

补阴益智汤配方颗粒对东莨菪碱所致小鼠 学习记忆损伤的保护作用

白鑫宇¹, 刘萍¹, 杨帆², 付宇斌¹, 姜爽³, 宋伍^{3*}

(1. 遵义医学院, 基础药理教育部重点实验室暨特色民族药教育部国际合作联合实验室, 贵州 遵义 563006; 2. 深圳华润三九医药贸易有限公司, 广东 深圳 518110; 3. 长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] **目的:**考察给予东莨菪碱造模后,补阴益智汤配方颗粒对小鼠学习记忆损伤的保护作用,并通过神经递质和突触可塑性相关蛋白考察其可能的机制。**方法:**雄性昆明种小鼠50只,通过腹腔注射东莨菪碱($3.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)建立小鼠学习记忆损伤模型。随机分为正常组、模型组和补阴益智汤高、中、低($18, 6, 2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),造模后,连续给药2周,通过小鼠跳台实验, Morris水迷宫实验和新物体辨别实验,考察小鼠学习记忆的能力。采用高效液相色谱法测定小鼠前额叶皮层和海马内氨基酸类神经递质的水平,通过蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测小鼠海马区内突触核蛋白(Syn),突触后密度蛋白-95(PSD-95)和脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白的表达。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠跳台实验、水迷宫实验潜伏期显著缩短($P < 0.01$),触电次数显著增加($P < 0.01$),对新物体的探索时间显著缩短($P < 0.01$),海马及前额叶皮层内 γ -氨基丁酸(GABA)含量增多,而谷氨酸(Glu)含量均显著降低($P < 0.01$),海马内Syn, PSD-95和BDNF蛋白表达量均明显增多($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,中、高剂量给药组潜伏期明显延长($P < 0.05, P < 0.01$),其中高剂量组触电次数明显减少($P < 0.05$);对新物体的探索时间显著延长($P < 0.01$),GABA含量明显降低($P < 0.05, P < 0.01$),Glu含量以及Syn, PSD-95和BDNF蛋白表达量明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**补阴益智汤配方颗粒可以改善东莨菪碱所致的小鼠学习记忆损伤,其机制可能与改变海马及前额叶皮层内Glu/GABA以及调节小鼠海马脑区内Syn和PSD-95蛋白的表达有关。

[关键词] 补阴益智汤; 东莨菪碱; 学习记忆损伤; 行为学; 神经递质; 突触可塑性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)12-0138-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017120138

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170324.1417.034.html>

[网络出版时间] 2017-03-24 14:17

Effect of Buyin Yizhi Decoction on Learning and Memory Disorder Induced by Scopolamine in Mice

BAI Xin-yu¹, LIU Ping¹, YANG Fan², FU Yu-bin¹, JIANG Shuang³, SONG Wu^{3*}

(1. Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education and Joint International Research Laboratory of Ethnomedicine of Education, Zunyi Medical University, Zunyi 563006, China; 2. Shenzhen Huarun Sanjiu Pharmaceutical Trade Co. Ltd., Shenzhen 518110, China; 3. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Buyin Yizhi decoction on learning and memory disorder induced by scopolamine, and investigate its possible mechanism through neurotransmitter and synaptic plasticity related proteins. **Method:** The learning and memory disorder models were established by intraperitoneal injection of

[收稿日期] 20161227(012)

[基金项目] 遵义医学院2016博士启动课题(F-814);遵义市临床药学重点实验室经费项目[省市科合(2015)53号]

[第一作者] 白鑫宇, 硕士, 助理实验师, 从事抗炎免疫药理学研究, Tel:18300916113, E-mail:bxyspu@163.com

[通讯作者] *宋伍, 博士, 讲师, 从事神经药理研究, Tel:18626619519, E-mail:five841110@126.com

scopolamine ($3.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) in 50 male Kunming mice. Then these mice were randomly divided into normal blank group, model group and Buyin Yizhi decoction high dose group ($18 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), middle dose group ($6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low dose group ($2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The treatment lasted for 2 weeks after modeling. Step-down test, Morris water maze test and novel object test were used to explore the ability of learning and memory in mice. Meanwhile, the amino acid neurotransmitter levels in prefrontal cortex and hippocampus of the mice were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The expression levels of Synemby (Syn), PSD-95 and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus were determined by Western blot. **Result:** As compared with the normal blank group, the latency in step-down test and Morris water maze test was shortened significantly in model group ($P < 0.01$); the electric shocks number was increased ($P < 0.01$); and the exploration time of new object was shortened ($P < 0.01$); at the same time, the contents of gamma-aminobutyric acid (GABA) was increased while the contents of glutamic acid (Glu) were reduced ($P < 0.01$) in hippocampus and prefrontal cortex; and the expression levels of Syn, PSD-95 and BDNF protein were reduced in hippocampus. As compared to the model group, the latency was significantly prolonged in middle and high dose groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the number of electric shocks in the high dose group was decreased significantly ($P < 0.05$), and the exploration time of new objects was significantly prolonged ($P < 0.05$); GABA content was significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while Glu content and the expression levels of Syn, PSD-95 and BDNF protein were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** These findings suggest that Buyin Yizhi decoction could improve the learning and memory disorder induced by scopolamine and the underlying mechanism may be associated with the increased Glu/GABA ratio in hippocampus and prefrontal cortex and the higher expression levels of Syn and PSD-95 in hippocampus.

[Key words] Buyin Yizhi decoction; scopolamine; learning and memory; behavior; neurotransmitter; synaptic plasticity

阿尔兹海默症 (AD) 是一种常见于老年人群的神经退行性疾病, 临床主要表现为记忆功能减退及认知功能障碍等症^[1]。在我国, 人口数量不断增长, 老年人所占比例不断上升, 阿尔兹海默症将成为一种新型常见病。 β 淀粉样蛋白沉积诱导的级联反应是目前比较公认的 AD 发病机制^[2-5]。尽管近些年对阿尔兹海默症的研究不断深入, 但临床缺乏疗效显著, 毒副作用少的抗 AD 药物, 因此开发新的用于改善学习记忆和认知功能的药物十分重要。

中草药用于改善学习记忆和认知功能具有天然、多效、低毒等特点。中医有关 AD 症状的论述散见于“善忘”、“呆病”等证中。历代医家对其病因病机的论述很多, 总体可归纳为虚实两端, 以本虚标实为其根本。虚证主要包括肾精亏虚和气血衰少; 实证主要包括瘀血痹阻和痰湿蒙闭, 其中以肾虚为本、痰凝血瘀为标。传统二至丸是由女贞子和旱莲草共同组成, 具有补肝益肾, 滋阴养血的功效, 已在临床广泛应用。现代药理学研究结果显示二至丸由蒸女贞子、墨旱莲 2 味中药等量组成, 是滋阴补肾方剂, 其毒副作用小, 被广泛应用于临床, 近年来也发现其

还具有抗衰老作用^[6]。参考前期研究成果, 在传统二至丸中加味, 栀子、黄芩和甘草 5 味中药组方而成, 其中, 栀子泻火除烦、清热利尿、凉血解毒; 黄芩清热燥湿、泻火解毒; 甘草益气补中、泻火解毒、调和诸药^[7], 以上 5 药合用, 能够补肾填精、清热益智治其本, 益气化痰、活血祛瘀, 具有抗炎、益智、延缓衰老等作用, 取名为补阴益智汤。

虽有研究证明二至丸对 D-半乳糖致衰老模型大鼠在 Morris 水迷宫实验中学习记忆有一定的保护作用, 其机制可能与降低衰老大鼠脑组织一氧化氮 (NO) 含量和一氧化氮合酶 (NOS) 活性有关^[8]。另外, 有研究表明, 海马区内突触核蛋白 (Syn), 突触后密度蛋白-95 (PSD-95) 和脑源性神经营养因子 (BDNF) 蛋白参与调节东莨菪碱导致的学习记忆损伤, 同时, 氨基酸类递质 γ -氨基丁酸 (GABA) 含量和谷氨酸 (Glu) 含量的变化在学习记忆系统中也具有重要的作用^[9-11], 但二至丸对这些指标还未有报道。因此, 本研究在前人的基础上, 本研究采用东莨菪碱小鼠模型, 考察补阴益智汤配方颗粒对小鼠学习记忆能力和认知功能的影响, 并通过相关神经递质变化, 突触蛋白等研究其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性昆明种小鼠 50 只, SPF 级, 体重 18 ~ 22 g。饲养于 SPF 级实验室, 室内环境温度控制在 25 ± 2 °C, 相对湿度为 40% ~ 70%, 光照时间为 12 h 明暗交替。实验期间动物自由摄食饮水。动物合格证号 SCXK(渝)2012-2015。本研究获得遵义医学院实验动物伦理委员会批准, 所有实验研究均符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

1.2 药物及试剂 补阴益智汤配方颗粒: 旱莲草(批号 1507001W) 20 g, 女贞子(批号 1510003Y) 20 g, 栀子(批号 1508001S) 10 g, 黄芩(批号 1506001W) 10 g, 甘草(批号 1506001S) 5 g, 全部药物均由华润三九医药股份有限公司生产。给药前, 将一剂补阴益智汤配方颗粒加入 32.5 mL 煮沸的蒸馏水溶解, 配制成 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液, 置于 4 °C 保存备用。东莨菪碱(美国 Sigma 公司, 批号 4A96820); Syn 抗体(美国 Bio Vision 公司, 批号 6008-100); PSD-95 抗体(英国 Abcam 公司, 批号 ab2723); BDNF 抗体 H-117(美国 Santa Cruz 公司, 批号 sc-20981); BCA 检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司, 批号 P0010S); DS-PAGE 凝胶试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 批号 WB-0201)。

1.3 仪器 LM-MJ0015 型小鼠跳台及 LM-WM0010 型水迷宫系统(长沙斯泰林生物科技有限公司), XR-XX17 型新物体识别系统(上海欣软信息科技有限公司)。

2 方法

2.1 实验分组及给药方法 将昆明种小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只。分别为补阴益智汤高、中、低剂量组($18, 6, 2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 模型组和正常组。给药组小鼠按剂量每日灌胃给予补阴益智汤配方颗粒, 正常组及模型组小鼠给予相同体积的空白溶剂, 每天 1 次, 连续给药 2 周。

2.2 东莨菪碱学习记忆损伤模型小鼠的建立^[12] 补阴益智汤高、中、低剂量组和模型组小鼠, 分别于行为学实验开始前 30 min 内腹腔注射东莨菪碱 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 正常组小鼠分别于行为学开始前 30 min 腹腔注射相同体积的空白溶剂。行为学实验期间每日腹腔注射东莨菪碱或空白溶剂, 直至行为学实验结束。

2.3 跳台实验 小鼠腹腔注射东莨菪碱或空白溶剂造模 30 min 后, 进行跳台实验训练。先将小鼠放入跳台箱中适应环境 5 min, 适应期间不通电, 随后将小鼠放在安全平台上, 并接通 36 V 交流电, 如果

小鼠跳下平台, 受到电击后跳回平台为正确反应。小鼠训练 5 min。24 h 后再次进行检测, 直接将小鼠放在安全平台上并接通电源, 记录小鼠第一次跳下平台时间即为潜伏期, 并记录小鼠跳下平台触电次数。如小鼠 5 min 内未跳下平台, 潜伏期按 300 s 计算。

2.4 水迷宫实验 实验前在水池壁上贴上形状不同的图画, 作为小鼠寻找平台的参照物, 整个实验期间其位置保持不变。水温控制在 (21 ± 1) °C, 在水中加入墨汁将水搅浑以免让动物看清水下平台。获得性训练: 按东西南北将水池分为 4 个象限, 平台置于其中任意一个象限区的中央, 且始终保持位置不变。将小鼠头朝池壁放入水中, 放入位置随机取, 4 个起点的任意 1 点。小鼠找到隐藏平台的时间即为隐藏平台潜伏期。每次训练的上限时间为 60 s, 若小鼠在规定时间内无法找到隐藏平台则潜伏期记录为 60 s, 引导其上平台并在平台上停留 10 s, 将动物移开、擦干, 放回笼内。每只动物每天训练 3 次, 2 次训练之间间隔 15 ~ 20 min, 连续训练 5 d。探查训练: 最后 1 次获得性训练结束后的第 2 天, 将平台撤除, 开始 60 s 的探查训练。将动物由原先平台象限的对侧放入水中。记录动物在穿越原平台的次数, 以此作为空间记忆的检测指标。

2.5 新物体辨别实验 新物体识别实验在一个旷场实验装置($25 \text{ cm} \times 25 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$)中进行, 有 A, B, C 3 个物体, 其中 A, B 物体完全一样, C 物体与 A, B 物体完全不同, 所有物体均足够重以防止小鼠推动。测试环境在隔音、避光的场所。在测试盒上方以 60 W 白光灯照射使盒内无阴影处。测试主要分适应期、训练期和检测期。第 1 天为适应期: 将鼠放入测试盒的中间, 盒内未放任何物体, 自行适应性活动 5 min。第 2 天为训练期: 在测试盒内放入 2 个相同的玩具(A, B), 距离两侧壁 8 cm, 将小鼠背朝物体, 从盒中距物体等距离处放入, 熟悉 10 min。记录小鼠与这 2 个物体的探索情况。第 3 天为识别检测期: 用玩具 C 体替换其中一个物体 B 放入盒内(A, C), 位置不变, 将小鼠背朝物体, 从盒中距物体等距离处放入, 观察 10 min。记录小鼠与这 2 个物体的探索情况。以小鼠鼻子或嘴巴触及物体的次数和距离物体 2 cm 范围内探究的时间为探索情况, 前爪搭在物体上、嗅、舔、咬等均属于探究物体, 但爬上物体或攀越物体均不算对物体的探索。

2.6 HPLC 检测小鼠脑区氨基酸类神经递质的含量 行为学实验结束后, 小鼠断头取脑, 将脑组织置于冰上, 快速分离前额叶皮层和海马, 称质量。取部

分组织样本按照 1 g: 9 mL 比例加入甲醇/水(体积比 1:1),匀浆,4 ℃离心 10 min,取上清液。上清液内加入等体积的乙腈,4 ℃离心 10 min,取上清液,加入等体积的碳酸氢钠溶液(0.5 mol·L⁻¹)及一半体积的 DNFB(0.5%),震荡混匀后于 65 ℃条件下水浴 55 min。滤膜过滤后备用。进样量为 10 μL,流速为 1.0 mL·min⁻¹,检测波长:激发光波长 λ_{ex} = 340 nm,发射光波长 λ_{em} = 450 nm,分别检测前额叶皮层和海马内 GABA 和 Glu 含量。

2.7 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 Syn, PSD-95, BDNF 蛋白表达 将分离的海马组织,用预冷的生理盐水冲洗后,加入含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液(1:9)匀浆裂解。4 ℃离心后,分离上清液,将提取的蛋白分装后于 -20 ℃保存。采用 BCA 检测试剂盒对蛋白浓度进行测定。根据待测蛋白分子质量选择十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶电泳分离蛋白,转膜至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭后,加入 Syn(1:500 稀释),PSD-95(1:1 000 稀释)或 BDNF(1:1 000 稀释)一抗,4 ℃孵育过夜,加二抗(1:1 000 稀释)室温下孵育 2 h,显影拍照。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 数据分析软件对数据进行统计学分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对东莨菪碱所致学习记忆损伤小鼠跳台实验潜伏期的影响 模型组小鼠在检测期跳下平台潜伏期与正常组比较显著缩短($P < 0.01$),触电次数显著增加($P < 0.01$)。给药低剂量组小鼠潜伏期和触

电次数与模型组比较均无明显差异;给药中剂量组小鼠潜伏期与模型组比较明显延长($P < 0.05$),但触电次数与模型组比较无明显差异;给药高剂量组小鼠潜伏期与对照组比较明显延长($P < 0.05$),且触电次数明显减少($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 补阴益智汤对东莨菪碱所致学习记忆损伤小鼠跳台实验潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Buyin Yizhi decoction on latency and electric shocks number of dementia mice in step-down test induced by scopolamine($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	潜伏期/s	触电次数/次
正常	-	221.34 ± 43.11	0.48 ± 0.81
模型	-	75.15 ± 23.62 ²⁾	4.32 ± 1.33 ²⁾
补阴益智汤	2	134.27 ± 43.81	4.13 ± 0.60
	6	163.33 ± 37.53 ³⁾	3.97 ± 0.82
	18	189.13 ± 66.06 ³⁾	2.16 ± 1.01 ³⁾

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 2~5 同)。

3.2 对东莨菪碱所致学习记忆损伤小鼠水迷宫实验潜伏期及跨平台次数的影响 与正常组比较,模型组小鼠训练第 1,3,5 天找到平台的潜伏期均显著延长($P < 0.01$)。各给药组小鼠训练第 1 天潜伏期与模型组小鼠均无明显差异;各给药组剂量依赖性缩短寻找平台的时间,且第 5 天相对于第 1 天寻找时间的差距也明显增高($P < 0.05$)。与正常组比较,模型组小鼠跨越平台数显著增加($P < 0.01$)。给药低剂量组小鼠跨越平台数与模型组比较无明显差异;给药中、高剂量组小鼠跨越平台数与模型组比较均明显减少($P < 0.05, P < 0.01$),且随着剂量增加减少约明显。见表 2。

表 2 补阴益智汤对东莨菪碱所致学习记忆损伤小鼠水迷宫实验潜伏期及跨平台数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Buyin Yizhi decoction on escaping latency and platform crossings of dementia mice in Morris water maze test induced by scopolamine($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	潜伏期/s			跨越平台数/次
		第 1 天	第 3 天	第 5 天	
正常	-	56.26 ± 3.71	41.11 ± 6.10	34.41 ± 4.97	2.15 ± 0.41
模型	-	134.81 ± 11.47 ²⁾	112.03 ± 10.36 ²⁾	99.04 ± 7.71 ²⁾	6.44 ± 0.31 ²⁾
补阴益智汤	2	133.13 ± 10.32	94.07 ± 9.53	67.24 ± 5.10 ³⁾	5.25 ± 0.14
	6	137.04 ± 9.44	73.19 ± 8.42 ³⁾	51.19 ± 4.02 ⁴⁾	4.91 ± 0.40 ³⁾
	18	131.57 ± 11.13	49.35 ± 5.21 ⁴⁾	44.08 ± 4.82 ⁴⁾	3.10 ± 0.51 ⁴⁾

3.3 对东莨菪碱所致学习记忆损伤小鼠新物体辨别记忆改变的影响 模型组小鼠对新物体的探索时间与正常组比较显著缩短($P < 0.01$)。给药低剂量组小鼠对新物体的探索时间与模型组比较无明显差异;给药中、高剂量组小鼠对新物体的探索时间与模

型组小鼠比较均显著延长($P < 0.01$)。见表 3。

3.4 对东莨菪碱所致学习记忆损伤小鼠脑内氨基酸类神经递质含量的影响 模型组小鼠海马及前额叶皮层内 GABA 含量均明显高于正常组,而 Glu 含量均显著低于正常组($P < 0.01$);给药中剂量组

表 3 补阴益智汤对东莨菪碱所致学习记忆损伤小鼠新物体探索时间改变的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

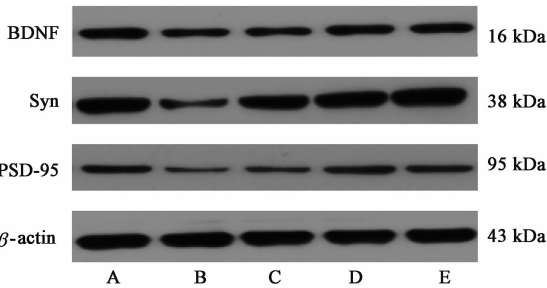
Table 3 Effect of Buyin Yizhi decoction on novel object discovery time of dementia mice in novel object test induced by scopolamine ($\bar{x} \pm s, n = 10$) %

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	训练期	检测期
正常	-	44.71 ± 4.83	71.52 ± 6.23
模型	-	45.55 ± 5.45	44.34 ± 4.65 ²⁾
补阴益智汤	2	44.62 ± 4.30	53.07 ± 3.71
	6	47.31 ± 6.08	71.22 ± 7.10 ⁴⁾
	18	41.04 ± 3.71	69.17 ± 5.53 ⁴⁾

表 4 补阴益智汤对东莨菪碱所致学习记忆损伤小鼠脑区氨基酸类神经递质含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Buyin Yizhi decoction on GABA and Glu levels in different encephalic region of dementia mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$) $\mu g \cdot g^{-1}$

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	GABA		Glu	
		海马	前额叶皮层	海马	前额叶皮层
正常	-	13.51 ± 1.87	4.25 ± 0.43	15.71 ± 1.41	2.48 ± 0.76
模型	-	19.83 ± 2.21 ²⁾	9.33 ± 1.63 ²⁾	9.75 ± 0.91 ²⁾	1.63 ± 0.31 ²⁾
补阴益智汤	2	20.74 ± 3.70	9.06 ± 0.86	11.02 ± 1.19	1.96 ± 0.41
	6	16.70 ± 2.05 ³⁾	6.71 ± 0.90 ³⁾	9.92 ± 1.22 ³⁾	2.45 ± 0.60 ³⁾
	18	14.92 ± 3.62 ⁴⁾	5.14 ± 1.12 ⁴⁾	14.71 ± 1.50 ⁴⁾	2.37 ± 0.52 ⁴⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 补阴益智汤 2 $g \cdot kg^{-1}$ 组; D. 补阴益智汤 6 $g \cdot kg^{-1}$ 组; E. 补阴益智汤 18 $g \cdot kg^{-1}$ 组

图 1 BDNF, Syn 及 PSD-95 蛋白在小鼠海马脑区的表达

Fig. 1 Protein expression of BDNF, Syn and PSD-95 in hippocampus of dementia mice

表 5 补阴益智汤对东莨菪碱所致学习记忆损伤小鼠海马脑区 BDNF, Syn 及 PSD-95 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of Buyin Yizhi decoction on protein expression of BDNF, Syn and PSD-95 in hippocampus of dementia mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$) %

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	BDNF	Syn	PSD-95
正常	-	100.0	100.0	100.0
模型	-	76.5 ± 15.6 ¹⁾	31.7 ± 14.0 ²⁾	45.7 ± 13.9 ²⁾
补阴益智汤	2	78.0 ± 11.5	69.8 ± 12.0 ⁴⁾	59.6 ± 8.8
	6	87.4 ± 9.4	87.6 ± 7.8 ⁴⁾	87.4 ± 7.2 ⁴⁾
	18	101.6 ± 17.8 ³⁾	91.9 ± 11.6 ⁴⁾	87.3 ± 5.2 ⁴⁾

因此本研究没有设置阳性药组,在今后的研究中应继续寻找机制相近,疗效明确的阳性药,进一步优化

和给药高剂量组小鼠海马及前额叶皮层内 GABA 含量均明显低于模型组 ($P < 0.05, P < 0.01$), 而 Glu 含量无明显变化, Glu/GABA 逐渐升高。见表 4。

3.5 对东莨菪碱所致学习记忆损伤小鼠海马内 BDNF, Syn, PSD-95 表达的影响 结果显示模型组小鼠海马内 BDNF, Syn 和 PSD-95 蛋白表达量均明显低于正常组 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 给药低、中、高剂量组小鼠海马内 BDNF, Syn 和 PSD-95 蛋白表达量均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1, 表 5。

4 讨论

东莨菪碱是中枢胆碱受体拮抗剂, 可以阻断大脑内乙酰胆碱受体, 引起胆碱能神经系统功能失调, 导致学习记忆功能障碍^[11]。有研究表明, 东莨菪碱 3 $mg \cdot kg^{-1}$ 腹腔注射能明显降低小鼠学习和认知能力, 因此本研究采用东莨菪碱腹腔注射 3 $mg \cdot kg^{-1}$ 的方法, 建立小鼠学习记忆障碍模型^[12]。此方法操作简单且动物死亡率低, 重复性较好。在其他药物对东莨菪碱导致小鼠学习记忆损伤的研究中, 对于阳性药的选择没有一致的标准, 在多奈哌齐、加兰他敏、石杉碱甲、秋水仙碱、吡拉西坦等选择中^[9, 13-15], 没有找到与本研究同类的明确可以治疗的阳性药,

实验设计。

本研究采用跳台实验, 水迷宫实验和新物体识

别实验 3 种行为学模型作为补阴益智汤配方颗粒对东莨菪碱导致的小鼠学习记忆损伤模型的治疗作用的行为学指标。跳台实验属于一次性刺激回避反应实验,反应动物经过一次刺激后记忆获得的情况;水迷宫实验是通过小鼠在水箱内游泳并找到隐藏在水中平台的方法来检测小鼠对水迷宫学习和记忆的获取能力;新物体识别实验是一种精细、敏感的行为学检测方法,通过记录小鼠对物体的探索时间,检测小鼠的非空间记忆能力。行为学实验结果表明,补阴益智汤配方颗粒可以明显增强小鼠对触电行为和在水迷宫内平台位置的记忆能力,并且明显改善小鼠对新物体的识别记忆能力,表明补阴益智汤配方颗粒对小鼠的学习记忆能力有显著改善作用。

有研究发现,在一定的浓度范围内,Glu 的释放量与学习记忆能力呈正相关,而 GABA 的释放量与学习记忆能力呈负相关^[16]。Glu/GABA 升高也可以明显改善学习记忆功能,但比值过高也会对学习记忆能力产生抑制作用^[17]。本研究考察补阴益智汤配方颗粒对学习记忆损伤模型小鼠海马及前额叶皮层内 GABA 和 Glu 的含量,结果显示补阴益智汤可以明显降低小鼠海马及前额叶皮层内 GABA 含量并且增加 Glu 含量,由此可以看出补阴益智汤改善学习记忆功能的机制可能与调节海马及前额叶皮层内 Glu 和 GABA 的含量有关。

海马区是与学习记忆密切相关的重要脑区,而海马内神经元损伤也是造成学习记忆功能障碍的主要原因。BDNF 为脑源性神经营养因子,有研究表明,BDNF 在神经元的生存和发展中起着重要作用,是促进学习记忆功能的重要蛋白^[18]。突触传递是神经元信号的重要手段,突触的生化 and 形态持久变化的能力称为突触可塑性,突触可塑性被认为是学习记忆的基础^[19]。Syn 为突触前膜的标记蛋白,参与神经递质释放、维持轴突生长等功能,其表达量通常认为与轴突密度有关^[20];PSD-95 是突触后膜的标记蛋白,是一种突触后致密物的组成蛋白,起着维持树突稳定的重要作用^[21]。研究发现阿尔兹海默症模型小鼠学习记忆能力下降可能与海马突触后致密物 BDNF, Syn, PSD-95 的表达减少有关^[22-23]。结果显示补阴益智汤可以明显改善东莨菪碱造成的小鼠海马 Syn, PSD-95 蛋白表达的降低,因此说明补阴益智汤改善学习记忆功的机制还与调节海马内 Syn, PSD-95 蛋白的表达有关。

[参考文献]

[1] Lord A. An amyloid-beta protofibril-selective antibody

prevents amyloid formation in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 36(3): 425-434.

[2] Hüll M, Berger M, Heneka M. Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease: how far have we come? [J]. *Drugs*, 2006, 66(16): 2075-2093.

[3] 黄毅,佟晓光. 中国人口老龄化现状分析[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(21): 4853-4855.

[4] Vander L M. The myth of Alzheimer disease [J]. *Rev Med Suisse*, 2013, 9(371): 244-245.

[5] Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, et al. Oxidative stress and oxidative DNA damage is characteristic for mixed Alzheimer disease/vascular dementia [J]. *J Neurol Sci*, 2008, 266(1): 57-62.

[6] 张喆,高长玉,韩伟丽,等. 二至丸对 D-半乳糖诱导衰老模型大鼠血清 POD 活性、LPO 含量影响的实验研究[J]. *中医药学报*, 2013, 41(6): 79-81.

[7] 蔡秀江,黄美艳,丁安伟,等. 二至丸考源及药理作用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(23): 272-275.

[8] 赵雪莹,张喆,韩伟丽,等. 二至丸对 D-半乳糖致衰老模型大鼠行为学与脑组织 NO 含量及 NOS 活性的影响[J]. *中医药导报*, 2015, 21(19): 16-18.

[9] 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.

[10] 孔宏,宋倩,王玉其,等. 枳菊解郁汤对抑郁模型小鼠学习记忆能力及海马和前脑皮层 BDNF 表达的影响[J]. *曲阜师范大学学报:自然科学版*, 2010, 36(2): 113-117.

[11] Doguc D K, Delibas N, Vural H, et al. Effects of chronic scopolamine administration on spatial working memory and hippocampal receptors related to learning [J]. *Behav Pharmacol*, 2012, 23(8): 762-770.

[12] 高莉,彭晓明,张富春,等. 不同剂量东莨菪碱对小鼠学习记忆功能的影响[J]. *医药导报*, 2013, 32(5): 573-576.

[13] 尹若熙,李刚,俞腾飞,等. 肉苁蓉多糖对东莨菪碱所致学习记忆障碍模型小鼠在突触可塑性方面的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(6): 801-807.

[14] 周世月,邓之荣,谭琳,等. 五味子酚对东莨菪碱诱导的痴呆小鼠学习记忆损伤的保护作用[J]. *中国药理学杂志*, 2014, 49(23): 2088-2091.

[15] 李军,辛勤,林丽文. 绿茶多酚对东莨菪碱及 D-乳糖所致小鼠学习记忆障碍的影响[J]. *济宁医学院学报*, 2014, 37(5): 316-319.

[16] 张夏微,张丹参,薛贵平,等. 雌二醇对去卵巢大鼠学习记忆能力及脑内氨基酸水平的影响[J]. *河北北*

方学院学报:医学版, 2011, 1(5): 8-13.

- [17] 董晓华,张丹参,孟宪勇. Glu/GABA 水平相关性对学习记忆的影响[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(2): 283-285.
- [18] Shinoda Y, Sadakata T, Nakao K, et al. Calcium-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) promotes BDNF secretion and is critical for the development of GABAergic interneuron network [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(1): 373-378.
- [19] Richter J D, Klann E. Making synaptic plasticity and memory last: mechanisms of translational regulation [J]. Genes Dev, 2009, 23(1): 1-11.
- [20] Fornasiero E F. Synapsins contribute to the dynamic spatial organization of synaptic vesicles in an activity-dependent manner [J]. J Neurosci, 2012, 32(35): 12214-12227.
- [21] Ehrlich I, Klein M, Rumpel S, et al. PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(10): 4176-4181.
- [22] Huerta P T, Volpe B T. Transcranial magnetic stimulation, synaptic plasticity and network oscillations [J]. J Neuroeng Rehabil, 2009, 6(2): 1-10.
- [23] YAO W D. Identification of PSD-95 as a regulator of dopamine-mediated synaptic and behavioral plasticity [J]. Neuron, 2004, 41(4): 625-638.

[责任编辑 周冰冰]