

二精丸总多糖抗长期应激大鼠学习记忆障碍的作用机制*

★ 许小强** 黄敬耀*** 赵涛 涂秀英 黄佩蓓 高书亮 肖百全 罗荣 赵向峰 (江西中医学院药理教研室 南昌 330006)

摘要:目的:探讨二精丸总多糖抗长期应激大鼠学习记忆障碍的作用机制。方法:采用长期应激法造模,二精丸总多糖灌胃,给药结束后用 Morris 水迷宫法测定各组实验大鼠的学习记忆能力;采用酶联免疫法测定大鼠血清雌二醇(E_2)、睾酮(T)、皮质酮(CORT)、 E_2/T 值以及海马部位乙酰胆碱酯酶(AchE)含量。结果:二精丸总多糖组与模型组相比,平均潜伏期明显缩短($P<0.05$),搜索方式明显改变,游泳路径显示在中环区和中心区百分比增加($P<0.05$),平台区穿越次数增多($P<0.05$); E_2 和 E_2/T 值明显降低($P<0.05$),T 和 CORT 明显升高($P<0.05$);海马部位 AchE 浓度明显减少($P<0.05$)。结论:二精丸总多糖能提高长期应激法所致肾阴虚模型大鼠学习记忆能力,同时降低 E_2 和 E_2/T 浓度;升高 T 和 CORT 浓度;抑制 AchE 活性。

关键词:肾阴虚;Morris 水迷宫;二精丸;总多糖;激素水平;AchE

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

Mechanism of Total Polysaccharides in Erjing Pill on Long-term Stress-induced Cognitive Deficits

XU Xiao-qiang, HUANG Jing-yao, ZHAO Tao, TU Xiu-ying, HUANG Pei-bei, GAO Shu-liang, XIAO Bai-quan, LUO Rong, ZHAO Xiang-feng

Department of Pharmacology, Jiang Xi University of Traditional Chinese Medicine, NanChang 330006

Abstract: Objective: To study the mechanism of total polysaccharides in Erjing Pill on long-term stress-induced cognitive deficits. Methods: Model rats of kidney-YIN deficiency were made by using the method of long-term stress, Morris water maze was used to determine the cognition ability of different rats, then we used euzymelinked immunosorbent assay to determine the content of E_2 , T, CORT, E_2/T in serum and AchE in hippocampus(HIP). Results: Compared to model group, total polysaccharides in Erjing Pill can shortened obviously mean incubation period($P<0.05$) and changed obviously the way of searching, it increased obviously the sector percentage distribution of swimming pathway disclosed in middle ring zone and center zone($P<0.05$) and the frequency of passing through plateau region($P<0.05$); it Lowered obviously the content of E_2 and E_2/T ($P<0.05$), it heightened obviously the content of T and CORT($P<0.05$), meanwhile it also shortened the activity of AchE in HIP($P<0.05$). Conclusion: Total polysaccharides in Erjing Pill could elevate the cognition ability of model rats, lowering the content of E_2 and E_2/T , heightening the content of T and CORT, restraining the activity of AchE in HIP.

Key Words: Kidney-YIN deficiency; Morris water maze; Total polysaccharides; Hormone level; AchE

随着社会经济的快速发展,生活和工作节奏的加快,生存压力的加大,这种紧张、快节奏的生活方式造成人们慢性长期的应激状态。应激可影响脑的认知功能,包括学习与记忆等,因此,研究改善慢性

长期应激所致学习记忆功能的药物是一项十分重要的课题。近年来,中医药在改善学习记忆功能方面的研究越来越受到关注。本课题旨在探索具有强精益气补肾中医古方二精丸有效活性部位总多糖改

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30360123)

** 作者简介:许小强(1979—),男,硕士研究生,主要从事抗衰老药理研究, E-mail: lotus115@163.com

*** 通讯作者:黄敬耀(1944—),男,教授,长期从事药理学教学和抗衰老药理的科研工作, Tel: (0791)6801463, E-mail: huangjingyao@vip.sina.com

善学习记忆功能的某些分子作用机制,揭示肾阴虚的某些实质。为今后开发研制防治认知疾病及延年益寿中药新药提供某些理论与实验依据。

1 材料

1.1 实验动物 SD 大鼠,雄性, (200 ± 20) g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供;合格证号为:SCXK(沪)2003-0003;室温 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$,自然光照,自由进水进食。

1.2 实验药物 二精丸总多糖(本教研室自制);黄精和宁夏枸杞(市黄庆仁药栈提供);吡拉西坦片(脑复康),湖北华中药业有限公司提供,产品批号:20050703。

1.3 实验试剂 血清睾酮(T)酶免定量测定试剂盒;血清雌二醇(E_2)酶免定量测定试剂盒;血清皮质酮(CORT)酶免定量测定试剂盒;乙酰胆碱酯酶(AchE)测定试剂盒,大连泛邦化工技术有限公司提供。

2 方法

2.1 二精丸水煎液的制备 取黄精和枸杞各 1 000 g,加 5 倍体积自来水浸泡 30min 后,煮沸后,煎煮 2 次,第 1 次煎煮 40min,第 2 次煎煮 50min,2 次煎煮液过滤后合并,80~100 $^\circ\text{C}$ 水浴浓缩得药液 1 000 ml (含生药量 $2\text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$),冰箱保存备用。

2.2 二精丸总多糖的制备 取黄精、枸杞各 1 000 g,将两药 1:1 混匀进行煎煮 2 次,第 1 次 40min,第 2 次 50min,然后把 2 次煎煮液混合,用滤纸过滤将药渣去除,浓缩至 500 ml,再将 6 倍体积的体积分数为 0.75 的酒精倒入煎煮液中,过夜沉淀。次日将上清液倒出,再将上清液沉淀 1d,倒出上清液,如此进行 3d,将所得沉淀收集然后再用体积分数为 0.95 的酒精、无水酒精、丙酮洗涤,干燥后得二精丸总多糖提取物。测得二精丸总多糖提取物多糖含量质量分数为 0.964。

2.3 动物分组、给药及造模方法 取 SD 雄性大鼠 60 只,随机分组,每组 10 只,共 6 组,分别为正常对照组(control)、阳性组(Masc)、模型组(model)、原方组(AP)、总多糖高剂量组(PSHD)、总多糖低剂量组(PSLD)。除 control 组外,其余五组大鼠采用每天上午束缚悬吊与夹尾交替使用长期激怒应激法进行造模,每天下午给药,造模时间为 21d,control 组灌胃等体积生理盐水(NS),PSHD 组灌胃 $600\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 总多糖,PSLD 组灌胃 $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 总多糖,Masc 组灌胃 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,AP 组灌胃 $4\text{ 000 mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 二精丸。

2.4 各组大鼠学习记忆能力的测定方法 从实验

第 22 天开始,各组大鼠分别进行水迷宫航行定位实验训练。水迷宫分 I、II、III、IV 四个象限,直径 150 cm,高 50 cm,平台高 35 cm,实验前在迷宫内加水直至高于平台 1.5 cm,并加入墨汁以肉眼不能看见平台为度,水温保持在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。池壁上标有东南西北四个入水点,随机选取两入水点,大鼠面壁投入水池中。大鼠连续训练 5d,2 次/d,每次训练时间为 60 s,如果大鼠在规定时间内未找到平台,则由实验人员帮其登陆平台,并在平台上站立 15 s,以帮助记忆,然后再按顺序进行下一次训练。第 5 天下午训练结束后将迷宫内的平台移去,进行空间探索实验(正式测试实验),摄像记录 60 s 内大鼠在迷宫内的游泳路径(轨迹)。整个实验过程中应保持迷宫室内的物体原貌,切勿移动,并且应及时清除水迷宫内大鼠产生的粪便以免对实验产生不良影响。

2.5 各组大鼠 E_2 、T、CORT 及 AchE 的测定方法

水迷宫测试学记忆能力实验结束后,对各组大鼠进行股动脉取血,1 500 r/min 离心 10min 后取血清冰冻(-20°C)保存备用,用于 E_2 、T、CORT 含量的 ELISA 检测。然后将各组大鼠立即断头处死,在冰台上快速取大脑海马组织,将大脑海马组织用组织匀浆器处理 30s,用冰冷 NS 制成 10% 的匀浆液,40 $^\circ\text{C}$ 3 500 r/min 离心 10min,取上清液置于 -20°C 冰箱保存,用于 AchE 含量的 ELISA 检测。所有操作均按试剂盒说明书进行。

2.6 统计方法 所有的数据均用 SPSS 13.0 进行单因素方差分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 一般情况 造模过程中 model 组大鼠出现形体消瘦、体毛稀疏、烦躁、易出汗、体重明显下降等症状,体温变化不明显(肛温)。PSHD 组与 model 组相比,这些症状得了明显的改善。

3.2 对模型大鼠平均逃避潜伏期的影响 第 1~2 天,各组大鼠均无明显的变化;第 3~5 天,model 组与 control 组相比,平均逃避潜伏期明显延长($P < 0.05$),PSHD 组与 model 组相比,平均逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$);第 1~5 天,PSHD 组与 AP 组相比,平均逃避潜伏期有比较明显的变化,但无统计学意义。见表 1。

3.3 对大鼠搜索策略的影响 搜索策略是反映大鼠学习记忆能力的一个重要指标,大鼠到达平台的策略共分 4 种,分别为直线式、趋向式、边缘式、随机式。各组大鼠第 1 天在 Morris 水迷宫实验里大部分采用边缘式和随机式;第 2~3 天,除 model 组大鼠外,各组大鼠随机式次数明显降低,直线式次数明

显增加。到了第 4~5 天,除 model 组外,各组大鼠的主要搜索方式为趋向式、直线式,特别是 control 组和 PSHD 组大鼠,而 model 组大鼠的主要搜索方

式为边缘式。

3.4 对大鼠空间探索实验的影响 见表 2。

表 1 各组对大鼠平均逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Group	剂量 /mg·kg ⁻¹	平均逃避潜伏期/s				
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
Control	—	38.46 ± 12.48	36.87 ± 11.01	33.47 ± 8.16	21.74 ± 10.96	18.57 ± 8.60
Model	—	40.45 ± 13.55	42.04 ± 5.12	46.12 ± 4.86	49.65 ± 3.38	52.18 ± 6.56
Masc	4000	41.11 ± 8.36	37.24 ± 14.03	36.94 ± 16.46	30.75 ± 15.51 [△]	27.36 ± 8.65 [△]
AP	400	40.49 ± 11.86	36.73 ± 13.48	4.11 ± 13.44 [△]	31.42 ± 12.12 [△]	26.66 ± 7.62 [△]
PSHD	600	39.72 ± 12.04	37.00 ± 13.60	4.29 ± 8.22 [△]	26.58 ± 6.83 [△]	19.75 ± 13.50 [△]
PSLD	300	42.15 ± 15.55	38.81 ± 12.29	7.49 ± 13.98	29.98 ± 9.22 [△]	27.42 ± 11.51 [△]

注:vs normal control group, $P < 0.05$; vs model group, $\triangle P < 0.05$; vs archeo-prescription group, $\diamond P < 0.05$ 。

表 2 各组对大鼠空间探索实验的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Group	剂量/mg·kg ⁻¹	ORZ(%)	MRZ(%)	CZ(%)	PTPF/F
Control	—	49.16 ± 13.20	40.54 ± 11.79	11.55 ± 3.19	3.50 ± 1.51
Model	—	73.49 ± 9.44	25.47 ± 9.34	2.64 ± 1.62	0.75 ± 0.71
Masc	4000	69.09 ± 9.87	28.28 ± 8.69	1.05 ± 0.94	2.00 ± 0.76
AP	400	68.81 ± 9.96	28.60 ± 8.71	2.59 ± 2.86	1.86 ± 1.07
PSHD	600	46.96 ± 12.98 ^{△◇}	42.63 ± 8.51 ^{△◇}	10.41 ± 5.57 ^{△◇}	3.22 ± 2.22 ^{△◇}
PSLD	300	69.73 ± 14.53	28.85 ± 13.77	1.42 ± 1.03	1.12 ± 0.83

注:vs normal control group, $P < 0.05$; vs model group, $\triangle P < 0.05$; vs archeo-prescription group, $\diamond P < 0.05$ 。ORZ:outer ring zone,外环区域;MRZ:middle ring zone,中环区域;CZ:center zone,中心区域;PTPF:passing through platform frequency,穿越平台次数。

从表 2 可知:Model 组与 control 组相比,外环区域(ORZ)显著增多,中环区域(MRZ)和中心区域(CZ)显著减少($P < 0.05$)。PSHD 组与 model 组相比,ORZ 显著减少,MRZ 和 CZ 显著增多($P < 0.05$);PSHD 组与 AP 组相比,ORZ 显著减少,MRZ 和 CZ 显著增多($P < 0.05$);model 组与 control 组相

比,穿越平台次数(PTPF)明显减少($P < 0.05$)。PSHD 组与 model 组相比,PTPF 明显增多($P < 0.05$);PSHD 组与 AP 组相比,PTPF 明显增多($P < 0.05$)。

3.5 二精丸总多糖对模型大鼠 E₂、T、CORT、E₂/T 的影响 见表 3。

表 3 各组大鼠血清中 E₂、T、CORT、E₂/T 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Group	Dose/mg·kg ⁻¹	E ₂ /pg·ml ⁻¹	T/ng·ml ⁻¹	CORT/nmol·L ⁻¹	E ₂ /T
Control	—	29.26 ± 2.25	4.80 ± 0.45	4.65 ± 0.70	6.14 ± 0.71
Model	—	53.56 ± 54.37	2.40 ± 0.73	1.64 ± 0.27	23.47 ± 4.60
Masc	4000	36.76 ± 10.41 [△]	2.83 ± 0.77	3.18 ± 1.58 [△]	13.99 ± 6.32 [△]
AP	400	37.47 ± 6.07 [△]	3.32 ± 1.16 [△]	3.63 ± 1.35 [△]	13.63 ± 7.67 [△]
PSHD	600	34.79 ± 6.49 [△]	4.46 ± 0.73 ^{△◇}	3.96 ± 0.53 [△]	7.80 ± 0.84 ^{△◇}
PSLD	300	46.43 ± 4.53 ^{△◇}	3.07 ± 0.39 [△]	2.51 ± 0.82 [◇]	15.39 ± 2.86 [△]

注:vs normal control group, $P < 0.05$; vs model group, $\triangle P < 0.05$; vs archeo-prescription group, $\diamond P < 0.05$ 。

3.6 对大鼠海马部位 AchE 的影响 见表 4。

表 4 各组对大鼠海马部位 AchE 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Group	Dose/mg·kg ⁻¹	AchE/nmol·L ⁻¹
Control	—	0.17 ± 0.07
Model	—	0.70 ± 0.11
Masc	4000	0.10 ± 0.03 [△]
AP	400	0.43 ± 0.27 [△]
PSHD	600	0.06 ± 0.02 ^{△◇}
PSLD	300	0.22 ± 0.17 ^{△◇}

注:vs normal control group, $P < 0.05$; vs model group, $\triangle P < 0.05$; vs archeo-prescription group, $\diamond P < 0.05$ 。

4 讨论

随着全球人口的老齡化,衰老以及与衰老相关

的疾病已成为世界范围内日趋严重的医学问题和社会问题。我们采用了长期激怒应激法来制造肾虚模型,此法与其它方法相比较具有许多的优点:(1)更接近于临床实际,其属情志失调而致病,符合中医七情致病特点。(2)避免了大剂量给药造成的急性损伤和中毒。(3)未用激素之类药物,无人所导致内分泌紊乱,较符合中医病因学理论。故长期激怒应激法是肾虚证实验研究的首选造模方法。长期激怒应激法目前有比较公认的两种方法,束缚悬吊法^[1]和夹尾法^[2],但经过我们多次的预实验发现,两种方法均有缺点:束缚悬吊法对大鼠双后肢局部

损伤比较大,容易出现红肿化脓溃烂,不利于长时间进行,此外,这种方法激怒程度很大,大鼠耐受力有限,在造模过程中大鼠容易死亡。而夹尾法对大鼠尾巴损伤比较大,容易出现红肿化脓溃烂,并且激怒程度比较轻。为达到最理想的效果,我们对上述两种方法稍作改进,即两种方法交替进行。这样使得造模过程中既不会造成大鼠死亡,也不会影响大鼠的激怒程度。

学习记忆能力与脑功能紧密联系在一起,学习记忆能力是脑功能最基本的表现,而从中医学的角度来讲,脑功能与肾精盛衰密切相关,故肾阴虚会导致学习记忆功能下降。我们使用 Morris 水迷宫系统的评价了各组大鼠的学习记忆功能。在定位航行实验中,model 组学习成绩显著下降,平均逃避潜伏期明显长于 control 组,在迷宫中的搜索方式主要是边缘式和随机式,这说明动物在用长期应激激怒法造肾阴虚模型后发生了严重的学习记忆功能障碍。Conrad CD 等^[3]也报道束缚应激损伤大鼠 Y 型迷宫空间记忆能力。Quervain DJ 等^[4]研究发现,当人或动物处于强烈的急性应激或长期慢性应激状态时,其学习记忆能力受到明显影响,表现为学习记忆能力低下。本实验观察了二精丸总多糖对肾阴虚模型大鼠的学习记忆功能的影响,结果表明,PSHD 组与其它组相比,搜索策略、PTPF、MRZ、CZ 百分比均发生明显的变化($P < 0.05$)。提示二精丸总多糖能有效改善长期应激激怒法造肾阴虚模型大鼠的学习记忆功能障碍,对改善 AD 认知功能具有广阔的前景。

近年来肾虚本质的研究受到高度重视,在肾的实质的研究中显示肾虚与丘脑-垂体-性腺轴功能活动失调密切相关,肾虚越重,激素变化越显著。性激素内环境的改变是肾虚发生和发展的重要物质基础,可以作为肾虚不同证型的客观指标。方素钦等^[5]在对肾虚证实质研究中,男性肾虚组与 control 组比较,T、T/E₂ 显著降低,E₂ 显著增高;女性肾虚证组与 control 组比较,T 显著增高,E₂、T/E₂ 显著降低。刘雁峰等^[6]在对大鼠施以 4 周的复合刺激(冷水游泳和进食时电击)后,大鼠血浆中 CORT 水平明显低于对照组。本实验观察了二精丸总多糖对肾阴虚模型大鼠血清 E₂、T、CORT 值的影响,结果表明,PSHD 组与其他组相比,E₂、T、CORT、E₂/T 均有明显的变化($P < 0.05$)。说明二精丸总多糖能有效的逆转长期应激激怒法所致肾阴虚证模型大鼠 E₂、T、CORT、E₂/T 值,使之趋向正常水平。

中枢胆碱能系统与学习记忆有密切关系,这一领域的研究已积累了大量资料。学习记忆的生化机制主要阐明神经递质、神经肽及生物大分子对学习记忆的作用及其机制^[7]。有研究证明^[8],老化及老年性痴呆病人脑组织中胆碱乙酰化酶活性明显降低,AchE 活性明显升高,造成脑内 Ach 含量不足,中枢胆碱能系统功能障碍,而出现学习记忆障碍。研究表明,中药有效成分能够有效对抗各种模型大鼠学习记忆障碍^[9,10]。本实验观察了二精丸总多糖对肾阴虚模型大鼠 AchE 活性的影响,结果表明:PSHD 组 AchE 活性显著降低($P < 0.05$)。提示长期应激激怒所致肾阴虚模型大鼠学习记忆的损害可能与海马胆碱能神经功能活动的减退有关。二精丸总多糖能抑制 AchE 活性,提高模型大鼠的学习记忆。二精丸总多糖能提高长期应激激怒法所致肾阴虚模型大鼠学习记忆能力,二精丸总多糖提高模型动物学习记忆能力作用机制可能是通过以下途径/指标来实现:降低 E₂ 和 E₂/T 浓度;升高 T 和 CORT 浓度;抑制 AchE 活性。但具体的作用机制有待于系统深入的研究,此外,二精丸总多糖的提取工艺、质量标准有待于改进,二精丸总多糖的作用也有待于进一步研究。

参考文献

- [1]樊蔚虹,岳广欣,李素香,等.长期应激致肝肾阴虚证动物模型研制[J].中国中医基础医学杂志,2001,7(9):707~709
- [2]顾立刚,王庆国,赵岩松,等.应激刺激对大鼠下丘脑单胺类激素和 T 淋巴细胞功能变化影响的研究[J].中国中医药信息杂志,2000,7(8):44~45
- [3]Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y, et al. Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianepetine pretreatment[J]. Behav Neurosci., 1996, 110(6): 1 321~1 334
- [4]Quervain de DJ, Roozendaal B, McGaugh JL. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory [J]. Nature, 1998, 394(6695): 787~790
- [5]方素钦,林炳辉,叶盈,等.中老年人肾虚证与性激素及免疫功能的研究[J].福建中医药,2002,33(2):1~3
- [6]刘雁峰,王天芳,杨维益,等.复合应激因素致大鼠促肾上腺皮质激素和皮质酮含量变化的研究[J].中国医药学报,2000,15(1):72
- [7]沈玉先,魏伟,张瑰红,等.褪黑素对痴呆大鼠胆碱能功能的修复[J].中国药理学通报,2002,18(3):281~285
- [8]Leathwood PD, Mauron J, Lecithin J, et al. Senile dementia: outlook for the future 1st ed[M]. Alan R liss, 1984. 9
- [9]金英,闫恩志,范莹,等.阿魏酸钠对抗 Aβ25-35 致大鼠学习记忆障碍与 IL-1β 和 p38MAPK 表达的相关性探讨[J].中国药理学通报,2006,22(5):602~606
- [10]邓云,马百平,徐秋萍,等.知母有效成分对拟痴呆模型大鼠学习记忆的影响及机制[J].中国药理学通报,2005,21(7):830~833

(收稿日期:2007-04-17)