

开心散有效部位对小鼠学习记忆功能的影响

尚伟芬¹, 刘江云¹, 齐云¹, 徐丽珍¹, 蔡润兰¹, 吴彬¹, 杜力军²

(1 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094;

2 清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要: 用药理研究指导植化分离, 寻找中药复方开心散有效部位(KXS), 探讨其益智作用及机理。采用氢溴酸东莨菪碱造模, 用跳台法和水迷宫测试小鼠的学习记忆能力, 测定小鼠大脑组织乙酰胆碱酯酶(AchE)和超氧化物歧化酶(SOD)活性以探讨其作用机理。跳台法测试表明模型组正确区时间(Ts)缩短, KXS能延长Ts, 水迷宫实验结果显示, 模型小鼠游泳时间明显延长, KXS能缩短游泳时间。KXS能逆转模型小鼠AchE活性的升高和SOD活性的降低。实验结果提示KXS对模型小鼠的学习记忆能力有一定的改善作用。

关键词: 开心散; 乙酰胆碱酯酶; 跳台; 水迷宫

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2003)02-0024-04

Effects of KXS on Ability of Learning and Memory in Mice

SHANG Weifen¹, LIU Jiang-yun¹, QI Yun¹, XU Li-zhen¹, CAI Run-lan¹, WU Bin¹, DU Li-jun²

(1. Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Uni Medical College Institute of Medicinal Plant Development, Beijing 100094, China; 2. Department of Biological Sciences and Technology, TsingHua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Objective: To study the effects and mechanisms of "kai xing san" (KXS) on ability of learning and memory in mice. Methods: Passive avoidance performance (Step-down test) and water maze methods were used to evaluate the effects of KXS on ability of learning and memory in mice. Spectrophotometry was employed to determine acetylcholine esterase(AchE) and SOD activities in whole brain. Results: In water maze, mice with memory impairments induced by Scopolamine hydrobromide took longer latency to reach the end point, while KXS can reduce the latency. In step-down test, the right time (Ts) of the mice with memory disorders is shorter than that of the normal, while KXS can prolong Ts. KXS shows activities against the elevated AchE activity and the decreased SOD activity in whole brain of mice with memory disorders. Conclusion: KXS can improve the ability of learning and memory in models induced by Scopolamine Hydrobromide.

Key words: kai xin san; acetylcholine esterase(AchE); step-down test; waer maze

随着老年化社会的到来, 老年性痴呆(Alzheimer's Disease AD)的发病率逐年升高。由于AD的病理机制尚不清楚, 所以目前仍缺乏理想的药物。中药复方可作用于多系统、多环节、多途径, 因此有其独特的优势。

开心散始见于唐·孙思邈《备急千金要方》, 由远志、人参等组成, “主好忘”, 为益气养心、安神之代表方剂。开心散历代医家研究颇多, 化裁不同。《千金方》之定志小丸, 主心气不足, 五脏不足, 忽忽喜忘。许多益智类方剂都是在此基础上加减而成。开心散的现代药理研究也不少^[1~4], 各家研究的处方配比

都不同, 但剂型仍停留在传统的水煎和醇提, 这限制了该药的应用和发展。我们通过药理和植化研究密切结合, 比较了不同配比方剂的优劣, 研究了提取工艺, 找到其有效部位。本文报道开心散有效部位(KXS)对化学致痴呆小鼠记忆功能及其大脑组织乙酰胆碱酯酶(AchE)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响。

1 材料

1.1 动物 ICR小鼠, 80只, 雌雄各半, 16~18g, 北京维通利华试验动物技术有限公司提供。许可证号: scxk(京)2002~0003。

昆明种小鼠, 100只, 雌雄各半, 16~18g, 军事医学科学院试验动物中心提供。许可证号: 京动许字

99001。

1.2 药品和试剂 开心散由人参、远志、茯苓、石菖蒲组成,乙醇提取,经树脂纯化,经药理试验筛选出第3号有效部分(主要含皂苷、糖酯类等成分),由中国医学科学院药用植物研究所植化室提供。氢溴酸东莨菪碱,购自中国药品生物制品检定所。脑复康粉剂(吡拉西坦),由中国医学科学院药物所屈志伟老师馈赠。乙酰胆碱酯酶试剂盒购自南京建成生物工程研究所。邻苯三酚(焦性没食子酸)分析纯,贵州遵义市建强化工厂生产。其它试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 跳台计算机自动分析处理系统,中国医学科学院药用植物研究所与航天医学工程研究所联合研制;方形水迷宫,中国医学科学院药物研究所研制;LD5-2A离心机,北京医用离心机厂生产;HOSHIZAKI F1208型制冰机;DY89-I型玻璃匀浆机,宁波新芝科器研究所生产;752紫外光栅分光光度计,上海第三分析仪器厂生产。

2 方法

2.1 对被动回避反应试验(跳台法)的影响 采用小鼠跳台法^[5]。小鼠预先进行筛选,将小鼠放于跳台箱内,通以35V电流,动物受电击后,其正常反应为跳上跳台,逃避电击,挑选出反应敏感的小鼠。然后将筛选出的小鼠随机分为7组,空白组,东莨菪碱(Scop)模型组,阳性药石杉碱甲组,阳性药脑复康组(Pir),开心散有效部位小剂量组118.5mg/kg(相当于5g生药/kg)、大剂量组237mg/kg。每天灌胃一次、连续灌胃11d,空白组、模型组、石杉碱甲组灌胃同体积蒸馏水。最后一天灌胃给药30min后,腹腔注射(ip)东莨菪碱2mg/kg,而石杉碱甲组则灌胃给药后15min腹腔注射东莨菪碱。ip东莨菪碱20min后开始跳台训练。小鼠先在跳台测试箱内适应3min,然后通以35V电流,共测试5min。计算机自动记录小鼠安全区(Ts)、错误区(Te)、潜伏期时间(LP)及错误次数(Ne)。24h后,测试小鼠记忆巩固。

2.2 对东莨菪碱所致小鼠空间障碍的影响 将60只ICR小鼠随机分为5组,每组12只,空白组,东莨菪碱模型组,开心散有效部位小剂量组、大剂量组(剂量同上),阳性药脑复康组,每天灌胃1次,连续灌胃12d,第12d开始水迷宫测试^[6]。水迷宫共测试5d,每天给药30min后,ip东莨菪碱0.5mg/kg,再过20min开始水迷宫测试,训练由近渐远,起点从先是A点,然后B点,最后C点,每只动物每天训练一次,

2min/次,记录每只动物进入盲端的次数(错误次数,Ne)以及游泳时间(T)。2min内没游出者按120s计。以错误次数及游泳时间作为小鼠空间辨别障碍的指标。

2.3 对小鼠大脑组织内乙酰胆碱酯酶(AchE)活力的影响 将72只ICR小鼠随机分为6组,每组12只,空白组,东莨菪碱组,开心散小剂量组,中剂量组,大剂量组,阳性药脑复康组,每天灌胃一次,连续灌胃26d,最后一天,给药后30min,ip东莨菪碱2mg/kg,再过20min颈椎脱臼处死小鼠,迅速取出小鼠脑组织,分离出大脑组织,-20℃冰箱保存,待测AchE。加入预冷的1/15M磷酸钠缓冲溶液(pH=7.2),冰浴制成10%组织匀浆,蛋白定量采用Bradford法^[7]。

AchE活性的测定方法采用南京建成生物研究所试剂盒方法进行。AchE水解乙酰胆碱生成胆碱和乙酸,胆碱可以与巯基显色剂反应生成TNB黄色化合物,根据颜色的深浅进行比色定量,水解产物胆碱的数量可反应AchE活力。具体操作按测定试剂盒进行。

2.4 对小鼠大脑组织内超氧化物歧化酶(SOD)活力的影响 分组和给药以及取脑组织同AchE的测定,脑组织加入预冷的生理盐水,冰浴制成10%组织匀浆,蛋白定量采用Bradford法^[7]。SOD采用邻苯三酚自氧化法测定。邻苯三酚在碱性条件下能发生自氧化,生成有色中间物和超氧阴离子,后者对自氧化起催化作用,SOD能清除超氧阴离子,从而抑制邻苯三酚自氧化,依据邻苯三酚自氧化的变化,推算出SOD活力^[8]。

2.5 统计学方法 大部分数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用t检验。

3 结果

3.1 东莨菪碱对小鼠被动回避能力的影响及KXS的保护作用 从表1看出,东莨菪碱模型组呆在跳台上的时间(Ts)较正常组显著缩短,KXS能增加小鼠Ts,特别是KXS大剂量组与模型组比较有差异显著性。模型组Ne增多,KXS有减少Ne的趋势,但差异没有显著性。

3.2 KXS对东莨菪碱引起的小鼠空间障碍的影响

从表2可以看出,东莨菪碱模型组游泳时间(T)较正常组明显延长,开心散有效部位能缩短小鼠游泳时间,从B2、C2、C3几天的游泳结果可以看出,KXS给药组游泳时间逐渐缩短,C3(C点第三天)KXS

大剂量与模型组比较差异有显著性。同时模型组错误次数(Ne)明显增加, KXS 能降低模型小鼠的 Ne。模型组游出百分率(Rc%)相对减少, KXS 组游出百分率较模型组升高。

表1 KXS 对东莨菪碱所致小鼠记忆获得障碍的影响($\bar{x} \pm s; n = 10$)

组别	剂量 (mg/kg)	训练(第1d)		测试(第2d)	
		Ts(s)	Ne	Ts(s)	Ne
空白对照组		283.92 ± 10.97	0.60 ± 0.70	299.89 ± 0.00	
东莨菪碱组		64.11 ± 108.05**	2.10 ± 3.11	69.45 ± 95.50**	
KXS	118.5	68.08 ± 85.53	3.67 ± 5.48	142.26 ± 127.61	
	237.0	129.23 ± 123.73	1.44 ± 1.42	262.59 ± 81.30**	
脑复康组	450.0	65.38 ± 107.25	1.67 ± 1.66	127.66 ± 144.36	
石杉碱甲组	0.2	99.88 ± 108.26	1.56 ± 3.54	163.35 ± 127.72	

注:与正常组比较** $P < 0.01$; 与模型组比较** $P < 0.01$

表2 KXS 对东莨菪碱所致小鼠空间障碍的影响($\bar{x} \pm s; n = 12$)

组别	剂量 (mg/kg)	Ne	T(s)	Rc(%)
B2 空白对照组			71.67 ± 42.10	66.7
			107.83 ± 20.46	41.67
	118.5		77.92 ± 52.67	41.67
	237.0		82.55 ± 44.15	54.55
C2 空白对照组		2.67 ± 1.97	41.50 ± 29.97	100.00
		8.75 ± 6.14**	73.83 ± 39.07*	66.67
	118.5	7.67 ± 4.83	77.83 ± 48.88	50.00
	237.0	6.09 ± 5.05	56.09 ± 38.75	81.81
C3 空白对照组		4.00 ± 3.33	43.17 ± 39.05	83.33
		8.00 ± 4.71*	88.58 ± 47.12*	33.33
	118.5	6.73 ± 4.83	73.17 ± 42.20	58.33
	237.0	7.00 ± 5.13	38.17 ± 25.17#	72.73
脑复康组	500.0	6.05 ± 4.77	57.33 ± 41.67	83.33

注:与对照组比较* $P < 0.05$; 与模型组比较# $P < 0.05$

3.3 KXS 对小鼠大脑组织 AchE 活性的影响 东莨菪碱模型组 AchE 活力明显增高, KXS 能够抑制酶的活性, 大剂量组与模型组比较有显著性差异。阳性药脑复康也明显降低 AchE 的活性。

3.4 KXS 对小鼠大脑组织 SOD 活性的影响 从表4可以看出, 东莨菪碱模型组 SOD 活性较正常组有明显降低, KXS 大剂量组能逆转 SOD 活性的降低。

表3 各组动物大脑组织 AchE 活性的变化($\bar{x} \pm s; n = 12$)

组别	剂量 (mg/kg)	乙酰胆碱酯酶 ($\mu\text{mol/mg 蛋白}$)
空白对照组		3.263 ± 0.895
东莨菪碱模型组		4.039 ± 0.486*
KXS 组	118.5	3.646 ± 0.685
	237.0	3.673 ± 1.116
脑复康组	355.5	3.150 ± 0.519##
	500.0	2.919 ± 0.573##

表4 KXS 对小鼠大脑组织 SOD 活性的影响($\bar{x} \pm s; n = 12$)

组别	剂量 (mg/kg)	SOD 活性 (u/mg 蛋白)
空白对照组		1678.39 ± 479.53
东莨菪碱模型组		1007.92 ± 170.59*
KXS 组	118.5	964.33 ± 197.98
	237.0	963.27 ± 288.74
脑复康组	355.5	1165.34 ± 191.69#
	500.0	1119.49 ± 136.22

4 讨论

开心散是益智类方剂的基本方, 从补益心脾, 养心安神, 化痰开窍入手, 达到益智健脑的目的, 开心散有效部位是在开心散的基础上加工提取而成。本文报道的结果显示 KXS 对由化学药品所造成的记忆获得障碍、空间障碍有明显的改善作用。并能逆转东莨菪碱模型小鼠大脑组织中 AchE 活性的升高和 SOD 的降低。说明 KXS 有促进学习记忆能力的作用, 胆碱系统可能是其主要的用途途径。KXS 具有减轻脂质过氧化, 清除自由基的作用, 这也许是其健脑益智、抗衰老的途径之一。以上结果说明 KXS 是开心散方剂中主要的有效成分之一, 其益智作用可能是通过直接作用于中枢学习记忆的生理过程。

学习记忆是大脑最高级的功能, 学习记忆的脑机制主要包括神经生理机制和生化机制。前者主要探讨记忆在脑中的定位及其伴随的生物电活动规律; 后者主要采用神经药理和生化方法以阐明神经递质、神经肽及生物大分子对学习记忆的作用及其机理。各类递质中以中枢胆碱能系统最为注目^[9]。乙酰胆碱(Ach) 是中枢胆碱能神经系统重要的神经递质, 它由胆碱、乙酰辅酶 A 在胆碱乙酰转移酶(ChAT) 的催化下合成, 并由 AchE 分解。ChAT 和 AchE 共同维持 Ach 的动态平衡^[10]。老年性痴呆患

者胆碱能缺陷也说明胆碱能系统在学习记忆中的重要性。Ach 是与学习记忆密切相关的中枢神经递质,胆碱能神经的退变导致 Ach 浓度的降低,因此目前许多老年性痴呆患者的治疗措施是以使用胆碱酯酶抑制剂来增加 Ach 浓度为基础的。自由基诱发细胞膜或细胞器中不饱和脂肪酸发生过氧化作用,是生物学衰老的重要原因之一。自由基生成过量是神经退行性疾病的各种发病机制的“交汇点”。SOD 可以通过歧化作用清除体内氧自由基,从而减少脂质过氧化反应,维持生物膜结构及其正常功能。

现代医学证明,学习记忆障碍其机理是多方面的,它与脑内神经突触传递障碍,神经递质代谢异常、脑物质代谢、能量代谢异常密切相关^[1]。目前的工作还只是开始,KXS 的作用机理还将作进一步的研究。

参考文献:

- [1] 卞慧敏,郭海英,黄玉芳,等.开心散对四种动物模型记忆功能的影响[J].中国实验方剂学杂志,1999,5(5):51-53.
- [2] 王建,郑军,徐志国.单味人参、定志小丸等对小鼠脑组织胆碱酯酶活力的影响[J].陕西中医学院学报,1994,17(4):37-39.
- [3] Nobuyoshi Nishiyama, Yueping Zhou, Ken Takashina, et al.

Effects of DX-9386, a Traditional Chinese Preparation on Passive and Active Avoidance Performances in Mice[J]. Biol. Pharm. Bull. 1994, 17(11) 1472-1476.

- [4] 谢明村,楮俊杰,彭文煌.定志丸对东莨菪碱诱发大鼠被动回避反应的影响[J].中国中药杂志,1996,21(8):490-493.
- [5] 张均田,斋藤洋.十二种化学药品破坏小鼠被动回避性行为——跳台试验和避暗试验的作用的比较观察[J].药理学报,1986,21(1):12-19.
- [6] LIU Jing, ZHANG Hai-Yan, TANG Xi-Can, et al. Effect of synthetic (-)-huperzine A on cholinesterase activities and mouse water maze performance[J]. Acta Pharmacologica Sinica. 1998, 19(5):413-416.
- [7] MARION M. BRADFORD. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding[J]. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1976, 72: 248-254.
- [8] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理学实验方法[M].第二版.北京:人民卫生出版社,1982,502-506
- [9] 韩怡凡,陈先瑜.中枢胆碱能递质系统与学习记忆关系的研究[J].生理科学进展,1983,14(3):216-222.
- [10] 田金洲,杨承芝,杨惠民.复方大黄制剂对老年小鼠大脑皮质和海马 ChAT、AchE 活性及 Ach 含量的影响[J].中国老年学杂志,1999,19(1):32-33.
- [11] 陈奇 主编.中药药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,1994.738.