DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.039
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
448 2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

# 论著

文章编号:1000-5404(2001)04-0448-03

## “脑功复得”改善脑老化的基础研究

何小川,蔡文琴,李泽桂,杨 忠 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究中药合剂“脑功复得”口服液(以下简称脑功复得)对老龄大鼠学习记忆能力及大脑皮质海马突触泡膜素(Synaptophysin, SY)、Tau-蛋白表达等的影响,探讨其延缓脑老化的功效及可能机制。方法 应用爬杆主动回避反应(Active avoidance reaction, AAR)将动物分为学习记忆正常组和障碍组,再随机分别设置对照组(普食)和实验喂药组(5 ml/d,2月)。在此基础上进行AAR和多功能箱被动回避反应(Passive avoidance reaction, PAR)训练、突触体计数、突触泡膜素和Tau蛋白免疫组化染色(Immunocytochemistry, ICC)、凋亡细胞计数。结果 服用脑功复得2月后,AAR习得率明显提高、消退明显延迟、步入潜伏期(Step through latency, STL)明显延长、大脑皮质海马突触体计数明显增高、突触泡膜素ICC染色增强、Tau蛋白ICC染色减弱、凋亡细胞减少。结论 通过动物实验说明从神经行为学和形态学指标看,提示脑功复得能够延缓脑老化。

关键词:老化;脑功复得;学习记忆;突触体;凋亡细胞;Tau蛋白
中图法分类号:R285;R322.8 文献标识码:A

## Experimental study on the effect of *Naogongfude* on the aging of the rat brain

HE Xiao-chuan, CAI Wen-qin, LI Ze-gui, YANG Zhong (Department of Histology and Embryology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** Objective To evaluate the effect of Naogongfude (NGFD, a traditional Chinese medicine orally administrated) on learning and memory and the expressions of synaptophysin (SY) and Tau-protein in cerebral cortex and hippocampus in aged rats and to explore the possible mechanism. Methods Rats were divided into normal and neural disturbance groups according to the outcomes of active avoidance reaction (AAR) test, and then each group was randomly divided into control and NGFD-treated experimental groups. Animals were orally fed with NGFD for 2 months (5 ml/d) in experimental group or routinely fed in control and taken AAR and passive avoidance reaction (PAR) tests. After the rats were sacrificed, the synaptosome count, the expression of SY and Tau-protein, and the neuron apoptosis in cerebrum were examined. Results The rats after 2-month NGFD administration had an increased AAR acquisition, obviously delayed AAR extinction and prolonged step through latency (STL) of PAR. The number of synaptosomes was raised and the immunoreactive intensity of synaptophysin was increased remarkedly, while Tau-protein immunoreactivity and apoptotic cells were decreased in cerebrum. Conclusion NGFD does have the effect of improving brain function and putting off the aging of rat brain according to the results of behavior study and morphological observation.

**Key words:** aging; learning and memory; synaptosome; apoptotic cell; Tau-protein

当今人口老化现象日益突出,中成药对延缓神经系统退行变性、促进脑神经功能恢复在临床与科研中已得到了肯定[1,2]。因此我室根据临床经验采用多种名贵中成药提取而成中药合剂脑功复得口服液。本研究是用脑功复得治疗老龄大鼠,观察其大脑皮质和海马突触泡膜素、Tau-蛋白免疫组化染色及学习记忆能力等指标的变化,以探讨脑功复得对改善脑老化的作用及其可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和药品

突触泡膜素-BioGenex公司 Tunel-Kit-Boehringer Mannheim公司 Tau蛋白-DAKO公司 Anti-Mouse IgG FITC Conjugate-Sigma公司脑功复得口服液(本室提供配方,西南医院药局制备)。

### 1.2 学习记忆行为学训练方法

1.2.1 爬杆主动回避反应(AAR)[3] 采用爬杆主动回避反应箱。以灯光(25 W)为条件刺激,电击为非条件刺激。

爬杆反应的习得:以灯亮5 s后大鼠自动爬杆为主动回避反应(AAR)。每天训练20次。以在两周内正确反应率连续3 d都在80%以上为习得标准。

爬杆反应的消退:只给予灯光信号(5 s),不给电击,观察习得以后不同时间AAR正确率的变化。

1.2.2 多功能箱被动回避反应(PAR)[4] 将多功能条件反应箱平放在桌边,跳板悬空,将大鼠尾对门洞平放在跳板上,它此时的正常反应为惊慌、探究,很快找到并穿过门洞进入反应箱,这段时间记为潜伏期L1;关闭门洞,并用适宜电压电击鼠爪5~10 s,24 h重复测定大鼠潜伏期,记为L2。以L2作为记忆巩固的指标,L2越长,说明记忆保持能力越强。

动物分组:68只Wistar大鼠,雌雄不限,18~24月龄。AAR习得率达到并超过习得标准的动物为学习记忆正常组,反之为障碍组,学习记忆正常组和障碍组大鼠再随机分别设置对照组(普食)和喂药组(5 ml/d,2月)。进行AAR和PAR训练。本试验正常组大鼠为34只,障碍组大鼠为34只。

### 1.3 突触体流式细胞仪(Flowcytometer, FCM)计数、凋亡细胞FCM计数

按文献[5]制备突触体悬液,以突触泡膜素为一抗,FITC为二抗,进行免疫荧光间接染色,FCM计数;按文献[6]应用原位末端标记技术(TDT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)荧光标记凋亡细胞,FCM技术检测凋亡细胞数。

作者简介:何小川(1971—),男,四川省崇州市人,硕士,助理实验师,主要从事中药对脑功能影响方面的研究。电话:(023)68752231
通信作者:蔡文琴,电话:(023)68752230
收稿日期:2001-01-11;修回日期:2001-03-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

### 1.4　突触泡膜素、Tau-蛋白免疫组化及图像分析[7,8]

突触泡膜素是突触小泡膜的主要蛋白, 可作为突触密度的标志; Tau-蛋白是神经元内的一种微管蛋白, 神经退行性变病人其脑组织内 Tau-蛋白和β-淀粉样蛋白沉积形成老年斑。

免疫组化实验参照文献[9]进行。Tiger 图像分析仪分析。

### 1.5　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 双侧 $t$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　学习记忆行为学结果

2.1.1　脑功复得对老年大鼠 AAR 的影响　(1)脑功复得对老年大鼠 AAR 习得率的影响, 服用脑功复得 2 月后, 分别于第 1、3、5、7、9 天观察习得率的变化: 正常组($n$= 10) AAR 习得率明显增高, 障碍组($n$= 10) AAR 习得率达正常大鼠水平, 并于第 9 天平均习得率达 80.42%, 提示其能增强正常组及改善障碍组大鼠学习能力。(2)脑功复得对老年大鼠 AAR 消退率的影响只给予灯光信号, 不给电击, 观察习得以后第 1、2、3 天 AAR 正确率的改变: 正常组 AAR 消退明显延迟, 提示其能延迟正常组的遗忘; 障碍组 AAR 消退达正常大鼠水平, 提示其能改善障碍组的遗忘。

2.1.2　脑功复得对老年大鼠 PAR 的影响　步入潜伏期(Step through latency, STL)是 PAR 训练中最常用的记忆指标, STL 越长说明记忆力越强。服用脑功复得 2 月后: 正常实验组($n$= 5) STL 值(24.7±5.3) s 较正常对照组($n$= 5)STL 值(18.1±7.3) s 明显延长, 提示其能增强正常组记忆能力; 障碍实验组($n$= 5) STL 值(22.4±5.5) s 较对照组($n$= 5)STL 值(18.2±4.7) s 有延长的趋势。

### 2.2　脑功复得对老年大鼠突触体 FCM 计数的影响

服用脑功复得 2 月后: 老年正常实验组大鼠($n$= 5)皮质突触体数目 13.45±3.47 较对照组大鼠($n$= 3)突触体数目 7.64±3.10 明显增高; 老年障碍实验组大鼠($n$= 5)皮质突触体数目 7.37±2.35 较对照组大鼠($n$= 3) 皮质突触体数目 4.60±2.06 有所增加。提示脑功复得能增强正常大鼠和改善老年大鼠学习记忆能力(注: 此组动物来自观察 STL 所用大鼠)。

### 2.3　脑功复得对老年大鼠皮质凋亡细胞 TUNEL-FCM 计数的影响

服用脑功复得 2 月后: 正常实验组($n$= 5) 凋亡细胞数 11.75±7.42 较对照组($n$= 3) 凋亡细胞数 19.75±4.46 明显降低, 提示其能延缓脑老化; 障碍实验组($n$= 5) 凋亡细胞数 18.07±9.15 较对照组($n$= 3)凋亡细胞数 30.54±9.02 减少, 达到正常组大鼠水平, 提示其能改善障碍组脑老化。

### 2.4　脑功复得对老年大鼠皮质海马突触泡膜素及 Tau 蛋白免疫组化的影响

服用脑功复得 2 月后: 正常组突触泡膜素免疫反应增强, Tau 蛋白免疫反应减弱, 提示其能延缓脑老化, 见表 1、2, 图 1、2。

表 1　老年大鼠皮质、海马突触泡素免疫反应光密度($\bar{x}\pm s$)

**Tab 1　Optical density of synaptophysin ICC staining in the cortex and hippocampus of the aged rats($\bar{x}\pm s$)**

| Group | $n$ | Cortex | CA3 | CA1 |
|---|---|---|---|---|
| Normal control | 3 | 0.95±0.24 | 0.81±0.42 | 0.72±0.47 |
| Normal experimental | 3 | 1.28±0.47 ## | 0.95±0.44 # | 0.90±0.37 # |
| Distubance control | 3 | 0.82±0.30 | 0.60±0.32 | 0.56±0.28 |
| Distubance experimental | 3 | 0.90±0.24 | 0.75±0.38 # | 0.69±0.33 # |

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* control

表 2　老年大鼠皮质、海马 Tau 蛋白免疫组化染色光密度($\bar{x}\pm s$)

**Tab 2　Optical density of Tau-protein ICC staining in the cortex and hippocampus of the aged rats($\bar{x}\pm s$)**

| Group | $n$ | Cortex | CA3 | CA1 |
|---|---|---|---|---|
| Normal control | 3 | 2.95±0.34 | 2.81±0.43 | 2.72±0.37 |
| Normal experimental | 3 | 1.96±0.27 ## | 2.45±0.44 # | 1.90±0.35 ## |
| Distubance control | 3 | 3.82±0.31 | 3.60±0.32 | 3.56±0.24 |
| Distubance expeimental | 3 | 3.40±0.34 | 2.75±0.38 ## | 3.39±0.34 |

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* control

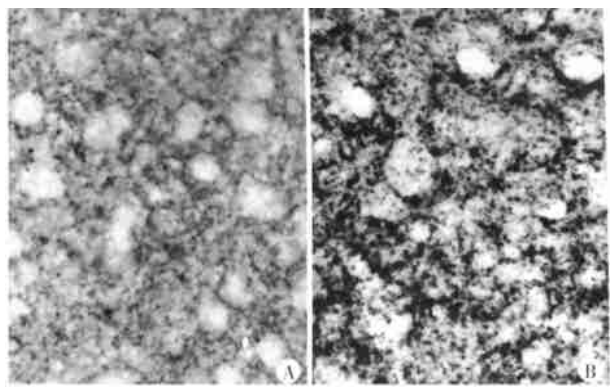


图 1　突触泡膜素大鼠大脑皮质免疫组化染色　(ABC× 200)

**Fig 1　Photo-micrograph of punctuated grain structure in synaptophysin immunohistochemical staining of rats' cortex**　(ABC× 200)

A: Disturbance rats feeding with NGFD; B: Obstacle control rats

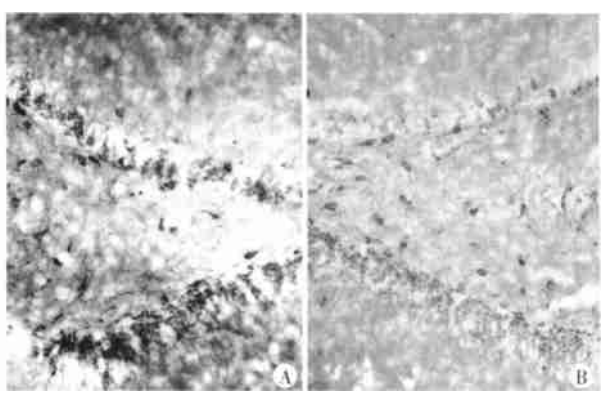


图 2　Tau 蛋白在大鼠海马免疫组化染色　(ABC× 100)

**Fig 2　Photo-micrograph of Tau-protein immunohistochemical stain in rats' hippocampus**　(ABC× 100)

A: Disturbance control group; B: Disturbance experimental; Fed with NGFD, the immunoreactive intensity in hippocapus turned down

## 3　讨论

如今脑老化所导致的劳动力损失、疾病等给家庭和社会造成了极大的负担, 因此关于延缓脑老化及其机制的研究具有重要意义。脑老化导致脑功能下降, 表现为学习记忆能力下降、神经元减少、凋亡细胞增多、脑神经元 Tau 蛋白合成增多、神经递质改变以及突触形态和功能损伤等。目前有很多关于老化机制的学说, 如膜假说、基因决定假说、损伤积累假说等。同时

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

人们已在努力开发延缓衰老的药品，在这方面祖国医学亦甚为活跃。本实验所用脑功复得在临床已获显效，为探讨其可能机制，我们对服用脑功复得老年大鼠和对照组老年大鼠进行了神经行为学及形态学等方面的研究，结果表明：①脑功复得能促进正常老年大鼠学习记忆能力提高，表现为 AAR 习得率明显增高、消退明显减缓；STL 明显延长；海马皮质突触体 FCM 计数增多，突触泡膜素免疫组化染色增强。②脑功复得能改善障碍老年大鼠的学习记忆能力，表现为各项指标接近正常大鼠水平。③脑功复得能延缓脑老化，表现为皮质海马凋亡细胞 TUNEL-FCM 计数下降、Tau 蛋白免疫组化染色减弱。其可能机制是：脑老化的神经行为表现是以神经元形态与功能改变为基础，其老化神经元有的为不可逆，有的处于不可逆与可逆的中间状态，如供给足够的神经元活化物质，供氧充足，则此类神经元可程度不一恢复其形态与功能完整。脑功复得乃中药合剂，由天麻等名贵中药材精炼而成（处方暂不发表），具有神经元必需的多种氨基酸、类皮质激素、皂甙和生物碱等成分，其药效成分含天麻素、五味酚、多种三萜类皂甙、多种氨基酸、果糖及微量元素等。方中主药具有健脑补肾作用、活血化瘀通络、健脾滋补作用。故其能改善血液循环，增加氧供，减少神经元有害物质，避免活性处于中间状态的神经元向不可复方向发展，争取恢复神经元的形态与功能的完整，促进处于抑制状态的神经元及早复苏，对已不可逆的区域有可能促进其它神经元代偿。本实验结果也表明脑功复得具有促进突触泡膜素合成增加及改善神经递质释放的功能。因此脑功复得可能具有延缓脑老化功能。

脑功复得是中药合剂，成分复杂，并且脑老化是一个复杂的生理过程，人的大脑功能与作用机制非常复杂。因此其改善脑功能的机制还不能完全确定，可能在于其神经药理活性的多样性，通过不同的途径，发挥其促进神经功能恢复的作用。本动物实验提示脑功复得口服液具有改善学习记忆能力和延缓脑老化的作用，但关于其作用机制还有待进一步研究。

## 参考文献：


[1] Barnes C A. Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat[J]. TNS, 1998, 11(6): 163－169.

[2] 阎孝诚 主编. 实用中医脑病学[M]. 北京：学苑出版社, 1993. 18－25.

[3] Bucherelli C. Differential effect of functional ablation of thalamic reticular nucleus on the acquisition of passive and the active avoidance[J]. Int J Neurosci, 1993, 73(1-2): 77－84.

[4] 隋建峰，熊 鹰，张长城 等. 一种用于大鼠被动回避行为训练的多功能条件反射箱[J]. 第三军医大学学报, 1994, 16(5): 363－365.

[5] 陈康宁，董为伟. 大鼠脑缺血/再灌流中钙与神经元凋亡关系的研究[J]. 中国老年学杂志, 2000, 20(5): 293－295.

[6] 赵士福. 细胞凋亡与神经系统疾病[J]. 国外医学：神经病学、神经外科学分册, 1996, 23(3): 124－127.

[7] 龙大宏，姚志彬，何蕴韶 等. 神经生长因子对痴呆模型鼠海马突触素影响[J]. 解剖学杂志, 1997, 20(2): 114－117.

[8] Schultz C, Dehghani F, Hubbard G B, *et al*. Filamentous tau pathology in nerve cells, astrocytes, and oligodendrocytes of aged baboons[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2000, 59(1): 39－52.

[9] 蔡文琴，王伯弥 主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社, 1994. 74－82.


（编辑 陈聪连）

（上接 445 页）

流（TAPVC）、大动脉转位（TGA）和右室双出口（DORV），见表 1。

表 1 各类紫绀型先心病超声诊断符合率

| 病种 | *n* | 完全符合 | 基本符合 | 不符合 |
|---|---|---|---|---|
| F4 | 116 | 113 | 0 | 3 |
| F3 | 27 | 25 | 1 | 1 |
| Ebstein 畸形 | 18 | 17 | 0 | 1 |
| TAPVC | 13 | 11 | 0 | 2 |
| TGA | 8 | 8 | 0 | 0 |
| DORV | 15 | 9 | 0 | 6 |

## 3 讨论

F4 占先心病的 11.9%，并在紫绀型先心病中居于首位，占 60%～70%，F3 的发病率较低。两者虽都合并多种畸形，但心脏各腔室及大血管的起源正常，超声诊断一般并不困难。诊断难点是由于肺气影响，对右室流出道、肺动脉狭窄的形态学评价可能不全面。本组诊断敏感性为 97.1%。

Ebstein 畸形与 TAPVC 发病率很低，前者占先心病的 1%[1]。虽然发病率低但诊断并不困难，本组 18 例患者只有 1 例轻型下移患者漏诊。TAPVC 占先心病的 1.5%～3%[1]，特别应注意心上型 TAPVC，本组有 2 例误诊，其一与工作早期经验不足有关，另一原因是由于胸前探查时肺静脉处于远场，受声束发散影响，管壁、管腔均感模糊，用多普勒观察血流受取样夹角过大及远场信/噪比差的限制而不够准确，操作者应结合杂音出现部位多切面仔细探查。

TGA 与 DORV 少见而复杂。TGA 占先心病的 0.6%～1.4%[1,2]，这种畸形心腔及大血管空间关系较复杂，重点在于辨清心房、心室的位置及主、肺动脉的起源及位置关系。DORV 是一种不完全型大动脉转位，该畸形在左室长轴观与 TOF 很相似，若采用心尖五腔观可明确主动脉的起源，从而减少误诊。

关键词：超声心动描记术；紫绀型先天性心脏病
中图法分类号：R541.104 文献标识码：B

## 参考文献：


[1] 顾恺时 主编. 胸心外科手术学[M]. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社, 1993. 632－730.

[2] 林其姗，章国忠，陈伟达. 彩色多普勒超声心动图诊断纠正型大动脉换位[J]. 中国超声医学杂志, 1994, 10(6): 9－11.


（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net