

益肾化浊方对快速老化 P8 小鼠学习记忆能力及精神行为影响 *

于臻¹, 程汝珍², 张伟², 吴丹², 张琳琳^{3△}

(1. 天津市中医药研究院附属医院, 天津 300120; 2. 天津中医药大学, 天津 301617;
3. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300250)

摘要: 目的 观察中药益肾化浊方对快速老化 P8(SAMP8)小鼠学习记忆能力及精神行为的影响。方法 将 20 只 3 月龄雄性 SAMP8 小鼠随机分为模型(SAMP8)组和益肾化浊方(YSHZ)组, 每组 10 只, 并选用 10 只抗快速老化小鼠(SAMR1)作为对照。YSHZ 组予益肾化浊方按生药 6.24g/(kg·d)进行灌胃, 其他两组予以等量蒸馏水, 每天 1 次, 持续 12 周。采用 Morris 水迷宫评价小鼠的学习记忆能力, 旷场实验和高架十字迷宫评价其精神行为情况。**结果** 水迷宫实验显示, 各组小鼠平均游泳速度无统计学差异($P>0.05$); 与 SAMR1 组相比, SAMP8 组小鼠逃避潜伏期显著延长、穿越平台次数显著减少($P<0.05$); 与 SAMP8 组相比, YSHZ 组小鼠避潜潜伏期显著缩短、穿越平台次数显著增加($P<0.05$)。旷场实验和高架十字迷宫结果显示, 与 SAMR1 组相比, SAMP8 组小鼠总运动距离、进入中心区域次数及在开放臂停留的时间比例均显著减少($P<0.05$); 与 SAMP8 组相比, YSHZ 组小鼠总运动距离和进入中心区域次数均显著增加($P<0.05$), 在开放臂停留的时间比例有增加的趋势($P>0.05$)。**结论** 益肾化浊方可有效改善 SAMP8 小鼠早期学习记忆能力减退及精神行为异常。

关键词: 益肾化浊方; 阿尔茨海默病; 快速老化小鼠; 学习记忆; 精神行为

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2021)03-0006-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2021.03.002

Effects of Yishen Huazhuo Decoction on Learning and Memory Ability and Psychiatric Behavior in Senescence-Accelerated Mouse-Prone 8

YU Zhen¹, CHENG Ruzhen², ZHANG Wei², WU Dan², ZHANG Linlin³

(1. Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Tianjin 300120, China;

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China;

3. Second Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300250, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe the effect of Yishen Huazhuo Decoction on the learning and memory ability and psychiatric behavior of senescence-accelerated-prone mouse-8 (SAMP8). **Methods** Twenty 3-month-old male SAMP8 mice were randomly divided into model group (SAMP8) and Yishen Huazhuo Decoction (YSHZ) group, with 10 mice in each group. Ten 3-month-old male senescence-accelerated mouse resistant 1 (SAMR1) mice were used as the control group (SAMR1). YSHZ group was given Yishen Huazhuo Decoction by 6.24 g/(kg·d) of crude drug, while SAMP8 and SAMR1 groups were given the same amount of distilled water once a day for 12 weeks. Morris water maze (MWM) was applied to evaluate the learning and memory ability of the mice. Open field test (OFT) and elevated plus maze (EPM) were employed to measure their psychiatric behavior. **Results** The results of MWM showed that there was no significant difference in the average swimming speed among the groups ($P>0.05$). Compared with SAMR1 group, the escape latency of SAMP8 group was significantly prolonged and the number of crossing platform was significantly reduced ($P<0.05$). Compared with SAMP8 group, the escape latency of YSHZ group was significantly shortened and the number of crossing platform was significantly

收稿日期: 2021-04-20

* 基金项目: 国家自然科学基金(81873272)

第一作者简介: 于臻(1992-), 女, 医师, 博士, 研究方向: 中西医结合防治脑病。

△通信作者: 张琳琳, E-mail: zllcr@163.com

increased ($P<0.05$). The results of OFT and EPM revealed that compared with the SAMR1 group, the total movement distance, the number of times to enter the central zone and the proportion of time to stay in the open arms of SAMP8 group were significantly reduced ($P<0.05$), while compared with SAMP8 group, the first two indicators of YSHZ group were significantly increased ($P<0.05$), and the proportion was increased ($P>0.05$). **Conclusion** Yishen Huazhuo Decoction can effectively improve the early learning and memory impairment and psychiatric disorders of SAMP8 mice.

KEY WORDS: Yishen Huazhuo Decoction; Alzheimer's disease; senescence-accelerated mouse; learning and memory; psychiatric behavior

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)以进行性记忆减退及其他认知功能障碍、精神行为异常和日常生活能力下降为主要临床症状^[1], 90%于 65 岁以后发病, 是最常见的痴呆原因^[2]。目前我国 AD 患者超过 1 000 万, 是全球 AD 患者数量最多的国家^[3]。前期研究发现, 益肾化浊方可有效改善轻度 AD 患者临床症状^[4]。在此基础上, 本研究选取 3 月龄 SAMP8 小鼠作为研究对象, 旨在观察益肾化浊方对其学习记忆能力及精神行为的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物 SPF 级 3 月龄雄性 SAMP8 小鼠 20 只, 体质量 20~25 g, 3 月龄雄性抗快速老化小鼠(senescence-accelerated-resistant mouse-1, SAMR1)小鼠 10 只, 体质量 20~25 g, 均由天津中医药大学第一附属医院提供。饲养于天津市南开医院实验动物中心, 明暗交替 12 h/12 h, 室温 23~25 ℃, 相对湿度为 50%~60%, 自由摄食与饮水。实验过程中所有操作遵循《实验动物管理与使用指南》^[5]。

1.2 药物与主要仪器 益肾化浊方组成: 女贞子 10 g, 淫羊藿 10 g, 肉苁蓉 10 g, 制何首乌 6 g, 石菖蒲 6 g, 川芎 6 g, 一次性购于天津中医药大学第二附属医院中药房。为保证灌胃期间药物的稳定性^[6], 便于保存同时利于质量控制, 将上述中药饮片提取浓缩、真空冷冻干燥后制成中药复方冻干粉, 于阴凉干燥处密封保存备用。

旋转蒸发仪(郑州英峪予华仪器有限公司, RE-201D), 原位冻干机(无锡沃信仪器有限公司, VS-502FD), Morris 水迷宫视频分析系统(北京众实迪创科技发展有限公司 ZS-001), ANY-maze 动物行为分析系统(美国 Stoelting 公司)及旷场实验检测箱, 高架十字迷宫实验视频分析系统(北京众实迪创科技发展有限公司, ZS-DSG)。

1.3 分组及干预 将 20 只 SAMP8 小鼠随机分成模

型(SAMP8)组、益肾化浊方(YSHZ)组各 10 只, 10 只 SAMR1 小鼠作为对照组。各组小鼠进行灌胃干预: YSHZ 组予以益肾化浊方, 模型组和对照组予以蒸馏水。YSHZ 组给药剂量参考《药理实验方法学》^[7]中体表面积法, 根据人(70 kg)与小白鼠(20 g)之间 0.002 6 的折算系数进行计算, 按患者每日服用益肾化浊方生药 48 g, 则 20 g 小鼠每日生药量为 0.124 8 g, 即生药 6.24 g/kg, 将上述益肾化浊方中药复方冻干粉用蒸馏水配成相应浓度的药液。各组小鼠每日灌胃 1 次, 持续 12 周。

1.4 Morris 水迷宫 灌胃结束后参照 Vorhees 等^[8]实验方案, 向水迷宫的圆形水池中注入清水使水深达 30 cm, 加入黑色复配着色剂使水呈现为不透明的黑色, 水温控制在 21~22 ℃。将黑色的目标平台隐藏于第一象限水面下 1 cm, 以进行定位航行实验。

1.4.1 定位航行实验 每天每只小鼠进行 4 次检测, 共持续 5 d。小鼠入水后, 系统自动跟踪记录数据。若小鼠在 65 s 内登上平台, 则系统自动停止记录, 逃避潜伏期时间即为记录时间; 若超过 65 s, 则逃避潜伏期时间系统自动记录为 65 s, 同时引导小鼠到平台上停留 10 s。

1.4.2 空间探索实验 定向航行实验结束后次日将水池中平台移除, 每只小鼠检测 1 次, 从平台对侧位置即第三象限内投放, 系统自动跟踪记录小鼠入水后 65 s 内穿越平台区域的次数。

1.5 旷场实验 将小鼠放于清洁的方形旷场实验检测箱内, 使用 ANY-maze 动物行为分析系统进行数据采集, 以记录 5 min 内各只小鼠的活动总距离及进入中心区域的次数。每次小鼠测试结束后, 均用酒精充分擦拭检测箱以防小鼠间气味或者脏物的干扰。

1.6 高架十字迷宫 参照 Walf 等^[9]实验方案, 将小鼠置于仪器中开放臂和封闭臂的连接处, 面朝实验者对侧的开放臂, 用高架十字迷宫实验视频分析系统记

录其 5 min 内的活动情况,并计算其在开放臂内停留时间的比例。同旷场实验,在每次测试后用酒精擦拭仪器,待其挥发后再进行下只小鼠测验。

1.7 统计方法 采用 SPSS 19.0 统计分析软件进行处理,正态分布数据计量资料以均值、标准差($\bar{x} \pm s$)表示;多组间比较采用方差分析,连续变量的比较采用重复测量的方差分析。非正态分布数据计量资料以中位数、四分间距 $M(IQR)$ 表示,组间比较采用非参数 Kruskal-Wallis 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 益肾化浊方对 SAMP8 小鼠学习记忆能力的影响

2.1.1 平均游泳速度 各组小鼠 5 d 的游泳速度数据采用重复测量方差分析,组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),说明各组间小鼠体能情况基本相同,可排除游泳速度对逃避潜伏期的影响。见表 1。

表 1 各组小鼠游泳速度估算的边际均值比较($\bar{x} \pm s$)		
分组	<i>n</i>	平均游泳速度/ $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
SAMR1 组	10	18.65±1.04
SAMP8 组	10	16.85±1.09
YSHZ 组	10	17.69±1.04

2.1.2 逃避潜伏期 各组小鼠 5 d 逃避潜伏期时间比较采用重复测量方差分析,经 Mauchly 球形检验($P<0.05$),采用 Greenhouse-Geisser 进行校正,结果显示:时间因素 $P<0.05$,说明各组小鼠的逃避潜伏期均随时间的变化而变化,且时间与分组因素存在交互作用($P<0.05$),说明不同组的逃避潜伏期不相等。事后多重比较结果显示:与 SAMR1 组相比,SAMP8 组及 YSHZ 组小鼠逃避潜伏期均显著延长($P<0.05$);与 SAMP8 组相比,YSHZ 组小鼠避潜伏期明显缩短($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠逃避潜伏期估算的边际均值比较($\bar{x} \pm s$)		
分组	<i>n</i>	逃避潜伏期/s
SAMR1 组	10	32.57±1.49
SAMP8 组	10	56.52±1.49*
YSHZ 组	10	39.01±1.49**

注:与 SAMR1 组比较,* $P<0.05$;与 SAMP8 组比较,** $P<0.05$ 。

2.1.3 穿越平台次数 经 Kruskal-Wallis 检验,结果显示:与 SAMR1 组相比,SAMP8 组小鼠穿越平台次数显著减少($P<0.05$),而 YSHZ 组与之相比差异无统计学意义($P>0.05$);与 SAMP8 组相比,YSHZ 组小鼠穿越平台次数明显增加($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠穿越平台次数比较($M(IQR)$)		
分组	<i>n</i>	穿越平台次数/次
SAMR1 组	10	4.5(3)
SAMP8 组	10	0(0)*
YSHZ 组	10	3(2)*

注:与 SAMR1 组比较,* $P<0.05$;与 SAMP8 组比较,** $P<0.05$ 。

2.2 益肾化浊方对 SAMP8 小鼠精神行为的影响

2.2.1 旷场实验结果 经单因素方差分析发现:与 SAMR1 组小鼠相比,SAMP8 组小鼠活动总距离及进入中心区域次数均显著减少($P<0.05$),而 YSHZ 组与之相比差异无统计学意义($P>0.05$);与 SAMP8 组相比,YSHZ 组小鼠活动总距离及进入中心区域次数均显著增加($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组小鼠旷场实验结果比较($\bar{x} \pm s$)			
分组	<i>n</i>	总距离(m)	进入中心区域次数
SAMR1 组	10	7.32±0.99	17.50±5.72
SAMP8 组	10	2.34±1.50*	5.00±2.97*
YSHZ 组	10	5.62±0.67**	16.33±4.18#

注:与 SAMR1 组比较,* $P<0.05$;与 SAMP8 组比较,** $P<0.05$ 。

2.2.2 高架十字迷宫结果 经单因素方差分析发现:与 SAMR1 组小鼠相比,SAMP8 组和 YSHZ 组小鼠在开放臂停留时间的占比均显著减少($P<0.05$),但与 SAMP8 组相比,YSHZ 组小鼠在开放臂停留时间的占比无统计学差异($P>0.05$)。见表 5。

表 5 各组小鼠高架十字迷宫结果比较($\bar{x} \pm s$)		
分组	<i>n</i>	开放臂停留时间比例/%
SAMR1 组	10	51.54±20.19
SAMP8 组	10	9.88±5.82*
YSHZ 组	10	18.12±0.31*

注:与 SAMR1 组比较,* $P<0.05$ 。

3 讨论

AD 属祖国医学“健忘”“痴呆”等病证范畴^[10],其根本病机在于肾虚,兼有痰瘀浊邪^[11],因此采用益肾化浊法以切中肯綮。该法由著名中医脑病专家张伯礼院士提出,课题组成员在传承其经验及研究成果的基础上,结合多年的临床实践和专家建议,以法组方并进行了优化。益肾化浊方由 6 味中药组成,方中女贞子并制首乌以增滋肾阴之功,淫羊藿合肉苁蓉以强温肾阳之力,4 药合用以“阴中求阳,阳中求阴”;石菖蒲豁痰开窍、川芎活血行气,使津液得布、气血通利。美国国立老化研究所和阿尔茨海默病协会强调 AD 的病理改变在其临床症状出现前 15~20 年就已经开始,因此早期干预对于预防或延缓其进一步发展具有重要意义。

快速老化小鼠(SAM)^[12]是日本 Toshio Takeda 教授在京都大学研发,并由天津中医药大学第一附属医院的韩景献教授引进我国^[13],其中 SAMP8 小鼠是目前公认的研究衰老和 AD 的动物模型^[14]。随着月龄的增加,雄性 SAMP8 小鼠不仅行为活动减少、反应下降,外观上皮肤毛发欠光泽、晦暗、粗糙,并出现脱毛、皮肤溃疡、眼睛损害和脊柱后凸的老化征象及情绪失调、昼夜节律紊乱等^[15-16],且伴增龄性学习记忆能力障碍^[17]。研究显示,SAMP8 小鼠 4 月龄出现早期学习和记忆障碍^[18],5 月龄时已出现焦虑抑郁相关的精神行为异常^[19]。而中医认为衰老的出现与肾虚密切相关^[20],故 SAMP8 小鼠是进行本研究的理想模型。

行为学评价是衡量动物学习记忆能力及其精神行为的主要标准^[21]。Morris 水迷宫是评价动物学习记忆的经典方法^[22],利用动物厌恶水而被迫游泳、学习寻找水中隐藏平台的本能进行检测。涉及两大经典实验:一是定向航行实验,主要用于考察动物的空间学习记忆能力,其中,动物找到隐匿平台所需的时间为逃避潜伏期,该时间的长短与实验动物的学习记忆能力成反比;二是空间探索实验,主要反映动物对空间记忆的维持能力^[23]。旷场实验和高架十字迷宫则是研究动物精神行为的常用测试,前者用于分析小鼠活动和焦虑样行为^[24],小鼠受到压力时在旷场中的活动减少,而其焦虑程度较低时更倾向于在旷场的中央区域活动;后者利用啮齿动物对保护区域如封闭臂的偏好及探索新环境的天性之间的矛盾来考察其焦虑状态,

在开放臂中停留时间越长显示其焦虑程度较低。

本次研究结果显示,Morris 水迷宫实验中各组小鼠在游泳速度无显著差异的前提下,与 SAMR1 组小鼠相比,SAMP8 组小鼠逃避潜伏期时间明显增加,表现出一定的学习记忆障碍;在空间探索实验中,与 SAMR1 组相比,SAMP8 组小鼠的穿越平台次数显著减少,说明该小鼠对于前 5d 的学习记忆保持较差;而经过益肾化浊方干预后,SAMP8 小鼠逃避潜伏期时间明显缩短,穿越平台次数也显著增加,提示益肾化浊方能有效改善 SAMP8 小鼠早期学习记忆能力减退。旷场实验和高架十字迷宫结果显示,与 SAMR1 组相比,SAMP8 组小鼠总运动距离、进入中心区域次数及在开放臂停留的时间比例显著减少,提示 SAMP8 小鼠的精神行为异常;在使用益肾化浊方干预后,SAMP8 小鼠总运动距离和进入中心区域次数均显著增加,在开放臂停留的时间比例有增加的趋势,但尚未达到统计学差异,表明益肾化浊方具有一定的抗焦虑作用,考虑进一步扩大实验样本量予以确认。

综上所述,益肾化浊方可有效改善 SAMP8 小鼠早期学习记忆能力减退及精神行为异常,今后将进行具体机制的探索。

参考文献:

- [1] LIU-SEIFERT H, SIEMERS E, SUNDELL K, et al. Cognitive and functional decline and their relationship in patients with mild Alzheimer's dementia [J]. *J Alzheimers Dis*, 2015, 43(3): 949-955.
- [2] BONDI M W, EDMONDS E C, SALMON D P. Alzheimer's disease: past, present, and future [J]. *J Int Neuropsychol Soc*, 2017, 23(9-10): 818-831.
- [3] ADC 秘书处. 2050 年我国阿尔茨海默病患者将超 4000 万人家庭式照护将不堪重负[ER/OL]. (2019-11-04). <https://www.adc.org.cn/index.php/article/437.html>.
- [4] ZHANG Y L, LIN C, ZHANG L L, et al. Cognitive improvement during treatment for mild Alzheimer's Disease with a Chinese herbal formula: a randomized controlled trial [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130353.
- [5] 贺争鸣, 李根平, 朱德生, 等. 实验动物管理与使用指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2016: 115-118.
- [6] 王学成, 伍振峰, 李远辉, 等. 低温干燥技术在中药领域的

- 应用现状与展望[J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(1): 42-47.
- [7] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1698.
- [8] VORHEES C V, WILLIAMS M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2): 848-858.
- [9] WALF A A, FRYE C A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents [J]. Nat Protoc, 2007, 2(2): 322-328.
- [10] 王永炎, 张伯礼. 中医脑病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 855.
- [11] 张占军, 王永炎. 肾虚-痰瘀-酿毒-病络—中医对老年性痴呆早期发病病机认识 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(3): 244-246.
- [12] TAKEDA T, HOSOKAWA M, TAKESHITA S, et al. a new murine model of accelerated senescence[J]. Mech Ageing Dev, 1981, 17(2): 183-194.
- [13] 韩景献. 快速老化模型小白鼠(SAM)的老化诸特征[J]. 实验动物科学与管理, 1995, 12(4): 21-29.
- [14] PALL S M. Senescence-Accelerated mice P8: a tool to study brain aging and Alzheimer's disease in a mouse model[J]. ISRN Cell Biology, 2012(3): 1-12.
- [15] MORLEY J E, ARMBRECHT H J, FARR S A, et al. The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(5): 650-656.
- [16] TAKEDA T, HOSOKAWA M, HIGUCHI K. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of accelerated senescence[J]. J Am Geriatr Soc, 1991, 39(9): 911-919.
- [17] NOMURA Y, OKUMA Y. Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice[J]. Neurobiol Aging, 1999, 20(2): 111-115.
- [18] PICCARDUCCI R, PIETROBONO D, PELLEGRINI C, et al. High Levels of β -Amyloid, Tau, and Phospho-Tau in Red Blood Cells as Biomarkers of Neuropathology in Senescence-Accelerated Mouse High Levels of β -Amyloid, Tau, and Phospho-Tau in Red Blood Cells as Biomarkers of Neuropathology in Senescence-Accelerated Mouse[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 5030475.
- [19] 詹海燕, 杨蕊, 吴冰洁, 等. 自主跑笼运动对 SAMP8 小鼠精神行为及血清促肾上腺皮质激素、皮质醇的影响[J]. 脑与神经疾病杂志, 2020, 28(8): 494-498.
- [20] 沈自尹, 黄建华, 林伟, 等. 从整体论到系统生物学进行肾虚和衰老的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(6): 548-550.
- [21] WILLNER P, TOWELL A, SAMPSON D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. Psychopharmacology, 1987, 93(3): 358-364.
- [22] LIU B, LIU J, SHI J S. SAMP8 mice as a model of age-related cognition decline with underlying mechanisms in Alzheimer's Disease[J]. J Alzheimers Dis, 2020, 75(2): 385-395.
- [23] 周娇娇, 阙建宇, 于雯雯, 等. Morris 水迷宫检测动物学习记忆水平的方法学[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(24): 6274-6277.
- [24] KRAEUTER A K, GUEST P C, SARANYAI Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1916: 99-103.