

# 龟鹿二仙胶颗粒对自然衰老小鼠学习记忆能力的影响

王树鹏<sup>\*</sup>, 刘书宇

(辽宁中医药大学, 沈阳 110032)

[摘要] 目的: 研究龟鹿二仙胶颗粒对自然衰老小鼠学习记忆能力的影响。方法: 将自然老化的 14 月龄小鼠随机分成模型对照组、给药防治组及阳性对照组。药物加入饮水中自然饮入, 连续给药 3 个月, 检测前另选 2 月龄小鼠作为青年对照组, 各组于末次给药的前 4 d 用跳台法检测错误反应的潜伏期和逃避反应的潜伏期, 于末次给药的前 2 d 以避暗法检测错误反应的潜伏期和 5 min 内错误反应的次数。检测后采血分离血清、取脑进行冰浴匀浆, 检测血清和脑匀浆的超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性和丙二醛 (MDA) 的含量。结果: 与青年对照组相比老龄模型对照组小鼠错误反应的潜伏期显著缩短, 逃避反应的潜伏期显著延长, 错误反应次数显著增加, SOD, GSH-Px 活力显著降低、MDA 含量显著增加。与老龄模型对照组相比, 各给药防治组老龄小鼠错误反应的潜伏期显著延长, 逃避反应的潜伏期显著缩短, 错误反应的次数显著减少, SOD, GSH-Px 活力显著提高, MDA 含量显著降低。结论: 龟鹿二仙胶颗粒对自然衰老小鼠具有增强抗氧化功能, 提高学习记忆能力的作用。

[关键词] 龟鹿二仙胶颗粒; 自然衰老; 学习记忆; 抗氧化

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0142-04

## Influence of Turtle and Deer Antlers Granula on Learning and Memory in Natural Aging Mice

WANG Shu-peng<sup>\*</sup>, LIU Shu-yu

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

**[Abstract] Objective:** To study the influence of turtles and deer antlers granula on learning and memory in the natural aging mice. **Method:** The natural aging of 14 months mice were randomly divided into model control group, administration control group and the positive control group. Drugs was prepared in drinking water and administrated to the rats for consecutive 3 months. In addition, 2 month-old mice were used as the young control group. Wrong and escape response latencies with step-down test for each group was investigated 4 days before the last administration. Two days before the last administration the error response latency and error response times within 5 min was detected by avoiding dark method. After the treatment of drugs, blood serum and brain homogenate were separated and prepared, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activity and malondialdehyde (MDA) content was detected. **Result:** Compared with young control group error response latency of aged model group mice was significantly shorter, escape response latency was significantly longer, the error reaction times increased significantly, SOD, GSH-Px activity significantly decreased, MDA content increased significantly. Compared with the aging model group, error response latency of the administration control group aged mice was significantly prolonged, escape response latency was significantly shortened, error response rate was significantly decreased, SOD, GSH-Px activities were significantly increased, MDA content was significantly lower.

[收稿日期] 20100622(008)

[通讯作者] <sup>\*</sup> 王树鹏, 副教授, 医学博士学位, 在站博士后, 研究方向: 中医药数据挖掘及中医药抗衰老的研究, Tel: 15002459766, E-mail: sywangshupeng@gmail.com

**Conclusion:** The turtle and deer antlers granula can enhance antioxidant and improve learning and memory for the natural aging mice.

**[Key words]** turtle and deer antlers granula; natural aging; learning and memory; antioxidant

在人类衰老的进程中,智能衰老出现的较早,且学习记忆能力减退较为明显,智能的衰老和中枢的脂质过氧化密切相关。中医名方龟鹿二仙胶具有“补人三宝气精神,延年益寿实可珍”的功效。本实验以龟鹿二仙胶颗粒对自然衰老小鼠学习记忆能力和中枢抗氧化功能的影响,评价其补“神”作用。

## 1 材料

**1.1 动物** 昆明种雄性小鼠,由辽宁中医药大学动物室提供,由动物室代养至 13 月龄,取回用于实验,动物合格证号 SCXK(辽)2007-0006。

**1.2 药物与试剂** 龟鹿二仙胶颗粒处方由人参、枸杞子、鹿角胶、龟板胶所组成,每克含生药 2.6 g,由辽宁中医药大学制剂教研室提供,临床用量 10 g/次,2 次/日,批号 20070423。超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒购于南京建成生物工程研究所,货号分别为 A001, A005, A004, A007。脑复康,湖南迪诺制药有限公司,批号 20061206。

**1.3 仪器** 紫外分光光度计、J<sub>2</sub>-SH 高速冰冻离心机,日本岛津公司产品。GF-1 型内切式匀浆器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司产品。分析天平,上海奥豪斯公司产品。微量移液器,上海求精玻璃仪器厂产品。小鼠跳台,20 cm × 20 cm × 20 cm,底部铺设可通电铜栅,一角放置绝缘橡皮台。避暗箱为 30 cm × 11 cm × 11 cm 的被动回避式条件反射箱,分明暗两间,暗室底部铺设可通电铜栅,明暗两室之间有一直径为 3 cm 的可穿越洞口。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 将自然老化的 13 月龄雄性昆明种小鼠按体重随机分成老龄模型对照组、老龄龟鹿二仙胶颗粒 3 g · kg<sup>-1</sup> 低剂量组、9 g · kg<sup>-1</sup> 中剂量组、27 g · kg<sup>-1</sup> 高剂量组、老龄脑复康 0.4 g · kg<sup>-1</sup> 阳性对照组、每组 12 只。每日将各剂量组的药物混入一定量常水中,分组投与自由饮用,饮净后换饮常水。每周称量 1 次体重,并根据体重的变化,重新计算药量,连续投药 90 d。并于检测前选取 12 只 2 月龄小鼠作为青龄对照组。

**2.2 跳台法实验** 于末次投药的前 4 d,参照戴氏改进法<sup>[1]</sup>,对各实验组小鼠进行跳台训练,将铜栅通 36 V 电流,把小鼠放在跳台装置的安全橡皮台上,小鼠跳至铜栅时即受到电击,为错误反应,其正确反应是逃回安全的橡皮台上。如此进行训练,使各组每只小鼠均有 3 次由橡皮台跳入铜栅遭电击又逃回的经历。24 h 后进行检测,铜栅通电,将各组小鼠放在橡皮台上,记录发生错误反应的潜伏期及受电击后逃回安全台的潜伏期,所得数据进行组间统计学检验,以评价龟鹿二仙胶颗粒对老龄小鼠学习记忆能力的影响。

**2.3 避暗法实验<sup>[2]</sup>** 于末次给药的前 2 d 各组小鼠进行避暗实验训练,暗箱底部铜栅通 36 V 电流,将各组实验小鼠头部背着洞口放入明室,明室上方点亮 100 W 光源,小鼠受到强光的刺激,逃往暗室躲避,但一进入暗室即遭到电击,逃回明室,进行重复训练,使各组每只小鼠都有 3 次进入暗室遭到电击逃出的经历,训练后 24 h 进行检测,记录各组小鼠初次进入暗室的潜伏期及 5 min 内进入暗室遭电击的次数,所得数据进行组间统计学检验,评价龟鹿二仙胶颗粒对老龄小鼠学习记忆能力的影响。

**2.4 对血清、脑组织抗氧化能力的影响** 经避暗法检测后,各组小鼠摘双侧眼球采血,分离血清,冷藏备用,取各组小鼠脑组织冰浴条件下匀浆,采用邻苯三酚自氧化法检测 SOD 活性,采用 5.5-双硫代对硝基苯甲酸显色法检测 GSH-Px 活力,采用硫代巴比妥酸比色法检测 MDA 含量,采用考马斯亮蓝法检测脑组织蛋白,具体操作按试剂说明书进行。所得数据进行组间统计学检验,评价龟鹿二仙胶颗粒对老龄小鼠抗氧化功能的影响。

**2.5 数据处理** 对实验所得的数据,采用 SPSS15.0 软件,对组间进行方差分析,统计结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。 $P < 0.05$  有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 在跳台法实验对老龄小鼠学习记忆功能的影响** 与青年对照组小鼠相比,模型对照组老龄小鼠学习记忆能力显著降低,而与老龄模型对照组相比,各给药防治组老龄小鼠学习记忆功能得到显著改

善, 实验结果见表 1。

表 1 龟鹿二仙胶颗粒在跳台法实验对老龄小鼠学习记忆功能的影响(  $\bar{x} \pm s, n = 12$  )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	错误反应潜伏期 /s	逃避反应潜伏期 /s
青年对照	-	87.62 ±19.47	3.43 ±1.22
老年模型	-	46.83 ±11.29 <sup>1)</sup>	7.42 ±1.98 <sup>1)</sup>
老年龟鹿二仙胶	3	61.14 ±13.06 <sup>2)</sup>	5.07 ±1.83 <sup>2)</sup>
	9	69.57 ±16.20 <sup>3)</sup>	4.68 ±1.54 <sup>3)</sup>
	27	78.70 ±18.19 <sup>3)</sup>	3.97 ±1.42 <sup>3)</sup>
	0.4	56.33 ±14.57 <sup>2)</sup>	5.50 ±1.51 <sup>2)</sup>

注: 与青年对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与老年模型组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

**3.2 在避暗法实验对老龄小鼠学习记忆功能的影响** 与青年对照组小鼠相比, 模型对照组老龄小鼠学习记忆能力显著降低, 而与老龄模型对照组相比, 各给药防治组老龄小鼠学习记忆功能得到显著改善, 实验结果见表 2。

表 2 龟鹿二仙胶颗粒在避暗法实验对老龄小鼠学习记忆功能的影响(  $\bar{x} \pm s, n = 12$  )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	错误反应潜伏期 /s	错误反应 /次
青年对照	-	213.42 ±31.57	1.46 ±0.82
老年模型	-	52.60 ±12.16 <sup>1)</sup>	3.98 ±1.68 <sup>1)</sup>
老年龟鹿二仙胶	3	98.79 ±16.13 <sup>2)</sup>	2.65 ±1.27 <sup>2)</sup>
	9	131.42 ±18.66 <sup>3)</sup>	2.21 ±0.92 <sup>3)</sup>
	27	181.58 ±25.54 <sup>3)</sup>	1.90 ±0.74 <sup>3)</sup>
	0.4	83.61 ±19.03 <sup>2)</sup>	2.79 ±1.02 <sup>2)</sup>

**3.3 对老龄小鼠血清, 脑组织抗氧化功能的影响** 与青年对照组小鼠相比, 模型对照组老龄小鼠血清及脑组织抗氧化能力显著降低。而与老龄模型组相比, 各给药防治组老龄小鼠血清、脑组织抗氧化功能得到显著改善, 实验结果见表 3、4。

表 3 龟鹿二仙胶颗粒对老龄小鼠脑组织抗氧化功能的影响(  $\bar{x} \pm s, n = 12$  )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	SOD /μU·g <sup>-1</sup>	GSH-Px /μU·g <sup>-1</sup>	MDA /μmol·g <sup>-1</sup>
青年对照	-	18.24 ±1.35	92.69 ±10.54	4.06 ±0.58
老年模型	-	6.39 ±0.72 <sup>1)</sup>	41.53 ±5.69 <sup>1)</sup>	8.83 ±1.02 <sup>1)</sup>
老年龟鹿二仙胶	3	10.25 ±1.57 <sup>2)</sup>	61.62 ±7.04 <sup>2)</sup>	6.05 ±0.71 <sup>2)</sup>
	9	13.12 ±1.69 <sup>3)</sup>	70.71 ±8.31 <sup>3)</sup>	5.39 ±0.68 <sup>3)</sup>
	27	15.23 ±1.74 <sup>3)</sup>	81.47 ±9.50 <sup>3)</sup>	4.96 ±0.57 <sup>3)</sup>
	0.4	9.97 ±1.02 <sup>2)</sup>	57.04 ±6.27 <sup>2)</sup>	6.33 ±0.75 <sup>2)</sup>

表 4 龟鹿二仙胶颗粒对老龄小鼠血清抗氧化功能的影响(  $\bar{x} \pm s, n = 12$  )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	SOD /μU·L <sup>-1</sup>	GSH-Px /μU·L <sup>-1</sup>	MDA /μmol·L <sup>-1</sup>
青年对照	-	85.57 ±9.63	252.46 ±20.31	7.35 ±0.82
老年模型	-	44.82 ±6.59 <sup>1)</sup>	147.57 ±16.04 <sup>1)</sup>	15.64 ±1.84 <sup>1)</sup>
老年龟鹿二仙胶	3	59.30 ±6.23 <sup>2)</sup>	185.31 ±11.26 <sup>2)</sup>	10.61 ±1.24 <sup>2)</sup>
	9	65.47 ±7.54 <sup>3)</sup>	206.43 ±19.87 <sup>3)</sup>	9.17 ±1.05 <sup>3)</sup>
	27	76.91 ±8.17 <sup>3)</sup>	227.60 ±20.42 <sup>3)</sup>	8.81 ±0.97 <sup>3)</sup>
	0.4	55.39 ±5.24 <sup>2)</sup>	178.42 ±16.63 <sup>2)</sup>	10.92 ±1.16 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

学习记忆是大脑的重要功能之一, 是人类思维的基本环节, 学习记忆能力减退是衰老早期表现出来的症状之一。

中医认为衰老是气、血、阴、阳失于平衡, 逐渐虚衰, 导致脏腑功能失调的结果。气虚血亏, 耗阴伤阳, 髓海空虚, 都会导致神明失养, 学习记忆能力减退。龟鹿二仙胶颗粒具有补气养血、滋阴助阳、益精填髓之功效, 中老年人长期服用可致气充血旺, 阴平阳谧, 髓海充盈, 延缓衰老, 神智机敏。

龟鹿二仙胶颗粒的药理作用也符合现代医学的抗衰老的基本理论。自由基学说是目前公认的致衰老的学说之一, 在青壮年的生理状态下, 人体内活性氧自由基、羟自由基、脂自由基等不断产生, 但在抗氧化酶系统作用下, 不断被清除, 使之维持于无害的水平, 过了壮年之后, 随着年龄的增长, 机体氧化作用增强, 抗氧化能力减弱, 自由基产生过多, 氧化不饱和脂肪酸, 生成脂质过氧化物损伤生物膜。自由基还使核酸、蛋白质变性, DNA 交联和断裂。从而导致细胞、亚细胞结构的改变和功能失调, 正常的生理功能受损, 随引起日趋衰老和疾病的发生。

脑组织中含有高浓度不饱和脂肪酸和高水平的氧化代谢, 因而是自由基最易侵袭的靶器官。过量自由基易使脑神经细胞脂质过氧化, 导致脑神经元退行性变, 甚至凋亡。由此可见, 抗氧化能力降低会加速中枢神经系统衰老, 功能减退, 造成学习记忆能力下降<sup>[3-5]</sup>。

机体内存在着完备的抗氧化的酶系统, 主要包括 SOD, GSH-Px, ACT 等, 这些酶不但具有协同地防止活性氧的损伤效应, 而且相互间还起着保护作用。O<sub>2</sub><sup>-</sup> 能灭活 CAT 和 GSH-Px, 而 SOD 能使 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 歧化生成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能灭活 SOD, 而 CAT 和 GSH-Px 则能催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成 H<sub>2</sub>O 和 O<sub>2</sub>。也就是说 SOD 保护

CAT 和 GSH-Px 免受  $O_2^-$  灭活, 同时 CAT 和 GSH-Px 保护 SOD 不被  $H_2O_2$  灭活。因此, 一旦在这相互保护系统中某一成员的减弱或减少, 整个酶性保护系统就可能全线崩溃, 导致不可逆性的细胞损伤<sup>[3]</sup>。

事实上在清除  $H_2O_2$  过程中, CAT 和 GSH-Px 是协同作用的, 在脑组织中 CAT 活性极低<sup>[3]</sup>, 而 GSH-Px 活性很高, 所以在中枢 SOD 歧化  $O_2^-$  生成的  $H_2O_2$  主要由 GSH-Px 催化生成  $H_2O$  和  $O_2$ 。在红细胞中, CAT 吸附于红细胞内膜, GSH-Px 存在于细胞浆中, 以正常速率产生的  $H_2O_2$  由 GSH-Px 催化生成  $H_2O$  和  $O_2$ 。

本文的研究结果表明龟鹿二仙胶颗粒对自然衰老小鼠血液系统和脑组织具有显著的提高 SOD 和 GSH-Px 的活性, 降低 MDA 的含量的作用。SOD 的活性提高有三方面意义: 其一特异地清除超氧化自由基; 其二将  $O_2^-$  歧化生成  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2$  再由 GSH-Px 催化成  $H_2O$  和  $O_2$ ; 其三, 保护 GSH-Px, CAT 免受  $O_2^-$  灭活, 使其活性提高, 加速  $H_2O_2$  清除。GSH-Px 活性提高有两方面意义: 其一催化  $H_2O_2$  生成  $H_2O$  和  $O_2$ , 特别是在中枢, 由于 CAT 活性极低, 主要依靠 GSH-Px 清除  $H_2O_2$ ; 其二保护 SOD 不被  $H_2O_2$  灭活, 提高 SOD 活性。

MDA 含量能间接反映机体内自由基产生情况和机体组织细胞脂质过氧化程度, 是评价衰老的重要指标之一<sup>[6]</sup>。由于抗氧化酶活性的提高和互相保护作用增强, 过氧化的产物 MDA 生成减少是不言而喻的。

依据自由基的学说, 用药物进行调节, 增强机体

防御自由基损伤酶系统的功能, 进而减少 MDA, 脂褐素的生成, 减轻细胞及组织结构的损伤, 延缓中枢及外周组织器官的衰老, 自然会精力充沛, 神智机敏。

上述研究结果表明龟鹿二仙胶颗粒所具有良好的抗氧化作用, 这可能是其填髓益智, 延缓中枢衰老作用的药理学基础之一。

“龟鹿二仙最守真, 补人三宝气精神”, 本文通过其抗中枢氧化, 改善自然衰老小鼠的记忆功能, 验证了其补“神”的功效。

#### [参考文献]

- [1] 戴向东, 赵伟康, 陈长勳. 调心方对化学损毁及自然衰老小鼠记忆功能的影响[J]. 中成药, 1994, 16(12): 27.
- [2] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 826.
- [3] 陈瑗, 周玫. 自由基-医学基础与病理生理[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 75, 121, 128.
- [4] P Arivazhangan T Thilakavathy, C Panneerselvam. Antioxidant lipoate and tissue antioxidants in aged rats [J]. Nutr Biochem, 2000(11): 122.
- [5] DeLeo D. Heller T S. Who are the kids who self-harm? An Australian self-report school survey [J]. Med J Aust, 2004, 181(3): 140.
- [6] Reiter R. Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in human [J]. J Pineal Res, 1995, 18: 1.

[责任编辑 聂淑琴]