

半夏总生物碱对 *D*-半乳糖所致衰老小鼠 学习记忆障碍的改善作用

唐瑛^{1*}, 雷呈祥¹, 段凯², 王晓昆³, 杨李³, 朱以良³

(1. 海军医学研究所, 上海 200433; 2. 湖北中医药大学, 武汉 430070;
3. 广州军区武汉总医院, 武汉 430070)

[摘要] **目的:**研究半夏总生物碱(TAPT)对 *D*-半乳糖诱导的衰老小鼠学习记忆的影响并初步探讨其作用机制。**方法:**昆明种小鼠 100 只,随机分为 5 组,即正常对照组,模型组,TAPT 低、中、高剂量组(7.5, 15, 30 mg·kg⁻¹),每组 20 只。模型组和 TAPT 组给予 120 mg·kg⁻¹的 *D*-半乳糖注射液(sc, 每天 1 次,连续 8 周),建立学习记忆障碍的衰老小鼠模型,对照组给予等量生理盐水;同时,TAPT 各组给予对应浓度的 TAPT 药液(ig, 每天 1 次,连续 8 周),对照组及模型组给予等量蒸馏水。采用跳台法和 Y 迷宫评价法测试 TAPT 对模型小鼠学习记忆障碍的改善作用,采用比色法测定小鼠脑组织中丙二醛(MDA)的含量,超氧化物歧化酶(SOD)和乙酰胆碱酯酶(AChE)的活性。**结果:**TAPT 低、中、高剂量组小鼠 Y 迷宫训练时达标所需总次数减少,分别为(21.9 ± 2.9), (20.8 ± 3.2), (19.7 ± 2.8)次;Y 迷宫记忆测试时错误次数也明显减少,分别为(3.8 ± 1.4), (3.2 ± 1.7), (1.7 ± 1.1)次;模型组小鼠脑组织 SOD 活性明显降低(28.98 ± 13.08) U·mg⁻¹, MDA 及 AChE 含量明显增加(2.78 ± 0.21) nmol·mg⁻¹, (1.05 ± 0.16) U·mg⁻¹;经 TAPT 干预后,各剂量组小鼠脑组织中 SOD 活性增高($P < 0.01$), MDA 含量明显降低($P < 0.01$);中、高剂量组 AChE 含量显著减少($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论:**应用 TAPT 干预 *D*-半乳糖诱导的衰老小鼠,可明显改善其学习和记忆功能,这可能与具有抗氧化作用及抑制 AChE 的活性有关。

[关键词] 半夏总生物碱; *D*-半乳糖; 衰老小鼠; 学习记忆

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0224-04

Effects of Total Alkaloids from *Pinellia ternate* on Learning and Memory in Aging Mice Induced by *D*-Galactose

TANG Ying^{1*}, LEI Cheng-xiang¹, DUAN Kai², WANG Xiao-kun³, YANG Li³, ZHU Yi-liang³

(1. Navy Medical Research Institute, Shanghai 200433, China;

2. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430070, China;

3. Wuhan General Hospital, Guangzhou Command, PLA, Wuhan 430070, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of total alkaloids from *Pinellia ternate* (TAPT) on learning and memory ability in aging mice induced by *D*-galactose and its preliminary mechanism. **Method:** One hundred mice were randomly assigned into control group, model group, TAPT low, middle and high dose group (7.5, 15, 30 mg·kg⁻¹), 20 mice in each group. The TAPT and the model groups were given 120 mg·kg⁻¹ *D*-galactose (sc, for 8 weeks) to induce aging-mouse model, and the control group was given the same volume of saline water; meanwhile, the TAPT groups were given appropriate liquid (ig, for 8 weeks), while the control and the model groups were given the same volume of distilled water. The step-down test and the Y-maze test were adopted to reflect the learning and memory of mice; and the colorimetric method was used to determine the cellular content of malondialdehyde (MDA), the enzyme activity of superoxide dismutase (SOD) and acetylcholinesterase (AChE). **Result:** Compared to the model group, the TAPT treatment brought mice to shorten the time to reach the final in the Y-maze training at (21.9 ± 2.9), (20.8 ± 3.2), (19.7 ± 2.8) times respectively, and also reduce the

[收稿日期] 20120219(002)

[通讯作者] *唐瑛, 研究员, 医学硕士, 从事中药药理研究, Tel: 021-81883052, E-mail: maotou01@163.com

mistakes in memory test at (3.8 ± 1.4) , (3.2 ± 1.7) , (1.7 ± 1.1) times respectively. SOD activity in brain tissues of aging model mice reduced evidently at $(28.98 \pm 13.08) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, while MDA and AChE contents increased evidently at $(2.78 \pm 0.21) \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$, $(1.05 \pm 0.16) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, while TAPT treatment could evidently decrease MDA ($P < 0.01$) and AChE contents ($P < 0.01$), and increase SOD activity ($P < 0.01$).

Conclusion: TAPT treatment could help aging model mice induced by D-galactose evidently to enhance their learning and memory, which might be related to its antioxidation and its inhibitory activity to AChE.

[Key words] total alkaloids from *Pinellia ternate* (TAPT); D-galactose; aging mice; learning and memory

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎,其性温,味辛,是一种常用中药,已有上千年的入药史,该药最早收藏于《神农本草经》中。现代药理研究发现,半夏的主要有效成分为生物碱^[1],而生物碱中以1-麻黄碱为主,还有胆碱、鸟苷、胸苷、次黄嘌呤核苷等。半夏总生物碱(total alkaloids from *Pinellia ternate*, TAPT)具有止呕、镇静、镇痛、心律失常、抗炎等作用。近年来有报道发现 TAPT 还具有抑制肿瘤细胞生长^[2]、抗衰老^[3]和抗惊厥^[4]等作用。本文采用皮下注射 D-半乳糖建立学习记忆障碍的衰老小鼠模型,探讨 TAPT 对衰老小鼠学习记忆的改善作用及其可能机制。

1 材料

1.1 药品与试剂 半夏总生物碱(TAPT,纯度 > 87% 购自武汉银河化工有限公司,批号 20110321), D-半乳糖(上海伯奥生物科技有限公司,批号 20101021),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malonaldaldelyde, MDA)及乙酰胆碱酯酶(acetylcholine sterase, AChE)测试试剂盒和蛋白质定量试剂盒(均购自南京建成生物工程研究所,批号 201103)。

1.2 动物 昆明种小鼠 100 只,SPF 级,雄性,体重 $(18 \pm 2) \text{ g}$,购于湖北省医学实验动物中心,动物生产许可证号 SCXK(鄂)2008-005。

1.3 仪器 MG-2 型 Y 迷宫(张家港市生物医学仪器厂),YLS-3T 型跳台记录仪(山东省医学科学院设备站),低温高速离心机(美国 贝克曼),UV8500 紫外分光光度计(上海 天美仪器公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 昆明种小鼠适应性喂养 1 周后,按体重随机分为正常对照组、模型组、及 TAPT 低、中、高剂量组 $(7.5, 15, 30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1})$,每组 20 只。参照文献[5]建立学习记忆障碍的衰老小鼠模型。模型组和 TAPT 组给予 $120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 D-半乳糖注射液(sc,每天 1 次,连续 8 周);对照组颈部给予等

量生理盐水。同时,各给药组分别按实验设计给予 TAPT(ig,每天 1 次,连续 8 周),对照组和模型组给予等量蒸馏水。小鼠饲养于 IVC 笼具中,每笼 5 只,室温 $18 \sim 24 \text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度为 50% ~ 70%,每日 12 h 光照,自由进食及饮水。每周称量体重 1 次。

2.2 Y 迷宫行为学的观察 参照文献[6]。在 MG-2 型 Y 迷宫(规格 $100 \text{ mm} \times 150 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$,分安全区和电击区)内,给予小鼠电击刺激,迫使它逃避并迅速找到安全区,以观察小鼠空间分辨学习和记忆能力。以小鼠受电击后能从起步区直接逃至安全区为正确反应,否则属错误反应。于末次给药 1 h 后开始训练,训练时先将小鼠放入 Y 迷宫中适应 5 min,再将小鼠放入 I 臂起步区,接通 60 V 电流,以灯光信号表示安全区,按安全区方向 I→II→III→I 给予电击连续训练,每训练 1 次让小鼠休息 30 s,给予下 1 次电击,小鼠逃至安全区为正确反应,以小鼠连续 10 次训练中全对或 9 次正确时作为学会空间辨别的标志,记录达标时所需总训练次数,作为学习成绩。24 h 后再次测试,记录 10 次测试中的错误次数作为记忆成绩。

2.3 跳台实验 参照文献[6]。实验装置为被动回避性条件反射箱,用不透明黑色塑料板分隔成 5 个小格,箱底铺以铜栅,间距为 0.5 cm,可以通电作为刺激电极,在每小格($10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$)的右后方放置 1 个高和直径均为 4.5 cm 的绝缘橡胶台,作为小鼠逃避电击的安全台,小白鼠正常反应是跳上跳台以躲避电击,并获得记忆。实验时将 5 只小鼠分别放入反射箱的 5 小格内适应 3 min,然后通入 36 V 交流电,小鼠受到电击逃至安全台上,再从台上下来,以两前足同时接触铜栅遭到电击为错误反应,观察记录 5 min 内小白鼠受电击跳上平台的次数,以此作为学习成绩。24 h 后再次测试,将小白鼠放在平台上,开始通以电流,记录动物从通电后第 1 次跳下平台的时间(潜伏期)和 5 min 内跳下平台的次数(错误次数)以观察其记忆保持情况。

2.4 脑组织生化指标的检测 实验结束时颈动脉放血后,迅速取大脑并称重,按 1:9 (W/V)加入冰生理盐水在低温(4 ℃)冰水浴中制作 10% 脑组织匀浆,离心取上清,用蛋白质定量试剂盒测定蛋白质含量。严格按试剂盒操作方法测定小鼠脑组织中 MDA 含量、SOD 及 AChE 活性。

2.5 统计学处理 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,均数比较采用方差分析及 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 实验期间各组动物均自由饮食,生长状况良好,没有动物意外损伤和死亡,实验开始时和结束时,各组小鼠体重差别均无统计学意义。

3.2 TAPT 对小鼠电迷宫行为学的影响 与正常对照组相比,模型组小鼠 Y 迷宫训练时达标所需总次数和测试时的错误次数均增多,差异有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组比较,TAPT 干预组小鼠 Y 迷宫训练时达标所需总次数减少,差异有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);TAPT 干预组小鼠 Y 迷宫记忆测试时错误次数也明显减少,中、高剂量组与模型组比较均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而低剂量组无统计学意义。见表 1。

表 2 半夏总生物碱对学习记忆障碍小鼠跳台实验的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/mg·kg ⁻¹	训练中错误数/次	记忆中错误数/次	潜伏期/s
正常对照	19	-	2.6 ± 1.1 ¹⁾	1.6 ± 0.8 ²⁾	237.2 ± 38.0 ²⁾
模型	18	-	4.8 ± 1.7	3.9 ± 1.5	140.9 ± 73.5
TAPT	18	7.5	3.0 ± 1.1	2.7 ± 1.1	209.3 ± 46.8
	19	15	2.4 ± 0.8 ²⁾	2.1 ± 1.2 ¹⁾	226.2 ± 68.0
	19	30	2.3 ± 1.2 ²⁾	2.0 ± 1.0 ¹⁾	239.1 ± 56.8 ¹⁾

3.4 TAPT 对小鼠脑组织 MDA 含量、SOD 及 AChE 活性的影响 与正常对照组相比,模型组小鼠脑中 MDA 含量及 AChE 活性增高,SOD 活性明显降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组相比,TAPT 各干预组小鼠脑组织 SOD 活性明显增加,而

表 1 TAPT 对小鼠 Y 迷宫行为学的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量 /mg·kg ⁻¹	学习时达标所需数/次	记忆时错误数/次
正常对照	18	-	18.0 ± 2.9 ²⁾	1.4 ± 1.1 ¹⁾
模型	17	-	27.1 ± 3.7	5.6 ± 2.1
TAPT	18	7.5	21.9 ± 2.9 ¹⁾	3.8 ± 1.4
	19	15	20.8 ± 3.2 ²⁾	3.2 ± 1.7 ¹⁾
	19	30	19.7 ± 2.8 ²⁾	1.7 ± 1.1 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.3 TAPT 对小鼠跳台实验的影响 与正常对照组相比,模型组小鼠跳台实验训练 5 min 内的错误次数明显增多,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);模型组小鼠 24 h 后测试时潜伏期和记忆测试中错误次数均与正常对照组差异明显,有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组相比,TAPT 给药组小鼠跳台实验训练测试和 24 h 后记忆测试错误次数明显较少,统计学分析中、高剂量组有显著性差异 ($P < 0.01$);但低剂量组差异无意义;24 h 后 5 min 记忆测试时的错误次数中、高剂量组与模型组比较差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。TAPT 各给药组小鼠 24 h 后记忆测试时潜伏期较模型组明显增加,但仅高剂量组的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

MDA 含量明显减少,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);TAPT 各干预组均可拮抗 D-半乳糖引起的小鼠脑中 AChE 活性的升高,中、高剂量组差异明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 TAPT 对小鼠脑组织 MDA 含量、AChE 及 SOD 活性影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	AChE/U·mg ⁻¹
正常对照	-	2.07 ± 0.21 ²⁾	80.44 ± 13.16 ²⁾	0.60 ± 0.05 ²⁾
模型	-	2.78 ± 0.21	28.98 ± 13.08	1.05 ± 0.16
TAPT	7.5	2.32 ± 0.16 ²⁾	67.38 ± 15.01 ²⁾	0.95 ± 0.06
	15	2.11 ± 0.26 ²⁾	71.48 ± 10.97 ²⁾	0.89 ± 0.09 ¹⁾
	30	2.09 ± 0.34 ²⁾	73.75 ± 8.74 ²⁾	0.74 ± 0.07 ²⁾

4 讨论

衰老是生物体随着时间的推移所带来的一种自发的必然过程,它是复杂的自然现象,表现为结构和机能衰退,适应性和抵抗力下降^[7]。采用 *D*-半乳糖可诱导较理想的动物衰老模型^[8],这是由于在一定时间内,连续给动物注射 *D*-半乳糖可生成二醛糖及 H_2O_2 ,还可引起蛋白质交联;另外,半乳糖的代谢产物半乳糖醇由于不能被细胞进一步代谢而堆积,从而影响正常渗透压,导致细胞肿胀和功能障碍、代谢紊乱,最终导致衰老的发生。本实验中给小鼠连续 8 d 皮下注射 *D*-半乳糖,测定小鼠脑中 MDA 含量及 AChE 活性增高,SOD 活性明显降低,Y 迷宫实验和跳台实验表明其学习和记忆能力与正常小鼠差异明显,出错率较高,进一步说明用 *D*-半乳糖复制衰老小鼠模型是成功的。

Y-迷宫实验显示,与模型组比较,TAPT 干预后小鼠 Y 迷宫训练时达标所需总次数减少,记忆测试时错误次数也明显减少,中、高剂量组与模型组比较均有统计学意义。跳台实验显示,与模型组相比,中、高剂量 TAPT 给药组小鼠跳台实验训练测试和 24 h 后记忆测试错误次数明显较少,统计学分析组有显著性差异;TAPT 各给药组小鼠 24 h 后记忆测试时潜伏期较模型组明显增加,但仅高剂量组的差异有统计学意义。这说明一定剂量的半夏总生物碱能很好地改善 *D*-半乳糖致衰老小鼠的学习记忆能力。

在正常生理条件下,机体会产生许多自由基及其中间产物,其与抗氧化系统保持着动态平衡关系,但是,随着机体的衰老,这个平衡被打破,以至于活性氧等自由基大量产生^[9]。而作为还原电位较强的强还原剂 TAPT,能消除体内过量自由基,避免生物大分子的损伤。TAPT 干预 *D*-半乳糖致衰老小鼠后,脑组织中自由基中间产物 MDA 的含量显著减少,而抗氧化系统相关酶 SOD 活性升高。另一方面,人衰老的主要表现之一为记忆和认知功能障碍,其大脑皮质、皮质下组织乙酰胆碱(ACh)含量下降明显^[10]。ACh 是进行及维持高级神经系统功能的一种重要介质,与学习记忆功能正相关。AChE 是 ACh 合成的限速酶,可反映该系统的功能状态,因此,国内外广泛使用 AChE 的活性间接反映脑组织内 ACh 水平^[11]。本实验发现,中、高剂量 TAPT 干预组均可抑制 *D*-半乳糖引起的小鼠脑 AChE 活性的升高。

综上所述,应用 TAPT 干预 *D*-半乳糖诱导的衰老小鼠,能明显改善其学习和记忆功能,这可能与其具有抗氧化作用及抑制 AChE 的活性有关。该项研究对进一步开展 TAPT 药理研究,指导其临床应用有重要意义。

[参考文献]

- [1] 张跃进,孟祥海,许玲,等. 不同炮制方法对半夏化学成分含量的影响研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008,14(12):21.
- [2] 陈芳,杨李,王晓昆,等. 半夏生物碱对人肝癌细胞 Bel-7402 增殖的影响[J]. 中国药房, 2011, 22(43):4048.
- [3] 周芳,刁波,段凯,等. 半夏总生物碱对帕金森病大鼠学习记忆功能的影响及其机制的初步探讨[J]. 中国临床神经外科杂志, 2011,16(7):413.
- [4] 张密,李禄金,吕映华,等. 半夏与钩藤生物总碱联合抗惊厥作用及毒性反应的定量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(4):95.
- [5] 朱坤杰,孙建宁. 六味地黄丸对 *D*-半乳糖所致衰老大鼠学习记忆的改善作用及机理[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006,12(8):44.
- [6] 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, 2002:826.
- [7] Blagosklonny M V, Hall M N. Growth and aging: a common molecular mechanism[J]. Aging, 2009, 1(4):357.
- [8] Chen C F, Lang S Y, Zuo P P, et al. Effects of *D*-galactose on the expression of hippocampal peripheral-type benzodiazepine receptor and spatial memory performances in rats[J]. PNEC, 2006,31(7):805.
- [9] Mao P, Reddy P H. Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: implications for early intervention and therapeutics[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1812(11):1359.
- [10] Eggers C, Herholz K, Kalbe E, et al. Cortical acetylcholine esterase activity and ApoE4-genotype in Alzheimer disease[J]. Neurosci Lett, 2006, 408(1):46.
- [11] Askar K A, Kudi A C, Moody A J. Spontaneous reactivation and aging kinetics of acetylcholinesterase inhibited by dichlorvos and diazinon[J]. J Toxicol Sci, 2011, 36(2):237.

[责任编辑 聂淑琴]