

五味子醇提部位对反复脑缺血再灌注致记忆障碍模型小鼠学习记忆的影响

苗明三, 张广伟, 马霄 (河南中医学院, 郑州 450008)

摘要: 目的 探讨五味子醇提部位对反复脑缺血再灌注致记忆障碍模型小鼠学习记忆的影响。方法 将动物随机分成 6 组, 分别灌服尼莫地平片混悬液、银杏叶混悬液及大、小剂量五味子醇提部位混悬液, 假手术组 (空白组) 和模型组给予同体积生理盐水, 1 次·d⁻¹, 连续给药 15 d, 采用双侧颈总动脉夹闭, 建立反复脑缺血再灌注致小鼠学习记忆障碍模型。术后 48 h 进行行为学检测。跳台法: 将小鼠放入跳台仪的小盒内进行训练, 24 h 后重新测试小鼠记忆情况, 观察并记录小鼠首次从跳台上跳下的潜伏期及 5 min 内错误次数; 避暗法: 将小鼠尾部对着进入暗室的小口放入测定盒中, 进行训练, 24 h 后重新测定小鼠记忆情况, 观察并记录小鼠首次进入暗室的潜伏期及 5 min 内进入暗室遭电击的次数。结果 跳台法: 大剂量五味子醇提部位组显著延长造模后小鼠触电潜伏期, 明显减少测试期小鼠跳台错误反应次数; 避暗法: 大剂量五味子醇提部位组明显延长造模后小鼠潜伏期, 明显减少测试期小鼠错误反应次数。结论 五味子醇提部位对反复脑缺血再灌注致记忆障碍模型小鼠学习记忆具有一定改善作用。

关键词: 五味子醇提部位; 反复脑缺血再灌注; 记忆障碍; 学习记忆

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693 (2009) 05-0353-04

Effect of Schisandra Chinensis Baill Distilled by Ethanol on the Ability of Learning and Memory in Memory Impairment Mice Model Induced by Repeated Cerebral Ischemia-reperfusion

MIAO Mingsan, ZHANG Guangwei, MA Xiao (*Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of Schisandra Chinensis Baill distilled by ethanol on the ability of learning and memory in memory impairment mice model induced by repeated cerebral ischdmia-reperfusion. **METHOD** The mice were randomly divided into six groups, respectively irrigating the groups with Nimodipine suspension, ginkgo leaf tablet suspension, large and small doses of Schisandra Chinensis Baill distilled by ethanol, sham group (blank) and the model group for the same volume of saline. Once a day, 15 days for delivery. Mice model of cerebral ischemia-reperfuqion injury was established by bilateral common carotid artery blocking. 48 hours after operation, begin the experiment of behavior. Step down test: the mice were put into the apparatus of step down for discipline and the training, 24 hours later, retest the memory of the mice, register the delitescence of the set up and the times of the mistakes in 5 minutes. Evading dark test: the mice were put into the darkroom, turn on the electrical source for discipline and the training, 24 hours later, retest the memory of the mice. Register the delitescence of enter into the darkroom and the tip-and-run times. **RESULTS** Step down test: the large doses of Schisandra Chinensis Baill distilled by ethanol could notably prolong the latent phase of getting an electric shock, and could obviously decrease the error times in Step down tests; Evading dark test: the large doses of Schisandra Chinensis Baill distilled by ethanol could markedly prolong the latent phase for model mice in learning tests, and could notably decrease the error times in learning tests. **CONCLUSION** Schisandra Chinensis Baill distilled by ethanol could significantly improve on the ability of learning and memory of memory impairment mice model induced by repeated cerebral ischdmia-reperfusion.

KEY WORDS: Schisandra Chinensis Baill distilled by ethanol; repeated cerebral ischemia-reperfusion; memory impairment; learning and memory

基金项目: 河南省高等学校创新人才培养工程(2004-23)

作者简介: 苗明三, 男, 博士, 教授 Tel: (0371) 65962546 E-mail: miaomingsan@163.com

随着人口老龄化,脑血管病已成为危害人类健康的主要疾病,其中缺血性脑血管病发病率较高。而由脑缺血引起的智能障碍,尤其是学习记忆功能的减退,不仅影响患者的生活质量,也造成巨大的社会和家庭负担。因此研究对因缺血所致的学习记忆功能减退有疗效的药物,已成为医学界重要的课题之一。五味子性温味酸,归肺肾心经,具生津敛汗、涩精止泻、宁心安神之功效,临床用于心悸、失眠、多梦等疗效较好。现代研究表明,五味子在调节中枢神经、镇静、催眠、改善心脏营养性血流等方面有较好的药理作用,我们的前期研究提示,五味子多糖^[1]具有好的抗氧化作用。本文报道五味子醇提部位对反复脑缺血再灌注致记忆障碍模型小鼠学习记忆的影响。

1 材料与方法

1.1 药物试剂

五味子,购自河南省药材公司,为木兰科植物北五味子*Schisandra Chinensis* Baill的干燥成熟果实;五味子醇提部位,干燥的五味子制成粗颗粒,取1 000 g,分别以8倍量的95%乙醇回流提取2次,合并两次醇提液,挥醇,浓缩致干,得浸膏298.2 g,每克浸膏相当于生药3.34 g;尼莫地平片,山东新华制药股份有限公司生产,批号030911;银杏叶提取物片(商品名金纳多),德国威玛舒培博士药厂生产,每片含银杏叶提取物40 mg,其中银杏黄酮甙9.6 mg,萜类2.4 mg(银杏内酯、白果内酯),批号030901。

1.2 实验动物

小鼠,昆明种,♀♂各半,体重18~21 g,河南医学动物实验中心提供,豫医动管(证)字第0038号。

1.3 实验仪器

小鼠回避性条件反射箱,山东省医学科学院设备站生产;YLS-3T型跳台记录仪,山东省医学科学院设备站生产。

1.4 统计分析

数据分析采用SPSS 10.0 for windows统计软件,计量资料组间比较,采用单因素方差分析。

2 实验方法与结果

2.1 对小鼠学习记忆的影响(跳台法)^[2-5]

取昆明种小鼠60只,随机分成6组(♀♂分笼饲养),其中5组造反复脑缺血再灌注致记忆障碍模型,另设1空白组(假手术组);造模型5组分别灌服尼莫地平片混悬液(0.02 g·kg⁻¹,用0.5%CMC配成1 mg·mL⁻¹)、银杏叶片混悬液(0.04 g·kg⁻¹,用0.5%CMC配成2 mg·mL⁻¹)、大、小剂量五味子醇提部位混悬液(0.4 g·kg⁻¹、0.2 g·kg⁻¹,取浸膏用0.5%CMC配成20 mg·mL⁻¹、10 mg·mL⁻¹);假手术组和模型组给同体积生理盐水,1次·d⁻¹,连续给药15 d。于第12天给药后2 h,小鼠用水合氯醛(400 mg·kg⁻¹)麻醉后,仰位固定,行颈部切口,分离双侧颈总动脉,穿线备用。假手术组只分离双侧颈总动脉,不阻断。用一针灸针(尖端弯成勾状)勾住双侧颈总动脉提起致血流阻断,固定针灸针,10 min后松下针灸针,使血液再灌注10 min,如此反复2次。创口以碘酒消毒并敷以青霉素粉,缝合伤口。术后48 h再进行行为学检测,先将小鼠放入反射箱中适应3 min,立即接通36 V电源连续电刺激5 min,小鼠受到电击后的正常逃避反应为跳上跳台,小鼠双足同时接触铜栅为触电,视为错误反应;如此训练5 min并记录5 min内错误次数。24 h重新测验,观察小鼠记忆情况,记录小鼠首次跳下的潜伏期和5 min内错误次数。结果见表1。

表1 五味子醇提部位对反复脑缺血再灌注致记忆障碍模型小鼠学习和记忆的影响(跳台法, $\bar{x}\pm s$, n=10)

Tab 1 Effect of *Schisandra Chinensis* Baill distilled by ethanol on the ability of learning and memory in memory impairment mice model induced by repeated cerebral ischdemia-reperfusion (Step down test, $\bar{x}\pm s$, n=10)

组 别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	测试潜伏期 /s	错误反应次数/次	
			训练期	测试期
假手术组		292.45±13.50 ¹⁾	1.27±1.19 ¹⁾	0.36±0.67 ¹⁾
模型组		161.55±76.44	3.09±1.64	2.00±1.48
尼莫地平片组	0.02	250.82±52.35 ¹⁾	1.36±0.92 ¹⁾	0.55±0.52 ¹⁾
银杏叶片组	0.04	253.91±55.70 ¹⁾	1.45±1.04 ¹⁾	0.64±0.81 ¹⁾
大剂量醇提部位组	0.4	239.27±46.00 ¹⁾	1.55±1.04 ¹⁾	1.09±0.94 ²⁾
小剂量醇提部位组	0.2	169.82±53.00	2.77±1.49	1.82±0.98

注:与模型组比较,¹⁾P<0.01,²⁾P<0.05
Note: Compared with the model group, ¹⁾P<0.01, ²⁾P<0.05

从上表可看出,与假手术组比,模型组小鼠测试期触电潜伏期显著缩短 ($P<0.01$),训练期和测试期错误反应次数显著增多 ($P<0.01$),说明造记忆障碍模型成功。与模型组比,尼莫地平片组、银杏叶片组能显著延长模型小鼠触电潜伏期 ($P<0.01$),显著减少模型小鼠错误反应次数 ($P<0.01$);大剂量五味子醇提部位组能显著延长模型小鼠测试潜伏期 ($P<0.01$),明显减少测试期小鼠跳台错误反应次数 ($P<0.05$)。

2.2 对小鼠学习记忆的影响(避暗法)^[2-5]

小鼠规格、分组、给药、造模、手术方法均同上,术后 48 h 进行行为学检测。将小鼠头部背向洞口放入明室,立即接通 36 V 电源,启动计时器,小鼠一进入暗室立即受到电击,计时器则同时停止计时;取出小鼠,记录小鼠从放入明室至进入暗室遇到电击所需的时间,此即潜伏期。24 h 后重新测验,记录小鼠首次出现错误遭电击的潜伏期和 5 min 内遭电击次数。结果见表 2。

表 2 五味子醇提部位对反复脑缺血再灌注致记忆障碍模型小鼠学习和记忆的影响(避暗法, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab 2 Effect of Schisandra Chinensis Baill distilled by ethanol on the ability of learning and memory in memory impairment mice model induced by repeated cerebral ischdmia-reperfusion (Evading dark test, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组 别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	潜伏期 /s	错误反应 次数/次
假手术组		258.36±43.56 ¹⁾	0.64±0.67 ¹⁾
模型组		183.27±48.10	1.91±0.94
尼莫地平片组	0.02	253.45±46.82 ¹⁾	0.91±0.83 ¹⁾
银杏叶片组	0.04	257.36±53.33 ¹⁾	0.64±0.67 ¹⁾
大剂量醇提部位组	0.4	229.27±57.17 ²⁾	1.09±0.83 ²⁾
小剂量醇提部位组	0.2	221.55±57.92	1.27±1.01

注:与模型组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$
Note: Compared with the model group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.05$

从上表可看出,与假手术组比,模型组可显著减少小鼠首次出现错误潜伏期 ($P<0.01$),显著增加 5min 内错误反应次数 ($P<0.01$),说明造记忆障碍模型成功。与模型组比,尼莫地平片组和银杏叶片组能显著延长模型小鼠首次出现错误的潜伏期 ($P<0.01$),显著减少模型小鼠错误反应次数 ($P<0.01$);大剂量五味子醇提部位组能明显延长模型小鼠首次出现错误的潜伏期 ($P<0.05$),明显减少 5 min 内小鼠错误反应次数 ($P<0.05$)。

3 讨论

学习、记忆是脑的高级功能,是构成智能的要素,可分为获得、巩固及再现三个基本过程。检测学习记忆功能的实验方法有多种,但跳台法及避暗法是应用得比较多且经典的检测学习记忆功能的方法^[6]。目前血管闭塞法(4VO 模型)及局限性大脑中动脉(MCA)缺血等模型,虽应用较广、脑缺血实验结果较为可靠,但仍具不足之处^[7];如脑缺血实验多需使用麻醉剂,但有学者认为戊巴比妥钠等对脑缺血性损害有保护作用;此类实验一般 1~2 d 才能完成造模过程,均需较复杂的手术操作,有的尚需显微外科手术技巧,有一定难度,且对动物有损伤,易对实验结果产生影响。与上述造模方法相比,本实验方法简便、易行,采用价廉且血管解剖近似于人的小鼠作为实验对象,结果稳定、可靠,是一种良好的动物模型。

晋《抱朴子》载五味子“常服能返老还童、延年益寿”;明《本草纲目》记载,五味子“补虚劳,令人身体悦泽、明目”;提示五味子有好的抗老化作用。近有报道五味子醇提部位可提高小鼠学习能力^[8],五味子木脂素、五味子乙素、五味子酚均有好的抗氧化作用^[9],也有报道五味子水提液有好的益智作用^[10];我们前期研究也表明五味子多糖有抗衰老作用。为全面发现五味子的药理作用,观察了五味子醇提部位对脑老化模型学习记忆的影响。本实验表明,五味子醇提部位可明显减少跳台实验小鼠错误反应次数,显著延长小鼠测试潜伏期;可显著延长避暗实验小鼠首次出现错误的潜伏期,明显减少 5 min 内错误反应次数。即五味子醇提部位对反复脑缺血再灌注致记忆障碍模型小鼠学习记忆有明显的改善作用,能提高小鼠的学习记忆功能,这也是五味子宁心安神、调节神经系统的机理之一。

REFERENCES

[1] MIAO M S. Effect of Schisandra polysaccharide on Brain aging model mice [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中国医药学报), 2002,17 (3):187-188.
[2] TIAN G Q, GUO S S, LU H Q. Effect of Bushen Huoxue Recipe on Learning and Memory Dysfunction and Hippocampal Nerve Cell Apoptosis in Mice with Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury[J]. Chin J Integr Tradit Chin West Med(中国中西医结合杂志), 2003,23(2):123-123.
[3] XU X H, WANG L B, YANG S W, et al. Relationship between ability of learning memory and lipofuscin content of

brain in mice of different age[J]. Chin J Geriatr(中华老年医学杂志), 1998,17(2):80-82.

- [4] HUO Z Y, LIU D H, LIU X L. Improved effect of melatonin on learning and memory in mice with repeated cerebral ischemia and reperfusion and its mechanism[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学), 2003,8(5): 567-569.
- [5] MIAO M S. Materia medica of Chinese herbal medicine can be eaten(食疗中药药物学)[M]. Beijing: Science Press, 2001, 242-243.
- [6] WANG C S, LI Y Z, SONG Z H, et al. Effects of phenylethanoid glycosides on mice memory recurrence dysfunction induced by ethanol[J]. China Sci Tech Infor(中国科技信息), 2005,17 (17A) :240-243.

[7] LI H. Progress on animal model of ischemic cerebrovascular disease[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理), 1995,6(1):59-62.

[8] CHEN X M, XIE X, SUN J J, et al. Study on Acute Toxicity and Learning-memory Improvement of Schisandra Chinensis and Polygalatenuifolia Extracts[J]. Pract Prev Med (实用预防医学), 2006,13(4):807-808.

[9] YANG X Q. Progress on the effective site and the Pharmacological effects of Schisandra [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2005,28 (2):156-158.

[10] YANG X Q. The Pharmacology Research of Schisandra on the role of Brain strengthening [J]. Chin Med Rep(中国医药导报), 2007, 4(22):107-108.

收稿日期: 2008-07-02