

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

中藥智力增進劑之開發與研究 (3/3)

Development and Study on the Cognition-enhancing Chinese Herbs (3/3)

計畫編號：NSC 90-2320-B-039-040

執行期限：90年8月1日至91年7月31日

主持人：謝明村 執行機構及單位名稱：中國醫藥學院中國藥學研究所

一、中文摘要

蛇床子石油醚萃取層於訓練前給予時可明顯改善 scopolamine 誘導之被動迴避學習操作障礙暨水迷路學習操作障礙。其次，乙醯膽鹼周邊拮抗劑 scopolamine methylbromide 及周邊交感神經毒素 6-hydroxydopamine 均不會阻斷蛇床子石油醚萃取層之作用，但腎上腺切除後可阻斷蛇床子石油醚萃取層之作用。綜合上述結果，蛇床子石油醚萃取層之改善學習障礙作用應與周邊神經系統無關；而僅部分與腎上腺有關。進一步，蛇床子油溶性主要成分 osthole 不論經皮下注射或腦室給藥均具增強雌性大鼠水迷路學習操作能力之作用，亦可改善卵巢切除後停經大鼠水迷路學習操作能力障礙之現象。

針對中樞神經機制之探討，更發現蛇床子素僅可改善 central catecholaminergic neurotoxin - 6-OHDA 誘發之學習操作障礙，但對 central acetylcholinergic neurotoxin - AF64A 及 serotonergic neurotoxin - 5,7-dihydroxytryptamine 誘發之學習操作障礙則不具改善作用。因此，蛇床子素之改善學習操作障礙主要與中樞 catecholaminergic neuronal system 有關而與 serotonergic 或 acetylcholinergic neuronal system 無關。最後，更發現蛇床子素並無法改善雙側海馬注射 β blocker propranolol 誘發之學習操作障礙。因此，蛇床子素之改善學習操作障礙主要與中樞 adrenergic α receptor 有關而與 adrenergic β receptor 無關。

關鍵詞：蛇床子、學習記憶、被動迴避學習、水迷路

Abstract

Petroleum ether layer of *Cnidium monnieri* (SCM_{PE}) administered before the training trial attenuated the scopolamine (SCOP)-induced performance impairment on passive avoidance task and Morris water maze in male rats. Only adrenalectomy but not scopolamine methylbromide (peripheral cholinergic antagonist), 6-hydroxydopamine (peripheral catecholaminergic neurotoxin when given intravenously) blocked the counteracting effects of SCM_{PE} on SCOP-induced performance impairment in male rats. From these data, we demonstrated that the counteracting effects of SCM_{PE} may be partially related to activate the adrenal gland. Furthermore, osthole, a major lipophilic ingredient of SCM_{PE}, administered sc or icv promoted the performance of Morris water maze in intact female and attenuated the performance impairment in ovariectomized female rats.

We further found intracerebral administration of osthole attenuated the performance impairment of Morris water maze caused by 6-hydroxydopamine (icv, central catecholaminergic neurotoxin) but not 5,7-dihydroxytryptamine (icv, central serotonergic neurotoxin) and AF64A (icv, central acetylcholinergic neurotoxin). Therefore, the attenuating effects of osthole might be related to modulating the activities of central catecholaminergic but not

acetylcholinergic and serotonergic neuronal system. Finally, intracisternal administration of osthole did not reverse the performance impairment of Morris water maze caused by bilateral intrahippocampal injection of propranolol. From these results, we suggest osthole is a major component of SCM_{PE} and the attenuating effects of osthole were related to modulating the activities of central catecholaminergic neuronal system via activating adrenergic α receptors.

Keywords: Osthole, Learning and memory, Passive avoidance task, Morris water maze, catecholaminergic neurons

二、緣由與目的

今已開發之智力增進劑，主要分成七大類：nootropics、vasodilators 及 metabolic enhancers、psychostimulants、cholinergic agents、biogenic amines drugs 及 neuropeptides 等⁽¹⁾；其中已於臨床使用者為 vasodilators 及 metabolic enhancers 之藥物如 donepezil、dihydroergotoxine；cholinergic agents 之藥物如 tacrine、及 nootropics 類藥物如：piracetam、nefiracetam 等，此類藥物於 1972 年由 Giurgea 提出，主要作用在活化腦神經、促進腦內資訊聯匯及增強學習記憶⁽²⁾，但相關開發藥物仍於動物試驗或臨床試驗階段。而自天然物開發智力增進劑上，已研發之藥物包括 huperzine A（臨床試驗階段）、gypenosides 等⁽³⁾，而其他中藥如人參、黨參、銀杏等亦發現具有智力增進之作用⁽⁴⁾；因此，從中藥開發智力增進劑，頗值得我們努力與期待。

按中醫理論『衰老』主要在於『腎衰』、『氣衰』及『血瘀痰瘀』⁽⁵⁾；因此，中醫師對於老年痴呆症之臨床用藥多以溫腎壯陽類中藥為主，約佔總體抗衰老藥一半，在長生不老、輕身延年藥物統計中，亦佔百分之六十至百分之七

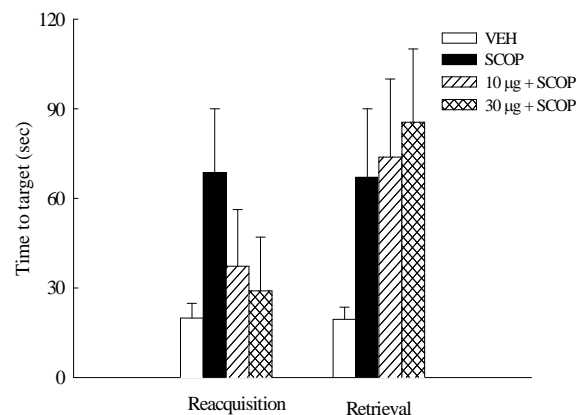
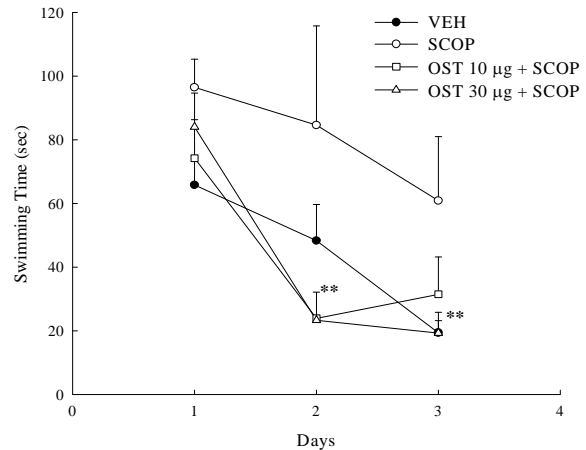
十；其次為滋腎養陰、活血化瘀類中藥⁽⁶⁻⁷⁾。按補助計畫第一年之研究成果發現地黃、當歸、麥門冬、蛇床子、知母之甲醇粗抽物均可增強動物之學習操作行為，其次牛膝、地黃、當歸、麥門冬、蛇床子、知母等之甲醇粗抽物均可改善 MK-801 及 scopolamine 誘發被動迴避學習反應、主動迴避學習反應及水迷路之學習獲得障礙。第一年之研究成果發現蛇床子油溶性主要成分 osthole 不論經皮下注射或腦室給藥均具增強雌性大鼠水迷路學習操作能力之作用，亦可改善卵巢切除後停經大鼠水迷路學習操作能力障礙之現象。

在腦部區域於學習記憶所扮演的角色上，Mishkin 研究曾指出 amygdala 與 hippocampus 兩者在學習記憶過程所扮演之角色密不可分⁽⁸⁾，但 Olton 等於 1987 年之研究則認為 memory 主要係因 hippocampus 之參與而完成，而非 amygdala⁽⁹⁾；故 amygdala 與 hippocampus 兩者參與不同之學習記憶形態。事實上，早期研究中認為 hippocampus 區主要負責貯存空間性記憶⁽¹⁰⁾，而在 1986 年 Teyler 及 Discenna 更明確指出 hippocampus 區負責一切學習型態之刺激與反應間的連結⁽¹¹⁾；因此，hippocampus 區負責了學習記憶之統合，其地位益發顯得重要。而在被動迴避學習反應後，發現 hippocampus、amygdala 區 NE 之 turnover 有增加現象⁽¹²⁾。另在神經解剖研究上，已知 hippocampus 區接受來自 locus coeruleus 之 noradrenergic neurons、medial raphe 之 serotonergic neurons 或 medial septum 之 cholinergic neurons 的支配，而 medial septum 之 cholinergic neurons 另又接受 medial raphe 之 serotonergic neurons 的支配⁽¹³⁾。當 raphe 區給予 5, 7-DHT 可誘發學習記憶障礙；更指出其所造成障礙可能係經由影響 hippocampus 區所致⁽¹⁴⁾。事實上，Decker 及 McGaugh 即指出大鼠學習記

憶過程可能係由腦內神經迴路—raphe-septo-hippocampal 神經路徑所操縱⁽¹⁵⁾。因此，本年度目的之一：擬以神經毒素（6-hydroxydopamine、5, 7-dihydroxytryptamine、AF64 A、ibotenic acid 等）造成各腦部區域之損壞來探討腦部各區域在 osthole（蛇床子）增強動物學習模式學習操作能力之角色。其次，Cory-Slechta 等指出學習記憶過程神經傳遞系統主要為 hippocampus 區 excitatory amino acid (EAA)，若投與 MK-801 (NMDA receptor antagonist) 時，可造成學習操作能力障礙⁽¹⁶⁻¹⁷⁾；hippocampus 區 EAA 神經系統又受 basal forebrain 及 septum 之 cholinergic neurons、locus coeruleus 之 noradrenergic neurons、medial raphe 之 serotonergic neurons 等的調節⁽¹³⁾，因此投與上述各神經傳遞物質拮抗劑【cholinergic neurons、serotonergic neurons、noradrenergic neurons】亦可造成學習操作能力障礙⁽¹⁸⁻²⁴⁾。本年度另一目的：擬以上述之各類神經傳遞物質或細胞內訊息阻斷劑造成學習操作損壞來探討神經遞質或細胞內訊息在 osthole（蛇床子）增強動物學習模式學習操作能力之角色。

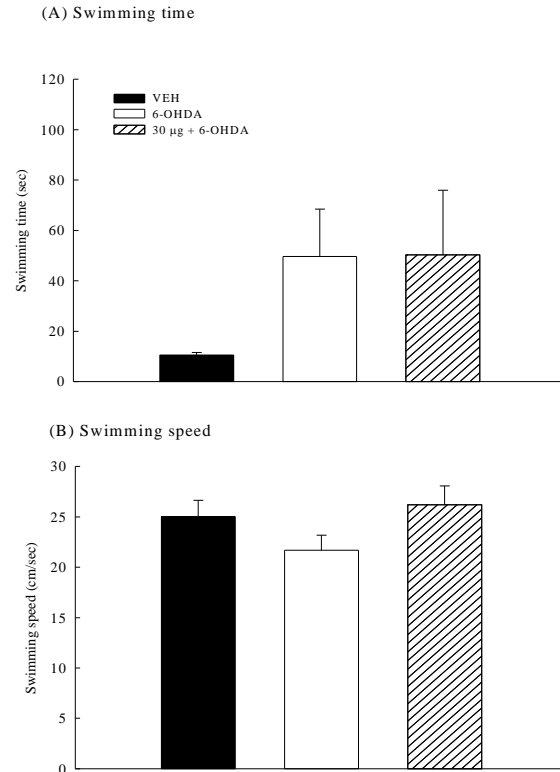
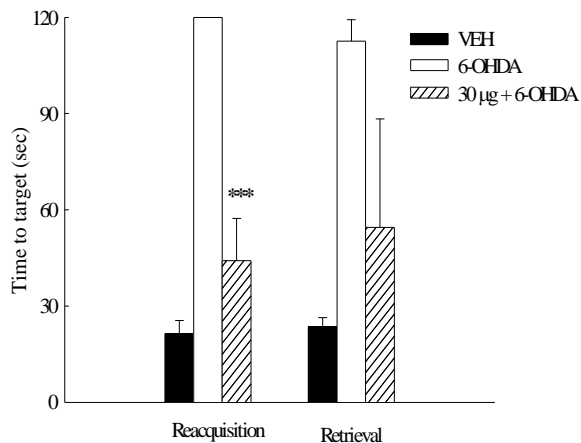
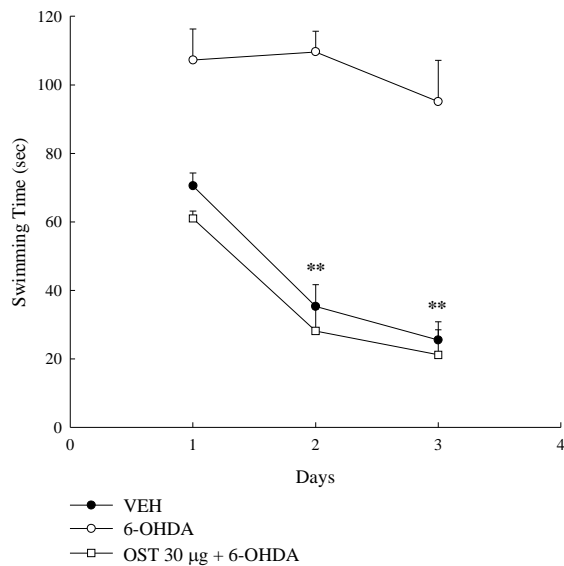
三、結果與討論

按第一年暨第二年之研究成果，我們得知蛇床子甲醇粗抽物改善學習操作障礙之活性成分主要存在於石油醚層，而其中蛇床子素又為其主要之活性成分；而第二年度隻研究成果中發現蛇床子素改善學習操作障礙之部分作用機制，除與腎上腺素有關外，主要與中樞神經系統有關。因此，再以蛇床子素經側腦室投與時，發現可增強大鼠在水迷宮之學習操作能力，並可改善 scopolamine 誘發之學習操作暨工作記憶再學習障礙，此結果見下圖（圖一至圖二）。

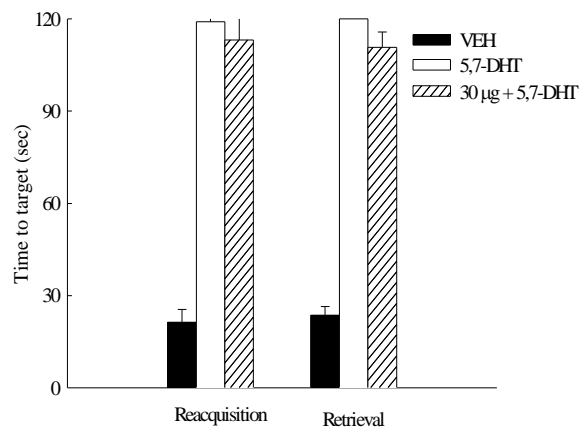
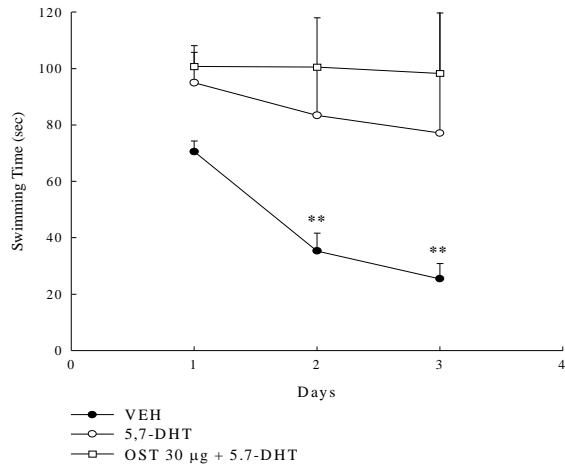


因此，本年度按此研究成果繼續探討各類中樞神經系統（包括 catecholaminergic neuronal system、serotonergic neuronal system、cholinergic neuronal system）在蛇床子素增強學習操作能力所扮演之角色。首先，為探討中樞 catecholaminergic neuronal system 在蛇床子素增強學習操作能力所扮演之角色，我們選用 catecholaminergic neurotoxin - 6-hydroxydopamine (6-OHDA)。6-OHDA 經側腦室注射給予大鼠後 14 天，會破壞突觸前之 catecholaminergic neurons，造成 catecholaminergic neuron 萎縮死亡，因而促使大鼠於水迷宮學習操作上出現障礙【見下圖（圖三）】；蛇床子素於 6-OHDA 破壞 14 天候進行水迷宮空間學習操作前經側腦室給予可明顯改善 6-OHDA 所造成之水迷宮空間學習操作障礙【見下圖（圖三）】。另 6-OHDA 亦可造成工作記憶再學習及再現過程之障礙，同時蛇床子素一

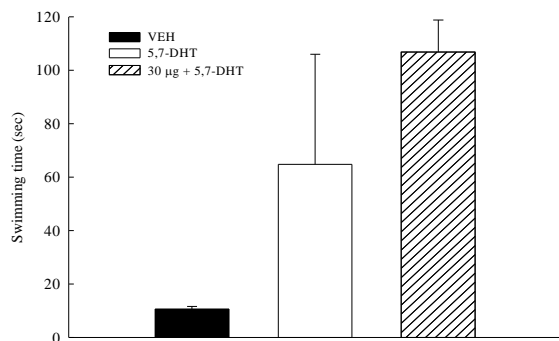
可改善 6-OHDA 所造成之工作記憶再學習及再現過程障礙【見下圖（圖四）】。而 6-OHDA 所造成之障礙部份可能因影響其 motivation 有關但與游泳能力無關，同時蛇床子素改善 6-OHDA 造成障礙之作用主要與改善其記憶障礙部份有關【見下圖（圖五）】。



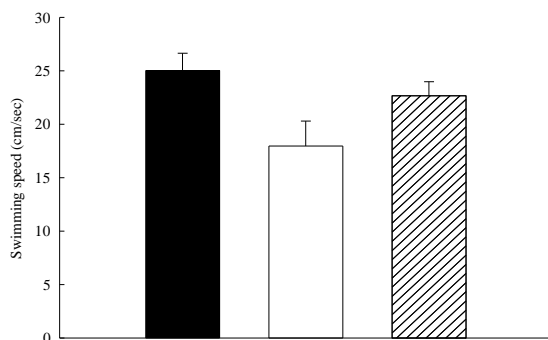
其次，為探討中樞 serotonergic neuronal system 在在蛇床子素增強學習操作能力所扮演之角色，我們選用 serotonergic neurotoxin — 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT)。5,7-DHT 經側腦室注射給予大鼠後 14 天，會破壞突觸前之 serotonergic neurons，造成 serotonergic neuron 萎縮死亡，因而促使大鼠於水迷宮學習操作上出現障礙【見下圖（圖六）】；但蛇床子素於 5,7-DHT 破壞 14 天候進行水迷宮空間學習操作前經側腦室給予並無法改善 5,7-DHT 所造成之水迷宮空間學習操作障礙【見下圖（圖六）】。另 5,7-DHT 亦可造成工作記憶再學習及再現過程之障礙，而蛇床子素亦無法改善 5,7-DHT 所造成之工作記憶再學習及再現過程障礙【見下圖（圖七）】。而 5,7-DHT 所造成之障礙部份可能因影響其 motivation 有關但與游泳能力無關，同時蛇床子素改善 5,7-DHT 造成障礙之作用主要與改善其記憶障礙部份有關【見下圖（圖八）】。



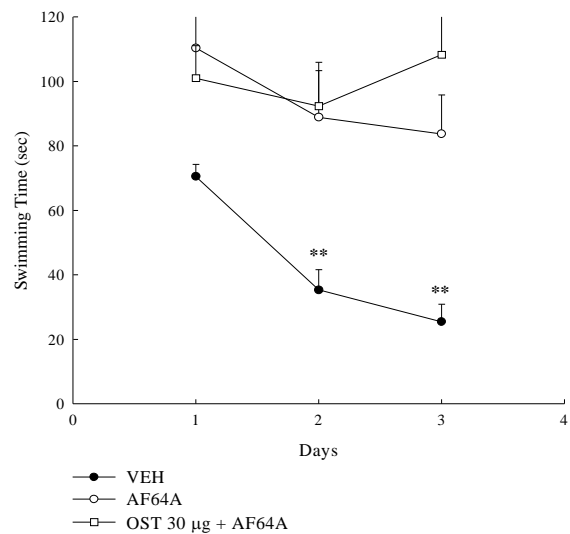
(A) Swimming time

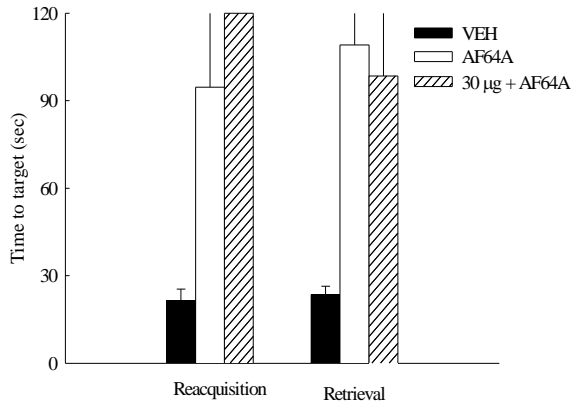


(B) Swimming speed

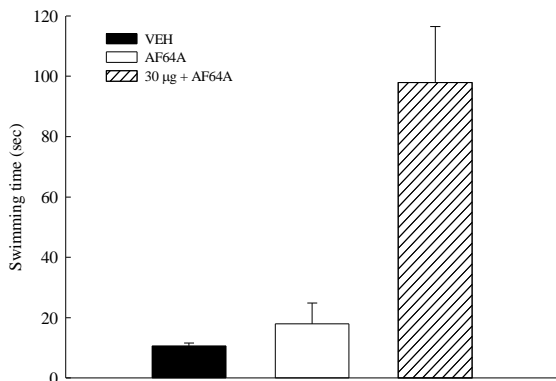


最後，為探討中樞 cholinergic neuronal system 在在蛇床子素增強學習操作能力所扮演之角色，我們選用 cholinergic neurotoxin - acetylcholine mustard (AF64A)。AF64A 經側腦室注射給予大鼠後 14 天，會破壞突觸前之 cholinergic neurons，造成 cholinergic neuron 萎縮死亡，因而促使大鼠於水迷宮學習操作上出現障礙【見下圖(圖九)】。；蛇床子素於 AF64A 破壞 10 天候進行水迷宮空間學習操作前經側腦室給予並無法改善 AF64A 所造成之水迷宮空間學習操作障礙【見下圖(圖九)】。另 AF64A 亦可造成工作記憶再學習及再現過程之障礙，同時蛇床子素亦無法改善 AF64A 所造成之工作記憶再學習及再現過程障礙【見下圖(圖十)】。而 AF64A 所造成之障礙部份可能與影響其 motivation 及游泳能力均無關，但蛇床子素無法改善 AF64A 造成障礙可能部份與降低其 motivation 及游泳能力有關【見下圖(圖十一)】。

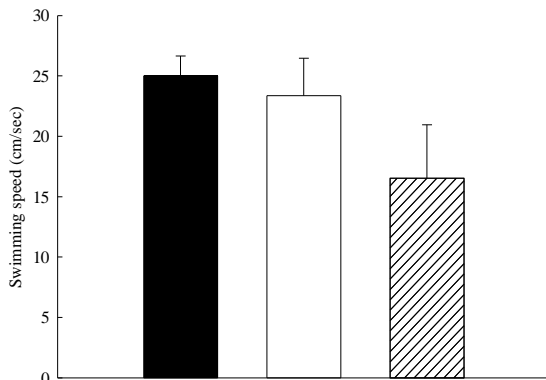




(A) Swimming time

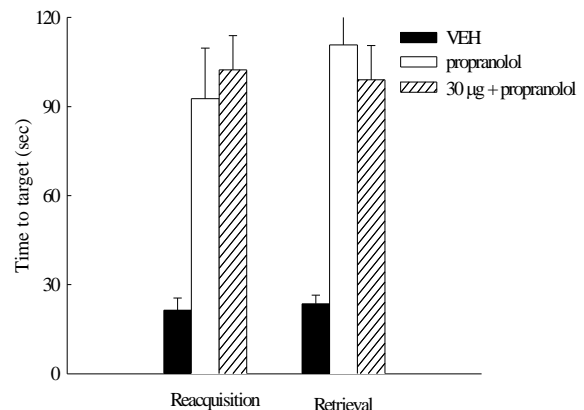
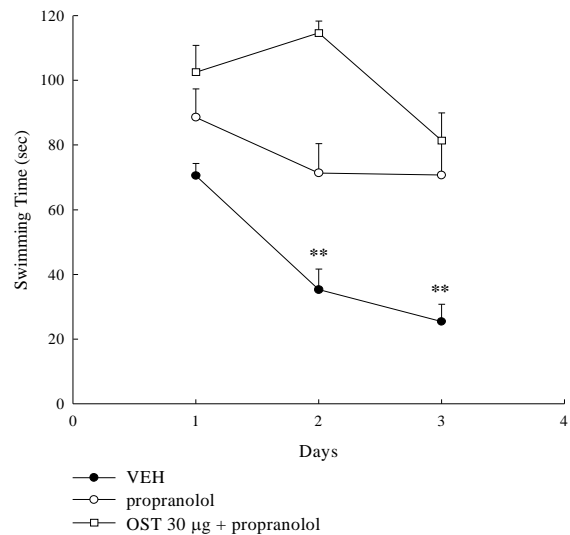


(B) Swimming speed

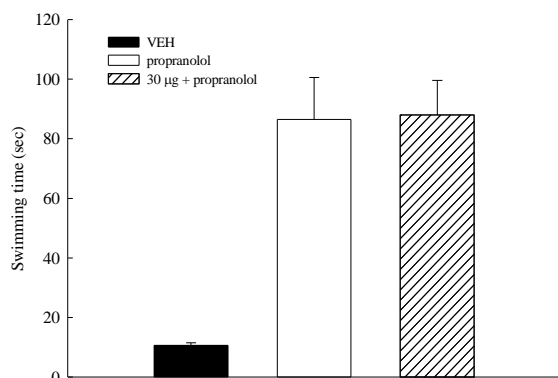


從上述結果可知，蛇床子素改善學習記憶障礙主要與 catecholaminergic neuronal system 有關。因此，我們進一步探討 catecholaminergic receptors 在蛇床子素改善學習記憶障礙所扮演角色。為探討中樞在 catecholaminergic receptors 在蛇床子素增強學習操作能力所扮演之角色，我們選用 adrenergic β receptor antagonist - propranolol。Propranolol 經雙側海馬注射給予大鼠後，會阻斷 adrenergic β receptor，

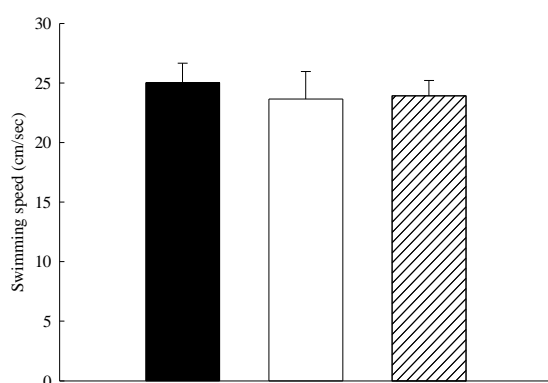
造成 catecholaminergic neuronal system 活性之降低，因而促使大鼠於水迷宮學習操作上出現障礙【見下圖（圖十二）】。；蛇床子素於雙側海馬注射 propranolol 同時經由側腦室給予並無法改善雙側海馬注射 propranolol 所造成之水迷宮空間學習操作障礙【見下圖（圖十二）】。另雙側海馬注射 propranolol 亦可造成工作記憶再學習及再現過程之障礙，同時蛇床子素亦無法改善雙側海馬注射 propranolol 所造成之工作記憶再學習及再現過程障礙【見下圖（圖十三）】。而雙側海馬注射 propranolol 所造成之障礙部份可能因影響其 motivation 有關但與游泳能力無關，同時蛇床子素改善雙側海馬注射 propranolol 造成障礙之作用主要與改善其記憶障礙部份有關【見下圖（圖十四）】。



(A) Swimming time



(B) Swimming speed



綜合以上之結果，我們發現蛇床子之主要活性成分分布在石油醚層，而蛇床子素為石油醚層中之一個成分，亦為蛇床子之主要活性成分。進一步之研究發現蛇床子素不論經皮下注射或腦室注射均具改善大鼠學習記憶障礙之作用，其作用機制部分與調節腎上腺活性有關而與周邊神經系統無關，另亦與中樞神經系統有關；針對中樞神經機制之探討，更發現蛇床子素僅可改善 catecholaminergic neurotoxin - 6-OHDA 誘發之學習操作障礙。因此，蛇床子素之改善學習操作障礙主要與中樞 catecholaminergic neuronal system 有關而與 serotonergic 或 acetylcholinergic neuronal system 無關。最後，更發現蛇床子素並無法改善雙側海馬注射 β blocker propranolol 誘發之學習操作障礙。因此，蛇床子素之改善學習操作障礙主要與中樞 adrenergic α receptor 有關而與 adrenergic β receptor 無關。

四、計畫成果自評

按補助計畫第一年度之研究成果發現地黃、當歸、麥門冬、蛇床子、知母之甲醇粗抽物均可增強動物之學習操作行為，其次牛膝、地黃、當歸、麥門冬、蛇床子、知母等之甲醇粗抽物均可改善 scopolamine 誘發被動迴避學習反應、主動迴避學習反應及水迷路之學習獲得障礙【本成果已投稿於 **American Journal of Chinese Medicine**、**Phytotherapy Research**】。因此，於第二年度選擇滋陰藥蛇床子繼續進行研究，發現蛇床子石油醚萃取層可明顯改善 scopolamine 誘導之被動迴避學習操作障礙暨水迷路學習操作障礙；其作用應與周邊交感、副交感神經系統暨 central adrenergic receptors 無關；而僅部分與腎上腺有關【本成果已投稿於 **Phytotherapy Research**】。

進一步，蛇床子石油醚萃取層口服給予雌性大鼠時，可明顯改善 scopolamine 誘導之被動迴避學習操作障礙暨水迷路學習操作障礙；而對卵巢切除造成雌性大鼠停經之被動迴避學習能力障礙，僅高劑量下始具改善作用。且服用蛇床子石油醚萃取層之雌性大鼠可使因 scopolamine 減低之血中 estradiol 濃度恢復至與正常鼠相當；但對 progesterone 則均不影響。因此，蛇床子石油醚萃取層改善雌性大鼠學習記憶障礙可能部分與增加 estradiol 之分泌有關。最後，蛇床子油溶性主要成分 osthole 3~10 mg/kg 不論經皮下注射或腦室給藥均具增強雌性大鼠水迷路學習操作能力之作用，亦可改善卵巢切除後停經大鼠水迷路學習操作能力障礙之現象；但在工作記憶上，皮下注射僅可改善記憶再現能力，而腦室給藥僅可改善再學習過程【本成果已投稿於 **American Journal of Chinese Medicine**】。

最後，針對中樞神經機制之探討，更發現蛇床子素僅可改善 catecholaminergic neurotoxin - 6-OHDA 誘發之學習操作障礙。因此，蛇床子素之改善學習操作障礙主要與中樞 catecholaminergic neuronal system 有關而與 serotonergic 或

acetylcholinergic neuronal system 無關。最後，更發現蛇床子素並無法改善雙側海馬注射 β blocker propranolol 誘發之學習操作障礙。因此，蛇床子素之改善學習操作障礙主要與中樞 adrenergic α receptor 有關而與 adrenergic β receptor 無關。

五、參考文獻

- [1] Moos, W.H., Davis, R.S., Schwarz, R.D. and Gamzu, E.R. (1988) Cognition activators. *Med. Res. Rev.* 8: 353-391.
- [2] Giurgea, C. (1972) Vers une pharmacologie de l'activite' integrative du cerveau. Tentative ddu concept nootrope en psychopharmacologie. *Actual. Pharmacol.* 25:115-156.
- [3] 陳執中 (1997) 老年癡呆症防治新藥研究進展。中國藥學雜誌，32：260-262。
- [4] 馬慶、馬川 (1997) 中藥有效治療阿耳滋海默病的機裡研究。中草藥，28：243-246。
- [5] 喻國雄、陳漢平 (1990) 中西醫抗衰老學說的回顧與展望。遼寧中醫雜誌，(4)：44-48。
- [6] 周慎 (1993) 老年癡呆症的用藥及組方規律探討。陝西中醫，14：374-375。
- [7] 陳新謙 (1995) 近十年來國內抗衰老藥的研究進展。中國藥學雜誌，30：515-518。
- [8] Mishikin, M. (1978) Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Science* 273:297-298.
- [9] Olton, D.S., Meck, W.H. and Church, R.M. (1987) Separation of hippocampal and amygdaloid involvement in temporal memory dysfunctions. *Brain Res.* 404:180-188.
- [10] O'Keefe, J. and Conway, D.H. (1978) Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp. Brain Res.* 31:573-590.
- [11] Teyler, T.J. and Discenna, P. (1986) The hippocampal memory indexing theory. *Behav. Neurosci.* 100:147-154.
- [12] Kov'as, G.L., Dirk, H.G., Versteeg, E., Ronald, de K. and Be'la B. (1981) Passive avoidance performance correlates with catecholamine turnover in discrete limbic brain regions. *Life Science.* 28:1109-1116.
- [13] Graham, R.B. (1990) The hippocampus in learning and memory. In: Grajam, R.B. (eds.). Wadsworth Publishing Co., A Division of Wadsworth, California, p 587-609.
- [14] Lorens, S.A., Guldberg, H.C., Hole, K., Kohler, C. and Srebro, B. (1976) Activity, avoidance learning and regional 5-hydroxytryptamine following intra-brain stem 5,7-dihydroxytryptamine and electrolytic midbrain raphe lesions in the rat. *Brain Res.* 108:97-113.
- [15] Decker, M.W. and McGaugh, J.L. (1991) The role of interactions between the cholinergic and other neuromodulatory systems in learning and memory. *Synapse.* 7:151-168.
- [16] Lupien, S.J. and McEwen, B.S. (1997) The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res. Rev.*

- 24:1-27.
- [17] Cory-Slechta, D. A. (1994) The impact of NMDA receptor antagonists on learning and memory functions. *Psychopharmacol. Bull.* 30:601-612.
- [18] Lee, E.H., Lee, C.P., Wang, H.I. and Lin, W.R. (1993) Hippocampal CRF, NE, and NMDA system interactions in memory processing in the rat. *Synapse* 14(2):144-153.
- [19] Ohno, M., Kobayashi, M., Kishi, A. and Watanabe, S. (1997) Working memory failure by combined blockade of muscarinic and beta-adrenergic transmission in the rat hippocampus. *Neuroreport* 8(7):1571-1575.
- [20] Ohno, M., Yamamoto, T. and Watanabe, S. (1993) Blockade of hippocampus nicotinic receptors impairs working memory but not reference memory in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45(1):89-93.
- [21] Marighetto, A., Durkin, T., Toumane, A., Lebrun, C. and Jaffard, R. (1989) Septal alpha-noradrenergic antagonism in vivo blocks the testing-induced activation of septo-hippocampal cholinergic neurons and produces a concomitant deficit in working memory performance of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 34(3):553-558.
- [22] Chen, M.F., Chiu, T.H. and Lee, E.H. (1992) Noradrenergic mediation of the memory-enhancing effect of corticotropin-releasing factor in the locus coeruleus of rats. *Psychoneuroendocrinology* 17(2-3):113-124.
- [23] Guimaraes, F.S., del Bel, E.A., Padovan, C.M., Netto, S.M. and de Almeida, R.T. (1993) Hippocampal 5-HT receptors and consolidation of stressful memories. *Behav. Brain Res.* 58:133-139.
- [24] Lee, E.H.Y., Lin, W.R., Chen, H.Y., Shiu, W.H. and Liang, K.C. (1992) Fluoxetine and 8-OH-DPAT in the lateral septum enhances and impairs retention of an inhibitory avoidance response in rats. *Physiol. Behav.* 51:681-688.