

舒肝解郁胶囊对老年痴呆小鼠学习记忆能力的改善作用

吴建明^{1,2,3}, 马娜¹, 张鸿程¹, 柯潇¹, 郝晓锋¹, 张志荣², 高小平^{1*}

(1. 成都康弘药业集团博士后工作站, 成都 610036; 2. 四川大学华西药学院
博士后流动站, 成都 610041; 3. 泸州医学院药学院, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的:**观察舒肝解郁胶囊(Shugan Jieyu capsule, SGJY)对老年痴呆(Alzheimer's disease, AD)模型小鼠学习记忆能力的影响。**方法:**72只KM小鼠随机分为6组,即正常组、模型组、石杉碱甲组(0.07 mg·kg⁻¹)及SGJY高、中、低剂量组(480, 240, 120 mg·kg⁻¹)。各组每天均灌胃给药一次,给药体积为20 mL·kg⁻¹,连续14 d。末次给药1 h后除正常组外均ip 3 mg·kg⁻¹氢溴酸东莨菪碱,20 min后进行水迷宫测试,收集血清及全脑并测定其血清及脑组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)及总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)水平。另取10只人鼠淀粉样前蛋白(APP^{swe})阴性转基因小鼠为正常组,50只APP^{swe}阳性转基因小鼠随机分为5组,分组及剂量同前,连续灌胃给药30 d,末次给药1 h后进行跳台潜伏期与水迷宫测试(逃避潜伏期及游泳路径)。**结果:**与正常组比较,两种模型组小鼠逃避潜伏期及游泳路径均显著高于正常组($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,SGJY高、中、低剂量组均可不同程度地降低跳台实验逃离电击潜伏期及Morris水迷宫实验到达安全平台的潜伏期及总路程,尤其以高、中剂量组最为显著($P < 0.01$),且呈明显量效关系。同时3个剂量组均能显著改善脑组织中的MDA及T-AOC水平($P < 0.01$)。**结论:**舒肝解郁胶囊可显著改善老年痴呆小鼠学习记忆能力。

[关键词] 舒肝解郁胶囊; 老年痴呆; 东莨菪碱; APP^{swe}转基因小鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0126-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010126

Study of Shugan Jieyu Capsule Improving Learning and Memory Ability on AD Model Mice

WU Jian-ming^{1,2,3}, MA Na¹, ZHANG Hong-cheng¹, KE Xiao¹, HAO Xiao-feng¹, ZHANG Zhi-rong², GAO Xiao-ping^{1*} (1. Post-Doctoral Research Station, Kang Hong Pharmaceutical Group, Chengdu 610036, China; 2. Post-Doctoral Mobile Station, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. School of Pharmacy, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of Shugan Jieyu capsule (SGJY) on learning and memory ability in model mice with Alzheimer's disease (AD). **Method:** Seventy-two Kunming (KM) mice were randomly divided into six groups such as normal group, model group, huperzine A (Hup A) group (0.07 mg·kg⁻¹) and SGJY groups (480, 240, 120 mg·kg⁻¹). The mice were gavaged once a day for 14 days, then induced by scopolamine hydrobromide (ip, 3 mg·kg⁻¹) except normal group. The effect of SGJY was studied via Morris water maze test and the levels of malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (T-AOC) in plasma and brain tissue were detected. Randomly selected 10 non-APP^{swe} transgenic mice were as normal group, other 50 APP^{swe} transgenic mice with high expression of presenilin (PS) and amyloid precursor protein (APP) were divided into five groups as above, the mice were gavaged once a day for 30 days, then the effect of SGJY on learning and memory ability was evaluated by step-down test and water maze test. **Result:** Compared with normal groups, the levels of latencies and total distances before escaping onto the security platform increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model groups, SGJY groups in various dosage (480, 240, 120 mg·kg⁻¹) could shorten the latency period to escape from electric shock. In Morris water maze test, three groups of SGJY could shorten latencies and total distances before escaping onto the security platform at different levels. The effect

[收稿日期] 20140517(003)

[基金项目] 四川省科技成果转化专项(2012SC0029);四川省重大产业技术创新专项(2012CD00082)

[第一作者] 吴建明, 博士后, 副研究员, 从事药物筛选及药理毒理研究工作, Tel:028-87510241, E-mail:wjmbj@126.com

[通讯作者] *高小平, 博士, 研究员, 从事新药筛选及分子药理学研究, Tel:028-87519304, E-mail:gxplw2003@aliyun.com

was the most obvious in the group of high and middle dose SGJY ($P < 0.01$), which showed dose-effect relationship. Meanwhile, we also found that the SGJY of three different doses could significantly decrease the levels of MDA and increase that of T-AOC in brain tissue ($P < 0.01$). **Conclusion:** SGJY has marked effect of improving the learning and memory abilities of AD model mice.

[**Key words**] Shugan Jieyu capsule; Alzheimer's disease; Scopolamine hydrobromide; APPswe transgenic mice

舒肝解郁胶囊 (Shugan Jieyu capsule, SGJY) 为国家食品药品监督管理总局批准首个用于轻、中度单相抑郁症的中药制剂,由刺五加、贯叶连翘组成。据文献报道,刺五加皂苷可通过提高神经元细胞存活率、降低一氧化氮和乳酸脱氢酶释放水平而保护海马 CA1 神经元^[1-3],从而改善痴呆模型鼠的学习记忆等认知功能^[4]。同时贯叶连翘及其主要成分贯叶金丝桃苷亦可通过抑制脑组织乳酸脱氢酶释放而改善学习记忆^[5]。据此处方组成及药味特点,笔者推测舒肝解郁胶囊亦应改善老年痴呆致学习记忆障碍;为此,本文拟以东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍模型及高表达人类早老素和淀粉样前蛋白转基因小鼠模型,通过跳台实验及 Morris 水迷宫实验评价其药效。

1 材料

1.1 动物及分组 KM 小鼠,SPF 级,雌雄各半,四川省医学科学院实验动物研究所提供,合格证号 SCXK(川)2008-24。B6C3-Tg(APPswe, PSEN1dE9)85Dbo/MmJNju 转基因小鼠及同窝人类早老素(DeltaE9)与人鼠淀粉样前蛋白(APPswe)阴性小鼠,SPF 级,雌雄兼用,南京大学模式动物研究所提供,合格证号 SCXK(苏)2010-0001。

1.2 试剂 舒肝解郁胶囊由刺五加、贯叶连翘 2 味中药组成(成都康弘药业集团股份有限公司,批号 120309),石杉碱甲胶囊(重庆药友制药有限公司,批号 1102010);氢溴酸东莨菪碱注射液(徐州莱恩药业有限公司,批号 1101103);丙二醛(MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20110408);总抗氧化能力(T-AOC)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20110408)。

1.3 仪器 Spectra Max M5 多功能酶标仪(Molecular Devices 公司),DT-200 型小鼠跳台仪,BA-200 型小鼠避暗仪,Morris 水迷宫(均为成都泰盟科技有限公司),Allegra 64R 型高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 对东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的改善作用 取健康 KM 小鼠随机分为 6 组,即正常组、模型

组、石杉碱甲组($0.07 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、SGJY 高、中、低剂量组($480, 240, 120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组 12 只。各组均采用 *ig* 给药,给药体积为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天 1 次,连续 14 d。待各组给药 9 d 后开始进行 Morris 水迷宫训练,每天 2 次。末次给药 1 h 后除正常组 *ip* 生理盐水外,其余各组均 *ip* $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的氢溴酸东莨菪碱,20 min 后进行水迷宫测试,方法为保持站台位置不变由自动摄像系统记录小鼠寻找到站台的时间(潜伏期)和游泳路径(总路程),设置 300 s 为最大潜伏期,300 s 后将自动停止记录。测试完毕处死动物,收集血清及全脑(去小脑),称重,用预冷的生理盐水制备 10% 的脑匀浆, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液,据试剂盒说明书分别测定血清及组织匀浆液中 MDA 及 T-AOC 含量。

2.2 对 APPswe 转基因老年痴呆小鼠学习记忆障碍的改善作用 取 5 月龄 APPswe 转基因小鼠(高表达人类早老素和淀粉样前蛋白致老年痴呆小鼠),雌雄兼用,随机分为 5 组,即模型组、石杉碱甲组($0.07 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、SGJY 高剂量组($480 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中剂量组($240 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)及低剂量组($120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),另取同背景同月龄的 APPswe-w 阴性小鼠为正常组,每组 10 只。各组均采用灌胃给予相应药物,正常组和模型组给予等体积的蒸馏水,给药体积为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每日 1 次,连续 30 d,各组小鼠于给药 29 d 用跳台仪进行训练(小鼠在通电的平板上能找到并跳上安全平台),第 30 天给药 1 h 后测定小鼠找到并跳上安全平台所需时间(潜伏期)。于给药第 25 ~ 29 天进行水迷宫训练,每天 2 次。第 30 天完成跳台潜伏期测定后,采用 Morris 水迷宫进行行为学检测,方法同上,记录其寻找到站台的时间(逃避潜伏期)和游泳路径(总路程),并进行组间比较。

2.3 统计学分析 应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 One-Way ANOVA 分析,组间两样本比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的改善作

用表 1 结果显示,模型组小鼠寻找到站台的潜伏期及总路程均显著高于正常组 ($P < 0.05$),表明氢溴酸东莨菪碱已成功诱导了小鼠的记忆障碍;而各给药组较模型组均能显著缩短潜伏期及总路程 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且具明显量效关系。表明舒肝解郁胶囊已对东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍起到良好的改善作用。

表 2 结果显示,东莨菪碱对动物血清或脑组织中 MDA 及 T-AOC 水平无明显影响,但 SGJY 药物组可显著降低血清中 MDA 水平,尤其以高剂量组及低剂量组最为明显 ($P < 0.05$)。而脑组织中抗氧化指标测定显示,各 SGJY 药物组可极显著降低小鼠的 MDA 水平,提升 T-AOC 水平 ($P < 0.01$)。表明 SGJY 胶囊自身具有较强的抗氧化能力,对改善老年痴呆神经元损伤具有积极意义。

表 2 舒肝解郁胶囊对东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠氧化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effects of SGJY on oxidative indexes of AD model mice induced by scopolamine hydrobromide ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | 血清 | | 脑组织 | |
|------|----------------------------|--|--------------------------------------|--|--------------------------------------|
| | | MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | T-AOC/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ | MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ | T-AOC/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ |
| 正常 | - | 9.0 ± 1.3 | 3.8 ± 1.2 | 18.3 ± 4.0 | 5.1 ± 1.2 |
| 模型 | - | 10.2 ± 2.6 | 2.8 ± 0.5 | 14.9 ± 3.1 ¹⁾ | 5.8 ± 0.9 |
| 石杉碱甲 | 0.07 | 8.6 ± 1.6 | 3.6 ± 1.1 | 12.9 ± 4.4 | 7.6 ± 0.9 ⁴⁾ |
| SGJY | 480 | 7.7 ± 1.4 ³⁾ | 3.4 ± 1.0 | 10.5 ± 1.7 ⁴⁾ | 8.3 ± 0.8 ⁴⁾ |
| | 240 | 7.9 ± 1.5 | 2.8 ± 0.6 | 11.3 ± 1.2 ⁴⁾ | 8.0 ± 0.8 ⁴⁾ |
| | 120 | 7.7 ± 1.5 ³⁾ | 3.3 ± 0.6 | 11.0 ± 0.9 ⁴⁾ | 8.3 ± 0.8 ⁴⁾ |

3.2 对 APP^{swe} 转基因老年痴呆小鼠学习记忆障碍的改善作用 表 3 结果显示,模型组与正常组比较,其逃离电击潜伏期极显著升高 ($P < 0.01$),表明 APP^{swe} 转基因小鼠已具备老年痴呆学习记忆下降特征。各给药组均可不同程度地降低逃离电击潜伏期,且呈明显量效关系;降低潜伏期作用尤其以高剂量组 ($P < 0.01$) 及中剂量组 ($P < 0.05$) 最为明显。

表 4 结果显示,模型组与正常组相比,其水迷宫潜伏期及总路程极显著升高 ($P < 0.01$),表明 APP^{swe} 转基因小鼠已具备老年痴呆学习记忆下降特征。各给药组均可不同程度地降低到达安全平台的潜伏期及总路程,且呈明显量效关系;尤其以高剂量组及中剂量组最为明显 ($P < 0.01$),低剂量组对缩短到达安全平台的总路程也有明显改善 ($P < 0.05$)。表明舒肝解郁胶囊已对 APP^{swe} 小鼠学习记忆障碍起到良好的改善作用。

表 1 舒肝解郁胶囊对东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠潜伏期及总路程的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effects of SGJY on latencies and total distances of AD model mice induced by scopolamine hydrobromide ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | 潜伏期 /s | 总路程 /cm |
|------|----------------------------|------------------------|-----------------------------|
| 正常 | - | 108 ± 75 | 2 167 ± 1 670 |
| 模型 | - | 177 ± 99 ¹⁾ | 4 027 ± 2 096 ¹⁾ |
| 石杉碱甲 | 0.07 | 86 ± 69 ³⁾ | 1 955 ± 1 596 ³⁾ |
| SGJY | 480 | 54 ± 38 ⁴⁾ | 1 289 ± 916 ⁴⁾ |
| | 240 | 67 ± 51 ⁴⁾ | 1 583 ± 1 204 ⁴⁾ |
| | 120 | 78 ± 57 ⁴⁾ | 1 849 ± 1 312 ⁴⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

表 3 舒肝解郁胶囊对 APP^{swe} 小鼠跳台潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of SGJY on latencies of APP^{swe} transgenic mice in step-down test ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量/mg·kg ⁻¹ | 潜伏期/s |
|------|------------------------|---------|
| 正常 | - | 4 ± 2 |
| 模型 | - | 20 ± 10 |
| 石杉碱甲 | 0.07 | 7 ± 6 |
| SGJY | 480 | 8 ± 5 |
| | 240 | 11 ± 6 |
| | 120 | 13 ± 6 |

4 讨论

老年痴呆是一种以高级认知功能障碍为特征的神经退行性病变,主要病理基础为广泛的神经元丢失、脑内神经纤维缠结(NFT)和老年斑(SP)的出现。其发病机制主要包括两大方面,一为胆碱能系统的抑制导致蛋白质错误折叠、沉淀而形成 NFT 和

表 4 舒肝解郁胶囊对 APPswe 小鼠水迷宫潜伏期及总路程的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of SGJY on latencies and total distances of APPswe transgenic mice in Morris water maze test($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | 潜伏时间 /s | 总路程 /cm |
|------|----------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 正常 | - | 40 ± 13 | 435.4 ± 210.8 |
| 模型 | - | 76 ± 27 ²⁾ | 960.6 ± 228.6 ²⁾ |
| 石杉碱甲 | 0.07 | 46 ± 17 ⁴⁾ | 507.5 ± 170.0 ⁴⁾ |
| SGJY | 480 | 49 ± 18 ⁴⁾ | 603.7 ± 193.0 ⁴⁾ |
| | 240 | 54 ± 18 ⁴⁾ | 668.7 ± 189.0 ⁴⁾ |
| | 120 | 63 ± 20 | 751.5 ± 201.8 ³⁾ |

SP;二为以淀粉样蛋白(Aβ)为核心聚集和沉积而形成 SP 并产生毒性,同时 Aβ 亦可诱导 Tau 蛋白的磷酸化而形成 NFT^[6-9]。为此,本研究采用东莨菪碱阻断中枢 M 胆碱受体,抑制小鼠学习和记忆而模拟痴呆症状认知功能下降^[10-12]。另采用表达突变人类早老素和人鼠淀粉样前蛋白融合体的双转基因小鼠 [B6C3-Tg(APPswe, PSEN1dE9)85Dbo/MmJNju] 模拟 Aβ 及 PS-1 参与的老年痴呆 SP 和 NFT 的形成^[13]。上述两种模型分别代表了胆碱能系统抑制及淀粉样蛋白诱导的两种发病机制,进而评价舒肝解郁胶囊对老年痴呆小鼠学习记忆的改善作用。

研究表明,舒肝解郁胶囊可降低东莨菪碱诱导 AD 小鼠跳台实验中逃离电击潜伏期与 Morris 水迷宫实验中到达安全平台的潜伏期及总路程。同时亦可降低上述转基因小鼠逃离电击潜伏期与到达安全平台的潜伏期及总路程。提示舒肝解郁胶囊改善老年痴呆记忆障碍的机制与改善胆碱能系统抑制及淀粉样蛋白聚集或磷酸化途径有关。此外,在抗氧化指标测定中,东莨菪碱对动物血清或脑组织中 MDA 及 T-AOC 水平无明显影响,这与文献报道东莨菪碱对总抗氧化能力的改变特点具有相似性^[14]。但 SGJY 药物组可显著提升 T-AOC 水平($P < 0.01$)。表明 SGJY 胶囊自身具有较强的抗氧化能力,对改善老年痴呆神经元损伤具有积极意义。

综上,在 AD 的发病机制中胆碱能神经抑制及 Aβ 毒性在其发病中占有重要作用,为此本研究从上述两种途径分别评价并确证了舒肝解郁胶囊改善 AD 小鼠学习记忆能力的药理作用,且该作用与改善胆碱能抑制及 Aβ 毒性有关,同时与药物自身抗氧化作用亦有相关性。然而由于舒肝解郁胶囊的成分复杂性,其确切的干预学习记忆能力的物质基础尚不清楚,且其调节老年痴呆的分子机制也有待进一步阐明。

[参考文献]

[1] Kim D, Kim J Y, Han Y S. Alzheimer's disease drug discovery from herbs: neuroprotectivity from β-amyloid (1-42) insult [J]. J Altern Complem Med, 2007, 13 (3):333-340.

[2] Aguiar S, Borowski T. Neuropharmacological review of the nootropic herb Bacopa monnieri [J]. Rejuv Res, 2013, 16(4):313-326.

[3] 陈应柱, 顾永健, 包仕尧. 刺五加皂甙对皮质神经元缺血缺氧性损伤的保护作用 [J]. 临床神经病学杂志, 2006, 19(2):127-129.

[4] 葛许华, 顾永健, 姜正林. 刺五加皂苷对大鼠血管性痴呆防治作用的研究 [J]. 卒中与神经疾病, 2004, 11(6):353-356.

[5] 陈志武, 马传庚, 赵维忠. 金丝桃甙对脑缺血再灌损伤保护作用的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 1998, 33(1):14-17.

[6] Cruz L, Urbanc B, Buldyrev S V, et al. Aggregation and disaggregation of senile plaques in Alzheimer disease [J]. PNAS, 1997, 94(14):7612-7616.

[7] Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology [J]. PNAS, 1997, 94(24):13287-13292.

[8] 蒋圣娟, 孙振令, 张红雨. 阿尔茨海默氏症分子病理学及治疗方法的研究进展 [J]. 山东理工大学学报:自然科学版, 2003, 17(1):94.

[9] 段灿灿, 许建阳, 陈牛艳, 等. 益智饮对阿尔茨海默病大鼠学习记忆能力的影响及抗氧化作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5):135-138.

[10] 闫娟娟, 刘明, 胡园, 等. 定志小丸对东莨菪碱所致小鼠学习记忆障碍的影响及机制 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21):3293-3296.

[11] Ahmed T, Gilani A H. Inhibitory effect of curcuminoids on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia may explain medicinal use of turmeric in Alzheimer's disease [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2009, 91(4):554-559.

[12] 赵唯贤, 李高申, 范新六, 等. 柴胡疏肝散对阿尔茨海默病大鼠记忆功能的相关研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):207-210.

[13] Wasco W, Tanzi R E. Etiological clues from gene defects causing early onset familial Alzheimer's disease [M]. Molecular mechanisms of dementia, 1997:1-19.

[14] 楚晋, 叶翠飞, 李林. 二苯乙烯苷对痴呆小鼠学习记忆及自由基代谢的影响 [J]. 中国康复理论与实践, 2003, 9(11):643-645.

[责任编辑 聂淑琴]