

益智醒脑颗粒对血管性痴呆大鼠行为认知能力及胆碱能系统的影响

杨书婷, 陈冬冬, 潘 旻, 韦小翠, 张 焱, 程建明*

(南京中医药大学药学院, 江苏省中药功效物质重点实验室, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 观察益智醒脑颗粒对血管性痴呆大鼠行为认知能力及胆碱能系统的影响。**方法** 双侧颈总动脉结扎法制备模型, 将大鼠随机分为假手术组, 模型组, 吡拉西坦组 (378 mg/kg), 益智醒脑颗粒高、中、低剂量组 (1 260、630、315 mg/kg)。然后, 进行 Morris 水迷宫实验, 检测血浆 Ach 含量、AchE、GSH-Px 活性, 以及海马 MDA 含量、SOD、MAO-B 活性。**结果** 与模型组比较, 益智醒脑颗粒高、中剂量组可显著缩短大鼠逃避潜伏期 ($P < 0.05$), Ach 含量升高、GSH-Px、SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), MDA 含量降低、AchE、MAO-B 活性显著降低 ($P < 0.05$), 但低剂量组无明显变化 ($P > 0.05$)。**结论** 益智醒脑颗粒可改善血管性痴呆大鼠行为认知能力及胆碱能系统, 在中、高剂量下作用更明显。

关键词: 益智醒脑颗粒; 血管性痴呆; 行为认知能力; 胆碱能系统

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2018)09-2052-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.035

血管性痴呆是指由脑卒中或长期慢性脑缺血引起的局部病灶, 或由脑循环障碍引发的脑功能认知区域发生低灌注, 从而导致进行性认知功能衰退^[1], 除病理性神经系统定位损伤的临床表现外, 它还伴有严重的心理症状和异常精神行为^[2]。该病发病率逐年增长, 而且缺乏有效的防治药物, 中药在该方面有着独特优势。益智醒脑颗粒由西洋参、水蛭、远志、胆南星、石菖蒲、何首乌 6 味药材组成, 在缓解血管性痴呆方面具有良好的疗效, 故本实验考察其对大鼠行为认知能力及胆碱能系统的影响。

1 仪器

1.1 动物 SD 大鼠 80 只, 雌雄各半, 体质量 180 ~ 200 g, 由浙江省实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (浙) 2014-0001。

1.2 试剂 益智醒脑颗粒中间体 (自制)。吡拉西坦 (南京白敬宇制药有限责任公司); 10% 水合氯醛、CMC-Na、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX)、乙酰胆碱 (Ach)、乙酰胆碱酯酶 (AchE)、单胺氧化酶 B (MAO-B) 酶联免疫 (ELISA) 试剂盒 (南京金益柏生物科技有限公司)。

1.3 仪器 ZS-001 型 Morris 水迷宫 (北京众实迪创科技发展有限公司); MK3 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher 公司); 艾本德冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); GHP-9050N 型隔水式恒温培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); DGG-9140A 型电热恒温鼓风干燥 (上海森信实验仪器有限公司)。

2 方法

2.1 中间体及药物制备 西洋参加 12 倍量 70% 乙醇加热回流提取 2 h, 滤过; 药渣中加入制何首乌、蜜远志、胆南星、水蛭, 先加 8 倍量水煎煮 1.5 h, 滤过, 药渣再加 5 倍量水煎煮 1 h, 滤过, 再加 5 倍量水煎煮 1 h, 合并 3 次滤液; 石菖蒲加 12 倍量水提取 7 h, 收集挥发油。然后, 合并所有药材水煎液, 减压浓缩至含生药量 1.0 g/mL, 边搅拌边缓慢加入 95% 乙醇至最后醇沉量为 70%, 静置 6 h, 滤过, 醇沉液与醇提液合并浓缩, 减压干燥。将干燥好的中间体粉碎, 过 100 目筛, 收集可过筛粉末, 保存备用。再将挥发油和中间体粉末一起制备成 0.5% CMC-Na 混悬液, 制备工艺经中试放大后发现验证可行。

2.2 分组 80 只大鼠先进行 Morris 水迷宫实验筛选, 去除在 90 s 内未找到平台的 4 只, 剩下的随机选取 10 只 (雌雄各半) 作为假手术组, 其余采用双侧颈总动脉结扎法制备模型。造模结束后, 去除手术过程中及手术后饲养过程中死亡的 11 只大鼠, 剩下的选取 50 只 (雌雄各半), 随机分成假手术组, 模型组, 吡拉西坦组 (378 mg/kg), 益智醒脑颗粒高、中、低剂量组 (1 260、630、315 mg/kg), 每组 10 只, 雌雄各半。手术 1 周后开始给药 4 周, 给药组大鼠每 100 g 体质量灌胃给予 1 mL 相应药物, 假手术组、模型组大鼠灌胃给予 0.5% CMC-Na^[3-5]。

2.3 模型建立 大鼠手术前 12 h 禁食、自由进水, 然后每 100 g 体质量腹腔注射 0.3 mL 10% 水合氯醛进行麻醉, 大鼠仰卧, 栓线将其四肢固定在大鼠板周边, 分离颈总动

收稿日期: 2017-09-12

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助 (2017)

作者简介: 杨书婷 (1992—) 女, 硕士生, 研究方向为药物新技术。Tel: 13276677366, E-mail: ystnzyy@163.com

* 通信作者: 程建明 (1965—) 男, 博士, 研究员, 硕士生导师, 研究方向药物新剂型与新技术。Tel: 13585206999, E-mail: cjm7895@163.com

豚后用手术线分别结扎近心端和远心端，并从中间将颈总动脉剪断，缝合伤口，消毒擦拭切口。手术后1周内每天消毒伤口，每2 d腹腔注射青霉素（50万单位/kg）；假手术组仅分离颈总动脉，不结扎^[6-9]。

2.4 Morris水迷宫实验 实验装置由圆形不锈钢恒温水池、平台、供水系统、自动记录系统4个部分组成、水池直径1.5 m，高0.6 m，水深0.3 m，水温设置为（26 ± 1）℃。在池壁4个等距离的入水点作为实验起始点，水池被平均分成4个象限，分别为I、II、III、IV象限，其中在III象限的中间位置摆放1个平台，直径12 cm，高29 cm，并且低于水平面下1 cm，然后用墨汁将水染黑，使得平台不可见。在圆形不锈钢水池的上方装有一台摄像机，并与计算机相连，可实时动态地记录大鼠游泳轨迹，并且记录其运动时间。

最后一次给药结束后进行Morris水迷宫实验，使大鼠分别从另外3个象限的等距离入水点进入实验池中，观察其在90 s内能否找到平台，如果能找到并且在平台上停留10 s，记录寻找平台所需的时间（逃避潜伏期）；如果找不到平台，则用竹竿进行引导，并让其在平台上停留10 s，此时逃避潜伏期统一记录为90 s。3次平均时间为1次训练的逃避潜伏期，共训练4 d^[10]。

2.5 血浆成分检测 Morris水迷宫实验结束后，大鼠每100 g体质量腹腔注射0.3 mL 10%水合氯醛麻醉，5 mL负

压采血管进行腹主动脉取血，3 000 r/min低温离心15 min，分离血浆，按照试剂盒操作步骤测定乙酰胆碱（Ach）的量、乙酰胆碱酯酶（AchE）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性^[11]。

2.6 海马成分检测 腹主动脉取血结束后，大鼠断头处死，迅速取出脑组织，置于冰生理盐水中漂洗，除去血迹，滤纸拭干，于冰盒上分离出海马，装于冻存管中，液氮保存。精密称取适量制成10%脑组织匀浆，3 500 r/min低温离心10 min，取上清液，按照试剂盒操作步骤测定超氧化物歧化酶（SOD）、丙二醛（MDA）、单胺氧化酶B（MAO-B）含量和活性^[12]。

2.7 统计学分析 通过SPSS 13.0软件进行处理，计量数据以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较方差齐时采用LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状态 模型组大鼠饮水量较小，体毛枯黄无光泽，体型瘦弱，呆卧少动，行动迟缓，对外界刺激的反应迟钝；给药组大鼠情况明显好于模型组，而且药物剂量越大，状态越好，对外界刺激的反应更灵敏，行动更敏捷。

3.2 对大鼠行为的影响 表1显示，与模型组比较，第4天吡拉西坦组及益智醒脑颗粒高、中剂量组大鼠逃避潜伏期显著缩短（ $P < 0.05$ ），而低剂量组无明显变化（ $P > 0.05$ ）。

表1 益智醒脑颗粒对大鼠行为的影响（ $\bar{x} \pm s, n = 10$ ）

组别	逃避潜伏期/s			
	第1天	第2天	第3天	第4天
假手术组	53.16 ± 7.87	24.19 ± 4.61	7.56 ± 1.38	4.30 ± 0.71
模型组	85.07 ± 8.22	46.57 ± 5.94	32.92 ± 5.67	24.42 ± 1.72 [#]
吡拉西坦组	65.29 ± 10.26	35.88 ± 4.60	22.87 ± 2.47	14.33 ± 1.65 [*]
益智醒脑颗粒高剂量组	77.15 ± 8.79	55.68 ± 8.19	22.47 ± 2.50	16.05 ± 1.69 [*]
益智醒脑颗粒中剂量组	77.69 ± 10.10	56.49 ± 7.63	25.23 ± 2.95	16.28 ± 2.19 [*]
益智醒脑颗粒低剂量组	80.32 ± 9.87	58.15 ± 7.23	34.28 ± 6.03	23.19 ± 2.70

注：与假手术组比较，[#] $P < 0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$

3.3 对Ach含量、AchE、GSH-Px活性浓度的影响 表2显示，与模型组比较，吡拉西坦组及益智醒脑颗粒高、中剂量组Ach、GSH-Px活性浓度显著升高（ $P < 0.05$ ），

AchE活性浓度显著降低（ $P < 0.05$ ），而低剂量组无明显变化（ $P > 0.05$ ）。

表2 益智醒脑颗粒对Ach、AchE、GSH-Px浓度及活性的影响（ $\bar{x} \pm s, n = 10$ ）

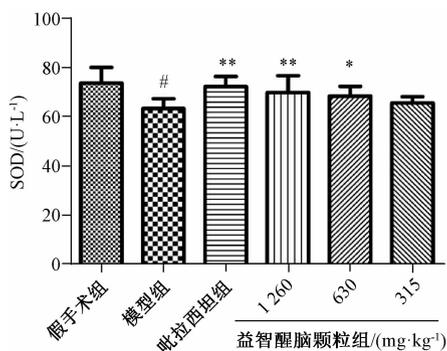
组别	Ach/($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	AchE/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	GSH-Px/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
假手术组	131.82 ± 5.68	162.78 ± 17.79	19.60 ± 2.07
模型组	112.13 ± 8.63 [#]	221.86 ± 40.76 [#]	15.08 ± 0.89 [#]
吡拉西坦组	126.26 ± 9.57 [*]	165.15 ± 22.33 [*]	18.41 ± 3.19 [*]
益智醒脑颗粒高剂量组	123.07 ± 7.40 [*]	181.83 ± 27.20 [*]	17.75 ± 2.12 [*]
益智醒脑颗粒中剂量组	121.98 ± 5.83 [*]	196.78 ± 14.15 [*]	18.06 ± 2.13 [*]
益智醒脑颗粒低剂量组	118.49 ± 9.47	205.09 ± 20.52	16.61 ± 2.20

注：与假手术组比较，[#] $P < 0.05$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$

3.4 对SOD、MDA、MAO-B活性影响 图1~3显示，与模型组比较，吡拉西坦组及益智醒脑颗粒高、中剂量组SOD活性显著升高（ $P < 0.05, P < 0.01$ ），MDA、MAO-B含量和活性显著降低（ $P < 0.05$ ），而低剂量组无明显变化（ $P > 0.05$ ）。

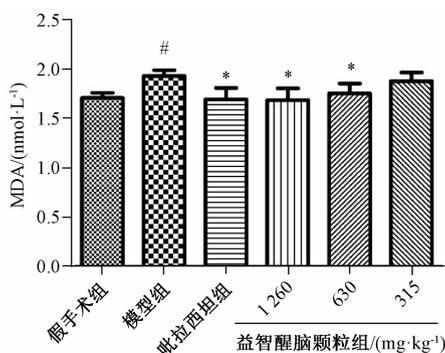
4 讨论

中医认为，血管性痴呆属于本虚标实、虚实夹杂的范畴，因此临床上根据虚实主次不同，采用先本后标、先标后本或标本兼治的方法进行治疗^[13-16]。益智醒脑颗粒组成为西洋参（6 g）、制首乌（12 g）、胆南星（9 g）、水蛭



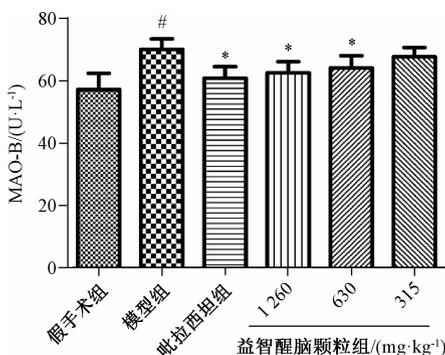
注: 与假手术组比较, [#]*P* < 0.05; 与模型组比较, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01

图1 益智醒脑颗粒对SOD活性的影响



注: 与假手术组比较, [#]*P* < 0.05; 与模型组比较, ^{*}*P* < 0.05

图2 益智醒脑颗粒对MDA含量的影响



注: 与假手术组比较, [#]*P* < 0.05; 与模型组比较, ^{*}*P* < 0.05

图3 益智醒脑颗粒对MAO-B活性的影响

(6 g)、远志 (6 g)、石菖蒲 (9 g), 共计 48 g, 疗效滋补肝肾、化痰通络、温化寒痰、醒脑开窍、健脑益智。方中西洋参益气养阴、善补元气、健脑益智, 而首乌制用善补肝血、益肾精, 二药合用阳生阴长, 共奏滋补肝肾、益精健脑之功, 为君药; 正常衰老过程中有血瘀证存在的可能, 瘀阻心脑则心神不安、心悸失眠、健忘痴呆、神昏谵语。《血证论·瘀血》云: “瘀血攻心, 心痛、头晕、神气昏迷……”, 而瘀血阻滞、痰凝不化、痰瘀互结、脑窍为之不通, 故方中又配以水蛭活血逐瘀; 胆南星燥湿化痰, 共奏化痰涤痰之功, 为臣药; 石菖蒲气味芳香、化湿开窍,

而远志安神益智, 共奏化痰开窍、宁心安神之功, 为佐药, 全方诸药合用, 标本兼治, 共奏补肾健脑、化痰涤痰、通络开窍之功。

张均田等^[17]发现, 西洋参中的人参皂苷 Rg₁、Rb₁ 不仅能增加小鼠大脑内 M-胆碱受体密度, 还可提高乙酰胆碱含量, 对促进大脑内蛋白质合成也有一定效果, 进而改善小鼠学习记忆能力; 二苯乙烯苷是何首乌中的活性成分, 具有抗氧化、清除自由基的作用, 能抑制神经细胞凋亡, 促进乙酰胆碱及其他神经递质合成, 减少乙酰胆碱分解; 制远志中的远志皂苷可提高 SOD 活性, 加速清除体内自由基, 升高 GSH-Px 活性, 促进体内过氧化物分解, 保证神经信号在生物体内的正常传递, 降低大脑脂质过氧化水平, 从而提高大鼠学习记忆能力。

Morris 水迷宫实验主要应用于老年痴呆、血管性痴呆、行为生物学等方面的研究, 能客观、科学、真实地反映大鼠学习记忆能力的变化, 为相关药物的有效性提供数据支持。本实验发现, 与假手术组比较, 模型组大鼠血浆 Ach 含量、GSH-Px 活性显著降低, AchE 活性显著升高; 海马 SOD 活性显著降低, MAO-B 活性、MDA 含量显著升高, 而经益智醒脑颗粒干预后上述指标均有所改善, 在中、高剂量下作用更明显。由此可知, 该制剂在治疗血管性痴呆方面具有较理想的效果, 可为进一步研究其作用机制提供参考。

参考文献:

[1] 曲艳吉, 卓琳, 王华丽, 等. 1980—2011 年中国社区 55 岁及以上人群中血管性痴呆流行病学的 Meta 分析[J]. 中国卒中杂志, 2013, 8(7): 533-543.

[2] 薄威, 邢雪松. 血管性痴呆的原因及机制[J]. 沈阳医学院学报, 2012, 14(2): 117-118, 122.

[3] 王馨, 李晶, 廖一兰, 等. 巴戟天水提物对老年痴呆模型大鼠的保护作用研究[J]. 中国药房, 2013, 24(31): 2908-2910.

[4] 乔之龙, 郭蕾, 李菲. 补肾益智汤对老年痴呆模型大鼠中枢神经递质的影响[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(12): 2565-2568.

[5] 肖移生, 曾元凤, 欧阳厚淦, 等. 黄精地龙方对老年痴呆大鼠行为认知及胆碱能系统的影响[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(4): 146-148.

[6] 林善花. 基于大鼠 AD 模型的生脉散药效物质基础研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2015.

[7] 谭子虎, 陈延. 加减薯蓣丸对血管性痴呆大鼠海马 BDNF mRNA 表达的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(4): 69-72.

[8] 庞小刚, 毕春玉, 于华芸, 等. 加味孔圣枕中丹对慢性脑缺血痴呆大鼠 VEGF 表达和微血管密度的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(23): 2515-2518.

[9] 武鹏, 罗远带, 甄丽芳, 等. 脑康胶囊对血管性痴呆大鼠行为学及海马区凋亡基因的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(9): 111-115.

- [10] 郑妮, 汤宇, 黎赛, 等. 新型复合式老年痴呆小鼠模型的建立[J]. 中南药学, 2009, 7(7): 481-484.
- [11] 洪汝, 许文强, 卢焕俊, 等. 续断提取物对血管性痴呆模型大鼠学习记忆能力的影响[J]. 延边大学医学学报, 2016, 39(2): 97-99.
- [12] 李雪娜. 益智胶囊对 $A\beta$ 致阿尔茨海默病模型大鼠干预作用及其有效成分研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2015.
- [13] 李钰兰, 郭宏敏. 血管性痴呆的五脏论治[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(1): 30-32.
- [14] 左扁头, 张华. 血管性痴呆的中医药治疗进展[J]. 光明中医, 2015, 30(8): 1811-1813.
- [15] 王璞, 王聿成, 潘激扬. 中医对老年痴呆的认识及治疗方药[J]. 中国医药科学, 2012, 2(4): 9-11.
- [16] 康宝仁, 庞声航. 中医防治老年痴呆概述[J]. 实用中医药杂志, 2013, 29(4): 327-329.
- [17] 张均田. 人参皂甙 R_{g1} 和 R_{b1} 药理作用的比较[J]. 基础医学与临床, 2000, 20(5): 4-6.

黄杞总黄酮对 2 型糖尿病合并动脉粥样硬化大鼠胰岛素抵抗的影响

韦洁, 李燕婧*, 陈晓军, 黄秋燕

(广西中医药研究院, 广西中药质量标准研究重点实验室, 广西南宁 530022)

摘要: **目的** 探讨黄杞总黄酮对 2 型糖尿病合并动脉粥样硬化大鼠胰岛素抵抗的影响。**方法** 高脂饲料、腹腔注射 *N*-硝基-*L*-精氨酸甲酯 (5 mg/kg) 共同诱导 GK 大鼠动脉粥样硬化后, 随机分为 5 组, 即模型组, 二甲双胍组 (150 mg/kg), 阿托伐他汀组 (10 mg/kg), 黄杞总黄酮高、低剂量组 (500、250 mg/kg), 另以正常 Wistar 大鼠为对照组, 灌胃给药 8 周。每 2 周检测体质量, 第 8 周测定空腹血糖 (FBG)、空腹胰岛素 (FINS), 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)、胰岛素敏感指数 (ISI), HE 染色法观察胰腺组织病理变化。**结果** 8 周后, 黄杞总黄酮组大鼠体质量显著低于模型组 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 黄杞总黄酮高剂量组 FBG、HOMA-IR 显著降低 ($P < 0.05$), ISI 显著升高 ($P < 0.05$), 而 FINS 水平无显著变化 ($P > 0.05$); 低剂量组亦然 (除 FBG 无明显变化, $P > 0.05$)。黄杞总黄酮高剂量组大鼠胰岛边缘较清晰, 胰岛形态较完整, 胰岛内细胞分布较均匀。**结论** 黄杞总黄酮可明显改善 2 型糖尿病合并动脉粥样硬化大鼠胰腺胰岛组织纤维化, 改善胰岛素抵抗, 增加胰岛素敏感性, 从而降低其血糖和体质量。

关键词: 黄杞; 总黄酮; 2 型糖尿病; 动脉粥样硬化; 胰岛素抵抗

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2018)09-2055-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.09.036

糖尿病是目前最常见的慢性代谢病之一, 致残率高, 严重影响患者生活质量, 以 2 型糖尿病最常见 (约占 90%), 其机制主要与胰岛素抵抗有关, 表现为糖、脂代谢异常^[1-2]。目前, 动脉粥样硬化是临床上较常见的 2 型糖尿病并发症, 而且高脂、高血糖易造成一定程度血管损伤^[3,4], 同时其伴随的胰岛素抵抗可通过抑制血管活性 NO 生成与释放进一步加剧血管病变^[5]。GK 大鼠是一种国际公认的自发性非肥胖型 2 型糖尿病动物模型, 主要表现为胰岛功能受损及胰岛素抵抗, 与人类发病特点较相似^[6]。

前期研究显示, 黄杞 *Engelhardia roxburghiana* Wall. 叶中的总黄酮可明显降低四氧嘧啶致糖尿病小鼠血糖水平, 但其机制尚未明确^[7]。本实验采用 GK 大鼠合并动脉粥样硬化模型模拟临床上 2 型糖尿病合并血管并发症, 考察黄

杞总黄酮对其胰岛素抵抗的影响, 明确该成分对胰岛素释放及血糖调控的机制, 以期阐明它对 2 型糖尿病合并血管并发症的影响, 为相关临床应用提供基础。

1 材料

1.1 动物及饲料 清洁级雄性 Goto-Kakisaki (GK) 大鼠、SPF 级 Wistar 大鼠, 均购于上海斯莱克实验动物有限公司, 动物许可证号 SCXK (沪) 2012-0002。普通饲料、高脂饲料 (猪油 10%、胆固醇 1%、猪胆盐 0.2%、鸡蛋黄 5%、丙硫氧嘧啶 0.07%、普通饲料 83.73%) 均由广西中医药研究院提供。饲养温度保持在 20~25℃, 相对湿度 55% 左右, 动物自由进食饮水, 每日 12 h 昼夜循环。

1.2 试药 黄杞叶采自广西上思, 经广西中医药研究院中药所专家鉴定为黄杞 *Engelhardia roxburghiana* Wall. 干燥

收稿日期: 2017-09-22

基金项目: 广西中药质量标准研究重点实验室青年骨干创新基金资助项目 (桂中重自 201508)

作者简介: 韦洁 (1988—), 女 (壮族), 硕士, 助理研究员, 从事中药药理学研究。Tel: 18776762005, E-mail: abcdefgwj@126.com

* **通信作者:** 李燕婧 (1979—), 女, 副主任药师, 从事中药药理学研究。Tel: 13878126053, E-mail: 124756736@qq.com