

阿尔茨海默病动物模型的建立及 智脑胶囊干预作用的研究*

韩明向¹ 杨文明¹ 李泽庚¹ 张国梁¹ 鲍远程¹ 邵正斌¹ 胡 兵² 刘爱平² 丁锦东²

摘要 目的:建立符合阿尔茨海默病(Alzheimer 病,AD)临床及病理特征的实验性 AD 动物模型,观察智脑胶囊对该模型大鼠学习记忆及脑组织病理形态学指标的影响。方法:采用 β -淀粉样蛋白(β -AP)大鼠侧脑室注射及转移生长因子 β_1 (TGF β_1)脑内注射制作实验性 AD 大鼠模型。应用避暗法和水迷路法测定 AD 模型大鼠学习记忆功能,并采用免疫组化及图像分析定量法检测实验性 AD 模型大鼠大脑皮层和海马结构 CA1 区 β -AP 沉积斑数目及截面积。结果:经改进由 β -AP 联用 TGF β_1 诱导的实验性 AD 模型大鼠既表现有行为学改变(学习记忆障碍),又具典型的 AD 病理学特征(β -AP 沉积斑)。智脑胶囊能有效地改善实验性 AD 模型大鼠学习记忆功能,减少模型大鼠大脑皮层和海马结构 CA1 区 β -AP 沉积斑数目及截面积。结论: β -AP 联用 TGF β_1 诱导的实验性 AD 模型大鼠是一接近临床的较好模型,可用于抗痴呆药物的筛选和药效评价。智脑胶囊能明显提高该模型大鼠学习记忆能力,减少模型大鼠大脑皮层、海马结构 CA1 区 β -AP 沉积斑数目及截面积,这是其发挥抗痴呆效应的主要机制。

关键词 智脑胶囊 阿尔茨海默病 动物模型 学习记忆 β -AP 沉积斑数目及截面积

Study on Establishment of Alzheimer's Disease Animal Model and Intervening Effect of Zhinao Capsule on It
HAN Ming-xiang, YANG Wen-ming, LI Ze-geng, et al The First Affiliated Hospital of Anhui TCM College, Hefei (230031)

Objective: To establish an experimental animal model of Alzheimer's disease (AD) with clinical and pathological specificity conformed to AD in human, and to observe the effect of Zhinao Capsule (ZNC) on learning, memory and patho-morphological parameters in the model. **Methods:** The experimental AD model of rats was improved and established by combined injection of β -amyloid protein (β -AP) to lateral ventricle and transforming growth factor β_1 (TGF β_1) to brain. The learning and memory function of the model rats were tested by step-through test and water-maze test, and the number and cross area of β -AP deposited macula in cerebral cortex and CA1 region of hippocampus were estimated quantitatively using immunohistochemical method and image pattern analysis. **Results:** The improved AD animal model showed both the specificity of behavior (learning and memory impairments) and the typical pathological specificity (β -AP deposited macula). ZNC could effectively improve the impairment of learning and memory and reduce the number and cross area of β -AP deposited macula in cerebral cortex and hippocampus CA1 region in the AD model rats. **Conclusion:** The AD rat model induced by the combined injection of β -AP and TGF β_1 is a good animal model simulated to the clinical reality, which could be used to screen and evaluate the anti-dementia agents. ZNC could display anti-dementia effect of the AD model rats.

Key words Zhinao Capsule, Alzheimer disease, animal model, learning and memory, number and cross area of β -AP deposited macula

* 安徽省自然科学基金项目(No. 99044591),安徽省优秀青年科技基金资助课题(皖科 01-12)

1. 安徽中医学院第一附属医院(合肥 230031); 2. 中国科学技术大学生命科学学院

通讯作者:杨文明, Tel: 0551-2838522, Fax: 0551-5131977, E-mail: yangwenming@163.com

大量的研究表明,缺乏既能反映阿尔茨海默病(Alzheimer 病,AD)行为学改变,又能出现典型的 AD 神经病理学特征的 AD 动物疾病模型,是阻碍 AD 进一步深入研究的症结所在。本实验在参考国外文献的基础上,改进并成功制作出既有 AD 的行为学改变,又有反映 AD 病理变化的 β -AP 沉积的 AD 大鼠模型,并

观察了中药复方智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠行为学改变(学习、记忆等)、脑组织病理学变化(β -AP 沉积)等指标的干预效应,以探讨智脑胶囊的作用机理。

材料与方法

1 动物 Wistar 雄性大鼠,体重 250~300g,购于安徽省医学研究所医学实验动物中心。适应性喂养 1 周,饲料为市售固体饲料(购于安徽医科大学实验动物中心),饮自来水。除实验时外,可自由摄食和饮水。

2 药物 智脑胶囊(由黄精、党参、川芎、石菖蒲等中药组成,每粒 0.5g,相当于生药 3g,由安徽中医学院第一附属医院制剂室提供),配制成水溶液,实验时稀释至所需浓度,脑复康(上海信谊药厂产品),配制成 100mg/ml 溶液。均 4℃ 保存,灌胃时温服。

3 主要试剂 β -淀粉样肽(1~40)和兔抗 β -淀粉样肽(1~40)单克隆抗体,均为美国 Sigma 公司产品;抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶标准试剂盒(ABC 标准试剂盒)及二抗生物素化抗体羊抗兔,为美国 Vector 公司产品;二氨基联苯胺(DAB)由吉泰公司提供(美国 Vector 公司产品);转移生长因子 β_1 (TGF β_1)为华美公司产品;其他试剂均为市售分析纯或化学纯试剂。

4 主要仪器 恒冷箱切片机,美国 DAMON/IEC DIVISION 制造;高速台式离心机,上海医疗器械厂生产;721 分光光度计,上海第三分析仪器厂出品;Nikon E800 显微图像分析系统,日本 Nikon 公司生产;江湾 I-C 型立体定位仪,上海第二军医大学仪器厂生产。

5 动物分组 Wistar 大鼠,随机分为正常组、假注射组、模型组、模型加脑复康对照组(简称“阳性药组”)和模型加智脑胶囊 I 组($2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和 II 组($4\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)。简称智脑 I 组、智脑 II 组,每组 10 只。

6 动物模型制备 参照 Nabeshima 和 Frautschy 的方法^[1,2]并进行改进,具体方法如下:3%戊巴比妥钠 $40\text{mg}/\text{kg}$ 腹腔注射,麻醉大鼠,将鼠头固定于江湾 I-C 型立体定位仪上保持前后囟在同一水平,剪开头发,暴露前囟,按大鼠脑立体定位图谱进行定位^[3],在前囟点后方 1.2mm,中线旁开 2.0mm,用 PK500 牙科钻钻一小孔,垂直插入一小塑料管(PE-10,美国),深度为 4mm(达侧脑室),将小管固定于大鼠头顶骨,局部撒复方新诺明药粉防止感染,缝合头皮,术后肌肉注射青霉素每只 8 万 U/d。模型组每只侧脑室内给予 β -AP $2\mu\text{g}/\text{d}$,连续 14 天,同时,于首次实验时在大鼠背侧丘

脑前方(-2.1mmAP, +1.4mmML 和 -4.6mmDV),用微量进样器显微注射转移生长因子 β_1 10ng 1 次,注射 5min,留针 3min。假注射组给予等体积的人工脑脊液,手术中注意动物呼吸(以免呼吸道阻塞),体温(用动物体温维持仪保持动物体温)。在 β -AP 末次注射 7 天后进行大鼠被动回避条件反应和空间学习记忆力测试。

7 给药方法 造模成功后(通过行为学测试及病理学观察证实),开始给药。智脑胶囊两组分别给予大鼠智脑胶囊水溶液 $2\text{g}/\text{kg}$ 体重、 $4\text{g}/\text{kg}$ 体重灌胃,正常组、模型组均给予等容积的生理盐水灌胃,而阳性药组灌胃脑复康混悬液 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重,连续 28 天。

8 指标观察及测定

8.1 一般情况 包括大鼠神志、活动、毛发、饮食等。

8.2 学习记忆指标 在侧脑室 β -AP 末次注射 7 天后,分别采用避暗法和水迷路法,观察大鼠学习记忆能力,以大鼠在明室停留时间超过 300s 为判定标准,观察大鼠在有灯的明室内的停留率,每天训练 10 次,连续 5 天,第 6 天测试。水迷路实验,大鼠训练以 90s 为限,若在此时限内动物不能到达平台,则训练停止并记录成绩为 90s,每天 2 次,连续 5 天。以大鼠自放入水中至找到平台时间作潜伏期,灌胃 28 天后,重复上述方法进行复测。

8.3 实验性 AD 模型大鼠大脑皮层、海马结构 CA1 区 β -AP 沉积斑数目和截面积 在 β -AP 末次给药后 12 天(即行为学实验进行后),取 β -AP 侧脑室注射大鼠 6 只,作脑组织形态学观察,了解大脑皮层、海马有无 β -AP 沉积斑。并和正常组(4 只)、假注射组(4 只)对照观察,以了解造模是否已造成大鼠大脑病理形态学改变。取造模成功的大鼠连续灌服中药智脑胶囊 28 天后进行行为学指标复测,并观察智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠大脑皮层、海马 CA1 区 β -AP 沉积的影响。具体方法为先将大鼠称重麻醉,剪开胸腔,暴露心脏,主动脉灌流,先以 0.9%生理盐水 100ml 快冲,继之以 4%多聚甲醛(pH7.4)灌流 30min,至动物尸体展开,肢体变硬为止。取出大脑,置 4%多聚甲醛/0.1MPB 中,后固定 6h,再分别移至 10%、20%、30%蔗糖/0.1MPB 中,每步均以沉淀为准,恒冷箱连续切片,片厚 $20\mu\text{m}$ 3 张取 1 张。开始作免疫组化,在脑片上滴加 0.3% H_2O_2 30min,5%小牛血清白蛋白(BSA)、1%大鼠血清及 1%山羊血清,共同孵育 20min,滴加按 1:100 稀释的兔抗人 β -AP(1~40)单克隆抗体,每次均取 2 张脑片作阴性对照,4℃ 过夜,滴加生物素标记的

二抗(山羊抗兔 IgG1:250)孵育切片 1h,加 ABC 复合物(1:100,10μg/ml 抗生物素蛋白+2.5μg/ml 生物素-过氧化物酶)45min;DAB/H₂O₂/CoCl₂/NH₄ NiSO₄(除 H₂O₂ 按 1:100 配制外,余则按 1:50 配制)室温显色为黑色,边加样边观察,镜下出现黑色,入水终止反应,超出 30min,即染不出。注意上述步骤自切片后做免疫组化开始,每步之后均用 PBS 洗涤,系列酒精脱水,二甲苯透明封片。在光镜下进行脑片观察,按包新民等主编的大鼠脑立体定位图谱^[3],对选取的大脑顶部皮层、海马 CA1 区进行定位(同一区域切片组织块三维定位相同),随机选取相同张数的脑片在光镜下观察形态,并在 Nikon E800 显微图像分析系统下对大脑皮层、海马 CA1 区 β-AP 沉积斑作定量分析,计算每平方毫米 β-AP 沉积斑数目和截面积(μm²)。

8.4 统计学方法 配对资料采用 *t* 检验。

结 果

1 一般情况观察 模型组与其他组比较,大鼠活动减少,体毛少泽,晦暗不顺,神情呆滞,反应欠灵,食欲减退。

2 智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠学习记忆的影响。

2.1 β-AP 侧脑室注射对大鼠空间辨别学习记忆能力的影响 见表 1。假注射组和正常组在水迷路中潜伏期均值上无明显差异,表明注射本身对实验结果无影响。模型组和正常组、假注射组比较,其潜伏期明显延长,以测试第 3、4、5 天最为明显,差异有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$),显示随测试时间延长,β-AP

损害作用明显,表明 β-AP 侧脑室注射可造成大鼠明显空间辨别学习记忆的障碍。

2.2 β-AP 侧脑室注射对大鼠被动回避反应的影响 用避暗法观察所得结果显示,模型组大鼠的明室停留率(35.3%)明显低于正常组(93.5%)和假注射组(86.4%)。模型组与正常组和假注射组比较差异有显著性($P<0.01$),而正常组与假注射组比较无明显差异($P>0.05$),表明模型组已造成大鼠学习记忆能力下降。

2.3 智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠空间辨别学习记忆能力的影响 见表 2。模型组和正常组比较,有显著的空间辨别学习记忆能力障碍。随着测定天数的后延,其表现得更为明显。与模型组比较,阳性药组对大鼠空间学习记忆有一定改善作用,但以第 5 天明显($P<0.05$)。而智脑胶囊两剂量组可明显改善实验性 AD 模型大鼠空间辨别学习记忆障碍,差异有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且作用优于阳性药组,但智脑胶囊两组间无统计学差异。

2.4 智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠被动回避反应的影响 用避暗法观察结果表明,正常组、模型组、阳性药组、智脑 I 组、智脑 II 组的明室停留率分别为 92.6%、28.7%、60.5%、73.3%、86.0%。智脑胶囊两剂量组均能明显提高大鼠明室停留率,与模型组比较,差异有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$),与正常组比较,其跳台停留率虽不及正常组,但无明显统计学差异。阳性药组与模型组比较,差异也有显著性($P<0.05$),但智脑 II 组与阳性药组比较,差异有显著性($P<0.05$)。表明智脑 II 组药效优于阳性药组。

表 1 β-AP 侧脑室注射对大鼠空间辨别学习记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	平均潜伏期(s)				
		1d	2d	3d	4d	5d
正常	10	85.4±4.6	61.4±11.3	40.2±12.1	33.5±10.2	30.1±12.4
假注射	10	84.2±5.8	63.5±12.4	42.1±11.5	31.4±11.8	35.2±11.6
模型	10	85.6±4.4	80.6±9.4	78.4±11.6*	78.1±11.9*	79.2±11.8**

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表 2 智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠空间辨别学习记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	平均潜伏期(s)				
		1d	2d	3d	4d	5d
正常	10	76.2±13.8	61.4±10.5	41.3±11.2	31.6±8.7	32.2±11.2
模型	10	89.3±0.7	88.4±0.6*	86.5±3.5*	84.1±5.9**	83.4±6.6**
阳性药	10	80.3±9.7	78.5±11.5	76.4±13.6	58.2±10.3	52.6±11.4△
智脑 I	10	72.1±8.5△	61.5±11.2△	42.7±12.1△△	36.1±11.6△△▲	30.4±10.7△△▲
智脑 II	10	76.4±13.6△	60.4±15.3△	41.6±11.2△△▲	32.6±10.5△△▲	30.5±11.4△△▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与阳性药组比较,▲ $P<0.05$

3 智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠大脑皮层、海马结构 CA1 区 β -AP 沉积的影响 见表 3。模型组在大脑皮层、海马等处出现有明显的 β -AP 沉积斑等特征性病理变化,而正常组和假注射组大鼠免疫组化染色未见明显 β -AP 阳性斑块。模型组在大脑皮层、海马 CA1 区可见许多散在 II ~ III 型淀粉样蛋白沉着(其分型标准为:I 型为碎片样沉着;II 型为均质的淀粉样蛋白沉着斑;III 型为中心有核,核周围有晕的蛋白沉着斑),偶可见呈梭形和锥形 β -AP 阳性反应神经元。大鼠灌胃药物 28 天后,智脑 I 组和阳性药组大鼠大脑皮层、海马结构 CA1 区 β -AP 沉积斑数目及截面积减少,但差异无显著性。智脑 I 组与模型组比较差异有显著性($P<0.05$),智脑 II 组与模型组及阳性药组比较,差异有显著性($P<0.05$, $P<0.01$)。而阳性药组与模型组比较虽有减少但差异无显著性。

表 3 智脑胶囊对实验性 AD 模型大鼠大脑皮层、海马结构 CA1 区 β -AP 沉积斑数目和截面积变化的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	β -AP 沉积斑数目(个/ mm^2)		β -AP 沉积斑截面积(μm^2)	
		大脑皮层	海马结构 CA1 区	大脑皮层	海马结构 CA1 区
模型	8	32.5 $\pm$ 6.7	21.4 $\pm$ 5.3	1904.3 $\pm$ 86.3	1466.3 $\pm$ 98.4
阳性药	8	26.3 $\pm$ 5.4	20.5 $\pm$ 4.1	1632.5 $\pm$ 86.5	1381.1 $\pm$ 81.5
智脑 I	8	20.1 $\pm$ 6.3*	14.5 $\pm$ 4.6*	1352.6 $\pm$ 80.1*	1120.5 $\pm$ 83.6*
智脑 II	8	17.2 $\pm$ 5.2** $\triangle$	11.3 $\pm$ 5.1** $\triangle$	1240.3 $\pm$ 68.4** $\triangle$	1007.3 $\pm$ 65.4** $\triangle$

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与阳性药组比较, $\triangle P<0.05$

讨 论

研制理想的 AD 动物模型是近年来 AD 研究的热点。由于 AD 病因学多因异质的特点,近年来虽然复制出许多 AD 动物模型,但多数未能很好反映或接近反映 AD 患者的临床全貌而仅模拟了 AD 的行为学改变,对反映 AD 主要病理特征却未能在模型中较好地加以解决。 β -AP 沉积学说是当今公认的造成 AD 的关键病因学说。据此,国外学者采用 β -AP 侧脑室输注造成 AD 动物模型,并认为这一模型是转基因 AD 模型的有益补充^[1,2],但存在着造模方法复杂、稳定性差、成功率不高等诸多不足。由于 β -AP(1~40)是体内淀粉样肽的主要形式之一,其可溶性较 β -AP(1~42)强,是啮齿类动物 SP 的主要成分,同时因动物体内存在着 β -AP 的清除机制,而后者往往是啮齿类动物造模包括转基因动物模型缺少产生 β -AP 沉积的原因之一。故使用 TGF β_1 可抑制 β -AP 的清除^[4]。因而上述试剂在本实验中被选用。此外由于雌激素有抗 AD 作用对造模不利^[5]。故实验所选动物以雄性或老年雌性鼠为

宜。本研究在参考国外文献的基础上,经过改进,成功地制作出既有大鼠行为学变化,又有脑内 β -AP 沉积的神经病理学改变的 AD 大鼠模型。显示该 AD 模型大鼠的上述改变与临床较为接近,且具有良好的稳定性、较高的成功率和较短的制作周期,从机能和形态两方面为 AD 药物机理及筛选研究提供具有较高实用价值的动物模型。

本研究以上述 AD 模型大鼠为研究对象,观察了智脑胶囊对该模型大鼠一次性被动回避反应和空间辨别学习记忆能力的影响。结果显示,智脑胶囊能明显缩短模型大鼠平均潜伏期,提高模型大鼠明室停留率。与 AD 模型组比较,差异有显著性,且药效优于脑复康阳性药组。表明智脑胶囊可改善实验性 AD 模型大鼠学习记忆能力,有助于 AD 的临床治疗。

大量研究表明,AD 是一中枢神经系统 β -AP 沉积症,且淀粉样蛋白沉积数量的多寡与 AD 严重程度呈正相关^[6]。本研究结果显示,实验性 AD 模型大鼠皮层、海马 CA1 区有明显的 β -AP 沉积。治疗后,智脑胶囊两组能显著减少上述区域内 β -AP 沉积斑数目和截面积,表明智脑胶囊可抑制和清除实验性 AD 模型大鼠大脑皮层和海马 CA1 区的 β -AP 沉积,改善与学习记忆等密切相关的皮层、海马 CA1 区神经元功能,达到易化学习记忆的目的。

参 考 文 献

1 Nabeshima T, Nitta A. Memory impairment and neuronal dysfunction induced by β -amyloid protein in rats. *Tohoku J Exp Med* 1994 ;174:241—249.

2 Frautschy SA, Yang F, Calderon L, et al. Rodent models of Alzheimer's disease: rat A beta infusion approaches to amyloid deposits. *Neurobiol Aging* 1996 ;17:311—321.

3 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱.北京:人民卫生出版社,1991:30—34.

4 Logan A, Berry M, Gonzalez A, et al. Effects of transforming growth factor β_1 on scar formation in the injured central nervous system. *Eur J Neurosci* 1994 ;6:355—363.

5 Paganini-Hill, Henderson VW. Estrogen replacement therapy and risk of Alzheimer's disease. *Arch Intern Med* 1996 ;156: 2213.

6 Kowall NA, Beal MF, Busciglio J, et al. An in vivo model for the neurodegenerative effects of β -amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ;88:7247—7251.

(收稿 2001-09-12 修回 2002-07-22)