

· 基础研究 ·

清宫寿桃丸对记忆障碍小鼠学习记忆的影响

袁 蓉^{1,2} 张业昊¹ 王 燕³ 丛伟红¹ 陈可冀¹

摘要 目的 观察清宫寿桃丸对利血平、亚硝酸钠、乙醇诱导的记忆障碍小鼠学习记忆的影响。**方法** ICR小鼠随机分为正常组、模型组、清宫寿桃丸(低、中、高剂量)组、金纳多组,每组 14 只。正常组和模型组给予等量的蒸馏水,清宫寿桃丸低、中、高剂量组分别按 0.9、1.8、3.6 g/kg 给药,金纳多组按 0.12 g/kg 给药,给药 15 天。干预 14 天后,获得性记忆障碍模型、巩固性记忆障碍模型、再现性记忆障碍模型分别使用利血平、亚硝酸钠及乙醇造模。干预 15 天后采用跳台实验及避暗实验评估学习记忆能力。**结果** 与正常组比较,三种模型小鼠错误次数均明显增多,潜伏期均明显缩短($P < 0.05$);与模型组比较,清宫寿桃丸不同剂量均可减少三种模型小鼠的错误次数($P < 0.05$),其中高剂量还可延长获得性记忆障碍小鼠的潜伏期($P < 0.05$);另外金纳多可减少巩固性记忆障碍小鼠的错误次数($P < 0.05$)。**结论** 清宫寿桃丸可改善获得性记忆障碍、巩固性记忆障碍和再现性记忆障碍,在改善记忆障碍方面的应用范围较广。

关键词 清宫寿桃丸;记忆障碍;学习记忆;老年性痴呆

Effect of Qinggong Shoutao Pill on Learning and Memory in Dismnesia Mice YUAN Rong^{1,2}, ZHANG Ye-hao¹, WANG Yan³, CONG Wei-hong¹, and CHEN Ke-ji¹ 1 Cardiovascular Laboratory, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091); 2 Graduate School, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029); 3 Integrated Traditional and Western Medicine Center for Cardiovascular Disease, China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Qinggong Shoutao Pill on the dysmnesia models induced by reserpine, sodium nitrite and ethyl alcohol. **Methods** ICR mice were randomly divided into normal group, model group, Qinggong Shoutao Pill group (low, medium and high dose), and ginaton group, with 14 mice in each group. The normal and model groups were given equal amounts of distilled water, the low, medium and high dose of Qinggong Shoutao Pill groups were respectively given at the dose of 0.9 g/kg, 1.8 g/kg and 3.6 g/kg, and ginaton group was given at the dose of 0.12 g/kg. After drug treatment for 14 days, the dysmnesia models of memory acquisition, consolidation and reappearance were established by reserpine, sodium nitrite and ethyl alcohol respectively. The memory results were estimated by using Step-down Test and Dark-avoiding Test after 15-days-intervention. **Results** Compared with the normal group, the number of errors in three dysmnesia models was significantly increased, and the latent time was significantly shortened ($P < 0.05$). Compared with the model groups, different dose of Qinggong Shoutao Pill could significantly reduce the number of errors ($P < 0.05$), and the high dose of Qinggong Shoutao Pill could prolong the latent time in mice with acquired dysmnesia ($P < 0.05$). In addition, ginaton could reduce the number of errors in mice with consolidated dysmnesia ($P < 0.05$). **Conclusion** Qinggong Shoutao Pill could improve the memory acquirement, consolidation and reappearance, and has a more widely application in the treatment of dysmnesia.

KEYWORDS Qinggong Shoutao Pill; amnesia; memory and learning; Alzheimer's disease

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81373821); 归国留学择优资助项目; 中国博士后科学基金项目(No. 2014M550134)

作者单位: 1. 中国中医科学院西苑医院心血管病实验室(北京 100091); 2. 北京中医药大学研究生院(北京 100029); 3. 中日友好医院中西医结合心血管病中心(北京 100029)

通讯作者: 丛伟红, Tel: 010-62835568, E-mail: congcao@188.com

DOI: 10.7661/j. cjm. 20180927. 204

学习记忆能力是思维活动的基本环节,伴随全球快速老龄化,受增龄性学习记忆能力减退、记忆障碍、痴呆影响的人群成倍增长,严重危害人类生活质量,成为公共健康的当务之急。WHO 于 2012 年紧急呼吁各国对此高度关注,学习记忆已是当今神经科学和老年医学的热点问题之一^[1,2]。老年性痴呆又称阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD),作为一种常见的神经退行性疾病,临床表现为记忆障碍、认知及语言功能障碍等,发病率高且呈逐年增长趋势,研究显示,AD 患者在发病前约 2~3 年,他们对自身记忆障碍的意识就开始下降^[3-5],因此,改善记忆障碍有助于及时预防和治疗 AD。

清宫寿桃丸源于清代宫廷御用秘方,20 世纪 80 年代由陈可冀院士主持整理清宫原始医药档案时将其公布于众,后被列为非物质文化遗产,该方由人参、生地、当归、枸杞子、益智仁、酸枣仁等中药组成,具有补肾生精、益元强壮等功效,中医学认为“肾主骨生髓”,“脑为髓海”,“肾气通于脑”,肾虚时,肾精不足,脑髓不足,则脑衰健忘,会出现记忆力减退、痴呆等记忆障碍。补肾可以补益脑髓,益智聪明,因此清宫寿桃丸可能有改善记忆的作用。为进一步确证清宫寿桃丸对学习记忆的三个重要过程即记忆获得、记忆巩固和记忆再现的影响^[6]。本研究分别以利血平、亚硝酸钠、乙醇干预记忆的三个不同阶段,建立了三种记忆障碍小鼠模型,从而观察清宫寿桃丸对学习记忆的影响。

材料与方法

1 实验动物 SPF 级 ICR 小鼠 252 只,雌雄各半,体重 18~22 g,1 月龄,北京维通利华技术有限公司提供,合格证号:SCXK(京)2006-0009,SPF 级动物房适应性饲养 3 天,动物饲养管理和动物实验操作符合《北京市实验动物管理条例》、《北京市实验动物福利伦理审查指南》的要求。

2 实验药物 清宫寿桃丸原料药粗粉,由人参、生地黄、当归、枸杞子、益智仁、酸枣仁等组成,7 g/丸,生药 4.24 g/丸,天津中新药业达仁堂制药厂,批号:P004;金纳多(银杏叶提取物片),40 mg/片,德国威玛舒培博士药厂,批号:4181212。

3 主要试剂及仪器 利血平,苏州亚科化学试剂股份有限公司,批号:YK2014051601,实验时用生理盐水配成浓度为 5 mg/100 mL 的水溶液;亚硝酸钠(化学纯),国药集团化学试剂有限公司,批号:20140428,实验时用生理盐水配成浓度为 6 mg/mL 的水溶液;无水乙醇(色谱纯),500 mL/瓶,Thermo

Fisher 公司,批号:140305,实验时用纯水配成浓度为 30 mL/100 mL(30%)的水溶液。TT-2 型小鼠跳台仪、BA-2 型小鼠避暗仪:中国医学科学院药物研究所。

4 分组及干预方法 将小鼠称重后随机分成 6 组,每组 14 只。即正常组,模型组,清宫寿桃丸低(0.9 g/kg)、中(1.8 g/kg)、高(3.6 g/kg)剂量组,金纳多(0.12 g/kg)组。清宫寿桃丸中剂量由临床等效用药剂量换算而来,低剂量减半,高剂量加倍。正常组、模型组给予等量的蒸馏水,清宫寿桃丸低、中、高剂量组及金纳多组分别给予相应药物,每日 1 次,连续给药 15 天后进行正式实验^[7]。

5 造模方法 利血平所致获得性记忆障碍模型^[8]:第 14 天给药后小鼠按 0.5 mg/kg 背颈部皮下注射利血平溶液,注射 60 min 后进行跳台训练,训练 5 min 使获得记忆,第 15 天进行正式跳台实验;亚硝酸钠所致巩固性记忆障碍模型^[8]:第 14 天给药后进行避暗训练,训练 5 min 使获得记忆,训练结束后立即按 120 mg/kg 背颈部皮下注射亚硝酸钠溶液,第 15 天进行正式避暗实验;乙醇所致再现性记忆障碍模型^[8]:第 14 天给药后进行跳台训练,训练 5 min 使获得记忆,第 15 天给药后 30 min,小鼠按 10 mL/kg 灌胃给予 30%乙醇溶液,灌胃 30 min 后进行正式跳台实验。

6 跳台实验 正式实验前一天训练一次使获得记忆。训练时将小鼠头向角落置于橡胶台上,使之适应 2 min,随后接通电源。开始时,小鼠一般会自跳台跳下,若不跳下,则使之跳下,从而受到电击数次,产生记忆,实验时间 300 s。正式实验时记录小鼠双足接触铜栅的次数(错误次数)及发生时间(潜伏期)。300 s 内未跳下者,潜伏期按 300 s 计算。

7 避暗实验 正式实验前一天训练使获得记忆。训练时将小鼠头向外放入避暗箱明室中,使之适应 2 min,随后接通电源。小鼠一般会进入暗室,若不进入,则使之进入,从而受到电击数次,产生记忆,实验时间 300 s。正式实验时记录小鼠四肢全部进入暗室的次数(错误次数)及发生时间(潜伏期)。300 s 内未进入者,潜伏期按 300 s 计算。

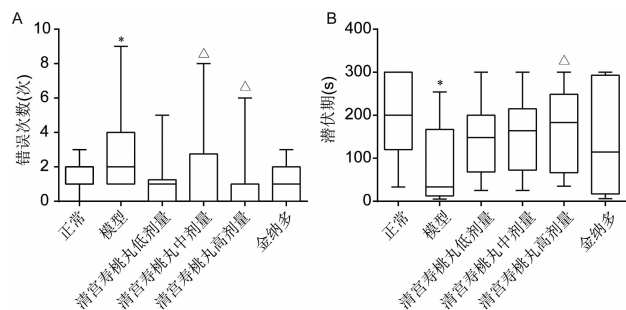
8 统计学方法 以 SPSS 10.0 软件进行分析,对计量资料首先进行正态性分析,非正态分布资料用 M(IQR)表示,非正态分布采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 小鼠一般状态比较 各组小鼠毛色光泽,饮食

正常,活动自如,均无死亡。

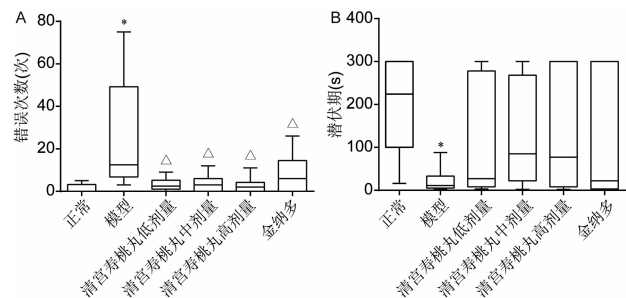
2 清宫寿桃丸对利血平致获得性记忆障碍的影响(图1) 与正常组比较,模型组小鼠 5 min 内错误次数明显增多,潜伏期明显缩短($P < 0.05$)。给药 15 天后,与模型组比较,清宫寿桃丸中、高剂量组小鼠的错误次数明显减少,高剂量组小鼠的潜伏期明显延长($P < 0.05$),而其他剂量组潜伏期虽有延长的趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A 为错误次数;B 为潜伏期;与正常组比较, * $P < 0.05$;
与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; $n = 14$

图1 清宫寿桃丸对利血平致获得性记忆障碍小鼠
错误次数及潜伏期的影响 [M (IQR)]

3 清宫寿桃丸对亚硝酸钠致巩固性记忆障碍的影响(图2) 与正常组比较,模型组小鼠 5 min 内错误次数明显增多,潜伏期明显缩短($P < 0.05$)。给药 15 天后,与模型组比较,清宫寿桃丸低、中、高剂量组及金纳多组小鼠的错误次数均明显减少($P < 0.05$),各给药组潜伏期均有延长的趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

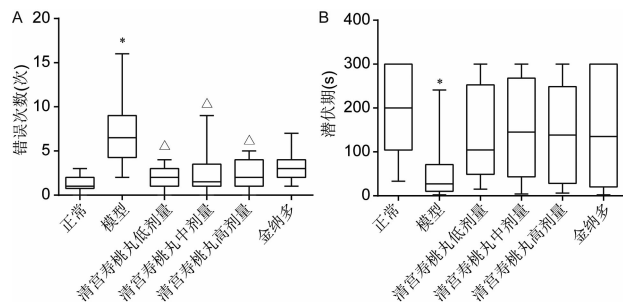


注:A 为错误次数;B 为潜伏期;与正常组比较, * $P < 0.05$;
与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; $n = 14$

图2 清宫寿桃丸对亚硝酸钠致巩固性记忆障碍小鼠
错误次数及潜伏期的影响 [M (IQR)]

4 清宫寿桃丸对乙醇致再现性记忆障碍的影响(图3) 与正常组比较,模型组小鼠 5 min 内错误次数明显增多,潜伏期明显缩短($P < 0.05$)。给药 15 天后,与模型组比较,清宫寿桃丸低、中、高剂量组小鼠的

错误次数均明显减少($P < 0.05$),各给药组潜伏期均有延长的趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:A 为错误次数;B 为潜伏期;与正常组比较, * $P < 0.05$;
与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; $n = 14$

图3 清宫寿桃丸对乙醇致再现性记忆障碍小鼠
错误次数及潜伏期的影响 [M (IQR)]

讨 论

早在 20 世纪 80 年代,课题组已证实清宫寿桃丸可提高老年患者瞬时记忆力、记忆广度以及扭转近事遗忘、对复杂指令动作的反应时间等,与维生素 E 比较,其提高记忆广度的效果更优^[9,10],提示清宫寿桃丸有预防记忆减退的作用。药理学研究也表明,清宫寿桃丸中多味药物及其活性成分对学习记忆和认知障碍均有改善作用:当归可改善东莨菪碱所致小鼠学习记忆障碍,提高中枢神经递质活性,保护神经细胞,其有效成分还可预防 β -淀粉样蛋白诱导的小鼠学习记忆障碍^[11,12];益智仁水提物可改善东莨菪碱所致的大鼠记忆障碍,降低海马乙酰胆碱脂酶活性,改善 D-半乳糖所致的小鼠学习与记忆能力^[13];酸枣仁可改善氯苯丙氨酸失眠模型大鼠的学习和记忆能力^[14]。以往研究提示清宫寿桃丸有良好的改善记忆的作用,本实验通过观察清宫寿桃丸对学习记忆的三个重要过程即记忆获得、记忆巩固和记忆再现的影响,进一步证明其改善记忆的作用和途径。

学习和记忆是一个极其复杂的生理过程,不同的影响因素由于作用途径和靶点不同,所产生的记忆障碍类型也不同。利血平可通过耗竭神经末梢的单胺类递质,破坏记忆的保持,造成获得性记忆障碍;亚硝酸钠可使血红蛋白变性,使脑组织缺血缺氧,损害学习和记忆过程,造成巩固性记忆障碍;乙醇可分层次抑制中枢,可能通过改变脑内胆碱能神经递质、肾上腺素能神经递质和 5-羟色胺的水平,造成再现性记忆障碍^[7]。本研究发现,三种模型小鼠的错误次数明显增多,潜伏期明显缩短,因而三种模型均有助于较好的评价药物的疗效。

在三种记忆障碍实验中,清宫寿桃丸均可明显减少小鼠 5 min 内错误次数,中剂量和高剂量效果更佳,在获得性记忆障碍实验中,清宫寿桃丸高剂量还能明显延长潜伏期。研究提示,清宫寿桃丸对化学损伤造成的小鼠获得性、巩固性及再现性记忆障碍均有改善作用,对获得性记忆障碍的改善更佳,且高剂量效果更好,从而证实清宫寿桃丸改善记忆障碍的作用。另外,金纳多可改善巩固性记忆障碍,有改善获得性和再现性记忆障碍的趋势,未来还需要进一步的研究证实。

学习记忆极为复杂,虽然本实验仅证实了古方清宫寿桃丸对获得性、巩固性和再现性记忆障碍有明显的改善作用,但为其临床治疗学习记忆障碍提供了一定的数据支持。同时,已有研究通过数据挖掘发现熟地黄、山茱萸、山药、菟丝子等补肾中药可改善记忆^[15],本研究证实清宫寿桃丸有改善记忆障碍的作用,在改善记忆障碍方面的应用范围较广,从而进一步为补肾中药治疗记忆障碍提供了更有力的证据。另外,就发病机制复杂的 AD 而言,其引起的学习记忆能力下降会因顺行性和逆行性记忆障碍而加重^[16]。因此,未来课题组将从认知行为的其他角度,进一步探讨清宫寿桃丸改善记忆障碍及 AD 的作用和深层次机制,同时采用临床评价的方法进行验证,使疗效确切的古方成为 AD 等记忆障碍相关疾病防治的新选择。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization and Alzheimer's Disease International. Dementia: a public health priority [R]. United Kingdom: Geneva, 2012: 7-10.
- [2] 武力勇,唐毅,魏翠柏,等.防老年痴呆从中青年开始[N].健康报,2017-9-2(4).
- [3] 侯雪芹,张磊,林雅萍,等.4种阿尔茨海默病动物模型行为学改变及凋亡机制的比较[J].中国老年学杂志,2015,35(12):3185-3187.
- [4] 韩玉梁,贾建军,吴卫平.阿尔茨海默病的情景记忆障碍研究进展[J].中华老年心脑血管病杂志,2017,19(5):555-558.
- [5] Wilson RS, Boyle PA, Yu L, et al. Temporal course and pathologic basis of unawareness of memory loss in dementia[J]. Neurology, 2015, 85(11): 984-991.
- [6] 罗燕,陈真.学习记忆障碍动物模型及行为学检测指标的评析[J].安徽医药,2018,22(2):204-206.
- [7] 徐立,丛伟红,魏翠娥,等.维脑康对小鼠记忆障碍的影响[J].中药药理与临床,2007,23(6):60-62.
- [8] 李仪奎主编.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,1991:171-172.
- [9] 陈可冀,周文泉,李春生,等.清宫寿桃丸延缓衰老的临床及实验研究[J].中医杂志,1985,26(7):25-28.
- [10] 李春生.清宫寿桃丸和御制平安丹的研究[N].中国中医药报,2013-5-24(4).
- [11] 吴红彦,李海龙,王虎平,等.大剂量当归对东莨菪碱致痴呆小鼠模型学习记忆及 AchE、ChAT 活性的影响[J].时珍国医国药,2013,24(3):552-554.
- [12] 李曦,张丽宏,王晓晓,等.当归化学成分及药理作用研究进展[J].中药材,2013,36(6):1023-1028.
- [13] 陈萍,王培培,焦泽沼,等.益智仁的化学成分及药理活性研究进展[J].现代药物与临床,2013,28(4):617-623.
- [14] 吴巧敏,赵艺初,韩艺凡,等.生酸枣仁、炒酸枣仁、酸枣果肉对 PCPA 失眠模型大鼠学习记忆能力影响的对比研究[J].中医药导报,2016,22(5):72-75.
- [15] 沈怡婷,周颖,陈霞,等.基于数据挖掘的中药改善学习记忆能力组方规律[J].中国老年学,2017,37(18):4616-4619.
- [16] El Haj M, Antoine P, Nandrino JL, et al. Autobiographical memory decline in Alzheimer's disease, a theoretical and clinical overview [J]. Ageing Res Rev, 2015, 23(Pt B): 183-192.

(收稿:2018-05-21 在线:2018-11-04)

责任编辑:赵芳芳