·药理与临床·

调心方活性部位对皮质酮抑制大鼠海马脑片 CA1 区诱发长时程增强的作用

乔海法, 杨 胜, 周文霞*, 张永祥
(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘 要: 目的 以长时程增强(LTP)为指标, 研究调心方(TXR)活性部位 A(TXR-A)对皮质酮抑制大鼠海马脑片 LTP 作用的影响。方法 将脑片分为正常对照组、皮质酮组、皮质酮+ TXR 组、皮质酮+ 不同浓度 TXR-A 组, 记录前脑片用含药人工脑脊液 (ACSF) 孵育 1 h, 记录时用相同 ACSF 灌流。采用细胞外微电极记录技术, 记录大鼠海马脑片 CA1 区诱发群峰电位 (PS), 然后施以 100 Hz、100 个脉冲的强直刺激 HFS 诱发 LTP。结果 与正常脑脊液组相比, 皮质酮 (2 μmol/L) 孵育海马脑片 1.5 h 以上, 强直刺激后 PS 增幅显著降低, 提示皮质酮对海马 LTP 具有抑制作用。用不同浓度的 TXR-A+ 皮质酮孵育脑片 1.5 h 以上, 强直刺激后高浓度 TXR-A 组的 PS 平均幅度显著提高, 且作用优于 TXR。提示 TXR-A 可以对抗皮质酮对 LTP 的抑制。结论 该活性部位可能是发挥 TXR 改善皮质酮抑制大鼠海马 CA1 区诱发 LTP 作用的主要成分之一, 拮抗皮质酮对 LTP 的抑制是其益智作用的机制之一。

关键词: 调心方; 长时程增强 (LTP); 皮质酮; 海马脑片
中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2005)01-0065-04

Effect of active fraction of Tiaoxin Recipe on long-term potentiation inhibited by corticosterone in area CA1 of rat hippocampal slices

QIAO Hai-fa, YANG Sheng, ZHOU Wen-xia, ZHANG Yong-xiang
(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of active fraction A (TXR-A) extracted from Tiaoxin Recipe (TXR) on inhibition of corticosterone on long-term potentiation (LTP) induced by high frequency stimulation (HFS) in rat hippocampal slices. **Methods** The slices were divided into control, corticosterone, corticosterone+ TXR, and corticosterone+ different concentration of TXR-A groups, then were incubated with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) added by drugs for 1 h before recording and were perfused with the same ACSF during recording. Population spike (PS) was recorded from stratum pyramidale of area CA1 using extracellular recording following stimulation of Schaffer collaterals in rat hippocampal slices. Then a 100 Hz, 100 pulses HFS was used to induce LTP. **Results** PS amplitude was decreased significantly *vs* that in the control group, when the slices were pre-incubated in ACSF added by corticosterone (2 μmol/L) over 1.5 h, meaning that LTP was inhibited by corticosterone. However, PS amplitude of the slices pre-incubated in ACSF added by corticosterone (2 μmol/L) and high concentration TXR-A was increased significantly *vs* that of corticosterone pre-treating slices, meaning that high concentration TXR-A enhanced LTP inhibited by corticosterone. Furthermore, increased LTP amplitude in high concentration TXR-A was much more than that in TXR. **Conclusion** TXR-A is one of main TXR active ingredients which facilitate LTP inhibited by corticosterone in area CA1 of rat hippocampal slices. The antagonist effect on corticosterone inhibition on LTP is one of the mechanisms to benefit the intelligence.

Key words: Tiaoxin Recipe (TXR); long-term potentiation (LTP); corticosterone; hippocampal slice

糖皮质激素 (glucocorticoids, GCs) 过度分泌与海马的增龄性认知机能障碍及阿尔茨海默病 (AD) 所表现的海马机能损伤关系密切。前期研究表明, ip 皮质酮 (corticosterone) 可明显抑制整体

* 收稿日期: 2004-05-08
基金项目: 国家自然科学基金重点项目(39830450)
作者简介: 乔海法(1967—), 男, 山东青岛人, 教授, 医学博士, 现为军事医学科学院总后优秀人才科研工作站研究人员, 主要从事中药及神经药理学研究。Tel: (010) 66931627 E-mail: haifaqiao@163.com
* 通讯作者 Tel: (010) 66931625 Fax: (010) 68211656 E-mail: Zhouwx@nic.bmi.ac.cn

大鼠海马齿状回诱发长时程增强 (long-term potentiation, LTP)[1]; 皮质酮也可以抑制海马脑片 CA1 区诱发 LTP, 由党参、桂枝、茯苓、菖蒲、远志和炙甘草等中药组成的调心方 (TXR) 则可以明显对抗这一作用[2]。为深入探讨 TXR 发挥益智作用的物质基础, 笔者通过药理和化学研究方法, 获得了几个部位, 其中, 部位 A 中含总皂苷 70% 以上, 初步动物实验结果表明, 该部位对 β-淀粉样蛋白 (β-AP) 诱导的痴呆模型大鼠的空间学习记忆障碍具有明显改善作用, 提示该部位可能是 TXR 发挥益智作用的活性部位之一。为进一步探讨其发挥益智作用的机制, 本研究采用细胞外微电极记录技术, 首先观察皮质酮对脑片 LTP 诱发的抑制作用, 然后观察调心方活性部位 A (TXR-A) 对皮质酮抑制大鼠海马脑片 CA1 区诱发 LTP 的影响, 并与 TXR 全方对抗皮质酮抑制 LTP 诱发的作用进行比较。

1 材料与方法

1.1 动物: 二级 Wistar 大鼠, 雌性, 体重 160～200 g, 由军事医学科学院动物中心提供。

1.2 药品与试剂: TXR 为水提醇沉制成的水溶液, 含生药 7.45 g/mL; TXR-A 则采取水煎、醇沉, 进而以乙醚、正丁醇提取的工艺进行提取, TXR-A (配方中远志的总皂苷> 50%) 配成含生药 7.45 g/mL 的溶液; 均由上海中医药大学老年医学研究所提供。皮质酮购于美国 Gibco BRL 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 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 ℃ 供氧条件下, 用振动切片机 (Vibroslice MA752, Campden Ins, 英国) 沿与海马长轴垂直的方向将其切成厚为 400 μm 的脑片, 全部脑片置于不断通入氧混合气体 (95% O_2+ 5% CO_2) 的人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 中, 在室温 (21～26 ℃) 下孵育 1.5 h 以上。ACSF 的组成为 (mmol/L): NaCl 124、KCl 5、KH_2PO_4 1.2、$MgSO_4$ 1.3、$NaHCO_3$ 26、$CaCl_2$ 2.5、*D*-glucose 10, 调 pH 值至 7.3～7.4。

1.4 群峰电位 (population spike, PS) 记录: 将孵育后的脑片置于海马浴槽中并固定, 不断通入氧混合气, 用蠕动泵持续灌流 ACSF (1.5～2 mL/min), 使海马脑片全浸于液面下。整个实验过程用恒温器将浴槽温度控制在 (30±1) ℃。双极刺激电极置于由海马 CA3 区锥体细胞发出而投射于 CA1 区的 Schaffer 侧支上, 玻璃微电极 (内充 4 mmol/L NaCl 溶液, 阻抗 3～7 MΩ) 置于海马 CA1 区锥体细胞层, 由刺激器 (SEN-7203, 日本) 输出刺激信号经隔离器 (SS-104J, 日本) 至刺激电极。记录细胞外诱发 PS, 则通过微电极放大器 (Axoclamp2A, Axon Ins, 美国) 与计算机相联, 由 Pclab2.2 软件 (北京微信斯达科技发展有限公司) 进行采样处理。

1.5 LTP 的诱发: 实验开始时, 先用中等强度的单刺激 (间隔 60 s, 持续 200 μs) 诱发出特征性的基础 PS, 稳定记录 10 min, 使 PS 达到稳定, 调节 PS 幅度至最大幅度的 50%～60%, 再稳定记录 15 min, 然后给予 Schaffer 侧支纤维一个频率为 100 Hz 的 100 个脉冲的高频刺激 (HFS), 此时可以记录到增大的 PS, HFS 后连续记录 60 min。

1.6 观测指标和测量方法: 实验中以 PS 幅度相对值 (%) 为观测指标, 并观察其增幅情况。具体测定方法: 每 5 个连续时间点即连续 5 min 采集的 5 个值 (1 个/min) 进行平均得一个值, 以 HFS 之前 15 min 内的 PS 均值为 100%, 每 5 个时间点平均得到的值分别除以 HFS 之前的 PS 均值, 得各时间点的 PS 幅度相对值 (%)。整体的平均增幅则是将 HFS 后 60 min PS 幅度均值除以 HFS 前的 PS 均值。

1.7 给药方法: 将 TXR 及 TXR-A 溶液离心, 并用 ACSF 分别稀释。其中, TXR 稀释 1 000 倍, 使其含生药 7.45 mg/mL; TXR-A 溶液则分别稀释 2 000、1 000、500 倍, 使其含生药分别为 3.75、7.45、14.9 mg/mL。当观察药物对海马脑片基础突触传递的影响时, 先采用通常的 ACSF 灌流脑片并记录正常的 PS, 然后采用含药 ACSF 灌流脑片, 观察其是否发生变化; 当观察皮质酮对海马脑片 LTP 的抑制作用及 TXR 或 TXR-A 对抗皮质酮的这种作用时, 则分别在实验前用含皮质酮 (2 μmol/L) 及皮质酮 (2 μmol/L) + TXR (含生药 7.45 mg/mL) 或皮质酮+ 不同质量浓度 TXR-A 的 ACSF 孵育脑片 1.5 h 以上, 并在整个实验记录过程中均用此含药 ACSF 灌流脑片。

1.8 数据处理: 采用 Origin 6.0 软件 (Microcal Software, 美国) 及 SAS 软件包 (Release 6.12, Sas Institute Inc, 美国) 对数据进行分析和统计学处理。定量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据比较采用配对 Student's t 检验; LTP 的动态变化采用具有一个重复测量的两因素方差分析 (two-way ANOVA); 而 1 h 平均 PS 幅度相对值则采用单因素方差分析 (one-way ANOVA); 多组比较用 SNK 检验。

2 结果

2.1 皮质酮对大鼠海马脑片诱发 LTP 的抑制作用: 首先用通常的 ACSF 灌流海马脑片, 记录正常的 PS, 将 PS 调至最大幅度的 50%～60%, 稳定记录 10 min 后, 灌流含 2 μmol/L 皮质酮的 ACSF, 观察其对脑片基础 PS 的影响。结果发现, 所记录的 7 例脑片在灌流后 30 min 内 PS 的形状、幅度没有发生明显变化 (图 1)。提示皮质酮并不影响大鼠海马脑片的基础突触传递。

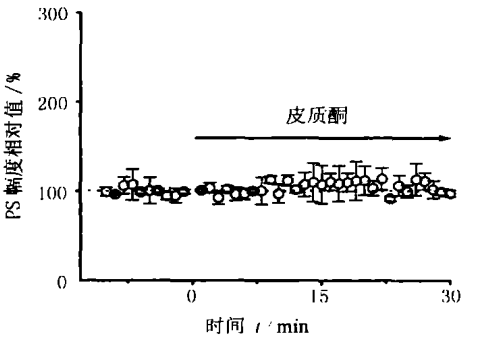


图 1 皮质酮对大鼠海马脑片基础 PS 的影响 (n= 7)

Fig. 1 Effect of corticosterone on baseline of PS in rat hippocampal slices (n= 7)

预先用含 2 μmol/L 皮质酮的 ACSF 孵育海马脑片 1.5 h 以上, 再观察 LTP 的诱发情况。结果发现, LTP 的幅度受到明显的抑制, 与对照组即正常 ACSF 组相比, HFS 后不同时间点 PS 增幅及 60 min 内的平均 PS 幅度也明显降低 (表 1、图 2), 提示皮质酮可以明显抑制大鼠海马脑片 LTP 的幅度。

2.2 TXR-A 及 TXR 对皮质酮抑制大鼠海马脑片诱发 PS 幅度的影响: 预先分别用含皮质酮+ TXR 及皮质酮+ 不同浓度 TXR-A 的含药 ACSF 孵育海马脑片 1.5 h 以上, 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的含药 ACSF 灌流, 观察 TXR-A 对皮质酮抑制脑片诱发 PS 及 LTP 幅度的影响。结果显示, HFS 后 14.9 mg/mL TXR-A 组不同时间点的 PS 幅度明显高于皮质酮模型组 (P< 0.01) (表 1)。7.45 和 14.9 mg/mL TXR-A 组脑片 HFS 后 60 min 内的平均 PS 幅度相对值明显高于模型组 (P< 0.01), 并表现出一定的量效关系, 14.9 mg/mL TXR-A 组的作用优于 TXR (P< 0.05) (图 2)。提示高浓度 TXR-A 可明显改善皮质酮对不同时间点 PS 幅度及整个 LTP 维持的抑制作用。

表 1 TXR-A 对皮质酮抑制大鼠海马脑片 CA1 区诱发 PS 幅度的影响 ($\bar{x}\pm s$, n= 6)

Table 1 Effect of TXR-A on PS inhibited by corticosterone in CA1 area of rat hippocampal slices ($\bar{x}\pm s$, n= 6)

组 别	剂 量 /(mg·mL^{-1})	PS 相对幅度值/% 5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min
对照	–	150.8± 5.6	152.2± 3.6	152.4± 3.9	155.0± 8.1	156.9± 7.9	156.6± 9.4
皮质酮	–	110.1± 7.4**	109.5± 8.4**	110.2± 6.0**	109.7± 9.4**	110.9±11.1**	110.3±14.8**
皮质酮+ TXR	7.45	172.0±21.1##	170.4±22.9##	170.6±20.4##	166.4±25.6##	165.0±25.6##	165.3±31.4##
皮质酮+ TXR-A	3.75	121.7± 7.8	119.7± 8.9	119.5± 9.6	118.1± 7.5	119.8± 9.3	118.1± 9.2
	7.45	146.1±20.6#	140.3±18.1#	146.7±11.3#	137.2±10.0#	138.9±14.4#	134.6±15.6#
	14.9	190.9±26.8## ※△	207.2±20.4## ※△	203.0±25.4## ※△	205.7±20.9## ※△	199.0±14.9## ※△	217.8±11.7## ※△

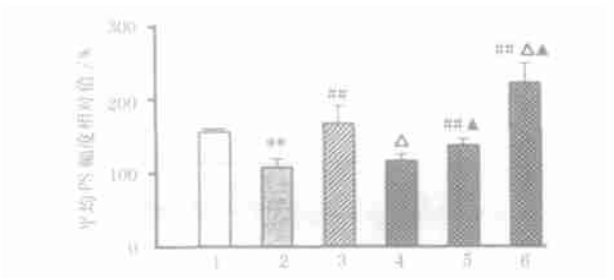
组 别	剂 量 /(mg·mL^{-1})	PS 相对幅度值/% 35 min	40 min	45 min	50 min	55 min	60 min
对照	–	153.0± 3.3	154.7± 7.7	156.8± 9.5	157.9± 4.8	159.5±12.6	159.3±17.3
皮质酮	–	109.7±12.6**	106.5±12.6**	107.0±15.9**	104.6±11.4**	105.7±13.8**	106.8±16.2**
皮质酮+ TXR	7.45	164.0±23.7##	167.0±22.4##	165.6±23.9##	163.9±25.0##	167.9±25.0##	168.7±28.4##
皮质酮+ TXR-A	3.75	120.6± 4.5	117.5± 7.4	118.1± 8.3	117.8±17.7	118.2± 6.1	116.6± 6.7
	7.45	139.8±11.0#	133.9±12.2#	136.6±13.8#	134.4±14.1#	128.9±19.8	135.1±10.9#
	14.9	223.6±28.2## ▲△	232.4±24.2## ▲△	235.1±21.2## ▲△	246.3±23.2## ▲△△	249.8±27.0## ▲△△	256.6±34.1## ▲△△

与对照组比较: ** P< 0.01; 与皮质酮组比较: # P< 0.05 ## P< 0.01; 与皮质酮+ TXR 组比较: ▲P< 0.05; 与皮质酮+ TXR-A (3.75、7.45 mg/mL) 组比较: △P< 0.05 △△P< 0.01

** P< 0.01 *vs* control group; # P< 0.05 ## P< 0.01 *vs* corticosterone group; ▲P< 0.05 *vs* corticosterone+ TXR group; △P< 0.05 △△P< 0.01 *vs* corticosterone+ TXR-A (3.75, 7.45 mg/mL) groups

3 讨论

皮质酮是肾上腺皮质分泌的主要 GCs, 具有抗炎、抗免疫和介导应激等重要作用, 其分泌受控于下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 功能轴, 血浆皮质酮水平升高可作用于下丘脑糖皮质激素受体而反馈性抑制 HPA 轴功能, 减少肾上腺皮质分泌皮质酮, 并使血浆皮质酮保持在一个较为稳定的水平。临床研究表明, AD 患者 HPA 轴功能亢进, GCs 水平明显高于正常水平[3～5]。皮质酮过量分泌可损伤中枢神经系统, 尤其对海马神经细胞具有选择性毒性[6,7]。AD 患者中,



1-对照 2-皮质酮 3-皮质酮+ TXR 4-皮质酮+ TXR-A (3.75 mg/mL) 5-皮质酮+ TXR-A (7.45 mg/mL) 6-皮质酮+ TXR-A (14.9 mg/mL) 与对照组比较: $^{**}P<0.01$; 与皮质酮组比较: $^{\#\#}P<0.01$; 与 TXR 组比较: $^{\triangle}P<0.05$; 与皮质酮+ TXR-A (3.75 mg/mL) 组比较: $^{\blacktriangle}P<0.05$

1-control 2-corticosterone 3-corticosterone + TXR 4-corticosterone + TXR-A (3.75 mg/mL) 5-corticosterone+ TXR-A (7.45 mg/mL) 6-corticosterone+ TXR-A (14.9 mg/mL)

$^{**}P<0.01$ *vs* control group; $^{\#\#}P<0.01$ *vs* corticosterone group; $^{\triangle}P<0.05$ *vs* TXR group; $^{\blacktriangle}P<0.05$ *vs* corticosterone+ TXR-A (3.75 mg/mL) group

图 2 **TXR-A** 对皮质酮抑制大鼠海马脑片 **CA1** 区诱发 **LTP** 平均 **PS** 幅度的影响 (***n*= 6**)

Fig. 2 Effect of TXR-A on mean PS of LTP inhibited by corticosterone in CA1 area of rat hippocampal slices (*n*= 6)

与学习记忆功能存在高度相关性的海马的损伤程度同其认知能力衰退具有明显的相关性, 前期研究表明, 快速老化小鼠海马中的皮质酮含量呈增龄性升高[8]; 皮质酮可显著抑制整体大鼠海马齿状回及离体海马脑片 CA1 区 LTP 的诱发及维持[1,2], 这与文献报道一致[9,10]。

本实验以 LTP 为观测指标, 首先观察了皮质酮对大鼠海马脑片 LTP 的抑制作用, 并在此基础上研究了 TXR-A 对皮质酮抑制大鼠海马脑片 LTP 的影响。结果表明, 皮质酮并不影响大鼠海马脑片的基础突触传递, 加入 TXR-A 也没有改变。相同于或 2 倍于 TXR 浓度的 TXR-A 可以增强被皮质酮抑制的 LTP 幅度, 并具有一定的量效关系, 两倍浓度的作用明显优于 TXR。因此, TXR 的该活性部位可能是发挥原方对抗皮质酮抑制大鼠海马脑片诱发 LTP 的主要成分之一, 它拮抗皮质酮抑制 LTP 的作用可能也是其益智的机制之一。然而, 在正常脑片上的实验表明, 不但与 TXR 相同浓度的 TXR-A 对 LTP 的促进作用不如 TXR, 即使 2 倍浓度的 TXR-A 作用也不如 TXR (结果另文发表), 这又提示 TXR-A 发挥益智作用与受试对象的机能状态有关, 其对改善皮质酮损害 LTP 具有特异性。由于皮质酮抑制海马 LTP 的诱发和维持与 Ca^{2+} 及一些与 LTP 关系密切的蛋白激酶的磷酸化有关, 因此, 该活性成分可能是通过改善皮质酮的这种抑制作用来促进 LTP 的诱发并发挥益智作用的。

References:

[1] Zhou J Z, Zhang Y X, Liu C H, *et al*. Inhibitory effect of corticosterone on the formation of long-term potentiation in rat hippocampal dentate gyrus [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1999, 13(4): 241-244.

[2] Wan Q, Zhang Y X. Effect of Tiao-Xin-Fang on long-term potentiation in rat hippocampal slices [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2002, 8(6): 22-25.

[3] O´Brien J T, Ames D, Schweitzer I, *et al*. Enhanced adrenal sensitivity of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) is evidence of HPA axis hyperactivity in Alzheimer´s disease [J]. *Psychol Med*, 1996, 26(1): 7-14.

[4] Magri F, Locatelli M, Balza G, *et al*. Pathological brain aging [J]. *Chronobiol Int*, 1997, 14(4): 385-396.

[5] Balldin J, Blennow K, Gottfries C G, *et al*. Relationship between mental impairment and HPA axis activity in dementia disorders [J]. *Dementia*, 1994, 5(5): 252-256.

[6] Sapolsky R M. A mechanism for glucocorticoid toxicity in the hippocampus; increased neuronal vulnerability to metabolic insults [J]. *J Neurosci*, 1985, 5: 1228-1240.

[7] Sapolsky R M. Pulsinelli W. Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implication [J]. *Science*, 1985, 229: 1397-1401.

[8] Zhou J Z, Zhang Y X. Increased corticosterone levels in plasma and hippocampus and their relationship with hippocampal ATP depletion in senescence accelerated mice [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 1998, 12(1): 12-15.

[9] Bodnoff S R, Humphreys A G, Lehman J C, *et al*. Enduring effects of chronic corticosterone treatment on the spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats [J]. *J Neurosci*, 1995, 15(1): 61-69.

[10] Ma Q, Wang F Z, Zhao T, *et al*. Effect of corticosterone on long-term potentiation in rat hippocampal slices [J]. *Chin J Appl Physiol* (中国应用生理学杂志), 2003, 19(1): 96-97.