

# 肾虚质大鼠学习记忆能力与海马 NMDA 受体表达的实验研究

孙瑜<sup>1</sup> 孙耀光<sup>1</sup> 张琪<sup>1</sup> 王晓棣<sup>2</sup> 王兴<sup>2</sup> 孙理军<sup>1</sup>

**摘要** **目的** 观察肾虚质大鼠学习记忆能力与海马 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体表达变化,探讨“肾藏志”中医学理论的物质基础与神经生物学机制。**方法** 将 40 只 SD 大鼠随机分为模型组、左归丸、右归丸组及空白组(产自正常孕鼠),每组 10 只,采用“猫吓鼠”经典造模法制备先天不足加后天失养复合型肾虚质仔鼠模型。对仔鼠恐吓同时开始给药,左归丸、右归丸组分别给予左归丸混悬液 0.1875 g/mL、右归丸混悬液 0.0938 g/mL 灌胃,空白组及模型组给予等量生理盐水灌胃,每日 1 次,每周用药 5 天,连续 2 个月。通过 Morris 水迷宫实验检测大鼠学习记忆能力,采用免疫组化法检测海马组织 NMDA 受体亚基 NR2A、NR2B 蛋白表达水平。**结果** 与空白组比较,模型组 Morris 水迷宫实验潜伏期及总路程增加( $P < 0.05$ );与模型组比较,左归丸及右归丸组上述指标均降低( $P < 0.05$ )。与空白组比较,模型组海马组织 NMDA 受体亚基 NR2A、NR2B 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,左归丸、右归丸组 NR2A 及 NR2B 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ )。**结论** 肾虚质大鼠学习记忆能力退化且海马 NMDA 受体表达低下,补肾药物左归丸、右归丸可上调 NMDA 受体表达,提高其学习记忆能力,从而改善肾虚质脑功能退化状态。

**关键词** 肾虚质;学习记忆能力;N-甲基-D-天冬氨酸受体

Learning and Memory Capacity and NMDA Receptor Expression in Shen Deficiency Constitution Rats SUN Yu-ru<sup>1</sup>, SUN Yao-guang<sup>1</sup>, ZHANG Qi<sup>1</sup>, WANG Xiao-di<sup>2</sup>, WANG Xing<sup>2</sup>, and SUN Li-jun<sup>1</sup>  
1 College of Basic Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi (712046); 2 Graduate School, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi (712046)

**ABSTRACT** **Objective** To explore material bases and neurobiological mechanisms of "Shen storing will" by observing learning and memory capacities and N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor expressions in Shen deficiency constitution (SDC) rats. **Methods** Totally 40 SD rats were randomly divided into the model group, the Zuogui Pill (ZP) group, the Yougui Pill (YP) group, the blank control group (consisting of normal pregnant rats), 10 in each group. SDC young rat model (inherent deficiency and postnatal malnutrition) was prepared by the classic way of "cat scaring rat". Medication started when they were scared by cat. Rats in the ZP group and the YP group were administered by gastrogavage with ZP suspension 0.1875 g/mL and YP suspension 0.0938 g/mL respectively. Equal volume of normal saline was administered to rats in the blank control group and the model group by gastrogavage. All medication was given once per day, 5 days in a week for 2 consecutive months. Learning and memory capacities were detected by Morris water maze test. Expressions of NMDA receptor subunits NR2A and NR2B in hippocampus were detected by immunohistochemical method. **Results** Compared with the blank control group, the latency period, total distance in Morris water maze test were longer in the model group ( $P < 0.05$ ). All the aforesaid indices all decreased in the ZP group and the YP group, with statistical difference when compared with the model group ( $P < 0.05$ ). The protein expressions of NR2A and NR2B in hippocampus were lower in the model group than in the blank control group ( $P < 0.05$ ). But when compared with

基金项目:陕西省科技厅研究项目(No. 2013JM4033);陕西省重点实验室研究项目(No. 13JS031)

作者单位:1. 陕西中医药大学基础医学院(陕西 712046); 2. 陕西中医药大学研究生院(陕西 712046)

通讯作者:孙理军, Tel: 13892010999, E-mail: 1246503262@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.05.0597

the model group, they were obviously higher in the ZP group and the YP group ( $P < 0.05$ ). Conclusions SDC rats had degenerated learning and memory capacities and lowered NMDA receptor expressions. ZP and YP could up-regulate learning and memory capacities and NMDA receptor expressions, thereby improving deterioration of brain functions in SDC rats.

**KEYWORDS** Shen deficiency constitution; learning and memory capacity; N-methyl-D-aspartate receptor

肾虚质是各类人群中常见的体质类型之一,是一种以肾中精气亏虚,肾脏功能低下为主要特征的体质状态<sup>[1]</sup>,研究证实肾虚抑制性影响生物体生长发育全过程<sup>[2]</sup>。本研究以“肾藏志应恐”、“恐伤肾”等中医学理论为依据,以大鼠学习记忆能力和海马 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体亚基表达为切入点,探讨肾虚质与脑功能衰退的相关性及“肾藏志”中医学理论的物质基础与神经生物学机制,为肾虚质特征及肾藏志理论的现代实验研究,提供研究思路与方法。

## 材料与方法

**1 动物** 40 只 8 周龄清洁级 SD 大鼠,雌雄各半,体重 200~300 g,购自西安交通大学医学院实验动物中心,动物许可证号: SCXK(陕)2007-001。标准饲料喂食,不限饮水,室温。雌、雄土猫各 1 只,3 月龄,凶狠善叫,鲜活大鼠喂食,不限饮水,室温。

**2 药物、试剂及仪器** 左归丸(每 10 丸含生药 1 g,河南省宛西制药股份有限公司,批号:100306),右归丸(每 8 丸含生药 3 g,河南省宛西制药股份有限公司,批号:110309),DAB 显色试剂盒、SABC 试剂盒、枸橼酸缓冲液、水合氯醛、乙醇、多聚甲醛、30% 蔗糖溶液、OCT 包埋剂、30%  $H_2O_2$ 、NR2A、NR2B 一抗、二抗(均购自武汉博士德公司),Morris 水迷宫(香港友成公司)、电子天平(赛多利斯)、冰冻切片机(Lecia CM1850)、显微镜(Zeiss A1,德国)。

**3 动物分组与模型制备** 参照本课题组前期研究制备肾虚体质模型<sup>[3]</sup>。30 只大鼠适应性饲养 1 周,按雄性:雌性 = 1:2 比例合笼交配。成功受孕后将孕鼠随机分为对照组( $n = 10$ )及肾虚组( $n = 10$ )。肾虚组孕鼠置于特制鼠笼,于 8:00~19:00 置于猫笼旁进行恐吓,同时在猫笼内放置雄鼠令其捕食使孕鼠在旁处于恐慌状态。对照组孕鼠不作刺激处理,非恐吓时间两组均置于同处并确保其他非处理因素一致。恐吓至两组孕鼠产子,将仔鼠饲养 4 周后进行分组,空白组( $n = 10$ )从对照组孕鼠所产仔鼠中随机选取;肾虚组孕鼠所产仔鼠随机选取 30 只,分为模型组、左归

丸组及右归丸组,每组 10 只。继续对此 3 组仔鼠进行上述“猫吓鼠”方案,持续 4 周后,肾虚组仔鼠出现不同程度的目光惊恐或眼中无神、体重减轻、倦怠无力、蜷缩、扎堆、活动减少、大小便增多、皮毛松弛等征象,解剖观察胸腺、脾、肾、肝、心、肺、睾丸等脏器未发现明显形态结构异常,提示肾虚体质模型仔鼠造模成功<sup>[1,3]</sup>。空白组仔鼠未予刺激,非恐吓时间 4 组仔鼠均置于同处以减小非处理因素。

**4 给药方法与剂量** 按文献折算<sup>[4]</sup>,大鼠用药量约为成人用量的 6.25 倍。左归丸成人每日服生药 18 g,则大鼠每日服生药为 1.875 g/kg,蒸馏水配成 0.1875 g/mL 混悬液备用。右归丸成人每日服生药 9 g,则大鼠每日服生药 0.9375 g/kg,蒸馏水配成 0.0938 g/mL 混悬液备用。对仔鼠恐吓同时开始灌胃,左归丸、右归丸组分别给予上述制备好的混悬液,空白组和模型组均给予等量生理盐水 10 mL/kg,每天 1 次,每周用药 5 天,连续 2 个月。

## 5 观察指标与检测方法

**5.1 Morris 水迷宫实验** 参照参考文献[5,6],各组仔鼠灌胃第 5 周时进行 Morris 水迷宫实验,实验第 1 天为适应训练,每只仔鼠在池中游泳 120 s。第 2~5 天为学习阶段,随机选取一象限将大鼠头朝池壁缓缓放入水中,记录大鼠找到水下平台时间,若超过 60 s 未找到者,则引导至平台停留 10 s,每只大鼠每天 4 次,中间间隔 15~20 min。实验第 6 天为测试阶段,将大鼠分别从 4 个不同象限放入水中,找到平台后令其休息 10 s,若 120 s 内找不到平台则记时 120 s,并将其引致平台休息 10 s,从下一象限继续实验,以大鼠 4 次测试平均值做为测试成绩,记录各组大鼠寻找平台所花费的时间即潜伏期(s)、总路程(cm)和第一次穿越目标区所用时间(s)。

**5.2 海马组织 NMDA 受体亚基 NR2A、NR2B 蛋白表达检测**

**5.2.1 海马组织提取** 各组仔鼠用药 2 个月、禁食 12 h 后称重,7% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.05 mL/100 g 体重),4% 多聚甲醛灌注,取海马组织,以 4% 多聚甲醛 4℃ 固定 4~6 h, PBS 洗 5 min × 3 次

置于 30% 蔗糖 4 ℃ 过夜, PBS 洗 5 min × 3 次、干燥、OCT 包埋, 冰冻切片切片, 室温静置 1 h 待测。

5.2.2 海马组织免疫组化检测 切片置入甲醇新鲜配置的 0.3% 双氧水室温封闭 20 min 消除内源性过氧化物酶, PBS 洗 5 min × 3 次, 置于 0.01 mol/L pH 6.0 枸橼酸缓冲液 95 ℃ 煮沸 15 min, 冷却后 PBS 洗 5 min × 3 次, 5% BSA 37 ℃ 封闭 20 min, 甩去多余液体; 滴加稀释后一抗 4 ℃ 过夜, 取出复温 PBS 洗 5 min × 3 次, 滴加二抗 37 ℃ 温浴 30 min, PBS 洗 5 min × 3 次, 滴加新鲜配置的 DAB 显色液避光显色, 镜下控制显色程度, 双蒸水冲洗终止显色, 苏木素复染, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 37 ℃ 干燥过夜。光镜下观察切片, 每组取 10 张, 每张镜下随机取 2 个视野进行结果记录。利用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行图像分析, 对阳性细胞进行平均吸光度值测定。

6 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-t 检验; 不符合正态分布采用非参数统计(秩和检验)。P < 0.05 为差异有统计学意义。

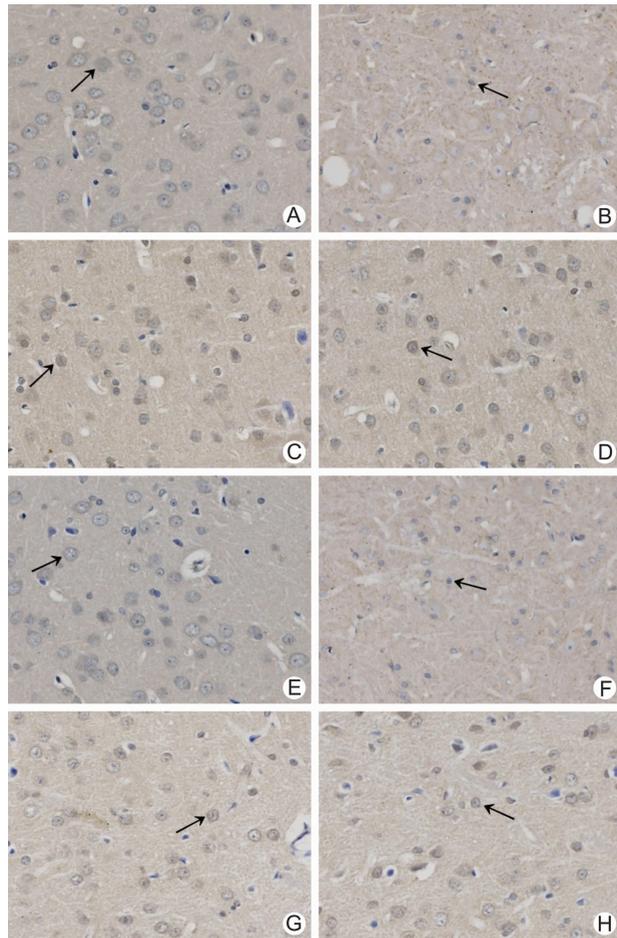
### 结 果

1 各组仔鼠一般情况 实验期间, 空白组仔鼠精力健旺, 饮食正常, 活动敏捷, 生长较快, 毛发密实。模型组、左归组和右归组在受惊吓初 3~4 天表现出活动增多, 反应机敏, 烦躁不安, 此后活动明显减少, 渐渐表现出对环境的耐受, 对外界刺激反应淡漠, 目光呆滞, 眼球突出, 毛发竖立, 瑟缩不动, 大、小便增多; 造模进行至后期, 模型组大鼠肾虚症状明显, 双眼无神, 精神不振, 四肢倦怠, 摄食量锐减, 体重明显下降, 皮毛脱落, 符合中医肾虚质的宏观征象。左归丸及右归丸组大鼠症状较模型组大鼠有所减轻。实验过程未出现仔鼠死亡情况。

2 各组 Morris 水迷宫实验潜伏期、总路程及第一次穿越目标区时间比较(表 1) 与空白组比较, 模型组 Morris 水迷宫实验潜伏期及总路程延长(P < 0.05); 与

模型组比较, 左归丸组及右归丸组潜伏期及总路程均缩短(P < 0.05), 右归丸组第一次穿越目标区时间缩短(P < 0.05); 左归丸及右归丸组上述指标比较, 差异均无统计学意义(P > 0.05)。

3 各组海马组织 NMDA 受体亚基 NR2A、NR2B 蛋白表达水平比较(图 1, 表 2) 免疫组化染色结果显示, 空白组神经细胞较多, 细胞结构致密且层次清楚; 模型组细胞结构松散, 神经细胞数目减少; 左归丸及右归丸组神经细胞较多, 染色较模型组深。对



注: A-D 为 NR2A 表达; A 为空白组; B 为模型组; C 为左归组; D 为右归组; E-H 为 NR2B 表达; E 为空白组, F 为模型组, G 为左归组, H 为右归组; 图中箭头所示为相应蛋白的阳性表达细胞

图 1 各组海马组织 NMDA 受体亚基 NR2A、NR2B 蛋白表达 (免疫组化, ×200)

表 1 各组仔鼠 Morris 水迷宫实验比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	潜伏期(s)	总路程(cm)	第一次穿越目标区时间(s)
空白	10	42.9 ± 3.1	71.9 ± 5.0	16.9 ± 0.9
模型	10	65.3 ± 10.7*	118.4 ± 11.6*	18.1 ± 1.8
左归丸	10	44.2 ± 8.6 <sup>△</sup>	91.7 ± 16.0 <sup>△</sup>	17.3 ± 2.5
右归丸	10	48.7 ± 9.1 <sup>△</sup>	81.3 ± 14.0 <sup>△</sup>	16.2 ± 2.1 <sup>△</sup>

注: 与空白组比较, \*P < 0.05; 与模型组比较, <sup>△</sup>P < 0.05

表 2 各组海马组织 NR2A、NR2B 吸光度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	NR2A	NR2B
空白	10	0.274 ± 0.022	0.817 ± 0.063
模型	10	0.067 ± 0.048*	0.513 ± 0.078*
左归丸	10	0.145 ± 0.021 <sup>△</sup>	0.744 ± 0.102 <sup>△</sup>
右归丸	10	0.139 ± 0.019 <sup>△</sup>	0.709 ± 0.083 <sup>△</sup>

注: 与空白组比较, \*P < 0.05; 与模型组比较, <sup>△</sup>P < 0.05

免疫阳性细胞进行平均吸光度值测定,与空白组比较,模型组 NR2A、NR2B 蛋白表达均明显减低( $P < 0.05$ );与模型组比较,左归丸组、右归丸组 NR2A 及 NR2B 蛋白表达升高( $P < 0.05$ ),左归丸组与右归丸组比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

## 讨 论

中医学认为“肾为先天之本”,“肾藏精,精生髓,髓通脑”,肾中精气是脑的形成、发育和功能发挥以及维持整个人体精神活动与行为活动的物质基础。中医情志学说有“肾藏志,在志为恐”之说,肾所藏之“志”的主要含义之一是指学习记忆。一方面,“脑为元神之府”,是“肾藏志”中医学理论中“志”产生活动的中枢部位;另一方面,“脑为髓之海”,而肾虚则髓不实,肾虚以“髓”为中介反作用于脑直接影响“肾藏志”中“志”的主要方面——学习记忆能力。临床研究已证实,肾虚质多包含脑学习记忆功能方面的障碍<sup>[7-10]</sup>。Morris 水迷宫实验是衡量啮齿类动物认知记忆能力的指标之一,通过检测评价可反映其学习记忆能力<sup>[11]</sup>,故本实验以 Morris 水迷宫检测实验大鼠的学习记忆能力。本实验中,与空白组比较,肾虚模型组大鼠 Morris 水迷宫潜伏期和总路程方面均延长,表现出反应迟钝和学习记忆能力的退化,补肾药物干预后状况得到改善,提示肾虚质对学习记忆的抑制性影响以及补肾药的对症疗效。

有研究表明,NMDA 受体与突触传递长时程增强、突触可塑性、学习记忆、神经系统生长发育的可塑性、缺血缺氧损伤、中枢神经系统内的疼痛传导、术后认知功能障碍及老年性痴呆等神经退行性疾病等密切相关<sup>[12]</sup>。NR2A 与 NR2B 是 NMDA 受体的两个重要亚基,在皮层特征性发育转变中具有重要作用,且主要与学习记忆的获得关系密切<sup>[13,14]</sup>。本研究选取 NR2A、NR2B 表达为切入点,从神经生物学角度揭示肾虚质对实验仔鼠脑学习记忆能力的抑制性影响。结果表明,肾虚质组大鼠 NR2A 与 NR2B 蛋白水平呈低表达,补肾药物干预后蛋白表达上调亦反映出与前期研究一致,即肾虚质抑制性影响学习记忆能力,从分子角度阐述了肾虚质对“志”的影响,为肾藏志理论的研究提供了新的思路与方法。

作为补肾中药的代表方,左归丸、右归丸已被证实可影响老年大鼠大脑边缘系统(海马、杏仁核)对下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴的调控作用,并可纠正老年大鼠神经内分泌功能的异常变化<sup>[15,16]</sup>,其通过提高脑源性神经营养因子及其受体 TrkB 基因表达改善老年大鼠的学习记忆能力<sup>[17]</sup>。本实验中,通过应用补肾

中药对肾虚质仔鼠进行干预,其学习记忆能力得到明显改善,NMDA 受体表达有显著升高,提示补肾中药可用于治疗肾虚质特征的学习记忆能力衰退,为衰老等老年性疾病的临床用药提供了实验依据,同时根据“病理药效推导生理”的研究思路,提示 NMDA 受体是“肾藏志”中医学理论中重要的物质基础,揭示了肾藏志理论的神经生物学机制。

## 参 考 文 献

- [1] 孙理军,李翠娟,王震,等.关于肾虚质实验动物模型相关问题的研究与思考[J].时珍国医国药,2012,23(12):3094-3095.
- [2] 薛昶,孙理军,郝蕊.肾虚体质大鼠生理指标变化的实验研究[J].陕西中医,2008,29(4):505-506.
- [3] 孙理军,李翠娟,王震,等.肾虚质实验动物模型的构建方法与评价[J].时珍国医国药,2013,24(1):247-249.
- [4] 何诚主编.实验动物学[M].北京:中国农业大学出版社,2006:283.
- [5] Zeng Q, Han J, Wang B, et al. Water maze spatial learning enhances social recognition ability in aged rats[J]. Behav Pharmacol, 2012, 23(7): 669-677.
- [6] Banik A, Anand A. Loss of learning in mice when exposed to rat odor: A water maze study[J]. Behav Brain Res, 2011, 216(1): 466-471.
- [7] MacDonald JF, Jackson MF, Beazely MA. Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors[J]. Crit Rev Neurobiol, 2006, 18(1-2): 71-84.
- [8] Yamin G. NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloidbeta-protein disruption of LTP in the hippocampus[J]. J Neurosci Res, 2009, 87(8): 1729-1736.
- [9] Kullmann DM, Lamsa K. Roles of distinct glutamate receptors in induction of anti-Hebbian long-term potentiation[J]. J Physiol, 2008, 586(6): 1481-1486.
- [10] Monfort P, Muñoz MD, Felipe V. Molecular mechanisms of the alterations in NMDA receptor-dependent long-term potentiation in hyperammonemia[J]. Metab Brain Dis, 2005, 20(4): 265-274.
- [11] Yamin G. NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloidbeta-protein disruption of LTP in the hippocampus[J]. J Neurosci Res, 2009, 87(8): 1729-1736.
- [12] Tang QS, Bao ZX, Qu M, et al. A discussion on

- the relationship between the kidney and mental emotion[J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2006, 25 (9): 538-540.
- [13] Mathur P, Graybeal C, Feyder M, et al. Fear memory impairing effects of system in treatment with the NMDA NR2B subunit antagonist RO25-6981 in mice attenuation with ageing[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2009, 91(3): 453-460.
- [14] White TL, Youngentob SL. The effect of NMDA-NR2B receptor subunit over-expression on olfactory memory task performance in the mouse[J]. Brain Res, 2004, 1021(1): 1-7.
- [15] 金国琴,戴薇薇,周国琪. 补肾方药延缓老年大鼠大脑边缘系统衰老的实验研究[J]. 中国老年学杂志, 2004, 24(7): 169-170.
- [16] 戴薇薇,金国琴,张学礼,等. 左归丸、右归丸对老年大鼠海马、杏仁核氨基酸类神经递质含量变化的影响[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(7): 397-400.
- [17] 戴薇薇,金国琴,张学礼,等. 左归丸、右归丸对衰老大鼠海马学习记忆相关基因 BDNF mRNA 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(4): 14-16.
- (收稿:2015-02-20 修回:2015-08-15)

## 欢迎订阅 2016 年《中国中西医结合杂志》

《中国中西医结合杂志》是由中国科学技术协会主管、中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的中西医结合综合性学术期刊。1981 年创刊,由中国科学院院士陈可冀担任总编辑。设有述评、专家论坛、专题笔谈、临床论著、基础研究、临床报道、综述、学术探讨、思路与方法学、临床试验方法学、病例报告、中医英译、会议纪要等栏目。本刊多次获国家科委、中宣部、新闻出版署及国家中医药管理局颁发的全国优秀期刊奖;2001 年被新闻出版署评为“双效期刊”,列入中国期刊方阵;2003—2014 年连续 12 年被评为“百种中国杰出学术期刊”;3 次获中国科协择优支持基础性和高科技学术期刊专项资助;4 次获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助;4 次获“中国科协精品科技期刊工程项目期刊”;2015 年 5 月荣获中国科协精品科技期刊 TOP 50 项目。并被多种国内外知名检索系统收录,如:中国科学引文数据库、中国生物医学文献数据库、美国医学索引(Medline)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、日本《科学技术文献速报》(JST)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich's PD)、波兰《哥白尼索引》(IC)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)等;为中国科技论文统计源期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,被编入《中文核心期刊要目总览》,每年影响因子及总被引频次在中医药类期刊中均名列前茅。

《中国中西医结合杂志》为大 16 开本,月刊,128 页;铜版纸印刷,彩色插图。国内定价:25.00 元/期。全年定价:300.00 元。国际标准刊号:ISSN 1003-5370,国内统一刊号:CN 11-2787/R,国内邮发代号:2-52,国外代号:M640。国内外公开发售,在各地邮局均可订阅,也可直接汇款至本社邮购。

地址:北京市海淀区西苑操场 1 号,中国中西医结合杂志社,邮政编码:100091;电话:010-62886827,62876547,62876548;传真:010-62874291;E-mail:cjim@cjim.cn;网址: <http://www.cjim.cn>。