

## · 论著 ·

## 刺五加苷 E 对小鼠学习及记忆能力的影响

汪 洋<sup>1,2</sup>, 翟 欣<sup>2</sup>, 韩利亚<sup>2</sup>, 张 宏<sup>2</sup>, 郑承剑<sup>2</sup>, 秦路平<sup>2</sup> (1. 浙江英特医药药材有限公司, 浙江 杭州 310000; 2. 第二军医大学药学院生药学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 探讨刺五加苷 E 对对氯苯丙氨酸(PCPA)造模小鼠学习记忆行为以及对海马内单胺类神经递质 5-羟色胺(5-HT)、5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)、多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NA)的影响。方法 Balb/c 小鼠随机分为空白组,模型组,阳性药组,刺五加苷 E(ELE)高、中、低剂量组。以 PCPA 腹腔注射建立小鼠损伤模型,给药 14 d 后 Morris 水迷宫实验测试小鼠的学习记忆能力,Elisa 试剂盒测定小鼠海马组织中 5-HT、5-HIAA、DA、NA 的含量。结果 行为学结果显示,模型组小鼠穿越平台次数较空白组明显降低( $P < 0.01$ ),ELE 高、中剂量组可明显增加小鼠穿越平台次数( $P < 0.01$ ),模型组小鼠 5-HT、5-HIAA 较空白组显著降低( $P < 0.01$ ),NA 也显著降低( $P < 0.05$ )。ELE 各剂量组 5-HT、5-HIAA 含量较模型组显著升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),ELE 高、中剂量可明显改善 DA、NA 的含量,且与模型组相比,差异显著( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。结论 ELE 提高 PCPA 造模小鼠学习记忆能力可能与其改善海马组织中 5-HT、5-HIAA、DA 和 NA 的含量有关。

**[关键词]** 刺五加苷 E; 认知功能; 单胺类递质

**[中图分类号]** R285

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2016)04-0318-03

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.04.008

## Effects of eleutheroside E on learning and memory ability in mice

WANG Yang<sup>1,2</sup>, ZHAI Xin<sup>2</sup>, HAN Liya<sup>2</sup>, ZHANG Hong<sup>2</sup>, ZHENG Chengjian<sup>2</sup>, QIN Luping<sup>2</sup> (1. Zhejiang Int Medicinal Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310000, China; 2. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the influence of eleutheroside E (ELE) on the learning and memory abilities of mice induced by para-chlorophenylalanine (PCPA) and on hippocampus' monoamine neurotransmitters of serotonin (5-HT), 5-hydroxy-indole acetic acid (5-HIAA), dopamine (DA) and norepinephrine (NA). **Methods** Balb/c mice were randomized into control group, model group, positive group and three treatment groups (high, moderate and low dose group). The mouse injury model was established by PCPA abdominal injection. The mice's abilities of learning and memory were detected in the Morris water maze test after 14 days of prevention medicine. The contents of 5-HT, 5-HIAA, DA and NA in mice's hippocampus were detected by Elisa kit. **Results** The behavior results showed that, compared with control group, the times across the platform by model group decreased significantly ( $P < 0.01$ ). The times across the platform by high and moderate dose groups increased significantly ( $P < 0.01$ ) after the administration of ELE. The contents of 5-HT and 5-HIAA of the model group were lower than those of the control group ( $P < 0.01$ ). The contents of NA was lower too ( $P < 0.05$ ). The contents of 5-HT and 5-HIAA of different dose groups were much higher than those of the model group. **Conclusion** The enhancement of learning and memory ability in the mouse injury model established by PCPA might be related with the improvement of the contents of 5-HT, 5-HIAA, DA, NA in mice's hippocampus by ELE.

**[Key words]** eleutheroside E; cognitive function; single amine neurotransmitter

刺五加苷 E(eleutheroside E, ELE)是中药刺五

加中的一种重要的活性成分,研究发现 ELE 具有抗疲劳活性,对长期睡眠剥夺导致的认知行为损伤具有改善作用<sup>[1]</sup>。然而,其改善认知损伤的作用机制尚不明确。单胺类神经递质是一类影响学习记忆的重要神经递质,其合成和代谢的紊乱会影响学习记忆能力<sup>[2,3]</sup>。对氯苯丙氨酸(PCPA)是一种 5-羟色胺(5-HT)合成抑制剂,本研究采用 PCPA 建立小鼠

**[基金项目]** 国家科技重大专项资助项目(2012ZX09J12110-01C)

**[作者简介]** 汪 洋,执业中药师。研究方向:生药质量评价。E-mail: 23095939@qq.com

**[通讯作者]** 秦路平,教授。研究方向:生药鉴定与质量评价;生药资源与新药开发。E-mail: qinsmmu@126.com

模型,探讨ELE对PCPA造模小鼠认知功能和海马内单胺类神经递质的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 Balb/c 小鼠,雄性,体重 18~22 g(动物合格证号:2007000543073,上海斯莱克实验动物有限责任公司)。

1.1.2 药品与试剂 ELE(第二军医大学药学院生药学教研室自制,质量分数 > 96%,批号:06/100304),PCPA(Sigma 公司,批号:H109520244),盐酸氟西汀胶囊(礼来苏州制药有限公司,批号:J20080016),羧甲基纤维素钠(国药集团化学试剂有限公司)。

1.1.3 仪器与设备 Morris 水迷宫实验设备(RD1101-MWM-G,上海移数信息科技有限公司),5-HT Elisa 试剂盒、5-HIAA Elisa 试剂盒、DA Elisa 试剂盒、NA Elisa 试剂盒均购自武汉 Cusabio 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 药物的配制 ELE、盐酸氟西汀均用 0.5% 羧甲基纤维素钠配制,PCPA 用 0.9% 生理盐水配制,加入 2 滴吐温-80 助溶。

1.2.2 动物分组及模型的制备 将实验小鼠随机分为空白组,模型组,阳性药盐酸氟西汀组(10 mg/kg),ELE 高剂量组(60 mg/kg)、中剂量组(30 mg/kg)、低剂量组(10 mg/kg),每组 10 只。空白组、模型组小鼠给予相应容量的 0.5% 羧甲基纤维素钠。每组小鼠连续灌胃 14 d,自灌胃第 7 天开始,对每组小鼠进行 Morris 水迷宫训练实验。在小鼠给药第 12 天,除空白组外,其余各组在灌胃给药 1 h 后,于小鼠腹腔注射 PCPA 给药,剂量为 200 mg/kg,每天 1 次,连续 3 d,最后一次注射完 30 min 后,进行行为学测试<sup>[4]</sup>。

1.2.3 Morris 水迷宫空间搜索实验 在给药后的第 7 天最后一次训练后撤除水下平台,在同一入水点将小鼠面向池壁放入水中,观测其在 120 s 内跨过原平台相应位置的次数<sup>[5]</sup>。

1.2.4 小鼠海马内单胺类神经递质的测定 于冰砂上操作,取小鼠大脑,分离海马组织,称重,于液氮中保存备用,测定前将组织用 PBS 溶液制备成 10% 匀浆液,然后置于 -20 °C 冰箱过夜。经反复冻溶 2 次处理后,匀浆液于 4 °C、5 000 r/min 离心 5 min,取上清液。上清液通过 Elisa 试剂盒分析 5-HT、5-HIAA、DA、NA 含量。

1.3 统计学分析 结果用( $\bar{x} \pm s$ )表示,利用 SPSS16.0 统计软件,进行 ANOVA 单因素分析。

## 2 结果

2.1 ELE 对 PCPA 造模小鼠空间学习记忆能力的影响 由实验结果可知,与空白组相比,模型组小鼠 Morris 水迷宫平台穿越次数显著减少( $P < 0.01$ ),说明 PCPA 腹腔注射给药后,小鼠学习记忆能力明显受损。与模型组相比,阳性药组及高、中剂量组小鼠的穿越次数均显著增加( $P < 0.01$ ),说明阳性药盐酸氟西汀和 ELE 高、中剂量均可增强小鼠学习记忆能力,且与阳性药组比较,ELE 高剂量组小鼠穿越次数差异无统计学意义,见表 1。

表 1 ELE 对 PCPA 造模小鼠 Morris 水迷宫穿越次数的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量 (mg/kg)	Morris 穿越次数 (次/2 min)
空白组	NS	4.20 ± 1.10
模型组	NS	1.60 ± 1.21**
阳性药组	10	9.25 ± 1.91##
低剂量组	10	2.75 ± 1.89
中剂量组	30	6.75 ± 1.76##
高剂量组	60	9.25 ± 2.45##

\*\*  $P < 0.01$ ,与空白组比较;##  $P < 0.01$ ,与模型组比较

2.2 ELE 对 PCPA 造模小鼠海马内单胺类成分含量的影响 实验结果显示,PCPA 给药后,模型组小鼠海马内 5-HT、5-HIAA 含量较空白组显著降低( $P < 0.01$ ),NA 显著降低( $P < 0.05$ ),DA 含量也有所下降,但无显著差异。阳性药组及 ELE 各剂量组小鼠的 5-HT、5-HIAA 含量均显著升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),阳性药明显增高 DA 含量( $P < 0.01$ ),ELE 高、中剂量对 DA、NA 的含量均有显著升高作用( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。与阳性药相比,ELE 中剂量在改善 5-HIAA 含量方面,ELE 高剂量在改善 DA 含量方面,均效果显著( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),见表 2。

## 3 讨论

单胺类神经递质是影响机体学习记忆功能的一类重要的神经递质<sup>[6]</sup>。其合成和代谢的紊乱将影响机体正常的学习记忆能力。5-HT 主要参与情感、睡眠、疼痛、学习记忆等复杂生理功能的调节。5-HIAA 是 5-HT 的主要代谢产物,5-HIAA 的含量

(下转第 371 页)

胞<sup>[14]</sup>。因此,DC-CIK 联合治疗表现出短期和长期的抗肿瘤作用,与临床研究的结果一致<sup>[15]</sup>。Marten 等<sup>[16]</sup>发现将同源 DC 和 CIK 细胞共培养后,DC 和 CIK 细胞的增殖能力及 CIK 细胞的杀伤活性均明显增强,并可诱导高效细胞因子激活和特异性 T 细胞反应。

残余肿瘤细胞可导致肿瘤复发和转移是临床治疗中的难题。DC-CIK 是杀伤残余肿瘤细胞最为有效的细胞,可建立有效免疫应答,在减少细胞毒性的同时杀伤肿瘤细胞,因此,患者可以很好地耐受这种治疗方式<sup>[17-19]</sup>。一般情况下,DC-CIK 治疗可刺激所需足够数量的活化 T 细胞,增强多种细胞因子的大量分泌,其诱导的抗肿瘤特异性免疫反应强、持续时间长、引起的不良反应轻,无需特殊处理,未见明显的毒性作用报道。在治疗结直肠癌方面,笔者发现 DC-CIK 治疗可提高结直肠癌患者机体的免疫功能,增强抗肿瘤疗效,对降低术后 5 年复发率和延长患者生存时间有重要意义<sup>[20]</sup>。

虽然 DC-CIK 治疗可有效控制肿瘤原发病灶,但无法确定过继免疫疗法是否能够长期有效控制肿瘤,预防复发。肿瘤细胞呈高度异质性<sup>[21]</sup>,一个明确的肿瘤可以同时在不同部位分别表达高水平、低水平的主要组织相容性抗原复合物 I (major histocompatibility complex I, MHC-I) 类限制性<sup>[22]</sup>,有意思的是,MHC-I 表达体现在肿瘤细胞之间的异构和通过 MHC-I 促进免疫细胞识别肿瘤细胞。MHC-I 高表达的肿瘤细胞可能对 DC 疫苗较为敏感,而低表达 MHC-I 的肿瘤细胞对 CIK 更敏感。因此,DC-CIK 治疗可根据不同人群肿瘤细胞 MHC-I 的表达水平发挥不同的作用。然而,可能是由于一个特定肿瘤的异质性,一种单一类型的免疫治疗可能只在某一种癌症族群患者中有效,在结直肠癌的治疗中同样存在此类限制。这便是生物治疗需要攻克的,获得足够的免疫效应器,识别肿瘤靶点,以及特定的 MHC 限制性。

## 【参考文献】

[1] 陈 勇. 口服单药希罗达与 FOLFOX 方案治疗晚期结直肠癌的疗效比较[J]. 中国药业, 2012, 21(11):90-91.

[2] Thara E, Dorff TB, Pinski JK, *et al.* Vaccine therapy with sipuleucel-T (provenge) for prostate cancer[J]. *Maturitas*, 2011, 69(4):296-303.

[3] Fox BA, Schendel DJ, Butterfield LH, *et al.* Defining the critical hurdles in cancer immunotherapy[J]. *J Transl Med*, 2011, 9:214.

[4] Bol KF, Tel J, de Vries IJM, *et al.* Naturally circulating

dendritic cells to vaccinate cancer patients[J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(3):e23431.

[5] Tel J, Smits EL, Anguille S, *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities[J]. *Blood*, 2012, 120(19):3936-3944.

[6] Wang X, Yu W, Li H, *et al.* Can the dual-functional capability of CIK cells be used to improve antitumor effects? [J]. *Cell Immunol*, 2014, 287(1):18-22.

[7] Frankenberger B, Schendel DJ. Third generation dendritic cell vaccines for tumor immunotherapy[J]. *Eur J Cell Biol*, 2012, 91(1):53-58.

[8] Mesiano G, Todorovic M, Gammaitoni L, *et al.* Cytokine-induced killer (CIK) cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(6):673-684.

[9] Jakel CE, Hauser S, Rogenhofer S, *et al.* Clinical studies applying cytokine-induced killer cells for the treatment of renal cell carcinoma[J]. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012:473245.

[10] Mesiano G, Todorovic M, Gammaitoni L, *et al.* Cytokine-induced killer (CIK) cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(6):673-684.

[11] Shi S, Wang R, Chen Y, *et al.* Combining antiangiogenic therapy with adoptive cell immunotherapy exerts better anti-tumor effects in non-small cell lung cancer models[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e65757.

[12] Hasumi K, Aoki Y, Wantanabe R, *et al.* Clinical response of advanced cancer patients to cellular immunotherapy and intensity-modulated radiation therapy [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(10):e26381.

[13] Hontscha C, Borck Y, Zhou H, *et al.* Clinical trials on CIK cells; first report of the international registry on CIK cells (IRCC)[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(2):305-310.

[14] Thanendrarajan S, Nowak M, Abken H, *et al.* Combining cytokine-induced killer cells with vaccination in cancer immunotherapy; more than one plus one? [J]. *Leuk Res*, 2011, 35(9):1136-1142.

[15] Schlom J. Recent advances in therapeutic cancer vaccines[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2012, 27(1):2-5.

[16] Marten A, Renoth S, von Lilienfeld-Toal M, *et al.* Enhanced lytic activity of cytokine-induced killer cells against multiple myeloma cells after co-culture with idiotype-pulsed dendritic cells[J]. *Haematologica*, 2001, 86(10):1029-1037.

[17] Xiang B, Snook AE, Magee MS, *et al.* Colorectal cancer immunotherapy[J]. *Discov Med*, 2013, 15(84):301-308.

[18] Toomey PG, Vohra NA, Ghansah T, *et al.* Immunotherapy for gastrointestinal malignancies[J]. *Cancer Control*, 2013, 20(1):32-42.

[19] Cui Y, Yang X, Zhu W, *et al.* Immune response, clinical outcome and safety of dendritic cell vaccine in combination with cytokine-induced killer cell therapy in cancer patients[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(2):537-541.

[20] Mesiano G, Todorovic M, Gammaitoni L, *et al.* Cytokine-in-

duced killer (CIK) cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(6):673-684.

[21] Duru N, Fan M, Candas D, *et al*. HER2-associated radioresistance of breast cancer stem cells isolated from HER2-negative breast cancer cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(24):

6634-6647.

[22] Beutler N, Hauka S, Niepel A, *et al*. A natural tapasin isoform lacking exon 3 modifies peptide loading complex function [J]. *Eur J Immunol*, 2013, 43(6):1459-1469.

[收稿日期] 2016-04-08 [修回日期] 2016-05-17  
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 319 页)

表 2 ELE 对 PCPA 造模小鼠海马内单胺类成分含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量 (mg/kg)	5-HT ( $\mu\text{g}/\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	5-HIAA ( $\mu\text{g}/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	DA ( $\mu\text{g}/\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	NA ( $\mu\text{g}/\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )
空白组	NS	5 383.68±676.78	1.63±0.04	7.19±0.68	53.01±7.42
模型组	NS	4 055.70±630.23**	1.46±0.12**	6.92±0.89	45.21±4.49*
阳性药组	10	4 937.20±574.89##	1.69±0.12##	12.42±2.91##	48.50±7.04
低剂量组	10	4 790.01±488.27#	1.71±0.18##	6.08±0.98	46.94±8.52
中剂量组	30	5 004.70±633.61##	1.82±0.06## <sup>Δ</sup>	9.19±2.07#	50.92±5.87#
高剂量组	60	5 283.70±226.83##	1.76±0.12##	22.02±4.02##	54.60±5.22##

\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ , 与空白组比较; #  $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ , 与模型组比较; <sup>Δ</sup>  $P<0.05$ , 与阳性药组比较

变化可直接反应 5-HT 的变化。有研究指出, DA 和 NA 含量的减少是造成学习记忆能力减退的重要原因<sup>[7]</sup>。本实验采用 PCPA (5-HT 合成抑制剂) 建立动物模型, 用以探讨 5-HT 和 5-HIAA 等单胺类神经递质在 ELE 改善认知功能损伤中的作用。

行为学结果显示, PCPA 连续 3 d 腹腔注射, 剂量 200 mg/kg 可导致小鼠 Morris 水迷宫穿越次数较空白组明显减少, 且模型组小鼠海马组织中 5-HT、5-HIAA、NA 含量较空白组均明显下降, DA 含量较空白组小鼠下降, 但无显著差异。这说明一定剂量的 PCPA 造模可损伤小鼠的空间学习记忆能力。同时证实了学习记忆能力的下降与海马内单胺类神经递质紊乱密切相关。给药后, ELE 高、中剂量组小鼠穿越平台次数较模型组明显增多, ELE 各剂量均可使小鼠体内 5-HT、5-HIAA 含量明显升高, 高、中剂量可明显升高 DA、NE 含量。这说明 ELE 可能通过升高小鼠体内单胺类神经递质的含量从而改善 PCPA 造模小鼠的学习记忆能力。阳性药盐酸氟西汀是一种选择性 5-HT 重吸收抑制剂, 可改善突触间隙中 5-HT 的生物利用度<sup>[8]</sup>, 该实验结果显示在改善 5-HT、5-HIAA 和 DA 含量方面, 一定剂量的 ELE 表现出与盐酸氟西汀相同的效果。然而, 由于单胺类神经递质合成和代谢过程复杂, 故其确切机制尚待进一步研究。

### 【参考文献】

- [1] Huang LZ, Wei L, Zhao HF, *et al*. The effect of eleutheroside E on behavioural alterations in murine sleep deprivation stress model [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 658 (2-3):150-155.
- [2] BIRTHELMER A, STEMMELIN J, JACKISCH R, *et al*. Presynaptic modulation of acetylcholine, noradrenaline, and serotonin release in the hippocampus of aged rats with various levels of memory impairments [J]. *Brain Res Bull*, 2003, 60 (3):283-296.
- [3] De la Fuente M, HEMANZ A, MEDINA S, *et al*. Characterization of monoamine systems in brain regions of prematurely ageing mice [J]. *Neurochem Int*, 2003, 43 (2): 165.
- [4] Alkam T, HIRAMATSU M, MAMIYA T, *et al*. Evaluation of object-based attention in mice [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 220(1): 185-193.
- [5] Gao YL, Li CM, Yin JG, *et al*. Fucoidan, a sulfated polysaccharide from brown algae, improves cognitive impairment induced by infusion of A $\beta$  peptide in rats [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2012, 33(2):304-311.
- [6] 刘耕陶. 当代药理学 [M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008:567-568.
- [7] 李竹, 郭月英. 人参促智作用机理研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 1998, 15(1):73-76.
- [8] Cunha MP, Pazini FL, Oliveira A, *et al*. Evidence for the involvement of 5-HT (1A) receptor in the acute antidepressant-like effect of creatine in mice [J]. *Brain Res Bull*, 2013, 95 (6): 61-69.

[收稿日期] 2016-01-14 [修回日期] 2016-05-23  
[本文编辑] 李睿旻