

## 远志清脑颗粒对拟痴呆模型小鼠学习记忆的影响及机制探讨

余兴华<sup>1\*</sup>, 李滔<sup>2</sup>, 李长伟<sup>2</sup>

(1. 厦门大学附属中山医院, 福建 厦门 361004; 2. 广东众生药业股份有限公司, 广东 东莞 523325)

**[摘要]** 目的: 观察远志清脑颗粒对拟痴呆模型小鼠学习记忆能力的影响及相关机制。方法: 用 ICR 小鼠, 设空白对照组, 模型对照组, 天保宁 40 mg·kg<sup>-1</sup> 组, 远志清脑颗粒低、中、高剂量组 (375, 750, 1 500 mg·kg<sup>-1</sup>), 采用 ip *D*-半乳糖 (*D*-gal) 合并亚硝酸钠 (NaNO<sub>2</sub>) 造痴呆模型小鼠。给药后通过水迷宫行为学实验测定模型小鼠的学习记忆能力, 病理染色观察皮层和海马神经元的变化, 分光光度法测定其脑组织生化代谢——超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力、丙二醛 (MDA) 含量。结果: 远志清脑颗粒 750 mg·kg<sup>-1</sup> 组小鼠的学习能力和记忆能力与模型组相比显著提高 ( $P < 0.01$ ); 大脑 SOD ( $1.64 \pm 0.26$ ) U·mg<sup>-1</sup> 较模型组 ( $0.88 \pm 0.25$ ) U·mg<sup>-1</sup> 明显升高 ( $P < 0.01$ ); GSH-Px ( $0.297 \pm 0.051$ ) U·mg<sup>-1</sup> 较模型组 ( $0.179 \pm 0.035$ ) U·mg<sup>-1</sup> 升高 ( $P < 0.01$ ); 脑组织 MDA ( $2.71 \pm 0.80$ ) μmol·g<sup>-1</sup> 较模型组 ( $3.72 \pm 0.95$ ) μmol·g<sup>-1</sup> 显著降低 ( $P < 0.01$ )。结论: 远志清脑颗粒明显提高小鼠的学习能力和记忆能力, 并且可明显升高大脑 SOD, GSH-Px 活性, 降低脑组织 MDA 含量, 这可能是其改善学习能力和记忆能力的基础。

**[关键词]** 远志清脑颗粒; 痴呆; 学习记忆能力

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0185-03

## Influences of Yuanzhi Qingnao Keli on Learning and Memory Ability and Biochemical Indexes in Mice with Alzheimer's Disease

YU Xing-hua<sup>1\*</sup>, LI Tao<sup>2</sup>, LI Chang-wei<sup>2</sup>

(1. Xiamen University Affiliated Hospital of Sun Yat-sen, Xiamen 361004, China;

2. Guangdong Zhongsheng Pharmaceutical Co. Ltd, Dongguan 523325, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the influence of Yuanzhi Qingnao Keli (YZQNK) on learning and memory ability and biochemical indexes in dementia model of mouse. **Method:** This research used ICR mice, injected *D*-gal and the nitric acid sodium lead to induce dementia in mice. Treatments were carried out with drugs. The maze was used to evaluate the learn ability of mice. The brain tissue biochemical indexes (SOD GSH-Px and MDA) were determined by spectrophotometry. Pathological dyeing and morphological examination were carried out to investigate changes in cortex and hippocampal neurons. **Result:** YZQNK of 750 mg·kg<sup>-1</sup> improved learning ability significantly compared with that of the controls ( $P < 0.01$ ). YZQNK of 750 mg·kg<sup>-1</sup> could obviously increase the levels of SOD ( $1.64 \pm 0.26$ ) U·mg<sup>-1</sup>, GSH-Px ( $0.297 \pm 0.051$ ) U·mg<sup>-1</sup> ( $P < 0.01$ ) and reduce MDA ( $2.71 \pm 0.80$ ) μmol·g<sup>-1</sup> in brain tissue ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** YZQNK may improve learning and memory ability, and increase levels of SOD, GSH-Px, and reduce MDA in brain tissue.

**[Key words]** Yuanzhi Qingnao Keli; Alzheimer's disease; learning and memory ability

老年性痴呆 (Alzheimer's disease, AD) 是以进行

性痴呆, 认知障碍为主要症状, 同时伴有精神行为异常的退行性病变, 其病因复杂, 发病机制不明确, 针对单一因素治疗 AD 效果甚微。我们采用远志清脑颗粒对实验性痴呆模型小鼠进行干预, 显示有很好的疗效, 体现了中药复方多靶点的作用机制。

**[收稿日期]** 20101025(004)

**[通讯作者]** \* 余兴华, 副主任药师, 从事临床中药学、中药炮制研究, Tel: 0592-8051818, E-mail: yuxinghua1970@sohu.com

## 1 材料

**1.1 动物** ICR 小鼠,雌雄各半,体重 20 ~ 22 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCKX(京)2006-0009。

**1.2 药品与试剂** 受试药物 远志清脑颗粒(YZQNKL)组方:远志、人参、附子组成,各味药材分别占 62.5%,12.5%,25%,以水提法制备,6.2 g 生药·g<sup>-1</sup>,以远志皂苷作为质控指标,由北京中医药大学中试车间提供,批号 100612。阳性对照药 天保宁(Taponing),棕红色片剂,康恩贝集团制药有限公司产品,每片含银杏叶精提物为 40 mg(其中银杏总黄酮苷 9.6 mg),批号为 010613-2。*D*-半乳糖(*D*-gal)(020123,北京化学试剂公司);其他试剂为市售分析纯(北京化学试剂公司)。

**1.3 仪器** 水迷宫测试仪(中国医学科学院药物研究所电子仪器室),AEG-220 型电子分析天平(Shimadzu,日本)。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 实验小鼠以性别分开后,按体重随机分为 6 组,即空白对照组,模型对照组,天保宁 40 mg·kg<sup>-1</sup>组,远志清脑颗粒 3 个剂量组(375,750,1500 mg·kg<sup>-1</sup>)。各组小鼠造模当天开始 ig 给药,连续 53 d,给药容积 20 mL·kg<sup>-1</sup>;空白对照组和模型对照组 ig 等容积的生理盐水。

**2.2 造模方法** 各给药组和模型对照组小鼠每日 ip *D*-gal,剂量为 120 mg·kg<sup>-1</sup>,容积为 10 mL·kg<sup>-1</sup>和 NaNO<sub>2</sub> 剂量为 90 mg·kg<sup>-1</sup>,ip 容积为 10 mL·kg<sup>-1</sup>。空白对照组 ip 等容积生理盐水。

**2.3 学习记忆能力测定** 采用小鼠水迷宫测试仪,测定小鼠分辨学习能力。于造模第 50 ~ 53 天,采用水迷宫测试仪(结构见图 1),测定小鼠的分辨学习能力。在第 50 天开始训练,条件为室温(22 ± 2)℃,水温为(25 ± 1)℃,水深 10 cm。整个实验分 4 d 进行,第 1 天先训练 A 点 1 次,B 点 2 次;第 2 天先训

练 B 点 1 次,再测定 B 点;第 3 天训练 C 点 3 次;第 4 天测定 C 点。A,B 点训练时间限制在 2 min 内,C 点限制在 3 min 内。超时者分别按 2 min 和 3 min 计。每只小鼠每次训练和测试均记录到达终点的时间(到达时间)和进入盲端的次数(错误次数)。分别以训练期和测试期 B、C 2 点到达时间和错误次数的均值作为学习成绩和记忆成绩。测试均各组间平行进行,给药后 1 h 测定。

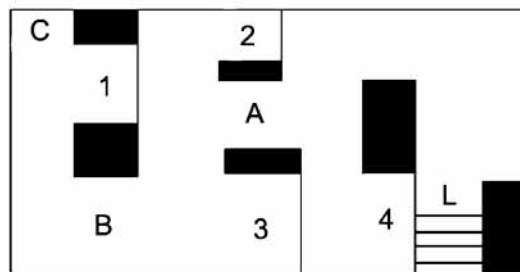


图 1 水迷宫实验示意图

A,B,C.:游泳起点;1,2,3,4. 障碍物;L. 阶梯

**2.4 大脑生化指标测定** 于造模、给药第 60 天,断头,在 4℃冰浴条件下迅速取脑,去除嗅球、小脑及脑干后,将其放置于冻存管中再浸入液氮中保存。生化测定时,将余下部分加 9 倍冰生理盐水制成 100 g·L<sup>-1</sup>脑匀浆,并按照南京建成生物工程研究所试剂盒说明测定 SOD,GSH-Px 活力及 MDA 含量。

## 3 统计学处理

实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,运用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计学处理。数据进行单因素方差分析和独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$  有统计学意义。

## 4 结果

**4.1 远志醒脑颗粒对痴呆模型小鼠学习记忆能力的影响** 实验结果显示,远志清脑颗粒可不同程度的缩短拟痴呆小鼠找到平台的时间和进入盲端的次数,其中以远志清脑颗粒 750 mg·kg<sup>-1</sup>组效果较好,与天保宁组相比无明显差异(表 1,2)。

表 1 远志清脑颗粒对痴呆模型小鼠学习能力的作用( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	B		C	
			盲端数/次	到达时间/s	盲端数/次	到达时间/s
正常组	17	-	2.96 ± 1.38 <sup>2)</sup>	42.55 ± 8.28 <sup>2)</sup>	3.88 ± 1.86 <sup>2)</sup>	68.16 ± 3.29 <sup>2)</sup>
模型组	17	-	4.76 ± 1.76	62.10 ± 2.99	6.55 ± 2.69	83.20 ± 3.79
天保宁组	18	40	3.44 ± 1.10 <sup>1)</sup>	66.09 ± 2.04 <sup>1)</sup>	4.98 ± 1.93 <sup>1)</sup>	72.35 ± 8.45 <sup>1)</sup>
远志清脑颗粒组	16	375	4.51 ± 1.77	67.53 ± 4.91	4.84 ± 1.28	73.25 ± 3.16
	16	750	2.98 ± 1.28 <sup>2)</sup>	47.67 ± 2.88 <sup>2)</sup>	3.91 ± 1.39 <sup>2)</sup>	66.38 ± 8.63 <sup>2)</sup>
	16	1500	3.85 ± 2.23 <sup>1)</sup>	54.02 ± 2.77 <sup>1)</sup>	6.19 ± 1.61 <sup>1)</sup>	72.54 ± 2.51 <sup>1)</sup>

注:与模型组相比<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

表2 远志清脑颗粒对痴呆模型小鼠记忆能力的作用( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	B		C	
			盲端数/次	到达时间/s	盲端数/次	到达时间/s
正常	17	-	1.29 ± 1.93 <sup>1)</sup>	25.71 ± 4.80 <sup>2)</sup>	3.76 ± 3.32 <sup>2)</sup>	58.18 ± 2.92 <sup>2)</sup>
模型	17	-	5.41 ± 3.50	62.12 ± 3.36	5.53 ± 5.48	74.94 ± 6.59
天保宁	18	40	1.72 ± 1.56 <sup>1)</sup>	37.11 ± 3.89 <sup>1)</sup>	3.28 ± 3.16 <sup>1)</sup>	37.72 ± 5.69 <sup>1)</sup>
远志清脑颗粒	16	375	2.88 ± 2.69 <sup>1)</sup>	46.12 ± 4.97	3.41 ± 3.09	41.71 ± 5.43
	16	750	2.43 ± 2.14 <sup>1)</sup>	38.07 ± 3.28 <sup>1)</sup>	2.50 ± 1.61 <sup>1)</sup>	28.64 ± 3.58 <sup>1)</sup>
	16	1 500	3.22 ± 2.76 <sup>2)</sup>	42.56 ± 6.84 <sup>2)</sup>	4.11 ± 2.82 <sup>2)</sup>	36.78 ± 2.04 <sup>2)</sup>

4.2 远志清脑颗粒对痴呆模型小鼠脑生化指标的影响 实验结果显示,远志清脑颗粒 1 500,750,375 mg·kg<sup>-1</sup>组连续给药 60 d 均能减轻这种自由基损

伤,表现为提高脑组织中 SOD 和 GSH-Px 活力,降低 MDA 含量,与模型对照组相比差异显著( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。结果见表 3。

表3 远志清脑颗粒对痴呆模型小鼠脑 SOD,GSH-Px 活力及 MDA 含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	SOD/U·mg <sup>-1</sup>	GSH-Px/U·mg <sup>-1</sup>	MDA/μmol·g <sup>-1</sup>
空白	17	-	1.54 ± 0.32 <sup>2)</sup>	0.332 ± 0.091 <sup>2)</sup>	2.66 ± 0.72 <sup>2)</sup>
模型	17	-	0.88 ± 0.25	0.179 ± 0.035	3.72 ± 0.95
天保宁	18	40	1.66 ± 0.42 <sup>1)</sup>	0.293 ± 0.051 <sup>1)</sup>	2.74 ± 0.85 <sup>2)</sup>
远志清脑颗粒	16	375	1.33 ± 0.19 <sup>1)</sup>	0.231 ± 0.066 <sup>1)</sup>	3.43 ± 0.75 <sup>1)</sup>
	16	750	1.64 ± 0.26 <sup>2)</sup>	0.297 ± 0.051 <sup>2)</sup>	2.71 ± 0.80 <sup>2)</sup>
	16	1 500	1.15 ± 0.38 <sup>1)</sup>	0.183 ± 0.057 <sup>1)</sup>	3.62 ± 0.70

## 5 讨论

AD 患者主要表现为进行性学习、记忆功能减退和认知障碍。许多研究表明,大量产生的氧自由基可导致线粒体 DNA 和线粒体膜损伤,而线粒体 DNA 损伤与 AD 的发生有关<sup>[1]</sup>。AD 患者普遍存在神经细胞线粒体 DNA 突变和缺失,其神经细胞线粒体 DNA 易受到氧化应激的损伤<sup>[1]</sup>。

目前认为,*D*-gal 受半乳糖合成酶的作用,产生了 O<sub>2</sub><sup>-</sup>·和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等活性氧,导致 SOD 活力下降,MDA 水平升高,其中活性氧是 *D*-gal 拟老化作用的启动因子,而基因表达和调控过程受累是重要环节<sup>[3]</sup>。

而远志清脑颗粒中的君药远志在临床上的应用已有上千年的历史,现代研究表明其主要成分远志皂苷能够提高学习记忆障碍模型小鼠跳台和水迷宫成绩,改善学习记忆能力<sup>[2]</sup>。臣药人参中人参皂苷作为人参主要活性成分治疗老年病机制主要为降低 Ap 沉积及对神经元的保护作用、降低 APP 异常水解、调节 Bka 及抑制神经细胞凋亡保护神经元等。佐使要附子针对年过半百,阳气自半的发病机制,共同组成具有益智、益气、温阳的复方制剂。

本实验表明与天保宁相似,远志清脑颗粒 375,750,1 500 mg·kg<sup>-1</sup>可以不同程度地改善痴呆小鼠模型学习记忆能力,并拮抗自由基损害,但是其作用以

远志清脑颗粒 750 mg·kg<sup>-1</sup>组效果较好,1 500 mg·kg<sup>-1</sup>作用有所下降,这可能是随着剂量的增加,药物浓度明显增高,影响脾胃的运化功能,从而导致其作用降低。其改善认知的激励可能是一方面通过阻断自由基引发的一级和二级反应,保护细胞膜免受脂质过氧化损伤;另一方面,通过减少 MDA,维持细胞膜的稳定性。因脑组织 MDA 含量增多与学习记忆能力减退、衰老过程加速密切相关,所以我们认为,抗脂质过氧化可能是远志清脑颗粒发挥抗脑功能衰退作用的重要机制之一。

## [参考文献]

- [1] Schindowski K, Leutner S, Kressmann S, et al. Age-related increase of oxidative stress-induced apoptosis in mice prevention by Ginkgo biloba extract (EGb761)[J]. J Neural Transm,2001,108(8/9):969.
- [2] 张耀春,王立为. 远志提取物对小鼠学习记忆的影响[J]. 中国新药杂志,2006,15(15):1254.
- [3] Ahlemeyer B, Krieglstein J. Pharmacological studies supporting the therapeutic use of Ginkgo biloba extract for Alzheimer's disease[J]. Pharmacopsychiatry,2003,36(Suppl 1):S8.

[责任编辑 聂淑琴]