

海马补肾丸对小鼠学习记忆障碍的改善作用

只德广¹, 庞纪平^{2,3}, 金兆祥³, 陈芙蓉¹, 王玉晶³, 范迪³, 姜溪¹, 岳南¹, 孙双勇¹, 顾煜琛^{4*}

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301
2. 天津中新药业集团股份有限公司中新制药厂, 天津 300457
3. 天津中新药业集团股份有限公司乐仁堂制药厂, 天津 300112
4. 武警江苏省总队医院, 江苏 扬州 225003

摘要: 目的 考察海马补肾丸对小鼠学习记忆障碍的改善作用, 并探讨其作用机制。方法 小鼠随机分为对照组、模型组、吡拉西坦组、龟龄集组和海马补肾丸组。采用腹腔注射东莨菪碱制备小鼠记忆获得性障碍模型, 计算学习正确率, 测定蛋白含量和乙酰胆碱酯酶活力。采用腹腔注射亚硝酸钠制备小鼠记忆巩固性障碍模型, 计算训练、测定学习正确率, 测定蛋白含量、去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA)、5-羟色胺 (5-HT) 以及丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 含量。结果 海马补肾丸 2.20 g/kg 组能显著增加小鼠学习记忆的正确率 ($P < 0.05$), 显著降低乙酰胆碱酯酶活力 ($P < 0.01$)。测定时, 与模型组比较, 海马补肾丸 1.10、2.20 g/kg 组能显著增加小鼠学习记忆正确率 ($P < 0.05$), 能不同程度增加小鼠大脑 SOD 含量, 降低 MDA 含量 ($P < 0.05$ 、0.01)。结论 海马补肾丸能明显改善小鼠的记忆获得、记忆巩固障碍, 推测其作用机制主要是通过降低乙酰胆碱酯酶活性, 增加脑内乙酰胆碱的含量, 改善记忆获得能力; 通过抗脑组织的氧化损伤, 增加大脑 SOD 含量, 降低 MDA 含量, 改善记忆巩固能力。

关键词: 海马补肾丸; 学习记忆障碍; 正确率; 乙酰胆碱酯酶; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2019)05-1290-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.05.005

Improvement of Haima Bushen Pills on learning and memory impairment in mice

ZHI De-guang¹, PANG Ji-ping^{2,3}, JIN Zhao-xiang³, CHEN Fu-rong¹, WANG Yu-ying³, FAN Di³, JIANG Xi¹, YUE Nan¹, SUN Shuang-yong¹, GU Yu-chen⁴

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co. Ltd, Tianjin 300301, China
2. Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co. Ltd, Zhongxin Pharmaceutical Factory, Tianjin 300457, China
3. Tianjin Zhongxin Pharmaceutical Group Co. Ltd, Larentang Factory, Tianjin 300112, China
4. Jiangsu Provincial Armed Police Corps Hospital, Yangzhou 225003, China

Abstract: Objective To investigate the improvement on Haima Bushen Pills on learning and memory impairment in mice, and study its mechanism. **Methods** Mice were randomly divided into control group, model group, piracetam group, Guilingji group, and Haima Bushen Pills group. The model of memory acquired impairment in mice was established by intraperitoneal injection of scopolamine. The correct rate of learning was calculated, and the protein content and acetylcholinesterase activity were determined. The memory consolidation impairment model of mice was induced by intraperitoneal injection of sodium nitrite. The learning accuracy of training and determination was calculated, and the protein content, NE, DA, 5-HT, MDA and SOD content were determined. **Results** Haima Bushen Pills (2.20 g/kg) group could significantly increase the correct rate of learning and memory in mice ($P < 0.05$), and significantly reduce the activity of acetylcholinesterase ($P < 0.01$). Compared with the model group, Haima Bushen Pills (1.10, 2.20 g/kg) group could significantly increase the correct rate of learning and memory in mice ($P < 0.05$), and increase SOD content and decrease MDA content in mice brain ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Haima Bushen Pills can significantly improve memory acquisition and memory consolidation disorders in mice. Its mechanism is maybe mainly through reducing the activity of acetylcholinesterase, increasing the content of acetylcholine in the brain and improving the ability of memory acquisition. And improve the memory consolidation by

收稿日期: 2018-12-05

作者简介: 只德广, 男, 副研究员, 本科, 从事药理学研究。E-mail: zdg_tj@163.com

*通信作者 顾煜琛, 本科, 从事临床药理研究。E-mail: 5001446@qq.com

resisting oxidative damage of brain tissue, increasing SOD and reducing MDA content in brain.

Key words: Haima Bushen Pills; learning and memory impairment; correct rate; acetylcholinesterase; SOD; MDA

海马补肾丸为临床名方,由鹿茸、鹿肾、海马、虎骨等36味中药组成,具有滋阴补肾、强壮健脑的功效,用于身体衰弱、气血两亏、肾气不足、面黄肌瘦、心跳气短、腰酸腿疼、健忘虚喘等。海马补肾丸可改善“阳虚”小鼠相关症状,延长缺氧和寒冷环境条件下的生存时间^[1]。本实验以小鼠记忆获得、记忆巩固障碍两种模型评价海马补肾丸的益智健脑作用,为临床应用提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

海马补肾丸(天津乐仁堂制药厂,规格0.27 g/丸,批号0340157)。龟龄集胶囊(山西广誉远国药有限公司,规格0.3 g/粒,批号103170408)。吡拉西坦片(天津金世制药有限公司,规格0.4 g/片,批号2016030)。羧甲基纤维素钠(CMC-Na,上海禾丰化学试剂有限公司,批号20110520)。东莨菪碱(上海迈瑞尔化学技术有限公司,批号71977019)。亚硝酸钠(NaNO₂,天津市风船化学试剂科技有限公司,批号20180102)。总蛋白定量试剂盒(批号20180516)、乙酰胆碱酯酶(AchE)试剂盒(批号20180514、20180622)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号20180518)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号20180517)均购自南京建成生物工程研究所。Mouse 5-HT ELISA KIT(批号201805)、Mouse NE ELISA KIT(批号201805)、Mouse DA ELISA KIT(批号201805)均购自上海依赫生物科技有限公司。

1.2 仪器

JZZ98-CM 动物自主活动检测仪、JZZ98-鼠跳台、避暗检测仪(中国医学科学院药物研究所); RT-6100 型酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司); FA1104 型电子天平(上海天平仪器厂); TGL-16B 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); SSW-600-2S 型电热恒温水槽(上海博远实业有限公司医疗设备厂); ECA522 电子天平、ECC2201 电子天平(南京博尼塔科学仪器有限公司); ST16R 冷冻离心机(Thermo); SCIENT2-II D 超声波细胞粉碎机(新芝); ZH-MG-3 型 Y 迷宫(安徽正华生物仪器设备有限公司)。

1.3 动物

昆明种小鼠, SPF 级, 体质量 18~20 g, 北京

维通利华实验动物技术有限公司提供, 生产许可证编号 SCXK(京)2016-0011。

1.4 海马补肾丸对东莨菪碱致小鼠记忆获得障碍的影响

将小鼠随机分为对照组、模型组、吡拉西坦(300 mg/kg)组、龟龄集(0.24 g/kg)组和海马补肾丸(0.55、1.10、2.20 g/kg)组, 每组各 12 只, 每天灌胃给药 1 次, 对照组给予等量的蒸馏水, 模型组给予相应容积 0.5% CMC-Na, 连续 14 d, 给药容积为 20 mL/kg。末次给药后 1 h 采用跳台装置进行 Y 型电迷路空间分辨能力实验。实验前 10 min 除对照组 ip 生理盐水外, 其余各组小鼠 ip 东莨菪碱 2 mg/kg, 注射体积 10 mL/kg。实验时轻提小鼠尾巴放入起步区, 适应环境 4 s, 然后以 36 V 电刺激小鼠, 观察 10 次中的正确次数, 计算学习正确率^[2-3]。

随后处死小鼠, 取脑组织, 用冰冷的生理盐水漂洗, 除去血液, 滤纸吸干、称定质量, -70 °C 保存, 按试剂盒说明书测定蛋白含量和乙酰胆碱酯酶活力。

1.5 海马补肾丸对亚硝酸钠致小鼠记忆巩固障碍的影响

小鼠随机分为对照组、模型组、吡拉西坦(300 mg/kg)组、龟龄集(0.24 g/kg)组和海马补肾丸(0.55、1.10、2.20 g/kg)组, 每组各 12 只。各组每天灌胃给药 1 次, 对照组给予等量的蒸馏水, 模型组给予相应容积 0.5% CMC-Na, 连续 14 d, 给药容积为 20 mL/kg。第 14 天灌胃后 1 h 进行 Y 型电迷路空间分辨能力实验, 测试学习能力。学习完后除对照组外各组立即 ip NaNO₂ 120 mg/kg 以复制记忆巩固障碍模型, 注射体积 10 mL/kg, 对照组 ip 相同体积的生理盐水。24 h 后进行记忆能力测试, 计算训练、测定学习正确率^[2-3]。

随后处死小鼠, 取脑组织, 用冰冷的生理盐水漂洗, 除去血液, 滤纸吸干、称定质量, -70 °C 保存, 按试剂盒说明书测定蛋白含量、5-羟色胺(5-HT)去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)以及 MDA、SOD 含量。

1.6 统计学方法

实验数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验和方差分析。

2 结果

2.1 海马补肾丸对东莨菪碱致小鼠记忆获得障碍的影响

与对照组比较,模型组学习记忆正确率显著下降,提示造模成功。与模型组比较,海马补肾丸 2.2 g/kg 能显著增加小鼠学习记忆的正确率($P < 0.05$),龟龄集 0.24 g/kg 能显著增加小鼠学习记忆的正确率,与吡拉西坦 300 mg/kg 作用相似,见表 1。

与对照组比较,模型组小鼠大脑乙酰胆碱酯酶活力显著增强。与模型组比较,海马补肾丸 2.2 g/kg 能显著降低乙酰胆碱酯酶活力($P < 0.01$),龟龄集 0.24 g/kg 能显著降低乙酰胆碱酯酶活力,吡拉西坦 300 mg/kg 未见显著作用,见表 1。提示海马补肾丸通过降低乙酰胆碱酯酶活力增强记忆获得能力。

表 1 海马补肾丸对东莨菪碱致记忆获得障碍小鼠学习记忆正确率、大脑乙酰胆碱酯酶活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of Haima Bushen Pills on accuracy of learning and memory and activity of cerebral acetylcholinesterase in scopolamine-induced memory acquisition disorder mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ (mg kg ⁻¹)	学习记忆正 确率/%	乙酰胆碱酯 酶/(U mg ⁻¹)
对照	—	70.8 ± 18.8	0.36 ± 0.07
模型	—	50.0 ± 21.3 [#]	0.43 ± 0.09 [#]
龟龄集	0.24	67.5 ± 17.1 [*]	0.34 ± 0.08 [*]
吡拉西坦	0.30	69.2 ± 20.7 [*]	0.38 ± 0.10
海马补肾丸	0.55	50.8 ± 21.5	0.37 ± 0.09
	1.10	62.5 ± 18.6	0.36 ± 0.09
	2.20	70.0 ± 23.7 [*]	0.34 ± 0.05 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

2.2 海马补肾丸对亚硝酸钠致小鼠记忆巩固障碍的影响

训练时,与对照组比较,其余各组小鼠学习正确率未见显著变化。测定时,与对照组比较,模型组小鼠跑到安全区的正确率显著降低($P < 0.01$),显示已造成记忆巩固障碍,提示模型成功。与模型组比较,海马补肾丸 1.10、2.20 g/kg 组能显著增加小鼠学习记忆正确率($P < 0.05$),龟龄集 0.12 g/kg 能显著增加小鼠的正确率,吡拉西坦 300 mg/kg 作用相似($P < 0.01$),见表 2。

与对照组比较,模型组小鼠大脑 DA 含量显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,各剂量组对 5-HT、NE、DA 含量未见显著差异。吡拉西坦 300 mg/kg 未见显著作用,见表 3。

表 2 海马补肾丸对亚硝酸钠致记忆巩固障碍小鼠学习记忆正确率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of Haima Bushen Pills on correct rates of learning and memory in mice with memory consolidation disorder induced by sodium nitrite ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ (mg kg ⁻¹)	训练学习记忆 正确率/%	测定学习记忆 正确率/%
对照	—	73.3 ± 25.3	74.2 ± 20.2
模型	—	83.3 ± 17.2	49.2 ± 20.7 ^{##}
龟龄集	0.24	79.2 ± 13.1	76.7 ± 17.2 ^{**}
吡拉西坦	0.30	90.0 ± 12.1	85.8 ± 13.8 ^{**}
海马补肾丸	0.55	79.2 ± 16.2	66.7 ± 23.5
	1.10	79.2 ± 17.3	68.3 ± 22.9 [*]
	2.20	87.5 ± 9.7	70.8 ± 21.1 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

表 3 海马补肾丸对亚硝酸钠致记忆巩固障碍小鼠大脑 5-HT、NE、DA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effect of Haima Bushen Pills on 5-HT, NE, and DA levels in mice with memory consolidation disorder induced by sodium nitrite ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	5-HT/(ng mg ⁻¹)	NE/(ng mg ⁻¹)	DA/(pg mg ⁻¹)
对照	—	7.56 ± 1.36	0.30 ± 0.14	3.67 ± 0.58
模型	—	7.90 ± 1.56	0.27 ± 0.11	3.00 ± 0.70 [#]
龟龄集	0.24	7.08 ± 1.78	0.33 ± 0.08	3.47 ± 0.62
吡拉西坦	0.30	6.80 ± 1.76	0.32 ± 0.06	3.47 ± 1.03
海马补肾丸	0.55	7.06 ± 1.61	0.28 ± 0.10	3.32 ± 0.84
	1.10	7.10 ± 1.83	0.29 ± 0.10	3.42 ± 0.72
	2.20	7.05 ± 2.00	0.31 ± 0.08	3.32 ± 0.77

与对照组比较: [#] $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs control group

与对照组比较, 模型组小鼠大脑 SOD 含量显著降低, MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 海马补肾丸 1.10、2.20 g/kg 组能不同程度增加小鼠大脑 SOD 含量, 降低 MDA 含量 ($P < 0.05$ 、

0.01)。龟龄集 0.24 g/kg 能显著增加小鼠大脑 SOD 含量, 降低 MDA 含量。吡拉西坦 300 mg/kg 作用相似 ($P < 0.05$ 、0.01), 见表 4。提示海马补肾丸通过抗氧化损伤提高小鼠记忆巩固能力。

表 4 海马补肾丸对亚硝酸钠致记忆巩固障碍小鼠大脑 SOD、MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Effect on Haima Bushen Pills on SOD and MDA levels in mice with memory consolidation disorder induced by sodium nitrite ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg kg ⁻¹)	SOD/(U mg ⁻¹)	MDA/(nmol mg ⁻¹)
对照	—	245.6 ± 37.2	2.08 ± 0.57
模型	—	211.3 ± 19.0 [#]	2.55 ± 0.35 [#]
龟龄集	0.24	254.1 ± 33.9 ^{**}	2.03 ± 0.60 [*]
吡拉西坦	0.30	248.2 ± 51.6 [*]	1.99 ± 0.65 [*]
海马补肾丸	0.55	238.5 ± 54.1	2.20 ± 0.62
	1.10	246.1 ± 42.4 [*]	2.23 ± 0.49
	2.20	259.5 ± 46.5 ^{**}	2.20 ± 0.41 [*]

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3 讨论

学习记忆障碍是老年性疾病的常见症状, 发病机制复杂, 涉及到各种系统和环节, 其中神经中枢胆碱能系统与学习记忆障碍的关系密切^[4]。东莨菪碱属于胆碱受体阻断剂, 可阻断脑内胆碱受体, 可降低大脑皮层和海马内乙酰胆碱含量^[5]。乙酰胆碱是体内一种重要的神经递质, 其相应突触部位的受体为胆碱能受体, 它在中枢神经系统内广泛分布, 其主要功能之一就是维持意识清醒和记忆功能, 因此给予东莨菪碱能影响学习记忆功能, 造成记忆获得性障碍; 亚硝酸钠导致脑组织缺氧缺血, 损害到细胞, 影响脑组织的正常代谢, 损害学习记忆过程, 造成记忆巩固障碍^[6]。

海马补肾丸含有多种成分, 如有机物氨基酸含量多达 17 种以上, 还有酸性黏多糖, 性激素等。海马补肾丸对机体特异性和非特异性免疫机能都有明显的促进作用, 具有性激素样作用、抗疲劳作用等, 动物实验证明无任何毒副作用。本研究结果表明, 海马补肾丸能显著增加东莨菪碱致记忆获得障碍、亚硝酸钠致记忆巩固障碍小鼠的学习记忆的正确率 ($P < 0.05$), 并且海马补肾丸显著降低乙酰胆碱酯酶活力 ($P < 0.01$), 不同程度地增加小鼠大脑 SOD 含

量, 降低 MDA 含量 ($P < 0.05$)。

综上所述, 海马补肾丸能够明显改善小鼠的记忆获得、记忆巩固障碍, 推测其作用机制主要是通过降低乙酰胆碱酯酶活性, 增加脑内乙酰胆碱的含量, 改善记忆获得能力; 通过抗脑组织的氧化损伤, 增加大脑 SOD 含量, 降低 MDA 含量, 改善记忆巩固能力。

参考文献

- [1] 刘若庸, 路红莉, 于云, 等. 海马补肾丸的药理作用研究 [J]. 中草药, 1992, 23(7): 363-365.
- [2] 陈奇. 中药药理实验方法学 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 910.
- [3] 徐淑云, 卞如廉, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 826-827.
- [4] 陈晓霞, 王刚, 陈生弟. 帕金森病患者学习与记忆障碍及影响因素研究进展 [J]. 内科理论与实践, 2012, 7(3): 231-233.
- [5] 高莉, 彭晓明, 张富春, 等. 不同剂量东莨菪碱对小鼠学习记忆功能的影响 [J]. 医药导报, 2013, 32(5): 573-576.
- [6] 胡志红, 范玲玲, 胡咏梅. 亚硝酸钠对大鼠海马骨架蛋白磷酸化水平及空间学习记忆的影响 [J]. 生理学报, 2015, 67(5): 479-486.