

• 论著 •

活忆饮对阿尔茨海默病模型大鼠 β -淀粉样肽 1-40 和烟碱型胆碱受体的影响金丽英¹, 郭宗君¹, 张延霞², 杜芳¹, 杨学伟¹

(1. 青岛大学医学院附属医院脑血管病研究所, 山东 青岛 266003; 2. 解放军第八十八医院, 山东 泰安 271000)

【摘要】 目的: 观察中药方剂活忆饮对实验性阿尔茨海默病(AD)模型大鼠脑内不同部位 β -淀粉样肽 1-40(A β 1-40)和烟碱型胆碱受体(nAChR)表达的影响, 探讨中医药治疗 AD 的方法。方法: 成年健康雌性 Wistar 大鼠 15 只, 在脑立体定位仪上切断大鼠双侧穹隆-海马伞, 切除双侧卵巢, 建立实验性 AD 动物模型。按随机数字表法分为 3 组, 每组 5 只。①AD 组: 4.8 ml 生理盐水灌胃, 每日 1 次; ②雌激素治疗组(E2 组): 苯甲酸雌二醇(1 mg/kg)皮下注射, 每周 1 次; ③活忆饮治疗组: 中药方剂活忆饮每次灌胃 4.8 ml, 每日 1 次(活忆饮主要由补肾益精中药熟地, 活血行气中药黄芪, 以及泻火解毒中药黄连等组成, 水煎浓缩至含生药量 1 kg/L 汤剂)。所有大鼠均治疗 28 d。采用免疫组化染色观察大脑皮质区、海马 CA1 区、杏仁复合体区、Meynert 核区的 A β 1-40、nAChR 阳性细胞表达。结果: 活忆饮治疗组和 E2 组皮质区、海马 CA1 区、杏仁复合体区、Meynert 核区 nAChR 阳性细胞数均显著高于 AD 组, 而 A β 1-40 阳性细胞数显著低于 AD 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。活忆饮治疗组大脑皮质区、杏仁复合体区 nAChR 阳性细胞数较 E2 组均明显升高, 海马 CA1 区和 Meynert 核区 A β 1-40 阳性细胞数则均较 E2 组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 中药方剂活忆饮可以提高 AD 模型大鼠脑内不同部位 nAChR 表达, 降低 A β 1-40 表达, 具有干预 AD 病理过程的作用。

【关键词】 阿尔茨海默病; β -淀粉样肽 1-40; 烟碱型胆碱受体; 中草药

中图分类号: R285.5; R277.7 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)06-0370-04

Effects of Huoyi decoction (活忆饮) on expressions of amyloid- β -peptide1-40 and neuronal nicotinic acetylcholine receptor in different brain sections of rat's model with Alzheimer's disease JIN Li-ying¹, GUO Zong-jun¹, ZHANG Yan-xia², DU Fang¹, YANG Xue-wei¹. 1. Institute of Cerebrovascular Disease, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong, China; 2. The 88th Hospital of PLA, Taian 271000, Shandong, China

【Abstract】 Objective: To observe the effect of Chinese traditional herbals Huoyi decoction (活忆饮) on expressions of amyloid- β -peptide1-40 (A β 1-40) and neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) in different sections of rat's model with Alzheimer's disease (AD) and approach the method of traditional Chinese medicine for treatment of AD disease. **Methods:** The rat's model of AD was made by excision of bilateral fimbria-fornix of hippocampus in the brain under a stereotaxic apparatus, and the bilateral ovariectomy. Fifteen healthy female Wistar rats were randomly divided into three groups (each $n=5$): ①AD group: 4.8 ml normal saline was infused into the stomach once a day; ②estradiol supplement therapy group (E2 group): estradiol (1 mg/kg) subcutaneously injection, once a week; ③Huoyi decoction group: 4.8 ml Huoyi decoction was administered into the stomach, once a day [The Huoyi decoction was composed of traditional Chinese herbals of prepared rehmannia root for nourishing the kidney and strengthening the essence (补肾益精), astragalus root for promoting blood and qi circulation (活血行气), and gold-thread root (Rhizoma Coptidis) for purging intense heat and removing toxic substances (泻火解毒); the above water decoction was concentrated to 1 L containing 1 kg crude drug (1 kg/L)]. The changes of expression of the A β 1-40 and nAChR positive cells were observed in the hippocampus CA1, cerebral cortex, amygdala, Meynert nucleus with immunohistochemical method. All the rats were observed and treated for 28 days. **Results:** The nAChR positive cells were increased and A β 1-40 positive cells were decreased distinctly in the Huoyi decoction group and E2 group in comparisons with those in the AD group in the hippocampus CA1, cerebral cortex, amygdala and Meynert nucleus ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In the cerebral cortex and amygdala, the nAChR positive cells in Huoyi decoction group were increased more significantly than that in E2 group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while in the hippocampus CA1 and Meynert nucleus, the A β 1-40 positive cells in Huoyi decoction group were more decreased markedly than that in E2 group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** The traditional Chinese herbals Huoyi decoction can elevate the expression of nAChR and decrease the expression of A β 1-40 in many

brain sections of rat's model with AD, and has the action of interference in the pathological process of AD.

【Key words】 Alzheimer's disease; amyloid- β -peptide 1-40; neuronal nicotinic acetylcholine receptor; Chinese herbals

阿尔茨海默病(AD)是一种以认知记忆障碍为主要特征的进行性神经系统疾病,其特征性病理改变为老年斑形成、神经元纤维缠结、神经元丢失以及多种神经递质和受体改变。老年斑的主要成分 β -淀粉样肽 1-40 与 1-42(A β 1-40, A β 1-42)是 β -淀粉样肽前体蛋白(APP)在病理状态下产生的异常代谢产物。乙酰胆碱系统与 APP 有密切的关系,烟碱型胆碱受体(N 受体, nAChR)则调节 APP 翻译后的加工。胆碱能神经系统损伤在 AD 发生过程中具有重要的作用^[1],破坏大鼠脑内胆碱能神经可模拟部分 AD 病理改变,其中穹窿-海马伞切断是一种有效方法^[2]。研究发现,女性认知功能损害发生率高于男性,这种病发倾向可能与雌激素缺乏密切相关,且是 AD 发生的重要原因^[3-4]。一般认为,大鼠卵巢切除(OVX)是一种研究雌激素缺乏过程的理想模型^[5]。本实验以双侧穹窿-海马伞切断和双侧卵巢切除建立 AD 大鼠模型,观察中草药方剂活忆饮及雌二醇对 AD 模型大鼠脑内不同部位 A β 1-40 和 nAChR 表达的影响,以期探讨治疗 AD 的相关方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组:清洁级健康雌性 Wistar 大鼠 15 只,5 月龄,体重 220~250 g,由山东省医学科学院动物实验中心提供(动物合格证号:GB14922-94),环境温度 22 ℃,所有大鼠自由摄食和饮水(青岛大学医学院实验动物中心生产的标准固体饲料),照明、通风、温度、湿度等饲养环境条件相同。将模型动物按随机数字表法分为实验性 AD 组(AD 组)、补充外源性雌激素治疗组(E2 组)、中草药方剂活忆饮治疗组(活忆饮组)3 组,每组 5 只。

1.2 模型制备

1.2.1 穹窿-海马伞切断:大鼠用 10 g/L 戊巴比妥钠(35~40 mg/kg)麻醉后,固定于脑立体定位仪上,常规消毒、剪毛,正中切开头皮,暴露颅骨,参照 Paxinos 和 Watson 的大鼠脑立体定位图谱^[6],于前囟后 2.2~2.5 mm、中线外 1 mm 处,用电动开颅器凿开颅骨,切开硬脑膜,用自制双刃刀先置于上述部位的脑表面,接着降刀 4.5 mm、外移 1 mm、然后再

降刀 1 mm、外移 1.5 mm,最后上下抽动刀约 20 次,以保证海马伞外侧缘完全切断。

1.2.2 卵巢切除术:麻醉大鼠后在腰背部中央剪开皮肤,切口约 2~3 cm,先将动物右侧卧位放置,在最末肋骨下约 1 cm 处沿脊柱旁切开肌肉,打开腹腔,将肾脏下方的卵巢结扎并切除;再将动物转向左侧,以同样的方法切除右侧卵巢。

1.3 雌激素治疗:参照 Gundlach 等^[7-8]用药方法和给药时间,补充外源性苯甲酸雌二醇 1 mg/kg 皮下注射,每 7 d 1 次,共 4 次。

1.4 中药方剂活忆饮的治疗:参照文献^[9-10]用药方法和时间进行治疗。活忆饮主要由补肾益精中药熟地和活血行气中药黄芪,以及泻火解毒中药黄连等组成,水煎浓缩至含生药量 1 kg/L 的汤剂,每日每次 4.8 ml 灌胃。AD 组予等量生理盐水灌胃。

1.5 脑组织取材:用戊巴比妥钠麻醉大鼠,暴露心脏,先以生理盐水 200 ml 经升主动脉搏冲洗,再灌注 40 g/L 多聚甲醛 200~300 ml 固定,持续 30 min 后取脑备用。取材范围为前囟后 2.0~5.0 mm 和前囟后 2.0 mm 至前囟前 0.3 mm。脑组织常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,连续冠状切片(片厚 5 μ m),用于免疫组化观察。

1.6 细胞免疫组化染色:切片经 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗浸入兔抗 A β 1-40 蛋白(或 nAChR)溶液(1:200,武汉博士德公司)中 4 ℃孵育过夜,生物素化兔二抗溶液孵育 2 h,加入卵白素-生物素-过氧化物酶(ABC)复合物孵育 2 h,每步之间均用 PBS 漂洗 3 次,每次 10 min。用硫酸镍铵加强的 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)呈色,蒸馏水终止反应,干燥、脱水透明、封片,光镜观察。阴性对照用 0.01 mol/L PBS 替代一抗,其余步骤相同。

1.7 统计学处理:参考 Paxinos 和 Watson 大鼠脑立体定位图谱,在光学显微镜下(10 \times 40)于皮质区、海马 CA1 区、杏仁复合体区、基底前脑 Meynert 核等部位随机各取 5 个视野,记录 A β 1-40、nAChR 阳性细胞数,取平均值,用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS10.0 统计软件进行 *t* 检验分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表 1 结果显示:活忆饮组和 E2 组大鼠皮质区、

基金项目:山东省科技厅基金资助项目(3130110,022130109)

通讯作者:郭宗君,研究员(Email:zjguo@zju.edu.cn)

作者简介:金丽英(1964-),女(汉族),山东省人,副研究员(Email:jly1351@163.com)。

海马 CA1 区、杏仁复合体区、Meynert 核区 nAChR 阳性细胞数显著高于 AD 组,而 $\text{A}\beta 1-40$ 阳性细胞数显著低于 AD 组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。活忆饮组大鼠大脑皮质区、杏仁复合体区 nAChR 阳性细胞数较 E2 组明显升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);在海马 CA1 区和 Meynert 核区 $\text{A}\beta 1-40$ 阳性细胞数较 E2 组显著降低,差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。

表 1 各组大鼠不同脑区 $\text{A}\beta 1-40$ 、nAChR 阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Amounts of $\text{A}\beta 1-40$, nAChR positive cells in different cerebral regions of rats in each group ($\bar{x} \pm s$) 个/视野

部位	组别	动物数(只)	$\text{A}\beta 1-40$	nAChR
皮质区	AD 组	5	45.80 ± 9.60	30.20 ± 8.65
	E2 组	5	28.11 ± 23.78*	66.00 ± 4.24**
	活忆饮组	5	11.00 ± 5.67**	91.66 ± 9.31***#
海马 CA1 区	AD 组	5	59.83 ± 14.03	41.95 ± 9.63
	E2 组	5	36.80 ± 15.34*	97.67 ± 9.29**
	活忆饮组	5	12.25 ± 11.83**#	80.95 ± 7.36**
杏仁复合体区	AD 组	5	62.04 ± 17.46	38.18 ± 9.19
	E2 组	5	17.25 ± 10.22**	84.50 ± 6.36**
	活忆饮组	5	8.51 ± 5.24**	95.23 ± 5.42***#
Meynert 核区	AD 组	5	51.88 ± 10.29	18.18 ± 1.65
	E2 组	5	6.14 ± 2.89**	91.33 ± 10.12**
	活忆饮组	5	2.28 ± 1.38***#	97.89 ± 4.57**

注:与 AD 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 E2 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

研究发现,AD 患者脑内 nAChR 数量显著下降。已知乙酰胆碱系统与 APP 代谢有密切关系,而 nAChR 可调节 APP 翻译后的加工,应用 M1 激动剂后,可增加可溶性 APP 的释放,以及增加 α -分泌酶的活性,又同时抑制 β -分泌酶的活性^[11]。

雌激素对人类及动物学习、记忆等认知功能具有重要的作用。研究发现,雌激素对脑损伤具有神经保护作用,如雌激素替代治疗可延缓神经细胞凋亡,减小脑梗死体积等^[12]。手术切除卵巢的患者和自然绝经后的妇女可有学习和记忆减退、情感低落、情绪波动、焦虑等变化,严重者甚至发展为 AD。卵巢切除后造成大鼠体内雌激素缺乏,导致雌激素受体下调或退用性萎缩和减少,引起功能异常,从而影响 APP 代谢和神经细胞的多种功能活动^[4]。

乙酰胆碱与记忆的形成和储存有关。基底神经核(NBM)和内侧隔核是脑内主要胆碱能神经元的分布区,它们发出纤维投射到海马和大脑皮质,所释放的乙酰胆碱占大脑皮质释放乙酰胆碱的绝大部分,对记忆起重要作用。双侧穹窿-海马伞切断后损伤了隔区胆碱能神经纤维至海马与皮层的投射,从而破坏胆碱能功能诱发动物学习记忆障碍^[1]。本实

验结果显示,补充外源性雌激素后大鼠皮质区、海马 CA1 区、杏仁复合体区、Meynert 核区的 nAChR 阳性细胞数明显升高, $\text{A}\beta 1-40$ 阳性细胞数明显减少。这与雌激素替代治疗提高基底前脑的胆碱能神经元功能及对 APP 系统的调节作用有关^[13]。

祖国医学认为,AD 属于“呆病”、“文痴”、“郁证”等范畴,提出其病机为脏腑本虚为主,兼以标实、痰、瘀。其因年迈体虚、肝肾渐亏、脑髓空虚、气血不足、心神失养为病之本,血瘀痰阻、脉络不利为病之标,病位在脑、肝、肾、心、脾。中医辨证分析治疗从整体出发,辨证施治,充分体现“理、法、方、药”的完整性,是中医治疗 AD 的特色所在^[14]。中药复方含多味中药,单味药又含多种成分,因此可作用于多系统、多环节、多途径。有研究者应用豁痰化瘀中药复方治疗 AD 取得显著疗效,并通过作用于 APP 环节而下调实验性 AD 大鼠脑组织 APP mRNA 过度表达,从而减少 β -淀粉蛋白在脑组织内沉积来对 AD 的病情进行有效干预^[15]。本课题组方中所用熟地等具有补肝肾,助阳生精,填髓健脑的作用;黄芪等具有通补结合,寓通于补,共奏益气健脑、化痰宁心安神之功;黄连和甘草等配伍寒温相宜,一补一泻,通补结合,直对病机,取效尤速。从本实验中观察到,采用中药治疗后,大鼠皮质区、海马 CA1 区、杏仁复合体区、Meynert 核区的 $\text{A}\beta 1-40$ 阳性细胞数均明显减少,nAChR 阳性细胞数明显升高。说明活忆饮方剂可干预乙酰胆碱系统对 APP 代谢系统的影响过程,并可能有类似雌激素样作用,从而影响 AD 病理形成过程,有一定疗效,但其机制仍需进一步探讨。

参考文献:

- [1] Lyness S A, Zarow C, Chui H C. Neuron loss in key cholinergic and aminergic nuclei in Alzheimer disease: a meta-analysis[J]. *Neurobiol Aging*, 2003, 24(1): 1-23.
- [2] Krügel U, Bigl V, Eschrich K, et al. Deafferentation of the septo-hippocampal pathway in rats as a model of the metabolic events in Alzheimer's disease[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2001, 19(3): 263-277.
- [3] 郭宗君, 杜芳, 张延霞, 等. 穹窿-海马伞切断及去势大鼠脑内 β 淀粉样肽 1-40 表达的变化[J]. *齐鲁医学杂志*, 2004, 19(1): 4-5, 8.
- [4] Henderson V W. Estrogen-containing hormone therapy and Alzheimer's disease risk: understanding discrepant inferences from observational and experimental research[J]. *Neuroscience*, 2006, 138(3): 1031-1039.
- [5] Singh M, Meyer E M, Millard W J, et al. Ovarian steroid deprivation results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female SD rats[J]. *Brain Res*, 1994, 644(2): 305-312.
- [6] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinated [M]. 2nd ed. Australia: academic Press Australia, 1988: figure

- 23-38.
- [7] Gundlach C, Kohama S G, Mirkes S J, et al. Distribution of estrogen receptor beta (ER β) mRNA in hypothalamus, midbrain and temporal lobe of spayed macaque; continued expression with hormone replacement[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2000, 76(2): 191-204.
- [8] 郭宗君, 金丽英, 王洪霞, 等. 外源性雌激素对 IBA 和 D-gal 诱发大鼠认知障碍的干预作用[J]. 中国老年学杂志, 2003, 23(11): 761-763.
- [9] 张建宏, 范建中, 邓爱文. 石杉碱甲治疗轻中型颅脑外伤记忆及认知障碍的临床研究[J]. 中国康复医学杂志, 2002, 17(3): 162-164.
- [10] 李海玲, 李林, 李斌, 等. 中药复方 962 对老龄大鼠皮质胆碱乙酰转移酶和乙酰胆碱酯酶活性的影响[J]. 首都医科大学学报, 2000, 21(3): 190-192.
- [11] Wevers A, Burghaus L, Moser N, et al. Expression of nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease; postmortem investigations and experimental approaches[J]. Behav Brain Res, 2000; 113(1-2): 207-215.
- [12] 么冬爱, 章军建, 张晓琴, 等. 雌激素对脑缺血时 Bcl-2 蛋白表达影响及神经保护作用的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(1): 29-31.
- [13] Sohrabji F, Miranda R C, Toran-Allerand C D. Estrogen differentially regulates estrogen and nerve growth factor receptor mRNAs in adult sensory neurons[J]. J Neurosci, 1994, 14(2): 459-471.
- [14] 袁婉丽, 胡节惠, 罗昌明. 中医药治疗阿尔茨海默病进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2000, 9(3): 203-205.
- [15] 杨文明, 韩明向, 李泽庚, 等. 豁痰化痰中药复方对白介素-1 β 诱导大鼠脑组织 APP mRNA 表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(5): 278-280.
- (收稿日期: 2007-04-02 修回日期: 2007-05-31)
(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

低能量低频次体外冲击波碎石术联合中药治疗尿路结石 925 例

张顺平¹, 王佐超²

(1. 天津市武警医学院附属医院, 天津 300162; 2. 天津市人民医院泌尿外科, 天津 300121)

【关键词】 体外冲击波; 结石; 泌尿系

中图分类号: R691.4 文献标识码: B 文章编号: 1008-9691(2007)06-0373-01

应用 X 线定位体外冲击波碎石术 (ESWL) 治疗 925 例泌尿系结石患者, 疗效满意, 报告如下。

1 临床资料

1.1 病例: 925 例患者中男 673 例, 女 252 例; 年龄 12~77 岁, 平均 (43.96 \pm 1.00) 岁; 肾盂结石 32 例, 输尿管结石 880 例, 膀胱结石 13 例; 结石最大 2.5 cm; 903 例合并不同程度肾积水。所有患者无体外碎石治疗的禁忌症。

1.2 治疗方法: 无需麻醉, 肾、输尿管上段结石取平卧位, 输尿管中下段、膀胱结石取俯卧位, 工作电压 3.5~7.5 kV, 平均频率 50 次/min, 冲击次数 1 500~2 500 次。术后综合治疗: ①给予患者具有清热利湿、活血化瘀、行气止痛功效的金钱排石汤 (方药由金钱草、海金沙、鸡内金、木香、滑石、萹蓄等组成); ②多饮水, 饮水量 2 000~3 000 ml/d, 增加尿液对结石的冲刷力, 利于排石^[1]; ③多运动, 采用后跟单脚蹦, 根据重力原则帮助结石排出^[2]。

1.3 结果: 一次碎石排净者 612 例, 二次碎石排净者 233 例, 结石最终排净者 915 例, 其余 10 例改用其他方法治疗。并发症: 术后血尿 860 例, 再发痉挛性绞痛 108 例次, 局部皮肤红斑、淤血 86 例, 处理后缓解; 未见输尿管石街、肾包膜下血肿发生。

2 讨论

本组 925 例患者中, 经 1~3 次碎石后, 成功率达 97.8%, 且对合并有肾绞痛者有缓解作用。近代医学认为活血化瘀中药能够改善微循环、抗组织缺氧、抗凝、解聚、纤溶等功效, 对 ESWL 术后肾及输尿管的损伤亦有修复作用^[3]。

无效的 10 例患者最终经手术或输尿管镜治疗证明为结石被纤维包裹, 结石虽然已被粉碎, 但由于包裹较紧, 亦不能排出。总结这类患者, 大多为病史较长, 有的有不成功碎石史, 其中 1 例患者有结石感染史, 所以对这类患者可以不进行 ESWL 治疗, 而直接手术或输尿管镜治疗, 以免增加患者的负担。

ESWL 后的主要并发症有肉眼血尿、石街石巷形成、肾绞痛、发热等。本组碎石后出现肉眼血尿者占 92.97%, 通过对症、多饮水、服中药等综合治疗, 血尿多在 1~3 次排尿后缓解。肾绞痛发生率为 11.68%, 通过解痉、止痛后均得到缓解。

ESWL 所致的空化效应是结石粉碎和组织损伤的主要机制, 但冲击能量越高、频率越快, 对肾脏损伤越严重, 其远期可致肾性高血压、肾萎缩、输尿管组织水肿和纤维化^[4], 但是低能量、低频次可以减少或避免这种并发症的发生。

参考文献:

- [1] 杨嗣星, 詹炳炎, 王玲瓏, 等. 尿路结石致急性肾功能衰竭的急诊手术治疗[J]. 中国危重病急救医学, 1996, 8(8): 467-469.
- [2] 刘志亮, 李占清, 李日清, 等. 中西医结合治疗上尿路结石 983 例[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2003, 10(4): 248.
- [3] 满建仁, 杨景旭, 孙寒, 等. 体外震波碎石治疗尿石症性肾功能衰竭 4 例[J]. 中国危重病急救医学, 1998, 10(5): 316.
- [4] Aoki Y, Ishitoya S, Okubo K, et al. Changes in resistive index following extracorporeal shock wave lithotripsy[J]. Int J Urol, 1999, 6(10): 483-492.

(收稿日期: 2007-06-01)

修回日期: 2007-09-26

(本文编辑: 李银平)