

当归-红芪超滤膜提取物对老龄大鼠记忆功能和神经递质的影响

刘萍萍¹, 李应东^{1,2}, 周倩倩¹, 孙少伯¹, 刘凯^{1,2*}

(1. 甘肃中医学院, 兰州 730000; 2. 甘肃中医学院附属医院, 兰州 730020)

[摘要] **目的:**探讨不同相对分子质量当归-红芪(当归:红芪 1:5)超滤膜提取物对老龄大鼠记忆功能和神经递质的影响。**方法:**本实验选 3 月龄 Wistar 大鼠 12 只作为青年对照组(A 组), 24 月龄 Wistar 大鼠 48 只随机分为老年空白对照组(B 组)、当归-红芪超滤膜提取物相对分子质量 5 万 Da(C 组)、相对分子质量 10 万 Da(D 组)、20 万 Da 组(E 组), 用药组分别给予相对分子质量为 5 万 Da($1.87 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、10 万 Da($2.14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、20 万 Da($2.47 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)的当归-红芪超滤膜提取物, 其余 2 组给予同体积生理盐水, 连续灌胃 70 d, 观察各组大鼠学习记忆功能, 显微镜下海马, 大脑皮质组织形态改变, 检测脑组织中神经递质乙酰胆碱(Ach), 单胺类神经递质 5 羟色胺(5-HT), 多巴胺(DA), 去甲肾上腺素(NE)含量。**结果:**老年组大鼠与青年组大鼠相比学习能力下降; 海马, 大脑皮质组织形态改变存在差异, 神经递质 Ach, DA, NE, 5-HT 含量显著降低($P < 0.05$); 与衰老组大鼠相比, 当归红芪超滤膜提取物组大鼠脑组织中 Ach, DA, NE, 5-HT 含量增高, 有显著差异($P < 0.05$); 与 10 万 Da 相对分子质量组相比, 5 万 Da, 20 万 Da 相对分子质量组大鼠脑组织神经递质含量的影响不及 10 万 Da 相对分子质量组明显($P < 0.05$)。**结论:**当归红芪超滤膜提取物可以通过提高神经递质 Ach, DA, NE, 5-HT 含量来改善老龄大鼠记忆功能, 尤以 10 万 Da 相对分子质量组为优。

[关键词] 当归红芪超滤物; 记忆功能; 神经递质

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0189-04

[doi] 10.11653/syfy2013240189

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131012.0922.004.html>

[网络出版时间] 2013-10-12 9:22

Effects of Ultra-filtration Extract from Angelica Sinensis Radix and Hedysari Radix on the Old Rats' Memory Function and Brain Neurotransmitters

LIU Ping-ping¹, LI Ying-dong^{1,2}, ZHOU Qian-qian¹, SUN Shao-bo¹, LIU Kai^{1,2*}

(1. Gansu College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Lanzhou 730000, China;

2. Affiliated Hospital of Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** In order to investigate the effect of ultra-filtration extract from Angelica Sinensis Radix and Hedysari Radix (Angelica Sinensis Radix:Hedysari Radix 1:5) on the memory ability and brain neurotransmitters in old rats. **Method:** 12 healthy male Wistar rats with 3-months old were selected for the youth control group (A), and 48 natural aging male Wistar rats with 24-months old were selected and randomly divided into four groups: the old control group (B), 5×10^4 Da molecular of UFE-AH group (C), 1×10^5 Da molecular of UFE-AH group (D), and 2×10^5 Da molecular of UFE-AH group (E); Group A, B were given normal saline ($7 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and Group C, D, E were respectively given with 5×10^4 Da ($1.87 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 1×10^5

[收稿日期] 20130724(009)

[基金项目] 国家教育部“春晖计划”(Z2004-1-62042)

[第一作者] 刘萍萍, 在读硕士研究生, 从事中西医结合心脑血管疾病的基础与临床研究, Tel:13919119661, E-mail:liupp81@163.com

[通讯作者] *刘凯, 副主任医师, 副教授, 从事脑血管疾病的中西医治疗及甘肃道地药材开发研究, Tel:13669380195, E-mail:xubo_1@163.com

($2.14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), $2 \times 10^5 \text{ Da}$ ($2.47 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) molecular of UFE-AH by gavage. After 10 weeks, the learning and memory ability were measured, and heir brain tissue was observed (hippocampus and cortex) by microscope, the contents of the central neurotransmitter acetylcholine (Ach), the monoamine neurotransmitter 5-hydroxytryptamine (5-HT), dopamine (DA), and norepinephrine (NE) were tested in the brains. **Result:** The learning and memory ability in group B were lower than that of group A, and the contents of Ach, 5-HT, DA, and NE in the brain tissue also decreased; Compared with group B, the contents of Ach, 5-HT, DA, and NE group C, D and E increased, and the increase extent in group D was more significant than that in group C and E. **Conclusion:** Ultra-filtration extract from *Angelica Sinensis Radix* and *Hedysari Radix Polybotrys* can improve the learning and memory ability of old age rats, which may be related to the increase of the Ach, 5-HT, DA, and NE in the brain tissue, and the effect of $1 \times 10^5 \text{ Da}$ molecular weight group is better than others molecular weight group.

[Key words] ultra-filtration extract from *Angelica Sinensis Radix* and *Hedysari Radix*; memory ability; brain neurotransmitters

学习记忆是大脑的高级功能,是一个受多种因素影响的复杂生理生化过程^[1],其中脑内神经递质作为信息传递的载体,在维持神经冲动的正常传递和学习记忆等脑功能方面具有重要作用^[2]。正常情况下,脑内神经递质分泌稳定,相互之间比例协调,维持大脑功能稳定;机体在衰老过程中,大脑皮层出现萎缩,神经兴奋性下降、脑内神经递质合成减少甚至丧失,包括与学习记忆功能密切相关的一些神经递质如乙酰胆碱(Ach),单胺类神经递质五羟色胺(5-HT),多巴胺(DA),去甲肾上腺素(NE)含量下降^[3],致使平衡被打破,出现代谢紊乱,严重影响大脑学习记忆功能。本实验观察不同相对分子量当归红芪超滤膜提取物对自然衰老大鼠学习记忆的改善作用,并探讨其可能机制,筛选出药物干涉的最佳分子量范围。

1 材料

1.1 中药材 当归(*Angelicae Sinensis Radix*)、红芪(*Hedysarum polybotrys* Hand. -Mazz)购自甘肃岷县药材站,经甘肃中医学院药学院生药教研室李成一教授鉴定为正品。

1.2 动物 选用 3,24 月龄的雄性 Wistar 大鼠,实验动物来源于甘肃中医学院医学实验中心,SPF 级动物合格证号 SCXK(甘)2011-0001。

1.3 试剂和仪器 5-HT 试剂盒、DA 试剂盒、NE 试剂盒、Ach 试剂盒(RD 公司,批号 E11070605)。BP211D 型电子天平(瑞士 Sartorius 公司),UV-2401PC 型紫外-可见分光光度仪(日本岛津),美国亚培全自动酶标分析仪,Morris 水迷宫实验系统,BI2000 图像分析系统(成都泰盟公司)。

2 方法

2.1 药物制备 甘肃省膜科学技术研究所和甘肃

中医学院中西医结合研究所联合制备,当归-红芪以 1:5 的比例混合后经煎煮,粗滤,浓缩,微滤,超滤(5,10,20 万 Da 相对分子质量截留)制成不同相对分子质量超滤膜提取物,经浓缩,干燥包装备用。

2.2 分组及给药 Wistar 大鼠,SPF 级,雄性,3 月龄 12 只,体重(160.8 ± 9.3) g,作为青年对照组(A 组);24 月龄 48 只,体重(461.6 ± 36.8) g,随机分为老年空白对照组(B 组)、当归红芪超滤膜提取物 5 万 Da(C 组)、10 万 Da(D 组)、20 万 Da 组(E 组)。每组 12 只,各组大鼠在相同条件下适应性喂养 7 d 后,开始进行实验。C,D,E 组分别给予相对分子质量 5 万 Da($1.87 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),10 万 Da($2.14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),20 万 Da($2.47 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)的当归红芪超滤膜提取物,(药物剂量以生药 $19.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 为准,每 1 克生药可提取当归红芪超滤物提取物相对分子质量 5 万 Da 为 0.096 g,相对分子质量 10 万 Da 为 0.111 g,相对分子质量 20 万 Da 为 0.127 g),A,B 组均给予同体积生理盐水 $7 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,每天灌胃 1 次,连续 70 d。

2.3 指标检测

2.3.1 大鼠学习记忆功能检测(水迷宫实验) 70 d 以后开始行 Morris 水迷宫实验,实验分为定向航行实验和空间探索实验。先对大鼠进行 3 d 训练,第 4 天开始定向航行试验,记录第 4,5 天大鼠的逃避潜伏期,并取其平均值作为大鼠学习能力的检测指标。第 6 天行空间探索实验,记录大鼠穿越平台次数来作为判断大鼠记忆能力的指标。

2.3.2 光学显微镜下组织形态学观察 冰上快速取脑,去小脑和延髓,分离大鼠左侧颞叶大脑皮质和左侧海马,福尔马林溶液固定,不同浓度乙醇逐级脱水,二甲苯溶液,石蜡中浸泡后包埋,切片,然后脱

蜡,Harris 苏木素染色、脱水、透明、封固、晾干,光学显微镜下观察组织形态。

2.3.3 神经递质 Ach, DA, NE, 5-HT 含量测定 剩余脑组织去除右侧大脑皮质称重,用 4 ℃ 生理盐水制备成 10% 的组织匀浆,3 000 r·min⁻¹,离心 10 min,取上清液,按试剂盒说明,用酶联免疫法测脑组织 Ach, DA, NE, 5-HT 的含量。

2.4 统计学处理 数据分析采用 SPSS 13.0 软件进行统计处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

表 1 当归红芪超滤膜提取物对自然衰老大鼠学习记忆功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	相对分子质量/Da	药物剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	逃避潜伏期/s	穿越平台数/次
青年对照	-	-	29.5 ± 14.0 ^{2,3)}	10.0 ± 2.7 ³⁾
老年对照	-	-	85.5 ± 11.0 ^{1,3)}	2.9 ± 1.7 ^{1,3)}
当归-红芪超滤膜提取物	5 × 10 ⁴	1.865	73.6 ± 21.4 ^{1,3)}	3.8 ± 2.4 ^{1,3)}
	1 × 10 ⁵	2.137	43.3 ± 23.8 ^{1,2)}	6.6 ± 1.7 ^{1,2)}
	2 × 10 ⁵	2.467	53.0 ± 14.0 ^{1,2)}	4.3 ± 1.5 ^{1,3)}

注:与青年对照组相比¹⁾ $P < 0.05$;与老年对照组相比²⁾ $P < 0.05$;与当归-红芪超滤膜提取物 1 × 10⁵ Da 相对分子质量 2.137 g·kg⁻¹·d⁻¹ 组相比³⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 光学显微镜下组织形态学观察 在光学显微镜下青年组大鼠大脑皮质和海马区神经细胞丰富,层次清晰;衰老组大鼠大脑皮质和海马区神经细胞层次不清楚,排列稀疏、杂乱,脱失明显;当归红芪超滤膜提取物组大鼠大脑皮质和海马区神经细胞层次欠清楚,与青年组相比有部分细胞脱失;如图 1 所示。

3.3 神经递质 Ach, DA, NE, 5-HT 中枢胆碱能递质 Ach 含量 与 A 组比较,B 组大鼠脑组织 Ach 含量明显减少($P < 0.01$);与 B 组相比,用药 D, E 组 Ach 含量明显增加($P < 0.05$);与 D 组相比,用药 C 组大鼠脑组织 Ach 含量明显减少($P < 0.05$)。

单胺类神经递质-DA, NE, 5-HT 含量 与 A 组比较,B 组大鼠脑组织 NE, DA 及 5-HT 含量明显减少($P < 0.05$);与 B 组相比,用药 C, D, E 组,大鼠脑组织 NE, DA 含量增加($P < 0.05$);D 组大鼠脑组织 5-HT 含量增加($P < 0.05$);与 D 组相比,用药 C, E 组大鼠脑组织 NE, DA 及 5-HT 含量减少,有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

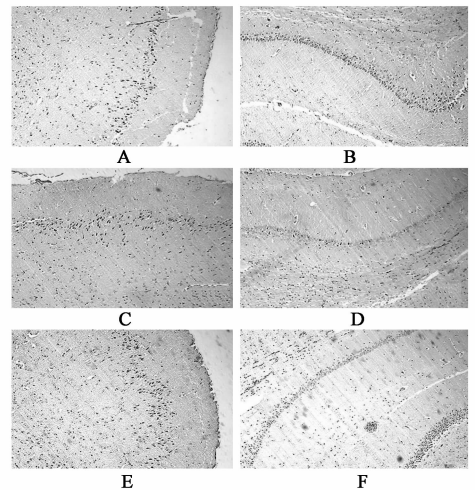
由此可见,当归-红芪超滤膜提取物可明显提高衰老大鼠脑组织神经递质含量,以相对分子质量 10 万 Da 效果最为显著。

4 讨论

中医学认为气和血是构成人体和维持人体生命

3 结果

3.1 水迷宫实验测试 与 A 组相比,B, C, D, E 组潜伏期延长,平台搜索次数明显增加,有显著统计学意义($P < 0.05$),说明在衰老大鼠的学习记忆功能是下降的。与 B 组比较,用药 D, E 组大鼠潜伏期缩短,穿越平台次数均增加,说明用药组衰老大鼠学习记忆功能的下降是有明显改善;与 D 组相比,用药 C, E 组潜伏期延长,平台搜索次数明显增加,有显著统计学意义($P < 0.05$),说明 D 组改善衰老大鼠学习记忆功能的下降最优。见表 1。



A, B. 青年对照组; C, D. 老年对照组;
E, F. 当归-红芪超滤膜提取物相对分子质量 10 × 10⁵ Da
2.137 g·kg⁻¹·d⁻¹ 组

图 1 当归红芪超滤膜提取物对自然衰老大鼠大脑皮质(A, C, E)和海马区组织(B, D, F)形态的影响(Harris 苏木素染色, × 100)

活动的基本物质,衰老是脏腑气血功能的衰退。本研究取方益气养血名方当归补血汤,以甘肃道地药材红芪代用黄芪,采用超滤技术截留组方中不同相对分子质量范围的有效组分,研究其抗衰老的作用及机制。

增龄性的学习记忆能力下降是衰老的重要表现

表 2 当归-红芪超滤膜提取物对自然衰老大鼠脑组织 Ach, NE, DA 及 5-HT 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	相对分子 质量/Da	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	Ach/nmol·g ⁻¹	NE/pg·g ⁻¹	DA/pg·g ⁻¹	5-HT/ng·g ⁻¹
青年对照	-	-	375.98 ± 89.18 ^{2,3)}	227.78 ± 97.27 ²⁾	154.68 ± 16.99 ^{2,3)}	101.35 ± 3.65 ^{2,3)}
老年对照	-	-	176.40 ± 64.64 ^{1,3)}	82.69 ± 37.05 ^{1,3)}	49.89 ± 22.73 ^{1,3)}	42.53 ± 8.52 ^{1,3)}
当归-红芪超滤膜提取物	5 × 10 ⁴	1.87	200.68 ± 63.15 ^{1,3)}	133.12 ± 45.11 ^{1,2,3)}	78.32 ± 19.30 ^{1,2,3)}	47.62 ± 7.58 ^{1,3)}
	1 × 10 ⁵	2.14	263.39 ± 87.29 ^{1,2)}	205.01 ± 76.50 ²⁾	105.76 ± 31.80 ^{1,2)}	62.51 ± 10.90 ²⁾
	2 × 10 ⁵	2.47	236.48 ± 60.01 ^{1,2)}	147.67 ± 61.43 ^{1,2)}	79.82 ± 52.47 ^{1,2,3)}	49.62 ± 5.87 ^{1,3)}

之一^[4],而中枢神经系统被认为是机体学习记忆的中枢,现代研究证实海马^[5]和大脑皮层^[6]与学习记忆密切相关,其功能完整是学习记忆的基础,二者功能的完整除其结构的完整,各种神经递质的参与及其质和量的正常更是不可缺少^[7]。脑内 Ach 是目前发现的与学习记忆关系最为密切的一种神经递质,单胺类神经递质(如 NE, DA, 5-HT 等)对注意力、记忆力和反应有着重要的调节作用,它们在学习记忆行为中起着极其重要的调节作用,其含量的减少可以造成学习记忆功能减退^[8]。因此,提高脑组织中神经递质含量可以作为有效改善机体学习记忆功能的一条重要途径。

本研究实验结果显示相对分子质量 5, 10, 20 万 Da 范围当归-红芪超滤膜提取物能够改善衰老大鼠学习记忆能力,能够提高脑组织中神经递质 Ach, DA, NE, 5-HT 含量,且以相对分子质量 10 万 Da 作用尤为显著。研究提示当归补血汤通过益气补血可以改善衰老所致的记忆力和学习能力下降而具有益智作用,机制与提高衰老大鼠脑组织中胆碱能、单胺类神经递质含量相关。本课题组前期研究显示当归-红芪超滤膜提取物有效成分在 10 万 Da 相对分子质量范围内具有清除自由基,抗氧化作用,通过抗自由基而延缓脑组织衰老,从而改善衰老过程中出现的记忆力下降^[9-10]。多次研究结果提示当归-红芪超滤膜提取物改善衰老过程中出现的记忆力下降不是通过一个靶点调控实现的,而是多靶点共同作用的结果,多靶点作用间的相互影响及其作用机制与方式尚有待进一步探讨。

[参考文献]

[1] 张黎,李娜,王春华,等. 甲醛对小鼠记忆力及脑组织神经递质水平的影响[J]. 吉林大学学报:医学版, 2011,37(6):1102.

[2] 马迪,彭瑞云,高亚兵,等. 微波辐射对大鼠学习记忆与海马组织中神经递质的影响研究[J]. 军事医学, 2011,35(2):104.

[3] 周文丽,张建鹏,冯伟华,等. 脑衰老机制与脑疾病的关系[J]. 生命的化学,2008,28(4):435.

[4] 王虎清. 衰老过程中神经系统的作用[J]. 国外医学:老年医学分册,2008,29(2):53.

[5] 石海燕,李莹,史佳琳,等. 地黄寡糖对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马乙酰胆碱的影响[J]. 中药药理与临床,2008,24(2):27.

[6] 白黎明,张晓双,武苗. 等. 地黄饮子对慢性脑低灌注大鼠学习记忆及海马 AChE, ChAT 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):207.

[7] 崔越,周敏,周静文,等. 海马神经元钙离子通道的研究进展[J]. 中国老年学杂志,2012,32(3):643.

[8] 隋洪玉,赵晓莲,齐淑芳,等. 蒲公英对衰老模型小鼠脑组织单胺氧化酶及单胺类神经递质含量的影响[J]. 中成药,2007,29(8):1223.

[9] Li Yingdong, MA Yanhua, ZHAO Jianxiong. et al. Protection of ultrag-filtration decoction extract from danggui buxue decoction on oxidative damage in cardiomyocytes of neonatal rats and its mechanism [J] Chin J Integr Med, 2011,17(11):854.

[10] 李应东,王博雯,周倩倩,等. 当归红芪超滤物对自然衰老大鼠抗氧化作用机制的研究[J]. 时珍国医国药,2012,23(6):1439.

[责任编辑 聂淑琴]