



定志小丸对东莨菪碱所致小鼠学习记忆障碍的影响及机制

闫娟娟^{1,2}, 刘明^{1,2}, 胡园¹, 余冰颖¹, 张刚强¹, 刘屏^{1*}

(1. 解放军总医院 临床药理研究室, 北京 100853; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的:研究经典古方定志小丸(由石菖蒲、远志、茯苓、人参按 2:2:3:3 比例组成)对东莨菪碱所致小鼠学习记忆障碍的影响及可能的作用机制。方法:将小鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照组(石杉碱甲 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、定志小丸高、中、低剂量组($700, 350, 175 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),连续灌胃 7 d 后,腹腔注射东莨菪碱($1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)制备小鼠学习记忆障碍模型,通过 Morris 水迷宫试验评价各组小鼠的学习记忆功能,并测定各组小鼠全脑中谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)、5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、乙酰胆碱(Ach)含量及乙酰胆碱酯酶(AchE)活性。结果:行为学测试结果表明定志小丸能明显降低模型小鼠在 Morris 水迷宫定位航行试验中的平均潜伏期,增加空间探索试验中的穿越平台次数、目的象限游泳路程及时间的百分比;增加小鼠脑中 Glu, 5-HT, DA 和 Ach 含量,降低 GABA 含量和 AchE 活性。结论:定志小丸可明显改善东莨菪碱所致小鼠学习记忆障碍,增强小鼠学习记忆的能力,其作用机制可能与调节 Glu/GABA 系统以及提高脑中 Ach 和单胺递质含量有关。

[关键词] 学习记忆;定志小丸;Ach;5-HT;DA;Glu;GABA

定志小丸和开心散均源于《备急千金要方》,为人参、远志、茯苓、石菖蒲 4 味药材组成,但剂量配比不一,功能主治也不尽相同,前者为远志、石菖蒲各 2 两,人参、茯苓各 3 两;后者为远志、人参各 4 分,茯苓 2 两,石菖蒲 1 两;两者皆为中医治疗情志疾病的基本方剂。定志小丸主治心气不定、五脏不足、甚者忧愁悲伤不乐、忽忽喜忘、朝差暮剧、暮差朝发狂眩,具有补益心脾、化痰开窍、益智定志之功效,开心散主治好忘。本课题组一直针对开心散和定志小丸的药理作用及机制进行研究,前期研究已发现其具有明显的抗抑郁^[1-3]和抗疲劳作用^[4],且参与了脑内中 BDNF 和单胺递质系统调节。文献报道定志小丸可提高老龄大鼠在 Y 电迷宫中的学习记忆能力,提高老龄小鼠在跳台试验中的学习记忆能力^[5-6],尚未见对其作用机制的研究。本研究采用东莨菪碱造成记忆获得障碍小鼠模型,观察定志小丸对记忆获得障碍小鼠在 Morris 水迷宫中空间学习记忆能力和

记忆保持能力的影响,并观察各组动物脑中与学习记忆功能密切相关的谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)、5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、乙酰胆碱(Ach)含量及乙酰胆碱酯酶(AchE)活性,探索定志小丸对学习记忆功能影响的作用机制。

1 材料

1.1 动物 KM 小鼠,雄性,体重 18 ~ 22 g,解放军总医院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(京)2009-0007。

1.2 药品 人参、茯苓、远志、石菖蒲购自同仁堂有限公司,中国中医科学院中药研究所鉴定。石菖蒲、远志、茯苓、人参按 2:2:3:3 比例投料提取,浸膏粉 1 g 相当于 7.14 g 生药(批号 20091012);石杉碱甲(哈伯因)由豫中制药厂生产,批号 100704;氢溴酸东莨菪碱注射液由徐州莱恩药业生产,批号 1007311。

1.3 仪器及试剂 Morris 水迷宫仪器及动物行为学分析软件均购于上海移数科技公司;5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、乙酰胆碱(Ach)、乙酰胆碱酯酶(AchE)的 ELISA 试剂盒均来自 R&D 公司;谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)由南京建成生物工程研究所提供。

2 方法

2.1 分组、给药及造模 72 只小鼠随机分为 6 组,

[稿件编号] 20120121007

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2008ZXJ09004-028);总后“十一五”中医药基金项目(2006212004)

[通信作者] * 刘屏,博士生导师,从事中药及天然活性物质研究, Tel/Fax: (010)66936676, E-mail: liuping301@126.com

[作者简介] 闫娟娟,硕士研究生, Tel: (010)66936678, E-mail: yanjuanjuan103@163.com

每组 12 只,即正常组、模型组、阳性对照组(石杉碱甲 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、定志小丸高、中、低剂量组($700, 350, 175 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。正常饲养 1 d 适应环境后,连续灌胃定志小丸每日 1 次,连续 7 d,期间进行 Morris 水迷宫训练 5 d,正常组、模型组灌胃等量蒸馏水,第 7 次给药前动物禁食(不禁水)16 h,于第 7 次给药后 40 min,除正常组灌胃等量生理盐水,其他各组按 $10 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 体积腹腔注射 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 东莨菪碱注射液,15 min 后进行定位导航试验;注射东莨菪碱 24 h 后,进行空间探索试验。

2.2 Morris 水迷宫训练及测试 参照文献方法^[7],从试验第 2 天到第 6 天为 Morris 水迷宫训练,每天训练 1 次;于第 7 天进行定位航行试验,利用行为学分析软件记录大鼠 120 s 内找到平台所需的时间(即潜伏期);第 8 天撤出平台,进行空间探索试验,记录小鼠在 120 s 内穿越原平台所在位置的次数(穿越平台次数)、第 3 象限(即目的象限)游泳路程(时间)及游泳总路程(总时间)。计算得出目的象限游泳路程百分比和时间的百分比 = 目的象限游泳路程(时间)/游泳总路程(总时间)。

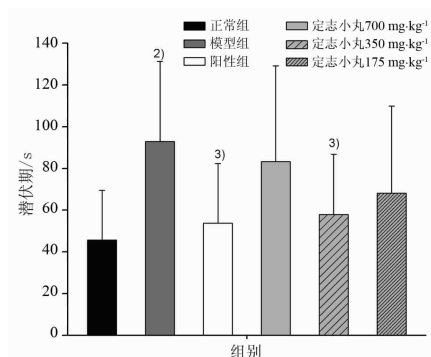
2.3 采集样品及相关物质的测定 空间探索试验结束后,立即脱颈处死,迅速在冰上剥离大脑,称重,加入脑重的 9 倍量生理盐水匀浆,在 $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min,取上清置于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。按试剂盒说明书测定脑匀浆上清液中 Glu, GABA, 5-HT, DA 和 Ach 的含量, AchE 活性。

2.4 数据统计处理 实验数据采用单因素方差分析,组间差异采用 Dunnett's 后检验,量反应资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 对定位导航试验中潜伏期的影响 潜伏期结

果显示,腹腔注射东莨菪碱后,模型组小鼠的潜伏期明显升高,与正常组比较有显著差异($P < 0.01$);定志小丸 $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 均能不同程度降低小鼠的潜伏期,与模型组比较明显缩短($P < 0.05$) (图 1)。



与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (图 2 同)。

图 1 定志小丸对东莨菪碱诱发记忆障碍小鼠潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 1 Effect of Dingzhixiao Wan (DZXW) treatment on the latency in the hidden platform test in scopolamine-induced learning-memory impairment mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

3.2 对小鼠在空间探索试验中的影响 Morris 水迷宫空间探索实验结果显示,腹腔注射东莨菪碱后模型组小鼠穿越平台次数和目的象限游泳路程百分比、目的象限游泳时间百分比均明显比小于正常组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,定志小丸 $350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组小鼠穿越平台次数明显增多($P < 0.05$);定志小丸各个剂量组小鼠的目的象限游泳路程百分比均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);定志小丸 $350, 175 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组小鼠目的象限游泳时间百分比均增加($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 定志小丸对东莨菪碱诱发记忆障碍小鼠在空间探索试验中的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effects of DZXW treatment on the probe trial testing in Morris water maze test of scopolamine-induced learning-memory impairment in mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	穿越平台次数	目的象限游泳路程百分比/%	目的象限游泳时间百分比/%
正常	-	3.58 ± 2.02	22.65 ± 7.60	22.49 ± 9.76
模型	-	$1.92 \pm 1.11^{1)}$	$11.15 \pm 5.89^{2)}$	$13.65 \pm 4.70^{1)}$
阳性对照	0.05	$3.17 \pm 1.40^{3)}$	$21.46 \pm 13.17^{3)}$	$19.25 \pm 6.33^{3)}$
定志小丸	700	2.08 ± 1.04	$16.19 \pm 3.95^{3)}$	15.63 ± 3.69
	350	$3.33 \pm 1.60^{3)}$	$19.18 \pm 6.29^{4)}$	$19.15 \pm 6.5^{3)}$
	175	2.75 ± 2.52	$20.44 \pm 5.50^{4)}$	$19.82 \pm 6.08^{3)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.3 对 Glu 和 GABA 的影响 与正常组比较,东莨菪碱模型组小鼠脑中 Glu 含量显著降低 ($P < 0.05$),GABA 含量显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,定志小丸 $700 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 均能不同程度的提高小鼠脑中 Glu 和 GABA 的含量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (图 2)。

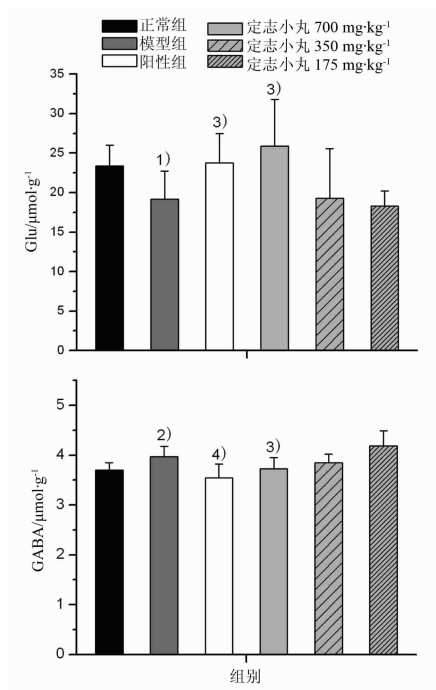


图 2 定志小丸对东莨菪碱诱发记忆障碍小鼠脑中 Glu 和 GABA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 2 Effect of DZXW treatment on Glu and GABA levels in brain of scopolamine-induced learning-memory impairment in mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

3.4 对 5-HT 和 DA 的影响 与正常组比较,东莨菪碱模型组小鼠脑中 5-HT 和 DA 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,定志小丸 $175 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可显著升高小鼠脑中 5-HT 和 DA 含量 ($P < 0.05$) (表 2)。

3.5 对 Ach 和 AchE 的影响 与正常组比较,东莨菪碱模型组小鼠脑中 Ach 含量明显降低和 AchE 活性显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,定志小丸 $350, 175 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 均能不同程度的升高小鼠脑中 Ach 含量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 定志小丸 $175 \sim 700 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 均能不同程度降低小鼠脑中 AchE 活性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (表 3)。

表 2 定志小丸对东莨菪碱诱发记忆障碍小鼠脑中 5-HT 和 DA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of DZXW treatment on 5-HT and DA levels in brain of scopolamine-induced learning-memory impairment in mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	5-HT/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	DA/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	108.51 ± 17.10	52.53 ± 4.90
模型	-	95.15 ± 5.65 ¹⁾	45.42 ± 2.66 ²⁾
阳性对照	0.05	97.01 ± 8.60	47.14 ± 4.40
定志小丸	700	93.36 ± 16.03	43.26 ± 2.48
	350	97.48 ± 11.55	46.67 ± 3.51
	175	104.60 ± 9.48 ³⁾	49.45 ± 3.63 ³⁾

表 3 定志小丸对东莨菪碱诱发记忆障碍小鼠脑中 Ach 和 AchE 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effect of DZXW treatment on Ach and AchE levels in brain of scopolamine-induced learning-memory impairment in mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Ach/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	AchE/ $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	407.64 ± 36.92	88.14 ± 6.55
模型	-	375.99 ± 23.06 ¹⁾	95.16 ± 5.41 ¹⁾
阳性	0.05	404.92 ± 14.20 ⁴⁾	88.85 ± 6.82 ³⁾
定志小丸	700	387.10 ± 24.60	89.15 ± 5.82 ³⁾
	350	416.51 ± 45.53 ³⁾	86.11 ± 6.33 ⁴⁾
	175	408.97 ± 21.90 ⁴⁾	90.27 ± 4.91 ³⁾

4 讨论

定志小丸是益智类方剂的基本方,以人参大补元气,健脑益智;茯苓宁心安神,健脾利湿;远志、菖蒲化痰开窍,益智安神;共奏补养心脾,益智定神。该方已成为临床用于改善和治疗以记忆障碍为早期临床症状的老年性痴呆的基本方剂之一^[8]。本研究表明,定志小丸可明显逆转由东莨菪碱所致模型小鼠脑内小鼠脑内 5-HT 和 DA 含量降低,与作者前期研究以及定志小丸升高老龄大鼠脑内单胺递质的报道一致^[2,6]。同时本实验结果还表明,定志小丸也可明显升高学习记忆障碍小鼠脑内 Ach 含量、降低 AchE 活性,提高中枢胆碱能神经系统的功能。

现代研究证实,脑内 Glu/GABA 系统在调节学习记忆功能中起着重要的作用,Glu 对学习记忆起正性调节作用,GABA 对学习记忆起负性调节作用^[9]。Glu 与 NMDA 受体结合,致使 Ca^{2+} 通道开放,使得突触后 Ca^{2+} 浓度升高,导致长时程突触增强 (LTP);GABA 由 Glu 脱羧酶催化合成,GABA 是

通过对 GABA_B 受体调节实现对学习记忆起负性调节作用^[10]。本实验研究表明东莨菪碱所致模型小鼠脑内 Glu 含量降低及 GABA 含量升高,而定志小丸 700 mg · kg⁻¹ 剂量可明显逆转这种现象,表明定志小丸改善小鼠记忆障碍可能与升高 Glu 含量,且降低 GABA 含量有关。

综上所述,定志小丸在行为学上表现出可明显改善东莨菪碱诱发小鼠学习记忆障碍,在影响与学习记忆相关物质基础方面表现出可显著提高记忆障碍动物脑中 Ach, 5-HT, DA 和 Glu 含量,降低 GABA 含量和 AchE 活性。提示定志小丸增强小鼠学习记忆的作用可能与其调节中枢神经系统,即胆碱能系统、Glu/GABA 系统、5-HT 系统功能相关。

[参考文献]

[1] 汪进良. 开心散抗抑郁的物质基础和作用机制的研究[D]. 北京:中国人民解放军军医进修学院, 2005:49.
[2] Zhou X J, Liu M, Yan J J, et al. Antidepressant-like effect of the extracted of Kai Xin San, a traditional Chinese herbal prescription, is explained by modulation of the central monoaminergic neurotransmitter system in mouse [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139(2):422.

[3] 刘明, 闫娟娟, 周小江, 等. 开心散对慢性应激抑郁模型大鼠学习记忆的影响[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(16):2439.
[4] Cao Y, Hu Y, Liu P, et al. Effects of a Chinese traditional formula Kai Xin San (KXS) on chronic fatigue syndrome mice induced by forced wheel running [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 139(1):19.
[5] 邹琼宇, 瞿融, 马世平, 等. 定志小丸对老龄小鼠学习记忆能力的影响[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(1):3.
[6] 瞿融, 马世平, 詹莹, 等. 定志小丸对老龄大鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(4):684.
[7] Vorhees C V, Williams M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. Nat Protoc, 2006, 1(2):848.
[8] 王欣. 开心散的源流和发展[J]. 山东中医药大学学报, 1997, 21(5):393.
[9] 张士善, 张力, 张丹参. 脑内 Glu/GABA 学习记忆调节系统[J]. 药学学报, 1997, 32(8):638.
[10] 董晓华, 张丹参. Glu/GABA 水平相关性对学习记忆的影响[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(2):283.

Effect and mechanism of Dingzhixiao Wan on scopolamine-induced learning-memory impairment in mice

YAN Juan-juan^{1,2}, LIU Ming^{1,2}, HU Yuan¹, YU Bing-ying¹, ZHANG Gang-qiang¹, LIU Ping^{1*}

(1. Department of Clinical Pharmacology, Center of Pharmacy, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Dingzhixiao Wan (DZXW), a classic traditional Chinese medicine formula consisting of *Acorus tatarinowii*, *Polygala tenuifolia*, *Poria cocos* and *Panax ginseng* in a proportion of 2:2:3:3, on learning-memory impairment induced by scopolamine and its possible mechanisms. **Method:** The mice were randomly divided into six groups: the control group, the model group, the positive huperzine A (0.05 mg · kg⁻¹) group, DZXW 700 mg · kg⁻¹, 350 mg · kg⁻¹ and 175 mg · kg⁻¹ groups. DZXW extracts were orally administrated to the mice for 7 days. Scopolamine (1.5 mg · kg⁻¹, ip) was injected to establish the learning and memory impairment model in mice. Morris water maze (MWM) test was used to assess the learning and memory ability of each group. After the test, the activities of glutamic acid (Glu), γ -amino-butyric acid (GABA), serotonin (5-HT), dopamine (DA), acetylcholine (Ach) and acetyl cholinesterase (AchE) in brain tissue were measured. **Result:** The praxiology test showed that DZXW significantly decreased the average latency of model mice in the place navigation test, and enhanced the frequency for passing through the platform in the spatial probe test, the percentage between target quadrant swimming distance and time. Moreover, DZXW could significantly increase the contents of Glu and 5-HT, DA and Ach, while reducing the levels of GABA and AchE in mice brain. **Conclusion:** DZXW could significantly ameliorate the scopolamine-induced learning-memory impairment in mice and improve their learning-memory capacity, which may be related to its effect on adjusting Glu/GABA system and increasing Ach and monoamine neurotransmitter contents in mice brain.

[Key words] learning and memory; Dingzhixiao Wan; Ach; 5-HT; DA; Glu; GABA

doi:10.4268/cjcm20122128

[责任编辑 张宁宁]