

石菖蒲挥发油微乳对慢性应激小鼠记忆的影响及其机理研究

王光明, 李绍林, 蔡琳, 刘卫海

广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520

[摘要] 目的: 建立慢性应激小鼠模型, 观察石菖蒲挥发油微乳对慢性应激小鼠记忆的调节作用, 并初步探讨其作用机制。方法: 将 36 只昆明小鼠随机分为 3 组, 每组 12 只, 分别为空白对照组、慢性应激组、慢性应激+石菖蒲挥发油微乳组(给药组)。空白对照组正常喂养, 慢性应激组每天进行 8 h “慢性应激束缚实验”, 给药组给予石菖蒲挥发油微乳 4.5 g/(kg·d) 灌胃, 同时与慢性应激组同步进行“慢性应激束缚实验”。观察小鼠一般状态并测量其体质量, 利用 Morris 水迷宫观察小鼠的空间学习记忆能力, 并检测小鼠血清糖皮质激素水平。结果: 实验第 28 天时, 与空白对照组比较, 慢性应激组小鼠体质量明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与慢性应激组比较, 给药组小鼠的体质量增长明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与空白对照组比较, 慢性应激组小鼠在训练期间的平均潜伏期明显较长, 平台穿越次数也显著减少, 血浆皮质醇水平较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。与慢性应激组比较, 给药组小鼠的训练平均潜伏期缩短, 平台穿越次数增多, 血清中皮质醇水平明显下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: 石菖蒲挥发油微乳具有改善慢性应激小鼠记忆的作用, 其机制与降低血清糖皮质激素水平有关。

[关键词] 石菖蒲; 慢性应激; 记忆; 糖皮质激素; 动物实验; 小鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2017) 12-0004-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.12.002

Shichangpu Volatile Oil Microemulsion Can Improve the Memory of Mice with Chronic Stress

WANG Guangming, LI Shaolin, CAI Lin, LIU Weihai

Abstract: **Objective:** To establish a chronic stress mouse model, and observe the regulatory effect of Shichangpu volatile oil microemulsion on the memory of mice model, so as to discuss its mechanism preliminarily. **Methods:** Divided 36 Kunming (KM) mice into 3 groups randomly, 12 cases in each group, namely blank control group, chronic stress group and combination of chronic stress and Shichangpu volatile oil microemulsion group (the treatment group). Blank control group received the normal diet, chronic stress group received “the chronic restraint stress experiment”, and the treatment group received the intragastric administration with 4.5 g/(kg·d) of microemulsion of Shichangpu volatile oil as well as “the chronic restraint stress experiment”. Observed the general state of mice, and measured their body mass. Observed the spatial learning and memory ability of mice by means of Morris water maze, and detected the level of serum glucocorticoid. **Results:** At the 28th day of the experiment, comparing with blank control group, body mass of the chronic stress group was decreased evidently, the difference being significant ($P < 0.05$). Comparing with chronic stress group, body mass of the treatment group was increased evidently, the difference being significant ($P < 0.05$). Comparing with blank control group, the latencies of mice in chronic stress group were evidently longer, times of passing through the platform were also reduced significantly, and levels of plasma cortisol were relatively high, differences being significant ($P < 0.01$). Comparing with the chronic stress group, the latencies of mice in the treatment group were shortened, times of passing through the platform were also increased, and levels of plasma cortisol were declined significantly, differences being significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** The microemulsion of Shichangpu volatile oil has the function of improving the memory of mice with chronic stress, the mechanism of which is related to the decrease of levels of serum glucocorticoid.

Keywords: Shichangpu; Chronic stress; Memory; Glucocorticoid; Animal experiment; Mice

[收稿日期] 2017-05-18

[基金项目] 广东省科技计划项目(2013B021800173); 广东省中医药局项目(20141211); 广东食品药品职业学院院级项目(2013YZ006)

[作者简介] 王光明 (1966-), 男, 副教授, 主要从事中药药理研究。

[通信作者] 李绍林, E-mail: lisl@gdzy.edu.cn.

近年来随着社会的发展、生活节奏的加快、竞争压力的增大,现代人往往处于一种慢性应激状态。短暂、适度的应激刺激有助于提高机体的适应能力,但是慢性应激会激活下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA轴)并释放大量的糖皮质激素,糖皮质激素持续升高,损伤机体的学习和记忆功能。在人类和许多其他哺乳动物中,皮质醇是糖皮质激素的主要形式^[1],研发慢性应激所致认知障碍的新型治疗药物是当前药物学家关注的热点和难点。石菖蒲是天南星科植物多年生草本植物 *Acorus tatarinowii* Schott 的干燥根茎,是常用的益智中药^[2]。《神农本草经》称石菖蒲“开心孔,通九窍”。《名医别录》载:石菖蒲久服聪耳目,益心智。石菖蒲挥发油是否能够改善慢性应激造成的记忆损害未见报道。本研究以石菖蒲挥发油微乳为研究对象,观察其对慢性应激小鼠记忆的影响,并对其作用机制进行初步探索,从而为石菖蒲的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与主要仪器、试剂 SPF级雄性5~6周的昆明小鼠36只,由广东省实验动物中心提供,实验动物质量许可证号:44005800003406,在广州中医药大学科技园动物房[使用许可证号:SYXK(粤)2013-0014]饲养并进行实验。本动物实验所有操作均严格按照《试验动物管理条例》和《关于善待试验动物的指导性意见》的相关规定执行。昆明小鼠随机放置标准的笼子里(6只/每笼),通风环境,充足的食物与水,适应性饲养1周。Morris水迷宫(北京杰日欧公司);Noldus Ethovision XT软件(荷兰Noldus公司);鼠行为限制器由聚酯透明材料构成的圆柱形管状,方便观察小鼠的行为状态,限制器的顶端有56个直径1cm的通气小孔,保证小鼠的呼吸畅通,以免影响动物模型的建立,限制器的长度610cm(可调节),内径3cm。糖皮质激素ELISA检测试剂盒(美国ENZO公司),Cremophor EL(聚氧乙烯醚蓖麻油)(德国,BASF),油酸乙酯、异丙醇(广州铭旺生物科技有限公司),石菖蒲挥发油微乳自制(每克微乳相当于生药1.67g)。

1.2 石菖蒲挥发油微乳的制备 石菖蒲饮片购自康美药业股份有限公司(批号:15082701),经广东省中医院陈燕芬主任中药师鉴定为天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott 的干燥根茎,符合《中国药典》2015年版中关于石菖蒲药材的要求。石菖蒲饮片粉碎过40目筛,经超临界CO₂萃取(萃取压力22.5MPa,萃取温度43℃,解析压力4.0MPa,解析温度25℃,萃取时间126min),从萃取釜收集挥发油,备用。取超临界萃取所得挥发油与油酸乙酯按1:1混合均匀作为微乳油相,加入8倍量混合表面活性剂(Cremophor EL与异丙醇之比为1:1),充分搅拌均匀后,往混合相中缓慢加入5倍量水相,边加水边匀速搅拌至清澈状,即得石菖蒲挥发油微乳(每克微乳样品含生药1.67g),密封,4℃保存,备用。

1.3 实验分组与给药 依据体质量情况将36只小鼠随机分为3组,每组12只,分别为空白对照组、慢性应激组、慢性应

激+石菖蒲挥发油微乳组(给药组)。空白对照组正常饲养,慢性应激组每天进行8h“慢性应激束缚实验”(当日23:00~次日7:00,详情见1.4),连续28天;给药组给予石菖蒲挥发油微乳4.5g/(kg·d)灌胃,早上8:00、傍晚18:00各灌胃1次,连续灌胃28天,同时与慢性应激组同步进行“慢性应激束缚实验”。

1.4 慢性束缚应激实验 慢性束缚应激是将受试小鼠置入束缚管中限制其活动而造成的一种应激刺激。实验者将小鼠置于鼠行为限制器中,保持小鼠仅能呼吸运动,每天8h(当日23:00~次日7:00),连续28天,束缚应激结束后放回饲养笼,束缚应激期间对照组小鼠禁饮禁食8h。

1.5 Morris水迷宫实验 参照文献[3]方法,Morris水迷宫置于空间信息丰富的实验周围环境,整个实验期间周围环境信息固定不变。在水池上标定同一点作为每次实验入水点,站台置于离入水点较远的象限的中间。各组小鼠分别进行相应实验处理28天后,分别进行Morris水迷宫实验。第1~5天为空间定向条件反射训练,空间参考记忆获得:每天训练4次,每次90s,各次训练间隔1min,每次入水位置随机,记录入水到爬上平台时间为训练潜伏期。若小鼠在最大潜伏期(90s)内找不到平台则由实验人员引导其到平台,并使其在平台上休息1min以形成记忆,该次训练潜伏期则记为90s。第6天进行空间定向能力测试,测定空间记忆的保持,平台移去后,将小鼠面向桶壁放入水中,入水位置固定。用摄像系统记录小鼠2min内在水迷宫中的活动,采用Noldus行为分析系统进行统计分析,记录学习寻找平台的潜伏期、平台穿越次数,以判断小鼠记忆储存及提取再现能力^[4]。

1.6 一般状态观察 每天观察小鼠的毛发色泽、身体姿态、精神状态、活动情况、耳廓色泽,对束缚应激的反抗情况以及粪便等。

1.7 小鼠体质量变化 实验开始前测量1次小鼠体质量,依据小鼠体质量情况随机进行分组,此后每周测量小鼠体质量1次,观察小鼠体质量变化。

1.8 小鼠血清中糖皮质激素水平检测 小鼠眼眶采血,制备血清,颈椎脱臼法处死。ELISA试剂盒检测血清糖皮质激素水平,操作步骤按照试剂盒说明进行。

1.9 统计学方法 采用SPSS19.0软件进行统计学处理,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 各组小鼠一般状态 开始实验前,各组大鼠精神状态正常、动作反应灵敏。从第7天开始,与空白对照组比较,慢性应激组小鼠活动有减少的趋势,第14天慢性应激组小鼠精神状态低靡、易惊,反应慢,活动减少,第28天,慢性应激组小鼠少动、少食、无欲状态,在受到外界攻击时不仅表现为无逃逸,且发出恐惧的叫声。经石菖蒲干预后,给药组小鼠

整个实验过程精神较好,动作灵活,与空白对照组小鼠无明显差异。

2.2 各组小鼠实验前后体质量比较 见表1。实验前,各组小鼠体质量差异无统计学意义($P>0.05$)。实验第14天时,慢性应激组小鼠体质量低于空白对照组,说明应激使动物体质量减轻。实验第28天时,与空白对照组比较,慢性应激组小鼠体质量明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。与慢性应激组比较,给药组小鼠的体质量增长明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表1 各组小鼠实验前后体质量比较($\bar{x}\pm s$) g

组别	n	实验前	实验第14天	实验第28天
空白对照组	12	22.35±1.86	27.72±2.34	30.65±2.75
慢性应激组	12	22.75±1.72	26.17±1.75	27.83±2.06 ^①
给药组	12	22.40±1.54	27.18±1.67	29.71±2.01 ^②

与空白对照组比较,① $P<0.05$;与慢性应激组比较,② $P<0.05$

2.3 各组小鼠 Morris 水迷宫实验比较 见表2。与空白对照组比较,慢性应激组小鼠在训练期间的平均潜伏期明显较长,平台穿越次数也显著减少,差异均有统计学意义($P<0.01$),这说明慢性应激损害了小鼠的学习能力和空间记忆能力。与慢性应激组比较,给药组小鼠的训练平均潜伏期缩短,平台穿越次数增多,差异均有统计学意义($P<0.01$)。

表2 各组小鼠 Morris 水迷宫实验比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	训练平均潜伏期(s)	平台穿越次数
空白对照组	9.02±1.52	6.54±1.36
慢性应激组	17.38±3.05 ^①	2.86±0.78 ^①
给药组	10.21±1.84 ^②	6.11±0.99 ^②

与空白对照组比较,① $P<0.01$;与慢性应激组比较,② $P<0.01$

2.4 各组小鼠血清皮质醇水平比较 见表3。与空白对照组比较,慢性应激组小鼠血浆皮质醇水平较高,差异有统计学意义($P<0.01$)。与慢性应激组比较,给药组小鼠血清中皮质醇水平明显下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。

表3 各组小鼠血清皮质醇水平比较($\bar{x}\pm s, n=12$) $\mu\text{g/L}$

组别	皮质醇
空白对照组	4.15±0.94
慢性应激组	10.58±1.86 ^①
给药组	6.38±1.72 ^②

与空白对照组比较,① $P<0.01$;与慢性应激组比较,② $P<0.01$

3 讨论

本试验发现,经慢性应激束缚实验后,应激组小鼠一般状

态与体质量与空白对照组比较都出现显著下降,说明应激实验对小鼠的生命健康有显著影响,而给予石菖蒲挥发油微乳干预的给药组,可以显著缓解上述症状的出现,说明石菖蒲挥发油微乳对小鼠的慢性束缚应激反应有较好的改善作用。

本试验发现,28天的慢性束缚应激使小鼠体质量较空白对照组明显下降,活动减少,与空白对照组比较,训练平均潜伏期显著延长、平台穿越次数显著减少,慢性束缚实验损害了小鼠海马的空间学习与记忆能力,这和文献报道^[6]一致。而给予石菖蒲挥发油微乳干预的给药组,与慢性应激组相比,训练平均潜伏期、测试平台穿越次数都显著改善,研究表明,石菖蒲挥发油微乳可逆转慢性应激小鼠的学习记忆能力。

随着人们生活节奏的加快,我们每天都要面对各种各样的应激,加拿大著名的生理学家 Hans Selye 1936 年首次提出“应激”这个概念。当机体受到应激时,各种应激源通过神经末梢感受器将信息传递至下丘脑,一方面,通过对自主神经、神经内分泌和神经体液的调节,做出应对准备;另一方面,将这些信息传递给大脑,根据个体反应模式,做出思维判断后再将信息反馈至丘脑和下丘脑,增强下丘脑作用。本研究结果表明,慢性应激常伴糖皮质激素显著增高。富含糖皮质激素受体的海马结构易感于应激,而海马是学习记忆的重要部位,因此,慢性应激可损害海马的学习记忆功能^[6-7],研究改善慢性应激导致的学习记忆障碍的产品十分必要。

石菖蒲味辛微温,入心肝脾胃经,辛开芳化,中医学认为服食石菖蒲有耳聪目明、益智宽胸、祛湿解毒之功效。现代药理实验结果表明,石菖蒲有效成分起可以明显改善痴呆小鼠的学习记忆功能^[8]。Mao J 等^[9]的研究结果也表明,石菖蒲及其活性成分细辛醚能够促进在体神经干细胞增殖和神经发生,其机制与调控 ERK 蛋白激酶的级联反应直接促进神经干细胞增殖和神经发生有关。本研究发现石菖蒲挥发油微乳可以改善慢性应激引起的认知损害,使用石菖蒲挥发油微乳干预后,可以显著降低慢性束缚应激实验产生的糖皮质激素水平,学习记忆能力得到显著改善,其机制与降低血清中糖皮质激素水平有关,这可为后期将石菖蒲挥发油微乳开发成为益智保健产品提供实验依据。

[参考文献]

- [1] Rahman MM, Callaghan CK, Kerskens CM, et al. Early hippocampal volume loss as a marker of eventual memory deficits caused by repeated stress [J]. Sci Rep, 2016, 6: 29127.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015年版,一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:91-92.
- [3] 宿艳敏. Morris 水迷宫实验中三种小鼠的学习能力及其性别差异[D]. 石家庄:河北医科大学,2013.
- [4] Edwards SR, Hamlin AS, Marks N, et al.

- Comparative studies using the Morris water maze to assess spatial memory deficits in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2014, 41(10): 798–806.
- [5] 张兆一, 任美玲, 杨朋, 等. 慢性应激大鼠海马 DG 区牛磺酸在空间学习记忆过程中的变化[J]. *中国实验诊断学*, 2016, 20(6): 871–874.
- [6] Dorey R, Pierard C, Chauveau F, et al. Stress induces memory retrieval impairments: different time-course involvement of corticosterone and glucocorticoid receptors in dorsal and ventral hippocampus[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2012, 37(13): 2870–2880.
- [7] Sekine Y, Zyryanova A, Crespillo-Casado A, et al. Stress responses. Mutations in a translation initiation factor identify the target of a memory-enhancing compound[J]. *Science*, 2015, 348(6238): 1027–1030.
- [8] 郭俊, 陈云波, 魏刚, 等. 石菖蒲活性成分及其不同比例配伍对痴呆小鼠学习记忆功能的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2012, 23(2): 144–147.
- [9] Mao J, Huang S, Liu S, et al. A herbal medicine for Alzheimer's disease and its active constituents promote neural progenitor proliferation[J]. *Aging Cell*, 2015, 14(5): 784–796.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

铁皮枫斗颗粒治疗亚硝基胍诱发慢性萎缩性胃炎大鼠作用观察

聂晓静¹, 吴人照², 龙华晴^{1,2}, 马津真^{1,2}, 陈宇²,
戴关海², 陈璇², 童晔玲², 任泽明², 杨芳亮³

1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053
2. 浙江省中医药研究院, 浙江 杭州 310007
3. 浙江天皇药业有限公司, 浙江 杭州 310012

【摘要】目的: 探讨铁皮枫斗颗粒治疗亚硝基胍(MNNG)诱发慢性萎缩性胃炎(CAG)模型大鼠的萎缩逆转作用。方法: Wistar 大鼠自由饮用浓度为 167 μg/mL 的 MNNG 水溶液, 建立慢性萎缩性胃炎大鼠模型。确定成模后, 将造模成功的大鼠分为模型组、铁皮枫斗颗粒组、叶酸片组, 另设没有经过处理的大鼠为正常组。模型组灌胃生理盐水, 铁皮枫斗颗粒组灌胃铁皮枫斗颗粒为 1.2 g/(kg·d), 叶酸片组灌胃叶酸片为 5.0 mg/(kg·d)。观察大鼠体质量、胃组织病理组织学情况。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠在治疗前和治疗第 8 周时体质量显著降低, 炎症等级较高, 腺体数量明显减少, 腺体厚度明显降低, 主细胞明显减少, 胃组织出现不典型增生和肠化生的数量较多, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较, 治疗第 8 周时, 铁皮枫斗颗粒组和叶酸片组大鼠的体质量显著升高, 炎症等级降低, 腺体数量明显增多, 腺体厚度明显升高, 胃组织不典型增生和肠化生现象明显好转, 不典型增生和肠化生的数量明显减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与叶酸片组比较, 铁皮枫斗颗粒组大鼠的体质量较高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 铁皮枫斗颗粒与叶酸片均对 CAG 模型大鼠具有良好的治疗作用, 可以减轻大鼠体质量丢失, 减轻胃黏膜炎症等级、腺体萎缩、不典型增生。

【关键词】慢性萎缩性胃炎; 铁皮枫斗颗粒; 叶酸片; 胃组织不典型增生; 肠化生; 动物实验; 大鼠

【中图分类号】 R573.3+2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 0256-7415 (2017) 12-0007-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.12.003

Tiepi Fengdou Granules Have Greatly Curative effect in Treating Rats with Chronic Atrophic Gastritis Induced by MNNG

NIE Xiaojing, WU Renzhao, LONG Huaqing, MA Jinzhen, CHEN Yu, DAI Guanhai,
CHEN Xuan, TONG Yeling, REN Zeming, YANG Fangliang

Abstract: Objective: To study the atrophy reversal effect of Tiepi Fengdou granules in treating model rats with chronic

【收稿日期】 2017-05-15

【基金项目】 浙江省重大科技专项资助项目 (2009C13032); 浙江省自然科学基金项目 (LY15H280011); 国家科技重大专项重大新药创制课题资助项目 (2016ZX09101069)

【作者简介】 聂晓静 (1990-), 女, 学士学位, 研究方向: 中医临床基础。

【通信作者】 吴人照, E-mail: wufeng03@126.com。