

• 药理与临床 •

茯苓及其化学拆分组分学习记忆及镇静催眠的性味药理学研究

徐煜彬, 徐志立, 李明玉, 窦德强*

辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

摘要: **目的** 评价茯苓及其拆分组分的活性, 并结合中医传统理论对其进行性味归属。 **方法** 采用东莨菪碱造成小鼠记忆障碍并应用 Morris 水迷宫实验, 观察茯苓及其组分对学习记忆的影响, 同时应用抖笼法及戊巴比妥钠协同催眠实验来观察茯苓及其组分的镇静催眠作用。 **结果** 茯苓水煎液 (生药 8.56 g/kg)、醋酸乙酯组分、石油醚组分、粗多糖组分及精制多糖组分均能明显缩短小鼠到达平台的潜伏期, 并且降低东莨菪碱所致记忆障碍小鼠大脑乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性, 醇洗物与水洗物对潜伏期的影响不明显, 各个组分对于小鼠的脑指数均有不同程度的增加; 生药 42.8 g/kg 茯苓水煎液可显著延长阈上剂量戊巴比妥钠引起小鼠睡眠时间, 而对小鼠睡眠潜伏期没有影响; 茯苓粗多糖能显著缩短小鼠的睡眠潜伏期, 并且与精制多糖组分均能显著延长小鼠睡眠时间, 醋酸乙酯组分作用次之。 **结论** 茯苓改善学习记忆和镇静催眠作用都与其味甘入脾能健脾宁心相关, 其醋酸乙酯、石油醚及多糖拆分组分可能为其甘味的物质基础。

关键词: 茯苓; 拆分组分; 学习记忆; 镇静催眠作用; 物质基础; 性味归经

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)11-1577-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.11.015

Nature and flavor pharmacology of Fuling and its components for learning and memory improvement as well as sedative and hypnotic effects

XU Yu-bin, XU Zhi-li, LI Ming-yu, DOU De-qiang

College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To evaluate the activities of Fuling (the dried sclerotium of *Poria cocos*) and its components, then its nature and flavor were attributed by traditional Chinese medicine (TCM) theory. **Methods** Scopolamine was used to cause learning and memory impairment in mice, and Morris water maze test was used to observe the effects of Fuling and its components on learning and memory of mice, and shaking cage method and pentobarbital sodium were used to evaluate the sedative and hypnotic effects of Fuling and its components. **Results** Water decoction of Fuling (crude drug 8.56 g/kg), ethyl acetate, petroleum ether, crude polysaccharides, and refined polysaccharides components could significantly shorten the latency of scopolamine-induced memory impairment in mice to reach the platform; Acetylcholinesterase activity in mice brain was decreased, the effects of the components washed with alcohol and water on latency were less obvious and the individual components of the cerebral index showed an increase in different proportions; Crude drug (42.8 g/kg) water decoction of Fuling could significantly prolong the sleeping time, but had no effect on sleep latency; Crude polysaccharides could significantly shorten the sleep latency while the refined polysaccharides could significantly increase sleeping time; Followed by ethyl acetate components, the petroleum ether components showed a weak antagonistic effect. **Conclusion** The learning and memory improvement as well as the sedative and hypnotic effects are associated with Fuling's sweet taste which can tonify spleen to calm nerves; The ethyl acetate, petroleum ether, and polysaccharides components are the basic materials of sweet taste. **Key words:** Fuling [dried sclerotium of *Poria cocos* (Schw.) Wolf]; components; learning and memory; sedative and hypnotic effect; basic materials; nature and flavor tropism

茯苓(*Poria*, Fuling)为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核, 具有利水渗湿、

健脾宁心等作用^[1]。《日华子本草》记载“补五劳七伤, 走胎, 暖腰膝, 开心益智, 止健忘, 忌醋及酸

收稿日期: 2013-09-12

基金项目: 国家重点基础研究计划(“973”计划)项目(2013CB531803); 辽宁省高等学校创新团队课题(LT2013020)

作者简介: 徐煜彬(1988—), 男, 博士, 研究方向为中药药效物质研究。E-mail: Xuyubin1988@126.com

*通信作者 窦德强, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质研究。E-mail: deqiangdou@126.com

物”。《神农本草经》记载“味甘，平。主胸胁逆气。忧患，惊邪恐悸，……久服安魂魄养神”。说明茯苓具有益智、改善记忆、宁心安神的作用。目前关于含有茯苓的组方对改善记忆的研究已有报道，Zhang等^[2]发现远志和茯苓水提液能明显缩短化学药所致记忆障碍小鼠 Morris 水迷宫的逃避潜伏期，并能降低乙酰胆碱酯酶（AchE）的活力；吴红彦等^[3]和 Shi 等^[4]发现含有茯苓的黑逍遥散能显著降低小鼠脑内 AchE 活性，并增强胆碱乙酰转移酶（ChAT）活性，张敏等^[5]和卢建中等^[6]分别通过跳台法和 Morris 水迷宫法发现茯苓水提液能改善学习记忆，但对单味茯苓及其组分改善记忆的作用机制研究较少。中枢胆碱能系统功能正常是正常学习记忆功能的生理基础，抗胆碱药或拟胆碱药可分别加重或改善学习记忆障碍^[7]。研究表明，抗胆碱药物东莨菪碱能使小鼠的记忆发生障碍，因此其是公认的制备学习记忆障碍模型的药物^[8-10]。

中药发挥药效可能是多个不同的组分，也可能是单个组分，基于其复杂，不可控等特点^[11-12]，本实验对茯苓进行了组分拆分，采用 Morris 水迷宫模型，东莨菪碱造成小鼠学习记忆障碍模型^[13]和抖笼法^[14-15]及戊巴比妥钠协同催眠实验^[16-17]，并首次采用脑指数和 AchE 活性对茯苓及其拆分组分的活性进行综合评价，期望能结合中药的组分结构特点及茯苓性味特点对组分改善记忆进行深入的讨论，以发现茯苓改善学习记忆障碍的有效组分，阐述茯苓的“质-性-效”关联，从而揭示茯苓的物质基础与性效关系，为茯苓各拆分组分对记忆的影响建立一个初步的评价体系。

1 材料

1.1 实验动物

昆明种小鼠，雌雄各半，体质量 18~22 g，由大连医科大学动物实验中心提供，合格证号 SCXX（辽）2008-0002。

1.2 仪器

FD—EA—50 冷冻干燥机（北京博医康实验仪器有限公司）；M1 型 Morris 水迷宫（成都泰盟科技有限公司）；UV2100 紫外可见分光光度（上海尤尼柯仪器有限公司）；RM6240 BD 型抖笼换能器（成都仪器厂）。

1.3 药品及试剂

茯苓，2012 年 11 月收集于云南省腾冲县，经辽宁中医药大学药用植物教研室王冰教授鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥

菌核；吡拉西坦片（批号 20120532，华中药业股份有限公司）；东莨菪碱（批号 120802，上海禾丰制药有限公司）；D-101 型大孔吸附树脂（沧州宝恩吸附材料科技有限公司）；AchE 试剂盒（南京建成生物工程研究所）；戊巴比妥钠（批号 556178-100，上海试剂二厂）。

2 方法

2.1 茯苓组分的拆分^[18-20]

采用水蒸气蒸馏法，获得茯苓挥发油组分。茯苓水煎液减压浓缩至 100 mL，加 95%乙醇使醇沉体积分数为 80%，0~5℃放置过夜；离心（8 000 r/min，10 min），收集上清液和沉淀，沉淀加少量水溶解，水浴挥至无醇味，再加水至 100 mL，加 95%乙醇调乙醇体积分数至 80%，0~5℃放置过夜；离心（8 000 r/min，10 min），收集沉淀，依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤直至无颜色，沉淀冷冻干燥，即得茯苓粗多糖组分（得率 0.66%）。将上清液减压浓缩，水浴挥至无醇味，加水至 100 mL，依次用石油醚、醋酸乙酯萃取直至颜色明显变浅或无色得石油醚萃取物 I 和醋酸乙酯萃取物 I。余下水层挥至无醋酸乙酯味，加水至 100 mL，通过 D-101 大孔吸附树脂柱色谱（上样量为生药材-湿树脂 1 g：3 mL），洗脱溶剂依次为水、95%乙醇，分别洗脱至无色，收集相应的洗脱液，树脂水洗物冻干，即得树脂水洗组分。95%醇洗物浓缩至 25 mL，依次用石油醚、醋酸乙酯萃取直至无色，得到石油醚萃取物 II、醋酸乙酯萃取物 II 和树脂醇洗物，冷冻干燥，得到树脂醇洗组分。由于挥发油的量极少，并且用 HPLC-ELSD 检测得到的图谱中挥发油与石油醚萃取物有重叠的部分，因此，将茯苓中挥发油与石油醚萃取物 I 和 II 合为一个组分，即为石油醚萃取组分；醋酸乙酯萃取物 II 与醋酸乙酯萃取物 I 合并为醋酸乙酯萃取组分。精制多糖的拆分：称取适量粗多糖，进行常规 Sevag 法除蛋白，即得精制多糖组分（得率 0.18%）。

对各组分代表性成分的分析结果表明石油醚组分（得率 0.02%）主要含有芳香酯类化合物，醋酸乙酯组分（得率 0.09%）主要为三萜类成分，树脂水洗组分（得率 1.69%）含有无机盐、小分子糖等，而树脂醇洗组分（得率 0.28%）含有氨基酸、聚炔类成分。

2.2 茯苓及拆分组分改善学习记忆作用的研究

2.2.1 不同剂量茯苓对东莨菪碱所致记忆障碍小鼠的影响^[2,13,21] 根据 Morris 水迷宫前期预试验结果确定茯苓低、中、高剂量，取 65 只小鼠，每天

Morris 水迷宫训练 1 次, 训练 3 d, 排除差异性特别大的小鼠。取 60 只小鼠进行随机分组, 分为对照组, 模型组, 吡拉西坦阳性组 (0.686 g/kg), 茯苓水煎液低、中、高剂量 (生药 2.14、4.28、8.56 g/kg, 《中国药典》2010 年版中规定茯苓给药量为 15 g, 折算小鼠的给药量为 2.14 g/kg) 组, 各组均 ig 给药, 给药体积为 0.1 mL/10 g。实验第 1~3 天, 除对照组和模型组 ig 给予等量生理盐水外, 其他各组小鼠固定时段 ig 给药 1 次, 随后 4 d 在 Morris 水迷宫测试前 1 h ig 给药, 0.5 h 前除对照组 ip 生理盐水外, 其余各组均 ip 东莨菪碱 2 mg/kg。在第 7 天, Morris 水迷宫测试结束后, 立即将小鼠处死, 取大脑制成脑匀浆, 离心, 取上清液进行 AchE 活性测定。

2.2.2 茯苓拆分组分对东莨菪碱所致记忆障碍小鼠的影响^[2,13,21] 取 105 只小鼠, 每天 Morris 水迷宫训练 1 次, 训练 3 d, 排除差异性特别大的小鼠, 根据“2.2.1”项实验结果, 茯苓水煎液生药 8.56 g/kg 为改善记忆障碍的有效剂量 (相当于临床用量的 4 倍), 故各化学拆分组分按其在生药中的量的 4 倍量给予实验动物, 给药体积为 0.1 mL/10 g, 模型组和对照组给予等体积的生理盐水。取 100 只小鼠随机分组, 分为对照组、模型组、吡拉西坦阳性组 (0.686 g/kg)、石油醚组、醋酸乙酯组、树脂醇洗组、树脂水洗组、粗多糖组、精制多糖组、茯苓水煎液 (生药 8.56 g/kg) 组。实验方法及检测指标同“2.2.1”项。

2.3 茯苓及拆分组分对镇静催眠作用的研究

2.3.1 不同剂量茯苓对小鼠镇静催眠作用 采用抖笼法观察镇静作用。根据前期预试验结果确定茯苓低、中、高剂量 (生药 10.7、21.4、42.8 g/kg), 取 40 只小鼠随机分组, 分别为对照组, 茯苓低、中、高剂量组, 每只小鼠开始实验时, 先进笼适应 2 min, 随后记录 20 s 曲线, 对每个实验记录段求振幅的平均值, 对照组 ig 给予生理盐水 0.25 mL/10 g, 茯苓低、中、高剂量组小鼠分别 ig 茯苓水煎液, 描记给药后 1 h 小鼠活动波形, 并求算振幅平均值^[14-15]。

戊巴比妥钠协同催眠实验: 取 40 只小鼠随机分组, 分为对照组, 茯苓低、中、高剂量 (生药 10.7、21.4、42.8 g/kg) 组, 对照组 ig 给予生理盐水 0.25 mL/10 g, 茯苓低、中、高剂量组小鼠分别 ig 茯苓水煎液, 连续给药 7 d, 于末次给药前 8 h 禁食, 前 1 h 禁水, 给药 0.5 h 后 ip 戊巴比妥钠溶液 80 mg/kg (阈上剂量), 记录各组小鼠睡眠潜伏期和持续时间。另取 40 只小鼠随机分组, 分组及给药方法同

上, 给药 0.5 h 后 ip 戊巴比妥钠溶液 50 mg/kg (阈下剂量), 记录各组发生睡眠的小鼠数量^[16-17]。

2.3.2 茯苓拆分组分对小鼠镇静催眠作用^[16-17] 根据“2.3.1”项实验结果, 茯苓水煎液生药 42.8 g/kg 为镇静催眠的有效剂量, 各化学拆分组分按其在生药中量的 20 倍量给予实验动物, 给药体积为 0.2 mL/10 g, 对照组给予等体积的生理盐水。戊巴比妥钠协同催眠实验: 取 80 只小鼠随机分组, 分为对照组、石油醚组、醋酸乙酯组、粗多糖组、精制多糖组、水洗物组、醇洗物组、茯苓水煎液 (42.8 g/kg) 组, 连续给药 7 d, 按“2.3.1”项方法进行戊巴比妥钠阈上剂量和阈下剂量协同实验。

2.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。计数资料采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 茯苓及拆分组分对东莨菪碱所致记忆障碍小鼠的影响

3.1.1 茯苓对东莨菪碱所致记忆障碍小鼠的影响 给予东莨菪碱后, 模型组小鼠逃避潜伏期明显延长, 模型组与对照组比较差异非常显著 ($P < 0.01$), 说明造模成功, 东莨菪碱所致小鼠记忆障碍模型稳定可靠。高剂量茯苓水煎液能明显缩短模型小鼠 2 min 内达到终点平台的潜伏期, 而且随着时间的延长, 趋势也越来越明显, 从低、中、高 3 个剂量来看, 随着药物浓度的提高, 潜伏期也越来越短, 见表 1。高剂量茯苓水煎液能显著增加模型小鼠在平台所在象限的时间和行程 (图 1)。高剂量茯苓水煎液能明显降低模型小鼠大脑内 AchE 的活性 ($P < 0.01$), 并且脑指数显著增加 ($P < 0.01$), 见表 2。

3.1.2 茯苓拆分组分对东莨菪碱所致记忆障碍小鼠的影响

从表 3 可以看出醋酸乙酯组分和石油醚组分能明显缩短模型小鼠 2 min 内达到终点平台的潜伏期 ($P < 0.01$), 粗多糖及精制多糖也能明显缩短模型小鼠逃避潜伏期 ($P < 0.01$), 但作用较醋酸乙酯和石油醚组分弱, 醇洗物与水洗物对潜伏期的影响较不明显。而且随着天数的加长, 趋势也越来越明显。从表 4 可知, 醋酸乙酯、石油醚、粗多糖及精制多糖组分能明显降低模型小鼠大脑内的 AchE 活性 ($P < 0.01$)。而各个组分对于小鼠的脑指数均有不同比例的增加。

3.2 茯苓及拆分组分对小鼠的镇静催眠作用

3.2.1 茯苓对小鼠的镇静催眠作用 从表 5 可以看

表1 茯苓对记忆障碍小鼠 Morris 水迷宫测试结果的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 1 Effect of Fuling on results of Morris water maze test for memory impairment mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	逃避潜伏期 / s			
		第1天	第2天	第3天	第4天
对照	—	57.17±40.89	34.55±38.44	35.89±38.34	23.92±20.45
模型	—	119.41± 1.33 ^{##}	118.17± 3.85 ^{##}	120.00± 0.00 ^{##}	117.76± 4.04 ^{##}
吡拉西坦	0.686	93.11±45.68	94.00±41.46	82.86±52.38	65.60±57.99*
茯苓水煎液	2.14	109.59±22.73	109.94±31.81	78.64±53.64	75.79±46.11*
	4.28	99.01±41.08	77.30±55.38	73.26±51.77*	66.21±49.80*
	8.56	115.38± 7.59	69.54±47.18*	66.22±50.67*	52.47±53.54*
组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	平台象限停留时间比例 / %			
		第1天	第2天	第3天	第4天
对照	—	55.32±20.89	57.88±21.98	57.43±18.31	68.89±15.12
模型	—	24.22± 7.49 ^{##}	25.32± 7.49 ^{##}	25.93± 2.01 ^{##}	28.35± 4.89 ^{##}
吡拉西坦	0.686	35.11± 6.68*	40.10± 1.38**	45.21±16.24*	52.57±27.12*
茯苓水煎液	2.14	28.59± 4.73	30.22± 3.58	37.96±13.53	42.83±21.03
	4.28	32.01± 3.08*	38.25± 4.01**	47.67±17.78**	49.56±25.17*
	8.56	35.38± 7.59*	45.57± 9.01**	49.06±21.28**	58.67±23.69**
组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	平台象限停留行程比例 / %			
		第1天	第2天	第3天	第4天
对照	—	27.17± 6.58	30.68± 4.34	32.78±9.07	41.27±13.05
模型	—	21.62± 3.99 [#]	21.62± 3.99 [#]	23.89±3.37 ^{##}	26.84± 3.67 ^{##}
吡拉西坦	0.686	25.31±15.68*	34.37±16.52**	35.66±8.38**	40.11± 4.23**
茯苓水煎液	2.14	22.54± 8.71	25.18± 4.45	25.99±5.58	30.14± 3.55
	4.28	24.01±11.08*	30.68±10.41*	31.48±3.57*	34.87± 4.49**
	8.56	25.18± 7.59*	33.14± 6.89**	33.81±5.88**	39.85± 3.01**

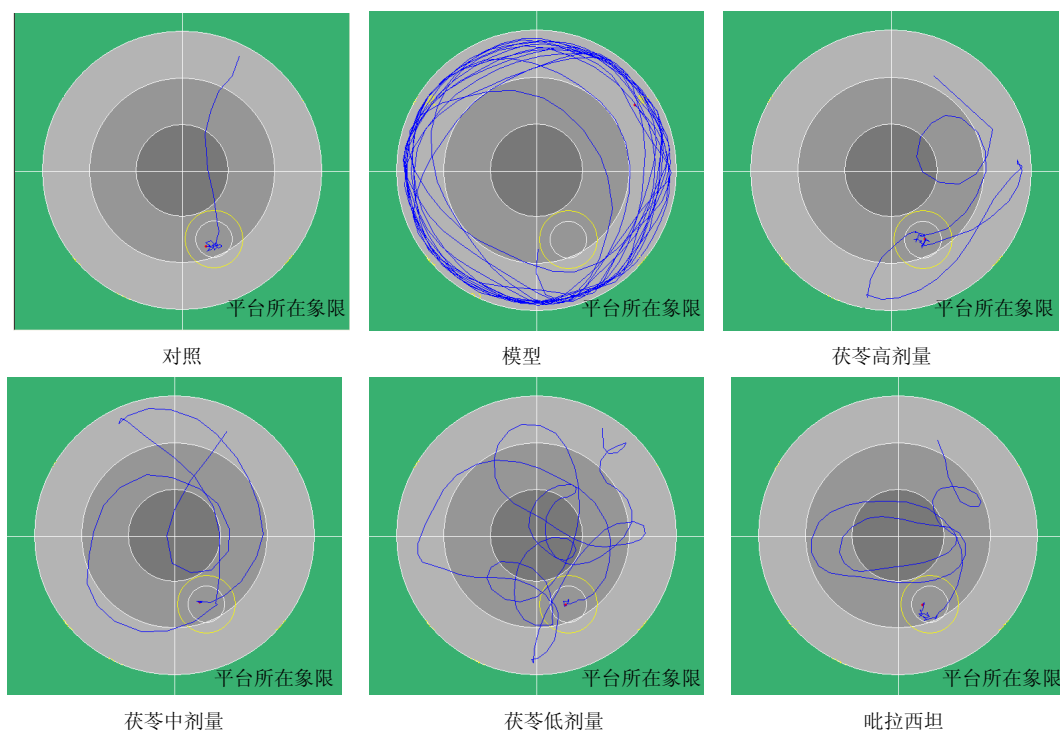
与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

图1 Morris 水迷宫测试小鼠 2 min 运动轨迹图

Fig. 1 Trajectory chart of mice in 2 min in Morris water maze test

表2 茯苓对记忆障碍小鼠脑组织 AchE 活性和脑指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effect of Fuling on AchE activity and cerebral index of memory impairment mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	AchE / (U·mg ⁻¹)	脑指数 / %
对照	—	1.89 ± 0.13	1.49 ± 0.18
模型	—	2.69 ± 0.14 ^{##}	1.20 ± 0.15 ^{##}
吡拉西坦	0.686	2.03 ± 0.12 ^{**}	1.52 ± 0.23 ^{**}
茯苓水煎液	2.14	2.92 ± 0.83	1.24 ± 0.16
	4.28	2.49 ± 0.09 [*]	1.35 ± 0.05 [*]
	8.56	2.14 ± 0.08 ^{**}	1.48 ± 0.08 ^{**}

出茯苓水煎液单次给药对小鼠的镇静作用极弱。茯苓高剂量组协同阈上剂量戊巴比妥钠明显增加小鼠睡眠时间 ($P < 0.01$), 同时茯苓高剂量组能显著增加给予阈下剂量戊巴比妥钠小鼠的入睡动物数量, 提高入睡率 ($P < 0.05$)。见表 6。

3.2.2 茯苓拆分组分对小鼠的催眠作用 粗多糖组分可显著延长小鼠睡眠潜伏期 ($P < 0.01$), 而石油醚组分表现出一定的兴奋作用, 醋酸乙酯组分稍微延长小鼠睡眠时间 ($P < 0.05$), 粗多糖及精制多糖组分显著延长小鼠睡眠时间 ($P < 0.01$)。粗多糖和精制多糖组分能显著增加给予阈下剂量戊巴比妥钠小鼠的入睡动物数量, 提高入睡率 ($P < 0.01, 0.05$)。见表 7。

表3 茯苓各拆分组分对记忆障碍小鼠逃避潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 3 Effect of Fuling's components on escape latency of memory impairment mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	逃避潜伏期 / s			
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
对照	—	21.41 ± 34.96	22.75 ± 34.84	15.59 ± 4.03	9.12 ± 2.02
模型	—	81.32 ± 42.16 ^{##}	78.41 ± 40.00 ^{##}	74.23 ± 31.98 ^{##}	72.66 ± 28.83 ^{##}
吡拉西坦	0.686	51.22 ± 46.65	33.90 ± 9.96 ^{**}	21.56 ± 25.18 ^{**}	18.81 ± 3.29 ^{**}
石油醚	0.002	57.28 ± 34.89	32.74 ± 31.48 [*]	31.64 ± 32.50 [*]	28.79 ± 24.57 ^{**}
醋酸乙酯	0.008	56.25 ± 44.65	27.93 ± 16.17 [*]	25.76 ± 33.97 ^{**}	24.10 ± 14.22 ^{**}
树脂醇洗物	0.024	71.50 ± 37.07	59.54 ± 26.08	49.92 ± 31.06	49.47 ± 17.22 [*]
树脂水洗物	0.144	70.53 ± 42.36	62.43 ± 51.15	57.30 ± 29.10	52.12 ± 12.09 [*]
粗多糖	0.056	56.44 ± 33.96	42.31 ± 33.63 [*]	32.31 ± 44.72 [*]	29.10 ± 11.16 ^{**}
精制多糖	0.016	55.73 ± 45.38	42.61 ± 25.68	32.95 ± 19.11 [*]	31.52 ± 13.01 ^{**}
茯苓水煎液	0.856	59.64 ± 31.48	39.90 ± 13.19 [*]	32.20 ± 14.40 [*]	31.60 ± 8.10 ^{**}

表4 茯苓各组分对记忆障碍小鼠脑组织 AchE 活性和脑指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Fig. 4 Effect of Fuling's components on AchE activity and cerebral indexes of memory impairment mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	AchE / (U·mg ⁻¹)	脑指数 / %	组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	AchE / (U·mg ⁻¹)	脑指数 / %
对照	—	1.709 0 ± 0.311 1	1.387 ± 0.066	树脂醇洗物	0.024	3.323 5 ± 0.477 4	1.322 ± 0.102 [*]
模型	—	3.548 5 ± 0.623 9 ^{##}	1.212 ± 0.046 ^{##}	树脂水洗物	0.144	3.569 1 ± 0.518 9	1.354 ± 0.084 ^{**}
吡拉西坦	0.686	1.813 1 ± 0.333 0 ^{**}	1.390 ± 0.084 ^{**}	粗多糖	0.056	2.182 8 ± 0.353 6 ^{**}	1.328 ± 0.035 [*]
石油醚	0.002	1.990 8 ± 0.474 2 ^{**}	1.321 ± 0.055 [*]	精制多糖	0.016	2.123 2 ± 0.546 7 ^{**}	1.365 ± 0.172 ^{**}
醋酸乙酯	0.008	1.895 7 ± 0.263 8 ^{**}	1.338 ± 0.071 ^{**}	茯苓水煎液	0.856	2.604 8 ± 0.322 1 ^{**}	1.338 ± 0.052 [*]

表5 茯苓对小鼠自发活动的影响 (抖笼法, $\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Effect of Fuling on spontaneous activities of mice (shaking cage method, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	给药前振幅 / cm	给药后振幅 / cm	振幅差值 / cm
对照	—	0.669 ± 0.240	0.992 ± 0.308	0.323 ± 0.418
茯苓水煎液	10.7	0.778 ± 0.233	1.018 ± 0.461	0.240 ± 0.552
	21.4	0.933 ± 0.267	1.076 ± 0.274	0.143 ± 0.263
	42.8	0.823 ± 0.302	0.767 ± 0.484	-0.056 ± 0.437 [*]

表6 茯苓协同戊巴比妥钠对小鼠的催眠作用 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 6 Effect of Fuling on hypnotic action of mice induced by sodium pentobarbital ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	阈上剂量戊巴比妥钠		阈下剂量戊巴比妥钠	
		潜伏期 / min	睡眠时间 / min	入睡动物数 / 只	入睡率 / %
对照	—	5.7±1.26	22.0±6.75	0	0
茯苓水煎液	10.7	5.5±1.05	34.0±27.28	3	30
	21.4	4.9±1.47	47.8±47.95	4	40
	42.8	4.6±1.24	68.6±27.62**	6*	60

表7 茯苓各组分协同戊巴比妥钠对小鼠的催眠作用 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 7 Effect of Fuling's components on hypnotic action of mice induced by pentobarbital sodium ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	阈上剂量戊巴比妥钠		阈下剂量戊巴比妥钠	
		潜伏期 / min	睡眠时间 / min	入睡动物数 / 只	入睡率 / %
对照	—	4.82±0.87	14.62±2.55	1	10
石油醚	0.01	4.68±0.40	11.50±2.21	0	0
醋酸乙酯	0.04	3.40±0.73	20.96±2.98*	4	40
水洗物	0.72	5.24±1.98	12.57±2.68	1	10
醇洗物	0.12	5.01±1.52	12.30±2.92	0	0
粗多糖	0.28	2.77±0.36**	43.05±9.50**	9**	90
精制多糖	0.08	4.00±2.12	32.47±6.30**	7*	70
茯苓水煎液	42.8	3.91±1.05	31.50±7.04**	7*	70

4 讨论

4.1 茯苓改善学习记忆物质基础的确定

大脑中胆碱能系统是学习记忆的重要机制,中枢胆碱能系统功能正常是正常学习记忆功能的生理基础,但是由于其作用机制的复杂性,并且和其他系统如去甲肾上腺素能,5-羟色胺能具有交叉性,在临床上拟胆碱能药物治疗作用非常局限^[22]。遵循传统中医理论,神经系统都属于脑的范畴,学习记忆障碍自古受到重视,中医多称之为“喜忘”、“健忘”^[23],健忘以虚证居多,如精、气、血亏虚,髓海不足,脑失所养等^[24]。

本实验结果表明茯苓水煎液,石油醚、醋酸乙酯、粗多糖及精制多糖组分能显著降低东莨菪碱所致记忆障碍模型小鼠的 AchE,并提高小鼠的脑指数。乙酰胆碱能激活胆碱能 M1、M3 受体,从而激活蛋白磷脂酶,生成三磷酸肌醇和甘油二酯,打开 Ca²⁺通道,使蛋白磷酸化并且激活 CREB,使脑内蛋白因子转录表达,从而影响学习记忆^[25]。而钙离子本身作为第二信使,由 Ca²⁺/磷脂依赖性蛋白激酶(PKC)和 Ca²⁺/CaM 依赖性蛋白激酶(CaM II)介导的 Ca²⁺依赖性蛋白磷酸化在神经可塑性中起重要作用,并且在 Ras/MAPK/ERK、PLCγ、IP3-K/Akt

这几条通路中起着重要的作用^[26-27]。表明茯苓改善东莨菪碱所致学习记忆障碍与降低 AchE 活性有关,结合中医基础理论“脑为元神之府”,本实验首次应用脑指数指标进行学习记忆评价,发现具有一定的规律性,能对 AchE 指标起到补充作用。Lee 等^[28]发现茯苓总三萜与 5-HT₃ 受体有密切的关系,而醋酸乙酯组分主要包含三萜类成分,表明醋酸乙酯组分改善记忆有可能通过 AchE 和 5-HT₃ 受体进行多重调节。Gao 等^[29]对褐藻素研究发现能显著降低大鼠脑内 AchE 活力,并增加乙酰胆碱转移酶(ChAT)的活力,表明多糖改善记忆与中枢胆碱能神经系统密切相关,这也间接说明了茯苓粗多糖组分和精制多糖组分改善记忆的作用机制,而石油醚组分主要含有芳香脂类化合物,可能与芳香化合物提神醒脑有关。各组分对东莨菪碱所致的小鼠脑指数均有不同程度的增加,并且 Morris 水迷宫测试也显示随着训练天数的延长,醇洗物与水洗物表现出微弱的作用,这可能与改善脑指数有一定关系。粗多糖中含茯苓多糖 35.43%,精制多糖中含茯苓多糖 22.29%,从研究结果看,给药后二者无显著性差异,说明茯苓多糖也具有显著的改善学习记忆作用。

茯苓味甘入脾,具有健脾宁心的作用,而茯苓的宁心作用主要是健脾来体现的,脾为气血化生之源,脑髓的盈亏与脾密切相关,而脾藏意,在志为思:意,即意念,是将从外界获得的知识通过思维取舍,形成回忆的印象;思,即思考、思虑,是人的精神意识思维活动的一种状态。“心有所忆谓之意”(《灵枢·本神》)。“谓一念之生,心有所向而未定者,曰意”(《类经·脏象类》)。“脾藏营,营含意”(《灵枢·本神》)。上述都表明脾跟意相关,脾气健运,气血化源充足,髓海得养,则意念丰富,思路清晰,记忆力强;反之,脾的运化功能不足,“脾阳不足则思虑短少,脾阴不足则记忆多忘”(《中西汇通医经精义·上卷》)。脾气健运则肺气旺。肺功能正常,气血充足,则髓海有余,肺藏魄:魄是不受内在意识支配而产生的一种能动作用表现,属于人体本能的感觉和动作,即无意识活动,如耳的听觉、目的视觉等,都属于魄的范畴。故曰:“魄之为用,能动能作,痛痒由之而觉也”(《类经·脏象类》)。魄与生俱来,“并精而出入者谓之魄”(《灵枢·本神》)。“肺藏气,气舍魄”(《灵枢·本神》)。故肺气旺盛则体健魄全,魄全则感觉灵敏,耳聪目明,记忆力强盛,动作正确协调。综上所述茯苓宁心功效是通过健脾功效得以实现,改善学习记忆与其甘味入脾起到健脾宁心作用相关,为其甘味作用,由此醋酸乙酯组分、石油醚组分、多糖组分也是其甘味的物质基础。

4.2 茯苓镇静催眠物质基础的确定

《本草分经》:“甘、淡,平。白者入气分,益脾宁心”。《神农本草经百种录》:“味甘,平。主胸胁逆气,忧悲,惊邪恐悸,……久服安魂养神,不饥延年。心脾和通之效”。历代本草表明茯苓具有宁心安神,镇静的功效,茯苓味甘入脾,脾为后天之本,气血生化之源,脾气健运,化源充足、血液充盈则心有所主,心神得安。《素问·逆调论》云:“胃不和则卧不安。”《温病条辨·中焦篇》说:“不寐,中焦湿聚,阻遏阳气不得下交于阴也”。上述都表明了脾与宁心安神的关系,脾运化功能直接影响到心神的充养,另一方面,脾位于中焦,为气机升降出入的枢纽,气机升降正常,营卫运行正常才能心神得安。本实验结合茯苓的性味对茯苓镇静催眠作用进行研究发现,与对照组相比,茯苓高剂量组单次给药,小鼠自发活动明显减少,并且茯苓高剂量组连续ig给药7d可显著地延长阈上剂量戊巴

比妥钠引起小鼠睡眠时间,结合上述中医基础理论表明这可能与茯苓味甘入脾而健脾宁心安神有关。而以茯苓单用有效剂量即高剂量对茯苓各拆分组分进行了平行研究发现粗多糖能显著缩短小鼠的睡眠潜伏期,并且与精制多糖组分都能显著增加小鼠睡眠时间,但是粗多糖作用最强,表明除多糖外蛋白还有一些小分子化合物也对小鼠睡眠有一定的影响,醋酸乙酯也能延长小鼠睡眠时间,但作用较多糖弱。综上所述茯苓镇静催眠作用与其味甘入脾健脾宁心安神作用有关,为其甘味的作用,由此茯苓的醋酸乙酯组分、多糖组分为其甘味的物质基础。

综上,茯苓改善学习记忆及镇静催眠作用与茯苓味甘入脾、健脾宁心有关,为甘味的作用,而茯苓拆分组分中的醋酸乙酯组分、石油醚组分及多糖组分都为其甘味的物质基础。

参考文献

- [1] 梁学清,李丹丹,黄忠威. 茯苓药理作用研究进展 [J]. 河南科技大学学报, 2012, 30(2): 154-156.
- [2] Zhang M, Wang L H, Chen D X, *et al.* Effects of EPP on place orientation and space exploration dysfunctions in mice [C]. Jilin: International Conference on Human Health and Biomedical Engineering, 2011.
- [3] 吴红彦,王彩霞. 黑逍遥散对AD小鼠脑组织AChE, ChAT, MAO活性的影响 [J]. 甘肃中医学院学报, 2010, 27(2): 23-24.
- [4] Shi H, Wang M S, Xu H J, *et al.* Effects of nutrimental mixture of Taurine-Poriacocos and *Euryale ferox* on growth, learning, memory and stamina in mice [J]. *Acta Nutr Sin*, 1997, 19(2): 236-239.
- [5] 张敏,陈冬雪,孙晓萌. 茯苓水提液对小鼠学习记忆的影响 [J]. 北华大学学报, 2012, 13(1): 62-64.
- [6] 卢建中,喻萍,吕毅斌,等. 茯苓提取物对铅致记忆损伤及相关抗原表达的影响 [J]. 毒理学杂志, 2006, 20(4): 224-226.
- [7] 张中启,罗质璞. 学习记忆的胆碱能机制与去甲肾上腺素能和5-羟色胺能介质系统的关系 [J]. 中国药理学通报, 1994, 10(2): 81-83.
- [8] Flood J F, Cherkin A. Scopolamine effects on memory retention in mice: a model of dementia? [J]. *Behav Neural Biol*, 1986, 45(2): 169-184.
- [9] Jamialahmadi K, Sadeghnia H R, Mohammadi G, *et al.* Glucosamine alleviates scopolamine induced spatial learning and memory deficits in rats [J]. *Pathophysiology*, 2013, doi: org/10. 1016/j. pathophys. 2013. 04. 003.
- [10] Rabbani M, Vaseghi G, Hajhashemi V. AM281,

- Cannabinoid Antagonist/Inverse agonist, ameliorates scopolamine-induced cognitive deficit [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2012, 15(5): 1106-1110.
- [11] 屠鹏飞, 史社坡, 姜 勇. 中药物质基础研究思路与方法 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 209-215.
- [12] 陶 丽, 范方田, 刘玉萍, 等. 中药及其组分配伍的整合作用研究实践与进展 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(2): 153-156.
- [13] 姜红柳, 杨 振, 孟 勤, 等. 人参皂苷 Re 对小鼠学习记忆障碍的作用 [J]. 中国药理学通报, 2008, 24(10): 1399-1340.
- [14] 淤泽溥, 杨秀英, 李淑仪. 一种简易的镇静药物实验方法—抖笼换能器法 [J]. 云南中医学院学报, 1992, 15(1): 31-35.
- [15] 封洲燕, 郑筱祥. 抖笼法药理实验数据采集和定量分析 [J]. 浙江大学学报, 2002, 36(2): 183-185.
- [16] 葛会奇, 贾天柱. 五味子炮制品镇静催眠作用研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(5): 636-637.
- [17] 徐锦平, 马 英, 梁凯东. 三清安眠汤剂的镇静催眠作用及作用机制探讨 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(4): 848-851.
- [18] 李 俊, 韩向晖, 李仲洪, 等. 茯苓多糖的提取及含量测定 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2000, 17(1): 49-50.
- [19] 殷洪梅, 尚 强, 萧 伟. 金银花多糖脱蛋白方法的研究 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 584-586.
- [20] 陈 莉. 茯苓多糖提取工艺的优化及开发利用研究 [D]. 贵州: 贵州大学, 2007.
- [21] Liu X J, Wu W T. Effects of ligustrazine, tanshinone II A, ubiquinone, and idebenone on mouse water maze performance [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1999, 20(11): 987-990.
- [22] 张中启, 罗质璞. 学习记忆的胆碱能机制与去甲肾上腺素能和 5-羟色胺能介质系统的关系 [J]. 中国药理学通报, 1994, 10(2): 81-83.
- [23] 刘 承, 张海燕, 王景洪. 汉以来中医防治健忘的主要理论与经验 [J]. 陕西中医学院学报, 2004, 27(1): 68-69.
- [24] 李 辉, 高根德. 中药促进记忆的临床研究进展 [J]. 中国康复, 2009, 24(5): 350-351.
- [25] 王晓良. 应用分子药理学 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2005.
- [26] Parsian A, Sinha R, Raeette B, *et al*. Association of a variation in the promoter region of the brain-derived neurotrophic factor gene with familial Parkinson's disease [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2004, 10(4): 213-219.
- [27] Finkbeiner S. CREB couples neurotrophin signals to survival messages [J]. *Neuron*, 2000, 25(1): 11-14.
- [28] Lee J H, Lee Y J, Shin J K, *et al*. Effects of triterpenoids from *Poria cocos* Wolf on the serotonin type 3A receptor-mediated ion current in *Xenopus* oocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 615(1/3): 27-32.
- [29] Gao Y L, Li C, Yin J G, *et al*. Fucoidan, a sulfated polysaccharide from brown algae, improves cognitive impairment induced by infusion of A β peptide in rats [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2012, 33(2): 304-311.