

# 益智仁挥发油对东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的改善作用研究<sup>△</sup>

马俊俏<sup>1\*</sup>, 吴勇<sup>1,2</sup>, 周俊璇<sup>2</sup>, 邱振鹏<sup>1,2</sup>, 张宝徽<sup>1,2</sup>, 胡俊杰<sup>1,2</sup>, 田先翔<sup>1#</sup>(1.湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部实验室, 武汉 430061; 2.湖北中医药大学药学院, 武汉 430061)

中图分类号 R965;R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)22-3074-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.22.11

**摘要** 目的:考察益智仁挥发油对东莨菪碱诱导的小鼠学习记忆障碍的改善作用。方法:将50只雄性小鼠随机分为正常组、模型组、阳性药物组(盐酸多奈哌齐, 3 mg/kg)和益智仁挥发油低、高剂量组(0.5、1 mL/kg), 每组10只。除正常组、模型组小鼠灌胃等体积水外, 其余组小鼠均灌胃对应药物, 连续27 d; 自给药第22天起, 除正常组小鼠腹腔注射等体积生理盐水外, 其余组小鼠均连续6 d腹腔注射氢溴酸东莨菪碱溶液(3 mg/kg)进行造模。末次给药结束后, 采用Morris水迷宫实验考察小鼠行为学; 采用苏木精-伊红染色法观察小鼠海马组织CA1区神经细胞形态学; 检测小鼠海马组织中乙酰胆碱酯酶(AChE)、胆碱乙酰转移酶(ChAT)的活性; 检测小鼠海马组织和血清中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性及丙二醛(MDA)的含量。结果:与模型组比较, 阳性药物组和益智仁挥发油高剂量组小鼠的逃避潜伏期分别自第2、3天起显著缩短, 第三象限停留时间、第三象限路程百分比和穿台次数均显著延长或增加, 首次穿台时间均显著缩短( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ); 小鼠海马组织CA1区神经细胞排列较整齐, 结构相对正常, 核浓染的程度降低; 小鼠海马组织中ChAT、SOD、GSH-Px活性和血清中SOD、GSH-Px活性均显著升高, 海马组织中AChE活性显著降低, 海马组织和血清中MDA含量均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。益智仁挥发油低剂量组上述指标虽均有改善, 但差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。结论:益智仁挥发油能显著改善东莨菪碱导致的小鼠学习记忆障碍, 其作用机制可能与其调节AChE、ChAT活性来增强胆碱能神经功能及抗氧化损伤有关。

**关键词** 益智仁; 挥发油; 东莨菪碱; 小鼠; 学习记忆障碍; 改善作用

## Study on Improvement Effects of Volatile Oil from the Fruit of *Alpinia oxyphylla* on Scopolamine-induced Learning and Memory Impairment in Mice

MA Junqiao<sup>1</sup>, WU Yong<sup>1,2</sup>, ZHOU Junxuan<sup>2</sup>, QIU Zhenpeng<sup>1,2</sup>, ZHANG Baohui<sup>1,2</sup>, HU Junjie<sup>1,2</sup>, TIAN Xianxiang<sup>1</sup>  
(1. Laboratory for TCM Resource and TCM Compound Formula, Hubei University of TCM, Ministry of Education, Wuhan 430061, China; 2. College of Pharmacy, Hubei University of TCM, Wuhan 430061, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To investigate the improvement effects of volatile oil from the fruit of *Alpinia oxyphylla* on scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. **METHODS:** 50 male Kunming mice were randomly divided normal group, model group, positive drug group (donepezil hydrochloride, 3 mg/kg) and volatile oil from the fruit of *A. oxyphylla* low-dose and high-dose groups (0.5, 1 mL/kg), with 10 mice in each group. Except control group and model group were given equivalent water intragastrically, other groups were given relevant medicine intragastrically for consecutive 27 days. Since the 22nd day of administration, except normal group was given equivalent normal saline, other groups were given Scopolamine hydrobromide solution (3 mg/kg) intraperitoneally for consecutive 6 days. After last medication, Morris water maze test was used to investigate the praxiology of mice. HE staining was used to observe the morphology of neurons in CA1 area of hippocampus in mice. The activities of AChE and ChAT in hippocampus were detected in mice. The activities of SOD and GSH-Px, the content of MDA in hippocampus and serum were also detected. **RESULTS:** Compared with model group, the escape latencies of mice were shortened significantly in positive drug group and volatile oil from the fruit of *A. oxyphylla* high-dose group since second and third day, respectively; retention time and distance percentage in the third quadrant, the frequency of crossing platform were prolonged or increased significantly, while the time of initial crossing platform was shortened significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). The neurons in the CA1 area of the hippocampus were arranged orderly, with regular cell shape; the degree of nuclear hyperchromasia was reduced. The activities of ChAT, SOD and GSH-Px in hippocampus, the activities of SOD and GSH-Px in serum were increased significantly; the activity of AChE in hippocampus was decreased significantly; while MDA contents in hippocampus and serum were decreased significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). There was improvement to some extent but without statistical significance in above indexes of volatile oil from the fruit of *A. oxyphylla* low-dose group ( $P>0.05$ ). **CONCLUSIONS:** The volatile oil from the fruit of *A. oxyphylla* can ameliorate scopolamine-induced learning and memory impairment by enhancing the

<sup>△</sup> 基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(No.鄂科技通[2015]23号-2015CFB729)

\* 硕士研究生。研究方向:神经药理学、新药研发。E-mail: 1072178876@qq.com

# 通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:神经药理学、新药研发。电话:027-68889363。E-mail:284633827@qq.com

function of cholinergic neurons through regulating the activities of AChE and ChAT and resisting oxidation.

**KEYWORDS** Fruit of *Alpinia oxyphylla*; Volatile oil; Scopolamine; Mice; Learning and memory impairment; Improvement effect

学习记忆障碍是多种神经系统疾病共同的临床症状,随着社会人口老龄化,其发生率越来越高。因此,寻找有效的药物来改善学习记忆障碍已成为神经系统疾病治疗的重点之一。益智仁是姜科多年生植物益智(*Alpinia oxyphylla* Miq.)的干燥成熟果实,具有暖肾固精缩尿、温脾止泻摄唾之功效<sup>[1]</sup>。现代药理学研究表明,益智仁具有益智健脑、强心、抗癌、抗衰老、镇静、镇痛等多种药理作用<sup>[2-3]</sup>。挥发油是益智仁的主要化学成分,近年来研究发现,益智仁挥发油具有脂溶性高、易透过血脑屏障等优点,能够对抗神经细胞凋亡<sup>[4]</sup>;益智仁挥发油中的芳樟醇具有自由基清除作用<sup>[5]</sup>,圆柚酮具有很好的抗氧化活性<sup>[6]</sup>。但目前国内外对益智仁挥发油改善学习记忆功能的研究较少,故本研究采用腹腔注射东莨菪碱建立小鼠学习记忆障碍模型,考察益智仁挥发油对其学习记忆功能的影响,为益智仁挥发油的深入研究提供实验基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Morris 水迷宫(中国医学科学院药物研究所); Allegra 64R 型高速冷冻离心机(美国贝克曼库尔特公司); xMark 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); Eclipse E200 型光学显微镜(日本 Nikon 公司)。

### 1.2 药材、药品与试剂

益智仁药材[武汉市神草中药饮片有限责任公司,批号:1702013,经湖北中医药大学大学生药教研室陈科力教授鉴定为姜科植物益智(*A. oxyphylla* Miq.)的干燥成熟果实];氢溴酸东莨菪碱对照品(上海晶纯生化科技股份有限公司,批号:F1713061,纯度:99.9%);盐酸多奈哌齐片[卫材(中国)药业有限公司,批准文号:国药准字 H20050978,规格:5 mg];乙酰胆碱酯酶(AChE)、胆碱乙酰转移酶(ChAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

### 1.3 动物

SPF 级昆明种小鼠,雄性,体质量 18~20 g,由湖北省实验动物研究中心提供,动物使用许可证号:SCXK(鄂)2015-0018。小鼠均适应性喂养 1 周后进行实验。

## 2 方法

### 2.1 益智仁挥发油的制备

采用水蒸气蒸馏法提取益智仁挥发油。将干燥益智仁粉碎过 80 目筛,取粉末 13.5 kg,加水 108 L 浸泡 6 h,微沸 8 h,得益智仁挥发油 82.2 mL(得率为 0.6%)。将提取的挥发油密闭储于棕色瓶中,4℃保存,备用。在动物实验前,以聚山梨酯 80(最终比例为 0.5%)为乳化剂将益智仁挥发油配成乳剂,临用时按给药剂量加水稀释至适当浓度。

### 2.2 分组、给药及造模

取 50 只小鼠,按随机数字表法分为正常组、模型组、

阳性药物组(3 mg/kg)<sup>[7]</sup>和益智仁挥发油低、高剂量组(0.5、1 mL/kg,按挥发油计,剂量由预实验确定),每组 10 只。阳性药物组小鼠灌胃盐酸多奈哌齐溶液(将盐酸多奈哌齐片碾碎后以水配制成溶液);益智仁挥发油低、高剂量组小鼠灌胃“2.1”项下稀释后的乳剂;正常组和模型组小鼠均灌胃等体积水。灌胃体积均为 10 mL/kg,每日给药 1 次,连续给药 27 d。

参照文献[8]方法建立小鼠学习记忆障碍模型。自给药第 22 天起,在给药后 30 min,除正常组小鼠腹腔注射等体积生理盐水外,其余组小鼠均腹腔注射东莨菪碱溶液(生理盐水配制,剂量为 3 mg/kg,给药体积为 10 mL/kg),连续注射 6 d。

### 2.3 小鼠行为学考察

在小鼠末次腹腔注射东莨菪碱或生理盐水后 30 min,采用 Morris 水迷宫实验考察其行为学。迷宫中水深 25 cm(高出平台 1 cm),水温为(25±0.5)℃,黑色圆形平台置于第Ⅲ象限中央。小鼠入水位置为第Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ中任意一个象限,入水点均为该象限的中点。每只小鼠每天训练 3 次,每次训练 90 s,连续 5 d。若小鼠在 90 s 内找到平台,则使其在平台上停留 10 s,并记录小鼠从入水到找到平台所需的时间,作为逃避潜伏期;若小鼠在 90 s 内未找到平台,则由操作人员将其引导至平台,并停留 10 s,将其逃避潜伏期记为 90 s。第 6 天进行空间探索实验:撤掉平台,小鼠从第Ⅰ象限入水,持续时间 90 s,观察小鼠在第Ⅲ象限的停留时间、第Ⅲ象限路程百分比、首次穿越平台(简称“穿台”)的时间和穿台次数,并记录小鼠游泳轨迹。

### 2.4 小鼠海马组织病理学检查

水迷宫实验结束后,各组随机取 4 只小鼠,水合氯醛麻醉后开胸,暴露心脏,自左心室升主动脉灌注约 50 mL 生理盐水,待流出液为无色时,继以灌注 4% 多聚甲醛溶液约 60 mL 至小鼠全身变硬。灌注结束后,剖取小鼠全脑放入 4% 多聚甲醛溶液中固定,常规脱水、包埋、切片,苏木精-伊红(HE)染色,在光学显微镜下观察海马组织 CA1 区神经细胞的数量、形态及结构。

### 2.5 小鼠海马组织中 AChE、ChAT 活性检测

水迷宫实验结束后,各组取剩余的 6 只小鼠,水合氯醛麻醉后眼眶取血,4℃下 3 000 r/min 离心 15 min,取上层血清,-80℃保存;快速剖取脑组织,在冰上仔细剥离海马组织,按 1:9 的比例(m/v,g/mL)加入 4℃生理盐水,制成 10% 脑组织匀浆,4℃下 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,-80℃保存。取脑组织匀浆上清液,解冻至室温后按 AChE、ChAT 检测试剂盒说明书进行操作,采用酶标仪分别于 412、324 nm 波长处测定吸光度(OD)值,计算 AChE、ChAT 活性。

### 2.6 小鼠海马组织和血清中 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量检测

取“2.5”项下脑组织匀浆上清液和血清,解冻至室温后按 SOD、GSH-Px、MDA 检测试剂盒说明书进行操作,

采用酶标仪分别于450、412、532 nm波长处测定OD值,计算SOD、GSH-Px活性及MDA含量。

## 2.7 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 益智仁挥发油对小鼠行为学的影响

3.1.1 逃避潜伏期 与正常组比较,模型组小鼠的逃避潜伏期明显延长,从第2天起差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),表明东莨菪碱明显降低了小鼠的学习记忆能力;与模型组比较,阳性药物组和益智仁挥发油低、高剂量组小鼠的逃避潜伏期均缩短,其中阳性药物组和益智仁挥发油高剂量组分别从第2、3天起差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。各组小鼠逃避潜伏期测定结果见表1。

表1 各组小鼠逃避潜伏期测定结果( $\bar{x} \pm s, n = 10, s$ )

Tab 1 Escape latency of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n = 10, s$ )

组别	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
正常组	68.95 ± 19.44	46.56 ± 20.10	39.08 ± 14.61	25.68 ± 13.32	20.85 ± 11.56
模型组	82.01 ± 10.99	70.35 ± 14.83**	65.40 ± 17.90**	55.24 ± 17.59**	50.78 ± 16.53**
阳性药物组	68.33 ± 5.83	47.42 ± 17.91 <sup>Δ</sup>	42.32 ± 18.89 <sup>ΔΔ</sup>	28.39 ± 15.55 <sup>ΔΔ</sup>	23.68 ± 13.13 <sup>ΔΔ</sup>
益智仁挥发油低剂量组	74.24 ± 11.78	60.73 ± 18.75	53.41 ± 17.84	46.11 ± 18.19	42.91 ± 15.55
益智仁挥发油高剂量组	71.15 ± 20.11	54.54 ± 16.87	47.70 ± 20.40 <sup>Δ</sup>	32.77 ± 16.03 <sup>ΔΔ</sup>	27.98 ± 17.32 <sup>ΔΔ</sup>

注:与正常组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$

Note: vs. normal group,\*\* $P < 0.01$ ;vs. model group,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$

3.1.2 空间探索行为指标 与正常组比较,模型组小鼠的第Ⅲ象限停留时间、第Ⅲ象限路程百分比和穿台次数均显著缩短或减少,首次穿台时间显著延长,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,阳性药物组和益智仁挥发油低、高剂量组小鼠的第Ⅲ象限停留时间、第Ⅲ象限路程百分比和穿台次数均延长或增加,首次穿台时间均缩短,其中阳性药物组和益智仁挥发油高剂量组差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。各组小鼠空间探索行为指标测定结果见表2。

表2 各组小鼠空间探索行为指标测定结果( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab 2 Spatial exploratory behavior indexes of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	第Ⅲ象限停留时间,s	第Ⅲ象限路程百分比,%	首次穿台时间,s	穿台次数,次
正常组	35.69 ± 6.19	45.03 ± 5.97	18.36 ± 4.13	6.38 ± 1.51
模型组	20.47 ± 4.88**	30.52 ± 5.57**	31.12 ± 6.12**	3.25 ± 1.16**
阳性药物组	35.48 ± 5.26 <sup>ΔΔ</sup>	42.20 ± 5.11 <sup>ΔΔ</sup>	21.45 ± 4.75 <sup>ΔΔ</sup>	5.75 ± 1.04 <sup>ΔΔ</sup>
益智仁挥发油低剂量组	23.59 ± 6.16	36.41 ± 6.87	28.03 ± 5.11	3.50 ± 1.31
益智仁挥发油高剂量组	28.10 ± 6.47 <sup>Δ</sup>	38.67 ± 7.15 <sup>ΔΔ</sup>	23.96 ± 4.90 <sup>ΔΔ</sup>	4.75 ± 1.28 <sup>ΔΔ</sup>

注:与正常组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$

Note: vs. normal group,\*\* $P < 0.01$ ;vs. model group,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P < 0.01$

3.1.3 游泳轨迹 正常组小鼠的游泳轨迹大多数呈直线式;模型组和益智仁挥发油低剂量组小鼠的游泳轨迹则绝大多数呈边缘式,没有明确的定位目标,游泳路径

较正常组明显增长;阳性药物组和益智仁挥发油高剂量组小鼠的游泳轨迹呈趋向式,在短暂搜索后即可定位并登陆平台,游泳路径较模型组明显缩短。各组小鼠空间探索游泳轨迹见图1。

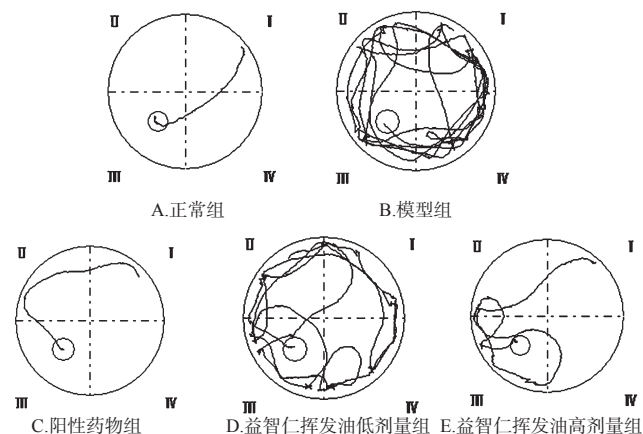


图1 各组小鼠空间探索游泳轨迹

Fig 1 Space exploring swimming trajectory of mice in each group

### 3.2 益智仁挥发油对小鼠海马组织CA1区神经细胞形态学的影响

正常组小鼠海马组织CA1区神经细胞数量多,排列整齐,细胞形态完整,结构正常,细胞质丰富,细胞核与细胞质界限清晰可见,核仁明显;与正常组比较,模型组和益智仁挥发油低剂量组小鼠海马组织CA1区神经细胞数量减少,细胞核浓染、与胞质界限模糊,细胞形态不规则,核仁不明显;与模型组比较,阳性药物组和益智仁挥发油高剂量组小鼠海马组织CA1区神经细胞排列较整齐,结构相对正常,核浓染和固缩的程度降低。这表明高剂量益智仁挥发油可以改善东莨菪碱导致的小鼠海马组织神经细胞受损。各组小鼠海马组织CA1区神经细胞形态学显微图见图2。

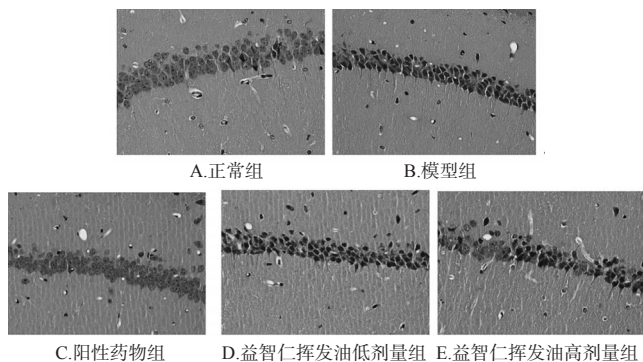


图2 各组小鼠海马组织CA1区神经细胞形态学显微图(HE,×400)

Fig 2 Morphological micrographs of hippocampal CA1 neurons of mice in each group(HE,×400)

### 3.3 益智仁挥发油对小鼠海马组织中AChE、ChAT活性的影响

与正常组比较,模型组小鼠海马组织中AChE活性

显著升高,ChAT活性显著降低,差异均有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,阳性药物组和益智仁挥发油低、高剂量组小鼠海马组织中AChE活性均降低,ChAT活性均升高,其中阳性药物组和益智仁挥发油高剂量组差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组小鼠海马组织中AChE、ChAT活性检测结果见表3。

表3 各组小鼠海马组织中AChE、ChAT活性检测结果( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Tab 3 Activities of AChE and ChAT in hippocampal tissue of mice in each group( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	AChE, U/mg	ChAT, U/g
正常组	0.31±0.09	102.66±14.32
模型组	0.59±0.13**	56.74±11.75**
阳性药物组	0.33±0.10 <sup>ΔΔ</sup>	94.67±10.45 <sup>ΔΔ</sup>
益智仁挥发油低剂量组	0.43±0.08	75.16±15.02
益智仁挥发油高剂量组	0.37±0.10 <sup>Δ</sup>	86.41±14.51 <sup>Δ</sup>

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>Δ</sup> $P<0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

Note: vs. normal group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ , <sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

### 3.4 益智仁挥发油对小鼠海马组织和血清中SOD、GSH-Px活性及MDA含量的影响

与正常组比较,模型组小鼠海马组织和血清中SOD、GSH-Px活性均显著降低,MDA含量均显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,阳性药物组和益智仁挥发油低、高剂量组小鼠海马组织和血清中SOD、GSH-Px活性均升高,MDA含量均降低,其中阳性药物组和益智仁挥发油高剂量组差异均有统计学意义( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组小鼠海马组织和血清中SOD、GSH-Px活性和MDA含量检测结果见表4。

表4 各组小鼠海马组织和血清中SOD、GSH-Px活性及MDA含量检测结果( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Tab 4 Activities of SOD, GSH-Px and contents of MDA in hippocampal tissue and serum of mice in each group( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	SOD		GSH-Px		MDA	
	海马组织, U/mg	血清, U/mL	海马组织, U/mg	血清, U/mL	海马组织, nmol/mg	血清, nmol/mL
正常组	174.45±19.47	74.76±12.38	65.04±11.74	175.30±26.52	1.43±0.20	4.18±1.12
模型组	105.31±16.63**	47.55±8.30**	38.15±9.12**	113.38±17.87**	2.04±0.21**	7.50±1.22**
阳性药物组	172.93±25.09 <sup>ΔΔ</sup>	72.81±10.34 <sup>ΔΔ</sup>	62.46±9.80 <sup>ΔΔ</sup>	168.60±22.49 <sup>ΔΔ</sup>	1.49±0.22 <sup>ΔΔ</sup>	4.34±1.13 <sup>ΔΔ</sup>
益智仁挥发油低剂量组	125.08±17.28	54.23±7.35	44.74±9.39	144.29±16.43	1.78±0.19	5.98±1.24
益智仁挥发油高剂量组	159.74±32.72 <sup>Δ</sup>	67.54±9.80 <sup>Δ</sup>	56.33±10.68 <sup>Δ</sup>	157.07±20.95 <sup>Δ</sup>	1.62±0.24 <sup>Δ</sup>	5.14±1.26 <sup>Δ</sup>

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>Δ</sup> $P<0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

Note: vs. normal group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ , <sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

## 4 讨论

东莨菪碱为M胆碱受体拮抗药,易透过血脑屏障进入中枢,可逆性地阻断中枢内M受体,减少乙酰胆碱(Ach)与受体结合,引起胆碱能神经系统功能失调,导致学习记忆功能障碍<sup>[9]</sup>。本实验采用东莨菪碱腹腔注射造模后,小鼠的逃避潜伏期、首次穿台时间、游泳路径明显

延长或增加,第Ⅲ象限停留时间、第Ⅲ象限路程百分比和穿台次数均明显缩短或减少,表明小鼠的学习记忆功能出现障碍,模型建立成功。益智仁挥发油干预后,其高剂量组小鼠上述指标较之模型组均有显著改善,表明小鼠的学习记忆能力得到明显提高。

Ach是中枢胆碱能神经系统的一种神经递质,在海马相关的学习记忆过程中起重要作用<sup>[10]</sup>。AChE和ChAT是Ach代谢过程中的两个关键酶:AChE是Ach的分解酶,ChAT则是Ach的合成酶,两者共同调节脑组织中Ach的含量,其活性高低可以反映药物对胆碱能神经功能的改善作用<sup>[11]</sup>。本研究发现,益智仁挥发油干预后,其高剂量组小鼠海马组织中AChE活性显著降低,ChAT活性显著升高,提示益智仁挥发油可能是通过调节AChE和ChAT的活性来调节胆碱能神经功能,从而发挥改善学习记忆功能的作用。

学习记忆障碍是多种神经系统疾病的共同症状。神经组织由于其独特的结构,更容易受到氧自由基的攻击,而细胞代谢时会产生大量自由基,易损伤DNA等大分子,加速神经细胞死亡并导致神经退行性疾病<sup>[12]</sup>。有研究表明,学习记忆障碍患者体内的自由基清除能力或抗氧化能力下降,导致氧应激因子过量,从而对神经细胞产生毒性<sup>[13]</sup>。当机体处于正常生理状态时,自由基不断产生的同时不断地被自身自由基清除系统清除,体内氧化与抗氧化系统保持着动态平衡,当机体出现某些病变时,如中枢胆碱能神经退化,可导致机体抗氧化酶活性不断下降,使体内氧自由基不能及时被清除,继而出现自由基异常堆积<sup>[13]</sup>。SOD是一种广泛存在于生物体内、维持机体自由基产生和清除动态平衡的重要酶,其可以催化超氧阴离子自由基发生歧化反应生成过氧化氢,较好地抵御氧自由基和其他氧化物对细胞的毒性作用,是体内清除自由基的重要抗氧化酶<sup>[14]</sup>。GSH-Px是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶,其能催化谷胱甘肽变成氧化型谷胱甘肽,使有害的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,从而起到保护细胞膜结构和功能的作用<sup>[15]</sup>。MDA是一种重要的脂质过氧化产物,其异常增加与记忆损伤有关<sup>[16]</sup>。本研究发现,高剂量益智仁挥发油可显著升高模型小鼠海马组织和血清中SOD、GSH-Px活性,显著降低MDA含量,提示益智仁挥发油可能通过抗氧化损伤发挥改善学习记忆功能的作用。

综上,益智仁挥发油可显著改善东莨菪碱导致的小鼠学习记忆障碍,其作用机制可能与抑制AChE活性、提高ChAT活性来增强胆碱能神经功能及抗氧化损伤有关。由于益智仁挥发油中的圆柚酮、芳樟醇等成分具有很好的抗氧化作用<sup>[5-6]</sup>,因此两者可能是其改善学习记忆作用的有效活性物质,但后续仍需进一步研究证实。

## 参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志:第6卷:第2分册[M]. 北京:科学出版社,1981:67.
- [2] SHIN TY, WON JH, KIM HM, et al. Effect of Alpinia oxy-

# 新型降血糖化合物G004的遗传毒性与生殖毒性研究<sup>△</sup>

蔡 鸣<sup>1\*</sup>, 侯 艳<sup>1</sup>, 乔红群<sup>2</sup>, 刘 晶<sup>1</sup>(1.江苏省药物研究所, 南京 210009; 2.南京工业大学药学院, 南京 211816)

中图分类号 Q355 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)22-3078-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.22.12

**摘要** 目的:研究新型降血糖化合物G004的遗传毒性与生殖毒性。方法:分别采用Ames试验(鼠伤寒沙门氏菌突变株回复突变试验)、CHL细胞(中国仓鼠肺成纤维细胞)染色体畸变试验、小鼠骨髓微核实验考察G004的遗传毒性;采用大鼠胚胎-胎仔发育毒性实验,在大鼠妊娠第6~15天连续灌胃给药G004(剂量分别为100、300、900 mg/kg),考察其对孕鼠体质量和摄食量、胚胎形成以及胎鼠生长发育等的影响,评价其生殖毒性。结果:遗传毒性方面,G004的Ames试验、CHL细胞染色体畸变试验和小鼠骨髓微核实验结果均为阴性;生殖毒性方面,G004各剂量组孕鼠均无明显毒性反应,100、300 mg/kg剂量组胎鼠生长发育正常,仅900 mg/kg剂量组出现吸收胎数增加及胎鼠骨骼发育迟缓。结论:G004无明显遗传毒性;剂量≤900 mg/kg时对怀孕大鼠母体无毒性作用,剂量≤300 mg/kg时对大鼠子代无致畸作用。

**关键词** 降血糖药;G004;遗传毒性;生殖毒性;胚胎;发育

## Study on Genotoxicity and Reproductive Toxicity of New Hypoglycemic Compound G004

CAI Ming<sup>1</sup>, HOU Yan<sup>1</sup>, QIAO Hongqun<sup>2</sup>, LIU Jing<sup>1</sup> (1. Jiangsu Institute of Materia Medica, Nanjing 210009, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Technology, Nanjing 211816, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the genotoxicity and reproductive toxicity of new hypoglycemic compound G004. METHODS: The genotoxicity of G004 was investigated by Ames trial (reverse mutation test of *Salmonella typhimurium* mutant), CHL cell (Chinese hamster lung fibroblasts) chromosomal aberration test and mice bone marrow micronucleus test. In embryo-fetal

- phylla fruit extract on compound 48/80-induced anaphylactic reactions[J]. *Am J Chin Med*, 2001, 29(2):293-302.
- [3] 钟恒亮,王荔萍,陈力.益智仁口服液镇静催眠作用实验研究[J].贵阳医学院学报,2002,27(2):132-134.
- [4] 黄凌,朱毅,邝少轶.益智仁挥发油抗帕金森模型小鼠黑质神经元凋亡的作用研究[J].中国药房,2011,22(47):4430-4433.
- [5] MITIĆ-CULAFIĆ D, ZEGURA B, NIKOLIĆ B, et al. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cell[J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(1):260-266.
- [6] 李生茂,彭璐,夏青,等.益智盐炙前后挥发油化学成分及抗氧化活性的比较研究[J].中医药信息,2015,32(6):23-27.
- [7] 杨久山,孙秀萍,王忆杭,等.连翘酯苷对东莨菪碱模型小鼠学习记忆的影响及其机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(8):177-181.
- [8] 王红利,薛莉君,万东,等.梓醇改善东莨菪碱诱导的学习记忆障碍及机制研究[J].中国药理学通报,2011,27(9):1271-1275.
- [9] JAIN NK, PATIL CS, KULKARNI SK, et al. Modulatory role of cyclooxygenase inhibitors in aging- and scopolamine or lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction in mice[J]. *Behav Brain Res*, 2002, 133(2):369-376.
- [10] WEINBERBERGER NM, MIASNIKOV AA, CHEN JC. Sensory memory consolidation observed: increased specificity of detail over days[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2009, 91(3):273-286.
- [11] 王爱梅,耿若君,李戈,等.早莲草对老年痴呆模型大鼠学习记忆及海马神经递质的影响[J].中国中医基础医学杂志,2016,22(3):332-335.
- [12] MARKESBERY WR, LOVELL MA. Damage to lipids, proteins, DNA, and RNA in mild cognitive impairment[J]. *Arch Neurol*, 2007, 64(7):954-956.
- [13] FAN Y, HU J, LI J, et al. Effect of acidic oligosaccharide sugar chain on scopolamine-induced memory impairment in rats and its related mechanisms[J]. *Neurosci Lett*, 2005, 374(3):222-226.
- [14] GOVERDHAN P, SRAVANTHI A, MAMATHA T. Neuroprotective effects of meloxicam and selegiline in scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress [J]. *Int J Alzheimers Dis*, 2012. DOI: 10.1155/2012/974013.
- [15] DRINGEN R. Metabolism and functions of glutathione in brain[J]. *Prog Neurobiol*, 2000, 62(6):649-671.
- [16] HALL ED, ANDRUS PK. Measurement of oxygen radicals and lipid peroxidation in neural tissues[M]. 2009. DOI:10.1002/0471142301.ns0717s48.

△ 基金项目:江苏省科技厅政策引导类计划(产学研合作)项目(No.BY2016005-10)

\* 副研究员。研究方向:毒理学、药物安全性评价。电话:025-83587711。E-mail:cmjssyy@sina.com

(收稿日期:2018-05-17 修回日期:2018-09-26)

(编辑:段思怡)