

最高峰,其后开始逐渐缩小。基质组动物创面由于动物自身的抵抗功能,创面也呈现愈合趋势,但明显慢于各给药组动物创面的愈合速度。自 21 d 开始,与基质组比较,复方虎杖蜂房喷雾剂对大鼠创面开始呈现明显的促进愈合作用,大鼠创伤面积缩小速度较基质组快,创面愈合率明显提高 ($P < 0.05$)。

本实验测得的皮肤 Hyp 水平在烧伤后 3 d 时最高,继之下降,14 d 之后又持续上升,直 35 d 未见下降。烧伤后 3 d 时,已坏死表皮内的胶原分解、变性,释放出大量 Hyp,致使 Hyp 水平骤然升高;随着坏死组织的溶脱,Hyp 下降;14 d 之后,胶原代谢活跃,新生胶原合成增多,Hyp 升高,此上升趋势持续至伤后 35 d,但仍低于正常大鼠皮肤 Hyp 水平,提示胶原合成仍在继续。Hyp 的动态变化与同一

时期的病理组织学切片变化相一致。

对小面积 度烧伤大鼠创面的治疗自 21 d 开始,复方虎杖蜂房喷雾剂组的 Hyp 与基质组相比有显著性差异 ($P < 0.05$),提示复方虎杖蜂房喷雾剂能促进胶原合成,促进烧伤面愈合。这与复方虎杖蜂房喷雾剂对治疗小面积 度烧伤大鼠创面的愈合相一致。

参考文献:

- [1] 张均田. 现代药理实验方法 [M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [2] 冯志民,徐 蓿,马旺扣. 动物组织中羟脯氨酸测定方法的建立及初步应用 [J]. 南京铁道医学院学报, 1999, 18 (3): 168.
- [3] 李文才,张锦生,李 华,等. 肝组织羟脯氨酸含量测定方法的优化 [J]. 上海医科大学学报, 2000, 27(4): 295.

广藿香醇对东莨菪碱致记忆障碍小鼠学习记忆功能的影响

黄晓舞¹,刘睿婷²,吕秋军^{3*}

(1. 解放军总医院 药材处,北京 100853; 2. 军事医学科学院放射与辐射研究所,北京 100850;

3. 杰华(北京)生物医药研究院,北京 100102)

摘要:目的 研究广藿香醇对东莨菪碱所致获得性学习记忆障碍小鼠学习记忆功能的影响。方法 采用 Morris 水迷宫检测小鼠学习记忆能力,广藿香醇 (80、40、20 mg/kg) 连续预防给药 10 d,训练前 15 min ip 给予东莨菪碱 (1.5 mg/kg)。行为学测试完成后,脑匀浆检测乙酰胆碱酯酶 (AChE)、丁酰胆碱酯酶 (BuChE) 以及胆碱乙酰转移酶 (Chat) 活性,免疫组化检测脑 M₁ 受体水平。结果 与模型组相比,广藿香醇 (80、40 mg/kg) 组小鼠学习记忆能力显著增强,脑 AChE 活性显著下降,而 Chat 活性显著提高,脑内 M₁ 受体水平也显著提高。结论 广藿香醇具有促进东莨菪碱小鼠学习记忆的作用,该作用可能与其抑制脑内 AChE 活性,提高 Chat 活性和 M₁ 受体水平有关。

关键词:广藿香醇;东莨菪碱;Morris 水迷宫;乙酰胆碱酯酶 (AChE);胆碱乙酰转移酶 (Chat);M₁ 受体

中图分类号:R286.1 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2009)09-1431-03

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 是我国常用中药,具有调节消化功能、胃肠平滑肌解痉作用,还具有抗菌等功效,其主要成分是三环倍半萜类化合物广藿香醇 (patchouli alcohol),研究表明广藿香醇具有钙离子通道拮抗作用^[1]。在前期针对 - 淀粉样蛋白抗损伤的体外研究中,发现广藿香醇具有显著的神经保护作用^[2]。鉴于雌激素具有多靶向抗阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的潜在活性^[3]及广藿香醇在雌激素受体 亚型 (ER) 特异性激动剂筛选实验中显示其具有强的 ER 转录激活活性^[4],为了进一步在体内研究广藿香醇抗 AD 作

用,确定其药效,本实验有用东莨菪碱致学习记忆障碍模型小鼠研究广藿香醇对学习记忆的改善作用。

1 材料

1.1 主要药物试剂和仪器:广藿香醇购自中国药品生物制品检定所,质量分数达 98% 以上,0.1% 羧甲基纤维素钠溶成混悬态。氢溴酸东莨菪碱购自 Sigma 公司,批号 0703232。乙酰胆碱酯酶 (AChE)、丁酰胆碱酯酶 (BuChE)、胆碱乙酰转移酶 (Chat) 活力检测试剂盒购自南京建成生物研究所。兔抗人 M₁ 受体一抗、免疫组化试剂盒及 DBA 染色试剂盒均购自武汉博士德公司。小鼠 Morris 水迷

* 收稿日期:2009-03-21

作者简介:黄晓舞(1972—),女,解放军总医院主管药师,研究方向为药品质量控制。

Tel: (010) 66937225 E-mail: huangxw9266@vip.sina.com

宫购自中国医学科学院,直径 1.0 m。

1.2 实验动物:昆明小鼠,体质量 18~22 g,雌雄各半,购自军事医学科学院实验动物中心,动物实验条件合格证号为 SCXK(京)2005-0013。

2 方法

2.1 动物分组、给药与造模:小鼠按体质量均衡及随机原则分组,分别为对照组、模型组、广藿香醇给药 80、40、20 mg/kg 组,每组 12 只。动物适应 1 d 后开始 ig 给药,对照及模型组给予溶剂,持续 10 d。末次给药 1 h 后除对照外,其余各组给予氢溴酸东莨菪碱造模,在学习训练前 15 min 小鼠 ip 1.5 mg/kg 氢溴酸东莨菪碱,给药体积 0.2 mL/10 g,每天给药 1 次,共 4 次。

2.2 Morris 水迷宫试验:实验前 1 d 先将小鼠放入水迷宫中自由游泳 2 min 以适应环境。每天小鼠训练 2 次,间隔 10 min,每次分别从 2 个不同入水点将小鼠面向容器壁放入水中游泳,若小鼠在 90 s 内不能找到水下平台,则将其直接置于平台上并停留 30 s。记录小鼠入水后爬上平台所用时间(潜伏期)作为检测小鼠对空间和线索学习的指标,共训练 4 d。

2.3 生化指标测定:行为学测试完成后,各组小鼠先摘眼球取血,4 000 r/min 离心 10 min 得血清,-20℃ 保存。处死小鼠,在冰块上快速分离大脑组织,称质量后将一半大脑用相当于组织质量 9 倍体积的生理盐水将所取脑组织制成 10% 组织匀浆,将匀浆 4 000 r/min 离心 15 min,取上清,-20℃ 保存。参照试剂盒说明书测定血清 BuchE 活性及脑组织 AchE、Chat 活性。

2.4 脑组织 M₁ 受体免疫组化:小鼠另外一半大脑先用 4℃ 生理盐水清洗两遍,迅速放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后,制做脑组织石蜡切片。每只鼠做两张切片,免疫组化采用 SABC 法,DAB 显色,最后用苏木素进行核复染。每组取一张切片作为阴性对照(一抗用 PBS 代替)。数据分析时,每张切片按海马和皮层相同部位选取 5 个视野,结果用 MIAS 医学图像分析管理系统 4.0 进行处理,分析平均吸光度和积分吸光度。

2.5 数据统计:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA) Dunnet s 检验两两比较。

3 结果

3.1 Morris 水迷宫试验:结果显示,随着训练次数的增加,各组小鼠找到平台的潜伏期逐渐缩短,结果

见表 1。与对照组相比,模型组小鼠找到平台潜伏期显著延长。广藿香醇(80、40 mg/kg)组与模型组比较明显缩短潜伏期,以高剂量组效果较为显著($P < 0.001$)。

表 1 广藿香醇对东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠 Morris 水迷宫潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of patchouli alcohol on latency in Morris Water-maze test for scopolamine-induced learning and memory impairment of mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	潜伏期/s			
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
对照	-	50.77 ± 20.66	38.03 ± 9.12	16.21 ± 10.32	12.87 ± 5.15
模型	-	87.90 ± 27.97 [*]	79.44 ± 16.79 [*]	71.66 ± 27.97 ^{***}	54.92 ± 18.84 ^{***}
广藿香醇	80	83.73 ± 18.04	53.71 ± 16.24	36.10 ± 13.14 ^{##}	32.63 ± 9.77 ^{##}
	40	86.67 ± 23.75	65.87 ± 12.93	53.27 ± 15.05 [#]	49.15 ± 12.39 [#]
	20	85.14 ± 19.08	77.01 ± 9.05	65.37 ± 16.76	57.04 ± 10.55

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group

3.2 生化指标测定结果:与对照组相比,模型组脑组织 AchE 活性显著升高,与模型组相比,广藿香醇(80、40 mg/kg)组 AchE 活性显著下降。与对照组相比,模型组血清 BuchE 活性显著升高,广藿香醇各剂量组 BuchE 活性与模型组比较无显著差异。与对照组相比,模型组脑组织 Chat 活性比对照组显著下降,广藿香醇(80、40 mg/kg)组脑组织 Chat 活性比模型组有显著升高。结果见表 2。

表 2 广藿香醇对东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠血清 BuchE 活性及脑组织 AchE 和 Chat 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of patchouli alcohol on BuchE activity in serum and activities of AchE and Chat in brain tissue in scopolamine-induced learning and memory impairment of mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	AchE/	BuchE/	Chat/
		(U·mg ⁻¹)	(U·mg ⁻¹)	(U·mg ⁻¹)
对照	-	0.63 ± 0.12	6.73 ± 0.58	327.74 ± 91.94
模型	-	1.00 ± 0.19 [*]	8.86 ± 0.95 [*]	101.49 ± 19.57 [*]
广藿香醇	80	0.71 ± 0.04 [#]	7.95 ± 1.31	229.21 ± 4.64 ^{##}
	40	0.82 ± 0.14 [#]	8.13 ± 0.85	193.77 ± 15.78 [#]
	20	0.92 ± 0.28	8.29 ± 1.62	114.72 ± 12.25

与对照组比较: * $P < 0.05$

与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

* $P < 0.05$ vs control group

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group

3.3 脑组织 M₁ 受体免疫组化结果:平均吸光度结果显示,与对照组相比,模型组平均吸光度值显著下降,说明细胞染色程度下降,M₁ 受体水平降低,而广

藿香醇组平均吸光度值均比模型组有所提高,说明药物可使 M₁ 受体水平提高。积分吸光度结果亦显示模型组比对照组显著降低,而广藿香醇组比模型组显著升高,说明药物组阳性细胞染色水平的整体水平升高,即抗原总量水平升高,结果见表 3。

表 3 广藿香醇对东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠脑 M₁ 受体水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 12)

Table 3 Effect of patchouli alcohol on M₁ receptor value in brain of scopolamine-induced learning and memory impairment of mice ($\bar{x} \pm s$, n = 12)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	平均吸光度	积分吸光度
对照	-	0.21 ± 0.04	1 077.70 ± 612.46
模型	-	0.15 ± 0.04 ^{***}	261.24 ± 103.28 ^{***}
广藿香醇	80	0.18 ± 0.05 [#]	858.88 ± 165.84 ^{###}
	40	0.17 ± 0.03 [#]	673.44 ± 171.66 ^{###}
	20	0.16 ± 0.02	986.53 ± 201.98

与对照组比较: ^{***} P < 0.001

与模型组比较: [#] P < 0.05 ^{##} P < 0.01 ^{###} P < 0.001

^{***} P < 0.001 vs control group

[#] P < 0.05 ^{##} P < 0.01 ^{###} P < 0.001 vs model group

4 讨论

AD 是一种中枢神经系统原发性退行性疾病,患者智力、记忆力及认知功能进行性降低,最终丧失思考、说话及活动能力。由于直接对人体进行抗 AD 的研究目前尚有许多限制,模拟 AD 的动物痴呆模型对于 AD 治疗药物的筛选和发病机制的探讨至关重要。东莨菪碱通过阻断脑内 M 受体干扰记忆和认知功能,现已广泛用于动物实验中建立动物认知功能损伤的 AD 模型,以验证药物的作用。本研究利用每日 ip 1.5 mg/kg 的东莨菪碱造成长时小鼠学习记忆障碍^[5]。

本实验结果表明,广藿香醇能够在一定范围内改善东莨菪碱模型小鼠的空间学习记忆能力,抑制模型小鼠脑内 AchE 活性而增强 Chat 活性,同时显著上调 M₁ 受体水平。已有研究表明,雌激素能够显著抑制 AchE 活性而提高 Chat 活力^[6],所以推测广藿香醇的作用可能与其 ER 激动剂的性质有关。并且研究发现,广藿香醇在显著抑制脑 AchE 活性的同时对血清 BuchE 并无显著抑制作用,这提示其对外周的胆碱能系统影响较小,从而有可能减小或避免以往低选择性胆碱酯酶抑制剂所带来的外

周胆碱样反应的副作用。然而,除东莨菪碱致小鼠记忆损伤模型外,广藿香醇的作用需进一步在其他 AD 动物模型上进一步考察,如 APP 转基因模型等。并且,广藿香醇作用确切机制以及最终信号通路尚待进一步探讨。

越来越多的实验证实雌激素及植物雌激素具有神经保护作用,能够改善动物的学习记忆和认知功能^[7]。本实验中所采用的广藿香醇是从传统中药广藿香中提取得到的,在前期进行体外 ER 激动剂活性筛选时,发现广藿香醇具有显著的选择性 ER 激动活性。鉴于雌激素在多靶向影响 AD 发生发展有着良好的潜在活性,以及 ER 主要与情绪调节和认知有关,而 ER 与生殖的关系更为密切的理论^[8],本研究室进行了此类化合物一系列的体内外研究并且获得了一些有意义的结果。提示通过筛选 ER 选择性激动剂来获得一些高效低毒的抗 AD 先导化合物有可能是一条行之有效的途径。

参考文献:

- [1] Ichikawa K, Kinoshita T, Sankawa U. The screening of Chinese crude drugs for Ca²⁺ antagonist activity; identification of active principles from the aerial part of *Pogostemon cablin* and the fruits of *Prunus mume* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(2): 345-348.
- [2] 黄晓舞, 白林, 徐风华, 等. 广藿香醇对 α -淀粉样蛋白神经毒性的抑制作用 [J]. *解放军药学报*, 2008, 24(4): 338-340.
- [3] Brann D W, Dhandapani K, Wakake C, et al. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications [J]. *Steroids*, 2007, 72(5): 381-405.
- [4] 陈立敏, 吕秋军, Satoshi I, 等. 基于报告基因的雌激素受体亚型激动剂细胞筛选模型的建立 [J]. *药理学学报*, 2006, 41: 721-726.
- [5] Bejar C, Wang R H, Weinstock M. Effect of rivastigmine on scopolamine-induced memory impairment in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, 383(3): 231-240.
- [6] 贾晓静, 张昱, 张葳, 等. 去卵巢大鼠胆碱能神经系统改变及雌激素保护作用机制的研究 [J]. *中国循证医学杂志*, 2005, 22(5): 410-412.
- [7] Zheng H, Xu H, Uljon S N, et al. Modulation of A (beta) peptides by estrogen in mouse models [J]. *J Neurochem*, 2002, 80: 191-196.
- [8] Gustafsson J A. What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signaling [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24: 479-485.