

丝瓜叶成分对脑缺血大鼠学习记忆障碍及皮层体感诱发电位的影响

齐尚斌*, 周永禄, 李利民, 熊 鹰¹, 隋建峰¹, 阮怀珍¹

(四川省中药研究所药理研究室, 成都 610041; ¹ 第三军医大学生理教研室, 重庆 400038)

摘要 目的: 研究丝瓜叶成分 L-6a 和 L-10 对脑缺血大鼠学习记忆障碍及皮层体感诱发电位(SEP)的影响。方法: 用脑缺血大鼠模型, 侧脑室注射(icv)给药, 以穿梭箱主动回避反应(AAR)测定学习记忆行为; 用 SYD₄₂₂₈ 型生理实验系统测定皮层体感诱发电位。结果: L-6a 0.5 mg·kg⁻¹ 显著促进脑缺血大鼠 AAR 的获得; 0.25 mg·kg⁻¹ 时, 无明显影响; L-6a 0.5 及 0.25 mg·kg⁻¹ 均显著延缓 AAR 的消退; 脑缺血后, L-6a(0.5 mg·kg⁻¹) 也减缓 SEP 波幅下降及其潜伏期延长; 脑缺血再通后, L-6a 和 L-10(0.5 mg·kg⁻¹) 均加大 SEP 振幅增高, 缩短其潜伏期。结论: L-6a 有显著促进脑障碍大鼠脑功能恢复的作用。

关键词 丝瓜叶成分(L-6a, L-10); 脑缺血; 学习记忆; 皮层体感诱发电位(SEP)

丝瓜有多种医疗保健作用, 丝瓜皂苷有增强机体免疫, 抗应激刺激等多种生理功能^[1]。丝瓜总皂甙含人参皂甙 Rg₁ 和 Re^[2], 已知 Rg₁ 能促进记忆获得、巩固和再现^[5]。L-6a 和 L-10 是我所首次从自然界分得并报道的成分, 结构及理化性质已作报道^[2-4]。作者等研究证明 L-6a, L-10 具有增强正常大鼠记忆保持功能和增加海马内生长抑素免疫反应物(somatostatin-like, immunoreactant, Somr-LI)的作用^[6]。本文研究 L-6a, L-10 对脑缺血大鼠的学习记忆障碍及皮层体感诱发电位(seduce electric potential, SEP)的影响, 以探讨丝瓜提取物对脑缺血损伤的治疗作用和机制。

材 料 和 方 法

药品与试剂 丝瓜叶成分 L-6a 与 L-10 由本所药化室提供, 以 2% 二甲基亚砜(DMSO)助溶, 用人工脑脊液配制, 药物浓度 L-6a 为 15.8 mmol·L⁻¹, L-10 为 14.5 mmol·L⁻¹, 给药剂量分别为 0.25 mg·kg⁻¹, 0.5 mg·kg⁻¹, 进行侧脑室注射(injected in cerebral ventricle, icv)。

动物 体重 200 ~ 250 g, Wistar 大鼠 38 只, ♀♂兼用。由第三军医大学实验动物中心提供。

实验分组 1. 脑缺血大鼠学习记忆障碍实验分 5 组, (1) 组、(2) 组分别给 L-6a, L-10 0.25 mg·kg⁻¹, (3) 组、(4) 组分别给 L-6a, L-10 0.5 mg·kg⁻¹, (5) 组为对照组, 给与实验组等容积的含 2% DMSO 的人工脑脊液, 脑缺血术前 icv, qd, 连续 3 d。手术后测定药物对大鼠主动回避反应(active avoidance response, AAR) 的获得和消退。2. 脑缺血大鼠 SEP 实验分 5 组, 各组大鼠都手术造成脑缺血模型, 进行不同处理, (1) 组为对照组, 术前 icv 与治疗组等容积含 2% DMSO 的人工脑脊液。(2) 组、(3) 组为脑缺血治疗组, 分别于术前 icv L-6a, L-10 0.5 mg·kg⁻¹, (4) 组、(5) 组为脑缺血再通治疗组, 于脑缺血 20 min 后再通, 同时分别 icv L-6a, L-10 0.5 mg·kg⁻¹。以上各组均按要求测定 SEP。

脑缺血模型 戊巴比妥钠 40 mg·kg⁻¹ ip 麻醉大鼠, 剖露第 1 颈椎和双侧颈总动脉, 用直径 0.5 mm 的电烧针烧灼双侧颈椎小孔内椎动脉, 造成永久性闭塞, 24 h 后用无损性动脉夹可逆性夹闭双侧颈总动脉 5 min, 间隔 1 h 1 次, 共 3 次。

侧脑室埋管及注射(icv) 按坐标(A:1.0, L:1.5 H:3.0)在侧脑室埋置不锈钢导管, 以牙托粉固定于颅骨上, 术后 3 ~ 5 d 开始。进行微量注射, 将清醒大鼠固定在敞式装置上, 导管中插入内管, 下端超出套管 0.5 mm, 另一端经塑料管与微量进样器连接, 注射时间不少于 2 min。

穿梭箱主动回避反应(AAR) 参考中药药理研究方法学, 用行为实验常用的穿梭箱, 按常规方法训练, 并测定 AAR 的获得及消退^[7]。每天训练 20

收稿日期: 1998-12-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39370851)

* Tel: (028) 5234707, Fax: (028) 5224504,

E-mail: asczyz @shell.scsti.ac.cn

次,以正确反应率连续 3 d 达到 80 % 以上为 AAR 获得标准。AAR 消退是以大鼠训练达标后一定时间内 AAR 的保持情况,以上训练均由微机控制,训练结果由微机自动记录。

体感诱发电位(SEP)测定 1. 常规麻醉大鼠,如前造成脑缺血模型,24 h 后再次麻醉,分离双侧颈总动脉及右侧坐骨神经,将大鼠固定于立体定位仪上,头顶正中切口,暴露全颅顶,在冠状缝上开一直径 0.25 cm 的小孔,保留硬脑膜完整,以备记录 SEP;在坐标 A₁L_{1.5} 处钻一直径 0.15 cm 的小孔,以备 icv 给药用。2. 用第三军医大学的 SYD₄₂₂₈ 型生理实验系统记录皮层 SEP,记录电极(银球电极)置于硬脑膜表面,参考电极置于同侧头皮切口,刺激电极置于对侧坐骨神经,动物妥善接地,实验在屏蔽室内进行,保持室温(20 ± 2) °C,刺激频率 2 Hz,波宽 0.5 ms,电流 5 ~ 15 mA(选择最适刺激强度),叠加 50 次,分析 SEP 各波的潜伏期及波幅。先做正常大

鼠 SEP,然后用可逆性动脉夹夹闭双侧颈总动脉,形成脑缺血,20 min 后松开动脉夹恢复对脑的血液供应,并于以上过程按分组要求于不同时间给药,连续记录 SEP。

统计学分析 实验数据均以 *t* 检验进行统计学处理,结果用均值 ± 标准差表示。

结 果

1 L-6a 对脑缺血大鼠主动回避反应获得和消退的影响

1.1 L-6a 对脑缺血大鼠主动回避反应获得的影响

表 1 结果表明:L-6a(0.5 mg·kg⁻¹) 明显促进脑缺血大鼠主动回避反应的获得,与对照组比较差异显著(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),剂量 0.25 mg·kg⁻¹ 时,对脑缺血大鼠主动回避反应的获得无明显影响。

Tab 1 Effects of L-6a given by icv, qd for 3 d on acquirement of active avoidance response(AAR) of cerebral ischemia rats (*n* = 9 ~ 10, $\bar{x} \pm s$)

Group	Dose/ mg·kg ⁻¹	Acquirement percentage of AAR/ %				
		1 d	3 d	5 d	7 d	10 d
L-6a	0.25	10.3 ± 8.2	27.9 ± 6.3	39.3 ± 7.4	57.5 ± 11.4	65.4 ± 11.8
L-6a	0.50	10.3 ± 6.3	35.6 ± 8.5*	65.6 ± 10.0**	75.1 ± 9.6**	83.4 ± 16.9**
Control	-	8.5 ± 7.0	25.1 ± 6.9	32.6 ± 9.2	45.1 ± 18.5	55.3 ± 11.5

Acquirement percentage of AAR was determined with computer at different times after ischemia. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 compared with vehicle (control) group.

1.2 L-6a 对脑缺血大鼠主动回避反应消退的影响

表 2 结果表明:两种剂量(0.25, 0.5 mg·kg⁻¹)的 L-6a 均显著延缓脑缺血大鼠主动回避反应的消退,与对照组比较有显著差异(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。

Tab 2 Effects of L-6a given by icv, qd for 3 d before ischemia on disappearance of active avoidance response (AAR) of cerebral ischemia rats (*n* = 7 ~ 9, $\bar{x} \pm s$)

Group	Dose/ mg·kg ⁻¹	% Right of AAR		
		6 d	8 d	10 d
L-6a	0.25	58.3 ± 15.2*	43.1 ± 10.2*	27.6 ± 8.1*
L-6a	0.50	77.5 ± 22.1**	66.3 ± 19.1**	49.9 ± 16.7**
Control	-	41.3 ± 15.5	31.6 ± 9.1	15.1 ± 6.2

Right percentage of AAR was determined with computer at different times after ischemia. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 compared with vehicle (control) group.

2 L-10 对脑缺血大鼠主动回避反应获得和消退的影响

2.1 L-10 对脑缺血大鼠主动回避反应获得的影响

L-10(0.25, 0.5 mg·kg⁻¹) 对脑缺血大鼠主动回避反应的获得无明显影响,与对照组比较无明显差异。

2.2 L-10 对脑缺血大鼠主动回避反应消退的影响

L-10(0.25, 0.5 mg·kg⁻¹) 对脑缺血大鼠主动回避反应的消退无明显影响,与对照组比较无明显差异。

3 L-6a, L-10 对脑缺血大鼠皮层体感诱发电位(SEP)的影响

3.1 脑缺血后 SEP 变化及 L-6a, L-10 的影响

刺激大鼠坐骨神经,于其对侧大脑皮层体感区可记录到 SEP,正常的皮层 SEP 由 1 个向下的正性波(P₀)和一个向上的负性波(N₀)组成,其峰值潜伏

期(peak-latency, PL)和波幅(amplitude, 基线至波峰高度值)见表3,(在 P_0 波之前可记录到另一小的正性波 P_1 ,未列入分析)。

阻断双侧颈总动脉后,SEP各波逐渐下降,峰潜伏期逐渐延长,其中 N_0 波先于 P_0 下降,缺血5 min

后比较各组的结果发现,L-6a治疗组的 P_0 波幅下降及 P_0, N_0 潜伏期延长较对照组变化减小,差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),L-10治疗组未见类似效果,见表3。

Tab 3 Brain changes of seduce electric potential (SEP) in the cortical body sensation region 5 min after ischemia in rats measured with SYD₄₂₂₈ physiological experiment system ($n = 7 \sim 8, \bar{x} \pm s$)

Group	Amplitude/ μV		Peak-latency/ ms	
	P_0	N_0	P_0	N_0
Normal	27.6 \pm 5.2	58.4 \pm 11.4	16.2 \pm 3.0	25.1 \pm 6.4
Ische mia	8.2 \pm 1.3	1.6 \pm 0.3	19.2 \pm 2.1	28.6 \pm 3.2
Ische mia + L-6a	10.9 \pm 2.0 ^{**}	2.1 \pm 0.9	16.4 \pm 2.5 [*]	25.3 \pm 2.7 [*]
Ische mia + L-10	8.7 \pm 1.5	1.8 \pm 1.1	17.3 \pm 6.8	29.1 \pm 4.5

L-6a 0.5 mg·kg⁻¹, L-10 0.5 mg·kg⁻¹ and same volume vehicle solution were administered by icv before ische mia of rats brain, respectively. P_0 : positive wave of SEP; N_0 : negative wave of SEP. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ compared with vehicle (control) group.

3.2 脑缺血再通后 SEP 的恢复及 L-6a, L-10 的影响

脑缺血 20 min 再通后,对照组大鼠可观察到 SEP 的恢复,表现为各波幅度逐渐增大,潜伏期缩短,其中 P_0 先 N_0 恢复,再通 30 min 后,SEP 虽仍有增大,变化幅度极小。但在 L-6a 和 L-10 治疗组,所

有大鼠的 SEP 恢复更明显,再通 30 min 测定,与对照组比较,两治疗组的 P_0 幅度值及 L-6a 治疗组的 N_0 幅度值与之有显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 3 组的 SEP 峰潜伏期较再通前脑缺血模型组均有一定程度缩短,组间无显著差异,见表 4。

Tab 4 Brain chanegs of SEP in the cortical body sensation region 30 min after reperfusion of ischemia rats measured with SYD₄₂₂₈ physiological experiment system ($n = 7 \sim 8, \bar{x} \pm s$)

Group	Amplitude/ μV		Peak-latency/ ms	
	P_0	N_0	P_0	N_0
Control	13.5 \pm 2.1	10.2 \pm 1.4	17.1 \pm 3.4	27.3 \pm 4.2
L-6a	19.7 \pm 3.2 ^{**}	12.4 \pm 2.3 [*]	16.9 \pm 3.1	25.7 \pm 2.6
L-10	16.8 \pm 2.8 ^{**}	9.8 \pm 1.6	17.2 \pm 1.9	28.4 \pm 5.3

L-6a 0.5 mg·kg⁻¹, L-10 0.5 mg·kg⁻¹ and same volume vehicle solution were individually administered by icv as soon as cerebral ischemia were reperused. P_0 : positive wave of SEP; N_0 : negative wave of SEP. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ compared with vehicle (control) group.

讨 论

本实验结果显示,丝瓜叶成分 L-6a 显著促进脑缺血大鼠主动回避反应的获得,显著延缓其消退,使其体感诱发电位(SEP)的波幅和潜伏期因缺血恶化得以明显减轻,再供血后,SEP 的幅度显著增大,潜伏期也有一定程度的缩短,给药后的多种变化,均表明 L-6a 能显著降低大鼠脑缺血损伤,促进脑缺血大

鼠学习记忆障碍的恢复。作者等以往的实验还证实 L-6a 具有显著增强正常大鼠学习记忆保持功能的作用,且显著增强大鼠脑海马内生长抑素免疫反应物 Som-LI 的含量^[6]。Som 是中枢内重要的神经递质或调制因子,与学习记忆过程和改善早老性痴呆的记忆障碍有关^[8,9],无论正常或脑损伤大鼠,给予 L-6a 后学习记忆功能都能增强,又见某种神经递质和脑电向增强功能方向变化,推断 L-6a 是一个有

益智作用的物质。Som 的增加和体感诱发电位 (SEP) 的变化为 L-6a 益智作用提供了一定的作用机制和基础。以此为鉴,有待对 L-6a 更广泛的益智作用和机制进行研究。

致谢 实验样品 L-6a 和 L-10 由(原)本所药化研究室梁龙、刘昌瑜同志研制提供。

References

- 1 He GX(何光星), Liu Y(刘云), Qi SB(齐尚斌). Some pharmacodynamic studies on *Luffa saponin*. *West China Pharm Sci*(华西药理学杂志), 1997, **12**: 76
- 2 Liang L(梁龙), Lu LE(鲁灵恩), Cai YC(蔡元聪). A review on the research on the chemical components of *Luffa* Plants. *West China Pharm Sci*(华西药理学杂志), 1995, **10**: 32
- 3 Liang L(梁龙), Lu LE(鲁灵恩), Cai YC(蔡元聪). Studies on the components from leaves of *Luffa cylindrica* Roem (I). *West China Pharm Sci*(华西药理学杂志), 1993, **8**: 63
- 4 Liang L(梁龙), Lu LE(鲁灵恩), Cai YC(蔡元聪).

- Studies on the chemical components from leaves of *Luffa cylindrica* Roem. *Acta Pharm Sin*(药学报), 1993, **28**: 836
- 5 Zhang JT(张均田). Recent progress in studies on the pharmacology of learning and memory in China. *Acta Pharm Sin*(药学报), 1986, **21**: 636
 - 6 Qi SB(齐尚斌), Wang XY(王晓阳), Zhou YL(周永禄), et al. Effects of new constituents L-6a and L-10 from leaves of *Luffa cylindrica* on learning, memory and hippocampal somatostatin in rats. *Acta Pharmacol Sin*(中国药理学报), 1997, **18**: 529
 - 7 Zou LB, ed. Effects of ginsenoside from stems and leaves on active avoidance response in rats (with shuttle-box method). *Research Methodology of Pharmacology of Chinese Materia Medica*. Beijing: The People's Health Publishing House, 1993. 897
 - 8 Eichebaum H, Stewart C, Morris SGM. Hippocampal representation in spatial learning. *J Neurosci*, 1990, **10**: 331
 - 9 Ji WQ(吉卫清), Zhang CC(张长城), Zhang GH(张光辉). Effect of somatostatin and GABA on long-term potentiation in hippocampal CA1 area in rats. *Acta Pharmacol Sin*(中国药理学报), 1995, **16**: 380

EFFECTS OF CONSTITUENTS L-6a and L-10 FROM LEAVES OF *LUFFA CYLINDRICA* ROEM ON DISFUNCTION OF LEARNING MEMORY AND SEP OF CEREBRAL ISCHEMIA RATS

Qi Shangbin(Qi SB), Zhou Yonglu(Zhou YL), Li Limin(Li LM), Xiong Ying(Xiong Y)¹,
Sui Jianfeng(Sui JF)¹ and Ruan Huaizhen(Ruan HZ)¹

(Sichuan Institute of Chinese Materia Medica, Chengdu 610041;

¹The Third Military Medical University, Chongqing 400038)

ABSTRACT AIM: To study the effects of the constituents L-6a and L-10 from leaves of *Luffa cylindrica* Roem on learning memory disfunction and seduce electric potential (SEP) in cerebral ischemia rats. **METHODS:** The learning memory behavior was determined by active avoidance response (AAR) in shuttle-box and the seduce electric potential (SEP) in cortical body sensation region was measured by SYD₄₂₂₈ physiological experiment system in model of cerebral ischemia rat after injecting experimental drugs in cerebral ventricle (icv). **RESULTS:** Treatment with L-6a at dosage of 0.5 mg•kg⁻¹ obviously promoted acquirement of AAR in cerebral ischemia rats ($P < 0.05$) and at doses of 0.5 and 0.25 mg•kg⁻¹ obviously postponed the fading away of AAR ($P < 0.05$). Treatment with L-6a (0.5 mg•kg⁻¹) was shown to relief the descent of SEP wave amplitude and the prolongation of SEP latent period after cerebral ischemia ($P < 0.05$). When blood was poured into brain again, both L-6a and L-10 were shown to markedly amplify SEP wave amplitude ($P < 0.05$) and shorten latent period of SEP. **CONCLUSION:** L-6a was found to obviously promote recovery of cerebral disfunction in rats.

KEY WORDS constituents of *Luffa cylindrica* Roem (L-6a and L-10); cerebral ischemia; learning memory; seduce electric potential (SEP)