

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.17.004

开心散对快速老化小鼠学习记忆能力和线粒体功能的影响*

周小江¹, 王瑾², 董宪喆³, 胡园¹, 刘屏^{1△}

(1. 中国人民解放军总医院临床药理研究室, 北京 100853; 2. 山西中医药大学, 山西 晋中 030619; 3. 首都医科大学宣武医院药物研究室, 北京 100053)

摘要:目的 探讨开心散对快速老化小鼠学习记忆能力和线粒体功能的影响。方法 采用 Morris 水迷宫实验检测开心散对快速老化小鼠学习记忆能力的影响, 计算并比较小鼠脑线粒体呼吸功能、活性氧(ROS)和三磷酸腺苷(ATP)含量、膜肿胀度、膜电位的影响。结果 3.570 g/kg 和 1.785 g/kg 的开心散均可显著降低 SAMP8 小鼠的逃避潜伏期及运动总路程, 且对 SAMP8 小鼠的逃避潜伏期及运动总路程的影响无显著差异。1.785 g/kg 的开心散降低 SAMP8 小鼠脑线粒体 ROS 含量和线粒体膜肿胀度, 并提高 SAMP8 小鼠脑线粒体呼吸控制指数(RCR)、磷酸化比值(ADP/O)、ATP 含量和线粒体膜电位, 改善线粒体氧化磷酸化水平和呼吸功能。结论 1.785 g/kg 的开心散可明显改善 SAMP8 小鼠在行为学上的学习记忆功能障碍和脑线粒体结构功能异常。

关键词: 开心散; 快速老化小鼠; 学习记忆能力; 线粒体功能

中图分类号: R932; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)17-0013-05

Effects of Kaixinsan Powder on Learning and Memory Ability and Mitochondrial Function in Rapidly Aging Mice

ZHOU Xiaojiang¹, Wang Jin², DONG Xianzhe³, HU Yuan¹, LIU Ping¹

(1. Department of Clinical Pharmacology, General Hospital of PLA, Beijing, China 100853; 2. Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong, Shanxi, China 030619; 3. Department of Drug Research, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing, China 100053)

Abstract: Objective To explore the effects of Kaixinsan Powder on learning and memory ability and mitochondrial function in rapidly aging mice. **Methods** Morris water maze was used to detect the effect of Kaixinsan Powder on the learning and memory ability of rapidly aging mice, and the effects of respiratory function, reactive oxygen species(ROS) and adenosine triphosphate(ATP) content, membrane swelling degree, and membrane potential were calculated and compared. **Results** Kaixinsan Powder of 3.570 g/kg and 1.785 g/kg could significantly reduce the escape latency and total distance of movement of SAMP8 mice, and there was no significant difference in the effect of the escape latency and total distance of movement of SAMP8 mice. Kaixinsan Powder of 1.785 g/kg reduced ROS content and mitochondrial membrane swelling in the brain mitochondria of SAMP8 mice, and increased the mitochondrial respiratory control index(RCR), phosphorus oxidation ratio(ADP/O), ATP content and mitochondrial membrane potential of the SAMP8 mouse brain, improved the level of mitochondrial oxidative phosphorylation and respiratory function. **Conclusion** Kaixinsan Powder of 1.785 g/kg can significantly improve the behavioral learning and memory dysfunction and the abnormal structure and function of brain mitochondria in SAMP8 mice.

Key words: Kaixinsan Powder; rapidly aging mice; learning and memory ability; mitochondrial function

学习记忆能力减退是老年人群常见的退行性疾病, 多因年龄增长所致中枢神经系统功能障碍, 主要涉及胆碱类神经递质表达异常、自由基损伤、氧化应激和胆固醇代谢紊乱等^[1-3]。学习记忆障碍的治疗机制可能包括抑制乙酰胆碱的表达、抗氧化、清除自由基、保护神经元等多种途径^[4-5]。线粒体是参与能量代谢的主要器官, 主要通过氧化磷酸化和调节细胞的呼吸功能为脑内神经元提供能量。学习记忆能力还可能与线粒体的结构和功能正常与否密切相关^[6]。开心散源自唐代孙思邈的《备急千金要方》, 由人参、茯苓、远志、石菖蒲组方, 是临床用于益智健脑的基本方, 可明显改善抑郁和痴呆患者的学习记忆能力^[7-8]。本研究中探讨了开心散对学习记

忆能力的改善作用与线粒体结构和功能的关系, 为研究其对老年患者学习记忆能力的改善作用机制提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器: Morris 水迷宫(上海移数信息科技有限公司); 3K15 型低温离心机(美国 Sigma 公司); ABJ220-4M 型电子天平(KERN & Sohn GmbH 公司, 精度为万分之一); 1420-012 型多功能酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司)。

试剂: 人参(批号为 19060304), 远志(批号为 19072001), 茯苓(批号为 19052101), 石菖蒲(批号为 19052901), 均购自北京同仁堂药材有限公司, 经中国人

*基金项目: 国家自然科学基金面上项目[81673877, 81674082]; 国家自然科学基金青年基金[81302909]。

第一作者: 周小江, 男, 博士研究生, 主管药师, 研究方向为药理学, (电子信箱)zhouxiaojiang301@foxmail.com。

△通信作者: 刘屏, 女, 博士研究生, 研究员, 研究方向为中药药理学, (电子信箱)liuping301@126.com。

民解放军总医院刘屏研究员鉴定为正品;石杉碱甲(上海复旦复华药业有限公司,批号为130501);BCA蛋白定量试剂盒(普利莱基因技术有限公司);Cell Titer-Glo™ 发光法细胞活力检测试剂盒(普洛麦格生物技术有限公司)。

动物:5月龄健康的SPF级雄性SAMP8小鼠30只,SAMR1小鼠10只,饲养于SPF级动物房,均由中国医学科学院药用植物研究所提供,动物许可证编号为SCXK(京)2019-0010。

1.2 方法

1.2.1 开心散浸膏制备

按处方称取人参222 g,茯苓222 g,石菖蒲148 g,远志148 g。人参用60%乙醇加热回流,提取4次,每次1 h,提取完后合并提取液,过滤,备用,药渣备用;石菖蒲加6倍蒸馏水浸泡12 h,提取挥发油8 h,再加等量乙醇制成50%油醇溶液,备用;石菖蒲药渣、人参药渣与茯苓、远志加水7.4 L混合,再提取3次,每次1 h,合并提取液,浓缩,加50%乙醇,放4℃冰箱冷藏,过夜。过夜后过滤提取液,再与人参提取液合并,乙醇回收,浓缩,减压干燥,即得开心散浸膏提取物。1 g浸膏粉相当于生药7.14 g。

1.2.2 动物分组及给药

10只SAMR1小鼠作为对照组(SAMR1组),30只SAMP8雄性小鼠随机分为模型组(SAMP8组)、开心散给药组(KXS组)和阳性药组(HupA组),每组10只。小鼠正常饲养3 d,适应实验室环境后,KXS组小鼠灌胃给予开心散[按生药量3.570,1.785,0.892 g/(kg·d)给药],HupA组小鼠灌胃给予石杉碱甲0.05 mg/(kg·d),每日1次,按每10 g体重0.1 mL给药,SAMR1组和SAMP8组灌胃给予等体积蒸馏水。

1.2.3 Morris水迷宫定位航行训练及测试

Morris水迷宫实验是用于研究和评价学习记忆的首选经典实验。于安静、避光环境里操作,水迷宫是一个黑色圆柱形容容器,内部放置一个圆形平台,平台位于水迷宫的第四象限。小鼠适应环境3 d后,开始Morris水迷宫实验训练,共4 d。训练时,向水迷宫里注入温水,没过平台1~2 cm,再倒入墨汁,避免小鼠能看到平台。将小鼠从平台对侧象限轻轻放入,同时计时60 s,记录小鼠从放入水中到爬上平台所用时间(即逃避潜伏期),如果小鼠60 s内未找到平台,指引小鼠爬到平台,并在平台上停留30 s。训练结束后,第5天进行正式实验,分别记录每只小鼠的逃避潜伏期、总路程和第三象限路程,如果60 s内小鼠未找到平台,则潜伏期记为60 s。给药3个月后同样方法进行水迷宫测试。

1.2.4 脑线粒体功能研究

溶液配制:(1)分离缓冲液。250 mmol/L葡萄糖,

10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,0.2% BSA,pH 7.4。分装后存于-20℃。(2)呼吸缓冲液。225 mmol/L葡萄糖,5 mmol/L KH₂PO₄,10 mmol/L Tris,10 mmol/L KCl,0.2 mmol/L EDTA,100 mg/L BSA,pH 7.4。分装后存于-20℃。(3)复合体I底物。2 mol/L的L-谷氨酸钠,1 mol/L的L-苹果酸,各加入5 μL(1 mL反应体系),终浓度分别为10 mmol/L和5 mmol/L。(4)二磷酸腺苷(ADP)。0.05 mol/L的ADP,加入5 μL(1 mL反应体系),终浓度为250 μmol/L,分装后存于-80℃。

脑线粒体提取:水迷宫测试结束后,使用梯度离心法提取SAMP8小鼠的脑线粒体^[4]。小鼠颈椎脱臼处死,在冰袋上迅速取出脑组织,放入盛有冰冷缓冲液的器皿中,去除小脑、脑干及血管,用缓冲液冲洗3次,滤纸吸干,称质量,剪碎。将脑组织碎块加入预冷的匀浆器中,按10 mL/g脑组织加预冷的分离缓冲液,冰上手动匀浆10次,制得匀浆液。4℃及700 g离心10 min,取上清液,以4℃及10 000 g离心10 min,取沉淀,所得沉淀即为线粒体。再往沉淀加分离缓冲液,4℃及10 000 g离心10 min,得到较纯净的线粒体。线粒体沉淀加分离缓冲液制备线粒体悬液,调节线粒体蛋白质量浓度至20~25 g/L。整个脑线粒体的提取制备过程应保持低温,尽量降低脑线粒体的损伤。

脑线粒体呼吸功能测定:使用Clark氧电极法,检测各组小鼠脑线粒体呼吸功能。反应条件为水温30℃,反应体系体积1 mL。首先,使用搅拌1 h的双蒸水和加无水亚硫酸钠的双蒸水分别对电极进行100%和0氧校正。然后将适量线粒体呼吸介质加入反应体系中2 min至空气饱和,加线粒体蛋白1 mg,2 min后加10 μL外源反应底物(10 mmol/L谷氨酸钠和5 mmol/L苹果酸的1:1混合物)测定NADH呼吸链;进入Ⅱ态呼吸。加5 μL 250 μmol/L ADP,进入Ⅲ态呼吸;ADP充分反应后进入Ⅳ态呼吸。

观察记录线粒体氧耗曲线,计算氧化磷酸化各参数。

磷氧化比值 $[n(P)/n(O)] = n(ADP/nmol)/n(O/nmol)$

Ⅲ态呼吸速率 $(V_3) = n(O/nmol)/t(min)/m_{protein}(mg)$

Ⅳ态呼吸速率 $(V_4) = n(O/nmol)/t(min)/m_{protein}(mg)$

呼吸控制指数 $(RCR) = V_3/V_4$

氧化磷酸化效率 $(OPR) = V_3 \times n(ADP)/n(O)$

式中, $n(P)$ 为每次加入ADP的量; $n(O)$ 为消耗的氧原子量; t 为时间; $m_{protein}$ 为加入的线粒体蛋白量; V_3 为加入外源底物和ADP后的呼吸速率; V_4 为ADP耗竭时的呼吸速率。

脑线粒体活性氧(ROS)测定:使用荧光探针(DCFH-DA)测定ROS含量。DCFH-DA浓度10 μmol/L,与各线粒体分别混合,孵育60 min,于激发波长488 nm,发射波长527 nm波长处采用酶标仪测定荧光强度。无荧光的

DCFH-DA 氧化生成荧光物质 DCF 的速率与活性氧含量成正比。

脑线粒体 ATP 含量测定:取 100 μL 质量浓度为 1.0 mg/mL 的线粒体匀浆液,加 100 μL Cell Titer-Glo™ 发光法细胞活力检测试剂盒检测液,放置 10 min,采用化学发光法测定 ATP 含量。

脑线粒体膜肿胀度测定:将线粒体加入反应缓冲液,制成质量浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 、体积为 200 μL 的溶液,摇匀,滴加到酶标板中(25 $^{\circ}\text{C}$, 520 nm),测定 10 min 内吸光度值的变化,试验以吸光度的减少值作为线粒体肿胀度的指标。

脑线粒体膜电位测定:小鼠脑线粒体膜电位的测定采用 96 孔黑色板,每孔加入 1 μL 1 mmol/L Rhodamin123 和 150 μL 膜电位缓冲液,37 $^{\circ}\text{C}$ 下测定荧光值(激发波长为 503 nm,发射波长为 527 nm),再加入 50 μL 线粒体混匀,同条件下检测脑线粒体摄取后的荧光值。脑线粒体膜电位计算公式如下, $(\Delta\psi = 61.54 \log[\text{Rh123}]_{\text{in}} / [\text{Rh123}]_{\text{out}} (37^{\circ}\text{C}))^{[9]}$ 。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

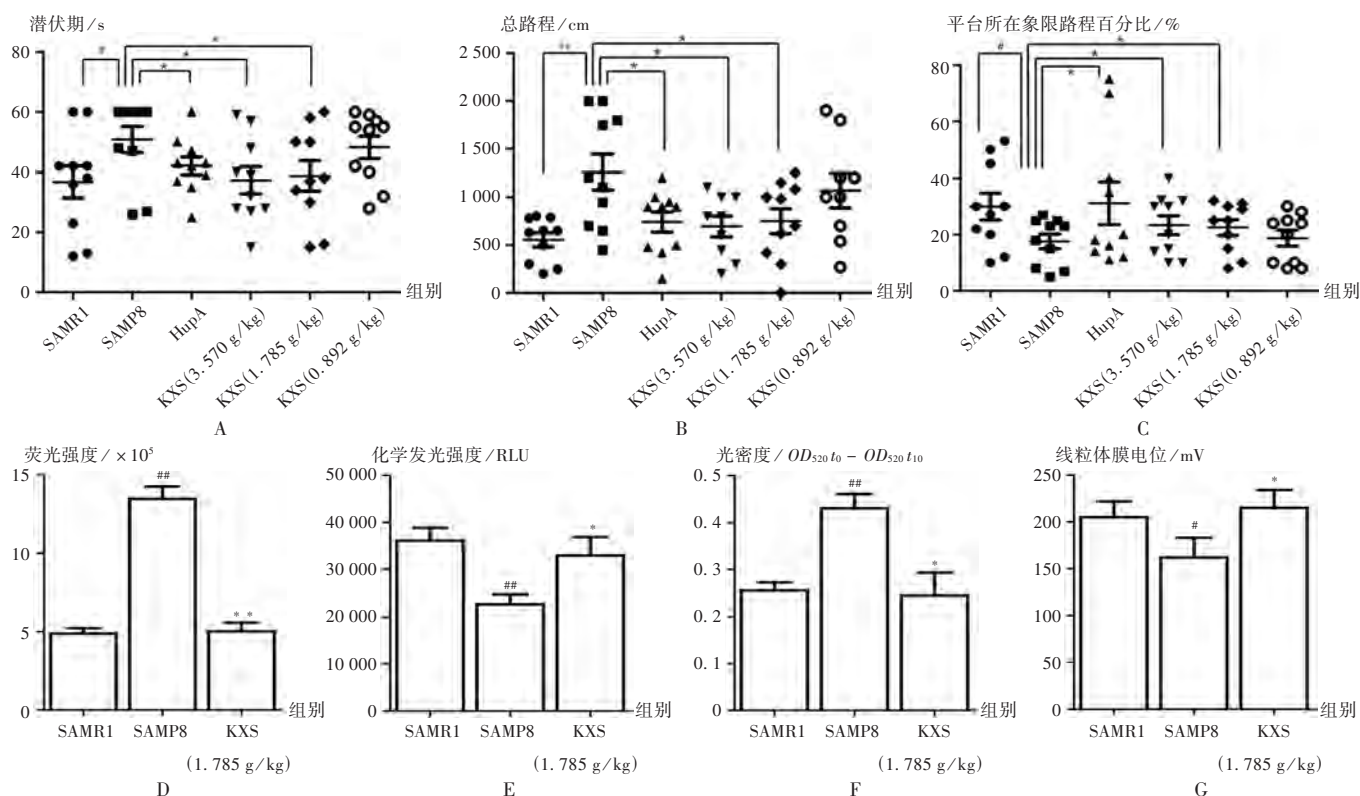
2.1 对 SAMP8 小鼠学习能力的影响

逃避潜伏期:前 4 d 的训练期中,4 组 SAM 小鼠的平均逃避潜伏期均呈下降趋势,表明各组小鼠寻找平台的能力在 4 d 的学习训练中均得到了提高。第 5 天, SAMP8 组小鼠的逃避潜伏期明显长于 SAMR1 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 3.570 g/kg 和 1.785 g/kg 的开心散和石杉碱甲均能显著降低小鼠的逃避潜伏期,与 SAMP8 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见图 1 A。

平台所在象限总路程及路程百分比:在前 4 d 的训练期中,各组小鼠的平台所在象限总路程均呈下降趋势,表明各组小鼠对于平台位置的记忆均有提高。第 5 天, SAMP8 组小鼠运动总路程长于 SAMR1 组, 3.570 g/kg 和 1.785 g/kg 的开心散和石杉碱甲均能降低小鼠运动的总路程,同时增加 SAMP8 组小鼠在平台所在象限路程的百分比,与 SAMP8 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见图 1 B 及图 1 C。

2.2 对 SAMP8 小鼠线粒体功能的影响

线粒体呼吸功能:与 SAMR1 组小鼠相比, SAMP8 小鼠 IV 态呼吸耗氧无显著变化,脑线粒体 III 态呼吸快速耗氧,呼吸明显降低,RCR、磷氧化比值 (ADP/O) 显著



A. 潜伏期 B. 总路程 C. 平台所在象限路程百分比 D. 脑线粒体 ROS E. 脑线粒体 ATP
F. 脑线粒体膜肿胀度 G. 脑线粒体膜电位

注:与 SAMR1 组相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$;与 SAMP8 组相比, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

图 1 开心散对快速老化小鼠逃避潜伏期、平台所在象限总路程和路程百分比及线粒体功能的影响 ($n = 10$)

降低 ($P < 0.05$)。1.785 g/kg 的开心散能提高 SAMP8 小鼠脑线粒体 RCR, ADP/O, 改善线粒体氧化磷酸化水平和呼吸功能。详见表 1。

表 1 开心散对 SAMP8 小鼠脑线粒体呼吸功能的影响
($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g/kg)	V_2 [nmol/(min·mg)]	V_4 [nmol/(min·mg)]	RCR	ADP/O
SAMR1 组		147 ± 19	32 ± 3.6	5.17 ± 0.21	1.54 ± 0.31
SAMP8 组		105 ± 10 [#]	35 ± 4.2	3.96 ± 0.35 [#]	1.17 ± 0.16 [#]
KXS 组	1.785	135 ± 23 [*]	34 ± 3.8	4.85 ± 0.26 [*]	1.48 ± 0.43 [*]

注:以 L-谷氨酸和 L-苹果酸为底物;与 SAMR1 组相比, [#] $P < 0.05$;与 SAMP8 组相比, ^{*} $P < 0.05$ 。

线粒体 ROS:与 SAMR1 组比较, SAMP8 组小鼠脑线粒体的 DCF 荧光值明显增加,提示 SAMP8 组小鼠线粒体内 ROS 含量显著增加,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。1.785 g/kg 的开心散能显著降低 SAMP8 组小鼠脑线粒体 ROS 含量,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。详见图 1 D。

线粒体 ATP 含量:与 SAMR1 组相比, SAMP8 组小鼠脑线粒体中 ATP 含量明显降低 ($P < 0.01$),表明线粒体能量合成减少。1.785 g/kg 的开心散能明显增加 SAMP8 组小鼠脑线粒体 ATP 含量,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见图 1 E。

线粒体膜肿胀度:与 SAMR1 组相比, SAMP8 组小鼠脑线粒体的膜肿胀度明显增加 ($P < 0.01$),表明脑线粒体结构受到严重损伤。1.785 g/kg 的开心散能显著降低 SAMP8 组小鼠脑线粒体膜肿胀度,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见图 1 F。

线粒体膜电位:与 SAMR1 组相比, SAMP8 组小鼠脑线粒体的膜电位显著降低 ($P < 0.05$),表明线粒体质子泵功能受到影响,结构受到损伤。1.785 g/kg 的开心散能提高 SAMP8 组小鼠脑线粒体膜电位,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见图 1 G。

3 讨论

学习记忆障碍是老年人常见退行性疾病,是阿尔兹海默症、抑郁症等神经系统疾病常见的临床表现。随着人口老龄化,学习记忆障碍患者人数也日益增加。研究发现,线粒体功能障碍及结构损伤、线粒体分布异常、突触结构和功能损坏,线粒体能量代谢下降均与学习记忆能力下降密切相关^[9]。因此,线粒体功能异常可能是引起学习记忆能力下降的一个重要因素。

本研究中采用 SAMP8 小鼠研究开心散对 SAM 小鼠学习记忆能力和线粒体功能的影响。快速老化模型小鼠(SAM)是由日本竹田俊男教授培育出来的一种具备稳定老化病态特征的衰老型小鼠,其中 SAMP8 是快速老化系,其学习记忆及认知功能随着年龄的增长呈快速

衰退趋势,中枢神经系统如海马、皮层等发生病理改变, SAMP8 被认为是与年龄有关的学习和记忆障碍的一个有用的动物模型^[10]。海马区是大脑的一个重要区域,在正常衰老和各种神经退行性疾病过程中,海马与认知能力下降有关^[11]。Morris 水迷宫实验结果显示,与同月龄 SAMR1 相比, SAMP8 小鼠逃避潜伏期更长,总路程更长,平台所在象限路程百分比更短,表现出 SAMP8 小鼠对平台位置等的记忆不清楚,学习记忆能力障碍。3.570 g/kg 和 1.785 g/kg 的 KXS 组可显著缩短 SAMP8 小鼠的逃避潜伏期,提高小鼠在平台所在象限运动路程的百分比,提高小鼠学习记忆能力。2 个质量浓度的开心散对 SAMP8 小鼠的逃避潜伏期及运动总路程的影响无显著差异,故采用 1.785 g/kg 的开心散进行线粒体结构和功能的研究。

RCR 是线粒体 III 态呼吸与 IV 态呼吸的比值,提示线粒体的完整状况,可衡量氧化磷酸化效率,ADP/O 越接近其理论值,表明生成 ATP 的能力越强^[12]。本研究结果显示,开心散可显著升高 SAMP8 小鼠脑线粒体 RCR 和 ADP/O,对 SAMP8 小鼠脑线粒体呼吸功能异常有明显的改善作用。线粒体通透性转运孔道是线粒体内外膜之间的蛋白复合体,通过调节基质中的离子和电荷,维持线粒体内环境的稳态,确保氧化磷酸化的正常进行^[13]。线粒体膜肿胀度反映了线粒体通透性转运孔道的开放程度,能直接提示线粒体结构异常^[14]。SAMP8 组小鼠脑线粒体膜肿胀度明显增加,膜电位显著降低,提示 SAMP8 组小鼠线粒体结构受到了严重损伤;开心散能有效抑制膜肿胀度,提高膜电位,保证氧化磷酸化的正常进行。线粒体是细胞内产生 ROS 的最主要结构,因此线粒体也最易因氧化应激而损伤^[15]。研究发现,与 SAMP8 组小鼠相比, KXS 组小鼠脑线粒体 ATP 合成能力增强,ROS 水平降低。表明开心散可能是通过改善海马区细胞内线粒体功能障碍改善 SAMP8 小鼠学习记忆能力下降的。

综上所述,开心散可明显改善 SAMP8 组小鼠学习记忆功能障碍和脑线粒体结构功能异常,其作用机制可能是通过降低 ROS 损伤、抑制线粒体膜肿胀度、提高线粒体膜电位等途径,保护线粒体结构功能的完整,确保神经细胞有充足的能量完成正常生理功能。

参考文献:

- [1] FU H, XU Z, ZHANG XL, et al. Kaixinsan, a Well-Known Chinese Herbal Prescription, for Alzheimer's Disease and Depression: A Preclinical Systematic Review[J]. Front Neurosci, 2019, 13: 1421.
- [2] LU C, SHI Z, SUN X, et al. Kai Xin San aqueous extract improves Abeta1-40-induced cognitive deficits on adaptive behavior learning by enhancing memory-related molecules expression in