

二仙益坤汤对围绝经期模型小鼠学习记忆能力的影响

山书玲, 郭晓娟, 范迎, 张慧珍, 焦河玲*

(南阳理工学院 张仲景国医学院, 河南 南阳 473004)

[摘要] **目的:**观察二仙益坤汤对围绝经期模型小鼠学习记忆能力的影响并探讨其作用机制。**方法:**雌性小鼠摘除卵巢模拟围绝经期,随机分为模型组,乙烯雌酚组(DES, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),二仙益坤汤高、中、低剂量组(30, 15, $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),另有假手术组作为对照,各组按相应剂量连续ig给药5周后,采用跳台法和Morris水迷宫实验观察其对围绝经期模型小鼠学习记忆能力的影响,并生化检测血清超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),脑组织一氧化氮(NO),乙酰胆碱(ACh),脑组织过氧化脂质(LPO),SOD活性和一氧化氮合酶(NOS),胆碱酯酶(AChE)活性,荧光定量PCR法检测海马中Bcl-2相关x蛋白(Bax)及B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)mRNA的表达。**结果:**与模型组相比较,给药各组能明显减少跳台实验训练错误次数及测试错误次数,延长潜伏期,Morris水迷宫实验中,二仙益坤汤高、中剂量组小鼠定向航行潜伏期缩短、空间搜索穿越站台次数增加;与模型组相比,给药各组均能提高小鼠血清SOD活性,降低MDA含量;提高脑组织SOD活性及ACh含量,降低LPO和NO水平,并降低AChE和NOS的活性;使模型大鼠海马Bcl-2表达上调,并降低Bax表达,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**二仙益坤汤对围绝经期模型小鼠具有改善学习记忆能力的作用,其作用机制可能与清除自由基、抗氧化和调节神经递质水平并影响凋亡因子Bax及Bcl-2 mRNA的表达等有关。

[关键词] 二仙益坤汤; 围绝经期; 学习记忆

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0134-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015180134

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150807.1000.016.html>

[网络出版时间] 2015-08-07 10:00

Effect of Erxian Yikun Decoction on Learning and Memory Ability of Perimenopausal Model Mice

SHAN Shu-ling, GUO Xiao-juan, FAN Ying, ZHANG Hui-zhen, JIAO He-ling* (Zhang Zhongjing Traditional Chinese Medicine College, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Erxian Yikun decoction on the ability of learning and memory of perimenopausal female mice. **Method:** The female mice was ovariectomized to simulate perimenopausal status and then randomly divided into model group, diethylstilbestrol group (DES, $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and Erxian Yikun decoction high, middle land low dose groups (30, 15, $7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). The sham operation group was also established as the control group. The mice were given corresponding drugs for 5 weeks. The effect on the ability of learning and memory in the different groups was investigated by using step down test and Morris water-maze test. The superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) level in serum, lipid peroxidase (LPO), nitric oxide (NO) and acetyl choline (ACh) level in brain tissue, as well as the activity of SOD, nitric oxide synthase (NOS) and acetyl choline esterase (AChE) were also detected. Fluorescence quantitative PCR was used to detect Bcl-2 Associated x protein (Bax) and B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) mRNA expressions in the hippocampus. **Result:** Compared with model group, the ability of learning and memory was significantly improved, the SOD activity in serum was increased, and the SOD activity and MDA level was decreased in the different treatment groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Meanwhile, the ACh level in brain tissue was increased, the AChE activity and LPO level and NO level were also decreased in the treatment groups, and Erxian Yikun decoction activated the Bcl-2 and lowered

[收稿日期] 20150520(013)

[基金项目] 河南省科技攻关计划项目(132102310341)

[第一作者] 山书玲,主任医师,从事围绝经期妇女保健工作,Tel:13937700058,E-mail:1521405431@qq.com

[通讯作者] *焦河玲,主任医师,从事围绝经期妇女保健工作,Tel:0377-62071309,E-mail:jjheling99@sohu.com

expressions of Bax ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Erxian Yikun decoction has the effect in improving the ability of learning and memory, this mechanism may relate to scavenging free radicals, anti-oxidization and regulating neurotransmitter level and influencing the effect of Bcl-2 and Bax expression.

[**Key words**] Erxian Yikun decoction; perimenopause; learning and memory

妇女进入围绝经期后往往出现一系列围绝经期症状,学习和记忆能力明显下降是常见的症状之一,且绝经后妇女认知功能障碍的发生率亦较同龄男性高 2~3 倍^[1],早期预防和有效延缓这种症状,改善中老年妇女的健康和成为目前研究的热点。大量研究^[2-3]显示,记忆力下降与体内雌激素水平降低有关,应用雌激素可有效缓解妇女围绝经期症状,改善其认知记忆功能,但存在着用药禁忌、副作用和潜在的致癌危险性。研究^[3-4]认为补肾类中药具有雌激素样作用,可通过调节神经递质代谢、提高脑内雌激素受体及神经营养因子的表达等发挥其改善记忆力的作用。依据传统经方二仙汤加减组成二仙益坤汤,前期临床用于缓解围绝经期症状,效果良好^[5]。本研究旨在探讨其在改善围绝经期模型小鼠学习记忆能力方面的作用,并从抗氧化、调节神经递质功能、抑制细胞凋亡等方面探讨其作用机制,为临床应用提供理论和实验依据。

1 材料

1.1 动物 昆明种雌性小鼠,体重为 18~22 g,由河南中医学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(豫)2014-0005。

1.2 药物及试剂 中药二仙益坤汤主要成分:淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归、菟丝子、熟地黄、女贞子、旱莲草、郁金等。所用中药均采购自南阳理工学院校医院(药材均经过南阳理工学院中药教研室黄显章教授鉴定,符合国家药典标准),所有中药按比例加水煎煮 2 次,浓缩制成半浓缩混悬液,每毫升药液含生药 2 g。己烯雌酚(DES,上海医药集团生产,批号 20120105),超氧化物歧化酶(SOD,批号 20120703),丙二醛(MDA,批号 20120706),过氧化脂质(LPO,批号 20120707),一氧化氮(NO,批号 20120528),一氧化氮合酶(NOS,批号 20120626),乙酰胆碱(ACh,批号 20110618),胆碱酯酶(AChE,批号 20110611)试剂盒均购于南京建成生物工程研究所,SYBR PrimeScript Real Time RT-PCR Kit 购于大连 TaKaRa 生物工程公司。

1.3 仪器 YLS-3T 型小鼠跳台仪(安徽省淮北正华生物仪器设备有限公司),Morris 水迷宫(上海吉量有限公司),PTC-200 型基因扩增仪(美国 BD 公

司),RT-PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),Mx3000P 型 RT-PCR 扩增仪(美国 Stratagene 公司),引物合成由广州达安基因公司。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 小鼠适应性饲养 1 周后,10% 水合氯醛麻醉后经背行卵巢切除术模拟围绝经期;假手术组行模拟手术,不摘除卵巢。观察 2 周后对去势小鼠进行阴道涂片检测 1 周,选择无规则动情周期的小鼠 50 只,随机分为模型组、阳性药物 DES 组、二仙益坤汤高、中、低剂量组,每组 10 只,另取 10 只假手术组小鼠作为对照。DES 组按 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给予 DES 混悬液;二仙益坤汤高、中、低剂量组分别按 $30, 15, 7.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌服配制不同浓度的半浓缩混悬液;模型组及假手术组每日灌胃等量生理盐水,均每日给药 1 次,动物给药 5 周后进行行为学实验。

2.2 学习记忆实验

2.2.1 跳台实验^[6] 将小鼠放入跳台反应箱内适应环境 3 min,立即通以 36 V 交流电刺激,小鼠受到电击后的正常反应为跳上跳台(安全区),记录 5 min 内小鼠跳下跳台的次数为训练错误次数即学习成绩。24 h 后重作测试,记录第 1 次跳下跳台的时间即潜伏期和 5 min 内跳下跳台的次数即错误次数为记忆保持测验。

2.2.2 Morris 水迷宫行为实验^[6] 圆柱形水迷宫,直径 120 cm,高 50 cm,内壁为黑色,内部分为大小相等的 4 个象限,在其中一象限中央放置一直径 9 cm 的站台,低于水面 1 cm。水池温度维持在 21~24 °C,实验分为两部分。

2.2.2.1 定位航行实验 每日分上午(9:00~11:00)和下午(15:00~17:00)时间段,每时间段各组小鼠均连续训练 2 次。训练时将小鼠在站台对面象限面向池壁放入水中,记录小鼠在 60 s 内搜索到站台并停留 10 s 的时间,为潜伏期,若 60 s 内小鼠未搜索到站台,则将其引至站台并停留 10 s,潜伏期记为 60 s。第 5 天下午开始记忆检测,将小鼠在站台对面象限面壁放入水中,记录其寻找站台的潜伏期。

2.2.2.2 空间搜索实验 即撤除站台,同样方法放

入小鼠,观察和记录 60 s 内小鼠穿越原站台位置的次数。重复 2 次,取平均值。

2.3 生化指标检测

2.3.1 血清 SOD 活性,MDA 含量测定 行为实验结束后,去势小鼠眼球取血,分离血清,分别按试剂盒说明书操作进行测定。

2.3.2 脑组织 SOD, LPO, NO, NOS, ACh, AChE 检测 小鼠处死,取脑组织,用生理盐水洗去残留血液,滤纸拭干,准确称取组织质量,处理后加 9 倍生理盐水制成 10% 的组织匀浆,2 500 r·min⁻¹离心 10 min,取上清,分别按各试剂盒说明书进行检测。

2.4 RT-PCR 法检测 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 x 蛋白 (Bax) 的转录表达水平 Trizol 法提取各组海马标本的 Total RNA,按照反转录试剂盒的操作说明书,将 mRNA 逆转录为 cDNA。并进行 RT-qPCR。 β -actin 作为内参照。Bcl-2, Bax 和 β -actin 引物采用 Gene Runner 软件设计,引物序列及预计产物长度见表 1。按照 RT-qPCR 试剂盒的操作说明书,RT-qPCR 检测 Bcl-2, Bax mRNA 的转录表达水平,计算目的基因/ β -actin 积分吸光度 IA。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Sequences primers of RT-qPCR

引物	引物序列	片段长度/bp
Bcl-2	5'-CCCTGGCATCTTCTCCTTC-3'	346
	5'-CATCTCCCTGTTGACGCTC-3'	
Bax	5'-GCAGAGGATGATTGCTGATG-3'	375
	5'-CTCAGCCCATCTTCTTCAG-3'	
β -actin	5'-GTAAGACCTCTATGCCAACA-3'	515
	5'-GGACTCATCGTACTCCTGCT-3'	

2.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件包分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本资料 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析,多组间两两比较,若方差齐用 LSD 法检验,若方差不齐,用 TamhanT² 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学差异。

3 结果

3.1 对围绝经期模型小鼠学习记忆能力的影响

3.1.1 跳台实验 模型组去势小鼠比假手术组潜伏期延长,且训练错误次数及测试错误次数明显增多;与模型组相比,DES 组、二仙益坤汤各剂量组均能减少小鼠训练错误次数及测试错误次数,并延长潜伏期 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

3.1.2 Morri 水迷宫及跨越平台次数实验 与假手

表 2 二仙益坤汤对围绝经期模型小鼠学习记忆能力的影响 (跳台试验) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Erxian Yikun decoction on ability of learning and memory of perimenopause model mice (diving platform experiment) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	训练错误数 /次	潜伏期 /s	测试错误数 /次
假手术	-	2.11 ± 0.78	198.40 ± 30.72	1.92 ± 0.96
模型	-	5.56 ± 1.87 ³⁾	133.30 ± 25.44 ³⁾	3.88 ± 1.46 ³⁾
DES	0.000 1	3.21 ± 1.33 ²⁾	178.70 ± 33.55 ²⁾	1.95 ± 1.16 ²⁾
二仙益坤汤	7.5	3.34 ± 1.14 ²⁾	162.60 ± 26.10 ¹⁾	2.34 ± 1.06 ¹⁾
	15	2.97 ± 1.76 ²⁾	174.40 ± 31.40 ²⁾	1.96 ± 0.90 ²⁾
	30	3.15 ± 1.66 ²⁾	187.60 ± 40.85 ²⁾	1.82 ± 0.66 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与假手术组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 7 同)。

术组比较,模型组小鼠明显延长了潜伏期、减少了穿越站台次数 ($P < 0.01$);与模型组相比,DES 组、二仙益坤汤各剂量组小鼠出现不同程度的潜伏期缩短、穿越站台次数增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 二仙益坤汤对围绝经期模型小鼠学习记忆能力的影响 (Morri 水迷宫测试) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Erxian Yikun decoction on ability of learning and memory of perimenopause female mice (morris water maze test) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	定向航行潜伏期 /s	空间搜索穿越 站台数/次
假手术	-	25.69 ± 6.87	3.42 ± 1.85
模型	-	43.56 ± 8.02 ³⁾	1.48 ± 1.21 ³⁾
DES	0.000 1	35.43 ± 9.37 ¹⁾	3.15 ± 2.11 ²⁾
二仙益坤汤	7.5	40.17 ± 10.63	1.86 ± 1.77
	15	36.21 ± 7.33 ¹⁾	2.87 ± 1.43 ¹⁾
	30	30.45 ± 6.54 ²⁾	3.19 ± 1.15 ²⁾

3.2 对围绝经期模型小鼠血清中 SOD, MDA 的影响 模型组与假手术组比较, SOD 活性明显降低, MDA 含量增加 ($P < 0.01$);二仙益坤汤高、中、低剂量组及 DES 组与模型组比较明显提高了 SOD 活性,降低了 MDA 含量,其结果有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

3.3 对围绝经期模型小鼠脑组织中 SOD, LPO 的影响 模型组与假手术组比较 SOD 活性明显降低, LPO 含量增加 ($P < 0.01$);二仙益坤汤高、中、低剂量组及 DES 组与模型组比较明显提高了 SOD 活性,降低了 LPO 含量,其结果有显著性差异 ($P < 0.05,$

$P < 0.01$)。见表 5。

表 4 二仙益坤汤对围绝经期模型小鼠血清 SOD, MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of Erxian Yikun decoction on SOD and MDA in serum of perimenopause model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹	MDA /μmol·L ⁻¹
假手术	-	72.19 ± 3.74	4.65 ± 0.38
模型	-	55.57 ± 5.37 ³⁾	6.11 ± 0.28 ³⁾
DES	0.000 1	72.01 ± 4.33 ²⁾	5.12 ± 0.50 ²⁾
二仙益坤汤	7.5	63.32 ± 2.94 ¹⁾	5.17 ± 0.67 ¹⁾
	15	62.94 ± 6.76 ²⁾	4.32 ± 0.41 ²⁾
	30	73.13 ± 5.66 ²⁾	4.54 ± 0.44 ²⁾

3.4 对围绝经期模型小鼠脑组织中 NO, NOS, ACh, AChE 的影响 模型组与假手术组比较, NO 含量和 NOS 活性均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 二仙益坤汤高、中剂量组及 DES 组均不同程度的降低了 NO 含量和 NOS 活性 ($P < 0.05, P < 0.01$), 而二

表 6 二仙益坤汤对围绝经期模型小鼠脑组织 NO, NOS, ACh, AChE 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effects of Erxian Yikun decoction on NO, ACh, NOS, AChE in brain tissue of perimenopause model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NO/mol·mg ⁻¹	NOS/U·mg ⁻¹	ACh/μmol·g ⁻¹	AChE/U·mg ⁻¹
假手术	-	0.9 ± 0.12	0.59 ± 0.13	42.19 ± 7.74	6.17 ± 1.67
模型	-	1.41 ± 0.21 ³⁾	0.86 ± 0.14 ³⁾	31.57 ± 6.37 ³⁾	8.11 ± 1.58 ³⁾
DES	0.000 1	1.19 ± 0.18 ¹⁾	0.69 ± 0.17 ¹⁾	38.01 ± 4.33 ²⁾	6.12 ± 1.50 ²⁾
二仙益坤汤	7.5	1.38 ± 0.19	0.73 ± 0.10 ¹⁾	35.82 ± 3.94 ¹⁾	6.65 ± 1.38 ¹⁾
	15	1.22 ± 0.13 ¹⁾	0.71 ± 0.11 ¹⁾	39.19 ± 6.86 ²⁾	6.54 ± 1.44 ¹⁾
	30	1.20 ± 0.16 ¹⁾	0.69 ± 0.16 ¹⁾	43.13 ± 4.66 ²⁾	6.32 ± 1.41 ²⁾

3.5 对围绝经期模型小鼠海马中 Bcl-2, Bax mRNA 表达的影响 与假手术组比较, Bax mRNA 表达增高, Bcl-2 mRNA 表达降低 ($P < 0.01$); 二仙益坤汤高、中剂量组及 DES 组与模型组比较, Bax mRNA 表达降低, Bcl-2 表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 7。

表 7 二仙益坤汤对围绝经期模型小鼠海马 Bax, Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effects of Erxian Yikun decoction of Bax, Bcl-2 mRNA in hippocampus of perimenopause model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Bcl-2 /β-actin	Bax /β-actin
假手术	-	1.03 ± 0.10	0.35 ± 0.12
模型	-	0.63 ± 0.22 ³⁾	0.88 ± 0.28 ³⁾
DES	0.000 1	0.92 ± 0.14 ²⁾	0.52 ± 0.50 ¹⁾
二仙益坤汤	7.5	0.77 ± 0.31	0.71 ± 0.22
	15	0.90 ± 0.46 ¹⁾	0.67 ± 0.24 ¹⁾
	30	0.94 ± 0.16 ²⁾	0.56 ± 0.31 ¹⁾

4 讨论

研究表明大脑长期雌激素缺乏可致前脑基底胆

表 5 二仙益坤汤对围绝经期模型小鼠脑组织 SOD, LPO 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of Erxian Yikun decoction on SOD, LPO in brain tissue of perimenopause model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	LPO /mol·g ⁻¹
假手术	-	10.79 ± 1.62	14.12 ± 1.90
模型	-	7.44 ± 1.11 ³⁾	22.63 ± 2.37 ³⁾
DES	0.000 1	12.90 ± 2.18 ¹⁾	13.11 ± 2.38 ²⁾
二仙益坤汤	7.5	11.18 ± 2.19	16.92 ± 1.99 ¹⁾
	15	12.24 ± 2.17 ²⁾	15.19 ± 1.71 ²⁾
	30	12.99 ± 2.22 ²⁾	13.19 ± 1.88 ²⁾

仙益坤汤低剂量组 NO 含量与模型组相比无显著性差异。模型组与假手术组比较 AChE 活性明显增高, ACh 含量下降 ($P < 0.01$); 二仙益坤汤各剂量组及 DES 组与模型组比较明显降低了 AChE 活性, ACh 含量也有明显提高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 6。

碱能神经元功能下降^[7], 并引起机体氧化与抗氧化失衡, 自由基堆积^[8]。过多的氧自由基会破坏机体细胞膜等重要成分, 引起脑神经功能衰退, 使围绝经期妇女出现明显的衰老性学习记忆力减退。MDA 是脂质过氧化最终产物, LPO 是不饱和脂肪酸经自由基作用所形成的过氧化物, 二者水平可间接反映细胞受损程度; SOD 可以催化超氧阴离子自由基的歧化反应, 阻断脂质过氧化作用, 使细胞膜免受氧自由基的损伤, 延缓衰老进程。有实验表明^[9] NO 含量和 NOS 活性随年龄的增加而增高, NO 是由谷氨酸与其受体结合后, 在激活钙依赖的 NOS 的作用下所产生的, 既是一种神经递质和信使分子, 参与神经传导及学习和记忆过程, 同时又是一种极不稳定的强氧化剂, 可与体内过多的超氧阴离子发生反应, 形成活性更高的过氧亚硝基基团, 对细胞产生毒性, 加速机体衰老^[9]。中枢胆碱能系统与学习记忆和认知关系最为密切, ACh 为其重要的神经递质, 由 AChE 催化分解^[10], ACh 不足可致学习障碍和记忆力减退。本研究结果表明, 二仙益坤汤各剂量组与

模型组比较明显提高了血清 SOD 活性,降低了 MDA 含量;能明显降低脑组织 NOS 和 AChE 活性和 LPO, NO 含量,并提高 ACh 含量,说明该方能对抗去卵巢后造成的自由基损伤,具有较好抗氧化、延缓衰老及调节神经递质的作用,从而提高去势动物的学习记忆能力。

各种研究认为海马与学习、记忆、行为和情绪密切相关,是研究动物或人认知功能的经典脑区。有研究^[11]报道大鼠认知功能受损与海马神经元的凋亡有密切关系,研究发现神经生长因子缺乏、神经细胞凋亡致使脑神经元受损发生萎缩缺失,进一步影响到学习记忆等高级功能。而 Bax, Bcl-2 作为一对关系密切的凋亡相关基因,在中枢神经系统中均有表达,在神经细胞凋亡的控制中起重要作用^[12], Bcl-2 基因有促进细胞周期和细胞增殖的能力,其过度表达可特异性抑制细胞凋亡;Bax 基因的过度表达能加速 IL-3 细胞株在细胞因子缺失时发生细胞凋亡,并对抗 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制作用,从而促进细胞凋亡^[13]。本实验研究发现围绝经期模型小鼠海马神经元 Bax 表达上升, Bcl-2 表达下降,提示围绝经期模型小鼠海马神经元细胞凋亡,可能是导致海马损伤的原因之一。而二仙益坤汤可以调节模型小鼠 Bax, Bcl-2 表达,减轻围绝经期模型小鼠海马细胞凋亡,这可能是二仙益坤汤提高学习和记忆能力的作用机制之一。

本方以补肾为主,平衡阴阳。方中多味中药经现代实验证实具有雌激素样作用^[14]和抗氧化、抗衰老及促智作用^[15-17]。如女贞子多糖与菟丝子多糖能使小鼠心、肝、肾组织中 MDA 含量不同程度下降, SOD 活力提高^[15],熟地黄能明显抑制去势大鼠海马神经元的凋亡,显著改善其学习记忆能力^[16];淫羊藿中所含淫羊藿多糖、总黄酮复合物能明显降低 AChE 活性,改善老龄大鼠学习和记忆能力^[17]。

本研究结果提示,二仙益坤汤能明显改善围绝经期模型小鼠学习记忆能力,其作用可能与清除体内过多自由基,改善神经递质功能,减轻神经细胞损伤、保护神经元的功能有关。

【参考文献】

[1] Rosario E R, Chang L, Head E H, et al. Brain levels of sex steroid hormones in men and women during normal aging and in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2011, 32(4):604-613.

[2] 龚莉莉, 张绍芬, 纪律. 绝经早期激素与中药治疗对认知记忆和生存质量的影响[J]. *生殖与避孕*, 2008, 28(1):26-31.

[3] 景苏玉, 魏美娟. 围绝经期妇女的记忆商与雌激素及补肾中药之间关系的临床研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2002, 22(7):494-495.

[4] 饶艳秋, 陈品丽, 程明军, 等. 中药更年期春(GNC)方对去势大鼠学习记忆能力及下丘脑神经递质的影响 [J]. *复旦学报:医学版*, 2014, 41(5):631-636.

[5] 张慧珍. 二仙汤合甘麦大枣汤治疗围绝经期综合症 55 例 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(9):841-845.

[6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. *药理实验方法学* [M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002:826-827.

[7] Gibbs R B, Aggarwal P. Estrogen and basal forebrain cholinergic neuron: implications for brain aging and Alzheimer's disease related cognitive decline [J]. *Horm Behav*, 1998, 34(2):98-111.

[8] 鲁遂荣, 方学熹, 侯安继, 等. 更年期平调液对更年期大鼠自由基影响的实验研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 1998, 4(8):35-37.

[9] 赵雪莹, 李冀, 王跃春, 等. 二至丸对 D-半乳糖致衰老模型大鼠 NO, NOS 影响的实验研究 [J]. *医药学报*, 2011, 39(5):39-40.

[10] 李雪娜, 李向军, 王宏涛, 等. 益智胶囊对阿尔茨海默病大鼠学习记忆能力的改善作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(5):115-119.

[11] Lucassen P J, Vollmann-Honsdorf G K, Gleisberg M, et al. Chronic psychosocial stress differentially affects apoptosis in hippocampal subregions and cortex of the adult tree shrew [J]. *Eur J Neurosci*, 2001, 14(1):161-166.

[12] Yang B, Prayson R A. Expression of Bax, Bcl-2 and P53 in progressive multifocal leukoencephalopathy [J]. *Mod Pathol*, 2000, 13(10):1115-1120.

[13] 郑航, 郑新民, 李世文, 等. Bcl-2/Bax 基因表达对隐睾生殖细胞凋亡的影响 [J]. *中国男科学杂志*, 2000, 14(2):81-85.

[14] 陶仕英, 牛建昭, 赵丕文, 等. 二仙汤及其组方中药对幼年大鼠子宫作用的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(18):118-121.

[15] 蔡曦光, 张振明, 许爱霞, 等. 女贞子多糖与菟丝子多糖清除氧自由基及抗衰老协同作用实验研究 [J]. *医学研究杂志*, 2007, 36(8):74-75.

[16] 李龙宣, 赵斌, 许志恩, 等. 熟地黄对去势大鼠海马神经元凋亡的抑制作用 [J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2006, 35(6):751-754.

[17] 孟宪丽, 曾南, 张艺, 等. 淫羊藿有效成分对老龄雄性大鼠下丘脑单胺类神经递质及其他脑功能作用的研究 [J]. *中国中药杂志*, 1996, 21(11):683-685.

【责任编辑 周冰冰】