

蜂眠宁胶囊对肾虚型老年痴呆模型大鼠的改善作用

熊义涛¹, 敖明章², 但汉雄³, 林园园¹

(1.湖北省中医院/湖北省中医药研究院 湖北 武汉 430061; 2.华中科技大学生命科学与技术学院 湖北 武汉 430074; 3.湖北中医药大学 湖北 武汉 430065)

摘要:目的 研究蜂眠宁胶囊对肾虚型老年痴呆动物模型的改善作用。方法 将雄性 Wistar 鼠随机分为6组,即空白组、假手术组、模型组、六味地黄丸组和蜂眠宁胶囊大、小剂量组。每天灌胃给予氢化可的松(15mg/kg),两周后于侧脑室注射 β -淀粉样蛋白(25-35)10 μ g,建立肾虚型老年痴呆动物模型。于手术第2天开始,六味地黄丸和蜂眠宁胶囊大、小剂量组灌胃给药。观察、检测各组大鼠的体重及一般状态、学习记忆能力、自主活动、行为学检测后测定各组大鼠血清皮质酮含量、免疫学指标及脑组织病理学变化。结果 模型组大鼠体重增长缓慢,自主活动迟缓,水迷宫学习记忆能力减退,胸腺和脾指数降低,血清皮质酮值降低,假手术组各项指标比模型组轻,表明短时间肾虚对学习记忆有一定影响,蜂眠宁胶囊大、小剂量组动物体重增长、自主活动、水迷宫上台潜伏期、实台象限游程、穿越平台次数、胸腺和脾指数、血清皮质酮值等与模型组比较得到明显改善($P<0.05$, $P<0.01$),效果具有显著性差异,并优于六味地黄丸组($P<0.05$)。结论 蜂眠宁胶囊对肾虚型老年痴呆症状具有显著改善作用。

关键词:老年痴呆 蜂眠宁胶囊 蜂胎冻干粉

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

doi: 10.3969/j.issn.1008-987x.2018.03.02

Effects of Fengmianning Capsule on Senile Dementia Model Rats

XIONG Yitao¹, AO Mingzhang², DAN Hanxiong³, LIN Yuanyuan¹

(1. Hubei Provincial Hospital of Chinese Medicine/The Academy of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy of Hubei, Wuhan 430074; 2. College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074; 3. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065)

Abstracts Objective To study the effects of Fengmianning capsule on the senile dementia animal models with deficiency of kidney. **Methods** Male Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, control group, Fengmianning capsule(FMN)high dose group, low dose group and Liuwei Dihuang pill(LWDH) group. To establish the senile dementia, the rats of the model group, FMN groups and LWDH group were treated by orally administered hydrocortison(15mg/kg/d) for 14d and then intracerebroventricular injection of amyloid β -protein(25-35) at the 14th day, control group was given the same volume of normal saline. From the 15th day to the end, FMN-treated rats and LWDH-treated rats were orally administered, rats in other groups were given an equivalent amount of distilled water. From the beginning, the following changes including body weight, locomotor activity, learning and memory, serum corticosterone, immunological indexes and the histopathology factors of brain were observed. **Results** The model rats showed that weight grew slowly, autonomic activity decreased, the ability of learning and memory impaired, thymus index, spleen index decreased, the level of serum corticosterone reduced. After 3

基金项目 湖北省卫生厅中医药中西医结合科研项目(项目编号:2012Z-Y41)。

作者简介 熊义涛(1966-),男,湖北省中医院主任药师,研究方向:中药新药研发。

通讯作者 林园园(1976-),女,湖北省中医院主管药师,研究方向:中药药理、药效研究 E-mail: 3091468165@qq.com。

weeks of administration of FMN capsule, all such indexes of rats were significantly improved ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while LWDH-treated rats showed the same improvement effects compared with model group. **Conclusion** FMN capsule and LWDH pill can also significantly improve senile dementia with deficiency of kidney.

Key words: senile dementia; Fengmianning capsule; bee embryo frozen dry powder

老年痴呆症(Alzheimer's disease, AD)临床上以进行性记忆力减退和智力下降为主要表现,病理生理主要以老年斑、神经细胞内的神经纤维缠结、淀粉样蛋白沉积以及神经元空泡变性和大量丧失为主^[1]。据报道,老年人口中痴呆的患病率占总人口的4%~5%,80岁以上的老年人可占17%~20%^[2]。蜂眠宁胶囊是由蜂胎冻干粉、缬草、黄芪等中药制备而成,具有延缓衰老和改善睡眠的作用。使用过程中,发现它能有效改善老年人的记忆力和应激反应能力,减轻老年斑的色素沉着。本实验是在肾虚动物模型的基础上,从侧脑室注射淀粉样蛋白片段,加速痴呆的形成,从而观察蜂眠宁胶囊对该模型的改善作用。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar大鼠72只(购于湖北省实验动物中心,合格证号:SCXK(鄂)2012-0007),雄性,体重(280±20)g。饲养条件为室温(25±2)℃,PVC大鼠饲养笼,普通饲料喂养。

1.2 药物

六味地黄丸(北京同仁堂生产,批号:120712);蜂眠宁胶囊(由武汉惠尔生物科技有限公司提供,批号:20131001)。

1.3 试剂与仪器

氢化可的松(山西晋新双鹤药业有限责任公司生产,批号:201208062);Aβ₂₅₋₃₅(Sigma产品,批号:101M4815V);SOD试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20130305);MDA试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20130301);大鼠皮质酮酶免试剂盒(RND公司,批号:LOT201212);睾酮放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所,批号:20121020)。

哺乳动物手术器械包、电子天平、TDL-80-2B型高速冷冻离心机(上海安亭公司)、恒温水浴锅、大鼠自主活动仪及Morris水迷宫测试仪(上海欣软信息科技有限公司)。

1.4 动物模型建立与给药方法

Wistar大鼠在正常条件下饲养1周后随机分为6组,即空白对照组、假手术组、模型对照组、六味地黄丸组(6g/(kg·d))和蜂眠宁胶囊大(0.9g/(kg·d))、小(0.3g/(kg·d))剂量组,每组12只。

除空白组外,其余各组大鼠每天灌胃给予氢化可的松(15mg/(kg·d))两周,造成肾虚模型^[3-4]。两周后再分别腹腔注射15%乌拉坦(1.5g/kg),待其麻醉后,放入无菌操作台内,固定,参照大鼠脑立体定位图谱,在顶骨右侧上钻一个小孔。具体定位是:以前囟为零点,于前囟向后0.8mm,中线旁开1.5mm处,用牙科钻钻开颅骨,暴露硬脑膜,再用微量注射器自脑表面垂直进针3.8~4.0mm,缓慢将5μL液体注入侧脑室,缓慢退针^[5]。其中假手术组注射生理盐水5μL,其他组注射Aβ₂₅₋₃₅(2μg/μL)5μL,注射后用牙科泥封堵颅骨。消炎粉消毒,缝合皮肤,建立肾虚型老年痴呆动物模型。

手术后蜂眠宁胶囊和六味地黄丸组灌胃给予相应的药物,其余各组灌胃给予相应体积的生理盐水。灌胃在每天上午行为学测试前1h进行,1次/d,共3周。

1.5 观察项目及方法

1.5.1 体重及一般状态观察:从给氢化可的松的第1天开始,每5天测1次体重、观察动物一般状态并记录。

1.5.2 空场实验:在侧脑室注射完2周后将大鼠放入空场测试箱,适应3min,测试10min,计算机自动记录动物的运动总路程、运动总时间、平均速度、僵滞时间。

1.5.3 水迷宫实验^[6]:在侧脑室注射完2周后进行水迷宫实验,分为定位航行实验(5天)和空间探索实验(1天),共6天。

(1)定位航行实验:开始进行水迷宫训练,实验前将大鼠置于站台上适应10s,随后将大鼠随机从不同象限面壁置入池内,大鼠登上站台5s后终止记录,最长记录时间为120s,若大鼠在120s内不能上台,引导其登上站台适应10s,最后将大鼠擦干放入鼠笼。如此将大鼠置入游泳池,4次/d,每次间隔1h,定位航行训练需要4天,记录第5天动物逃避潜伏期。

(2)空间探索实验:定航后将平台撤去,从靶象限的

对角象限将动物面向池壁置于池内,使动物在池内游泳 120s,记录动物在靶象限活动时间和路程比率及穿台次数。

1.5.4 胸腺和脾指数检测:行为学测试完后,处死动物取脾、胸腺,称质量,计算脾指数和胸腺指数。

1.5.5 血清皮质酮和睾酮的测定:动物断头处死取血,血样放置于4℃过夜后4000 r/min离心15min,取上清液,按试剂盒说明书进行检测。

1.5.6 脑组织SOD、MDA活性的测定:行为学检测结束后,将动物断头处死,立即将动物的脑组织取出,在4℃生理盐水中漂洗,除去血液,分离出皮层,制成10%的组织匀浆液,然后将组织匀浆液于4℃以3000r/min离心10min,取上清液,4℃储存待测。SOD、MDA活性的测定按相应试剂盒说明书进行。

1.5.7 脑组织病理形态变化:行为学测试结束后,每组随机取1只大鼠,15%乌拉坦(1.5g/kg)麻醉大鼠,用8号针头经左心室-升主动脉快速灌注0.9%氯化钠注射液,快速冲走组织中的血液;然后灌注4%多聚甲醛溶液,先快后慢,对组织进行固定,直至大鼠变僵硬,取出

脑组织,在4%多聚甲醛溶液中固定,常规石蜡切片和HE染色。

1.6 统计学方法

使用SPSS 10.0统计软件进行分析,实验数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较用单因素方差分析,组间两两比较用t检验。

2 结果

2.1 一般状态

空白组大鼠在整个实验过程中体重匀速增长,被毛光滑洁白、活动度较好;其余组在灌胃氢化可的松后5天左右出现活动度差、毛发光泽度差等症状,随着手术注射的加入,模型组动物基本蜷缩不动,进食量减少,体重增长缓慢或个别大鼠体重减轻;假手术组症状未见明显恶化,蜂眠宁胶囊和六味地黄丸组体重增长缓慢,但一般状态较好,被毛洁白,未发现明显的竖毛、蜷缩现象。从体重变化情况来看,随着氢化可的松的撤出,假手术组动物体重增长趋势恢复正常,而模型组体重增长缓慢或个别大鼠体重减轻,表明在肾虚模型基础上脑室内注射Aβ25-35可诱发老年痴呆。体重变化情况见表1。

表1 体重变化情况($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	0d	5d	10d	15d	20d	25d	30d	35d
空白组	286.4±18.8	295.8±21.6	311.4±23.4	319.4±20.7	330.7±23.2	343.6±25.2	350.5±22.2	361.2±26.3
假手术组	290.2±21.3	293.2±25.6	298.2±20.2	301.2±24.6	308.2±19.6	315.2±22.3	320.9±22.8	325.2±23.8
模型组	288.1±22.8	291.5±20.8	294.4±19.7	297.2±20.2	298.1±23.6*	301.7±19.2*	303.5±25.6*	302.4±21.2*
六味地黄丸组	284.7±24.6	289.0±21.8	296.1±23.5	300.7±27.2	305.1±28.2	314.0±25.7	317.4±27.5	323.8±25.9
黄眠宁小剂量组	280.6±20.6	284.1±24.5	290.3±22.8	293.7±24.5	298.2±23.3	304.6±22.7	310.7±27.8	318.7±29.3
黄眠宁大剂量组	283.6±23.3	287.1±21.7	292.3±24.8	296.6±20.5	301.9±25.7	309.6±27.9	315.8±24.2	321.6±28.4

与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较, $P<0.05$, $P<0.01$ 。

2.2 自主活动

与假手术组比较,模型组运动总路程减少,运动总时间和平均运动速度降低,僵滞时间加长,其差异具有

统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,蜂眠宁和六味地黄丸组的运动总路程、运动总时间和平均运动速度均有明显改善($P<0.01$)。见表2。

表2 各组动物空场实验指标变化($\bar{x} \pm s$, n=12)

组别	运动总路程(cm)	平均速度(cm/s)	运动时间(s)	僵滞时间(s)
空白组	1730.5±212.4	3.74±0.48	464.3±76.8	37.8±16.3
假手术组	1442.2±187.5	3.37±0.33	429.6±84.2	70.5±21.5
模型组	536.8±132.4**	2.12±0.61**	252.8±68.4**	250.2±47.8**
六味地黄丸组	1373.8±198.8	3.28±0.40	418.9±88.3	82.2±22.3
黄眠宁小剂量组	1245.6±213.7	3.03±0.56	387.6±100.6	97.6±32.8
黄眠宁大剂量组	1388.6±179.9	3.39±0.51	422.5±90.6	78.5±28.6

与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.3 水迷宫实验

Morris 水迷宫定位航行实验中,无论是潜伏期、实台象限游程,还是穿越平台次数,模型组与假手术组相比,差异都具有非常显著性($P<0.01$)。六味地黄丸组、蜂眠宁胶囊大、小剂量组与模型组比较,差异具有显著性($P<0.05$, $P<0.01$)。说明蜂眠宁胶囊、六味地黄丸对实验大鼠的记忆均具有改善作用,其中蜂眠宁胶囊的效果优于六味地黄丸($P<0.05$)。结果见表3。

2.4 胸腺和脾指数

与空白组比较,模型组的脾质量、胸腺质量、脾指数、胸腺指数均明显降低;与假手术组比较,模型组的指标依然降低,说明在肾虚模型形成后侧脑室注射A β 25-35,肾虚症状会持续恶化($P<0.05$)。采用蜂眠宁胶囊和六味地黄丸治疗后,胸腺质量和胸腺指数明显

升高($P<0.01$),表明蜂眠宁胶囊和六味地黄丸能在一定程度上能够改善糖皮质激素引起的免疫指标的下降,其中蜂眠宁胶囊大剂量组的改善效果优于六味地黄丸($P<0.05$)。结果见表4。

表3 水迷宫实验各组动物指标变化情况($\bar{x} \pm s$ $n=12$)

组别	潜伏期(s)	实台象限游程(cm)	穿越平台次数(次)
空白组	18.6 \pm 6.7	411.5 \pm 57.8	8.7 \pm 2.1
假手术组	21.4 \pm 8.8	652.6 \pm 68.2	7.2 \pm 2.3
模型组	76.8 \pm 21.2**	913.2 \pm 78.1**	2.8 \pm 1.4**
六味地黄丸组	38.6 \pm 9.2	724.3 \pm 60.3	5.6 \pm 2.1
黄眠宁小剂量组	40.7 \pm 11.9	773.8 \pm 49.7	5.2 \pm 3.0
黄眠宁大剂量组	31.5 \pm 10.5 #	658.0 \pm 66.2 #	7.0 \pm 1.7 #

与假手术组比较 ** $P<0.01$;与模型组比较, $P<0.05$, $P<0.01$;与六味地黄丸组比较 # $P<0.05$ 。

表4 各组胸腺和脾脏指数($\bar{x} \pm s$ $n=12$)

组别	胸腺质量(mg)	胸腺指数	脾脏质量(mg)	脾脏指数
空白组	301.5 \pm 27.9	0.83 \pm 0.17	1086.5 \pm 187.8	3.00 \pm 0.46
假手术组	218.2 \pm 36.7	0.67 \pm 0.14	785.3 \pm 117.2	2.41 \pm 0.61
模型组	133.6 \pm 21.6**	0.44 \pm 0.11**	318.7 \pm 87.7**	1.05 \pm 0.32**
六味地黄丸组	216.5 \pm 30.1	0.70 \pm 0.18	693.2 \pm 102.4	2.05 \pm 0.56
黄眠宁小剂量组	208.7 \pm 42.4	0.64 \pm 0.17	629.0 \pm 137.6	1.97 \pm 0.72
黄眠宁大剂量组	238.9 \pm 30.3 #	0.74 \pm 0.13	809.1 \pm 156.6 #	2.50 \pm 0.51 #

与假手术组比较 ** $P<0.01$;与模型组比较, $P<0.05$, $P<0.01$;与六味地黄丸组比较 # $P<0.05$ 。

2.5 血清中皮质酮和睾酮含量变化

与假手术组比较,模型组血清皮质酮和睾酮含量继续下降($P<0.01$);与模型组比较,蜂眠宁胶囊和六味地黄丸治疗组血清皮质酮和睾酮含量回升,差异具有显著性($P<0.05$, $P<0.01$),其中蜂眠宁胶囊大剂量组的改善效果优于六味地黄丸($P<0.05$),但仍未恢复至正常水平,可能与用药时间偏短有关,结果见表5。

表5 各组血清中皮质酮和睾酮含量变化($\bar{x} \pm s$ $n=12$)

组别	皮质酮($\mu\text{g/L}$)	睾酮(ng/mL)
空白组	103.3 \pm 30.1	2.84 \pm 0.78
假手术组	78.2 \pm 22.4	2.03 \pm 0.54
模型组	50.6 \pm 18.5**	1.12 \pm 0.31**
六味地黄丸组	63.9 \pm 17.6	1.76 \pm 0.45
黄眠宁小剂量组	64.3 \pm 17.9	1.74 \pm 0.62
黄眠宁大剂量组	76.4 \pm 22.8 #	2.17 \pm 0.54 #

与假手术组比较 ** $P<0.01$;与模型组比较, $P<0.05$, $P<0.01$;与六味地黄丸组比较 # $P<0.05$ 。

2.6 大脑皮质中SOD和MDA含量变化

模型组SOD含量明显下降,MDA含量上升,表明脑细胞出现了一定程度的氧化损伤;蜂眠宁胶囊和六味地黄丸治疗组皮质SOD含量回升,MDA含量降低($P<0.05$),表明药物干预具有一定的保护作用,其中蜂眠宁胶囊大剂量组对SOD含量的影响优于六味地黄丸组($P<0.05$),见表6。

表6 各组大脑皮质中SOD和MDA含量变化($\bar{x} \pm s$ $n=12$)

组别	SOD(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
空白组	305.7 \pm 47.8	4.12 \pm 0.78
假手术组	265.3 \pm 53.6	4.48 \pm 0.89
模型组	187.5 \pm 36.2**	5.24 \pm 0.71*
六味地黄丸组	236.0 \pm 44.7	4.76 \pm 0.56
黄眠宁小剂量组	222.4 \pm 52.9	4.82 \pm 0.71
黄眠宁大剂量组	272.5 \pm 40.9 #	4.27 \pm 0.61 #

与假手术组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较, $P<0.05$, $P<0.01$;与六味地黄丸组比较 # $P<0.05$ 。

2.7 脑组织病理学变化

空白组大鼠海马神经元细胞排列紧密,数目较多,结构清晰且分布均匀,胞核圆形无固缩或溶解现象,染色正常,未见胶质细胞增生。假手术组神经元数目稍有减少,细胞排列结构有松散现象,细胞体积无明显缩小,但胞核有固缩,染色加深。模型组大鼠海马及皮质结构异常,神经元数目明显减少,细胞排列松散、紊乱,多呈散在分布,细胞体积明显缩小,胞核固缩,染色加深,胶质细胞增生明显。蜂眠宁胶囊和六味地黄丸治疗组大鼠海马组织与模型组比较,在神经元数量、排列紧密程度以及神经元细胞核形态上都有明显的改善。见图1。

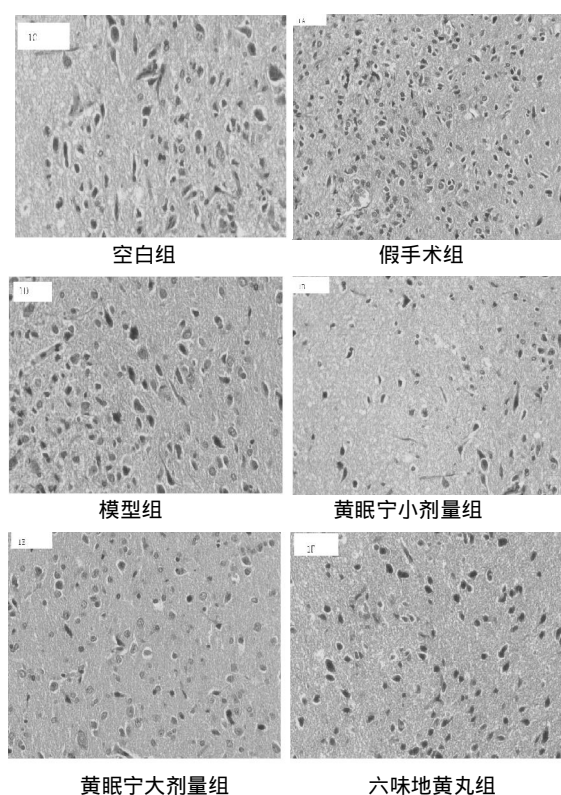


图1 各组大鼠海马区细胞结构变化(HE染色,200倍)

3 讨论

中医认为老年痴呆属于“心神失常”、“善忘”、“呆病”、“痴证”、“癡证”类中、“郁证”。老年痴呆是一种以本虚标实为特征的老年常见疾病^[7],其本虚主要在于肾精不足,髓海亏虚,清阳不升,肾亏是老年痴呆的发病根本。故防治老年痴呆药物以补肾药最为常用,以求肾中精髓得充,脑有所养。其标实在于瘀血^[8]蒙蔽脑窍,闭阻脑络,还有学者认为老人多瘀,或年高气血运行迟。蜂眠宁胶囊是由蜂胎冻干粉、黄芪、缬草、酸枣仁组方而成,现代药理研究表明,它们均有抗老年痴呆

的作用。方中重用蜂胎为君,取其益肾生津、柔肝养血、养心强志之功^[9]。黄芪、缬草为臣药,黄芪具有益气、升阳固表之功,对老年痴呆症状具有改善作用^[10];缬草具有理气的作用,两者合用,既能生血养血,又能推动血液的运行而达到化瘀的作用。佐以酸枣仁,可以有效改善肾虚失养所致的失眠。诸药合用,共奏益肾养血、理气活血之功能。本实验以短时间大剂量的皮质激素造成肾虚模型,并在此基础上侧脑室注射微量的 β 淀粉样蛋白片段复制老年痴呆模型,从动物的行为学表现以及后续的生理生化检测结果表明,急性痴呆模型建模成功。在建模同时进行预防性给予蜂眠宁胶囊,从动物的行为学表现,学习记忆机能测试以及后续的生理生化检测结果来看,蜂眠宁胶囊不仅可以延缓侧脑室微量注射 β 淀粉样蛋白片段引起的老年痴呆,对肾虚症状也有明显改善,该复方具有较好的开发价值,可望成为缓解老年肾虚和痴呆的新药。

参考文献:

- [1] 张均田.老年痴呆的发病机理及治疗策略[J].药学报,2000,35(8):635-640.
- [2] Wimo A, Jönsson L, Gustavsson A, et al. The economic impact of dementia in Europe in 2008-cost estimates from the Eurocode project[J]. Int J Geriatr Psych, 2011, 26: 825-832.
- [3] 陈晓阳, 陈容, 李晟, 等. 肾虚抑郁大鼠模型的建立及评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(5): 28-31.
- [4] 刘婷, 侯连兵. 中医药动物模型制备依据与方法的研究概况[J]. 药学专论, 2011, 20(8): 19-21.
- [5] 杨琳, 阳小强, 黄培林, 等. 海马区注射 A β 25-35 对大鼠学习记忆能力的影响[J]. 东南大学学报(医学版), 2011, 30(6): 832-836.
- [6] 李斌, 郭淑玲, 彭丽艳, 等. 三种拟痴呆动物模型在 Morris 水迷宫行为学测试中学习记忆行为的差异[J]. 医学研究生学报, 2014, 27(7): 683-685.
- [7] 廖勉勉, 孔明望. 从五脏与痰浅析老年痴呆的病因病机[J]. 湖北中医药大学学报, 2017, 19(4): 59-62.
- [8] 吴琼, 邢恩龙, 杨傲然, 等. 浅谈中医对气虚痰凝血瘀型老年痴呆病的认识和治疗[J]. 湖北中医药大学学报, 2016, 18(4): 48-51.
- [9] 沈平锐. 养颜益寿论蜂胎[J]. 中国食品, 1993(3): 4-5.
- [10] 高立威, 单铁英, 董洋, 等. 黄芪提取物对老年痴呆大鼠 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响[J]. 职业与健康, 2017(1): 44-47.

(稿件修回日期:2017-12-24 编辑:林飞)