样前体蛋白 (APP) 分解后的多肽。大多数 APP 分子被 α -分泌酶切割产生一个大的可溶性胞外片段,而不产生 $A\beta$ 。但先后经过 β -和 γ -分泌酶的水解后,依据 γ -分泌酶切割位点的不同可分别产生 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 。这两者在结构上只有两个氨基酸的差异,但在生化功能上却相差甚远。 $A\beta_{1-42}$ 的疏水性很强,且具有很强的聚集倾向。在正常情况下, $A\beta$ 保持产生与降解的平衡状态,但在某些病理条件下,如基因突变、细胞轻微损伤,这一平衡被打破,经过 β -和 γ -分泌酶途径水解的 β -APP 过多,从而使 $A\beta$ 产生、聚集过多,导致了 AD 病的发生^[4]。

有学者认为,Ach 递质减少启动了 $A\beta$ 大量沉积的过程^[5]。在本实验中采用小鼠 ip 东莨菪碱 (M 受体阻断剂) 的方法阻断乙酰胆碱对 M 受体的激动作用,达到间接启动了 $A\beta$ 沉积的目的。该实验结果也显示小鼠 ip 东莨菪碱后,脑组织 $A\beta$ 水平明显升高。通过清开灵与尼莫地平干预后,小鼠脑组织 $A\beta$ 水平较模型组明显降低,且学习记忆能力较模型组明显改善,提示清开灵通过降低脑组织 $A\beta$ 水平改善小鼠学习记忆能力。

[参考文献]

[1] Mattson M P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease [J]. Nature, 2004, 430 (7000):631.

[2] Alas K D. Cerebrospinal fluid levels of AB_{1-42} and tau: potential markers of Alzheimer disease [J]. Neurol Transmission,1998,53:321.

[3] 叶翠飞,张兰,张丽,等. 牛磺酸对东莨菪碱所致记忆获得性障碍模型小鼠的改善作用[J]. 中国药理学通报,2005,21(6):715.

[4] 肖飞,曾昭淳. Alzheimer disease 病因研究现状[J]. 中风与神经疾病杂志,2008,25(4):510.

[5] 李延峰. 阿尔茨海默病的发病机制和病理改变[J]. 中华老年医学杂志,2009,28(6):524.

[责任编辑 聂淑琴]