

辅酶 Q₁₀对动物学习记忆的促进作用研究

姚文兵, 王 华, 施 军, 梁越欣, 陈 鹏, 高向东*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

【摘 要】 目的: 观察辅酶 Q₁₀(CoQ₁₀) 对东莨菪碱所致记忆障碍模型小鼠和 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)单侧损伤 Meynert 基底核大鼠学习记忆的促进作用。方法: 利用东莨菪碱所致记忆障碍模型小鼠和 NMDA 单侧损伤 Meynert 基底核大鼠, 采用水迷宫和 Y 迷宫评价促智作用, 采用放射化学法测定大鼠皮层内乙酰胆碱转移酶(ChAT)活性。结果: 辅酶 Q₁₀能改善东莨菪碱所致小鼠的空间辨别学习记忆障碍, 对胆碱能损伤记忆功能具有恢复作用, 能防止 ChAT 活性降低。结论: 辅酶 Q₁₀对动物学习记忆有明显促进作用。

【关键词】 辅酶 Q₁₀; 乙酰胆碱转移酶; 东莨菪碱; NMDA; 学习记忆

【中图分类号】 R965 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2004)01-0073-04

CoQ₁₀具有比较广泛的药理作用, 能够改善缺血心肌氧利用率, 具有心肌线粒体 ATP 合成酶活化作用、心功能低下改善作用、心肌保护作用、抗醛甾酮作用等, 已用于临床多年, 在临床上主要用于急性慢性肝炎、轻中度充血性心功能不全及癌症等辅助治疗。近年来, 国内外对 CoQ₁₀的药理作用研究较为活跃, 除用于临床的药理作用外, 前人的研究还表明^[1]: CoQ₁₀作为抗氧化剂具有延缓衰老作用。本文观察了 CoQ₁₀对动物学习记忆的促进作用, 为 CoQ₁₀用于抗衰老、防治老年性痴呆提供实验依据。

1 实验材料

1.1 动物

昆明种小鼠, 雌雄各半, 体重 20 ± 2 g, 雄性 SD 大鼠, 体重 250 ~ 300 g, 合格证号: SCXK(苏)2002-0016, 均购于南京医科大学实验动物中心。

1.2 实验试剂

辅酶 Q₁₀(CoQ₁₀, 浙江海力生制药厂); 哈伯因(HupA, 石杉碱甲, 豫中制药厂, 批号 020401 103), *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA, Sigma 公司); [H³] 乙酰辅酶 A (Sigma 公司); 毒扁豆碱(Fluka 公司); 氯化胆碱(上海试剂三厂); 2, 5-二苯基噻唑、1, 4-双(5-苯基噻唑基-2-苯)闪烁纯, 上海试剂一厂; 其余常用化学试剂均为国产分析纯。

1.3 实验仪器

高速冷冻离心机(Tony Seiko Co., Ltd); 江湾 I 型立体定向仪(上海医用仪器厂); 370-6 台式牙科钻(上海齿科器械厂); MG-3 迷宫刺激器(张家港市教学试验器械厂); LS5000TD 液体闪烁仪(Beckman 公司); Y 型水迷宫装置(中国医学科学院药物所)。

2 实验方法

2.1 东莨菪碱所致记忆障碍模型小鼠的测定

2.1.1 迷宫训练方法^[2] 取小鼠 120 只, 随机分为 6 组, 每组 20 只, 适应 1 天, 从第 2 天起用水迷宫实验进行初筛, 连续训练 3 d, 训练期间小鼠自由进食饮水。

小鼠再随机分组, 雌雄各半, 记录小鼠游抵终端阶梯平台的时间, 以及游入盲端的次数(错误次数)。每天训练 2 次, 连续训练 1 周, 淘汰未达标者(游抵平台时间超过 20 s 或错误次数超过 2)。

2.1.2 给药方案 CoQ₁₀与阳性对照药哈伯因分别用 1% 的 CMC-Na 混悬均匀。将小鼠随机分为 6 组(每组 12 只, 雌雄各半), 分别为: 假损伤组(1% CMC-Na), 模型组(1% CMC-Na), 哈伯因组(0.5 mg/kg), CoQ₁₀高剂量组(40 mg/kg), CoQ₁₀中剂量组(20 mg/kg), CoQ₁₀低剂量组(10 mg/kg)。连续给药 2 周, 每日灌胃 1 次, 末次给药后开始造模。造模时

*【收稿日期】 2003-10-08 【*通讯作者】 Tel: 025-83271225

【基金项目】 教育部高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划

除假损伤组注射 2 ml/kg 生理盐水外,其余各组均注射东莨菪碱 3 mg/kg。

2.1.3 东莨菪碱所致记忆障碍小鼠模型的建立及空间学习记忆实验^[3] 末次给药后 1 h,模型组、阳性对照组及给药组腹腔注射东莨菪碱(3 mg/kg),假损伤组腹腔注射等容量的生理盐水,30 min 后进行水迷宫测试。记录小鼠游抵终端阶梯平台的时间以及过程中游入盲端的次数(错误次数)。

2.1.4 小鼠皮层胆碱酯酶(AchE)活力测定^[4] 水迷宫测试完成后,处死小鼠,立即取脑,在冰块上快速分离皮层。称重后立即置液氮中冷冻保存。用相当于组织重量 9 倍体积的匀浆介质(0.01 mol/L 蔗糖,0.01 mol/L Tris-HCl,0.01 mol/L EDTA·2Na,pH 7.4)将皮层制成组织匀浆,将匀浆 4℃ 3 000~4 000 r/min 离心 15 min,取上清参照试剂盒说明书测定 AchE 活性。样品蛋白含量测定采用 Lowry 法。

2.2 NMDA 单侧损伤 Meynert 基底核大鼠的测定

2.2.1 给药方案 CoQ₁₀用 1%CMC-Na 混悬均匀。雄性 SD 大鼠随机分为 4 组,每组 8 只。分别为:假损伤组(1%CMC-Na),模型组(1%CMC-Na),CoQ₁₀高剂量组(40 mg/kg),CoQ₁₀低剂量组(10 mg/kg)。每日灌胃 1 次,直至断头处死。

2.2.2 手术 连续给药 2 周后进行手术。模型组和给药组注射 1 μl 100 nmol/L NMDA(用 pH 7.4 PBS 配制),假损伤组注射 1 μl PBS^[5]。术后数日出现吞咽不能,需每日灌胃奶粉溶液。

2.2.3 空间辨别学习记忆实验 SD 大鼠手术后 15 d,以 Y 迷宫法观察动物空间辨别学习记忆能力^[6]。将大鼠放入迷宫箱内适应环境 5 min,然后驱赶至 I 臂(起始区),停留 2 min 后给予电击(50~70 V),大鼠遭电击后直接逃至 II 臂(安全区)为正确反应,停留于 I 臂及逃入 II 臂(电击区)皆为错误反应。大鼠在安全区停留 1 min 后,再以此区作为起始区给予电击,连续循环电击训练(安全区转换方向为 I—II—III—I)。以大鼠连续 10 次电击训练有至少 9 次正确反应作为达到训练标准。每日连续学习的电击次数不超过 20 次,每日训练一回。记录每回训练中正确反应的次数及每日训练中各组达到标准的个体的比率。

2.2.4 大鼠皮层胆碱乙酰转移酶(ChAT)活力测定^[7] 将大鼠断头处死,立即取出全脑,冰上分离

前脑皮层(frontal cortex),测定皮层内 ChAT 活力。以 Lowry 法测定组织匀浆上清蛋白质含量。

3 实验结果

3.1 CoQ₁₀对东莨菪碱所致记忆障碍模型小鼠的影响

结果见表 1,模型组小鼠反应错误次数与游抵平台的时间较假损伤组明显增加($P<0.01$),阳性对照石杉碱甲组和不同剂量的 CoQ₁₀组均有改善作用($P<0.01$, $P<0.05$)。

Tab 1. Improvement of scopolamine(Scop)-caused spatial recognition defects of mouse in water maze by CoQ₁₀($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Groups	Dose (mg/kg)	Latency of reaching the platform(s)	Times of error
Sham	-	34.00±18.26	2.50±1.58
Model	-	100.55±32.98 ^{##}	19.86±10.73 ^{##}
HupA	0.5	40.00±18.68 ^{**}	3.30±1.89 ^{**}
CoQ ₁₀	40	41.00±39.5 ^{**}	5.30±3.68 ^{**}
CoQ ₁₀	20	67.91±41.54 ^{**}	7.00±4.34 [*]
CoQ ₁₀	10	66.45±50.05 ^{**}	6.73±6.87 [*]

^{##} $P<0.01$ vs Sham; ^{**} $P<0.01$ vs model; ^{*} $P<0.05$ vs model

3.2 CoQ₁₀对东莨菪碱所致痴呆模型小鼠皮层内 AchE 的影响

结果见表 2,模型组皮层组织的 AchE 活性明显高于假损伤组($P<0.01$)。阳性对照石杉碱甲组具有拮抗胆碱酯酶(AchE)活性增高的作用($P<0.01$),而不同剂量的 CoQ₁₀组均无显示此作用。

Tab 2. Effect of CoQ₁₀ on the activity of AchE in cortex of mice($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Groups	Dose(mg/kg)	Activity of AchE(U/mg)
Sham	-	3.629±1.652
Model	-	6.889±2.29 ^{##}
HupA	0.5	2.611±0.593 ^{**}
CoQ ₁₀	40	5.102±2.018
CoQ ₁₀	20	7.665±4.96
CoQ ₁₀	10	7.021±3.122

^{##} $P<0.01$ vs Sham; ^{**} $P<0.01$ vs model

3.3 空间辨别学习记忆行为研究结果

由实验结果(表 3 和表 4)可见,NBM 损伤大鼠在每回(除第 3 次)训练中正确反应次数皆显著低于同回训练的假损伤大鼠,其达标率也低于假损伤组。表明 NBM 损伤造成了躲避电击条件反射获得障碍。

各给药组大鼠 每回训练正确反应次数高于 NBM 损伤大鼠, 其达标率也高于同回 NBM 损伤组, 表明躲避电击条件反射获得早于 NBM 损伤组。

Tab 3. The mean number of correct responser per round of training in Y-maze task($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Drugs	The mean number of correct responses per round				
	1	2	3	4	5
Sham lesion	3.1±1.3	6.4±1.1	8.6±3.0	14.3±4.1	
NBM lesion	1.8±1.0 [#]	2.7±0.8 [#]	6.7±2.0	9.5±3.3 [#]	14±3.9
CoQ ₁₀ (40 mg/kg)	0.5±0.58	1.25±0.5	11.0±4.9 [*]	13.8±1.5 [*]	
CoQ ₁₀ (10 mg/kg)	2±0.9	9±2.5 [*]	13.8±3.0 [*]		

[#] $P<0.01$, [#] $P<0.05$ vs Sham lesion; ^{*} $P<0.01$, ^{*} $P<0.05$ vs NBM lesion

Tab 4. The propotion of rats up to the training standard per round($n=6$)

Drugs	The propotion of rats up to the training standard					
	1	2	3	4	5	6
Sham lesion	0	0	14.3	71.4	100	
NBM lesion	0	0	16.7	33.3	83.3	100
CoQ ₁₀ (40 mg/kg)	0	0	83.3	100		
CoQ ₁₀ (10 mg/kg)	0	16.7	83.3	100		

3.4 CoQ₁₀对大鼠皮层内 ChAT 的影响

以皮层组织匀浆中每毫克蛋白所产生的[H³] Ach 的 d.p.m. 值代表 ChAT 活力。结果见表 5, SD 大鼠注射 NMDA 损伤 NBM 后, 皮层 ChAT 活力显著降低, 而各给药组与损伤组相比, 活力明显增高 ($P<0.01$)。

Tab 5 Effect of CoQ₁₀ on the choline acetyltransferase activity in frontal cortex($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Group	10 ⁶ d.p.m./mg protein
Sham lesion	2.68±1.41
NBM lesion	0.59±0.16 [#]
CoQ ₁₀ (40 mg/kg)	4.19±1.02 ^{**}
CoQ ₁₀ (10 mg/kg)	4.76±1.68 ^{**}

[#] $P<0.01$ vs sham lesion; ^{**} $P<0.01$ vs NBM lesion

4 讨 论

研究表明中枢胆碱能神经系统在学习和记忆功能中起主要作用^[9]。抗胆碱药如东莨菪碱和阿托品能损害人和动物的学习记忆能力, 而拟胆碱药如毒扁豆碱能促进学习记忆并拮抗东莨菪碱的记忆损害作用^[8]。

Meynert 基底核中的胆碱能神经元投射至大脑皮层, 皮层胆碱能突触介导特定认知功能。许多研究报道证明红藻氨酸(kanic acid), 鹅膏氨酸(i-

botenic acid), *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)和喹啉酸(quinolinic acid)等脑内注射损伤 NBM 可制作胆碱能损伤的动物模型模拟 AD^[8]。在实验过程中观察到, 手术后数日内大鼠表现出吞咽不能, 渴感缺乏和过度活跃, 与文献报道相符^[9]; 使用 Y 迷宫对各组大鼠进行空间辨别学习记忆实验, 发现模型组大鼠每回训练正确反应次数显著低于相应假损伤组, 且达到训练标准所需总电击训练次数显著多于假损伤组, 即表现出躲避电击条件反射获得障碍。同时皮层中胆碱能标志 ChAT 活性显著降低。这些现象说明动物模型成立。

本实验研究结果表明, CoQ₁₀对东莨菪碱所致学习记忆损害具有显著的改善作用, 能显著的提高 NBM 损伤大鼠空间辨别学习记忆能力; 对东莨菪碱所致的小鼠脑内胆碱酯酶(AchE)活性增高无拮抗作用, 但能显著增高损伤大鼠皮层 ChAT 活力。说明其促智作用与增强胆碱能功能有关。本实验室的研究结果还表明, CoQ₁₀对 NaCN 及缺糖损伤的 PC12 细胞具有保护作用(结果将另文报道); 能提高 NBM 损伤大鼠海马 NGFmRNA 水平(结果将另文报道), 提示 CoQ₁₀可能对神经系统具有保护作用。这些研究为 CoQ₁₀用于防治老年痴呆、增加其临床适应症提供一定的依据。

【参 考 文 献】

[1] Beal MF, Matthews RT. Coenzyme Q₁₀ in the central nervous system and its potential usefulness in the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Mol Aspects Med*, 1997; **18**: 169-179.

[2] Joy JJ, Magdi R, Soliman I. Effects of tacrine(THA) on spatial reference memory and cholinergic enzymes in specific rat brain regions [J]. *Life Sciences*, 1996, **58**(1): 47-54.

[3] Jae YK, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated

- cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay[J]. *J Neurosci Meth*, 1987, **20**: 83.
- [4] Liu J, Zhang HY, Wang LM, et al. Inhibitory effects of huperzine B on cholinesterase activity in mice[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1999, **20**(2): 141-145.
- [5] Wenk G L, Cribbs B, Melsill L. Nucleus basalis magnocellularis: optimal coordinates for selective reduction of choline acetyltransferase in frontal neocortex by ibotenic acid injection [J]. *Exp Brain Res*, 1984, **56**: 335-340.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 659-661.
- [7] Formun F. A rapid radiochemical method of the determination of choline acetyltransferase[J]. *J Neurochem*, 1975, **24**: 407-409.
- [8] Masaomi M. Characteristics of memory impairment following lesioning of the basal forebrain and medial septal nucleus in rats[J]. *Brain Res*, 1987, **419**: 19-31.
- [9] Anthony CS. Infusion of NMDA into the nucleus basalis of meynert, frontal cortex or lateral ventricle in rats: effect on memory and cholinergic brain neurochemistry [J]. *Pharmacol Biochem Behavior*, 1989, **33**: 485-488.

Improving Effect of CoQ₁₀ on Learning and Memory Ability in Animals

YAO Wen-Bing, WANG Hua, SHI Jun, LIANG Yue-Xing, CHEN Peng, GAO Xiang-Dong

(School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

【ABSTRACT】 AIM: to study the improving effects of CoQ₁₀ on animal learning and memory ability. METHOD: The NBM lesion rats were made by injecting *N*-methyl-*D*-aspartic acid (NMDA) into unilateral NBM of SD rats and memory deficits mouse were made by scopolamine. A Y maze task and water maze were used to study the ability of learning and memory. The activity of choline acetyltransferase (ChAT) was determined by the conversion of [³H] ACh. RESULT: CoQ₁₀ may improve scopolamine-caused spatial performance defects in mouse and may also improve the ability of NBM lesion-induced learning and memory and enhanced the ChAT activity in frontal cortex of NBM lesion rats. CONCLUSION: CoQ₁₀ may improve the learning and memory ability of animals.

【KEY WORDS】 CoQ₁₀; Choline acetyltransferase; Scopolamine; Learning and memory; NMBA

【Foundation Item】 This study was supported by Teaching and Researching Rewarding Program for College Excellent Young Teacher of Ministry of Education

· 会 讯 ·

首届全国药学服务与研究学术研讨会

时 间: 2004 年 10 月

地 点: 上海

主 办: 《药学服务与研究》杂志社

内 容: 临床药师的职责与培养, 临床药师的工作经验及体会; 医师如何开展药学服务; 药物治疗学和临床药学工作; 药物利用和药物经济学研究; 药学信息服务; 药学教育; 全国药学服务的现状调查; 药学服务如何与心理咨询相结合; 制药企业及药品营销企业能否开展、如何开展药学服务; 护师进行药学服务的

体会; 国外药学服务的概况; 国外药学服务的成功经验介绍等。

截稿日期: 2004 年 7 月 30

联系单位: 《药学服务与研究》杂志社

地 址: 上海市长海路 174 号

邮 编: 200433

电 话: 021-65519829, 021-25074639

传 真: 021-65519829

E-mail: PharmCR@yaoxue.net