六味地黄汤对快速老化模型小鼠(SAM)学习记忆能力的改善作用*

周建政　张永祥　周金黄(北京毒理药理研究所　北京　100850)

摘要　采用被动性回避反应、主动性回避反应和水迷宫实验,观察六味地黄汤对快速老化模型小鼠SAMP8 记忆获得和记忆保持能力、条件性回避反应能力和空间记忆能力等学习行为功能的影响。结果显示,SAMP8 记忆获得和记忆保持能力、条件性回避反应能力及空间记忆能力均明显衰退,长期给予六味地黄汤可提高 SAMP8 记忆获得和记忆保持能力,改善其空间记忆能力并部分改善其条件性回避反应能力。

关键词　六味地黄汤　学习记忆　早衰小鼠(SAM)

Cognition-Enhancing Effect of Liuwei Dihuang Decoction on Age-Related Deterioration of Learning and Memory in Senescence-accelerated Mouse(SAM)

Zhou Jianzheng, Zhang Yongxiang, Zhou Jinhuang

(*Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing* 100850)

Abstract: Cognition-enhancing effect of Liuwei Dihuang decoction(LW)on SAM was observed by using passive avoidance performance, shuttle box and water maze tests in the present paper. It was showed that memory registration and retention ability, spatial memory as well as conditioned avoid response were all greatly declined in SAMP8. However, chronic administration of LW to SAMP8 enhanced the memory registration and retention ability in passive avoidance performance, promoted the spatial memory ability in water maze test and partially improved the leaning behavior in conditioned avoidance performance. The present results suggested that chronic administration of LW significantly ameliorated age-related decline of learning and memory ability in SAM.

Key words: Liuwei Dihuang decoction, learning and memory, SAM

老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)是发生于老年前期或老年期以进行性痴呆为主要症状同时伴有精神行为异常的神经退行性疾病,其显著特征是严重的记忆丧失和个性改变[1~3]。祖国医学对老年性痴呆相关病症有独到的认识,认为"肾主骨生髓,通于脑",衰老的发生、发展以及老年性痴呆的发病均与增龄性"肾虚"有密切关系,因此,"补肾"为预防和治疗老年性痴呆的重要手段之一[4]。六味地黄汤(LW)是中药滋补肾阴的经典代表名方,由熟地(*Rehmannia glutinosa*)、山茱萸(*Cornus officinalis*)、山药(*Dioscorea opposita*)、泽泻(*Alisma orientalis*)、牡丹皮(*Paeonia suffruticosa*)和茯苓(*Poria cocos*)(以上中药材均由中科院药用植物研究所冯毓秀教授鉴定)组成,中医临床上广泛地用于肾阴虚相关疾病的治疗,如腰膝酸软、头晕目眩、耳鸣耳聋、遗精和盗汗等。最近日本学者研究发现给予中药滋补肾阳的经典方剂八味地黄汤可显著改善东莨菪硷所致大鼠学习记忆能力的降低,并显著升高东莨菪硷大鼠大脑乙酰胆碱水平[5],说明"肾虚"同动物学习记忆能力下降有关,八

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39570851)和国家"九五"攀登计划预选项目

味地黄汤可通过“补肾”调节中枢胆碱能神经系统功能从而改善动物的学习记忆能力。但作为“滋补肾阴”的经典方剂-六味地黄汤益智作用的研究尚未见报道,本文以早衰小鼠(senescence-accelerated mouse,SAM)为模型观察了长期给予LW对SAM学习记忆能力的影响。

1 材料和方法

1.1 动物 快速老化模型小鼠(SAM),包括抗快速老化亚系(SAM-resistant/1,SAMR1)和快速老化亚系(SAM-prone/8,SAMP8),于1994年10月由日本京都大学Taketa教授捐赠,在本院动物实验室普通清洁环境下饲养繁殖。选择6月龄小鼠用于实验。

1.2 药物 六味地黄汤由熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮和白茯苓按8∶4∶4∶3∶3∶3的比例混合,加入6倍量蒸馏水煎煮3h,所得药渣同法再煎煮1次,过滤,与第1次煎煮滤液混合并浓缩至终浓度为1g(生药)/mL备用。

1.3 行为实验

1.3.1 动物分组及给药 小鼠分为4组:SAMR1;SAMP8;SAMP8+LW 2.5g/kg;SAMP8+LW 5.0g/kg。SAMP8平均每只(平均体重为20g)每日的摄食量为5g,分别按10g/kg和20g/kg(药物/饲料)的比例将LW掺入饲料可基本保证SAMP8分别按照2.5g/kg和5.0g/kg两个剂量摄入药物,同时按同法制备不含药物的对照饲料。药物饲料和对照饲料在外型、硬度及营养成分含量(除LW外)等均完全相同。选择6月龄小鼠,连续5个月分别按对照组和给药组小鼠给予对照饲料和药物饲料。

1.3.2 自主活动测定 按照文献[6],使用小鼠自主活动测试仪(中国医学科学院药物研究所研制),自动采集动物在箱内的自发活动并记录30min内小鼠的自主活动次数。

1.3.3 被动性回避反应实验 本实验包括避暗(step through,ST)和跳台(step down,SD)两项实验。参照文献方法[6]进行。

1.3.4 主动回避实验—穿梭箱(shuttle box)实验参照文献[6],使用穿梭箱实验装置(Med Associates Inc,USA),分别记录小鼠条件性回避反应次数和条件性回避反应时间。

1.3.5 空间记忆实验—水迷宫(water maze,WM)实验 水迷宫(中国医学科学院药物研究所研制)实验共进行8d,前2d为学习训练阶段,每天每只小鼠分别从迷宫的近点和远点各训练1次;后6d为实验阶段,将小鼠放在迷宫的起点(starting point),启动微机自动采集小鼠经过各个盲端的总错误数和到达安全区的潜伏期,时间限定为120s。

2 结果

2.1 口服LW对SAMP8自主活动的影响

自主活动连续测定2次,间隔为24h。第1次测试结果表明,SAMP8自主活动次数少于SAMR1,LW可使其自主活动次数增加,但均无统计学差异。第2次测试SAMP8自主活动次数则明显少于SAMR1,LW可增高其自主活动次数,其中LW(po,5.0g/kg)可显著提高SAMP8自主活动次数。

2.2 口服LW对SAMP8被动性回避反应的影响

2.2.1 LW对SAMP8避暗实验中记忆获得和记忆保持能力的影响 ①对记忆获得能力的影响:SAMP8在避暗实验中逃避电击的成功率降低(数据未提供),进入暗室而遭电击的潜伏期缩短,但同SAMR1相比无显著性差异。长期口服LW可提高SAMP8避免电击的成功率(数据未提供),延长SAMP8进入暗室而遭电击的潜伏期,但无显著性差异。(图1)。②对记忆保持能力的影响:SAMP8避暗实验中所犯总错误数升高,记忆保持率降低(数据未提供),但同SAMR1相比无显著性差异。长期给予LW可升高SAMP8记忆保持率(数据未提供),

但同对照相比差异不显著。此外，LW 可降低 SAMP8 进入暗室而遭电击的总错误数，其中 LW(po，5.0g/kg)可以显著降低 SAMP8 的总错误数(图 1)。

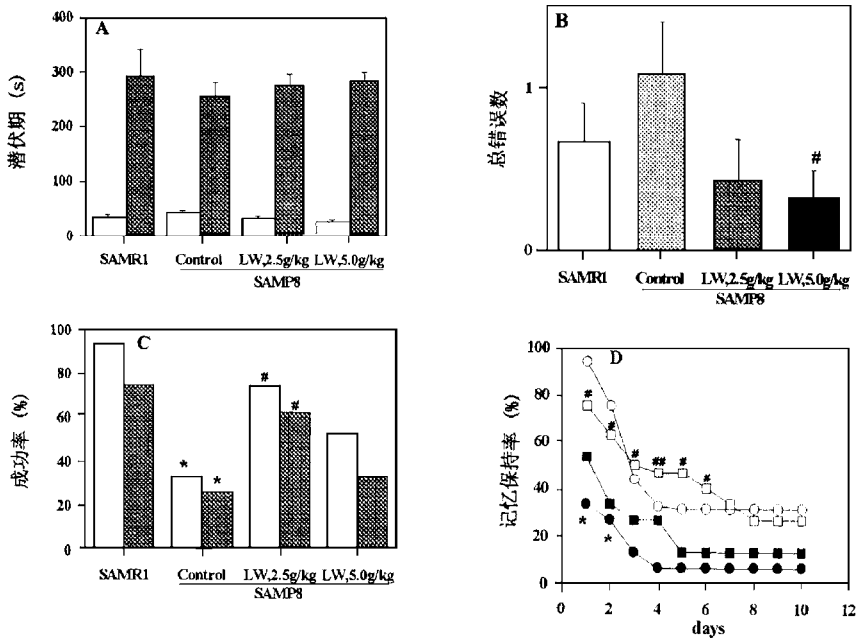


图 1　长期给予六味地黄汤(LW)对避暗实验(A 和 B)和跳台实验(C 和 D)中 SAMP8 记忆获得和记忆保持能力的影响

$n=14\sim16$，$\bar{x}\pm s$。同 SAMR1 相比 * $P<0.05$，** $P<0.01$；同 SAMP8 对照相比 # $P<0.05$，## $P<0.01$

LeaRning trial
Testing trail
—○—SAMR1-Control
—□—SAMP8+LW，2.5g/kg
—●—SAMP8-Control
—■—SAMP8+LW，5.0g/kg

(以下同)

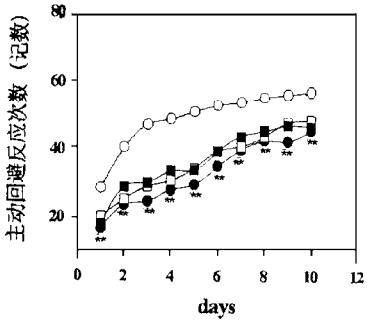
2.2.2　LW 对 SAMP8 跳台实验中记忆获得和记忆保持能力的影响①对记忆获得能力的影响；SAMP8 逃避电击的成功率明显地低于 SAMR1，其跳下跳台遭受电击的总错误数也明显高于 SAMR1，说明 SAMP8 记忆获得能力明显低下。长期给予 LW 可提高跳台实验中 SAMP8 逃避电击的成功率，其中 LW(po，2.5g/kg)可显著提高 SAMP8 逃避电击的成功率。此外，LW 可减少 SAMP8 跳下跳台而遭电击的总错误数，但同对照相比无显著性差异(数据未提供)(图 1)。②对记忆保持能力的影响：SAMP8 遭电击的总错误数升高，但同 SAMR1 相比无显著性差异，同时其记忆保持率也明显降低，说明 SAMP8 记忆保持能力低下。长期给予 LW 可以降低 SAMP8 遭电击的总错误数，但无显著性差异(数据未提供)。LW 可提高 SAMP8 记忆保持率，其中 LW(po，2.5g/kg)可显著提高 SAMP8 的记忆保持率(图 1)。

2.3　口服 LW 对 SAMP8 主动性回避反应能力的影响　SAMP8 条件性主动回避反应次数明显减少，主动回避潜伏期则明显延长(同 SAMR1 相比)，说明 SAMP8 条件性主动回避反应能力明显降低。长期给予 LW 对 SAMP8 条件性主动回避反应次数并无明显影响，但可显著缩短 SAMP8 第 7d 和第 8d 主动回避反应潜伏期(图 2)。

2.4　LW 对 SAMP8 空间记忆能力的影响　SAMP8 游到水迷宫终点安全区的潜伏期明显延长，经过 4 个盲端所犯错误数明显增多(同 SAMR1 小鼠相比)，说明 SAMP8 空间记忆能力明显下降。长期给予 LW 在实验阶段的第 2d 即可明显缩短 SAMP8 游至终点的潜伏期并显著地减少 SAMP8 经过 4 个盲端所犯的总错误数(图 3)。

3　讨论

快速老化模型小鼠(SAM)系由日本京都大学 Takeda 教授培育成功，包括快速老化的 P 系(SAMP)和抗快速老化的 R 系(SAMR)两个大系。SAMP8 是 P 系的亚系之一，研究证明 SAMP8 除具有快速老化等 P 系的一般特点外，其突出特征是在增龄过程中学习记忆能力加速衰退[7]。本实验发现 6 月龄 SAMP8 治疗性口服含 LW 的药物饲料，连续 5 个月，可显著降低 SAMP8 在被动



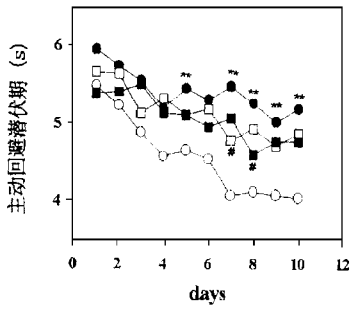
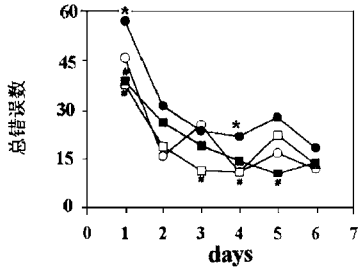


图 2　长期给予六味地黄汤(LW)对穿梭箱实验中 SAMP8 条件性回避反应能力的影响



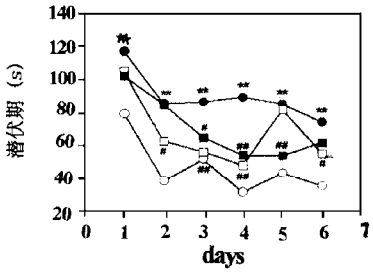


图 3　长期给予六味地黄汤(LW)对水迷宫实验中 SAMP8 空间记忆能力的影响

回避实验中的总错误数并提高 SAMP8 躲避电击的成功率，缩短水迷宫实验中 SAMP8 游至终点的潜伏期，减少小鼠经过盲端所犯的错误数。同时对 SAMP8 条件性回避反应能力亦有一定的改善作用，表明 LW 对 SAMP8 学习记忆功能的衰退有明显的改善作用。自主活动是特征性描述动物自发活动能力的指标之一，自主活动能力下降往往被认为是早衰的表现之一。在本实验中，SAMP8 自主活动次数明显地低于 SAMR1，给予 LW 可增加 SAMP8 自主活动，提示 LW 不仅对 SAMP8 学习记忆能力的衰退有明显的改善作用，而且对 SAMP8 整体功能的衰退也具有对抗作用。

海马与学习记忆功能密切相关，尤其是同空间记忆(spatial memory)和工作记忆(working memory)关系密切。本实验观察到 LW 可显著改善 SAMP8 的空间记忆能力，提示 LW 的益智作用可能与改善 SAMP8 海马机能有关。LW 为一“滋补肾阴”的经典代表名方，在临床上广泛地用于肾阴虚相关疾病的预防和治疗。费伯雄《医方论》、陈修圆《时方歌括》中称“此方非但治肝肾不足，实三阴并治之剂”，“六味滋阴益肝肾”。此外，根据祖国传统中医对“肾”功能的描述，“肾主骨生髓，通于脑”，有理由认为“肾”可能与中枢认识功能存在密切关系。本文首次报道了 LW 对中枢学习记忆能力的改善作用，说明 LW 可能通过“滋补肾阴”改善 SAMP8 的学习记忆能力，提示“滋补肾阴”药物确有益智作用。有文献报道，“肾虚”主要表现为下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamus-pituitary-adrenal，HPA)轴功能的紊乱，同时伴有下丘脑-垂体-性腺轴和下丘脑-垂体-甲状腺轴功能的紊乱，使用“补肾”的中药方剂右归饮、固真方等均可纠正肾虚患者 HPA 轴功能紊乱并显著改善患者肾虚相关的临床症状[8]，说明调节 HPA 轴功能、纠正 HPA 轴功能的紊乱可以改善肾虚患者的临床症状。我们以往研究表明，SAMP8 血浆皮质酮水平明显高于其抗早衰亚系对照 SAMR1，SAMP8 血浆皮质酮水平升高、HPA 轴功能紊乱可能与其学习记忆能力加速衰退有关[9]。我们最近研究发现，长期给予 LW 可降低 SAMP8 血浆皮质酮水平，使之接近其对照 SAMR1 水平(待发表)，说明 LW 对 SAMP8 小鼠 HPA 轴功能有明显的调节作用，可部分纠正其 HPA 轴功能的紊乱，提示通过滋补肾阴可调节动物 HPA 轴功能，纠正 HPA 轴功能的紊乱。这一作用可能与 LW 的益智作用具有密切关系。进一

步关于 LW 益智作用的机理研究正在进行当中。

参考文献

1 Hyman BT, Damasio H, Damasio AR, et al. Alzheumer's disease. *Ann Rev Public Health*, 1989, 10: 115～140

2 Moos WH, Davis RE, Schwartz RD, et al. Cognition activators. *Med Res Rev*, 1988, 8: 353～391

3 Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, et al. Stage-specific behavioral, cognitive and in vivo changes in community residing subjects with age-related memory impairment and primary degenerative dementia of the Alzheimer's disease. *Drug Dev Res*, 1988, 15: 101～114

4 周金黄，刘干中，王建华，等．老年性痴呆的研究进展．中药药理与临床．第四册．北京军事医学科学出版社，1996. 219～225

5 Hirokawa S, Nose M, Ishige A, et al. Effect of Hachimi-jio-gan on scopolamine -induced memory impairment and on acetylecholine content in rat brain. *J Ethopharmacol*, 1996, 50(2): 77～84

6 Zhang YX, Saito H, Abe K. Thymectomy-induced deterioration of learning and memory in mice. *Brain Res*, 1994, 658: 127～134

7 Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, et al. A new murine model of accelerated senescence. *Mech Aging Dev*, 1981, 17(2): 183～194

8 周金黄，刘干中，王建华，等．肾虚证和补肾方药的临床与实践研究．中药药理与临床．第四册．北京军事医学科学出版社，1996. 79～92

9 Zhou jian-zheng, Zhang yong-xiang, Zhou jin-huang. Increased corticosterone levels in both plasma and hippocampus and their relationship with hippocampal ATP depletion in Senescence accelerated Mouse (SAM). *Chin J Parmacol Toxico*, 1998, 14(1): 12～15

（收稿：1998-09-10）