

金思维对东莨菪碱致记忆障碍小鼠脑胆碱能系统的影响

董云芳¹, 冯慧利¹, 陈芳¹, 盛宁¹, 任映¹, 杨金铎¹, 时晶², 田金洲², 王蓬文^{1,2,*}

(1. 北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部和北京市重点实验室, 北京 100700; 2. 北京中医药大学神经变性病研究所, 北京 100700)

【摘要】 目的 通过建立东莨菪碱记忆障碍模型, 采用中药复方金思维进行干预, 观察金思维对东莨菪碱致记忆障碍模型小鼠行为学和胆碱能系统的影响, 探讨该药的神经保护作用机制。**方法** 将 ICR 小鼠随机分为正常对照组; 模型组, 溶媒 0.5% CMC; 阳性对照组, 多奈哌齐, 0.92 mg/(kg·d); 金思维大、中、小剂量组, 20、10、5 mg/(kg·d)。每组 18 只, 按 0.1 mL/10 g 小鼠体重连续灌胃给药 30 d。末次给药后造模, 对照组腹腔注射生理盐水, 其余各组腹腔注射东莨菪碱 3 mg/(kg·d), 溶于 0.9% 生理盐水, 按 0.1 mL/10 g 小鼠体重注射, 进行 Morris 水迷宫实验。实验结束后取皮层和海马组织, 分别测定皮层和海马中乙酰胆碱 (Ach) 含量、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 及胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 活性。**结果** 金思维可使模型小鼠游泳距离和游泳时间缩短及目标象限停留时间增长; 金思维可使模型组小鼠脑内 Ach 含量升高、AChE 活性下降和 ChAT 活性升高。**结论** 金思维可以改善东莨菪碱导致的记忆障碍模型小鼠学习记忆能力, 其机制可能与胆碱能系统有关。

【关键词】 金思维; 阿尔茨海默病; 乙酰胆碱; 乙酰胆碱酯酶; 胆碱乙酰转移酶; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 01-0107-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.01.017

Effect of herbal formula GAPT on cholinergic system in mice with scopolamine-induced memory impairment

DONG Yunfang¹, FENG Huili¹, CHEN Fang¹, SHENG Ning¹, REN Ying¹, YANG Jingduo¹, SHI Jing²,
TIAN Jinzhou², WANG Pengwen^{1,2,*}

(1. Key Laboratory of Chinese Internal Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Ministry of Education, Beijing 100700, China; 2. Institute of Neurodegenerative Diseases, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700)

Corresponding author: WANG Peng-wen. E-mail: pw_wang@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of a Chinese medicine formula GAPT, a combination containing Chinese herbs ginseng, *Acorus tatarinowii*, *Polygala* and tuber curcuma, on the behavior and cholinergic system in mice with scopolamine-induced memory impairment, and to explore the neuroprotective mechanism of GAPT. **Methods** ICR mice were randomly divided into normal control group (solution of 0.5% carboxy methyl cellulose, CMC), model group (0.5% CMC), positive control group (donepezil, 0.92 mg/(kg·d)), GAPT high, medium and low dose groups (20 mg/(kg·d), 10 mg/(kg·d), 5 mg/(kg·d)), 18 mice in each group, were given intragastric gavage once a day for 30 days. After the last administration, the control group and model group received intraperitoneal injection of normal saline,

【基金项目】 北京中医药大学在读研究生项目 (No. 2016-JYB-XS142); 北京市教育委员会科学研究与研究生培养共建项目 (No. 2016, 2017); 国家自然科学基金面上资助项目 (No. 81573927)。

Funded by Graduate Program of Beijing University of Chinese Medicine (No. 2016-JYB-XS142); The Beijing Municipal Commission of Education Scientific research and Graduate Training Co-Construction Project (2016, 2017); National Natural Science Foundation of China (No. 81573927).

【作者简介】 董云芳 (1990 -) 女, 硕士研究生, 研究方向: 神经变性病的中医药防治。E-mail: dongyf1990@126.com

【通信作者】 王蓬文 (1963 -) 女, 博士, 教授, 研究方向: 神经变性病的中医药防治。E-mail: pw_wang@163.com

and the other groups intraperitoneal injection of scopolamine (3 mg/(kg·d)), dissolved in 0.9% normal saline. Morris water maze test was performed to assess the learning and memory ability. Then the mice were killed and the Ach content and AchE and ChAT activity in the cortex and hippocampus were detected. **Results** GAPT increased the swimming distance, swimming time and the residence time in target quadrant of the model mice, increased the content of Ach and the activity of ChAT, and decreased the activity of AchE in the brain of the model group. **Conclusions** GAPT can improve the learning and memory ability of mice induced by scopolamine, and its mechanism may be related to cholinergic system.

[Key words] GAPT, a Chinese medicine formula; Alzheimer's disease; acetylcholine; acetylcholinesterase; cholineacetyltransferase; mice

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种很常见的神经变性疾病,以痴呆为主要特点,病情进行性加重。目前,全世界有患者 4 700 万人,预计到 2050 年将超过 1.31 亿人^[1]。AD 的病理特征是 β -淀粉样蛋白 (beta-amyloid peptide, A β) 的沉积和神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs), 神经元缺失和神经递质功能障碍等^[2]。在临床上,短期记忆的损伤和认知功能逐渐减退是 AD 患者的首发症状之一。随着患者病情逐渐恶化,开始表现出其他症状,包括长期记忆丧失、混乱、语言障碍、睡眠-觉醒周期紊乱、情绪波动、身体功能丧失甚至死亡。AD 的发病机制非常复杂。中枢神经系统的胆碱能神经是构成学习记忆的重要生物学和解剖学基础,在 20 世纪 70 年代就发现 AD 脑内胆碱能神经元相对选择性退变,目前多数学者认为脑内胆碱能系统的损害是造成 AD 的重要原因^[3]。

中药复方金思维 (a combination of Chinese herbs ginseng, *Acorus tatarinowii*, *Polygala*, tuber *Curcuma*, and others, GAPT) 是由人参、淫羊藿、石菖蒲、肉苁蓉、远志、郁金等中药组成的,全方共奏补气益肾、化痰活血的功效,临床研究发现其可提高轻度 AD 患者的总体认知功能,而且还可以改善患者的注意力^[4],实验研究也发现金思维提取物对淀粉样前体蛋白、糖原合成酶激酶 3 β 和 CaMKII 表达水平表达有影响^[5-7],但对直接关系到早期学习记忆能力的胆碱能系统的影响尚不清楚。因此,本实验以东莨菪碱诱导建立记忆障碍模型,利用中药复方金思维进行干预,研究金思维对小鼠行为学及中枢胆碱能系统的影响,探讨金思维的神经保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

7 周龄 SPF 级 ICR 小鼠 108 只,雄性,白色,体

重 33 ~ 35 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号【SCXK(京)2012-0001】,伦理审批号:16-20。小鼠的饲养、给药与取材均在北京中医药大学东直门医院屏障环境动物室进行【SYXK(京)2015-0001】。

1.1.2 试剂和仪器

中药复方金思维 (人参、淫羊藿、石菖蒲、肉苁蓉、远志、郁金等) 由北京中医药大学东直门医院制备;盐酸多奈哌齐 (卫材 (中国) 药业有限公司,批号:140635); 氢溴酸东莨菪碱 (产品批号:S1875), 购于美国 Sigma 公司;羧甲基纤维素钠 (Carboxymethyl cellulose sodium, CMC) (批号:3405005), 购于北京精求化工有限责任公司;乙酰胆碱 (Ach) 测定试剂盒,乙酰胆碱酯酶 (AchE) 测试盒 (货号:A024),胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 测试盒 (货号:A079-1),均购于南京建成生物工程研究所;分光光度计 (上海菁华科技有限公司);Morris 水迷宫实验设备 (上海移数信息科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及给药

除每天上午定时灌胃给药以外,饲养期间动物自由摄食和饮水。通过 SPSS 20.0 统计软件产生随机数字,进行随机分组。将 108 只 ICR 小鼠随机分为正常对照组 (0.5% CMC)、模型组 (0.5% CMC)、阳性对照组 (多奈哌齐组) 按照 0.92 mg/(kg·d) 的剂量,溶于 0.5% CMC,金思维大、中、小剂量组按照 20、10、5 mg/(kg·d) 剂量,溶于 0.5% CMC,每组 18 只,按 0.1 mL/10 g 小鼠体重连续灌胃给药每天 1 次,共 30 d。

1.2.2 造模方法

在末次小鼠灌胃 1 h 后造模,对照组腹腔注射生理盐水,其余各组腹腔注射东莨菪碱 3 mg/(kg·d),溶于 0.9% 生理盐水,按 0.1 mL/10 g 小鼠体重腹腔注射。

1.2.3 Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫检测小鼠的游泳时间、游泳距离和目标象限停留时间^[8]。

1.2.4 小鼠皮层和海马中 Ach 含量、AchE 及 ChAT 活性的测定

小鼠灌胃 1 个月后,脱颈,于冰上快速剥离脑组织(除去小脑),将其用预冷生理盐水进行冲洗以除去血迹,然后用滤纸拭干进行称重,用生理盐水制成 10% 的脑组织匀浆,用低温离心机以 3000 ~ 4000 r/min 离心 10 min,取上清液。用比色法测定小鼠脑组织匀浆中乙酰胆碱(Ach)含量、乙酰胆碱酯酶(AchE)及胆碱乙酰转移酶(ChAT)的活性。(具体实验步骤按照测试盒说明书进行)。

1.3 统计学分析

数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计分析,游泳距离和游泳时间用非参数检验 Kruskal-Wallis Test,组间比较用 Mann-Whitney test。目标象限停留时间及皮层和海马中 Ach 含量、AchE 和 ChAT 活性测定用单因素方差分析(One-Way ANOVA),两两比较用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 金思维对东莨菪碱致记忆障碍模型小鼠游泳距离的影响

从 Morris 水迷宫实验的整体结果来看,从第 1 天到第 5 天,小鼠的游泳距离虽有波动,但均呈减少趋势。模型组小鼠游泳距离与正常组相比,第 1 天

至第 5 天差异均有显著性($P < 0.01$);第 1 天仅金思维大剂量组与模型组差异有显著性($P < 0.05$);第 2 天金思维大剂量组及中剂量组与模型组差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);从第 3 天开始各干预组游泳距离均明显减少,各干预组与模型组比差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(表 1)。

2.2 Morris 水迷宫实验测试各组小鼠的游泳时间

从第 1 天到第 5 天的整体结果来看,各组小鼠的游泳时间呈减少的趋势。模型组小鼠游泳时间与正常组相比,第 1 天至第 5 天差异均有显著性($P < 0.01$)。第 1 天仅金思维中剂量组的游泳时间与模型组差异有显著性($P < 0.05$);第 2 天各干预组与模型组相比差异无显著性($P > 0.05$);第 3、4、5 天各干预组与模型组相比差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(表 2)。

2.3 Morris 水迷宫实验测试各组小鼠目标象限停留时间

在第 6 天 Morris 水迷宫空间探索实验中,模型组目标象限停留时间与正常组相比,差异有显著性($P < 0.01$)。各干预组与模型组比差异有显著性($P < 0.01$),各干预组在目标象限的停留时间明显增长(表 3)。

2.4 海马和皮层 Ach 含量

从皮层 Ach 含量的生化检测结果来看,模型组与正常组相比含量降低,两者有差异($P < 0.05$);金思维中剂量和小剂量组与模型组比,Ach 含量增加,两者差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);多奈哌齐组和金思维大剂量组与模型组相比差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1 金思维对东莨菪碱致记忆障碍模型小鼠游泳距离的影响($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Tab.1 Effects of GAPT on swimming distance of the mice with scopolamine-induced memory impairment($\bar{x} \pm s, n = 18$)

分组 Groups	第 1 天(cm) Day 1	第 2 天(cm) Day 2	第 3 天(cm) Day 3	第 4 天(cm) Day 4	第 5 天(cm) Day 5
正常组 Normal group	2258.25 ± 528.45	1493.1 ± 600.6	1257.29 ± 540.81	974.66 ± 571.62	892.71 ± 546.99
模型组 Model group	2776.61 ± 215.89**	2817.61 ± 442.2**	2789.84 ± 720.04**	2485.98 ± 883.8**	2492.34 ± 889.94**
多奈哌齐组 Donepezil group	2644.15 ± 588.52	2583.53 ± 492.8	2210.83 ± 1018.6 [△]	1667.98 ± 938.82 [△]	1702.19 ± 902.4 [△]
金思维大剂量组 GAPT high dose group	2556.52 ± 349.54 [△]	2317.67 ± 719.25 ^{△△}	2209.17 ± 663.95 [△]	1605.67 ± 836.43 ^{△△}	1738.6 ± 549.87 ^{△△}
金思维中剂量组 GAPT medium dose group	2618.3 ± 440.51	2464.42 ± 499.19 [△]	2152.62 ± 839.89 [△]	1703.98 ± 816.47 ^{△△}	1641.98 ± 935.49 ^{△△}
金思维小剂量组 GAPT low dose group	2599.1 ± 476.18	2463.21 ± 722.86	1947.5 ± 927.35 ^{△△}	1932.31 ± 890.5 [△]	1769.56 ± 906.34 [△]
X ²	13.614	35.797	27.475	23.460	27.727
P	0.018	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与正常组相比,** $P < 0.01$, * $P < 0.05$;与模型组相比,^{△△} $P < 0.01$,[△] $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; compared with the model group, ^{△△} $P < 0.01$, [△] $P < 0.05$.

表 2 金思维对东莨菪碱致记忆障碍模型小鼠游泳时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Tab. 2 Effects of GAPT on swimming time of the mice with scopolamine-induced memory impairment($\bar{x} \pm s, n = 18$)					
分组 Groups	第 1 天 (s) Day 1	第 2 天 (s) Day 2	第 3 天 (s) Day 3	第 4 天 (s) Day 4	第 5 天 (s) Day 5
正常组 Normal group	103. 31 $\pm$ 24. 18	73. 4 $\pm$ 33. 98	59. 89 $\pm$ 28. 44	47. 9 $\pm$ 28. 49	48. 85 $\pm$ 35. 74
模型组 Model group	118. 65 $\pm$ 5. 73 **	110. 43 $\pm$ 17. 04 **	98. 61 $\pm$ 28. 63 **	92. 13 $\pm$ 30. 89 **	91. 99 $\pm$ 21. 64 **
多奈哌齐组 Donepezil group	112. 6 $\pm$ 19. 57	106. 51 $\pm$ 24. 06	77. 59 $\pm$ 35. 13 Δ	61. 13 $\pm$ 34. 3 Δ	61. 26 $\pm$ 34. 02 $\Delta\Delta$
金思维大剂量组 GAPT high dose group	113. 06 $\pm$ 14. 52	105. 06 $\pm$ 29. 17	82. 68 $\pm$ 28. 05 Δ	62. 93 $\pm$ 35. 34 Δ	61. 66 $\pm$ 24. 54 $\Delta\Delta$
金思维中剂量组 GAPT midium dose group	109. 65 $\pm$ 15. 26 Δ	100. 06 $\pm$ 22. 19	77. 24 $\pm$ 34. 01 Δ	65. 48 $\pm$ 31. 39 Δ	65. 51 $\pm$ 32. 07 Δ
金思维小剂量组 GAPT low dose group	110. 08 $\pm$ 16. 81	99. 22 $\pm$ 30. 23	68. 31 $\pm$ 34. 48 $\Delta\Delta$	70. 82 $\pm$ 34. 62 Δ	67 $\pm$ 37. 82 Δ
X ²	7. 942	15. 823	16. 508	15. 865	23. 820
P	0. 159	0. 007	0. 006	0. 007	0. 000

注:与正常组相比, ** $P < 0. 01$, * $P < 0. 05$;与模型组相比, $\Delta\Delta P < 0. 01$, $\Delta P < 0. 05$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P < 0. 01$, * $P < 0. 05$; compared with the model group, $\Delta\Delta P < 0. 01$, $\Delta P < 0. 05$.

表 3 金思维对东莨菪碱致记忆障碍模型小鼠
目标象限停留时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 18$)
Tab. 3 Effects of GAPT on retention time in ttarget quadrant
of the mice with scopolamine-induced memory
impairment($\bar{x} \pm s, n = 18$)

组别 Groups	目标象限停留时 (s) Retention time in target quadrant
正常组 Normal group	33. 03 $\pm$ 6. 70
模型组 Model group	22. 87 $\pm$ 6. 67 **
多奈哌齐组 Donepezil group	29. 67 $\pm$ 6. 95 $\Delta\Delta$
金思维大剂量组 GAPT high dose group	29. 94 $\pm$ 5. 97 $\Delta\Delta$
金思维中剂量组 GAPT medium dose group	30. 32 $\pm$ 5. 26 $\Delta\Delta$
金思维小剂量组 GAPT low dose group	28. 27 $\pm$ 5. 01 $\Delta\Delta$
F	5. 480
P	0. 000

注:与正常组相比, ** $P < 0. 01$, * $P < 0. 05$;与模型组相比, $\Delta\Delta P < 0. 01$, $\Delta P < 0. 05$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P < 0. 01$, * $P < 0. 05$; compared with the model group, $\Delta\Delta P < 0. 01$, $\Delta P < 0. 05$.

从海马 Ach 含量的生化检测结果来看,模型组与正常组相比含量降低,两者差异有显著性 ($P < 0. 05$);多奈哌齐组与模型组相比差异无显著性 ($P > 0. 05$);金思维大剂量和小剂量组与模型组比, Ach 含量明显增加,两者差异有显著性 ($P < 0. 01$);金思维中剂量组与模型组比, Ach 含量增加,两者差异有显著性 ($P < 0. 05$)。
同组小鼠皮层和海马中 Ach 含量比较结果发现,只有正常组皮层和海马中的 Ach 含量差异有显著性 ($P = 0. 049$),其他各组小鼠皮层和海马中 Ach 含量比较均差异无显著性 ($P > 0. 05$) (表 4)。

表 4 皮层和海马中 Ach 含量及比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 4 Comparison of the contents of Ach in the cortex and hippocampus($\bar{x} \pm s, n = 8$)			
分组 Groups	ACh 含量 ($\mu\text{g}/\text{mgprot}$) Ach content		P 值 P value
	皮层 Cortex	海马 Hippocampus	(组内海马与皮层比较) Comparison of hippocampus and cortex in the same group
正常组 Normal group	60. 24 $\pm$ 13. 71	47. 11 $\pm$ 10. 43	0. 049
模型组 Model group	40. 94 $\pm$ 8. 17 *	29. 94 $\pm$ 14. 13 *	0. 077
多奈哌齐组 Donepezil group	53. 82 $\pm$ 18. 04	41. 52 $\pm$ 10. 87	0. 121
金思维大剂量组 GAPT high dose group	51. 49 $\pm$ 15. 59	52. 60 $\pm$ 16. 55 $\Delta\Delta$	0. 892
金思维中剂量组 GAPT medium dose group	65. 25 $\pm$ 16. 39 $\Delta\Delta$	49. 61 $\pm$ 16. 35 Δ	0. 077
金思维小剂量组 GAPT low dose group	57. 82 $\pm$ 16. 20 Δ	73. 95 $\pm$ 25. 47 $\Delta\Delta$	0. 153
F	2. 494	6. 287	
P	0. 046	0. 000	

注:与正常组相比, ** $P < 0. 01$, * $P < 0. 05$;与模型组相比, $\Delta\Delta P < 0. 01$, $\Delta P < 0. 05$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P < 0. 01$, * $P < 0. 05$; compared with the model group, $\Delta\Delta P < 0. 01$, $\Delta P < 0. 05$.

2. 5 海马和皮层 AchE 活性

从皮层 AchE 活性的生化检测结果来看,模型组与正常组相比活性增加,两者差异有显著性 ($P < 0. 01$);多奈哌齐组、金思维大剂量和中剂量组与模型组比 AchE 活性降低,差异有显著性 ($P < 0. 05$);

金思维小剂量组与模型组比 AchE 活性降低明显,两者间差异有显著性 ($P < 0. 01$)。
从海马 AchE 活性的生化检测结果来看,模型组与正常组相比活性增加,两者差异有显著性 ($P < 0. 01$);多奈哌齐组、金思维大剂量和中剂量组与模型

组比 AchE 活性降低明显,差异有显著性($P < 0.01$)。

同组小鼠皮层和海马中 AchE 活性比较结果发现,正常组皮层和海马间、金思维小剂量组皮层和海马间 AchE 活性差异无显著性($P > 0.05$);模型组、多奈哌齐组、金思维大、中剂量组皮层和海马中 AchE 活性差异有显著性($P < 0.01$),且皮层中 AchE 活性高于海马中 AchE 活性。(见表 5)

2.6 海马和皮层 ChAT 活性

从皮层 ChAT 活性的生化检测结果来看,模型组小鼠 ChAT 活性低于正常组,两者有差异($P < 0.05$);各干预组皮层 ChAT 活性与模型组比差异无

显著性($P > 0.05$)。

从海马 ChAT 活性的生化检测结果来看,模型组小鼠 ChAT 活性明显低于正常组,两者差异有显著性($P < 0.01$);多奈哌齐组、金思维大、小剂量组与模型组比 ChAT 活性增加,差异有显著性($P < 0.05$);金思维中剂量组与模型组比 ChAT 活性差异有显著性($P < 0.01$)。

同组小鼠皮层和海马中 ChAT 活性比较结果发现,仅金思维大剂量组皮层和海马中 ChAT 活性有差异($P < 0.05$),且海马中 ChAT 活性高于皮层中 ChAT 活性。(表 6)

表 5 皮层和海马中 AchE 活性及比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 5 Comparison of the AchE activity in the cortex and hippocampus($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组 Groups	AChE 活性 (U/mgprot) AChE activity		P 值 P value (组内海马与皮层比较) Comparison of hippocampus and cortex in the same group
	皮层 Cortex	海马 Hippocampus	
正常组 Normal group	0.58 ± 0.14	0.47 ± 0.09	0.066
模型组 Model group	0.91 ± 0.08 **	0.63 ± 0.15 **	0.000
多奈哌齐组 Donepezil group	0.73 ± 0.14 Δ	0.43 ± 0.10 $\Delta\Delta$	0.000
金思维大剂量组 GAPT high dose group	0.72 ± 0.17 Δ	0.45 ± 0.13 $\Delta\Delta$	0.003
金思维中剂量组 GAPT medium dose group	0.73 ± 0.12 Δ	0.35 ± 0.08 $\Delta\Delta$	0.000
金思维小剂量组 GAPT low dose group	0.64 ± 0.22 $\Delta\Delta$	0.60 ± 0.11	0.571
F	4.255	7.322	
P	0.003	0.000	

注:与正常组相比,** $P < 0.01$, * $P < 0.05$;与模型组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; compared with the model group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$.

表 6 皮层和海马中 ChAT 活性及比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 6 Comparison of the activity of ChAT in the cortex and hippocampus($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组 Groups	ChAT 活力 (U/g 组织湿重) ChAT activity		P 值 P value (组内海马与皮层比较) Comparison of hippocampus and cortex in the same group
	皮层 Cortex	海马 Hippocampus	
正常组 Normal group	69.92 ± 19.1	66.29 ± 11.81	0.654
模型组 Model group	50.08 ± 17.33 *	42.77 ± 11.53 **	0.337
多奈哌齐组 Donepezil group	61.40 ± 14.52	57.05 ± 8.94 Δ	0.482
金思维大剂量组 GAPT high dose group	44.47 ± 6.03	58.68 ± 14.35 Δ	0.022
金思维中剂量组 GAPT medium dose group	51.33 ± 16.2	61.14 ± 15.36 $\Delta\Delta$	0.234
金思维小剂量组 GAPT low dose group	52.27 ± 14.11	55.30 ± 8.94 Δ	0.616
F	2.933	3.422	
P	0.023	0.011	

注:与正常组相比,** $P < 0.01$, * $P < 0.05$;与模型组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$; compared with the model group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$.

3 讨论

在中枢神经系统中,胆碱能神经元分布广泛,它们主要存在于脊髓、后脑、内侧缰核、中脑区、基底前脑、纹状体和嗅结节等,几乎所有的脑区都受胆碱能神经元支配,所以胆碱能系统参与学习、记忆、应激反应、清醒和睡眠等重要的生理过程^[9]。乙酰胆

碱(acetylcholine, Ach)是所有胆碱能神经元使用的神经递质,其在外周和中枢神经系统中具有非常重要的作用。主要功能是维持意识的清醒,促进学习和记忆的改善^[10]。Ach 是在胆碱乙酰转移酶(cholineacetyltransferase, ChAT)的催化作用下由胆碱乙酰辅酶 A 和胆碱合成的,Ach 的分解靠乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE)完成,ChAT 和 AchE

共同维持 Ach 的稳态^[11]。因此 Ach 是已知的与学习记忆关系最密切的中枢神经递质。ChAT 在 Ach 的合成中具有重要的功能,其是分子量约为 69×10^3 的蛋白酶,主要位于胆碱能神经末梢的细胞质中^[12]。AchE 主要在脑和肌肉中表达。存在于脑中的 AchE 主要位于胆碱能系统中,是降解 Ach 的关键酶^[13]。当胆碱能神经元被去极化时,Ach 从突触小泡胞吐并释放到突触间隙中,在突触间隙中它可以活化 mAChR 和 nAChR。存在于突触间隙的 Ach 被 AchE 快速降解,释放出胆碱和乙酸^[14],每个分子的 AchE 可以每秒水解 5000 分子的 Ach,这使得 AchE 成为已知的最有效的酶之一^[15]。

AD 在胆碱能系统中的特征为在基底脑、海马神经元和大脑皮层中 Ach 含量不足、ChAT 活性的降低和 AchE 活性的增加。早期研究发现严重痴呆患者皮质中 ChAT 活性明显降低,减少胆碱的吸收、Ach 的释放和基底前脑胆碱能神经元的损失,证明 AD 患者皮层和海马突触前胆碱能缺陷。这些观察结果表明 ChAT 可能对学习和记忆发挥重要的促进作用。因此,ChAT 活性下降可能在 AD 中扮演一个重要角色^[16-17]。此外,AchE 负责破坏脑中的 Ach 而导致记忆丧失和认知缺陷,因此 AchE 活性的增加也在 AD 的进展中扮演重要角色。直到现在 AchEI 也是治疗轻、中度 AD 的主要药物^[18]。本实验中分别针对皮层和海马中 Ach 含量 AchE 和 ChAT 的活性进行了生化检测,这三者在胆碱能系统中对学习记忆发挥着重要的作用。因为 Ach 是维持意识清醒和促进学习记忆的重要神经递质,AchE 和 ChAT 是 Ach 的水解酶和合成酶,共同调节 Ach 的代谢平衡,二者的活性代表了胆碱能神经功能的状态。金思维的重要组成药物之一人参具有补脾益肺、安神益智的功效,人参皂苷是人参的有效活性成分,研究发现人参皂苷能使 Ach 的摄取和释放增加,也有实验证明人参皂苷可降低东莨菪碱所致的记忆障碍模型小鼠 AchE 的活性^[19]。淫羊藿是补益类中药,黄酮类化合物、多糖、木脂素等为其主要化学成分。目前已证明淫羊藿苷可通过增加 ChAT 的活性,使 Ach 的合成增加改善学习记忆^[20]。远志有安神益智、祛痰作用,研究证实远志对 AD 模型大鼠胆碱能系统损害有一定的保护作用^[21]。

从本次实验结果来看,金思维可以使东莨菪碱导致的记忆障碍模型小鼠皮层和海马中 Ach 含量的增多、ChAT 活性的增加和 AchE 活性的降低。所

以金思维是通过减少 AchE 的活性使 Ach 的水解减少,通过增加 ChAT 的活性使 Ach 的合成增多达到改善胆碱能神经功能的目的。正是因为金思维中含有多种中药,很多研究也已表明多种中药中的有效成分都对胆碱能系统有影响,这也说明了金思维对胆碱能系统是通过多靶点、多位点、多途径来发挥神经保护作用,进一步改善小鼠的学习记忆能力。Morris 水迷宫实验包括定位航行实验和空间探索实验,是检测小鼠学习记忆能力最经典的行为学实验之一^[22],本实验中金思维可以使东莨菪碱致记忆障碍模型小鼠的游泳距离和游泳时间变短,目标象限停留时间增长,也说明了模型小鼠的学习记忆能力有所改善。该模型从 Ach 结果来看对海马和皮层都有影响,没有差异,而 AchE 对海马影响更大。因此,金思维对模型减低的 Ach、ChAT 和升高 AchE 的海马和皮层的作用也不尽相同。AD 疾病中海马 Ach、AchE、ChAT 这三种物质的作用更为重要,本次试验中结果金思维大剂量组皮层 Ach 含量没有显著增多,金思维小剂量组海马 AchE 活性没有显著降低,金思维大、中、小剂量组皮层 ChAT 活性没有显著增加,药物没有显著的剂量依赖性,仍需以后的实验中进一步探索。

参 考 文 献 (References)

- [1] Prince M. World Alzheimer Report 2016 [M]. London: Alzheimer's Disease International, 2016.
- [2] Garin D, Virgone-Carlotta A, Gözel B, et al. COB231 targets amyloid plaques in post-mortem human brain tissue and in an Alzheimer mouse model [J]. J Neurochem, 2015, 132 (5): 609-618.
- [3] Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, et al. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system [J]. Curr Neuroparmacol, 2016, 14 (1): 101-115.
- [4] 苗迎春, 田金洲, 时晶, 等. 轻度认知损害的中医药学相关认识和研究进展 [J]. 健康必读, 2012, 11 (10): 33. Miao YC, Tian JZ, Shi J, et al. Knowledge of Chinese medicine and research progress of mild cognitive impairment [J]. Health Must-read, 2012, 11 (10): 33.
- [5] Shi J, Zhang X, Yin L, et al. Herbal formula GAPPT prevents beta amyloid deposition induced Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II and Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein phosphatase 2B imbalance in APPV717I mice [J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16: 159.
- [6] 周冰凌, 时晶, 韩德军, 等. 金思维提取物对 APPswe/PS1dE9 转基因小鼠海马淀粉样前体蛋白表达水平的影响 [J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17 (3): 14-17. Zhou BL, Shi J, Han DJ, et al. Influences of GAPPT on expressions of amyloid precursor protein in APPswe/PS1dE9 double

- transgenic mice [J]. J Hubei Univ Chin Med, 2015, 17(3): 14–17.
- [7] Shi J, Tian J, Zhang X, et al. A combination extract of Renshen (Panax Ginseng), Yinyanghuo (Herba Epimedii Brevicornus), Yuanzhi (Radix Palygalae) and Jiang-huang (Rhizoma curcuma Longae) decreases glycogen synthase kinase 3 β expression in brain cortex of APPV7171 transgenic mice [J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(2): 211–217.
- [8] 樊惠, 魏鹏, 陈晓培, 等. 姜黄素对 9 月龄 APP^{swe}/PS1^{dE9} 双转基因小鼠行为学的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(6): 33–37.
- Fan H, Wei P, Chen XP, et al. Effect of curcumin on the ethology of APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(6): 33–37.
- [9] Woolf NJ, Butcher LL. Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness [J]. Behav Brain Res, 2011, 221(2): 488–498.
- [10] Bartus RT, Dean RL, Beer B, et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction [J]. Science, 1982, 217(4558): 408–414.
- [11] 武宏伟, 王克柱, 冯利, 等. 人参皂苷水解产物 DS-1227 改善东莨菪碱致小鼠的学习记忆障碍 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(4): 27–31.
- Wu HW, Wang KZ, Feng L, et al. Improving effect of the ginsenoside hydrolysis product DS-1227 on scopolamine-induced learning and memory impairment in mice [J]. Chin J Comp Med, 2015, 25(4): 27–31.
- [12] Rylett RJ. Synaptosomal “membrane-bound” choline acetyltransferase is most sensitive to inhibition by choline mustard [J]. J Neurochem, 1989, 52(3): 869–875.
- [13] Seidman S, Sternfeld M, Ben Aziz-Aloya R, et al. Synaptic and epidermal accumulations of human acetylcholinesterase are encoded by alternative 3'-terminalexons [J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(6): 2993–3002.
- [14] Macdonald IR, Reid GA, Pottier IR, et al. Synthesis and preliminary evaluation of phenyl 4-123I-iodophenylcarbamate for visualization of cholinesterases associated with Alzheimer disease pathology [J]. J Nucl Med, 2016, 57(2): 297–302.
- [15] Potter PE, Hadjicostantinou M, Meek JL, et al. Measurement of acetylcholine turnover rate in brain: an adjunct to a simple HPLC method for choline and acetylcholine [J]. J Neurochem, 1984, 43(1): 288–290.
- [16] Buccafusco JJ, Beach JW, Terry AV Jr. Desensitization of nicotinic acetylcholine receptors as a strategy for drug development [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 328(2): 364–370.
- [17] Kwon YK, Choi SJ, Kim CR, et al. Effect of Chaenomeles sinensis extract on choline acetyltransferase activity and trimethyltin-induced learning and memory impairment in mice [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2015, 63(12): 1076–1080.
- [18] Hou XQ, Wu DW, Zhang CX, et al. Bushen-Yizhi formula ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative stress related neuronal apoptosis in scopolamine-induced senescence in mice [J]. Int J Mol Med, 2014, 34(2): 429–439.
- [19] 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): 1399–1400.
- Jiang HL, Yang Z, Meng Q, et al. Improvement and mechanism of ginsenoside Re on learning and memory deficits of mice [J]. Chin Pharmacol Bull, 2008, 24(10): 1399–1400.
- [20] 高琳娜, 唐千淇, 贺晓丽, 等. 淫羊藿苷对快速老化小鼠 SAMP10 学习记忆能力以及胆碱能系统活性的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14): 2117–2121.
- Gao LN, Tang QQ, He XL, et al. Effect of icariin on learning and memory abilities and activity of cholinergic system of senescence-accelerated mice SAMP10 [J]. China J Chin Mat Med, 2012, 37(14): 2117–2121.
- [21] 王永艳, 蔡晓艳, 刘彦刚, 等. 卵叶远志的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(8): 35–39.
- Wang YY, Cai XY, Liu YG, et al. Research progress of Polygala sibirica L [J]. China Med Herald, 2016, 13(8): 35–39.
- [22] Pereira IT, Burwell RD. Using the spatial learning index to evaluate performance on the water maze [J]. Behav Neurosci. 2015, 129(4): 533–539.

[收稿日期] 2017-05-23