

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

朱坤杰^{1,2*}, 孙建宁¹

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江齐齐哈尔 161042)

[摘要] 目的: 研究六味地黄丸对D-半乳糖(D-gal)所致衰老大鼠学习记忆能力的影响及作用机制。方法: 以D-gal 75 mg·kg⁻¹·d⁻¹皮下注射(s. c)给药8周复制亚急性衰老动物模型, 分别灌胃不同剂量的六味地黄丸进行治疗, 治疗8周后, 用Morris水迷宫检测大鼠的学习记忆能力, 测定脑组织单胺氧化酶(MAO)、乙酰胆碱脂酶(AchE)活性。结果: 高、低剂量的六味地黄丸可使大鼠空间搜索和辨别的学习能力增强, 使脑组织MAO、AchE降低。结论: 六味地黄丸可以改善D-gal致衰老大鼠学习记忆障碍。协调中枢胆碱能系统和肾上腺素能系统的功能是其可能的作用机制。

[关键词] 六味地黄丸; D-半乳糖; 学习记忆; 作用机制

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)08-0044-03

Cognition Enhancing Effect of Liuwei Dihuang Pill on Deterioration of Learning and Memory induced by D-Galactose in Rats

ZHU Kun-jie^{1,2}, SUN Jian-ning¹

(1. The Chinese Traditional Medical University, Beijing 100102, China;

2. Qiqihaer Medical College, Heilongjiang 161042, China)

[Abstract] **Objective:** To probe the cognition enhancing effect of Liuwei Dihuang pill on deterioration of learning and memory induced by D-galactose(D-gal) in rats, and to study the mechanism. **Methods:** Sub-acute aged animal model was replicated by administration of 75 mg·kg⁻¹·d⁻¹ s. c. for 8 weeks. Meanwhile, treating with different dose of Liuwei Dihuang pill for 8 weeks. The learning and memory ability was observed by Morris water maze. Activities of mono amine oxidase(MAO) and acetylcholinesterase(AchE) in brain tissue were detected. **Results:** High and low dose Liuwei Dihuang pill can enhance learning and memory ability. It can also decrease activities of mono amine oxidase(MAO) and acetylcholinesterase(AchE) in brain tissue. **Conclusions:** Liuwei Dihuang pill can improve the deterioration of learning and memory induced by D-gal in rats. The possible mechanism are regulating of central cholinergic nerve system and noradrenergic nerve system.

[Key words] Liuwei Dihuang pill; D-galactose; Learning and memory; Mechanism of action

六味地黄丸是传统中医滋补肾阴的经典名方, 由熟地、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓按8:4:4:3:3:3比例配伍而成, 已有的研究表明, 六味地黄丸

有明显的延缓衰老作用^[1]。在衰老的进程中, 机体的学习记忆能力也随之下落, 这和增龄性“肾虚”有密切关系^[2]。本研究主要观察六味地黄丸对D-gal致衰老大鼠学习记忆能力的影响, 进一步探讨其改善学习记忆的机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性Wister大鼠, 体重300~350g,

[收稿日期] 2005-12-12

[通讯作者] 朱坤杰, Tel: 13120121236; E-mail: zhukunjie166@sohu.com

由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, SPF 级, 合格证号, SCXK(京) 2002-2003。

1.2 器材 Morris 水迷宫, 中国医学科学院药研究所研制; 日本产 7060 生化自动分析仪。

1.3 药品及试剂 单胺氧化酶(MAO)、乙酰胆碱酯酶(AchE)检测试剂盒, 均由南京建成生物工程研究所提供; 六味地黄丸, 北京同仁堂集团生产, 批号: 4015667。D-半乳糖(D-gal), 分子式: C₆H₁₂O₆, 分子量: 180.16, 纯度: 98%, 浙江一新制药股份有限公司生产, 批号: 020201。

2 方法

2.1 动物分组及给药 取雄性 Wister 大鼠 40 只, 按体重均衡随机分 4 组, 每组 10 只动物。分别为阴性对照组、模型组、六味地黄丸高剂量组、六味地黄丸低剂量。对照组 s. c. 0.1ml/100g 的生理盐水, 其余各组均 s. c. 7.5% D-gal 0.1ml/100g (75mg/kg), 每天一次, 连续给药 8 周, 复制亚急性衰老动物模型。同时灌胃 ig. 给药进行治疗。低剂量组 ig. 16.2% 的六味地黄丸 1.62g/kg (相当于临床等效剂量), 高剂量组 ig. 32.4% 的复方地黄 3.24g/kg (相当于临床等效剂量的 2 倍), 给药容量均为 1ml/100g。对照组和模型组灌胃同容量的生理盐水。连续给药 8 周, 于末次给药后 1h, 用 Morris 水迷宫测定大鼠的学习记忆功能。

2.2 Morris 水迷宫行为测试^[3]

2.2.1 定位航行实验(Place navigation test): 将每只大鼠颈背部毛发用普通染发剂涂黑, 准备好 Morris 水迷宫, 检测大鼠空间搜索和辨别的学习记忆能力。让大鼠进行定位航行, 第一天让大鼠自由游泳 2min, 以熟悉环境, 第二天起每日一段, 每段训练 4 次。即在一个直径 100cm, 高 60cm 的圆形水池中放入直径 9cm, 高 39cm 的平台, 水深 40cm, 水温 26℃±1℃, 水中加入牛奶, 池内标有东西南北四个入水点, 将水池分为 4 个象限: SW、NW、SE、NE, 站台位于 SW 象限, 距圆心 23cm, 距池壁 21cm, 固定好站台后, 分别从 4 个入水点处将大鼠面向池壁放入水池中, 记录大鼠从入水点开始至找到平台的时间(潜伏期, SPL)、运行路径、诱导次数(动物若 2min 内找不到安全区, 则由实验者将其放回安全区, 称为诱导一次), 取第 4 天的平均值作为学习成绩, 共进行 4 天。

2.2.2 空间搜索实验(Spatial probe test) 在实验的第 5 天下午, 第 5 次训练时拆除水下平台, 然后任选

一入水点将大鼠面向池壁放入水中, 测其在 120s 内跨越平台相应位置次数。

2.3 测定脑组织 MAO-B 及 AchE 活性 学习记忆能力测试结束后, 将大鼠断头处死, 取端脑称重, 用生理盐水制成 10% 的脑组织匀浆, 采用考马斯亮兰法测定蛋白^[4], 并按文献方法^[5]测定脑组织中 MAO、AchE 活性, 操作严格按照试剂盒说明书进行。

2.4 统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行比较; 计数资料用率表示, 用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 六味地黄丸对 D-gal 致衰老大鼠学习记忆能力的影响 结果见表 1、表 2。

表 1 六味地黄丸对 D-gal 致衰老大鼠定位航行能力的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量 (g/kg)	潜伏期 (sec)	路径 (cm)	诱导次数 (次/组)	诱导百分比 (%)
对照组	—	42.0 ± 10.5	682.6 ± 32.3	1	2.5 ¹⁾
模型组	—	70.9 ± 9.6 ³⁾	977.1 ± 11.1 ³⁾	11	27.5
六味地黄丸	1.62	46.2 ± 10.2 ¹⁾	824.5 ± 23.1 ¹⁾	3	7.5 ¹⁾
六味地黄丸	3.24	34.4 ± 6.6 ¹⁾	650.9 ± 10.7 ²⁾	2	5.0 ¹⁾

注: 与模型组比¹⁾ P < 0.05; ²⁾ P < 0.01。(下同)

D-gal 致衰老大鼠空间搜索和辨别学习能力减弱, 到达平台的潜伏期延长, 搜索路径增加, 诱导次数及诱导百分比增加。高、低剂量的六味地黄可以使大鼠空间搜索和辨别的学习能力增强, 到达平台的潜伏期缩短, 搜索路径缩短, 诱导次数及诱导百分比减少。

表 2 六味地黄丸对 D-gal 致衰老大鼠空间搜索能力的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量 (g/kg)	跨越平台的次数
对照组	—	11.2 ± 2.9 ¹⁾
模型组	—	5.21 ± 1.8
六味地黄丸	1.62	8.57 ± 2.3 ¹⁾
六味地黄丸	3.24	9.94 ± 2.2 ¹⁾

D-gal 致衰老大鼠的记忆能力明显下降, 和对照组比, 跨越平台的次数减少, P < 0.05。高、低剂量的六味地黄丸增加大鼠跨越平台的次数, 和模型组比较, P < 0.05。

3.2 六味地黄丸对 D-gal 致衰老大鼠脑组织 MAO 及 AchE 活性的影响 结果见表 3。

D-gal 可以使脑内胆碱酯酶活性增强, 造成中枢

胆碱能系统的功能障碍,同时可以使单胺氧化酶活性增高。高、低剂量的六味地黄丸则可以逆转造模后的胆碱酯酶及单胺氧化酶活性的变化。

表 3 六味地黄丸对大鼠脑组织单胺氧化酶和胆碱酯酶活性的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量 (g/kg)	MAO-B (U/mgpr/h)	AchE (活力单位/mgpr)
对照组	—	2.01 ± 0.40 ²⁾	0.28 ± 0.03 ²⁾
模型组	—	3.12 ± 0.41	0.43 ± 0.07
六味地黄丸	1.62	2.68 ± 0.42	0.26 ± 0.09 ¹⁾
六味地黄丸	3.24	2.20 ± 0.52 ¹⁾	0.20 ± 0.09 1)

4 讨论

D-gal 所致衰老模型是依据衰老的代谢学说而设计的,给动物注射大剂量的 D-gal,出现与自然衰老动物相似的生理生化改变。已有的研究发现, D-gal 所致衰老^[6]模型动物的学习记忆能力减退,我们的实验结果和文献一致。

中医认为,学习记忆是脏腑功能活动的外在表现,尤其与肾和脑的关系最密切,中医治疗学习记忆障碍多从补肾填精论治^[7]。六味地黄丸是滋阴补肾的经典方剂,本实验采用 Morris 水迷宫检测动物的学习记忆能力。结果显示,高、低剂量的六味地黄丸可以增强 D-gal 致衰老大鼠的定位航行和空间搜索能力,改善 D-gal 致衰老大鼠的学习记忆。

在 70 年代初,Deutsch 等提出了阿尔茨海默病(AD)的胆碱能损伤学说。目前认为,中枢乙酰胆碱系统的缺失虽不是 AD 的特异性病理变化,任何原因的学习记忆障碍,均有可能造成中枢胆碱能系统功能的障碍,并成为各种不同类型的学习记忆障碍发病机理中共同的或最终的联系。乙酰胆碱相对不足,导致胆碱能神经的功能障碍影响学习记忆^[8,3]。本实验显示,高、低剂量的六味地黄丸可逆转 D-gal 所致大鼠脑组织中胆碱酯酶活性增加,使乙酰胆碱增加。

此外,研究发现人脑 MAO-B 活性 45 岁后随年龄的增加而急剧升高,与年龄呈正相关。同时中枢 MAO-B 的活性是影响自由基形成的重要因素^[9]。六

味地黄丸使脑内 MAO-B 活性降低。

学习记忆能力的降低是衰老的重要特征之一,它反映了脑功能的退化,即脑老化。这种变化与中枢神经系统的递质也有密切关系。本次实验结果显示,六味地黄丸可以逆转 D-gal 所致大鼠脑内 MAO-B 和 AchE 活性改变,从而调节中枢神经系统中两大类神经的功能平衡。因此,协调胆碱能神经和儿茶酚胺能神经功能可能是六味地黄丸改善学习记忆能力的物质基础之一。

[参考文献]

- [1] 周坤福,王明艳,赵凤鸣,等.六味地黄丸延缓衰老作用机制的实验研究[J].江苏中医,1999,20(1):44-45.
- [2] 周金黄,刘干中,王建华,等.老年性痴呆的研究进展[M].中药药理与临床.第4册.北京军事医学科学出版社,1996:219-225.
- [3] 赖红,赵海花,高杰,等.新型胆碱酯酶抑制剂对 AD 大鼠空间记忆及海马结构胆碱能纤维的影响,中国药理学通报,2005,21(7):807-810.
- [4] 宋晓伟,康健,林滢.改良的考马斯亮兰 G-250 染色法简便快速测定微量蛋白浓度[J].洛阳医学学报,1997,16(3):150-152.
- [5] 杨军,王静,姜文,等.赤芍总苷对 D-半乳糖衰老小鼠学习记忆及代谢产物的影响[J].中国药理学通报,2001,17(6):697-700.
- [6] 张熙,李文斌,张丙烈.D-半乳糖诱导拟衰老动物模型的记忆行为改变[J].中国老年学杂志,1996,16(4):230.
- [7] 周建政,张永祥,周金黄.六味地黄汤对快速老化模型小鼠(SAM)学习记忆能力的改善作用[J].中国实验方剂学杂志,1994,5(4):29.
- [8] 谢宁,何秀丽,周妍妍,等.地黄饮子对老年痴呆模型大鼠行为学、AchE 及 Na⁺ K⁺-ATP、Ca²⁺-ATP 酶活性的影响[J].中医药学刊,2004,22(7):1162-1163.
- [9] Fischer P, Gotz ME, Elliger B, et al. Platelet monoamine oxidase B activity and vitamin B12 in dementia [J]. Bio Psychiat, 1994, 35: 772-774.