

## 藏药旺拉提取物对东莨菪碱致动物学习记忆障碍的改善作用及其机制研究

李 敏, 王亚芳, 马 波, 刘耕陶, 张建军\*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** 观察藏药旺拉提取物(CE)对东莨菪碱致动物学习记忆障碍的改善作用并研究其作用机制。采用腹腔注射东莨菪碱造模,以跳台法测定小鼠的学习记忆能力,以电生理方法测定大鼠海马长时程增强(LTP)的诱导,分别以生化及放射性同位素分析法测定脑匀浆中乙酰胆碱酯酶(AChE)及胆碱乙酰转移酶(ChAT)的活性。结果表明,模型动物跳下平台的潜伏期明显缩短,LTP诱导受抑制。灌胃给予CE(5、10及20 mg·kg<sup>-1</sup>)可改善模型小鼠在跳台中的表现,腹腔注射CE(5 mg·kg<sup>-1</sup>)可逆转东莨菪碱对大鼠LTP诱导的抑制。此外,CE可显著增强ChAT活性,而对AChE活性无显著影响。CE可改善东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍,其作用可能与改善海马LTP诱导及增强ChAT活性有关。

**关键词:** 旺拉; 东莨菪碱; 跳台; 长时程增强; 胆碱乙酰转移酶; 乙酰胆碱酯酶

中图分类号: R282.71; R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2009)05-0468-05

## Effect and mechanism of *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract on scopolamine-induced deficits of learning and memory behavior of rodents

LI Min, WANG Ya-fang, MA Bo, LIU Geng-tao, ZHANG Jian-jun\*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Key Laboratory Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Beijing 100050, China)

**Abstract:** The aim of the present study is to investigate the effect and mechanism of *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract (CE) on scopolamine-induced learning and memory deficits. Learning and memory deficits of mice were evaluated by step-down passive avoidance test. Long-term potentiation of rats was detected in the dentate gyrus of hippocampus. Brain acetylcholinesterase (AChE) and choline acetyltransferase (ChAT) activities were also determined. The results showed that scopolamine impaired learning and memory performance and LTP induction in hippocampus. Oral administration of CE (5, 10, and 20 mg·kg<sup>-1</sup>) significantly alleviated scopolamine-induced memory deficits measured by step-down test ( $P < 0.05$ ). CE (5 mg·kg<sup>-1</sup>, ip) significantly reversed the inhibitory effect of scopolamine on LTP in rats. In addition, CE was found to increase the activity of ChAT in rat brain. These results suggested that CE could alleviate scopolamine-induced learning and memory deficits, which might be due to the LTP-improvement and ChAT activity enhancement.

**Key words:** *Coeloglossum viride* var. *bracteatum*; scopolamine; step down; long-term potentiation; choline acetyltransferase; acetylcholinesterase

收稿日期: 2008-11-07.

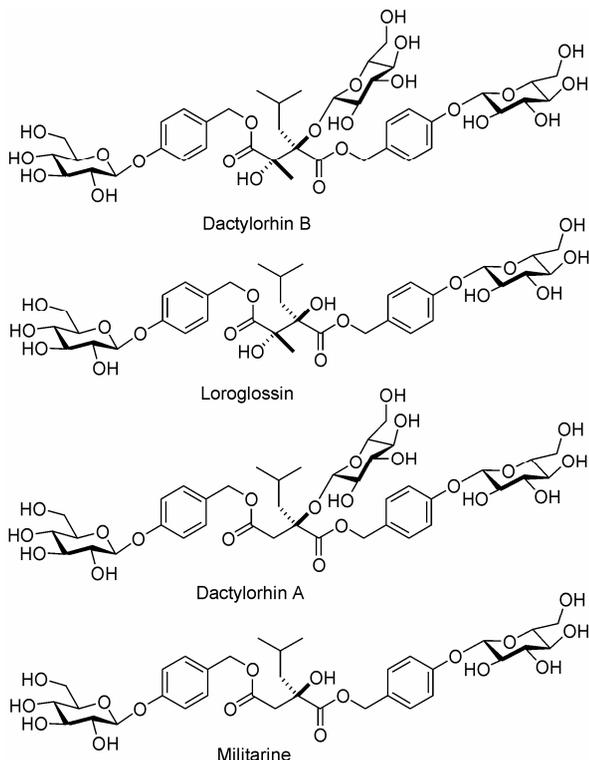
基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(2007CB507400).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63182392, E-mail: jjzhang@imm.ac.cn

旺拉是一种传统藏药,据古代藏医药著作中记载,具有补益气血、安神增智等功效,植物名为长苞凹舌兰[*Coeloglossum viride* (L.) Hartm. var. *bracteatum* (Willd.)].根据旺拉的传统药效,对其化学成分进行

了系统的研究,得到了具有增智活性的有效部位 CE (*Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract)。根据其理化性质和波谱数据,鉴定其中的主要化合物为 dactylorhin B、loroglossin、dactylorhin A 和 militarine (图 1),含量分别为 26.1%、20.7%、38.9%及 4.3%。前期研究表明,CE 可明显改善东莨菪碱、环己酰亚胺和乙醇引起的动物学习记忆功能障碍,保护神经元对抗淀粉样蛋白毒性<sup>[1]</sup>,但其作用机制仍不完全清楚。

海马脑区的长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 现象被认为是学习记忆的重要机制。许多病理因素如胆碱能损伤、 $A\beta$  沉积及脑缺血等均会导致海马 LTP 诱导障碍,动物学习记忆能力下降,而改善病理条件下 LTP 的诱导与动物学习记忆能力的增强有密切的关系<sup>[2-4]</sup>。另一方面,乙酰胆碱是学习记忆最为相关的神经递质,其合成及代谢的关键酶分别为胆碱乙酰转移酶 (choline acetyltransferase, ChAT) 和乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE)。通过促进合成酶或抑制代谢酶活性可维持突触间隙高水平的乙酰胆碱,增强胆碱能神经传递,提高学习记忆能力<sup>[5]</sup>。因此,本研究从学习记忆与突触可塑性、胆碱能神经传递的角度,观察了 CE 对东莨菪碱致痴呆模型动物的学习记忆能力、海马 LTP 诱导及乙酰胆碱酯酶和胆碱乙酰转移酶活性的影响,以此探讨 CE 对学习记忆的改善作用及其机制。



**Figure 1** Structures of four typical compounds in CE: dactylorhin B, loroglossin, dactylorhin A and militarine

## 材料与方法

**动物** 昆明种小鼠,雄性,体重 18~22 g; Sprague-Dawley (SD)大鼠,雄性,体重 200~220 g,由中国医学科学院实验动物研究所提供。

**药品与试剂** 旺拉购自青海省,由兰州大学张国梁教授鉴定,标本存放于中国医学科学院药物研究所 (批号 998204)。旺拉提取物 (CE) 由中国医学科学院药物研究所石建功教授提供,其分离过程及质量控制标准详见专利 [200410049669.6 (China)]。东莨菪碱购自 Merck 公司。石杉碱甲为豫中制药厂产品 (批号 H10940156)。多奈哌齐为卫材药业公司产品 (批号 060307A)。乙酰胆碱酯酶测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。实验用药物均以生理盐水配制。

**仪器设备** 跳台仪,中国医学科学院药物研究所研制;多导生理信号记录系统,美国 Biopac 公司;电子刺激器,成都仪器厂。

**学习记忆测定** 小鼠随机分为 6 组,分别为正常对照组,东莨菪碱模型组,CE 低、中、高剂量组 (5、10 和 20 mg·kg<sup>-1</sup>) 及多奈哌齐组 (5 mg·kg<sup>-1</sup>)。训练前,CE 组小鼠分别灌胃给予相应剂量的 CE (5、10 和 20 mg·kg<sup>-1</sup>),多奈哌齐组小鼠灌胃给予多奈哌齐 (5 mg·kg<sup>-1</sup>),对照组和模型组小鼠灌胃给予等量的生理盐水。30 min 后,CE 组、多奈哌齐组及模型组小鼠腹腔注射东莨菪碱 (1 mg·kg<sup>-1</sup>),对照组小鼠腹腔注射等量的生理盐水。30 min 后开始训练:将小鼠放入反应箱中适应环境 3 min,然后通以 36 V 交流电,其正常反应是跳回平台以躲避伤害性刺激。如此训练 5 min。24 h 后将小鼠置于平台上,记录 5 min 内小鼠第 1 次跳下平台的潜伏期。

**电极埋植** 大鼠以乌拉坦 (1.2 g·kg<sup>-1</sup>, ip) 麻醉,头部固定于立体定位仪,参照 Pellegrino 大鼠脑定位图谱钻孔埋植电极。本试验记录的是海马齿状回-穿通纤维的突触传递,记录电极位于海马齿状回:前囟后 3.8 mm,矢状缝旁 2.0 mm,颅骨表面下 3.8 mm;刺激电极位于穿通纤维:前囟后 7.5 mm,矢状缝旁 4.4 mm,颅骨表面下 3.5 mm。调整刺激电极和记录电极的位置,同时给予固定强度的刺激,当记录到最大群峰电位 (population spike, PS) 时将电极固定。

**PS 的记录及 LTP 的诱导** 测试刺激为波宽 0.1 ms 的方波,频率 1/60 Hz。强度采用引起最大 PS 所需强度的 40%。LTP 的诱导使用 100 Hz,100 串的高频刺激 (high-frequency stimulation, HFS),波宽及强度与测试刺激相同。大鼠随机分为 3 组:对照组、东莨菪碱模型组与 CE 给药组。每个测试刺激都诱发一

个 PS, 记录 15 min 基线 PS 后, CE 给药组大鼠腹腔注射 CE ( $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 对照组与模型组大鼠腹腔注射等量的生理盐水。15 min 后, 模型组与 CE 给药组大鼠腹腔注射东莨菪碱 ( $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 对照组大鼠腹腔注射等量生理盐水。再记录 15 min, 而后以 HFS 诱导 LTP, 记录 HFS 诱导后 1 h 的 PS。

**乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性的测定** 大鼠随机分为 4 组: 对照组、CE 组 ( $5$  和  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 和石杉碱甲组 ( $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 分别腹腔注射生理盐水、CE ( $5$  和  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 或石杉碱甲 ( $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 给药 1 h 后断头取脑称重, 按 1:4 (w/v) 加入冰冷的生理盐水, 制成 20% 的脑组织匀浆。AChE 活性测定的操作步骤以及活性计算按照试剂盒说明进行。

**胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 活性的测定** 大鼠随机分为 3 组: 对照组和 CE 组 ( $5$  和  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 腹腔注射生理盐水或相应剂量的 CE ( $5$  和  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。给药 1 h 后断头取脑称重, 按 1:20 (w/v) 加入 PB ( $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH=7.4, 其中含 EDTA  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 组织匀浆, 按 Fonnum 法<sup>[6]</sup>, 取匀浆液  $40 \mu\text{L}$  至 1 个空白试管, 同时加入反应液  $40 \mu\text{L}$  和  $^3\text{H}$ -乙酰辅酶 A  $20 \mu\text{L}$ , 于  $37^\circ\text{C}$  孵育 30 min 后终止反应。将孵育液移入闪烁杯, 加入四苯硼钠-乙腈溶液 2 mL 和甲苯闪烁液 10 mL, 轻摇 1 min, 使生成的  $^3\text{H}$ -乙酰胆碱提取到甲苯相 (未反应的  $^3\text{H}$ -乙酰辅酶 A 留在水相)。静置 10 min, 于液闪仪中测定其放射性强度。ChAT 活性以生成的乙酰胆碱量 [ $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{protein})\cdot\text{min}^{-1}$ ] 表示。

**数据的分析及统计** PS 的计算方法: 将连续 5 个 PS 的幅值取平均值作为该时间点的 PS 幅值, 以记录开始后 15 min 内的 PS 均值作为基线值, 再以所有时间点的 PS 幅值除以基线值, 得出各相应时间点的 PS 相对幅值 (%), 最后以时间为横坐标, PS 相对幅值 (%) 为纵坐标绘出 PS 幅值的动态变化图。所有数据以均数 $\pm$ 标准误 (mean  $\pm$  SE) 表示。跳台试验数据采用非参数检验 (Kruskal-Wallis) 结合 Dunn's test 检验。电生理实验采用方差分析 (ANOVA with repeated measures) 结合 *post hoc* LSD test 检验。生化实验采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 结合 Dunnett's test 检验。

## 结果

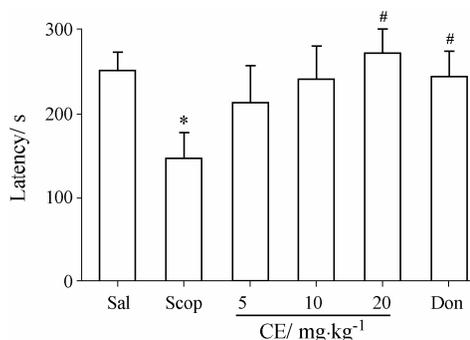
### 1 CE 对东莨菪碱诱导的学习记忆障碍的改善作用

腹腔注射东莨菪碱 ( $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 造成小鼠学习记忆障碍, 以跳台法检测动物的学习记忆能力。结

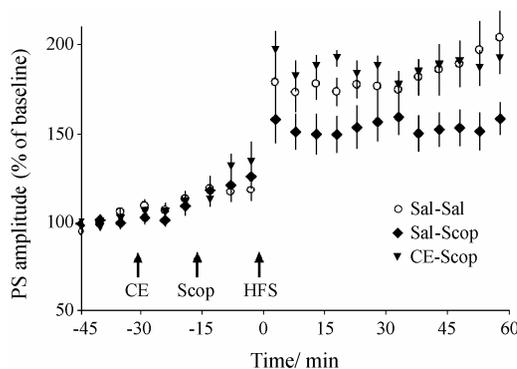
果如图 2 所示, 正常对照组小鼠跳下平台的潜伏期为 ( $250.3 \pm 22.9$ ) s, 模型组小鼠跳下平台的潜伏期显著缩短为 ( $146.9 \pm 30.8$ ) s, 缩短率达 41%, 表明小鼠的学习记忆能力下降。灌胃给予 CE ( $5$ 、 $10$  和  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 均可延长小鼠跳台潜伏期, 其中  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  CE 作用显著, 改善率达 121%, 优于多奈哌齐的作用 (改善率 94%), 提示 CE 对东莨菪碱造成的学习记忆障碍有显著改善作用。

### 2 CE 对东莨菪碱诱导的 LTP 抑制的改善作用

LTP 以群峰电位 (PS) 的幅度衡量。在高频刺激 (HFS) 诱导后, PS 的幅度比诱导前的基础值显著增加且维持较长时间 ( $>1 \text{ h}$ ) 不减弱视为 LTP 诱导成功。结果显示 (图 3),  $100 \text{ Hz}$ 、 $100$  串的 HFS 可以成功诱导



**Figure 2** Effect of CE on scopolamine-induced memory deficits measured by step-down passive avoidance test. CE ( $5$ ,  $10$ , and  $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , *po*), donepezil ( $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , *po*) or saline was administered 60 min before the training. Scopolamine ( $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , *ip*) or saline was injected 30 min before the training. The retention test was carried out 24 h after training. Step-down latencies were expressed as mean  $\pm$  SE ( $n = 15-21$ ). \* $P < 0.05$  vs control group (Sal); # $P < 0.05$  vs scopolamine group. Sal: Saline; Scop: Scopolamine; Don: Donepezil



**Figure 3** Effect of CE on scopolamine-induced inhibition of LTP in the dentate gyrus of the hippocampus of anesthetized rats. After a baseline recording of 15 min, CE ( $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , *ip*) or saline was injected and followed by scopolamine ( $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , *ip*) or saline injection 15 min later. HFS (100 pulses at  $100 \text{ Hz}$ ) was applied 15 min after the last injection. All data were presented as mean  $\pm$  SE of 8-10 observations. Sal: Saline; Scop: Scopolamine; HFS: High-frequency stimulation

大鼠海马齿状回 LTP, 表现为在 HFS 后对照组 PS 幅度比基础值升高 83%, 且维持 1 h 以上。东莨菪碱 ( $0.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , ip) 显著抑制了 LTP 的诱导, 表现为在 HFS 后模型组 PS 的幅度仅升高了 54%, 与对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。而 CE 完全逆转了东莨菪碱对 LTP 诱导的抑制, 在 HFS 后, CE 给药组 PS 的幅度升高了 88%, 与模型组比较有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 提示 CE 对东莨菪碱诱导的 LTP 的抑制具有改善作用。

### 3 CE 对大鼠脑内乙酰胆碱酯酶 (AChE) 及胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 活性的影响

表 1 为 CE 对大鼠脑匀浆 AChE 及 ChAT 活性的影响。正常大鼠脑匀浆中 AChE 的活性为 ( $0.72 \pm 0.18$ )  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , CE 组 (5 和  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 大鼠脑匀浆 AChE 的活性与对照组大鼠无显著差异, 石杉碱甲组大鼠脑匀浆 AChE 的活性显著降低, 抑制率达 33%。另一方面, 正常大鼠脑匀浆 ChAT 的活性为 ( $5.72 \pm 0.40$ )  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{protein})\cdot\text{min}^{-1}$ , CE 组 (5 和  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 大鼠脑匀浆 ChAT 的活性显著升高, 升高率分别达 139% 及 152%。

**Table 1** Effect of CE on AChE and ChAT activities in rat brain

Group	Dose / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	AChE activity / $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	ChAT activity/ $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{protein})\cdot\text{min}^{-1}$
Control	-	$0.72 \pm 0.18$	$5.72 \pm 0.40$
Huperzine A	1	$0.48 \pm 0.10^*$	-
CE	5	$0.80 \pm 0.16$	$13.68 \pm 1.02^{***}$
	10	$0.72 \pm 0.18$	$14.43 \pm 1.35^{***}$

$n = 10$ , mean  $\pm$  SE. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

## 讨论

本试验采用腹腔注射东莨菪碱造成动物学习记忆障碍模型, 观察了 CE 在跳台试验中对动物学习记忆能力的影响以及在 LTP 试验中对海马突触可塑性的影响, 同时观察了 CE 对大鼠脑内乙酰胆碱酯酶及胆碱乙酰转移酶活性的影响。结果表明, CE 可显著改善东莨菪碱所致的学习记忆及突触可塑性障碍, 并可显著升高大鼠脑内胆碱乙酰转移酶的活性。

东莨菪碱是非选择性 M 受体拮抗剂, 可模拟临床胆碱能功能低下导致的痴呆, 被广泛用于抗痴呆药物的评价。跳台学习过程属于被动回避反应的一种, 需要激活脑内胆碱能系统来完成学习任务, 因此是研究胆碱能对学习记忆影响的理想模型<sup>[7]</sup>。根据给予东莨菪碱的时间点不同, 跳台被动回避试验可被用于检测三个阶段的记忆过程 (记忆获得, 记忆巩固, 记忆

再现)。在本试验中, 训练前 30 min 给药与记忆获得相关。与以往结果一致, 本试验表明, 训练前 30 min 腹腔注射东莨菪碱可造成动物学习记忆障碍。CE 可剂量依赖性地延长跳台潜伏期, 显著改善了东莨菪碱模型小鼠的行为表现。

东莨菪碱对海马 LTP 诱导的抑制作用已有很多报道。Tanaka 等<sup>[2]</sup>首次证明了东莨菪碱可显著抑制豚鼠海马脑片 CA3 区 LTP 的诱导。Hirotsu 等<sup>[8]</sup>进一步指出, 东莨菪碱的抑制作用仅在高频率刺激前给予东莨菪碱有效, 而高频刺激后给予无影响。但在不同试验中, 东莨菪碱对 LTP 诱导的抑制程度并不完全一致。原因仍不清楚, 可能由于诱导刺激强度、动物种属、给药途径及剂量等差异所致。与 Sakata 等<sup>[9]</sup>的研究一致, 本研究的结果同样证明了东莨菪碱可以显著抑制大鼠海马齿状回的 LTP 的诱导。

LTP 是突触可塑性的一种形式。本研究最重要的发现是 CE 几乎完全拮抗了东莨菪碱对海马齿状回 LTP 诱导的抑制, 表明 CE 可以改善海马突触可塑性障碍。许多研究提示了海马齿状回 LTP 和学习记忆联系紧密, 尤其是联想式学习 (associate learning)<sup>[9,10]</sup>。因此, CE 对海马齿状回 LTP 的改善作用可能是其改善学习记忆的机制之一。另一方面, 作者在预试验中发现, CE 对正常大鼠基础诱发电位无显著影响, 对正常大鼠海马 LTP 的诱导 (100 Hz、100 串高频刺激) 也没有显著影响, 提示 CE 不能直接诱导或增强正常动物的突触可塑性, 但可改善胆碱能障碍动物的突触可塑性。

中枢乙酰胆碱能系统功能的显著减退是 AD 早期出现的主要病理变化, 并且持续整个病程。因此, 具有增强乙酰胆碱能作用的药物在老年痴呆症的治疗方面发挥了重要作用<sup>[11]</sup>。在本试验中, CE 可以使大鼠脑内胆碱乙酰转移酶活性升高, 而对乙酰胆碱酯酶活性无显著影响。这一结果表明, CE 对胆碱乙酰转移酶活性的升高可能是其改善学习记忆障碍的机制之一, 与胆碱酯酶抑制剂改善学习记忆的机制不同。

总之, 东莨菪碱可以诱导学习记忆障碍, 其机制可能与抑制海马 LTP 的诱导相关。本研究表明, CE 可以改善东莨菪碱诱导的学习记忆障碍, 而这一效应可能与改善海马脑区 LTP 的诱导及增加胆碱乙酰转移酶活性有关。

**致谢:** 中国医学科学院药物研究所石建功教授提供 CE 样品。中国医学科学院基础医学研究所左萍萍教授在同位素试验中给予帮助。

## References

- [1] Zhang D, Liu GT, Shi JG, et al. *Coeloglossum viride* var. *bracteatum* extract attenuates *d*-galactose and NaNO<sub>2</sub> induced memory impairment in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 104: 250–256.
- [2] Tanaka Y, Sakurai M, Hayashi S. Effect of scopolamine and HP 029, a cholinesterase inhibitor, on long-term potentiation in hippocampal slices of the guinea pig [J]. *Neurosci Lett*, 1989, 98: 179–183.
- [3] Lynch MA. Long-term potentiation and memory [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84: 87–136.
- [4] Cooke SF, Bliss TV. Long-term potentiation and cognitive drug discovery [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2005, 6: 25–34.
- [5] Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis [J]. *Exp Neurol*, 2000, 163: 495–529.
- [6] Fonnum F. A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase [J]. *J Neurochem*, 1975, 21: 407–409.
- [7] Tinsley MR, Quinn JJ, Fanselow MS. The role of muscarinic and nicotinic cholinergic neurotransmission in aversive conditioning: comparing pavlovian fear conditioning and inhibitory avoidance [J]. *Learn Memory*, 2004, 11: 35–42.
- [8] Hirotsu I, Hori N, Katsuda N, et al. Effect of anticholinergic drug on long-term potentiation in rat hippocampal slices [J]. *Brain Res*, 1989, 482: 194–197.
- [9] Sakata Y, Ishige K, Ohtakara T, et al. Natural drug extracts for a nutritive- tonic drink, promotes the induction of long-term potentiation in rat hippocampal dentate gyrus *in vivo* [J]. *Neurosci Res*, 2006, 55: 327–333.
- [10] Zhou Y, Song H, Ning Z, et al. Effects of *Panax notoginseng* saponins on long-term potentiation in the CA1 region of the rat hippocampus [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 1137–1141.
- [11] Zhang JT. Pathogenesis and therapeutic strategies of senior dementia [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2000, 35: 635–640.