

四逆散对疲劳大鼠学习记忆及脑内 GABA_{B1} 表达的影响 *

刘 燕 刘晓兰 宋月晗 范新六 马佳美 王 霁 许展嘉 李 峰[△]

(北京中医药大学 北京 100029)

摘要 目的 探讨四逆散对疲劳大鼠学习记忆及脑内 GABA_{B1} 受体的影响。方法 应用游泳训练和睡眠剥夺方法复制疲劳动物模型,运用 Y- 迷宫检测各组大鼠的学习记忆能力,采用免疫组化方法检测大鼠脑内 GABA_{B1} 受体阳性反应物的变化。结果 模型组与正常组相比,大鼠 Y- 迷宫正确反应率明显下降,错误反应率明显升高,大鼠脑内 GABA_{B1} 的阳性反应物数目明显增多;中药治疗组与模型组相比,正确反应率明显升高,错误反应次数明显下降,脑内 GABA_{B1} 受体的阳性反应物数目明显减少。结论 四逆散对疲劳大鼠学习记忆能力的下降具有改善作用。

关键词 四逆散 学习记忆 GABA_{B1}

中图分类号 Q95-3, R285.5 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 01-5-03

Effects of Sinisan on Learning and Memory & Expression of GABAB1 Receptor in the Brain of Fatigue Rats*

LIU Yan, LIU Xiao-lan, SONG Yue-han, FAN Xin-liu, MA Jia-mei, WANG Ji, XU Zhan-jia, LI Feng[△]

(Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of Sinisan on learning and memory in fatigue model and the expression of GABA B1 receptor in rats brain. **Methods:** The Fatigue models were taken by the method of swimming training and sleep deprivation. Evaluate learning and memory changes through Y maze and the changes of positive cell counts of GABA B1 receptors in rat brain by immunohistochemical method. **Results:** The correct response rate of Y-maze correctly were obviously lower in the model group than those in the normal control group. The error rate of Y maze were obviously higher in the model group than those in the normal control group. The expression of GABA B1 receptors in rat brain were higher in the model group than those in the normal control group. Sinisan can significantly increase the correct rate of Y-maze correctly and decrease the error rate and decrease the expression of GABA B1 in rat brain. **Conclusion:** Sinisan can increase the abilities of learning and memory in fatigue rats.

Key words: Sinisan; Learning and Memory; GABA B1

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)01-5-03

前言

学习记忆能力是人类大脑的高级神经功能之一,也是人类生存的重要基础,它时刻影响着人们的日常生活、工作和学习。γ-氨基丁酸(GABA)是中枢神经系统中重要的抑制性神经递质,近几年的研究发现,它与学习记忆的关系密切^[1-3]。GABA主要通过 GABA 受体介导一系列的神经活动。现在已知的 GABA 受体共有 GABAA、GABAB 和 GABAC 三种亚型,其中 GABAB 受体又可以分为 GABA B1 和 GABA B2 两种,GABA B1 在纹状体分布较多,与学习记忆的关系密切^[4-8]。本实验观察四逆散对疲劳大鼠学习记忆的改善及其对脑内 GABA B1 受体的影响,旨在探讨本方改善学习记忆的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

健康 Spargue-Dawley (SD) 成年雄性大鼠 18 只,体重 260±20g 克,SPF 级别。由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。戊巴比妥钠 北京化学试剂公司;多聚甲醛 北京化学试剂公司;3-3 二氨基联苯胺(DAB) 显色试剂盒 北京中山生物技术有限公司;30% H₂O₂: 北京化学试剂公司;0.01M PBS: 2000ml/ 袋,北京中杉金桥生物技术有限公司;甲醇 北京化学试剂公司;正常山羊血清(工作液) 北京中杉金桥生物技术有限公司;5%牛血清白蛋白(BSA) 北京中杉金桥生物技术有限公司;GABA_{B1} 抗体 1:10000 公司 GABABR1 抗体 1:10000 公司 兔 ABC Kit 北京中杉金桥生物技术有限公司;GENMED 染色液 C H-E STAINING Kit: GENMED 公司,美国;中性树胶 中国上海标本模型公司。中药选用张仲景《伤寒论》的四逆散,由炙甘草、枳实、柴胡、赤芍各 6g 组成;上药均由东直门医

* 基金项目 国家自然科学基金项目 (30873217)

作者简介 刘燕 (1974),女,硕士,实验师,研究方向 病证结合的辨证规律研究

△通讯作者 刘燕,电话 84287074, E-mail: liuy806@163.com

(收稿日期 2010-10-08 接受日期 2010-10-31)

院药房制成免煎颗粒。

1.2 仪器与设备

Y- 迷宫, 睡眠剥夺箱, 游泳池, 恒温冷冻切片机 (Leica, Germany) 显微镜 (Nikon, Japan) 。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与造模 将经过游泳训练合格的 18 只大鼠随机分为 3 组 正常对照组, 模型组, 中药组。模型组和中药组大鼠, 每天游泳一次, 每次 1 小时, 其余时间进行睡眠剥夺。中药组自造模第 1 天始, 灌服四逆散, 按人体用量换算成大鼠等效剂量作为大鼠用药量, 灌胃容积为 1ml/kg, 其余两组灌胃蒸馏水。

1.3.2 标本制备及检测指标

1.3.2.1 学习记忆能力的检测 应用 Y 迷宫对所有大鼠进行正确反应率和错误反应次数试验, 检测其学习记忆能力。

1.3.2.2 脑内 NMDANR1 阳性表达的制备及检测 行为学测试

结束后, 将大鼠用多聚甲醛灌注, 取出大脑, 置于 4% 的多聚甲醛中后固定 10h, 然后将脑组织置于 30% 的蔗糖中 4℃ 保存。

组织用冷冻片机切片, 放在 4℃ 预冷的丙酮中后固定, 采用 ABC 法染色。用 Nikon 4500 数码相机和 Nikon E200 型显微镜组合拍摄图像在显微镜物镜 40 倍和数码相机 4 倍, 光学放大下进行照像。每组随机测试 6 张切片, 每一部位随机测试 2 个视野, 分别测量阳性细胞数目。

1.4 数据统计

结果均采用 SPSS13.0 统计软件分析, 所有数据用平均值± 标准差表示, 组间差异采用单因素方差分析检验。

2 结果

2.1 Y 迷宫学习记忆的测定 结果见表 1

表 1 各组大鼠 Y 迷宫的变化

Table 1 The changes of each group in Y-maze

group	Correct response rate	Error number	Numbers of time to learn
normal group	0.91± 0.04	2.83± 1.34	10.75± 1.42
model group	0.76± 0.07**	6.60± 2.67**	17.73± 7.03**
Sinisan group	0.89± 0.09△△	4.09± 3.62△	15.18± 8.08

Note △compared with normol group, *P<0.05, ** P<0.01 ; compares with model group, △P<0.05, △△P<0.01。

由表 1 可以看出, 模型组与正常组相比, 正确反应率明显降低 (P<0.01), 错误反应次数明显升高 (P<0.01), 达标所需训练次数明显增多 (P<0.01), 中药组与模型组相比, 正确反应率明显升高 (P<0.01), 错误反应次数明显降低 (P<0.01), 达标所

需训练次数有所改善。提示中药四逆散对疲劳导致的学习记忆能力下降有明显的改善作用。

2.2 四逆散对疲劳大鼠脑内 GABA B1 的影响 结果见表 3

表 2 各组海马及纹状体区 GABA B1 免疫阳性反应物比较

Table 2 The comparison of the positive immunoreactive products of GABAB1 in hippocampus and striatum

group	hippocampus	striatum
normal group	48.33± 2.07	51.17± 2.13
model group	53.83± 1.72**	55.50± 1.87**
Sinisan group	51.83± 1.47**△	53.33± 1.37*△△

Note △compared with normol group, *P<0.05, ** P<0.01 ; compares with model group, △P<0.05, △△P<0.01。

由表 2 可以看出, 模型组与正常组相比, 海马及纹状体部位的 GABA B1 阳性表达明显增多 (P<0.01), 中药组与模型组相比, 海马及纹状体部位的 GABA B1 阳性反应物明显减少 (P<0.05), 提示中药四逆散具有调节海马和纹状体部位的 GABA B1 受体的作用。

3 讨论

γ - 氨基丁酸是中枢神经系统中的主要抑制性神经递质, 其对学习记忆的影响主要是通过其受体来介导的。GABA 受体可区分为 GABAA、GABAB 和 GABAC 三种类型的受体, 其中

GABAA 和 GABA C 受体属于配体门控离子通道 (ligand-gated ion channel, LGIC) 受体超家族, GABA B 受体是 G- 蛋白偶联受体 (G protein coupled receptor, GPCR)^[9]。GABA B 受体根据解剖定位及生理功能的差异可分突触前受体及突触后受体^[10]。突触前受体又分为异身受体 (heteroreceptors) 和自身受体 (autoreceptors)^[11]。激活突触前 GABA B 的异身受体可能降低兴奋性递质 (Glu) 释放, 介导突触前抑制^[12] 而激活突触前 GABA B 的自身受体则降低抑制性递质 GABA 的释放, 介导突触前去抑制, 解除 GABA 产生的突触前抑制所造成的 Mg²⁺ 对 NMDA 受体离子通道的阻抑作用, 有利于去极化^[13]。突触后的 GABA

B受体可以通过G蛋白而激活 K^+ 通道,也可通过第二信使(如花生四烯酸AA)途径而激活 K^+ 通道引起 K^+ 大量内流产生突触后膜超极化^[14]。因此,本实验通过观察疲劳大鼠的GABA B1变化,探讨其对学习记忆能力的改变具有重要的意义。

Y迷宫实验研究表明,模型组与正常组相比,正确反应率明显降低($P<0.01$),错误反应次数明显升高($P<0.01$),说明模型组大鼠的学习记忆能力明显下降,达标所需训练次数明显增多($P<0.01$)。中药组与模型组相比,正确反应率明显升高($P<0.01$),错误反应次数明显降低($P<0.01$),达标所需训练次数有所改善。提示中药四逆散对疲劳导致的学习记忆能力下降有明显的改善作用。四逆散对疲劳大鼠海马的实验表明,模型组与正常组相比,海马及纹状体部位的GABA B1阳性表达明显增多($P<0.01$),中药组与模型组相比,海马及纹状体部位的GABA B1阳性反应物明显减少($P<0.05$),提示中药四逆散可能通过调节海马和纹状体部位的GABA受体的含量,从而改善了疲劳大鼠学习记忆能力。

中医学认为肝主疏泄,调畅气机,调节情志。故肝疏泄正常则气机调畅,气血和调,人的精神饱满,情绪稳定,思维敏捷。若肝失疏泄则肝不舒,气机不畅,精神抑郁,情绪不佳,反应迟钝。正如《素问 四时刺逆从论》所述:"血气上逆,令人善忘"犹如陈士铎在《辨证录》中所说:"气郁不舒,忽忽如有所失,目前之事竟不记忆,乃肝气之滞。"张仲景所著的《伤寒论》中的四逆散,具有疏肝解郁,调节全身气血的作用。四逆散可能是通过调节疲劳大鼠脑内氨基酸受体的表达,从而起到改善学习记忆能力的作用。

参考文献(References)

[1] Farr SA, Uezu K, Creonte TA, et al. Modulation of memory processing in the cingulate cortex of mice [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2000, 65(3): 363-8

[2] 袁水霞, 李霞, 于萍. 脑内GABA受体在学习记忆中的作用[J], 首都师范大学学报(社会科学版), 2009, 增刊, 156-160

[3] Getova DP, Bowery NG. Effects of high-affinity GABAB receptor antagonists on active and passive avoidance responding in rodents with gamma-hydroxybutyrolactone-induced absence syndrome [J]. Psychopharmacology(Berl), 2001, 157(1): 89-95

[4] 彭建安, 郭萍等. 大鼠纹状体GABA受体的表达及年龄性变化[J], 中国组织化学与细胞化学杂志, 2008, 17(3), 323-326

[5] Schuler V, Luscher C, Blanchet C, et al. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1)[J]. Neuron, 2001, 31(1): 47-58

[6] Yu Z, Cheng G, Hu B. Mechanism of colchicine impairment on learning and memory, and protective effect of CGP36742 in mice [J]. Brain Res, 1997, 750(1-2): 53-8

[7] Robbins MJ, Calver AR, Filippov AK, et al. GABA(B2) is essential for g-protein coupling of the GABA (B) receptor heterodimer [J]. J Neurosci, 2001, 21(20): 8043-52

[8] 董晓华, 张丹参, 孟宪勇. Glu/GABA水平相关性对学习记忆的影响[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26: 283-285

[9] Bormann J. The "ABC" of GABA receptors. Trends Pharmacol Sci, 2000, 21: 16-19

[10] Lingridge GL, Randall AD. The synaptic activation of NM DA and Ca^{2+} signaling in neurons[J]. Ciba Found Symp, 1992, 164: 162-171

[11] Nelson MT, Connors MA, Knot HJ. Chloride channel blockers inhibit myogenic tone in rat cerebral arteries [J]. J Physiol, 1997, 502: 259-264

[12] Bonanno G, Fassio A, Schmid G, et al. Pharmacologically distinct GABA_A receptors that mediate inhibition of GABA and glutamate release in human neocortex[J]. Br J Pharmacol, 1997, 120(1): 60-64

[13] Collingridge GL, Randall AD. The synaptic activation of NMDA and Ca^{2+} signalling in neurons[J]. Ciba Found Symp, 1992, 164: 162-171

[14] Miggeld U, Bijaak M, Jarolimek W. A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system[J]. Prog Neurobiol, 1995, 46: 423-446