

· 实验研究 ·

调心方对大鼠海马脑片长时程增强效应的影响*

万 勤 张永祥

内容提要 目的:观察调心方对大鼠海马脑片长时程增强(LTP)效应的影响。方法:采用细胞外微电极技术,记录大鼠海马脑片 CA₁ 区细胞外群峰电位(PS),然后施以 100Hz、100 串的强直刺激,诱发 LTP 产生。结果:在正常情况下,大鼠海马脑片 LTP 的诱发成功率约为 60%,施以高频串刺激后 PS 幅度显著增高,PS 潜伏期明显缩短。用调心方(7.45mg/ml)预先孵育海马脑片对正常 PS 的形状、幅度均无明显影响,提示其并不影响海马脑片的基础突触传递;但施以高频刺激后脑片 LTP 的诱发率呈现升高趋势,同时其 PS 增幅与正常对照组比较也显著提高。结论:调心方可提高大鼠海马脑片 LTP 的诱发率及增幅,这可能是其改善海马学习记忆功能的作用机制之一。

关键词 调心方 长时程增强效应 海马脑片

Effect of Tiaoxin Recipe on Long-term Potentiation in Hippocampal Slices of Rats WAN Qin, ZHANG Yong-xiang *Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing (100850)*

Objective: To investigate the effect of Tiaoxin Recipe (TXR) on long-term potentiation in hippocampal slices of rats. **Methods:** Population spikes (PS) in CA₁ area of rats hippocampal slices were evoked by extracellular microelectrode recording technique, and tetanic stimulation (100Hz, 100 pulses) was used to induce long-term potentiation (LTP). **Results:** The successful rate of evoking LTP was about 60% under normal condition, the PS amplitude increased after stimulation, whereas PS latent period decreased obviously. Pre-incubation of hippocampal slices with TXR (7.45 mg/ml) showed little effect on either the shape or amplitude of PS, indicating it didn't influence the basal synaptic transmission. However, after tetanus, the LTP induction rate and PS amplitude were significantly enhanced compared with the control. **Conclusion:** TXR facilitates LTP induction rate and PS amplitude in rat hippocampal slices, which might be one of the mechanisms of TXR in improving learning and memory function of hippocampus.

Key words Tiaoxin Recipe, long-term potentiation, hippocampal slice

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是发生于老年前期或老年期的一种神经退行性疾病,临床主要表现为慢性进行性记忆障碍和智力明显减退。随着世界人口的老齡化,AD 已成为第四大引起人类死亡的疾病,严重危害老年人的身心健康与生命质量。AD 的发病机制涉及广泛,目前还缺乏理想的治疗药物,因此,研究与开发防治 AD 的药物是当今国际药理学研究领域的重要课题之一。大量临床实验研究表明,调心方能改善 AD 患者的认知功能障碍,对中、重度 AD 患者均有一定的治疗作用^[1-3]。动物实验也显示,调心方对 β -淀粉样蛋白诱导的痴呆模型大鼠的空间学习

记忆障碍具有明显的改善作用^[4,5]。本实验采用细胞外微电极记录技术,观察调心方对大鼠海马脑片长时程增强(long-term potentiation, LTP)效应的影响,试图从海马神经突触传递的角度来阐述其改善大鼠学习记忆功能的作用机制。

材料与方法

1 实验动物 20~25 只二级成年雄性 Wistar 大鼠(体重 120~200g),由军事医学科学院动物中心提供。

2 药物 调心方是由党参、桂枝、茯苓、石菖蒲、远志和炙甘草等组成的中药复方,其口服液由上海中医药大学老年医学研究所提供,含 7.45g 生药/ml。

3 海马脑片制备 将大鼠在乙醚麻醉下断头取脑,于大脑半球腹内侧分离出双侧海马,在 4℃ 供氧条

* 国家自然科学基金重点项目(No. 39830450)

军事医学科学院毒物药物研究所(北京 100850)

件下,用振动切片机 (Vibroslice MA752, Campden Ins, UK) 沿与海马长轴垂直的方向将其切成约 400 μ m 的脑片,全部脑片置于不断通入氧混合气 (95% O₂ + 5% CO₂) 的人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 中,在室温下孵育 2~3h。ACSF 的成分为 (mmol/L): NaCl 124、KCl 5、KH₂PO₄ 1.2、MgSO₄ 1.3、NaHCO₃ 26、CaCl₂ 2.5、Glucose 10,调节 pH 值至 7.3~7.4。

4 群峰电位记录 将孵育后的脑片置于 29~31℃ 恒温浴槽内,并不断通入氧混合气,用蠕动泵持续灌流 ACSF,速度为 2ml/min。双极刺激电极置于 CA₁ 区 Schaffer 侧支上,玻璃微电极 (内充 4mol/L NaCl 溶液,阻抗 4~10M Ω) 置于海马 CA₁ 区锥体细胞层,记录细胞外诱发群峰电位 (population spike, PS),通过微电极放大器 (Axoclamp 2A, Axon Ins, USA) 与计算机联机经 Pclab2.2 软件 (北京微信斯达科技发展有限公司) 进行采样处理。

5 LTP 的诱发 记录前将刺激强度调节到能诱发 1/2~2/3 最大 PS 幅度的刺激强度水平,待 PS 基本稳定后施以 100Hz、100 串的强直刺激,如果 PS 增幅在 20% 以上,并且能维持 30min 以上则认为 LTP 成功诱发,分别观察对照组和给药组的 LTP 诱发率以及 PS 幅度、PS 潜伏期的变化情况。

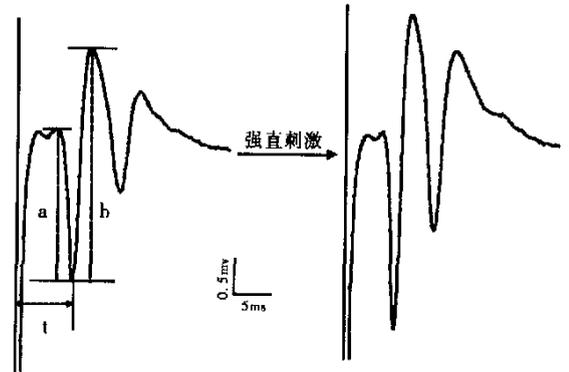
6 给药方法 将调心方口服液离心过滤,然后稀释 1000 倍溶于 ACSF,即调心方终浓度含 7.45mg 生药/ml。当观察调心方对海马脑片基础突触传递的影响时,先采用通常的 ACSF 灌流脑片记录正常的 PS,然后采用此含有调心方的 ACSF 灌流脑片观察其是否发生变化;而当观察调心方对海马脑片 LTP 诱生的影响时,不仅在实验记录过程中均采用含有调心方的 ACSF 灌流脑片,而且在实验前还用此液预先孵育海马脑片 2h 以上以确保药物的充分作用。

7 数据分析及统计学处理 采用 Origin 5.0 (Microcal Software, USA) 和 SPSS 软件对所获数据进行分析作图以及统计学处理,定量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数的比较采用自身对照 *t* 检验或成组 *t* 检验。

结 果

1 大鼠海马脑片 LTP 的诱生 首先记录海马脑片 CA₁ 区细胞外群峰电位 PS,使其幅度在较长一段时间内基本维持稳定,然后施以 100Hz、100 串的强直刺激诱发 LTP 产生 (见图 1)。实验中观察到,在所记录的 28 例正常大鼠海马脑片中,当采用强直刺激后有

17 例脑片的 PS 幅度显著增大,并且能持续 30min 以上,即 LTP 的诱发成功率约为 60%。以刺激前脑片的 PS 幅度为 100% 计算,强直刺激后其 PS 幅度显著增高,与刺激前比较约增加了 (35.77 \pm 10.79)% (用自身对照 *t* 检验, *P* < 0.01, *n* = 17)。同样,也以刺激前的 PS 潜伏期为 100% 计算,可见强直刺激后其 PS 潜伏期明显缩短,仅为刺激前的 (87.7 \pm 8.95)% (用自身对照 *t* 检验, *P* < 0.01, *n* = 17)。



PS 幅度 = (a + b)/2, PS 潜伏期 = t

图 1 大鼠海马脑片 CA₁ 区 PS 以及强直刺激后 PS 幅度及潜伏期的变化

2 调心方对大鼠海马脑片基础突触传递的影响 首先用通常的 ACSF 灌流海马脑片记录正常的 PS,待其基本稳定后,再用含 7.45mg/ml 调心方的 ACSF 灌流,观察其对脑片基础 PS 的影响。结果发现所记录的 5 例脑片在灌流调心方后的 30min 内,PS 的形状、幅度均没有发生明显的变化,从而提示调心方不影响大鼠海马脑片的基础突触传递。

3 调心方对大鼠海马脑片 LTP 诱生的影响 预先用含 7.45mg/ml 调心方的 ACSF 孵育海马脑片 2~3h,然后在记录脑片 PS 以及随后诱发 LTP 的过程中一直采用同样浓度的调心方灌流,观察其对脑片 LTP 诱发的影响。结果发现,在所记录的 15 例脑片中有 11 例成功地诱发出了 LTP,即 LTP 的诱发率为 73.33%,与正常对照组比较呈现出升高趋势。另外,强直刺激后调心方组脑片 PS 的增幅也显著提高,在施以强直刺激后的不同时间点,调心方组 PS 的幅度均显著高于相应的同一时间点的对照 (见图 2),从而提示调心方可增强大鼠海马脑片的 LTP 效应。强直刺激后调心方组的 PS 潜伏期与刺激前比较也明显缩短 (用自身对照 *t* 检验, *P* < 0.01, *n* = 11),与正常对照组比较其呈现出进一步缩短的趋势,但经统计学处理两者之间的差异无显著性。

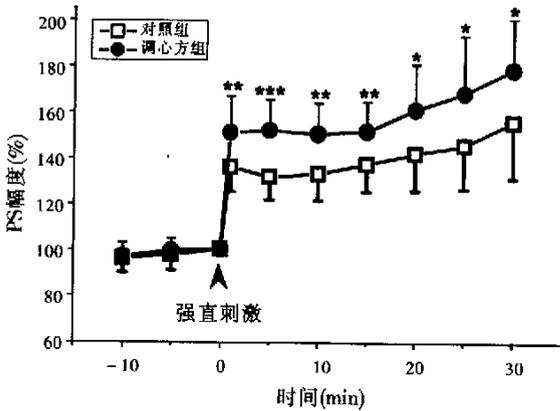


图 2 调心方对大鼠海马脑片强直刺激后 PS 增幅的影响

注:以强直刺激前 PS 幅度的平均值为 100% 计算,将其它各时间点的 PS 与之比较得到 PS 幅度的相对值(以百分数表示), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; $n = 11 \sim 17$

讨 论

学习记忆是中枢神经系统的重要功能,学习记忆功能的表达不仅需要足够数量的神经元,并且需要神经元之间形成复杂的突触联系,才具有传递、处理、加工和储存外来信息的能力。已有研究表明,神经突触的可塑性与学习记忆之间存在着密切联系,而 LTP 则被认为是反映神经突触可塑性的一个重要指标,它直接反映了突触水平上的信息贮存过程,初步沟通了整体的学习记忆行为与神经细胞可塑性变化之间的关系,是学习记忆重要的细胞学基础⁽⁶⁾。

海马是脑内与学习记忆功能关系最为密切的部位之一,其神经元脆性较大,易受损伤,在动物和人类中枢神经系统的所有脑区和神经核团中,海马的增龄性功能障碍最为明显。在老年性痴呆和其它一些神经退行性病变过程中都存在着严重的海马机能障碍,AD 患者海马损伤程度同其认知功能的衰退之间具有明显的相关性^(7,8);另外,有研究表明,动物空间学习记忆能力的增强或损伤与其海马 LTP 活动的提高与降低密切相关^(9,10),从而提示海马 LTP 是反映学习记忆过程中神经元生理活动的一个重要的客观指标。

因此我们在实验中观察了调心方对大鼠海马

LTP 效应的影响,结果发现,调心方对海马脑片 CA₁ 区锥体神经元正常的突触传递活动没有影响,但使其 LTP 诱发率呈现增高的趋势,并能显著提高 PS 的增幅,提示调心方对海马脑片 LTP 的诱发和维持具有促进作用,这可能是其改善海马学习记忆功能的作用机制之一。目前关于调心方影响海马 LTP 诱发的相关物质基础正在寻找和研究中。

参 考 文 献

1. 林水森,杨柏灿.养心健脑液治疗 Alzheimer 痴呆的临床研究.上海中医药大学学报 1997;11(1):44—45.
2. 李亚明,张春燕,王 健,等.调心方对中、重度老年性痴呆病智力的影响.现代康复 2000;4(7):996—997.
3. 周如倩,林水森,王 健,等.中药调心方、补肾方改善阿尔茨海默病认知功能的临床研究.现代康复 2001;5(6):46—47.
4. 周 晖,赵伟康.调心方对 β A 大鼠痴呆模型空间学习记忆障碍和胆碱能系统的影响.中药药理与临床 1998;14(3):29—31.
5. 刘学源,徐品初,林水森,等.调心方对杏仁核注射 β A 大鼠记忆行为和胆碱能系统作用的研究.现代康复 2001;5(5):48—49.
6. Bliss T, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature 1993;361:31—39.
7. Coleman P, Flood D. Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 1987; 11:1316—1321.
8. Mann DMA. The neuropathology of Alzheimer's disease: a review with pathogenetic, etiological and therapeutic considerations. Mech Aging Dev 1985;31:213—255.
9. Grant SGN, O'Dell TJ, Karl KA, et al. Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in *fyn* mutant mice. Science 1992;258:1903—1910.
10. Korol DL, Abel TW, Church LT, et al. Hippocampal synaptic enhancement and spatial learning in the Morris swim task. Hippocampus 1993;3:127—132.

(收稿:2002-02-20 修回:2002-07-15)

第二届全国中西医结合男科学会议征文通知

中国中西医结合学会拟 2003 年 4 月在安徽黄山市召开第二届全国中西医结合男科学会议,现将征文事宜通知如下:(1)征文内容:中医、西医及中西医结合诊治男性不育症、前列腺疾病、男性功能障碍、性传播疾病、中老年部分雄激素缺乏综合征等男科疾病的基础、临床以及实验研究。(2)征文要求:正文字数在 3000 字以内,附 800 字论文摘要;请用 400 字稿纸誊写,字迹清楚,欢迎打印稿或附光盘;论文请注明作者姓名、单位、通讯地址、邮编、电话,并加盖单位公章。于 2003 年 2 月 20 日前(以邮戳为准)寄至中国中医研究院广安门医院男科郭军、孔令青医师收,信封注明“征文”。地址:北京市宣武区北线阁 5 号。邮编:100053 电话:(010)88001126/88001053。论文也可发电子邮件,E-mail:gamyynk@sina.com 具体会议时间地点另行通知。如需更多信息,请访问中国男科网(<http://www.adpync.com>)。