

# 六味地黄丸对 APP/PS1 小鼠学习记忆能力 及胆碱能系统的影响

崔勇, 王艳杰, 赵丹玉, 冯晓帆, 张林, 柳春\*  
(辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847)

**[摘要]** **目的:**探讨六味地黄丸对 APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆能力以及胆碱能系统的影响。**方法:**将 40 只 APP/PS1 双转基因小鼠随机分为 APP/PS1 模型组, 六味地黄丸低、中、高剂量(0.59, 1.18, 2.36 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组, 西药布洛芬(0.04 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组, 每组 8 只。相匹配的 3 月龄野生型(WT)小鼠 8 只, 作为正常组。ig 给药 3 个月, 通过 Morris 水迷宫检测学习记忆能力。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测各组小鼠大脑皮层乙酰胆碱(ACh)含量, 乙酰胆碱转移酶(ChAT)和乙酰胆碱酯酶(AChE)的活性。**结果:**与正常组相比, APP/PS1 模型组小鼠在各时期找到平台所需的时间(潜伏期)均延长( $P < 0.05$ ), 在平台所在象限停留时间, 百分比, 穿越平台次数均降低( $P < 0.05$ ), ACh 含量及 ChAT 活性均降低( $P < 0.05$ )。六味地黄丸低、中、高剂量组和布洛芬组与 APP/PS1 模型组相比潜伏期缩短( $P < 0.05$ ), 在平台所在象限停留时间, 百分比, 穿越平台次数均增高( $P < 0.05$ ), ACh 含量及 ChAT 活性均增高( $P < 0.05$ ), AChE 活性无统计学差异。**结论:**不同剂量的六味地黄丸可通过提高脑内 ChAT 活性, 增加 ACh 含量影响中枢神经胆碱能系统, 从而改善 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力。

**[关键词]** 六味地黄丸; APP/PS1 小鼠; 水迷宫; 乙酰胆碱

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0148-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2016030148

## Effects of Liuwei Dihuang Wan on Learning and Memory Abilities and Cholinergic System in APP/PS1 Mice

CUI Yong, WANG Yan-jie, ZHAO Dan-yu, FENG Xiao-fan, ZHANG Lin, LIU Chun\*

(Department of Basic Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Liuwei Dihuang Wan on learning and memory abilities and activity of cholinergic system in APP/PS1 mice. **Method:** 40 double transgenic APP/PS1 mice were randomly divided into APP/PS1 model group, Liuwei Dihuang Wan low dose group (0.59 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), medium dose group (1.18 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), and high dose group (2.36 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), ibuprofen group (0.04 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), with 8 mice in each group. Another 8 3 month old wild type mice (WT) were selected as the normal group. After lavage administration for 3 months, Morris water maze was used to test their learning and memory abilities. The content of acetylcholine (ACh) and the activity of choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE) in cortex were measured by enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). **Result:** Compared with the normal control group, the time required to find the platform (latency) was longer in the model group of each period ( $P < 0.05$ ); time and percentage of staying in platform quadrant and frequency of crossing the platform were decreased ( $P < 0.05$ ); content of ACh and activity of ChAT were decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the APP/PS1 model group, latency was shortened ( $P < 0.05$ ), time and percentage of staying in platform quadrant and frequency of crossing the platform were increased ( $P < 0.05$ ) in Liuwei Dihuang Wan low, medium and high

**[收稿日期]** 20150531(004)

**[基金项目]** 辽宁省科学技术计划项目(2012225018)

**[第一作者]** 崔勇, 在读博士, 讲师, 从事中医药抗阿尔茨海默病机制的研究, Tel:17702425401, E-mail:cuiyong1288@sina.com

**[通讯作者]** \*柳春, 博士, 教授, 从事中医药对脏腑调控作用的信号转导机制研究, Tel:024-31207093, E-mail:liuchun5@yahoo.com.cn

dose groups as well as ibuprofen group; the content of ACh and the activity of ChAT were increased ( $P < 0.05$ ), while the activity of AChE was not significantly different. **Conclusion:** Different doses of Liuwei Dihuang Wan can improve learning and memory abilities of APP/PS1 mice, which is related to its effects on the cholinergic system by increasing the content of ACh and the activity of ChAT.

[**Key words**] Liuwei Dihuang Wan; APP/PS1 mice; Morris water maze; acetylcholine

阿尔茨海默病(AD)是导致进行性认知功能减退的最常见原因,临床以学习记忆障碍为主要表现<sup>[1]</sup>。有研究表明,AD患者中枢胆碱能系统受损与学习记忆障碍密切相关<sup>[2-3]</sup>。APP/PS1双转基因小鼠表达突变人 $\beta$ -淀粉样前体蛋白基因swe(Appswe)和突变早老蛋白1基因(PS1)是目前病理改变与AD最为接近的动物模型。六味地黄丸是传统滋补肾阴的经典名方,以滋补肾阴,进而填精补益为切入点,可以治疗AD。现代药理学研究表明,六味地黄丸具有抗氧化,抗细胞凋亡等作用<sup>[4-5]</sup>。但其能否影响胆碱能系统,从而改善APP/PS1双转基因小鼠学习记忆能力,尚未见相关报道。本实验通过观察六味地黄丸对APP/PS1小鼠行为学和胆碱能系统的影响,探讨六味地黄丸改善AD模型小鼠学习记忆障碍的机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 3月龄雌性APP/PS1双转基因小鼠40只,相匹配的3月龄雌性野生型(WT)小鼠8只,体重( $30 \pm 5$ )g,购自南京大学模式动物研究所,合格证号SCXK(苏)2015-0001。动物适应性饲养3d后,分笼喂养,自由饮食及饮水。

**1.2 药物及试剂** 六味地黄丸浓缩丸(北京同仁堂制药股份有限公司,批号14073881,每8丸相当于生药3g),布洛芬胶囊(珠海联邦制药股份有限公司,国药准字H19983137)。小鼠乙酰胆碱(ACh),乙酰胆碱转移酶(ChAT),乙酰胆碱酯酶(AChE)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(北京诚林生物科技有限公司,批号分别为E-20535, E-21422, E-21431)。

**1.3 仪器** XCS2型Morris水迷宫自动控制仪和小鼠自动穿梭控制记录系统(中国医学科学院药物研究所研制),UV-270型光度计(日本岛津)。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 将40只APP/PS1双转基因小鼠随机分为5组,每组8只。按照人与小鼠体表面积等效剂量换算方法,得六味地黄丸低、中、高剂量( $0.59, 1.18, 2.36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,按生药量计,下同)组;将六味地黄丸浓缩丸打成粉末,生理盐水混匀,

按体积 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 每天2次ig。西药布洛芬组用药量 $0.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,将布洛芬胶囊拆开,取药物研碎,生理盐水混匀,按体积 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 每日2次ig。正常组和APP/PS1模型组分别给予等体积生理盐水每日2次ig。以上各组连续治疗3个月。

**2.2 Morris水迷宫测定** Morris水迷宫主要由一不锈钢制成的圆柱形黑色水池和一可移动位置的平台组成。预先在水池里注入清水,使水面高出平台2cm,水温控制在( $25 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 。定位航行实验:平台置于某一象限的中间,小鼠入池位置为站台所在位置的象限,于象限边1/2弧度处头朝池壁入水,每次2min。水池上空通过摄像机与监视电视和计算机相连接。当设定的训练时间已到或动物已爬上平台,计算机停止跟踪并记录下游泳轨迹和自动计算出动物在水池中所游过的路程,找到平台所需的时间(即潜伏期)等指标。若动物在2min之内尚未找到平台,则将其拿到平台上并停留20s,结束1次训练。空间探索实验:定位航行实验结束后,撤去平台,以相同的入水点将小鼠入水,视频系统自动追踪,测定其在2min内在平台所在象限的停留时间,并计算此停留时间所占游泳总时间的百分比,记录穿越平台的次数。数据采集和处理由Morris水迷宫图像自动监视处理系统完成。于给药结束前1周开始训练及测试。

**2.3 胆碱能系统测定** 行为学测试结束后,小鼠迅速断头取脑,冰上分离小鼠皮层, $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用。测定前,称量皮层质量,按照1:9加入PBS(pH 7.4)制作成10%匀浆, $4^{\circ}\text{C}$ , $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10min,取上清液分别按照ELISA试剂盒操作,绘制标准曲线,用酶标仪在460nm处读取吸光度A,检测各组小鼠大脑皮层ACh含量及ChAT和AChE的活性。

**2.4 统计学处理** 采用SPSS 18.0统计软件,各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 各组大鼠Morris水迷宫实验比较** 在各组水迷宫定位航行实验中,随着训练时间和次数的增加,

各组潜伏期有缩短趋势。其中, APP/PS1 模型组与正常组相比在各时期潜伏期均显著延长 ( $P < 0.05$ )。六味地黄丸高剂量组和布洛芬组与 APP/

PS1 模型组相比, 潜伏期显著缩短 ( $P < 0.05$ )。六味地黄丸低剂量组与模型组相比, 潜伏期缩短, 在测试第 5, 6, 7 天有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 六味地黄丸对 APP/PS1 模型小鼠 Morris 水迷宫找到平台所需时间(潜伏期)的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effects of Liuwei Dihuang Wan on time of finding platform in Morris water maze for APP/PS1 mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
正常	-	61 ± 10	51 ± 8	46 ± 7	40 ± 6	35 ± 6	28 ± 5	23 ± 4
模型	-	88 ± 10 <sup>1)</sup>	81 ± 9 <sup>1)</sup>	75 ± 8 <sup>1)</sup>	70 ± 8 <sup>1)</sup>	71 ± 9 <sup>1)</sup>	74 ± 8 <sup>1)</sup>	71 ± 7 <sup>1)</sup>
六味地黄丸	0.59	70 ± 10	65 ± 9	65 ± 7	61 ± 7	51 ± 6 <sup>2)</sup>	41 ± 6 <sup>2)</sup>	36 ± 4 <sup>2)</sup>
	1.18	60 ± 7 <sup>2)</sup>	50 ± 7 <sup>2)</sup>	48 ± 6 <sup>2)</sup>	43 ± 6 <sup>2)</sup>	39 ± 6 <sup>2)</sup>	30 ± 3 <sup>2)</sup>	26 ± 4 <sup>2)</sup>
	2.36	60 ± 8 <sup>2)</sup>	49 ± 7 <sup>2)</sup>	50 ± 7 <sup>2)</sup>	41 ± 5 <sup>2)</sup>	38 ± 6 <sup>2)</sup>	29 ± 4 <sup>2)</sup>	25 ± 3 <sup>2)</sup>
布洛芬	0.04	68 ± 10 <sup>2)</sup>	51 ± 7 <sup>2)</sup>	47 ± 7 <sup>2)</sup>	46 ± 6 <sup>2)</sup>	38 ± 6 <sup>2)</sup>	30 ± 3 <sup>2)</sup>	29 ± 4 <sup>2)</sup>

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

在各组水迷宫空间探索实验中,与正常组相比, APP/PS1 模型组在平台所在象限停留时间、百分比、穿越平台次数均显著降低 ( $P < 0.05$ )。六味地黄丸低、中、高剂量组和布洛芬组与 APP/PS1 模型组相比,在平台所在象限停留时间,百分比,穿越平台次数均显著增高 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组水迷宫空间探索实验的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Comparison of spatial probe test in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	平台象限		穿越平台数 /次
		停留时间/s	停留比/%	
正常	-	38 ± 9	58.61 ± 5.77	6.7 ± 1.3
模型	-	14 ± 5 <sup>1)</sup>	26.19 ± 3.17 <sup>1)</sup>	2.1 ± 1.1 <sup>1)</sup>
六味地黄丸	0.59	20 ± 6 <sup>2)</sup>	40.90 ± 4.40 <sup>2)</sup>	5.6 ± 1.0 <sup>2)</sup>
	1.18	33 ± 7 <sup>2)</sup>	55.36 ± 5.66 <sup>2)</sup>	6.2 ± 1.1 <sup>2)</sup>
	2.36	31 ± 7 <sup>2)</sup>	50.89 ± 5.09 <sup>2)</sup>	5.8 ± 1.2 <sup>2)</sup>
布洛芬	0.04	29 ± 6 <sup>2)</sup>	51.42 ± 6.02 <sup>2)</sup>	5.0 ± 0.9 <sup>2)</sup>

**3.2 各组小鼠大脑皮层 ACh 含量, ChAT, AChE 的活性比较** APP/PS1 模型组与正常组相比, ACh 含量及 ChAT 活性均显著降低 ( $P < 0.05$ )。六味地黄丸低、中、高剂量组和布洛芬组与 APP/PS1 模型组相比, ACh 含量及 ChAT 活性均显著增高 ( $P < 0.05$ )。APP/PS1 模型组 AChE 的活性较正常组及六味地黄丸低、中、高剂量组和布洛芬组略有增高, 但无统计学差异。见表 3。

#### 4 讨论

AD 的发生与中枢胆碱能系统密切相关, ACh 的含量本身可以反映脑的学习记忆能力。ACh 与胆碱能受体结合, 兴奋胆碱能系统, 通过膈区-海马-

表 3 各组小鼠大脑皮层 ACh 含量及 ChAT 和 AChE 的活性的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Comparison of ACh content and activity of ChAT and AChE in cortex of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	ACh /μg·L <sup>-1</sup>	ChAT /U·mg <sup>-1</sup>	AChE /U·mg <sup>-1</sup>
正常	-	3.69 ± 0.31	91.19 ± 1.75	0.78 ± 0.06
模型	-	1.25 ± 0.11 <sup>1)</sup>	40.61 ± 1.04 <sup>1)</sup>	0.83 ± 0.09
六味地黄丸	0.59	2.77 ± 0.29 <sup>2)</sup>	52.66 ± 1.47 <sup>2)</sup>	0.70 ± 0.05
	1.18	3.15 ± 0.49 <sup>2)</sup>	80.62 ± 1.83 <sup>2)</sup>	0.69 ± 0.04
	2.36	2.90 ± 0.33 <sup>2)</sup>	74.20 ± 1.32 <sup>2)</sup>	0.71 ± 0.06
布洛芬	0.04	2.07 ± 0.37 <sup>2)</sup>	60.25 ± 1.09 <sup>2)</sup>	0.67 ± 0.05

边缘叶和大脑皮质通路调节第一级记忆转入第二级记忆的过程<sup>[6]</sup>。发生 AD 时 ACh 的合成, 储存及释放减少, 从而导致以认知和记忆功能障碍为主的临床表现。ChAT 和 AChE 的活性影响着 ACh 的运输, 合成及摄取。研究表明, 老年痴呆患者脑内 ACh 合成分泌减少, 其合成酶 ChAT 活性下降, 且与痴呆严重程度密切相关, 海马和皮层锥体细胞的突触烟碱受体及突触前 M 受体均减少。

中医认为, 肾藏精, 精生髓, 而脑为髓海, 故肾与大脑的功能关系密切。肾虚是衰老的最主要原因, 人至老年, 肾精渐衰, 肾虚导致脏腑功能失调, 进而变生痰浊瘀血, 阻滞胞络, 神明蒙蔽, 则是导致老年性痴呆的重要因素<sup>[7-8]</sup>。由熟地黄, 山茱萸, 山药, 泽泻, 丹皮, 茯苓组方的六味地黄丸是传统滋补肾阴的经典名方, 以滋补肾阴, 进而填精补益为切入点, 可以治疗 AD。现代医学证明六味地黄丸可调节内分泌失调, 增强机体免疫力, 又能改善体内自由基代

谢,抗凋亡,起到延缓衰老等作用<sup>[9-10]</sup>。

本实验的行为学测试结果表明,APP/PS1 模型组定位航行实验各时期潜伏期均延长,空间探索实验中在平台所在象限停留时间,百分比和穿越平台次数均降低。六味地黄丸低、中、高剂量组和布洛芬组潜伏期缩短,在平台所在象限停留时间,百分比,穿越平台次数均增高。这说明 APP/PS1 模型小鼠学习记忆能力较正常野生型小鼠明显下降,而六味地黄丸能够明显改善小鼠学习记忆障碍。在对各组小鼠大脑皮层 ACh 含量,ChAT, AChE 的活性测定中,APP/PS1 模型组 ACh 含量及 ChAT 活性均降低。六味地黄丸低、中、高剂量组和布洛芬组 ACh 含量,ChAT 活性均增高。ChAT 是合成 ACh 的关键酶,也是胆碱能系统中神经元的标志酶<sup>[11]</sup>。这说明六味地黄丸主要是通过上调 ChAT 活性,从而增加 ACh 的合成,使脑内 ACh 的含量水平上升,进而使学习记忆障碍的症状得到了明显改善。APP/PS1 模型组 AChE 的活性较正常组及六味地黄丸低、中、高剂量组和布洛芬组略有增高。这说明六味地黄丸对 AChE 活性无明显影响,这有待进一步研究及验证。综合本实验结果,六味地黄丸通过上调 ChAT 活性,使 ACh 含量增加,可以明显改善小鼠学习记忆障碍,为临床防治 AD 提供实验依据。

#### [参考文献]

[ 1 ] 张均田. 老年痴呆的发病机制及治疗策略·神经药理学研究进展[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:16.  
[ 2 ] Reale M, Di Nicola M, Velluto L, et al. Selective acetyl and butyrylcholinesterase inhibitors reduce amyloid- $\beta$  ex vivo activation of peripheral chemo-cytokines from Alzheimer's disease subjects: exploring the cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. *Curr Alzheimer Res*,

2014,11(6):608-622.

[ 3 ] Smitha M A, Zhua X, Tabatonb M, et al. Increased iron and free radical generation in preclinical Alzheimer disease and mild cognitive impairment[J]. *J Alzheimers Dis*, 2010,19(1):363-372.  
[ 4 ] Perry B, Zhang J, Saleh T, et al. Liuwei Dihuang a traditional Chinese herbal formula, suppresses chronic inflammation and oxidative stress in obese rats [J]. *J Integr Med*, 2014,12(5):447-454.  
[ 5 ] 谢宝刚,方修忠,陈颖,等. 基于 HPLC-UV 的代谢组学方法对六味地黄丸的抗炎药效评价[J]. *中国中药杂志*, 2012,37(17):2635-2638.  
[ 6 ] Craig L A, Hong N S, McDonald R J. Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2011, 35(6):1397-1409.  
[ 7 ] 高琳娜,唐千淇,贺晓丽,等. 淫羊藿苷对快速老化小鼠 SAMP10 学习记忆能力以及胆碱能系统活性的影响[J]. *中国中药杂志*, 2012,37(14):2117-221.  
[ 8 ] 费洪新,周忠光,姜波,等. 补阳还五汤对阿尔茨海默病小鼠学习记忆及海马  $\beta$  淀粉样前体蛋白的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014,20(20):125-128.  
[ 9 ] Zhang W, Hao J, Liu R, et al. Soluble A  $\beta$  levels correlate with cognitive deficits in the 12-month-old APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Behav Brain Res*, 2011,222(2):342-350.  
[ 10 ] Li F, Gong Q H, Wu Q, et al. Icariin isolated from *Epimedium brevicornum* Maxim attenuates learning and memory deficits induced by dgalactose in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2010,96(3):301-305.  
[ 11 ] 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.

[责任编辑 聂淑琴]