

丝瓜叶新成分 L-6a 和 L-10 对大鼠学习记忆及海马内生长抑素的影响¹

齐尚斌², 王晓阳, 周永禄, 张莉 (四川省中药研究所药理研究室, 重庆 630065, 中国);

阮怀珍, 王健, 李希成 (第三军医大学生理教研室, 重庆 630038, 中国)

R 285-5

Effects of new constituents L-6a and L-10 from leaves of *Luffa cylindrica* on learning, memory, and hippocampal somatostatin in rats¹

QI Shang-Bin², WANG Xiao-Yang, ZHOU Yong-Lu, ZHANG Li (Department of Pharmacology, Sichuan Institute of Chinese Materia Medica, Chongqing 630065, China);

RUAN Huai-Zhen, WANG Jian, LI Xi-Cheng (Department of Physiology, The Third Military Medical University, Chongqing 630038, China)

KEY WORDS L-6a; L-10; *Luffa cylindrica* Roem; learning; memory; hippocampus; somatostatin

AIM: To study the effects of two constituents L-6a and L-10 from the leaves of *Luffa cylindrica* Roem on learning, memory, and hippocampal somatostatin in rats. **METHODS:** The learning and memory in rats were determined using the passive avoidance response of shuttle-box, by icv. Somatostatin in hippocampus was determined with immunohistochemical and images analyses. **RESULTS:** L-6a 25 μ g raised memory-keeping activity ($P < 0.05$) in rats. L-6a 25 μ g increased the surface density and number density of somatostatin-like immunoreactant (Som-LI) ($P < 0.05$). L-10 25 and 50 μ g increased the surface density and number density of Som-LI ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** L-6a 25 μ g enhanced memory-keeping activity and increased the surface density and number density of Som-LI in rats. L-10 shows a tendency to enhance memory-keeping activity but no evident, but it increases the surface density and number density of Som-LI.

关键词 L-6a; L-10; 丝瓜; 学习; 记忆; 海马;

生长抑素

目的: 研究丝瓜叶新成分 L-6a 和 L-10 对大鼠学习记忆及海马内生长抑素的影响。 **方法:** icv 大鼠分别用穿梭箱被动回避反应及免疫组化、图像分析等法进行。 **结果:** L-6a(25 μ g)组记忆保持功能明显增强($P < 0.05$), 生长抑素免疫反应物(Som-LI)的面密度和数密度显著增加($P < 0.05$); 其余各组记忆保持功能增加不显著($P > 0.05$), L-10 (25 μ g)组 Som-LI 的面密度及(50 μ g)组 Som-LI 的面密度和数密度值均显著增加($P < 0.05$)。 **结论:** L-6a (25 μ g)具有增强记忆保持功能和增加 Som-LI 的作用, L-10 有增强记忆保持功能的趋势, 但不显著, 却显著增加海马内的 Som-LI。

丝瓜提取物具有增强机体免疫、抗应激刺激、抗病毒等多种生理功能(见齐尚斌撰写的综述: “丝瓜的临床应用与药理研究进展, 四川中草药研究 1996; 37-38; 90-5)。现已分离出多种化学单体成分^[1], L-6a 和 L-10 是我所首次从天然界分得并报道的新成分, 属三萜皂苷类成分。L-6a 为 2 α -羟基齐墩果酸-3-O- β -D 葡萄糖吡喃糖苷, 无色针晶 C₃₆H₅₈O₉, molecular weight 634 FAB-MS m/z: 687(M₁⁺ + K). mp: 224-226 $^{\circ}$ C.

L-10 为 21 β -羟基常春藤皂苷元 3-O- β -D 吡喃葡萄糖苷。为一新化合物, 命名为丝瓜皂苷 N (lucyoside N)。为无色颗粒状结晶 C₃₆H₅₈O₁₀, molecular weight 650 FAB-MS m/z 689 (M⁺ + K), mp: 221-223 $^{\circ}$ C.

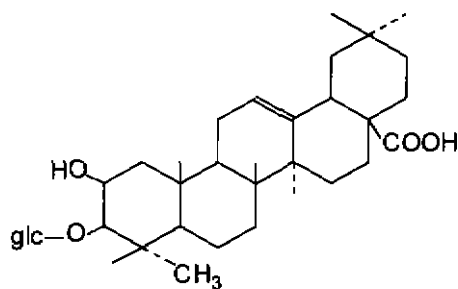
丝瓜皂苷类中含有人参皂苷 Rg1 和 Re^[1], 已知 Rg1 能促进记忆的获得、巩固和再现^[4]。本文研究丝瓜叶单体成分 L-6a 和 L-10 是否具有促智作用。

大脑的许多团核中, 海马与学习记忆功能的关系最密切^[5-7], 而海马内富含生长抑素神经元。生长抑素 somatostatin (Som) 是中枢内重要的神经

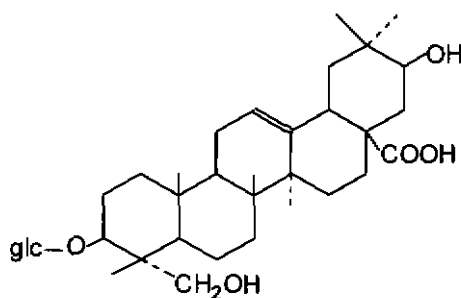
¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 39370851.

² Ptn 86-23-522-7262 (O), 86-23-517-7071 (H). Fax 86-23-522-4504. Received 1996-10-03 Accepted 1997-07-17

递质或调制因子。已证明 Som 参与学习记忆过程, 并与早老性痴呆的记忆障碍有关^[7,8]。本文旨在探讨丝瓜叶提取物对 Som 及对学习记忆的影响。



L-6a



L-10

MATERIALS AND METHODS

大鼠与手术 Wistar 大鼠 43 只, ♀♂ 兼用, 分笼饲养, 体重 200 - 250 g。麻醉后于一侧侧脑室 (P 1.5, LR 1.5, H 3.0) 埋植不锈钢套管一个, 术后 2 d 开始实验。

试药的配制 将 L-6a 与 L-10 用 Me₂SO 少许浸润助溶, 后加入人工脑脊液配成 2.5 和 5 g·L⁻¹ 两种浓度备用。

脑室注射 (icv) 向脑室内注射药物或 NS 10 μL, 约 1 min, 滞留针 1 min, 注药后 1 h 和 24 h 后做行为实验。

行为实验 采用被动回避行为训练避暗 (步人, step through) 法^[9,10]。训练箱用 5 mm 厚灰色硬塑料板制成, 分 A、B 两室大小均为 25 cm × 20 cm × 30 cm。两室间隔正中靠底边设一可供开闭的门洞, A 箱为暗箱, 底部设有平行铜栅, 以备通电刺激鼠爪用。B 箱为明箱, 其侧壁装有 40 W 灯泡开关, 用于作避暗实验。行为实验前将大鼠置于 B 箱内, 使其适应环境 5 min。行为实验于上午进行, 将大鼠随机分为 L-6a、L-10 (均设大、小剂量组) 和 NS 组, 共 5 组。给大鼠 icv 药物或 NS 后 1 h, 将大鼠置于 B 箱内, 开启门洞的门, 亮灯, 间隔潜伏期 (t₁) 后, 大鼠将经过门洞进入 A 箱以避光, 随即关闭门洞并电击鼠爪 2 ~ 5 s。24 h 后重新将大鼠放入 B 箱内, 大鼠将延长进入 A 箱的时间 (t₂)

以避免电击。记录每只大鼠在明室内停留的时间 (t₁、t₂), 以 t₂ 为大鼠记忆保持指标。

海马内 Som 免疫组化法^[11]检测 大鼠经行为实验后, ip 戊巴比妥钠 50 mg·kg⁻¹ 麻醉, 经升主动脉插管快速灌注 NS 100 mL 和新配制的 4% 多聚甲醛液 700 - 1000 mL (1.5 - 3 h), 再灌入 10% 蔗糖液 100 - 200 mL。取出海马组织置于 20% 蔗糖液中过夜 (以上溶液均用磷酸缓冲液 0.1 mol·L⁻¹ 配制, 4 ℃)。冰冻切片, (厚 40 μm), 切片先在 0.5% 的 Triton X-100 中温育 0.5 h, 再先后在正常羊血清、兔抗 Som 血清 (1:2000, 4 ℃, 48 h)、生物素结合羊抗兔血清 (1:200) 和链卵白素-生物素结合辣根过氧化物酶 (ABC) (1:100) 温育。对照实验以正常兔血清代替 Som 抗体温育。以上每一步骤均用磷酸缓冲液漂洗 3 次, 每次 10 min。经免疫组化染色后封片、镜检, 每鼠取 2 - 3 张切片经分析仪作定量分析。

数据处理 实验数据用微机进行 *t* 检验处理。

RESULTS

L-6a 和 L-10 对大鼠记忆保持的影响 L-6a 25 μg 组对大鼠 24 h 后的记忆保持功能明显增强, 与对照组比较, 大鼠进入 A 箱的潜伏时间显著延长 ($P < 0.05$); L-10 两剂量组的潜伏期也有延长的趋势, ($P > 0.05$); L-6a 50 μg 组则无改变 (Tab 1)。

Tab 1. Effects of L-6a and L-10 on memory-keeping function after icv injection in rats.

$\bar{x} \pm s$. * $P > 0.05$, ^a $P < 0.05$ vs NS 10 μL.

Group	Dose/μg	Rats	Memory time/s
NS		11	133 ± 52
L-6a	25	8	180 ± 0 ^b
	50	8	120 ± 60 ^a
L-10	25	8	147 ± 58 ^a
	50	8	146 ± 59 ^a

对海马内 Som-LI 的影响 L-6a 25 μg、L-10 25 μg 组和 L-10 50 μg 组的 Som-LI 面密度值与对照组比较有显著增加, L-6a 25 μg 组和 L-10 50 μg 组的 Som-LI 数密度值也明显多于对照组。表明 L-6a 25 μg 和 L-10 的两个剂量均能增加海马内 Som 免疫反应物 (Tab 2)。

DISCUSSION

本文用穿梭箱被动回避反应和免疫组化、图

Tab 2. Effects of L-6a and L-10 on Som-LI in hippocampi of rats.

$\bar{x} \pm s$. ^a $P > 0.05$, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs NS.

Group	Dose/ μg	Rates	$10^{-4} \times$ Som-LI density/ surface	μm number
NS		11	350 ± 145	11.2 ± 3.1
L-6a	25	8	549 ± 171^b	15.1 ± 2.5^c
	50	8	473 ± 218^a	13.4 ± 4.2^a
L-10	25	8	755 ± 96^c	13.3 ± 2.1^a
	50	8	607 ± 195^c	16.1 ± 5.2^b

像分析法研究了丝瓜叶新成分 L-6a、L-10 在促智作用方面的生理活性。结果发现: icv L-6a 或 L-10 对正常大鼠学习记忆保持时间的延长和海马内生长抑素的增加均有一定的作用, 其中 L-6a 25 μg 组, 不仅具有显著增强学习记忆保持功能的作用, 且海马内 Som-LI 也显著增加, 两者之间显示出了有相关性, 这种相关性与文献^[5]的结果相符。这一结果也提示丝瓜叶提取物的益智作用看来是通过增加海马内生长抑素来实现的。

同样的实验中, L-10 也明显增加海马内生长抑素免疫反应物, 而学习记忆保持时间只有延长的趋势, 是否因两种单体的结构的差异, 对促进海马内 Som-LI 的种类不同, 而表现出了生理活性方面的差异, 还在进一步研究。

本文的不足之处是药物的最佳有效剂量选择不够准确, 因而未能显示出药物明显的量效关系。

ACKNOWLEDGMENTS 实验样品由四川省中药研究所药化研究室梁龙与刘昌瑜同志提供。

REFERENCES

- Liang L, Lu LE, Cai YC. A review on the research on the chemical components of Luffa Plants. *West China Pharm Sci* 1995; 10: 32-8.
- Liang L, Lu LE, Cai YC. Studies on the components from leaves of *Luffa cylindrica* Roem (1). *West China Pharm Sci* 1993; 8: 63-6.
- Liang L, Lu LE, Cai YC. Studies on the chemical components from leaves of *Luffa cylindrica* Roem. *Acta Pharm Sin* 1993; 28: 386-9.
- Zhang JT. Recent progress in studies on the pharmacology of learning and memory in China. *Acta Pharm Sin* 1986; 21: 636-40.
- Ji WQ, Zhang CC, Zhang GH. Effects of somatostatin and GABA in hippocampus on the active avoidance response in rats. *Chin J Appl Physiol* 1995; 11: 40-3.
- Vecsei L, Kiraly C, Bollok I, Nagy A, Varga J, Penke B. Comparative studies with somatostatin and cysteamine in different behavioral tests on rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1984; 21: 833-7.
- Eichenbaum H, Stewart C, Morris RGM. Hippocampal representation in spatial learning. *J Neurosci* 1990; 10: 331-9.
- Ji WQ, Zhang CC, Zhang GH. Effect of somatostatin and GABA on long-term potentiation in hippocampal CA1 area in rats. *Acta Pharmacol Sin* 1995; 16: 380-2.
- Sui JF, Xiong Y, Zhang CC. A multifunction box for conditioned reflex training of passive avoidance behavior of rats. *Acta Acad Med Mili Tert* 1994; 16: 363-4.
- Wang AM, Cao YL, Wang YK, Zhao RI, Lu CM. Effects of Chinese ginseng root and stem-leaf saponins on learning memory and biogenic monoamines of brain in rats. *Chin J Chin Mat Med* 1995; 20: 493-5.
- Ruan HZ, Li XC. Effects of morphines and monoamines on pain modification of substances in spinal cord. *Sci Bull* 1990; 36: 1428-31.

Perspectives in Percutaneous Penetration: 6th International Conference

1998 Sep 22-26

Leiden, THE NETHERLANDS

Contact

Secretariat
PPP Conference
Redwood Building
Cardiff CF1 3XF
U K

Phn/Fax 44-1222-874952. E-mail ppp@an-ex.co.uk