

桃仁提取物对痴呆小鼠空间学习记忆和抗疲劳作用的影响

金慧玲¹, 张红英^{2*}

(1. 延吉市中医医院医生办公室, 吉林 延吉 133000;

2. 延边大学医学院机能学实验中心, 吉林 延吉 133002)

[摘要] 目的: 研究桃仁乙醇提取物对三氯化铝(AlCl_3)致痴呆小鼠空间学习记忆和抗疲劳的作用及机制。方法: 采用 AlCl_3 ($200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig, 40 d) 以复制痴呆小鼠模型。以 Morris 水迷宫、疲劳仪, 观察桃仁乙醇提取物 ($2.8, 1.4, 0.7 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig, 40 d) 对小鼠空间学习记忆和抗疲劳的作用, 测定脑组织丙二醛(MDA)含量和乙酰胆碱酯酶(AchE)活性。结果: 桃仁乙醇提取物 ($2.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 使 1 min 站台穿越次数明显增加; 并提高痴呆小鼠的抗疲劳能力, 桃仁乙醇提取物使痴呆小鼠脑组织 MDA 含量和 AchE 活性明显降低。结论: 桃仁乙醇提取物对痴呆小鼠空间学习记忆有明显的改善作用和抗疲劳能力, 其机制可能与降低 MDA 含量和 AchE 活性有关。

[关键词] 桃仁乙醇提取物; 学习记忆; 痴呆; 丙二醛; 乙酰胆碱酯酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0285-04

[doi] 10.11653/syjf2013160285

Effects of Extract from Persicae Semen Spatial Learning Memory and Anti-fatigue in Dementia Mice

JIN Hui-ling¹, ZHANG Hong-ying^{2*}

[收稿日期] 20121212(010)

[第一作者] 金慧玲, 硕士, 主治医师, 从事中医内科学, Tel: 15567630925, E-mail: ihlxh02102006@163.com

[通讯作者] * 张红英, 高级实验师, 从事心脑血管药理学研究, Tel: 0433-13843366516, E-mail: zhang-hongying52@163.com

较好, 在碱性环境中吸收较差, 预示着此药在胃中吸收较少, 在肠道环境中将会有较多的吸收。

[参考文献]

- [1] 刘静涵, 王洪诚, 高耀良. 中国乌头之研究 XVI. 关白附子中的新生物碱[J]. 中草药, 1981, 12(3): 1.
- [2] 张陆勇, 季惠芳, 常晓时, 等. 关附甲素与 I 类抗心律失常药对豚鼠乳头肌动作电位的作用比较[J]. 中国药科大学学报, 1994, 25(1): 49.
- [3] 后德辉, 邬利娅, 徐为人, 等. 关附庚素与关附甲素及关附壬素抗心律失常的比较[J]. 中国药科大学学报, 1987, 18(4): 268.
- [4] 刘静涵, 侯德辉, 王秋娟, 等. 抗心律失常药盐酸关附甲素的研究[J]. 中国科技奖励, 2008, 3: 57.
- [5] A Ji-Ye, Wang G J, Sun J G, et al. Identification of guanfu base A hydrochloride phase I and phase II metabolites in rat bile by liquid chromatography mass spectrometry [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(11): 1045.

- [6] A J Y, Wang G J, Sun J G, et al. Identification of phase I and phase II metabolites of Guanfu base A hydrochloride in human urine [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2003, 28(4): 265.
- [7] A J Y, Wang G J, Liu X Q, et al. Study on the metabolites of guanfu base A hydrochloride in rat urine by high performance liquid chromatograph-mass spectrum [J]. Acta Pharm Sin, 2002, 37(4): 283.
- [8] 李晓天, 王广基, 王素军. 盐酸关附甲素代谢产物关附壬素的药代动力学研究[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(3): 366.
- [9] LI X T, Wang G J, WANG S J, Pharmacokinetics of guanfu base I, a metabolite of guanfu base A, in rats [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 28(8): 1363.
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72(7): 248.

[责任编辑] 聂淑琴

(1. Doctor's Office of Yanji Traditional Chinese Medicine Hospital, Yanji 133000, China;
2. Yanbian University Unctional Laboratory Center, Yanji 133002, China)

[Abstract] Objective: To Study effect of ethanol extract from Persicae Semen on spatial learning memory and anti-fatigue in dementia mice induced by $AlCl_3$. **Method:** The mouse dementia model was induced by $AlCl_3$ ($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, ig, 40 d). Morris water maze test and the fatigue instrument were used to observe effect of ethanol extract malondialdehyde (MDA) contents and a cetylcholinesterase (AChE) activity in brain tissue were measured. **Result:** The ethanol extract from Persicae Semen ($2.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) could significantly increase traversing times in 1 min platform. It can could improve anti-fatigue effect, and decrease MDA contents and AChE activity in brain tissue. **Conclusion:** The ethanol extract from Persicae Semen has improvement effect and anti-fatigue effect on spatial learning memory and anti-fatigue in dementia mice. Its mechanism maybe related to MDA contents and AChE activity.

[Key words] ethanol extract from Persicae Semen; learning memory; dementia; MDA; AChE

学习、思维和记忆是大脑的高级功能,是构成智能的主要要素。增强学习、思维学习、思维和记忆的作用称为益智作用。人到老年,由于细胞衰老,器官功能减退,常会反映到许多方面,其中以大脑的老化最为突出,表现为注意力降低,学习能力下降,记忆减退,感觉迟钝等。治疗中,祖国医学许多主补心肾,兼补肝肾,具有补益作用的中药或方剂均明确记载着有益智或填髓补脑等作用。桃属于李属 Prunus、桃亚属 Amygdalus 蔷薇科植物。中国是桃亚属植物的起源中心,有着丰富的资源^[1-2]。桃仁为桃和山桃的种仁,味甘、苦,性平,具有活血化瘀、润肠通便、改善血液循环、抗过敏、镇痛止咳、抗炎、保肝等功效^[3-4]。桃仁虽有很好的医疗和保健作用,但目前其产品研发力度不够,对桃仁成分的研究甚少。关于桃仁乙醇提取物对 $AlCl_3$ 致痴呆小鼠空间学习记忆的作用,在国内外尚无文献报道。本研究采用 ig 给小鼠 $AlCl_3$ 的方法复制痴呆模型,探讨桃仁乙醇提取物对痴呆小鼠空间学习记忆和抗疲劳作用的影响,同时测定痴呆小鼠脑组织乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性和丙二醛 (MDA) 含量,为进一步开发应用桃仁提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 桃仁购置延边大学附属医院中药局,经延边大学药学院生药教研室刘永镇教授鉴定为山东产家用桃仁 (Persicae Semen)。 $AlCl_3$ 分析纯 (天津市化学试剂三厂,批号 20055026)、无水乙醇 (北京化工厂,批号 20060816)、MDA、AChE、蛋白定量试剂盒 (南京建成生物工程研究所,批号 20091012, 20091018)。

1.2 仪器 Morris 水迷宫 (上海吉量科技有限公

司), YLS-4C 型转棒疲劳仪 (安徽淮北正华生物仪器有限公司), VIS-723 型可见分光光度仪、GB-204 型电子秤 (上海精密科学仪器有限公司), TDL-40B 型离心机 (上海安亭科学仪器厂), HH-501 超级恒温水浴箱 (金坛市恒丰仪器厂), RE-52 型旋转式蒸发仪 (上海青浦沪西仪器厂), 202 型恒温干燥箱 (金坛市恒丰仪器厂)。

1.3 动物 昆明种小鼠 50 只, 雄性, 体质量 ($24\sim 26$) g, 由延边大学医学部实验动物科提供 (动物合格证号 10-1022), 许可证号为 SCXK (吉) 2003-0005。实验室室温 $18\sim 22\text{ }^\circ\text{C}$, 小鼠分笼喂养, 自由饮水和进食, 按时通风。

2 方法

2.1 桃仁提取物的制备 取桃仁 600 g 粉碎用 95% 乙醇在水浴中回流提取 2 次, 各用 10 倍量与 8 倍量乙醇提取 2 h 和 1 h 后过滤, 用旋转蒸发仪和水浴处理为浸膏 (批号 20075026), 临用前配成所需浓度。

2.2 实验分组 取昆明种雄性小鼠 50 只, 在实验室适应 2 d, 按体质量分层随机分为正常组, 模型组, 桃仁乙醇提取物高、中、低剂量 ($2.8, 1.4, 0.7\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组, 每组 10 只。

2.3 造模与给药 $AlCl_3$ 致痴呆小鼠模型的制备, 造模参照文献方法^[5-6]略加改进。每日上午造模, 正常组 ig 给等体积生理盐水, 模型组和桃仁乙醇提取物组 ig 给 $AlCl_3$ ($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 进行造模。每日 1 次连续造模 40 d。造模同时开始给药, 每日下午, 正常组和模型组 ig 给等体积生理盐水, 药物组 ig 给桃仁乙醇提取物。每日 1 次连续 ig 给药 40 d。

2.4 Morris 水迷宫行为测试实验^[5-6] Morris 水迷

宫为一直径 120 cm,高 50 cm 的圆柱形水池,其内部被分为 4 个大小相等的象限,在其中的一个象限中央放置一直径为 9.5 cm 透明玻璃平台,此平台位置一旦被确定将在整个行为学测试中保持不变,将平台没于水下 1 cm。试验过程中控制水温在 (22 ± 2) °C。

2.4.1 定位航行实验^[7] 第 37~40 天训练,开始进行定位航行实验,连续测试 4 d。每日分上、下午时间段,上午为 8:00~10:00,下午为 13:00~15:00,每个时间段内每组小鼠平均连续训练 2 次,其时间间隔不短于 10 min。训练时将小鼠在南(s)点面向池壁放入水中,记录小鼠在 60 s 内搜索到站台并停留 10 s,则此时的时间为逃避潜伏期,若小鼠在 60 s 内未搜索到站台,训练时将其引至站台并停留 10 s,潜伏期记录为 60 s。

2.4.2 空间搜索实验^[7] 定位航行试验结束后,间隔 1 d。第 42 天游泳实验时选择 SW 象限中心作为入水点,将小鼠面向池壁放入水中,检测小鼠寻找站台时的潜伏期,间隔 10 min 后撤除站台,进行空间搜索实验。将站台撤除后,同样选择 SW 象限中心作为入水点,将小鼠面向池壁轻轻放入水中,观察并记录 60 s 内小鼠穿越原站台位置的次数(即 1 min 站台穿越次数)。

2.5 抗疲劳动物的筛选 将疲劳仪设置为 $20 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,然后筛选小鼠,将小鼠轻轻置于疲劳仪各个通道上,取 1 min 内不下来的小鼠作为实验小鼠。分组造模与给药同 2.2,2.3。

2.6 抗疲劳实验 痴呆小鼠末次给药 1 h 后,将疲劳仪设置为 $20 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,轻轻将小鼠置于各通道上,先进行训练 1 次 2 min。次日进行正式实验,将疲劳仪设置为 $20 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,轻轻将小鼠置于各通道上开始计时,直到小鼠掉下为止。而小鼠能够在通道所保

持的时间,即为疲劳存活时间,观察记录各组动物的抗疲劳存活时间。

2.7 检测指标

2.7.1 一般情况 观察小鼠的饮食、饮水、活动情况、体质量(每周称重)、毛发光泽度等。

2.7.2 脑组织匀浆液的制备 实验结束后,小鼠称重,脱颈椎处死,迅速分离取出小鼠全脑组织,用滤纸吸干,准确称重脑组织,按 1:9 的比例加入冷生理盐水,冰浴研磨,并用生理盐水制成 10% 组织匀浆液, $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液于 $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下待测。

2.7.3 脑组织 AchE 活性和 MDA 含量的测定 所有操作按着试剂盒说明书进行。采用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,蛋白定量采用考马斯亮蓝法,最后测定各管吸光度,计算出 AchE 活性和 MDA 含量。

2.8 统计学处理 数据均采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 AlCl_3 致痴呆小鼠空间学习记忆和抗疲劳作用的影响(Morris 水迷宫法) 与正常组相比,模型组小鼠 Morris 水迷宫 1 min 站台穿越次数明显减少 ($P < 0.01$),与模型组相比,桃仁乙醇提取物 ($2.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组在 Morris 水迷宫实验中 1 min 站台穿越次数增加 ($P < 0.01$)。

抗疲劳实验:结果表明,正常组小鼠抗疲劳存活明显延长,与正常组相比,模型组小鼠抗疲劳存活时间明显缩短 ($P < 0.01$),与模型组相比,桃仁乙醇提取物 ($2.8, 1.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 小鼠抗疲劳存活时间明显延长 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 桃仁乙醇提取物对 AlCl_3 致痴呆小鼠空间学习记忆和抗疲劳作用的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	Morris 水迷宫		
			潜伏期/s	1 min 站台穿越数/次	抗疲劳存活时间/min
正常	-	15	43.81 ± 19.80	1.40 ± 1.30 ²⁾	18.41 ± 8.19 ²⁾
模型	-	15	36.51 ± 15.52	0.46 ± 0.52	2.33 ± 2.08
桃仁乙醇提取物	2.8	13	38.78 ± 10.37	1.15 ± 2.21 ²⁾	10.20 ± 7.13 ²⁾
	1.4	13	44.57 ± 9.87	0.93 ± 0.29	9.22 ± 5.24 ²⁾
	0.7	13	43.52 ± 9.37	0.85 ± 0.99	4.21 ± 3.20

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对 AlCl_3 致痴呆小鼠脑组织 MDA 含量和 AchE 活性的影响 与正常组相比,模型组小鼠脑组织 MDA 含量和 AchE 活性明显上升 ($P < 0.05$, $P <$

0.01),与模型组相比,桃仁乙醇提取物小鼠脑组织 MDA 含量和 AchE 活性明显降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 桃仁乙醇提取物对 AlCl₃ 致痴呆小鼠
脑组织 MDA 含量和 AchE 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹	AchE /nmol·mg ⁻¹
正常	-	1.79 ± 1.00 ¹⁾	1.02 ± 0.24 ²⁾
模型	-	2.40 ± 0.24	2.08 ± 0.99
桃仁乙醇提取物	2.8	0.84 ± 0.20 ²⁾	0.81 ± 0.17 ²⁾
	1.4	0.83 ± 0.19 ²⁾	0.92 ± 0.20 ²⁾
	0.7	0.85 ± 0.20 ²⁾	0.80 ± 0.21 ²⁾

4 讨论

实验采用 ig 给 AlCl₃ 以复制痴呆小鼠模型,观察桃仁乙醇提取物对痴呆小鼠空间学习记忆和抗疲劳的影响。结果,桃仁乙醇提取物能改善痴呆小鼠空间学习记忆的作用;桃仁乙醇提取物可提高痴呆小鼠抗疲劳能力,同时又能明显抑制小鼠脑组织 AchE 活性,降低脑组织 MDA 含量。

铝是自然界广泛存在的一种元素,但是它还是一种慢性神经毒物。近年来研究表明过量摄入铝可导致人体神经、骨骼及血液等多方面的损伤以及动物学习记忆能力进行性下降。它还可增强脑组织中的脂质过氧化水平,对神经产生毒性作用,从而影响学习记忆功能。因此以慢性铝中毒的方法建立老年痴呆模型是比较理想的模型。

结果表明,在 Morris 水迷宫实验中,桃仁乙醇提取物能显著降低 AlCl₃ 所致记忆障碍,桃仁乙醇提取物(2.8 g·kg⁻¹)使 1 min 站台穿越次数明显增加,说明,具有改善痴呆小鼠空间学习记忆的作用。在抗疲劳实验中,桃仁乙醇提取物(2.8,1.4 g·kg⁻¹)使小鼠抗疲劳时间明显延长,说明,具有抗疲劳的作用。

氧自由基的变化与痴呆程度密切相关,体内过多的自由基可与细胞膜中游离或结合状态的不饱和脂肪酸发生有害的过氧化反应,其主要产物之一 MDA 可破坏细胞膜,使细胞致死^[8-11],脂质过氧化产物 MDA 的含量间接反映了脂质过氧化的程度。结果,模型组小鼠脑组织 MDA 含量高于正常组和药物组,桃仁乙醇提取物可使小鼠脑组织 MDA 含量明显降低。表明,可能通过减轻脂质过氧化反应达到抗氧化作用,直接或间接清除 AlCl₃ 引起的自由基产生增多造成的损害、避免抗氧化性物质消耗导致的脑组织损伤。

参与和影响学习记忆功能的神经系统是多系统的,其中最为重要的是中枢胆碱能系统,ACh 是中枢胆碱能通路的重要神经递质。当海马与大脑皮质

细胞减少时,脑内的乙酰胆碱水平下降,学习记忆能力下降^[12],AchE 是乙酰胆碱的水解酶,也可作为乙酰胆碱活性的标志。通过测试 AchE 可以反映神经元的受损情况。因此通过抑制 AchE 活性,有利于改善痴呆症状。结果,模型组小鼠脑组织 AchE 活性高于正常组和药物组,桃仁乙醇提取物使小鼠脑组织 AchE 活性明显降低,从而相对提高脑内 Ach 的含量。

综上所述,桃仁乙醇提取物具有改善痴呆小鼠空间学习记忆和抗疲劳作用,其机制可能与改善中枢胆碱能神经系统功能,降低脑组织中 MDA 含量和 AchE 活性有关。

[参考文献]

[1] 过国南,王力荣,阎振立,等.利用花粉粒形态分析法研究桃种质资源的进化关系[J].果树学报,2006,23(5):664.

[2] 王富荣,赵剑波,佟兆国,等.桃种质资源亲缘关系的研究[J].植物遗传资源学报,2006,7(1):118.

[3] 修春,李铭源,宓穗卿,等.桃仁的主要化学成分及药理研究进展[J].中国药房,2007,18(24):1903.

[4] 李时珍.本草纲目.下册[M].2版.北京:人民卫生出版社,2005:1742.

[5] 徐叔云,卞如谦,陈修.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2003,828.

[6] 王丹,张红英,兰艳.远志水提取物对小鼠学习记忆及血液学指标的影响[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(5):188.

[7] 金英子,张红英,孙晓宇.马齿苋不同提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠空间学习能力的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(12):178.

[8] 杨斌.复方地黄对老年痴呆动物模型学习记忆能力的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(3):195.

[9] 郭晓峰,冯玉华,赵延龙.大黄虫丸、当归补血汤对 D-半乳糖致衰小鼠肝组织中的 SOD 活性和 MDA 含量的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(3):197.

[10] 江涝,方永奇,邹衍衍.β-细辛醚对痴呆小鼠学习记忆能力及 SOD、GSH-Px 和 MDA 水平的影响[J].中国老年学杂志,2007,27(12):1126.

[11] 张良和,张红英,孙晓宇.马齿苋乙醇提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):229.

[12] 肖雁,吴昌学,黄勇,等.脑通复方制剂对血管性痴呆大鼠学习记忆及胆碱酯酶活性的影响[J].中国医院药学杂志,2010,30(8):627.

[责任编辑 聂淑琴]