

Effect of Xin Nao Jia Formula on the Learning and Memory Abilities and Cofilin Content of Prefrontal Cortex in the Chronic Alcoholism Rats*

Nannan Huan¹, Hongbo Jiang^{1,3}, Lijun Hou³, Na An², Lei Xu², Ailin Du^{1,2}, Guangrui Wan^{1,2#}

¹San Quan Medical College, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan

²Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan

³The Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan

Email: #wgr@xxmu.edu.cn

Received: Jul. 12th, 2013; revised: Aug. 4th, 2013; accepted: Aug. 10th, 2013

Copyright © 2013 Nannan Huan et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract: Objective: To study the effect of xin nao jia formula on the learning and memory abilities and cofilin content of prefrontal cortex in the chronic alcoholism rats. **Methods:** Establish chronic alcoholism rat model; use Y-maze experiment to explore the learning and memory abilities of xin nao jia formula and immunohistochemical experiment to detect the cofilin content in prefrontal cortex. **Results:** Learning and memory tests showed that the learning and memory scores of control group rats have significantly increased more than the alcohol poisoned model group ($P < 0.01$), and xin nao jia formula group increased obviously more than alcohol poisoned model group, ($P < 0.01$). The cofilin content of prefrontal cortex of control group rats significantly increased more than alcohol poisoned model group ($P < 0.01$), and xin nao jia formula group increased obviously more than alcohol poisoned model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xin nao jia formula can promote learning and memory abilities by adding cofilin content in the prefrontal cortex abilities.

Keywords: Xin Nao Jia Formula; Learning and Memory; Cofilin

心脑佳配方对慢性酒精中毒大鼠学习记忆及前额叶皮质丝切蛋白含量的影响*

宦楠楠¹, 姜洪波^{1,3}, 侯丽君³, 安娜², 徐磊², 杜爱林^{1,2}, 万光瑞^{1,2#}

¹新乡医学院三全学院, 河南新乡

²新乡医学院, 河南新乡

³新乡医学院第三附属医院, 河南新乡

Email: #wgr@xxmu.edu.cn

收稿日期: 2013年7月12日; 修回日期: 2013年8月4日; 录用日期: 2013年8月10日

摘要: 目的: 研究心脑佳配方对慢性酒精中毒大鼠学习记忆及前额叶皮质丝切蛋白含量的影响。**方法:** 建立大鼠慢性酒精中毒模型、Y-迷宫实验探究心脑佳配方对学习记忆的影响、免疫组化检测皮质额叶丝切蛋白含量。**结果:** 学习记忆测试显示对照组大鼠学习记忆成绩比酒精中毒模型组明显升高($P < 0.01$), 心脑佳配方组与酒精中毒模型组相比, 学习记忆成绩明显上升($P < 0.01$); 对照组大鼠前额叶皮质中丝切蛋白含量较酒精中毒模型组明显升高($P < 0.01$), 而心脑佳配方组与模型组相比, 前额叶皮质中丝切蛋白含量明显增加($P < 0.05$)。 **结论:** 心脑佳配方可通过增加前额叶皮质中丝切蛋白含量、提升学习记忆能力。

*基金项目: 新乡医学院三全学院大学生科研课题(DXSKYLX2012015); 河南省科技厅基础与前沿研究项目(112300410053)。

#通讯作者。

关键词：心脑佳配方；学习记忆；丝切蛋白

1. 引言

过量饮酒及酗酒对人类健康的危害正成为日益严重的社会问题，长期大量饮酒可导致人体多器官的损伤，以肝、脑受损最为严重^[1]。心脑佳配方由天麻、葛根等六味食药两用中药按一定比例组成，是新乡医学院万光瑞教授从众多对大脑和心血管有益的中药中遴选出来的作用强、性能好、安全、稳定的六味中药构成的复方制剂，心脑佳配方的主要作用成分为黄酮^[2]。大量研究表明黄酮能提高慢性酒精中毒大鼠的学习记忆能力。本实验通过培养大鼠酒精中毒模型，进行Y型迷宫试验、大鼠大脑皮质切片免疫组化检测丝切蛋白含量推测心脑佳配方对慢性酒精中毒大鼠的保护作用及其可能机制。

2. 材料和方法

2.1. 药品及试剂

自制心脑佳配方，丝切蛋白试剂(购自北京博奥森生物技术有限公司)。磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 M, PH = 7.2~7.4)，DAB 显色试剂盒 ZLI-9018(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

2.2. 动物和分组

清洁雄性 Sprague Dawley 大鼠，体重(200 ± 20)g，由郑州大学动物中心提供，许可证号：SCXK(豫)2005-0001。随机分成3组，每组8只，A组为对照组、B组为酒精中毒模型组、C组为酒精 + 心脑佳配方组(心脑佳配方组)。

2.3. 慢性酒精中毒大鼠模型的建立

A组大鼠自由饮食饮水，B、C组自由饮食，饮用水由一定浓度酒精水溶液代替，酒精浓度由6%开始逐日递增1%至15%维持该浓度持续8周。

2.4. 用药

第9周开始C组大鼠继续饮用15%酒精的同时，每天早上以总黄酮量为780 mg/ml的心脑佳配方生理盐水溶液(2 ml/kg)灌胃，A、B两组用生理盐水(2

ml/kg)灌胃，持续10天。

2.5. 学习记忆能力检测

学习记忆的行为检测在灌胃结束后第2天进行，以Y-迷宫作为学习记忆能力的检测模型。在仪器箱底施以电击，3条臂每一条顶端都有信号灯，实验时信号灯开启表示该臂为安全区即该臂底部不通电；另两条臂通电，训练动物学会分辨信号而主动逃避电击。灯光出现的方位按照随机次序变换。

将大鼠置于Y-迷宫中，把3条臂的指示灯均打开让其适应环境3 min后再将灯熄灭。随机打开其中一条臂的指示灯，不亮的两条臂自动延迟5 s后则通电电击大鼠直至逃避到安全区为止。然后灯亮持续15 s后熄灭，完成1次测试。大鼠在10 s内一次直接逃至安全区为正确反应，否则为错误反应。以10次电刺激后有9次做出正确反应为学会。用大鼠学会所需训练的次数和学会后记忆再现次数来表示学习记忆成绩。训练次数越少，记忆再现次数越多，说明大鼠学习能力越强。所有学习记忆测试均于安静、暗光下进行。对电刺激反应迟钝的大鼠予以剔除(每组均剔除2只)^[2,3]。被剔除的大鼠将不参与后续实验。

2.6. 获取组织和免疫组化染色

学习记忆检测后，10%水合氯醛麻醉，4%多聚甲醛固定，断头取脑，多聚甲醛固定过夜，梯度酒精脱水，二甲苯固定，石蜡包埋。将制成的石蜡组织连续冠状切片，片厚7 μm，免疫组化采用SP二步法，脱蜡至水，抗原修复，经孵育、脱水、透明、封片。低倍镜(×100)定位，高倍镜(×400)观察。

2.7. 免疫组化的结果判定

光学显微镜下观察丝切蛋白的染色情况，阳性细胞显色为棕黄色或是棕褐色，胞浆、胞核均可显色。在400倍光镜下每组标本选取6个不同的皮质视野区，应用IPP(Image-Pro Plus 6.0)软件分析测量每个视野的平均光密度值。

2.8. 统计学的处理

Y-迷宫数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示；免疫组

化学图片用照相系统在光学显微镜下采集, 平均光密度值用 Image Pro-Plus 6.0 软件处理, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS12.0 进行统计学分析, 组间比较采用 t 检验。

3. 结果

3.1. 心脑佳配方对慢性酒精中毒大鼠学习记忆的影响

Y 型迷宫检测结果显示对照组大鼠与酒精中毒模型组大鼠相比学习记忆能力明显下降($P < 0.01$), 心脑佳配方组大鼠与酒精中毒模型组大鼠相比, 学习记忆能力明显提高($P < 0.01$)(表 1)。

3.2. 心脑佳配方对慢性酒精中毒大鼠额叶皮质丝切蛋白含量的影响

免疫组化染色丝切蛋白在大鼠额叶皮质神经细胞表达, 阳性细胞胞核和胞质均被染成棕黄色。对照组额叶皮质阳性细胞丝切蛋白大量表达(图 1(a)), 酒精中毒模型组阳性细胞丝切蛋白表达明显减少(图 1(b)), 心脑佳配方组丝切蛋白表达较酒精中毒模型组明显增加(图 1(c))。

IPP 软件分析染色平均光密度结果显示酒精中毒模型组大鼠与对照组大鼠相比丝切蛋白含量明显降低($P < 0.01$), 心脑佳配方组与酒精中毒模型组大鼠相比丝切蛋白含量明显上升($P < 0.05$)(表 2)。

4. 讨论

酒精中毒对神经系统最大的危害就是酒精对神经细胞的毒性作用以及对学习记忆的损害^[4]。本研究采用 Y-迷宫检测慢性酒精中毒大鼠学习记忆能力, 结果显示对照组大鼠与酒精中毒模型组大鼠相比学习记忆能力明显升高, 心脑佳配方组大鼠与酒精中毒模型组大鼠相比学习记忆能力明显提高, 提示心脑佳配方能提高慢性酒精中毒大鼠的学习记忆能力。

在哺乳动物脑内, 前额叶皮质(prefrontal cortex)是神经元可塑性的重要区域, 与学习和记忆的形成密切相关。同时, 前额叶皮质也是酒精累及的敏感部位^[5]。因此本研究选取大鼠前额叶皮质作为研究慢性酒精中毒大鼠对学习记忆影响的部位。丝切蛋白是主要的肌动蛋白解聚因子, 通过对 AMPA(α -氨基-3-羟基

Table 1. The effect of xin nao jia formula on the learning and memory abilities in the chronic alcoholism rats
表 1. 心脑佳配方对慢性酒精中毒大鼠学习记忆的影响

| 组别 | 学会训练次数 | 记忆再现次数 |
|-----------|----------------|---------------|
| A 对照组 | 35.83 ± 3.66** | 7.33 ± 1.03** |
| B 酒精中毒模型组 | 79.83 ± 6.79 | 4.00 ± 1.26 |
| C 心脑佳配方组 | 51.17 ± 5.85** | 6.33 ± 1.03** |

注: **与酒精中毒模型组相比 $P < 0.01$ 。

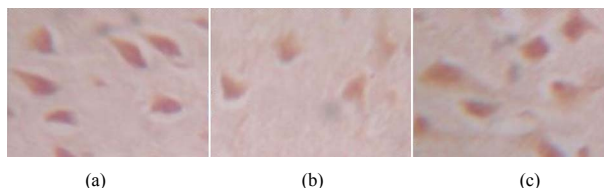


Figure 1. (a) Control group; (b) Alcohol poisoned model group; (c) Xin nao jia formula group

图 1. (a) 对照组($\times 400$); (b) 酒精中毒模型组($\times 400$); (c) 心脑佳配方组($\times 400$)

Table 2. The effect of xin nao jia formula on cofilin content of prefrontal cortex in the chronic alcoholism rats
表 2. 心脑佳配方对慢性酒精中毒大鼠额叶皮质丝切蛋白含量影响

| 组别 | 丝切蛋白含量 |
|-----------|-----------------|
| A 对照组 | 0.213 ± 0.008** |
| B 酒精中毒模型组 | 0.184 ± 0.006 |
| C 心脑佳配方组 | 0.200 ± 0.009* |

注: **与酒精中毒模型组相比, $P < 0.01$ 。*与酒精中毒模型组相比 $P < 0.05$ 。

-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体, 谷氨酸受体的一种亚型)受体转运和肌动蛋白动态变化的调节, 影响突触可塑性, 而在学习记忆有着密切的关系^[6]。突触可塑性是指突触在一定条件下调整功能、改变形态和增减数目的能力, 包括突触传递效能和突触形态结构的改变^[6]。其物质基础涉及到神经元和突触部位的某些神经递质、受体、蛋白质、基因等物质的改变^[7]。目前研究认为, 突触可塑性是中枢神经系统学习和记忆的细胞学机制^[8]。额叶突触失去丝切蛋白调节肌动蛋白可以导致各种类型的学习受损^[9]。本研究中免疫组化染色平均光密度结果显示对照组大鼠与酒精中毒模型组大鼠相比丝切蛋白含量明显升高, 心脑佳配方组大鼠与酒精中毒模型组大鼠相比丝切蛋白含量明显上升, 提示心脑佳配方能增加慢性酒精中毒大鼠额叶皮质丝切蛋白含量。

心脑佳配方的主要成分是黄酮, 大量研究表明酒

精能使大鼠学习记忆能力降低, 黄酮能改善慢性酒精中毒大鼠学习记忆能力。本研究结果提示心脑佳配方对慢性酒精中毒大鼠有保护作用, 可能通过增加额叶皮质丝切蛋白含量而增强慢性酒精中毒大鼠学习记忆能力, 但其引起丝切蛋白含量变化的机制还有待进一步的实验证实。

参考文献 (References)

- [1] 蓝贤俊, 邓彩霞, 陈永兰等. 白茅根对酒精中毒小鼠肝及脑损伤的保护作用研究[J]. 医学理论与实践, 2012, 25(2): 125-126, 128.
- [2] 李爽, 万佳, 陈文捷等. 心脑佳配方对慢性酒精中毒大鼠学习记忆及海马NMDA受体亚基NR2B表达的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2011, 27(1): 5-6, 80.
- [3] 王跃春, 王子栋, 孙黎明等. 动物记忆能力的 Y-型迷宫测试法(综述)[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2001, 22(5): 137-140.
- [4] C. Ince. The microcirculation is the motor of sepsis. *Critical Care*, 2005, 9(suppl. 4): S13-S19.
- [5] 徐春阳, 李爽, 郝伟等. 白藜芦醇对慢性酒精中毒大鼠前额叶皮质 cdk5 表达的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2012, 22(2): 158-159, 188, 194.
- [6] 葛建岭, 朋立超, 金孝炬. Cofilin 与学习记忆的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(1): 10-13.
- [7] 温薇, 金在顺, 周敏等. 开心散影响突触可塑性的研究进展[J]. 中医药学报, 2010, 38(2): 140-141.
- [8] L. Zhang, Y.-H. Li, K. Meng, et al. Subiculum areas after theta-burst stimulation of Schaffer collateral commissural fibers in rat hippocampal slices. *Chinese Journal of Physiology*, 2010, 53(5): 328-336.
- [9] M. B. Rust, C. B. Gurniak, M. Renner, et al. Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *The EMBO Journal*, 2010, 29(11): 1889-1902.