

# 调心方活性部位对大鼠 海马脑片 CA1 区诱发 LTP 的影响

乔海法, 杨 胜, 周文霞, 张永祥  
(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要:**目的: 研究调心方活性部位 A 对大鼠海马脑片诱发长时程增强(LTP) 效应的影响。方法: 采用细胞外微电极记录技术, 记录大鼠海马脑片 CA1 区诱发群峰电位(PS), 然后施以 100Hz, 100 串的强直刺激诱发 LTP。结果: 调心方活性部位 A 对大鼠海马脑片正常 PS 的形状、幅度无影响, 提示并不影响海马的基础突触传递。给予强直刺激后, 高浓度活性部位 A 可以明显增大 LTP 幅度, 提示具有促进和维持 LTP 的作用。结论: 调心方活性部位 A 可能是调心方促进和维持大鼠海马脑片诱发 LTP 的有效成分之一, 对 LTP 的促进作用也是调心方活性部位 A 益智作用的机制之一。

**关键词:** 调心方; 长时程增强; 海马脑片

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-9903(2005)01-0031-04

## Effect of Active Fraction of Tiaoxin Recipe on Long-term Potentiation of CA1 in Rat Hippocampal Slices

QIAO Hai-fa, YANG Sheng, ZHOU Wen-xia, ZHANG Yong-xiang

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China)

**Abstract:** Aim: To investigate the active fraction A (TRX-A) of Tiaoxin Recipe (TXR) on long-term potentiation (LTP) of CA1 area in the rat hippocampal slices. Methods: LTP in CA1 area of rat hippocampal slices, which was induced by high frequency stimulation (100Hz, 100pulses), was recorded with extracellular recording technique. Results: TXR-A or TXR showed no effect on baseline synaptic responses. Compared with the slices pre-incubated and perfused with decoction-free artificial cerebrospinal fluid (ACSF), population spike (PS) amplitude of slices exposed to TXR-A or TXR ACSF was significantly increased after high frequency stimulation. Conclusion: TXR-A is one of TXR active fractions which facilitate LTP in CA1 area of slices from rat.

**Key words:** Tiaoxin Recipe; Long-term potentiation; hippocampal slice

阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease, AD) 是发生于老年前期或老年期的以进行性痴呆为主要症状同时伴有精神行为异常的神经退行性疾病, 其显著特征是严重的记忆丧失和个性改变, 患者生活不能自理, 寿命明显缩短<sup>[1]</sup>。由于该病病理变化的复杂性, 目前取得的研究成果尤其是化学治疗药物方面十分有限, 迄今临床上尚无理想的预防和治疗药物。相比之下, 传统中医药在治疗老年性痴呆方面显示了独特的药效学特点。临床研究表明, 由党参、桂枝、茯苓、菖蒲、远志和炙甘草等中药组成的调心方 (TXR) 能改善 AD 患者的认知功能障碍, 对中、重度

AD 患者均有一定的治疗作用<sup>[2-4]</sup>。动物实验也显示, TXR 可以明显改善  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $\beta$ -AP) 诱导的痴呆模型大鼠的空间学习记忆障碍<sup>[5,6]</sup>。我室以往的研究结果表明, TXR 对整体大鼠及离体大鼠海马脑片诱发长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 具有易化和促进作用, 提示提高海马突触可塑性可能是该方改善 AD 患者认知功能障碍的作用机制之一<sup>[7-9]</sup>。为深入探讨 TXR 发挥益智作用的物质基础, 我们通过药理和化学研究的密切配合, 获得了几个部位, 其中, 部位 A 中总皂甙含量占 70% 以上, 初步动物实验结果表明, 该部位对  $\beta$ -AP (25-35) 诱导的痴呆模型大鼠的空间学习记忆障碍具有明显改善作用, 提示该部位可能是 TXR 发挥益智作用的活性部位之一。为进一步探讨其发挥益智作用的机理, 本研究采用细胞外微电极记录技术, 观察了调心方活性部位 A (TXR-A) 对大鼠海马脑片诱发 LTP 的影响,

收稿日期: 2004-03-15

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (39830450)

通讯作者: 周文霞, Tel: (010) 66931625, Fax: (010) 68211656,

E-mail: Zhouwx@nic.bmi.ac.cn

并与调心方全方的作用进行了比较。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 二级 Wistar 大鼠, 雌性, 体重 160~200g, 由军事医学科学院动物中心提供。

**1.2 药品及试剂** TXR 为水提醇沉制成的水溶液, 含生药 7.45g/mL; 活性部位则采用水煎、醇沉, 进而以乙醚、正丁醇提取的工艺进行提取。TXR-A 配成含生药 7.45g/mL 的溶液。上述溶液均由上海中医药大学老年医学研究所提供。实验中所使用的无机盐购自国内, 均为分析纯。

**1.3 海马脑片制备** 将大鼠在乙醚麻醉下断头取脑, 于大脑半球腹内侧分离出双侧海马, 在 4℃ 供氧条件下, 用振动切片机 (Vibroslicer MA752, Campdenins, UK) 沿与海马长轴垂直的方向将其切成厚为 400μm 的脑片, 全部脑片置于不断通入氧混合气 (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) 的人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 中, 在室温 (20~28℃) 下孵育 > 1.5h。ACSF 的成分为 (mmol/L): NaCl 124、KCl 5、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2、MgSO<sub>4</sub> 1.3、NaHCO<sub>3</sub> 26、CaCl<sub>2</sub> 2.5、D-Glucose 10, 调节 pH 值至 7.3~7.4。

**1.4 群峰电位记录** 将孵育后的脑片置于脑片浴槽中并固定, 不断通入氧混合气, 用蠕动泵持续灌流 ACSF (1~1.5mL/min), 使海马脑片全浸于液面下。整个实验过程用恒温器将浴槽温度控制在 (30±1)℃。双极刺激电极置于由 CA3 区锥体细胞发出的 Schaffer 侧支上, 记录用玻璃微电极 (内充 4 mol/L NaCl 溶液, 阻抗 3~7 MΩ) 置于海马 CA1 区锥体细胞层, 由刺激器 (SEN-7203, Japan) 输出刺激信号经隔离器 (SS-104J, Japan) 至刺激电极。记录细胞外诱发群峰电位 (population spike, PS) 则通过微电极放大器 (Axoclamp2A, Axon Ins, USA) 与计算机联接, 由 Pclab2.2 软件 (北京微信斯达科技发展有限公司) 进行采样处理。

**1.5 LTP 的诱发** 实验开始时, 先用中等强度的单刺激 (60sec interval, 200μs duration) 诱发出特征性的基础 PS, 稳定记录 10min, 使 PS 达到稳定, 调节 PS 至最大幅度的 50~60%, 再稳定记录 15min, 然后给予 Schaffer 侧支纤维 100Hz、100 串的高频刺激 (high frequency stimulation, HFS), 此时可以记录到增大的 PS, HFS 后连续记录 1h。

**1.6 观测指标和测量方法** PS 幅度: 实验中以 PS 幅度相对值 (%) 为观测指标, 并观察其平均幅度 (LTP 幅度) 情况, 计算方法见图 1。具体测定方法

是: 每 5 个时间点平均得一个值, 以 HFS 之前 15min 内的 PS 均值为 100%, 每 5 个时间点平均得到的值分别与 HFS 之前的 PS 均值比较, 得各时间点的 PS 幅度相对值, 以百分数 (%) 表示。对于整体的平均幅度则是将 HFS 后的全部 60min PS 幅度均值与 HFS 之前的 PS 均值相比而得。

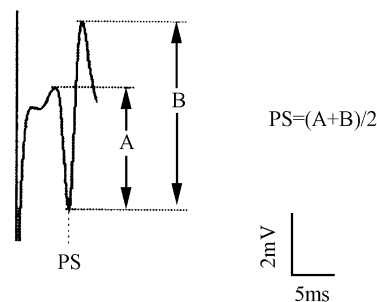


图 1 大鼠海马脑片 CA1 区诱发 PS 波形 A 和 B 分别是 PS 的下降支和上升支幅度

**1.7 给药方法** 将 TXR 溶液及 TXR-A 溶液离心, 并用 ACSF 稀释为所需浓度。其中, TXR 稀释 1000 倍, 使其终浓度为 1% (含生药 7.45 mg/mL); TXR-A 溶液则分别稀释 2000、1000、500 倍, 使终浓度分别为 0.5% (含生药约 3.75mg/mL), 10% (含生药 7.45mg/mL), 2% (含生药 14.9mg/mL)。当观察药物对海马脑片基础突触传递的影响时, 先用 ACSF 灌流并记录正常的 PS, 稳定后改用含药 ACSF 灌流并观察其是否发生变化; 当观察药物对海马脑片 LTP 的影响时, 在实验前用含药 ACSF 孵育海马脑片 > 1.5h 并于整个实验记录过程中采用此溶液灌流。

**1.8 数据分析及统计学处理** 采用 Origin 6.0 软件 (Microcal Software, USA) 及 SAS 软件包 (Release 6.12, Sas institute Inc, USA) 对所获数据进行分析作图和统计学处理。定量资料数据用“平均值±标准差 (mean±SD)”表示。LTP 的动态变化采用具有一个重复测量的两因素方差分析 (two-way ANOVA), 而 1h 平均 PS 增幅则采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 多组间比较用 SNK 检验。

## 2 结果

**2.1 调心方活性部位 A 对大鼠海马脑片基础突触传递的影响** 首先以 ACSF 灌流海马脑片, 记录正常 PS, 稳定后再用含 TXR 或 TXR-A 的 ACSF 灌流, 分别观察它们对脑片基础 PS 的影响。结果表明, 脑片在灌流 TXR 及不同浓度 TXR-A 的 30min 内, PS 的形状、幅度均没有发生明显变化, 提示调心方活性部位 A 不影响大鼠海马脑片的基础突触传递。

**2.2 调心方活性部位 A 对大鼠海马脑片诱发 PS 幅**

度的影响 预先分别用含 TXR 或 TXR-A 的 ACSF 孵育海马脑片 > 1.5h, 并在记录 PS 以及随后诱发 LTP 的过程中一直采用同样浓度的含药 ACSF 灌流, 观察其对脑片诱发 PS 及 LTP 幅度的影响。结果显示 (图 2), HFS 后 2% 浓度 TXR-A 组在各时间点的 PS 幅度相对值明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 与 TXR 组相比, 个别点的作用不如 TXR ( $P < 0.05$ ); 2% TXR-A 组脑片 HFS 后 60min 内的 LTP 增幅明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 但作用较 TXR 组弱 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

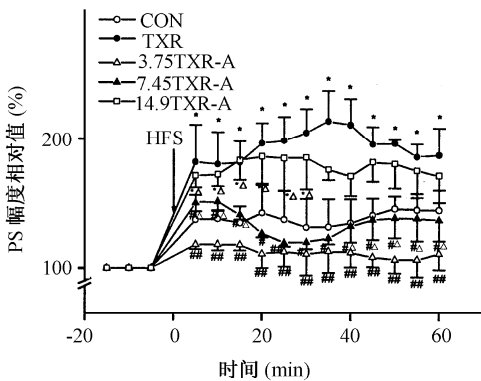


图 2 不同浓度调心方活部位 A 对大鼠海马脑片诱发 LTP 不同时间点 PS 幅度的影响

CON: 对照组 (正常 ACSF 组); TXR: 调心方组; TXR-A: 活性部位 A 组, 与对照组比较\*  $P < 0.05$ ; 与调心方组比较#  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ ; 不同浓度活性部位 A 之间比较^  $P < 0.05$ , ^^  $P < 0.01$ ,  $n = 6$ 。下同。

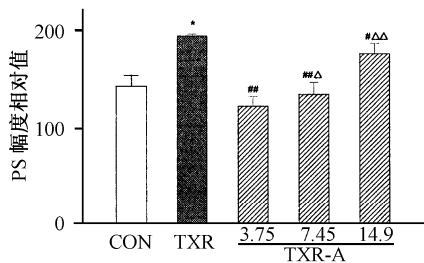


图 3 不同浓度调心方活性部位 A 对大鼠海马脑片诱发 LTP PS 平均幅度的影响

### 3 讨论

学习记忆是中枢神经系统的重要功能, 神经元之间的突触联系, 是形成这一功能的重要物质基础。已有研究表明, 突触可塑性与学习记忆行为存在着密切联系, 而 LTP 则被认为是反映突触可塑性的一个重要指标<sup>[10]</sup>。临床和动物实验的研究表明, 调心方对 AD 患者和  $\beta$  淀粉样蛋白诱导的大鼠两者学习记忆障碍的认知功能均具有改善作用<sup>[3,4,6,11]</sup>。调心方具有易化和维持海马 LTP 的作用, 这可能是其实现促智作用的机制之一<sup>[7-9]</sup>。

本实验以 LTP 为指标, 观察了调心方的活性部

位 A 对海马脑片诱发 LTP 的影响。结果表明, 实验中不同浓度的活性部位对大鼠海马脑片正常穿通路的突触活动没有影响, 但高浓度活性部位 A 可以增强 LTP 幅度。因此, 调心方该活性部位可能是原方发挥易化和维持 LTP 作用的有效成分之一, 它对 LTP 的易化作用是发挥益智作用的机制之一。与调心方全方的作用比较表明, 不但相同浓度的活性部位作用不如调心方, 即使两倍于调心方浓度的活性部位作用也不如调心方。然而, 在  $\beta$  淀粉样蛋白 (25-35) 脑片模型及皮质酮脑片模型上的实验则发现, 虽然与调心方相同浓度的活性部位的作用不如调心方, 但两倍浓度的活性部位的作用则明显优于调心方 (结果另文发表), 提示本活性部位发挥益智作用可能与受试对象的机能状态有明确关联。

由于本活性部位中的总皂甙含量达 70% 以上, 而近年来的研究证明, 甙类化合物在治疗老年痴呆方面具有良好的效果, 如 80 年代即证实属于三萜类皂甙的人参皂甙 Rg1 Rb1 对老年痴呆模型具有明显作用。而属于甾体类皂甙的知母皂甙治疗老年痴呆的作用也已获美国专利。无疑, 这对本活性部位进行深入的药理学研究提供了有益参考, 本活性部位中具体各皂甙的成分及含量、药理学特点等将在以后的研究得到进一步的分离和研究。

### 参考文献:

- [ 1 ] Cummings JL, Vinter HV, Cole Gm, et al. Alzheimer's disease ( etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities) [ J ]. Neurology, 1998, 51 ( Suppl ) : 2-17.
- [ 2 ] 林水淼, 杨柏灿. 养心健脑液治疗 Alzheimer 痴呆的临床研究 [ J ]. 上海中医药大学学报, 1997, 11 ( 1 ): 44-45.
- [ 3 ] 李亚明, 张春燕, 王健, 等. 调心方对中、重度老年性痴呆病智力的影响 [ J ]. 现代康复, 2000, 4 ( 7 ): 996-997.
- [ 4 ] 周如倩, 林水淼, 王健, 等. 中药调心方、补肾方改善阿尔茨海默病认知功能的临床研究 [ J ]. 现代康复, 2001, 5 ( 6 ): 46-47.
- [ 5 ] 周晖, 赵伟康. 调心方对  $\beta$ -AP 大鼠痴呆模型空间学习记忆障碍和胆碱能系统的影响 [ J ]. 中药药理与临床, 1998, 14 ( 3 ): 29-31.
- [ 6 ] 刘学源, 徐品初, 林水淼, 等. 调心方对杏仁核注射 A $\beta$  大鼠记忆行为和胆碱能系统作用的研究 [ J ]. 现代康复, 2001, 5 ( 5 ): 48-49.

- [ 7 ] 刘振伟,张永祥.调心方对麻醉大鼠海马长时程增强的作用[J].中药药理与临床,2002,18(3):4-6.
- [ 8 ] 万勤,张永祥.调心方对大鼠海马脑片长时程增强效应的影响[J].中国中西医结合杂志,2002,22(11):835-837.
- [ 9 ] 万勤,张永祥.调心方对 $\beta$ -淀粉样蛋白和皮质酮抑制大鼠海马脑片CA1区LTP的作用影响[J].中国实验方剂学杂志,2002,(6):22-25.
- [ 10 ] Bliss T, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus[J]. Nature, 1993. 361: 31-39.
- [ 11 ] 王健,林水淼,陆金宝,等.调心方、补肾方治疗Alzheimer病的比较研究[J].上海中医药大学学报,2001,15(3):19-21.