

脑力智宝对东莨菪碱所致学习记忆获得障碍小鼠的保护作用

江雪华^{1*}, 李锐², 周莉玲²

(1. 暨南大学医学院, 广东 广州 510632; 2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510405)

[摘要] **目的:** 探讨脑力智宝对东莨菪碱所致学习记忆获得障碍小鼠的保护作用与机制。**方法:** 腹腔注射东莨菪碱制备学习记忆获得障碍模型小鼠, 以跳台法观察脑力智宝对模型小鼠学习记忆能力的影响, 并检测血清与脑内胆碱酯酶活性、脑内游离氨基酸的含量。**结果:** 脑力智宝能显著改善模型小鼠的学习记忆能力, 有效抑制血清及脑内胆碱酯酶的活性, 并显著提高脑内谷氨酸(Glu)、天门冬氨酸(Asp)水平, 降低 γ -氨基丁酸(GABA)水平。**结论:** 脑力智宝增强小鼠的学习记忆获得过程的作用机制可能与抑制胆碱酯酶合成、提高脑内Glu/GABA比值有关。

[关键词] 脑力智宝; 学习记忆; 胆碱酯酶; 游离氨基酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)10-0042-03

Effect of Naoli Zhibao on Learning and Memory Acquired Disorder Induced by Scopolamine in Mice

JIANG Xue-hua^{1*}, LI Rui², ZHOU Li-ling²

(1. Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. College of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Naoli Zhibao (NLZB) on learning and memory acquired disorder induced by Scopolamine. **Methods:** Scopolamine was injected intraperitoneally to induce learning and memory acquired disorder in mice. The learning and memory capability of mice was investigated by step-down test, the activity of acetylcholinesterase (AChE) in serum and brain and the contents of free amino acids were measured. **Results:** NLZB significantly promoted the learning and memory capability of mice, and depressed the activity of AChE in serum and brain. On the other hand, NLZB could increase the contents of glutamate acid (Glu) and aspartic acid (Asp) in brain while the content of gamma-aminobutyric acid (GABA) was decreased. **Conclusion:** It is suggested that NLZB not only could regulate the center cholinergic system by depressing the activities of AChE and improving the level of acetylcholine in brain, but also could increase Glu/GABA ratio, which might be one of the mechanisms of NLZB to reinforcing intelligence.

[Key words] Naoli Zhibao; learning and memory; acetylcholinesterase; free amino acid

脑力智宝主要由龟甲、枸杞子、黄精、石菖蒲、核桃仁、当归、远志、红花等组成, 用于治疗精神发育迟

滞、脑瘫、癫痫、脑血管病后遗症、脑外伤后遗症、脑炎后遗症、老年性痴呆等脑病伴发的智力和肢体功能障碍, 具有一定的疗效。本文观察了脑力智宝对东莨菪碱所致学习记忆获得障碍小鼠学习记忆能力、血清与脑内胆碱酯酶活性、脑组织内游离氨基酸含量的影响。

[收稿日期] 2008-01-15

[通讯作者] * 江雪华, Tel: (020) 39720468; E-mail: sivajiang@163.com

1 材料和方法

1.1 药品与试剂 脑力智宝(NLZB),由广东高明脑病医疗医药研究院提供,由龟甲、枸杞子、石菖蒲、核桃仁、益智仁、当归、远志、红花等组成,水煎浓缩成 1 g 生药/mL。氢溴酸东莨菪碱注射液,成都制药一厂生产,批号:98070115。胆碱酯酶试剂盒,南京建成生物工程研究所产品。谷氨酸(Glu)、天门冬氨酸(Asp)、 γ -氨基丁酸(GABA)、邻苯二甲醛(OPA)、 β -巯基丙酸,SIGMA 产品;甲醇和乙腈为色谱纯,北京昌化精细化工厂产品;四氢呋喃为分析纯,经两次蒸馏纯化后使用;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硼砂和氢氧化钠均为分析纯。

1.2 仪器 直径为 30 cm 的圆形有机玻璃回避反应箱,箱底铺有铜栅,可以连接刺激电流,电压为 30 V,箱内一角设一直径和高均为 5 cm 的绝缘橡皮塞为安全区;722 光栅分光光度计,上海第三分析仪器厂产品;惠普 HP1050 型高效液相色谱仪。

1.3 动物与分组给药 NIH 小鼠,雄性,50 只,体重(22±2) g,由广州中医药大学实验动物中心提供。将小鼠按体重随机分为 5 组:正常对照组、东莨菪碱模型组、脑力智宝低、中、高剂量组。对照组和模型组分别给予等体积的生理盐水,脑力智宝低、中、高剂量组分别给予脑力智宝 2, 4, 8 g·kg⁻¹。各组动物均按 20 mL·kg⁻¹ 小鼠体重灌胃,1 次/d,连续 10 d。

1.4 造模与学习记忆能力测试 于第 10 d 给药后 2 h 后进行跳台训练,模型组及各给药组于训练前 20 min ip 东莨菪碱 2 mg·kg⁻¹,对照组小鼠 ip 等体积生理盐水。训练开始时,先将小鼠放入圆形回避反应箱内熟悉环境 2~3 min,轻放于平台上,当动物从跳台上跳下四肢接触铜栅时,即给予 30 V 电压刺激,记录小鼠逃避至平台上的潜伏期,并记录 5 min 内的触电次数(错误次数),以此作为学习功能的评价指标。24 h 后测试,将小鼠置平台上,记录其第一次跳

下受电击的时间(潜伏期)及其 3 min 内的触电次数(错误次数),以此作为记忆功能的评价指标。测试时,若小鼠在平台上超过 3 min,其潜伏期即以 180 s 计。

1.5 血清及脑内胆碱酯酶活性检测 跳台法测试结束后的小鼠,立即摘眼球取血分离血清,脱椎法处死动物后,迅速取脑,用预冷的生理盐水制成匀浆,用碱性羟胺比色法^[1]改良测其血清及脑内胆碱酯酶(AChE)的活性,并用马考斯亮兰法^[2]测定脑匀浆中的组织蛋白含量。

1.6 小鼠脑内游离氨基酸含量测定^[3] 快速取出小鼠脑组织,准确称重,在冰浴中加入甲醇制成 1:20 (W/V) 匀浆,2 000 g,4℃离心 15 min,收集上清液,同法再提取两次,合并 3 次提取的上清液,于沸水浴上挥干甲醇,残留物中准确加入 80% 乙醇,超声提取 30 min,2 000 g,4℃离心 30 min,取上清液,用邻苯二甲醛柱前衍生反相高效液相色谱法测定其中游离的 Glu, Asp, GABA 的含量。色谱仪工作条件:色谱柱为 Backman Altex Ultrasphere ODS, 250 mm × 416 mm i. d., 粒径 5 μm。流动相(A):10 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ pH 7.2 缓冲溶液(PB),含 0.3% 四氢呋喃(THF);流动相(B):PB-甲醇-乙腈(50:35:15)。线性梯度:在 0~40 min 内,流动相(B)以线性从 0% 上升到 100%。流量:1.0 mL·min⁻¹。柱温:40℃。检测波长:340 nm。

1.7 统计学处理 实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,运用统计软件 SPSS for windows 10.0 进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 对东莨菪碱模型小鼠学习记忆能力的影响 由表 1 可知,东莨菪碱模型小鼠学习记忆能力明显下降,与对照组比较,差异显著或非常显著($P < 0.05$)

表 1 脑力智宝对东莨菪碱模型小鼠学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	学习		记忆	
		潜伏期(s)	错误次数	潜伏期(s)	错误次数
对照组	—	12.1 ± 8.9 ²⁾	6.1 ± 3.7	113.6 ± 75.2 ¹⁾	1.3 ± 1.6 ²⁾
模型组	—	201.2 ± 120.1	9.5 ± 3.3	22.4 ± 47.6	5.3 ± 4.1
脑力智宝组	2	88.0 ± 41.8 ¹⁾	7.3 ± 3.6	90.3 ± 72.6	2.1 ± 2.3 ¹⁾
	4	57.3 ± 30.8 ²⁾	4.4 ± 4.0 ¹⁾	95.8 ± 49.1 ¹⁾	1.4 ± 0.9 ²⁾
	8	69.8 ± 57.1 ²⁾	4.8 ± 1.9 ¹⁾	143.1 ± 54.7 ²⁾	0.7 ± 0.9 ²⁾

注:与模型组相比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (下同)

或 $P < 0.01$); 脑力智宝各给药组均能不同程度提高模型小鼠的学习记忆能力, 与模型组比较, 差异显著或非常显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 对东莨菪碱模型小鼠血清及脑组织胆碱酯酶活性的影响 由表 2 可知, 与对照组比较, 模型组小鼠血清及脑组织中胆碱酯酶活性均明显升高, 差异显著 ($P < 0.05$); 脑力智宝中、高剂量组均可降低血清及脑组织中的胆碱酯酶活性, 与模型组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

表 2 脑力智宝对东莨菪碱模型小鼠血清及脑组织胆碱酯酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	胆碱酯酶活性	
		脑($U \cdot mg^{-1} prot$)	血清($U \cdot mL^{-1}$)
对照组	—	1.1 ± 0.8 ¹⁾	62.5 ± 20.0 ¹⁾
模型组	—	2.7 ± 1.2	98.5 ± 25.2
脑力智宝组	2	2.1 ± 1.3	81.5 ± 22.7
	4	1.3 ± 0.5 ¹⁾	77.2 ± 21.8 ¹⁾
	8	1.2 ± 0.4 ¹⁾	69.4 ± 30.6 ¹⁾

2.3 对东莨菪碱模型小鼠脑组织内游离氨基酸含量的影响 由表 3 可知, 与对照组比较, 模型组小鼠脑内 Glu, Asp 含量均降低 ($P < 0.05$), 而 GABA 含量则升高 ($P < 0.05$), Glu/GABA 比值降低为 2.05; 与模型组比较, 脑力智宝各给药组小鼠脑内 Glu, Asp 含量均升高, GABA 含量则降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), Glu/GABA 比值均明显升高, 并呈剂量依赖性。

表 3 脑力智宝对东莨菪碱模型小鼠脑组织内游离氨基酸含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	Glu	Asp	GABA
		($mg \cdot g^{-1}$ 湿组织)	($mg \cdot g^{-1}$ 湿组织)	($mg \cdot g^{-1}$ 湿组织)
对照组	—	1.261 ± 0.307 ¹⁾	0.304 ± 0.075 ¹⁾	0.284 ± 0.027 ¹⁾
模型组	—	0.814 ± 0.263	0.211 ± 0.058	0.397 ± 0.098
脑力智宝组	2	1.127 ± 0.151 ¹⁾	0.279 ± 0.039 ¹⁾	0.326 ± 0.064
	4	1.317 ± 0.313 ¹⁾	0.331 ± 0.079 ¹⁾	0.257 ± 0.061 ¹⁾
	8	1.408 ± 0.300 ²⁾	0.346 ± 0.079 ¹⁾	0.240 ± 0.055 ¹⁾

3 讨论

学习记忆过程伴随着复杂的神经生理、生化机制, 其中中枢胆碱能系统与学习记忆有密切关系。乙酰胆碱 (ACh) 由胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 合成, 胆碱酯酶 (AChE) 分解, 通过 ACh 受体发挥生物学效应^[4]。动物实验证实, 东莨菪碱、阿托品等 M-胆碱受体阻滞剂能明显抑制动物在各种行为模型的记忆获得, 而胆碱酯酶抑制剂以及胆碱能激动剂则有促进学习记忆作用, 因此, 可以通过增加脑内 ACh 含量或抑制 AChE 活性的途径来改善学习记忆功能^[5]。

中枢 Glu/GABA 学习记忆调节系统, 是继胆碱能神经之后神经递质调控学习功能的又一种理论, 该理论认为 Glu 对学习记忆起正性调节作用, GABA 对学习记忆起负性调节作用^[6]。Glu 与 NMDA 受体结合, 致使 Ca^{2+} 通道开放, 突触后膜内 Ca^{2+} 浓度升高, 继而促发一系列生化反应, 改变膜的性质, 导致长时程突触增强 (long-term potentiation, LTP) 产生。分布在突触前膜的 GABA_B 受体能阻滞钙通道, 减少 Ca^{2+} 内流, 减少兴奋性递质的释放, 起到突触前抑制的作用。分布在突触后膜的 GABA_B 受体, 是通过激活 G 蛋白, 调节细胞内蛋白激酶产生磷酸化作用, 使 K^{+} 离子电导增加, 引起缓慢的外向电流, 神经元超极化, 产生突触后抑制效应。在一定范围内 Glu/GABA 比值升高可以促进学习记忆。

脑力智宝主要由龟甲、枸杞子、黄精、石菖蒲、核桃仁、当归、远志、红花、益智仁等组成, 方中当归、红花养血活血, 破瘀散结; 石菖蒲、远志化痰开窍; 黄精、益智仁益气健脾; 龟甲、枸杞子、核桃仁平补肾阴肾阳, 益髓填精。脑力智宝能明显改善东莨菪碱模型小鼠的学习记忆能力, 有效抑制血清及脑内 AChE 的活性, 并显著提高脑内 Glu, Asp 水平, 降低 GABA 水平。提示脑力智宝增强小鼠的学习记忆获得过程的作用机制可能与抑制胆碱酯酶合成, 减少乙酰胆碱分解, 提高脑内乙酰胆碱水平, 并同时提高脑内 Glu/GABA 比值有关。

[参考文献]

- [1] 李凤珍, 孙曼霁. 微量羟胺比色法测量胆碱酯酶活性 [J]. 军事医学科学院院刊, 1988, 10(3): 211.
- [2] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248.
- [3] 牟德海, 李建生, 林展江, 等. 邻苯二甲醛柱前衍生反相高效液相色谱法测定人和小鼠血浆中的游离氨基酸 [J]. 分析测试学报, 1998, 17(4): 18.
- [4] 韩太真, 吴馥梅. 学习与记忆的神经生物学 [M]. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1998: 404.
- [5] Keverne J, Ray M. Neurochemistry of Alzheimer's disease [J]. Psychiatry, 2007, 7(1): 6.
- [6] 董晓华, 张丹参, 孟宪勇. Glu/GABA 水平相关性对学习记忆的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(2): 283.