

# 脑还丹对快速老化小鼠学习记忆能力的影响及其抗氧化和抗凋亡作用

李庆明, 蒙荣森, 魏昌秀, 阚方巨, 黄启辉

(中山大学第二医院中医科, 广东 广州 510120)

**[摘要]** 目的: 观察脑还丹对快速老化小鼠学习、记忆的影响及其抗氧化、抗凋亡作用。方法: 将 40 只 SAM-P/8 快速老化小鼠随机分为 4 组: 模型组、银杏络组、脑还丹低剂量组和脑还丹高剂量组, 每组 10 只。模型组予以生理盐水灌胃, 其余各组予以相应药物治疗。治疗 105 d 后, 采用跳台实验及 Y 型迷宫实验进行小鼠行为学测试, 并检测小鼠血清超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 的含量。采用逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测小鼠大脑皮质及海马凋亡抑制基因 bcl-x1 mRNA 的表达。结果: 银杏络组和脑还丹低、高剂量组小鼠的学习、记忆成绩均明显优于模型组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 其中以脑还丹高剂量组的疗效最为显著 ( $P < 0.01$ )。银杏络组和脑还丹低、高剂量组小鼠血清 SOD、GSH-Px 的含量及大脑皮质和海马 bcl-x1 mRNA 的表达, 均明显高于模型组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 而血清 MDA 的含量则明显低于模型组 ( $P < 0.01$ )。结论: 脑还丹能改善快速老化小鼠的学习、记忆能力, 具有抗氧化及促进 bcl-x1 mRNA 表达的作用。

**[关键词]** 脑还丹; 阿尔茨海默病; 学习; 记忆; 抗氧化; 细胞凋亡; bcl-x1 mRNA

**[中图分类号]** R749.16 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2006)01-0048-04

## Effects of Naohuandan Recipe on learning and memory abilities of SAM-P/8 mice and its role in anti-oxidation and anti-apoptosis

Qing-Ming LI, Rong-Sen MENG, Chang-Xiu WEI, Fang-Ju KAN, Qi-Hui HUANG

(Department of Traditional Chinese Medicine, Second Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province 510120, China)

**ABSTRACT** Objective: To investigate the effects of Naohuandan Recipe on learning and memory abilities of SAM-P/8 mice and its role in anti-oxidation and anti-apoptosis. Methods: Forty SAM-P/8 mice were randomly divided into four groups, which were untreated (normal saline-treated) group, Yinkeluo Tablets (extracts of ginkgo leaf)-treated group, low-dose Naohuandan Recipe-treated group and high-dose Naohuandan Recipe-treated group. Mice in these groups were given corresponding drugs orally for 105 days. Then the performances of learning and memory of mice were tested by a step-down passive avoidance task and a Y-maze test. The serum levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected. The expression level of bcl-x1 mRNA in cerebral cortex and hippocampus of mice was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Results: The performances of learning and memory in the Yinkeluo Tablets-treated group, low- and high-dose Naohuandan Recipe-treated groups were significantly improved as compared with those in the untreated group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and such performance was the best in the high-dose Naohuandan Recipe-treated group among these four groups ( $P < 0.01$ ). The serum levels of SOD and GSH-Px and the expression of bcl-x1 mRNA in cerebral cortex and hippocampus of mice in the Yinkeluo Tablets-treated group, low- and high-dose Naohuandan

**[基金项目]** 广东省中医药管理局基金资助项目 (No. A002003002)

Correspondence to: Prof. Qing-Ming LI. E-mail: likehang@163.com

Recipe-treated groups were also significantly higher than those in the untreated group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), while the serum level of MDA in the untreated group was higher than that in the other three groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Naohuandan Recipe can improve learning and memory abilities of SAM-P/8 mice, and this effect may be related to its anti-oxidation efficacy and enhancement of expression level of bcl-x1 mRNA.

**KEY WORDS** Naohuandan Recipe; Alzheimer disease; learning; memory; anti-oxidation; apoptosis; bcl-x1 mRNA

Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao / J Chin Integr Med, 2006, 4(1):48-51 www.jcimjournal.com

对阿尔茨海默病的治疗是研究热点之一。我们在以往研究的基础上<sup>[1]</sup>,进一步研究了中药脑还丹对快速老化小鼠神经元损伤的保护作用及其机制,现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 仪器和试剂** Y型迷宫和跳台实验箱,由广州医学院和中山大学解剖学教研室提供;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒,均为南京建成生物工程研究所产品;UV-2201型紫外分光光度计,日本 Shimadzu 公司产品;逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒,日本 Takara 公司产品;TRIzol,美国 Invitrogen 公司产品;2700型 PCR 仪,PE 公司产品;IBAS 2.0 图像分析系统,德国 Kontron 公司产品;脑还丹(由骨碎补、熟地、石菖蒲、人参、远志等组成),由江阴制药厂提供颗粒冲剂,批号 0208136;银可络片(银杏叶提取物),25 mg/片,深圳海王药业产品,批号 20021004。

**1.2 实验动物** 3月龄雄性 SAM-P/8 快速老化小鼠 40 只,体质量 18~25 g,由北京大学医学部提供。

**1.3 动物分组及给药方法** 40 只小鼠随机分为 4 组,即模型组、银可络组、脑还丹低剂量组和脑还丹高剂量组,每组各 10 只。银可络组予以银可络 31.2 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;脑还丹低剂量组予以脑还丹冲剂相当于生药用量 20.8 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;脑还丹高剂量组予以脑还丹冲剂相当于生药用量 41.6 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,均灌胃给药,1 次/d,共治疗 105 d。模型组予以等量生理盐水灌胃。

**1.4 小鼠行为学测试** 治疗结束后,进行小鼠行为学测试实验。

**1.4.1 跳台实验** 实验时将小鼠放入跳台实验箱内,接通 25 V 交流电,小鼠遭到电击后跳上平台,多数小鼠可能再次跳回铜栅,受电击后又跳上平台,记录 5 min 内小鼠双足同时接触铜栅即受电击的次数,记为错误次数,作为学习成绩。24 h 后重复实

验,为记忆保持测验。测验时,先将小鼠放于平台上,底部铜栅通电后,启动秒表,记录小鼠第 1 次跳下的潜伏期(即将小鼠放于平台上起,至小鼠第 1 次双足接触铜栅的时间间隔)和 5 min 内的错误次数,作为记忆成绩。

**1.4.2 Y型迷宫实验** 实验装置为 1 个由不透明塑料板制成的 Y 型迷路箱,将其与可调变压器相连,电压为 36 V。通过电击控制器,可使由 3 条支臂末端长 18 cm 段相互围成的区域,交替作为起步区或安全区。训练时将小鼠放入起步区,操纵电击控制器,小鼠遭到电击后,若直接逃至安全区为正确反应,反之为错误反应。记录小鼠达到 9/10 正确反应前所经受的电击次数作为学习成绩。24 h 后测验记忆成绩,仍以达到 9/10 正确反应前所经受的电击次数来表示。

**1.5 氧化损伤指标的检测** 行为学测试完成后,小鼠断头处死,眼球取血,血液静置 4 h,离心取血清备用。血清 SOD、MDA、GSH-Px 测定按试剂盒说明书进行。

**1.6 小鼠大脑皮质及海马 bcl-x1 mRNA 的表达** 小鼠断头法处死后取大脑皮质及海马组织,提取总 RNA 进行 RT-PCR 检测。bcl-x1 mRNA 引物由上海博亚生物技术公司合成,引物序列如下:正链:5' TTCGGGATGGAGTAAACTGG 3';负链:5' TGTCTGGTCACTCCGACTG 3';扩增 DNA 片段长度 318 bp。RT 反应体系:42~90 min 合成 cDNA 第 1 链,75~15 min 灭活逆转录酶。PCR 反应体系热循环参数:变性 94℃,30s;退火 59℃,1 min;延伸 72℃,1 min;共 35 个循环,末次循环后 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统成像,用各条带的 OPTDI(面积与平均光密度之乘积)与  $\beta$ -actin OPTDI 的比值作为其相对表达量。

**1.7 统计学方法** 所有实验数据采用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析,计量资料均数用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用方差分析,方差齐时采用 LSD,方差不齐采用 Tamhann's T2。

## 2 结果

2.1 小鼠跳台实验潜伏期及错误次数的比较 与模型组相比,银可络组和脑还丹低、高剂量组跳台实验的潜伏期均明显延长( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),5 min内错误次数(首次及 24 h 后)均明显下降( $P < 0.01$ )。其中以脑还丹高剂量组的作用最为明显,与银可络组及脑还丹低剂量组相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。脑还丹低剂量组与银可络组比较,则均无统计学差异。见表 1。

2.2 小鼠 Y 型迷宫实验学习及记忆成绩的比较

与模型组比较,银可络组和脑还丹低、高剂量组在 Y 型迷宫实验中的学习成绩及记忆成绩均明显改善( $P < 0.01$ ),其中以脑还丹高剂量组的作用最为明显,学习成绩与银可络组及脑还丹低剂量组相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。脑还丹低剂量组记忆成绩与银可络组比较,差异无统计学意义。见表 2。

2.3 各组小鼠血清 SOD、MDA、GSH-Px 水平的比较 与模型组比较,银可络组和脑还丹低、高剂量组 SOD 及 GSH-Px 水平均明显升高;而 MDA 水平则有明显下降( $P < 0.01$ )。脑还丹高、低剂量组与银可络组之间的比较均无统计学差异。见表 3。

表 1 各组 SAM-P/8 小鼠跳台实验潜伏期及错误次数的比较

Tab 1 Comparisons of latent period and times of getting electric shock of SAM-P/8 mice in step-down passive avoidance task among four groups

Group	n	Latent period (s)	Times of getting electric shock in 5 min at the start (learning ability)	Times of getting electric shock in 5 min after 24 h (memory ability)
Untreated	10	52.3 ± 26.6	5.1 ± 1.0	4.2 ± 1.6
Yinkeluo Tablets-treated	10	124.7 ± 81.4*	3.3 ± 0.5**	2.2 ± 0.8**
Low-dose Naohuandan Recipe-treated	10	118.1 ± 75.0*	3.8 ± 1.0**	2.4 ± 1.1**
High-dose Naohuandan Recipe-treated	10	201.6 ± 61.8**	2.0 ± 0.9**	1.0 ± 0.7**

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs untreated group;  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ , vs high-dose Naohuandan Recipe-treated group.

表 2 各组 SAM-P/8 小鼠 Y 型迷宫实验学习及记忆成绩的比较

Tab 2 Comparisons of learning and memory abilities of SAM-P/8 mice tested in Y-maze device by electric shock among four groups

Group	n	Times of getting electric shock at the start (learning ability)	Times of getting electric shock after 24 h (memory ability)
Untreated	10	79.8 ± 17.2	8.9 ± 3.4
Yinkeluo Tablets-treated	10	51.0 ± 8.1**	2.2 ± 1.8**
Low-dose Naohuandan Recipe-treated	10	46.8 ± 6.4**	2.0 ± 1.6**
High-dose Naohuandan Recipe-treated	10	17.8 ± 6.4**	1.7 ± 1.6**

\*\*  $P < 0.01$ , vs untreated group;  $P < 0.01$ , vs high-dose Naohuandan Recipe-treated group.

表 3 各组 SAM-P/8 小鼠血清 SOD、MDA、GSH-Px 水平的比较

Tab 3 Comparisons of serum levels of SOD, MDA and GSH-Px in SAM-P/8 mice among four groups

Group	n	SOD (kU/L)	MDA (μmol/L)	GSH-Px (activity level)
Untreated	10	318.4 ± 45.4	30.4 ± 3.5	397.9 ± 73.1
Yinkeluo Tablets-treated	10	408.8 ± 27.2**	20.0 ± 6.0**	552.5 ± 85.8**
Low-dose Naohuandan Recipe-treated	10	388.4 ± 26.0**	19.8 ± 5.5**	513.0 ± 78.1**
High-dose Naohuandan Recipe-treated	10	393.7 ± 22.3**	18.5 ± 5.9**	522.8 ± 56.5**

\*\*  $P < 0.01$ , vs untreated group.

2.4 各组小鼠大脑皮质及海马 bcl-x1 mRNA 表达的比较 各组小鼠大脑皮质及海马 bcl-x1 mRNA 的相对表达量,脑还丹高剂量组(3.8 ± 0.7, 4.0 ± 0.1)、脑还丹低剂量组(2.1 ± 1.2, 1.4 ± 0.3)和银可

络组(1.8 ± 0.3, 1.2 ± 0.3)较模型组(0.4 ± 0.1, 0.4 ± 0.2)均有明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );其中脑还丹高剂量组 bcl-x1 mRNA 的相对表达量最高。脑还丹高剂量组与脑

还丹低剂量组及银杏可络组之间的比较有统计学差异 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 脑还丹低剂量组与银杏可络组之间的差异则无统计学意义。见图 1。

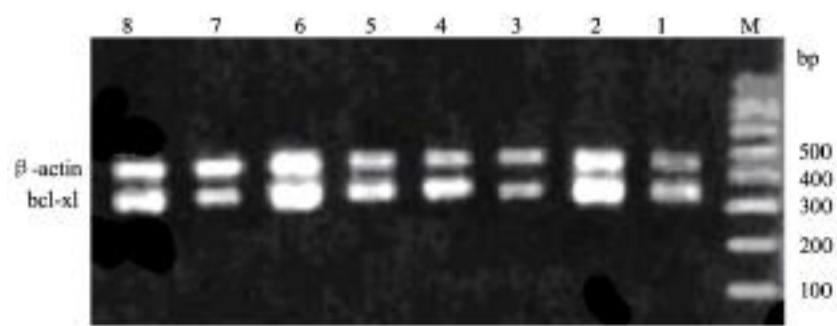


图 1 各组 SAM-P/8 小鼠大脑皮质及海马 bcl-x1 mRNA 的表达(RT-PCR)

Fig 1 Expression of bcl-x1 mRNA in cerebral cortex and hippocampus of SAM-P/8 mice among four groups (RT-PCR)

1: Hippocampus of untreated group; 2: Hippocampus of Yinkeluo Tablets-treated group; 3: Hippocampus of low-dose Naohuandan Recipe-treated group; 4: Hippocampus of high-dose Naohuandan Recipe-treated group; 5: Cerebral cortex of untreated group; 6: Cerebral cortex of Yinkeluo Tablets-treated group; 7: Cerebral cortex of low-dose Naohuandan Recipe-treated group; 8: Cerebral cortex of high-dose Naohuandan Recipe-treated group; M: Marker .

### 3 讨论

阿尔茨海默病属中医“呆病”、“善忘”等范畴。根据中医理论,我们认为其病机为肾虚精亏、髓海空虚、痰瘀交结阻于脑络,络损神伤发为呆病。用中药骨碎补、熟地、石菖蒲等组成的脑还丹复方,具有补肾填精、活血通络、涤痰开窍、平衡阴阳的功效。

快速老化小鼠 SAM-P/8 表现为随年龄增长而自然发生的学习、记忆障碍,是目前研究阿尔茨海默病较理想的动物模型<sup>[2]</sup>。我们通过跳台及 Y 型迷宫实验观察脑还丹对 SAM-P/8 小鼠行为学的影响。在跳台及 Y 型迷宫实验中,脑还丹及银杏叶提取物均可明显改善 SAM-P/8 小鼠的学习、记忆功能,优于模型组,且脑还丹的作用呈剂量依赖效应。

Lustbader 等<sup>[3]</sup>研究发现,阿尔茨海默病的发病机制与氧化应激有关,氧化应激通过氧自由基损伤神经元细胞,促进神经元细胞凋亡或死亡,引起神经系统功能减退。SOD、MDA 和 GSH-Px 是与机体氧化还原状态密切相关的物质。MDA 是一种脂质过氧化产物,是评价衰老的重要指标之一,又可反映组织氧化的程度。SOD 存在于细胞液中,其含量的高低间接反映了组织的抗氧化能力。GSH-Px 在体内广泛存在,特异性催化还原型谷胱甘肽对过氧化氢的还原反应,起保护细胞膜结构和功能的作用。Nomura 等<sup>[4]</sup>报道,在 SAM-P/8 小鼠脑发生病理学改变之前,其大脑皮层已发生了氧化应激反应。本实验结果表明,脑还丹及银杏可络均可明显提高

SAM-P/8 小鼠血清 SOD、GSH-Px 的含量,降低 MDA 的水平;脑还丹高、低剂量组及银杏可络组之间的比较则无统计学差异。银杏叶提取物已被公认为具有自由基清除剂的作用<sup>[5]</sup>,而脑还丹对 SOD、GSH-Px 及 MDA 的影响与银杏可络无统计学差异,提示脑还丹在清除自由基、减轻自由基对机体的损害方面具有一定的作用。

细胞凋亡在阿尔茨海默病的发病机制中可能起重要作用。研究表明,转基因阿尔茨海默病模型鼠脑内存在大量的神经元凋亡<sup>[6]</sup>。bcl-2 基因家族与凋亡密切相关。在细胞凋亡的调节中,bcl-x1 是凋亡抑制基因,其表达增加可抑制细胞的凋亡<sup>[7]</sup>。本实验结果显示,SAM-P/8 小鼠大脑皮质及海马 bcl-x1 mRNA 的表达减少,这可能是 SAM-P/8 小鼠发生学习、记忆障碍的物质基础。脑还丹低、高剂量组和银杏可络组均可不同程度增加 bcl-x1 mRNA 的表达,与模型组比较差异有统计学意义;其中以脑还丹高剂量组的表达量最高,与脑还丹低剂量组及银杏可络组比较,差异有统计学意义。提示,脑还丹和银杏可络均能促进抗凋亡基因的表达,bcl-x1 mRNA 表达的增加,可能是脑还丹治疗阿尔茨海默病的机制之一。

### [参考文献]

- 程志安,李庆明,李红毅,等.“脑还丹”对老龄去势大鼠海马 CA3 区及皮质神经元超微结构的影响.中国实验方剂学杂志,2002,8(2):31-33.
- 徐叔云主编.药理实验方法学.第 2 版.北京:人民卫生出版社,1991.660-665.
- Lustbader JW, Cirilli M, Lin C *et al*. ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. Science, 2004, 304(5669): 448-452.
- Nomura Y, Wang BX, Qi SB, *et al*. Biochemical changes related to aging in the senescence-accelerated mouse. Exp Gerontol, 1989, 24(1): 49-55.
- Le Bars PL, Katz MM, Berman N, *et al*. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. JAMA, 1997, 278(16): 1327-1332.
- Feng Z, Chang Y, Cheng Y, *et al*. Melatonin alleviates behavioral deficits associated with apoptosis and cholinergic system dysfunction in the APP 695 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. J Pineal Res, 2004, 37(2): 129-136.
- 张建军,何敢想,张赤志.茵陈术附汤对阴黄证大鼠肝细胞凋亡及 bcl-2 和 Bax 表达的影响.中西医结合学报,2003,1(2):116-118.

[收稿日期] 2005-01-04