

## 镇心省睡益智方及其挥发油对记忆损伤小鼠的保护作用研究\*

张科楠, 罗俊, 肖帅, 汤丹丰, 吴玲, 郭园园, 钟钰, 郑琴\*\*

(江西中医药大学 南昌 330004)

**摘要** 目的: 观察镇心省睡益智方(省睡方)水提液及其省睡方药对益智-石菖蒲挥发油对  $A\beta_{1-42}$  诱导阿尔茨海默病(AD)小鼠学习记忆及神经递质的影响。方法: 运用 ICR 小鼠侧脑室注入  $A\beta_{1-42}$  复制记忆损伤模型小鼠, 将省睡方水提液(0.455 g/kg)进行灌胃给药, 不同剂量益智-石菖蒲挥发油(12.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )进行吸嗅给药, 采用跳台实验、Morris 水迷宫实验对小鼠行为学能力进行检测, 采用尼氏染色光镜下观察海马 CA1 区神经元变化, 运用 Elisa 法检测小鼠海马组织中乙酰胆碱(Ach)、伽马氨基丁酸(GABA)、谷氨酸(Glu)含量的变化。结果: 跳台实验中, 与空白组相比, 模型组跳台实验潜伏期明显缩短、错误次数明显增加; 与模型组相比, 各给药组均可以显著延长小鼠跳台实验潜伏期、减少跳台错误次数; Morris 水迷宫定位航行实验显示, 模型组小鼠基本丧失学习记忆能力; 各给药组与第一天相比, 逃避潜伏期明显减少; 空间探索实验显示各组之间无显著差异; 在尼氏染色中, 镇心省睡益智方灌胃给药和益智-石菖蒲挥发油吸嗅给药均可以一定程度保护小鼠海马 CA1 区神经元; Elisa 结果显示, 与空白组相比, 模型组小鼠海马组织中 Ach 含量显著降低, GABA、Glu 含量显著性升高; 与模型组相比, 镇心省睡益智方灌胃 0.455 g/kg 组及益智-石菖蒲挥发油吸嗅给药 12.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、48.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组小鼠海马组织中 Ach 含量明显升高, GABA、Glu 含量明显降低。结论: 镇心省睡益智方水提液及挥发油灌胃及吸嗅给药可以改善  $A\beta_{1-42}$  所致 AD 模型小鼠的学习记忆行为、保护神经元, 升高 Ach 含量, 降低 GABA、Glu 含量可能是其防治 AD 的机制之一。

**关键词** 镇心省睡益智方; 挥发油; 吸嗅; AD; 神经递质

DOI:10.13412/j.cnki.zyyl.2019.05.024

随着人类平均寿命延长, 与年龄增长相关的神经退行性疾病, 诸如帕金森病(Parkinson's disease, PD)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)等日益增多<sup>[1]</sup>。其中, 阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)成为继肿瘤、心血管疾病和卒中后第 4 位致老年人死亡原因, 给社会和家庭带来沉重的经济负担和精神压力<sup>[2]</sup>。AD 的发病机制尚不清楚, 主要有胆碱能神经元假说、 $\beta$ -淀粉样蛋白( $\text{amyloid-}\beta$ ,  $A\beta$ )学说和 Tau 蛋白假说, 以及炎症假说、胰岛素假说、氧化不平衡假说和基因突变假说等<sup>[3]</sup>。AD 以  $A\beta$  淀粉样肽形成的炎性斑为主要特征<sup>[4, 5]</sup>, 伴有神经递质含量异常等变化, 二者对神经元结构、学习记忆功能具有重要影响<sup>[6, 7]</sup>。

镇心省睡益智方(省睡方)源自《千金翼方》, 由远志、石菖蒲、益智仁三味药组成, 用于治疗由各种原因引起的智力低下, 注意力不集中, 嗜睡头昏, 精神疲惫, 记忆力减退<sup>[8]</sup>。现代研究表明, 远志在常规用量时即可引起腹胀、恶心、损伤胃粘膜、引起胃肠道胀气, 从而引起严重的胃肠道反应、消化功能减弱, 若大剂量服用时可引起腹泻、溶血等不良反应, 并导致实验动物胃粘膜脱落、出血等, 呈现出明显的胃肠靶器官副作用<sup>[9]</sup>。同时长期给予实验动物石菖蒲, 也将导致实验动物胃肠道肿瘤<sup>[10, 11]</sup>存在潜在的致癌、制畸风险。

近年来, 国内外学者开始研究芳香疗法对神经系统的影响<sup>[12]</sup>。通过鼻腔吸入利用鼻脑连接作为一种最快捷的药物传送系统, 可避免外周副作用。研究发现<sup>[13]</sup>利用鼠尾草精油香熏能够改善受试者的认知能力。杨天鹏等<sup>[14]</sup>研究丁香酚不同给药途径对小鼠学习记忆的影响, 结果显示丁香酚吸入组的小鼠水迷宫实验、嗅觉辨识记忆实验结果明显优于其他组。“吸入入脑”是一种无损性给药方式, 因此嗅觉系统有可能成为有效控制和治疗神经系统类疾病的给药途径。

基于此, 本课题组采取吸嗅及灌胃给药的方式进行预防性给药, 研究镇心省睡益智方灌胃及吸嗅对  $A\beta_{1-42}$  诱导 AD 小鼠模型的学习记忆、脑内神经递质等的影响, 旨在探究镇心省睡益智方防治 AD 的作用和机理, 为中药复方吸嗅防治 AD 提供依据。

## 1 材料和方法

1.1 试验药物 远志、石菖蒲、益智仁均购自江西樟树天齐堂中药饮片有限公司, 批号分别为(1805003、1806004、1806004), 经江西中医药大学刘荣华教授鉴定品种合格。根据《千金翼方》中镇心省睡益智方进行提取, 精密称取远志粗粉 300 g, 石菖蒲粗粉 50 g, 益智仁粗粉 50 g 先后倒入圆底烧瓶, 加入 10 倍水, 浸泡 1 h 后提取 1 h, 提取两次, 合并滤液。备用。原方镇心省睡益智方组剂量参考文献方法<sup>[15]</sup>以动物单位质量换算为小鼠等效剂量 0.455 g/kg 灌胃(镇心省睡益智方水提液组剂量系按生药量计算)。精密称取石菖蒲 100 g, 益智仁 100 g, 参考 2015 年版《中国药典》挥发油乙法进行挥发油提取, 平行实验 3 次, 最终挥发油平均得油量为 2.5 ml, 平均得油率为 1.25%。 $A\beta_{1-42}$ (Sigma 公司, 规格: 0.1 mg/瓶, 批号: SLBG1637V)精密称取  $A\beta_{1-42}$  0.1 mg, 精密加入 PBS 和 DMSO(比例 9:1)混合液 2.215 mL 溶解, 涡旋, 分装冻存于 -80 °C 冰箱, 临用前取出于 37 °C 孵育箱中孵育 1 周, 使其成为絮凝态。

1.2 动物 ICR 雄性小鼠, SPF 级, 72 只, 鼠龄 5 月龄, 质量 25 g ~ 30 g, 购自江苏集萃药康生物科技有限公司, 生产许可证号为: SCXK(苏)2018-0008, 于 22.5 °C ~ 23.5 °C、湿度 60% ~ 65%、12 h 日夜循环光照条件下适应性饲养一周, 期间自由饮水、进食。

1.3 试剂 DMSO(细胞培养级, 规格: 50 mL/瓶, 批号: 821D031)、PBS(PH 7.2 ~ 7.4, 规格: 500 mL/瓶, 批号:

\* 基金项目: 江西省科技创新人才重点项目("5511"工程专项)(20171BCB18001); 中药学一流学科项目(JXSYLXK-ZHYA0092)。

\*\* 通讯作者: 郑琴, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药新剂型和新技术研究, Tel: (0791) 87118658, E-mail: zhengqin912006@163.com;

作者简介: 张科楠, 在读硕士, 研究方向: 中药新剂型和新技术研究; E-mail: 1036918133@qq.com。

20180630) 北京索莱宝科技有限公司; Ach、Glu、GABA 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒(上海语纯生物科技有限公司,批号均为:2018/05); 尼氏染色液(西安赫特生物科技有限公司,货号:ST065-1); 中性树胶(北京索莱宝科技有限公司,批号:11081021)。

1.4 仪器 脑立体定位仪(德国 Neurostar 公司, KOPF); 牙科钻(美国 FOREDOM 公司); 微量注射泵(美国, KD Scientific); 压缩空气雾化吸入器(江苏双盛医疗器械有限公司, DW-B 型); 跳台记录仪(上海京工实业有限公司, YLS-3TB 型); Morris 水迷宫(上海玉妍科学仪器公司); 包埋机(德国 LEICA 公司, RM2255); 切片机(德国 LEICA 公司, EG1150H); 摊片机(德国 LEICA 公司, HI1210); 烘片机(德国 LEICA 公司, HI1220); 光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司, BX43 型); 高通量组织研磨机(宁波新芝生物科技股份有限公司, SCIENTZ-192); 酶标仪(美国 Biotek 公司, ELx800)。

### 1.5 方法

1.5.1 动物分组及模型的制备 模型复制前动物进行跳台实验, 依据首次电击发生时间及 3 min 内错误次数筛选出指标无显著性差异小鼠, ICR 小鼠随机分成空白组、假手术组、模型组、镇心省睡益智方灌胃 0.455 g/kg、益智-石菖蒲挥发油 12.13 μg/mL、48.50 μg/mL 组。每组 12 只。参考文献<sup>[16-18]</sup>取 ICR 小鼠, 按 20 μL/g 给予 2% 水合氯醛进行腹腔注射麻醉。剪去头顶毛发, 纱布遮盖双眼, 以减少小鼠恐惧。将小鼠固定于脑立体定位仪, 沿鼠脑中线位置剪开头顶皮肤, 暴露前囟, 以前囟为基点, 向后 0.4 mm, 旁开 1 mm, 向下 2 mm 为药物注射点。模型组吸取 Aβ<sub>1-42</sub> (10 μmol/L) 5 μL, 假手术组吸取同体积溶剂(90% PBS 和 10% DMSO 混合液) 用同样的方法于 5 min 内精确注射入脑室。注射完毕, 先退针 1 mm 留针, 使药物充分弥散 2 min 后缓慢退针, 缝合。根据行为学实验、病理切片学及相关神经递质的变化来考察造模是否成功。

1.5.2 给药方法 ICR 组采用预防性给药, 镇心省睡益智方灌胃组及镇心省睡益智方挥发油组于造模前 15 天开始给药, 造模后继续给药 7 天。空白组、模型组、假手术组灌以等量的生理盐水。镇心省睡益智方灌胃组剂量 0.455 g/kg, 镇心省睡益智方挥发油 12.13 μg/mL (吸取 100 μL)、48.50 μg/mL (吸取 400 μL) 组吸嗅方法参考文献方法<sup>[19]</sup> 吸取挥发油于 DW-B 型压缩空气雾化器中, 并用蒸馏水分别稀释 20、80 倍, 置于密闭染毒箱(80 cm × 80 cm × 65 cm) 中先让药物充分挥发弥漫整个实验盒内, 再将镇心省睡益智方挥发油各组小鼠依次置入染毒箱中, 盖上染毒箱盒盖, 吸嗅 45 min (镇心省睡益智方挥发油按挥发油质量/蒸馏水体积比例计算)。

1.5.3 跳台实验<sup>[20]</sup> ICR 小鼠造模恢复后开始进行行为学测试。第一天进行跳台实验训练 24 h 后, 第二天开始测试, 记录各小鼠第一次电击发生的时间和 3 min 内错误次数, 实验期间继续给药。

1.5.4 Morris 水迷宫实验 采用 Morris 水迷宫实验测试小鼠认知能力。水迷宫主要由一直径 120 cm, 高 40 cm 圆桶及自动录像分析系统组成。

定位航行实验: 实验训练阶段连续进行 5 d, 每天训练 3 次, 期间继续给药。训练时, 将小鼠面向池壁从四个入水点分别放入水池, 记录小鼠从入水到找到隐蔽平台并站立于其上所需时间, 作为潜伏期。

空间探索实验: 定位航行实验结束后, 第 6 d 撤去平台, 从同一入水点放入水中, 测其 90 s 内穿过原平台象限的时间。

1.5.5 组织形态学观察 小鼠行为学测试完毕后, 取 6 只小鼠心脏灌流处死取脑, 石蜡包埋, 常规石蜡切片脱蜡至水, 将切片放于尼氏染色液中, 染色 30 min; 蒸馏水清洗 2 min ~ 3 min; 70% 酒精分色数秒至数分钟; 依次经 70% 酒精、80% 酒精、95% 酒精, 各 2 min 脱水; 无水乙醇 2 次, 每次 3 min; 二甲苯 2 次, 每次 5 min; 中性树胶封片, 观察。尼氏体呈紫色、细胞核呈淡紫色。

1.5.6 相关神经递质的检测 脑组织样品制备<sup>[21]</sup>: 取 6 只小鼠断头处死后, 分离脑组织。PBS 缓冲液洗净残留血, 吸水纸吸干液体后称重, 于液氮速冻后转移至 -80 °C 下保存, 备用。取适量脑组织, 加入 9 倍体积 PBS 缓冲液, pH 7.4, 配平后放入预冷适配器, 置于研磨机以频率 9.5 Hz, 研磨 20 min。匀浆液以 10 000 g 的转速 4 °C 离心 10 min, 收集上清液, 备用。Elisa 法测定 Ach、Glu、GABA 含量。

## 2 结果

2.1 跳台实验 与空白组、假手术组相比, 模型组小鼠学习记忆能力低下, 逃避潜伏期明显较短、错误次数明显较多; 与模型组相比, 镇心省睡益智方灌胃组(0.455 g/kg) 及镇心省睡益智方挥发油各组均能提高小鼠学习记忆能力、逃避潜伏期显著升高、错误次数明显减少。见表 1。

表 1 镇心省睡益智方灌胃及挥发油吸嗅对 Aβ<sub>1-42</sub> 致 AD 模型小鼠跳台逃避潜伏期及错误次数的影响 (x ± s)

组别	剂量/ (μg/mL)	逃避潜伏期/ n (s)	错误次数/ (3 min 内)
空白对照		12 138 ± 48 **	0.5 ± 0.5 **
模型对照		9 25 ± 9	2.0 ± 0.7
假手术		7 142 ± 50 **	0.9 ± 0.4 **
镇心省睡益智方灌胃	0.455 g/kg	6 104 ± 68 **	1.0 ± 0.6 **
镇心省睡益智方挥发油	12.13	9 84 ± 51 *	1.1 ± 0.6 **
镇心省睡益智方挥发油	48.50	9 110 ± 57 **	1.0 ± 0.9 **

与模型组比较 \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 (下同)。

### 2.2 Morris 水迷宫实验

2.2.1 对 AD 小鼠 Morris 水迷宫定位航行实验逃避潜伏期的影响 各组小鼠在水迷宫的逃避潜伏期均随着训练时间及次数的增加而缩短。在空白组中, 经过第一天的训练, 之后几天的逃避潜伏期均明显缩短, 与本组第一天比较, 均具有显著性差异, 证明空白组小鼠具有学习记忆的能力; 模型组中, 随着实验天数的增加, 模型组的逃避潜伏期并没有显著改善, 证明学习记忆能力丧失; 假手术组中, 经过前两天的训练, 第三、四、五天均与第一天比较有显著差异, 证明假手术组小鼠有学习记忆能力。但比空白组学习能力慢; 镇心省睡益智方灌胃(0.455 g/kg) 组中, 随着训练次数增加, 在第四、五天时, 逃避潜伏期与第一天相比明显降低, 证明省睡方灌胃能够改善造模后小鼠的空间学习记忆能力; 在镇心省睡益智方挥发油 12.13 μg/mL 组中, 第二、三、五天逃避潜伏期与第一天相比均显著降低。证明省睡方挥发油低剂量组也具有改善学习记忆能力; 在镇心省睡益智方挥发油 48.50 μg/mL 组中, 在第三、四、五天连续三天中, 逃避潜伏期与第一天相比均明显降低, 证明省睡方挥发油 48.5 μg/mL 效果显著, 可能对学习记忆具有改善、治疗作用。结果见表 2。

表2 镇心省睡益智方灌胃及挥发油吸嗅对  $A\beta_{1-42}$  致 AD 模型小鼠 Morris 水迷宫定位航行实验逃避潜伏期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

分组	剂量/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	潜伏期/s				
		第1 d	第2 d	第3 d	第4 d	第5 d
空白对照		21 $\pm$ 10	10 $\pm$ 3 $\Delta\Delta$	12 $\pm$ 6 $\Delta$	12 $\pm$ 5 $\Delta$	11 $\pm$ 6 $\Delta$
模型对照		28 $\pm$ 15	43 $\pm$ 22 $\Delta$	35 $\pm$ 17	32 $\pm$ 14	25 $\pm$ 13
假手术		35 $\pm$ 17	27 $\pm$ 14	11 $\pm$ 6 $\Delta\Delta$	21 $\pm$ 13 $\Delta$	17 $\pm$ 6 $\Delta$
镇心省睡益智方灌胃	0.455 g/kg	37 $\pm$ 21	26 $\pm$ 11	28 $\pm$ 15	10 $\pm$ 4 $\Delta\Delta$	12 $\pm$ 6 $\Delta\Delta$
镇心省睡益智方挥发油	12.13	22 $\pm$ 11	12 $\pm$ 8 $\Delta$	13 $\pm$ 6 $\Delta$	18 $\pm$ 6	14 $\pm$ 6 $\Delta$
镇心省睡益智方挥发油	48.50	40 $\pm$ 22	36 $\pm$ 18	18 $\pm$ 12 $\Delta\Delta$	14 $\pm$ 7 $\Delta\Delta$	12 $\pm$ 5 $\Delta\Delta$

同组第一天比较  $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.2.2 对空间探索实验目标象限停留时间的影响 预防性给药后,与空白组、假手术组相比,模型组目标象限停留时间有所减少,但无显著性差异;与模型组相比,省睡方灌胃组及省睡方挥发油组在目标象限停留时间均有所增加,但无显著差异。见表3。

表3 镇心省睡益智方灌胃及挥发油吸嗅对  $A\beta_{1-42}$  致 AD 模型小鼠 Morris 水迷宫空间探索实验的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	剂量/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	n	目标象限停留时间/(s)
空白对照		8	22 $\pm$ 5
模型对照		12	20 $\pm$ 4
假手术		7	23 $\pm$ 4
镇心省睡益智方灌胃	0.455 g/kg	9	22 $\pm$ 3
镇心省睡益智方挥发油	12.13	9	23 $\pm$ 5
镇心省睡益智方挥发油	48.50	9	22 $\pm$ 4

2.3 对 AD 小鼠海马 CA1 区神经元的影响 从尼氏染色结果看,预防性给药后,空白组(见图1A)、假手术组(见图1C)海马 CA1 区神经元排列紧密、无核固缩。模型组(见图1B)、镇心省睡益智方灌胃组(见图1D)海马 CA1 区均出现神经元细胞排列疏松,其中模型组出现明显的神经元丢失、核固缩。镇心省睡益智方挥发油 12.31  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组(见图1E)、省睡方挥发油 48.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组(见图1F)海马 CA1 区神经元较模型组 CA1 区有所改善,但也有神经细胞排列疏松,神经元丢失情况。预防性给药镇心省睡益智方及其挥发油对神经元具有一定的保护作用。见表4。

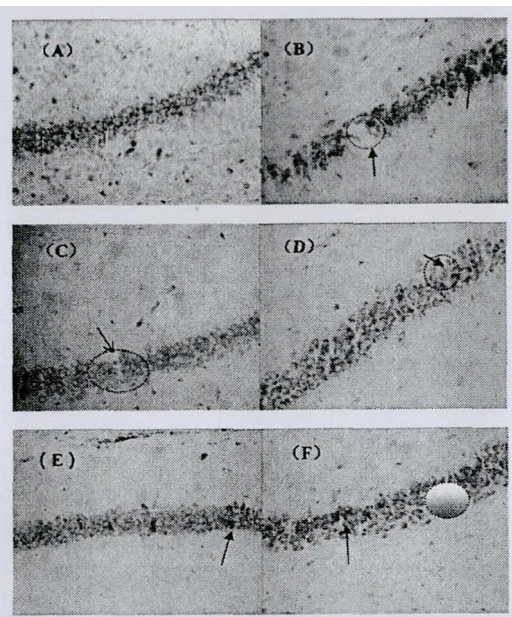


图1 镇心省睡益智方灌胃及挥发油吸嗅对  $A\beta_{1-42}$  致 AD 模型小鼠海马 CA1 区神经元的影响 ( $\times 400$ )

表4 镇心省睡益智方灌胃及挥发油吸嗅对  $A\beta_{1-42}$  致 AD 模型小鼠海马 CA1 区神经元的病理损伤分级程度分布影响(只)

组别	剂量/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	样本量	神经排列紧密,核固缩象	神经排列较紧密,核固缩象较少	神经排列疏松,核固缩明显	神经排列疏松,核固缩明显
空白对照		6	5	1	0	0
模型对照		6	0	0	5	1
假手术		6	4	2	0	0
镇心省睡益智方灌胃	0.455 g/kg	6	1	4	1	0
镇心省睡益智方挥发油	12.13	6	0	4	1	1
镇心省睡益智方挥发油	48.50	6	0	5	1	0

2.4 对 AD 小鼠海马相关神经递质的影响 预防性给药后,与空白组、假手术组相比,模型组 Ach 水平明显降低, Glu、GABA 水平显著升高;与模型组相比,镇心省睡益智方灌胃组及挥发油组对 AD 小鼠海马组织中 Ach 具有明显的升高作用,能显著抑制 AD 小鼠海马组织中 Glu、GABA 的含量。见表5。

表5 镇心省睡益智方灌胃及挥发油吸嗅对  $A\beta_{1-42}$  致 AD 模型小鼠海马相关递质的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

分组	剂量/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	GABA/ ( $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	ACH/ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	GLU/ ( $\text{mg}/\text{mL}$ )
空白对照		0.98 $\pm$ 0.11*	108 $\pm$ 17*	5.40 $\pm$ 0.82*
模型对照		1.09 $\pm$ 0.15	88 $\pm$ 18	6.04 $\pm$ 0.92
假手术		0.93 $\pm$ 0.09**	110 $\pm$ 11**	5.23 $\pm$ 0.49**
镇心省睡益智方灌胃	0.455 g/kg	0.85 $\pm$ 0.11**	110 $\pm$ 13**	4.58 $\pm$ 0.41**
镇心省睡益智方挥发油	12.13	0.85 $\pm$ 0.06**	108 $\pm$ 16*	4.90 $\pm$ 0.55**
镇心省睡益智方挥发油	48.50	0.84 $\pm$ 0.08**	107 $\pm$ 13*	4.98 $\pm$ 0.24*

### 3 讨论

本研究中,我们通过向 ICR 小鼠海马侧脑室注射  $A\beta_{1-42}$  成功地复制了 AD 动物模型,并采用镇心省睡益智方灌胃及挥发油吸嗅给药的方式进行预防性给药,与传统给药方式相比,挥发油吸嗅是经嗅觉通路将神经信号传递至脑并调节脑功能,从而有效避免了口服给药的首过效应,具有简单、快速、生物利用度高特点。由于未找到可以通过吸嗅给药的阳性药物,因此将镇心省睡益智方灌胃与挥发油吸嗅进行对比。结果显示模型组学习记忆能力较空白鼠发生了显著下降,通过尼氏染色也能够发现小鼠海马 CA1 区神经元发生了明显的丢失及核固缩。预防性给药后,能够显著改善  $A\beta_{1-42}$  诱导的学习记忆行为,并对脑神经元具有一定的保护作用。但镇心省睡益智方挥发油吸嗅给药组并不呈现一定的浓度依赖性,因为鼻腔给药浓度过高可能会产生抑制作用及鼻纤毛毒性<sup>[22]</sup>。

Ach 是中枢胆碱能神经系统主要的神经递质,对维持学习记忆正常进行具有重要作用<sup>[23]</sup>。本研究显示,镇心省睡益智方灌胃及挥发油吸嗅可升高小鼠海马中 ACH 含量,提示改善学习记忆与调节胆碱能系统相关。最近的一项对 AD 病人大脑的解剖研究发现,脑内相关区域存在谷氨酸转运体表达的减少<sup>[24]</sup>,GLU 介导的兴奋性毒性也将加速 AD 病人脑内神经元的凋亡<sup>[25]</sup>。镇心省睡益智方可降低小鼠海马中 GLU 含量,提示改善学习记忆与调节谷氨酸能神经元系统相关。脑内 A $\beta$  的积聚,会刺激反应性星型胶质细胞大量分泌并释放 GABA,而通过抑制反应性星型胶质细胞产生和释放 GABA,可以改善突触可塑性、学习及记忆功能<sup>[26]</sup>。镇心省睡益智方灌胃及挥发油吸嗅可降低小鼠海马组织 GABA 的含量,提示其改善学习记忆与调节 GABA 相关。

综上,预防性给药镇心省睡益智方及挥发油可改善动物模型的学习记忆行为,并对神经元具有一定的保护作用。其作用机制可能和药物分子与 GPCR 嗅觉受体(包括乙酰胆碱受体、谷氨酸受体、伽马氨基丁酸受体等)结合,产生相应的电信号并通过神经系统传递至大脑,升高 Ach 含量,降低 GABA、Glu 含量,对大脑功能进行改善<sup>[27]</sup>。

参考文献

[1]Naghavi Mohsen ,Wang Haidong ,Lozano Rafael ,et al. Global , regional , and national life expectancy , all-cause mortality , and causespecific mortality for 249 causes of death ,1980-2015 ( 2016 ) . A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2015. 385( 9963 ) : 117 ~ 171.

[2]荣蓉 ,曲连悦 ,孙珊珊 ,等. 阿尔茨海默病的药物治疗研究现状. *中国临床药理学杂志* 2019 35( 5 ) : 489 ~ 492.

[3]Peng D , Yuan X , Zhu R . Memantine hydrochloride in the treatment of dementia subtypes. *Journal of Clinical Neuroscience* ,2013 , 20( 11 ) : 1482 ~ 1485.

[4]Leszek J , Barreto G E , Gasiorowski K , et al. Inflammatory mechanisms and oxidative stress as key factors responsible for progression of neurodegeneration: role of brain innate immune system. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* 2016 , 15( 3 ) : 329 ~ 336.

[5]Luca Steardo J , Bronzuoli M R , Iacomino A , et al. Does neuroinflammation turn on the flame in Alzheimer's disease? Focus on astrocytes. *Frontiers in Neuroscience* , 2015 , 9 : 259 ~ 259.

[6]Greenamyre J T , Young A B . Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* ,1989 , 10( 5 ) : 593 ~ 602.

[7]Jo S , Yarishkin O , Hwang Y J , et al. GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature Medicine* , 2014 , 20( 8 ) : 886 ~ 896.

[8]施仁潮 ,俞宜年 ,朱圣田. 益智健脑效验方精选. 北京: 金盾出版社,1995: 163 ~ 165.

[9]安柳 ,吴赛 ,陈海洋 ,等. 石菖蒲-远志药对不同配伍比例对小鼠胃肠

形态的影响. *云南中医中药杂志* 2015 36( 8 ) : 63 ~ 66.

[10]杜毅 ,周超凡. 石菖蒲的效用与现代研究的关系. *中国中药杂志* , 1993 ( 4 ) : 244 ~ 245.

[11]陈俐. 石菖蒲药理作用的实验研究. *广州医学院学报* 2002 ( 4 ) : 75 ~ 78.

[12]Dobetsberger C , Buchbauer G . Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. *Flavour & Fragrance Journal* ,2011 , 26 ( 5 ) : 300 ~ 316.

[13]Moss L , Rouse M , Wesnes K A , et al. Differential effects of the aromas of salvia species on memory and mood. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* , 2010 25( 5 ) : 388 ~ 389.

[14]杨天鹏 ,唐敏 ,刘巧琼 ,等. 丁香酚通过嗅觉通路改善昆明鼠学习记忆的机制. *中国康复医学杂志* 2007 , 22( 6 ) : 487 ~ 489.

[15]徐叔云 ,卞如濂 ,陈修. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 第二版,1992: 178 ~ 180.

[16] Borreca A , Latina V , Corsetti V , et al. AD-Related N-Terminal Truncated Tau Is Sufficient to Recapitulate In Vivo the Early Perturbations of Human Neuropathology: Implications for Immunotherapy. *Molecular Neurobiology* ,2018 55( 10 ) : 8124 ~ 8153.

[17]Kim H Y , Kim H V , Jo S , et al. EPPS rescues hippocampus-dependent cognitive deficits in APP/PS1 mice by disaggregation of amyloid- $\beta$  oligomers and plaques. *Nature Communications* ,2016 6: 8997.

[18]Kowall N W , Beal M F , Busciglio J , et al. An in vivo model for the neurodegenerative effects of beta amyloid and protection by substance P. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,1991 , 88( 16 ) : 7247 ~ 7251.

[19]胡泓博 ,夏传余 ,李光武. 丁香酚吸嗅对 MCAO 模型大鼠脑源性神经营养因子的影响. *中风与神经疾病杂志* ,2015 , 32( 1 ) : 28 ~ 32.

[20]徐叔云 ,卞如濂 ,陈修. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 第二版,1992: 641 ~ 642.

[21]Kalita J , Kumar V , Misra U K , et al. Memory and Learning Dysfunction Following Copper Toxicity: Biochemical and Immunohistochemical Basis. *Molecular Neurobiology* ,2017 55( 5 ) : 3800 ~ 3811.

[22]陆燕 ,刘华 ,王东兴. 中药鼻腔给药临床前研究进展. *中国药房* , 2011 , 22( 47 ) : 4500 ~ 4502.

[23]Davies P. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* ,1976 308: 1403.

[24]Kirvell S L , Esiri M , Francis P T. Down-regulation of vesicular glutamate transporters precedes cell loss and pathology in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry* ,2006 , 98( 3 ) : 1713 ~ 1724.

[25]Greenamyre J T , Young A B. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* ,1989 , 10( 5 ) : 593 ~ 602.

[26]Jo S , Yarishkin O , Hwang Y J , et al. GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature Medicine* , 2014 , 20( 8 ) : 886 ~ 896.

[27]韩彦琪 ,许浚 ,龚苏晓 ,等. 基于味觉、嗅觉受体分子对接技术的中药性味物质基础研究的路径和方法. *中草药* ,2018 ( 1 ) : 14 ~ 19.

**Protective Effect of ZXXSYZ Fang and Its Essential Oil on Learning Ability and Memory of Alzheimer's Disease Model Mice\***

Zhang Kenan , Luo Jun , Xiao Shuai , Tang Danfeng , Wu Ling , Guo Yuanyuan , Zhong Yu , Zheng Qin\*\*  
( Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine , Nanchang 330004 )

**Objective:** To evaluate the protective effects of water extract from ZHENXIN XINGSHUI YIZHI FANG( ZXXSYZF) and the essential oil

from *Alpinia oxyphylla* and *rhizoma acori graminei* on learning memory and neurotransmitters of  $A\beta_{1-42}$  induced AD model mice. **Methods:** ICR mice were intracerebroventricularly injected with  $A\beta_{1-42}$  to establish the Alzheimer's Disease (AD) mice model. 0.455 g/kg ZXSSYZF water extract was orally administered, and different doses of essential oil (12.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 48.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were administered as inhalation. The Platform and Morris water maze tests were used to determine the mice behavior ability. Changes of brain ultrastructure (CA1) were observed by optical microscopy (Nissl stain). Contents of neurotransmitters Ach, Glu and GABA in hippocampus of AD mice were determined by ELISA. **Results:** In the platform test, compared with the control group, the latency period was significantly shortened and the error number were significantly increased in the model group. Compared with the model group, all doses of drug groups significantly prolonged the latency and reduced the error numbers. In Morris water maze tests, mice showed little learning and memory function in the model group. In other drug groups, compared with the first day, the escape latencies were significantly reduced, but space exploring abilities showed no significant difference. In the Nissl staining, the protective effects on hippocampus CA1 neurons were observed in both ZXSSYZF water extract group and essential oil group. In ELISA test, compared with the control group, in the model group, the level of Ach was significantly reduced and the levels of Glu and GABA were significantly increased. Compared with the model group, the levels of Ach were significantly increased and the levels of Glu and GABA were significantly reduced in 0.455 g/kg ZXSSYZF water extract group and essential oil groups (12.13  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 48.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). **Conclusion:** The extracted solution from ZXSSYZF and essential oil can improve the learning memory and protect neurotransmitters in  $A\beta_{1-42}$  induced AD mice, its mechanism may be related to increasing the level of Ach and reducing the levels of Glu and GABA.

**Key words** ZHENXIN XINGSHUI YIZHI FANG, essential oil, inhalation, Alzheimer's disease, neurotransmitter

## 运脾化浊解毒煎对泄泻型 IBS 大鼠 SP、VIP、5-HT 的影响\*

张晓艳<sup>1</sup>, 郭喜军<sup>1</sup>, 霍耐月<sup>2</sup>, 师虹艳<sup>3</sup>, 董笑一<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>河北省中医院脾胃病科, 石家庄 050000; <sup>2</sup>迁安市中医院肝胆科, 迁安 064400;

<sup>3</sup>石家庄市中医院脑病科, 石家庄 050000)

**摘要** 目的: 探讨运脾化浊解毒煎对泄泻型肠易激综合征 (IBS) 大鼠 P 物质 (SP)、血管活性肠肽 (VIP)、5 羟色胺 (5-HT) 的影响, 为完善其药理机制提供数据支撑。方法: 将 Wistar 大鼠随机分为 6 组: 正常对照组、模型对照组、复方嗜酸乳杆菌 0.05 g/kg 组、运脾化浊解毒煎 1.25 g/kg、2.5 g/kg、5.0 g/kg 组。除正常对照组外, 均以综合刺激法制备泄泻型 IBS 模型。模型制备成功后, 各组分别给予相应药物或蒸馏水灌胃, 连续 2 周。定时测定体重、摄食量、粪便含水量和腹壁撤退反射评分, 测定肠推进率和肠粘膜形态学评分, 分别采用 ELISA 法和免疫组织化学法测定血清及肠组织 SP、VIP、5-HT 水平。结果: 与正常对照组相比, 模型对照组肠推进率、形态学评分明显升高; 血清和肠组织 SP 与 5-HT 水平明显升高, VIP 水平明显降低。与模型对照组相比, 复方嗜酸乳杆菌 0.05 g/kg 组和运脾化浊解毒煎各组肠推进率、形态学评分明显降低; 血清和肠组织 SP 与 5-HT 含量或表达明显降低, VIP 含量或表达明显升高。运脾化浊解毒煎 1.25 g/kg 组仅形态学评分降低, 血清 VIP 水平升高。结论: 运脾化浊解毒煎对改善泄泻型 IBS 大鼠脑-肠轴功能有积极作用, 可能是其治疗 IBS 的重要机制之一。

**关键词** 运脾化浊解毒煎; 泄泻型; IBS; P 物质; 5 羟色胺; 血管活性肽

DOI:10.13412/j.cnki.zyyj.2019.05.025

肠易激综合征 (irritable bowel syndrome, IBS) 是一种以反复腹痛腹胀和排便习惯改变的功能性胃肠病, 临床主要分为泄泻型、便秘型、混合型和不定型 4 种亚型, 以泄泻型最为常见<sup>[1]</sup>。目前研究普遍认为, IBS 病机复杂, 受到胃肠动力学、脑-肠生物轴、肠道微生物及免疫等多重机制的作用<sup>[2,3]</sup>。由于西药的作用靶点相对单一, 治疗该病的效果并不理想, 临床上多辅以益生菌、免疫调节剂、穴位敷贴、中药汤剂等疗法。我国传统中医学讲究辨证用药, 标本兼治, 中药制剂具有多靶点的作用优势, 对治疗多种病理机制复杂的难治性疾病取得了良好成效。运脾化浊解毒煎是在“浊毒”理论指导下配伍的方剂, 由茯苓、白芍、炒薏苡仁、蒲公英等 16 味中药组成, 以运脾化湿、调和气血、

化浊解毒为用药方针。有研究指出, 化浊解毒煎对脑肠肽具有调节作用, 通过清除胃肠道的炎性介质和内毒素样物质, 改善胃肠道内环境, 利于及时恢复胃肠道内分泌功能<sup>[4]</sup>。实质上, 基于脑-肠轴理论而受到重视的脑肠肽在 IBS 的病理研究中取得了较多进展, 其中血管活性肠肽 (vasoactive intestinal peptide, VIP)、5 羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 及 P 物质 (substance p, SP) 等也均被证实为 IBS 的重要生化标记物, 其水平高低关系到 IBS 的内脏敏感性、发病程度及患者预后<sup>[5,6]</sup>。本研究观察运脾化浊解毒煎对 IBS 大鼠模型外周血和肠道 VIP、5-HT 及 SP 的影响, 为完善其药理机制和促进临床合理应用奠定基础。

\* 基金项目: 河北省中医药管理局科研计划项目 (编号: 2015094)。

\*\* 通讯作者: 董笑一, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 脾胃病。邮

箱: dongxiaoyi0309@163.com;

作者简介: 张晓艳, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 脾胃病。