

老年痴呆症药物治疗的一条新途径： 知母皂甙元促进脑 M 受体生成改善记忆功能*

胡雅儿** 王子玫 张永芳 张 瑞 孙启祥 夏宗勤**

(上海交通大学医学院 细胞调控研究室 上海 200025)

摘 要:研究从知母中提取的化合物知母皂甙元(ZMS)抗老年痴呆症(AD)的药理学作用。ZMS能显著改善多种动物模型的学习记忆功能,它不抑制胆碱酯酶,不占领M受体的配基结合位点,因此也不是M受体激动剂或拮抗剂。ZMS主要是调整脑内M受体的密度和它的M1、M2受体亚型,使之从低于正常调整到接近或达到正常,并且脑M受体的改善同学习记忆功能的改善呈正相关。因此,ZMS是一种新型的能显著改善学习记忆功能的药物,它不同于目前已知的胆碱脂酶抑制剂或M受体的激动剂、拮抗剂。其机理研究发现ZMS是通过促进M受体蛋白分子的生成,而使M受体在较高水平上达到新的平衡。这种促进合成是由于ZMS能提高细胞M1和M2受体的mRNA表达和提高mRNA的稳定性,从而促进M受体蛋白的表达。ZMS提高M受体mRNA的稳定性需要细胞合成某种蛋白质。

关键词:知母皂甙元 学习记忆功能 脑M受体 mRNA的稳定性

老年痴呆症(AD)是老年人的神经退行性疾病,严重影响老年人的生活质量,也是一个严重的社会问题。其最重要也是出现最早的症状是学习记忆等认知功能障碍。已有大量资料证明脑内M胆碱系统和学习记忆有密切关系^[1],AD和其它一些有痴呆症状的病人大多有大脑基底核M胆碱神经元及其对海马、皮层投射的减少^[2],前脑基底核的胆碱能神经元损害^[3]或毒蕈碱样胆碱能受体拮抗剂^[4]可引起记忆障碍,而该受

体的激动剂^[5]或胆碱酯酶抑制剂^[6]对记忆障碍有改善作用。因此90年代中期以来,临床应用的抗AD药物主要是胆碱脂酶抑制剂,对M1受体激动剂和M2受体拮抗剂也有不少研究。这些药物在临床上对改善症状有一定的效果,现在多数人认为此类药物属于“对症治疗”的范畴^[7]。

中医临床上大多根据辨证将AD病人分为若干类型,给予不同治则的方剂,但是从病机方面来说,中医经典理论比较一致地认为肾阴不足是衰老的根本原因(朱丹溪“阳常有余,阴常不足”,张景岳“阳非有余,真

收稿日期:2007-03-02

修回日期:2007-03-26

* 国家自然科学基金资助项目(39320004):知母皂甙元S调整M₁受体抗衰老的药效及机理研究,负责人:易宁育;国家自然科学基金项目(30070926):知母和黄芪有效成分合并应用时改善老年认知障碍的机理,负责人:胡雅儿。

** 联系人:夏宗勤,教授,博士生导师,研究方向:细胞调控机制的基础研究以及细胞调控机制与补益药药理作用关系;胡雅儿,教授,博士生导师,主要研究方向:膜受体、G蛋白和第二信使的神经系统信息传导与补益药的药理作用,以及其有效成分的抗老年痴呆。Tel:021-64671552, E-mail: yaerhu@shsmu.edu.cn

阴不足”),AD主要是本虚标实,肾精亏虚、髓海失充是主要病因^[8]。由于AD病人以阴虚气虚为多,方剂中常含滋阴药。我们设想,滋阴药有能防治AD的活性成分,如能把它们的有效成分成功地分离出来,制成纯品,虽然不等于原来的复方,但是一旦从中找到某些成分能改善学习记忆功能,就可以进行深入的细胞水平和分子水平机理研究,实现深层次的国际接轨。

本项目从滋阴药知母中提取纯化其中的主要活性成分知母皂甙元即菝葜皂甙元(Sarsasapogenin,以下简称ZMS,化学结构为5,20,22,25S-spirostan-3-ol),在证明它能重现知母对肾上腺素受体和/M胆碱受体双向调节作用^[9,10]的基础上,深入研究它防治AD的药理作用及其作用机制。

一、ZMS改善多种动物模型的学习记忆功能,但不是胆碱酯酶抑制剂及M受体激动剂或拮抗剂

1. ZMS能显著改善多种动物模型的学习记忆功能

用纯系SD大鼠造成的以下三种病理模型:自然衰老、脑内双侧基底核定位注射鹅膏蕈酸^[11]或单侧基底核定位注射b-淀粉样肽(A1-40)和鹅膏蕈酸的混合物^[12]。造型后以ZMS加羧甲基纤维素钠(CMC-Na)的稳定悬浮液灌胃,连续60天后用电迷路法(Y-迷宫法)^[13]或避暗法^[14]测试学习记忆功能,运用Wilcoxon signed rank test作统计。结果表明:三种模型的学习记忆功能都明显低于正常对照,喂服ZMS的模型动物则都有显著改善(表1)。

2. ZMS不是胆碱酯酶抑制剂、不占领脑M受体的配基结合位点

为了检验ZMS是否胆碱酯酶抑制剂,用Ellman比

色法,以一定时间内对照品的胆碱酯酶活力为100%,计算受试样品组的相对活力,ANOVA作统计处理。他克林对酶活力有显著的抑制,但ZMS均无抑制作用,见图1。说明ZMS不是有效的胆碱酯酶抑制剂。

采用放射配基竞争结合法。用大鼠脑标本和非选择性放射配基³H-QNB(英国Amersham产品)作结合实验,向反应系统中加不同量ZMS或已知竞争剂阿托品。结果显示阿托品得到典型的竞争抑制曲线,ZMS即使浓度高达10-4M仍无竞争抑制,不占领M胆碱受体的配基结合位点,说明ZMS既不是M1受体的激动剂也不是M2受体的拮抗剂。

3. ZMS对三种模型脑M受体密度的作用

大鼠脑匀浆经差速离心分出膜受体组分,用³H-QNB进行结合实验^[15],各组动物的标本平行配对进行。自然衰老大鼠和两种拟痴呆模型大鼠的脑M受体密度都显著低于对照大鼠,ZMS使它们的脑M受体密度都有显著提高,但都仅使密度接近而不超过正常动物。Tacrine不提高脑M受体密度,见表2。

M受体密度与电迷宫错误率或避暗试验5分钟内错误次数的相关性,三种模型的相关系数都非常显著,说明病理动物M受体密度较低,学习功能也差,ZMS使病理动物的M受体密度有不同程度的提高,提高多的,学习记忆改善也显著,M受体密度和学习记忆功能密切相关(R=0.49,P<0.01)。

二、ZMS提高M受体的特点

1. ZMS能显著提高M1和M2两种亚型受体的密度

研究ZMS对M1和M2亚型的调节作用。以³H-QNB和脑标本起结合反应,加入对M1亚型有选择性

表1 ZMS对三种拟痴呆模型学习记忆的影响

组别 (n=10)	双侧注射 鹅膏蕈酸	单侧注射 Ab1-40 + 鹅膏蕈酸	自然衰老大鼠电迷路的错误 %
模型对照	1.70 ±0.67	3.30 ±1.25	22.50 ±8.57
假手术对照	0.40 ±0.52**	0.50 ±0.53**	5.00 ±5.15**
Tacrine 13.5mg/kg/d	0.80 ±0.42**	2.10 ±0.74*	5.00 ±4.70**
ZMS3.6mg/kg/d	1.40 ±0.70	2.50 ±0.97	5.00 ±5.25**
ZMS18mg/kg/d	0.60 ±0.52**	2.20 ±0.79*	4.00 ±3.95**
ZMS90mg/kg/d	0.60 ±0.52**	1.90 ±1.10*	5.50 ±4.95**

数据以均数 ±SD表示,*和**表示与模型对照组比较 P<0.05和 P<0.01,下同。

的非标记配基 pirenzepine 进行双位点竞争结合^[16],高亲和力的曲线就代表 M1 亚型;对 M2 亚型有高亲和力的 methoctramine 作为非标记竞争剂,可以求出 M2 受体的数量和亲和力。两种模型受体密度的变化结果

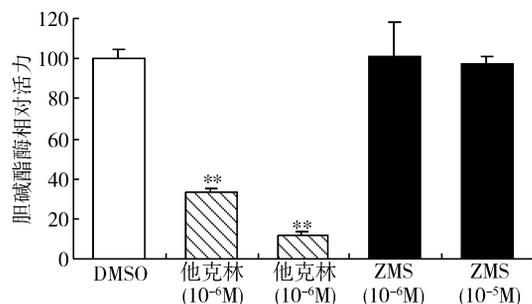


图 1 ZMS 和 Tacrine 对大鼠脑内胆碱酯酶活力的影响

见表 3,病理模型的脑 M1 和 M2 亚型受体密度都显著低于对照组, ZMS 对 M1 和 M2 亚型受体密度都有显著升高作用,但不使密度超过正常水平。平衡解离常数各组没有显著差异^[17]。

2 多种离体培养细胞的实验发现, ZMS 能直接提高靶细胞的 M 受体密度

选择多种细胞观察 ZMS 作用。药物溶于 DMSO,终浓度为 10^{-5} 或 10^{-6} mol/L,平行对照组加溶媒。加药 48h 后的细胞,用 ³H-QNB 单点结合法测定受体数量,以配对 t-检验作统计。ZMS 在 10^{-5} mol/L 时显著提高上述各种细胞的 M 受体密度(表 4),浓度为 10^{-6} mol/L 时作用不明显。离体实验证明 ZMS 能上调 M1 和 M2 两种亚型受体的密度。而且离体实验还有力地说明, ZMS 上调 M 受体密度不是通过其它神经或体液

表 2 ZMS 和 Tacrine 整体给药对脑 M 受体密度的影响

组别 (n=10)	自然衰老	脑内注射鹅膏蕈酸	脑内注射 Ab ₁₋₄₀ 加鹅膏蕈酸
模型对照	783 ±128	891 ±150	827 ±262
正常对照 (青年或假手术)	1051 ±144 ^{**}	1039 ±214 ^{**}	1423 ±536 ^{**}
Tacrine 13.5mg/kg/d	786 ±118	971 ±229	828 ±226
ZMS3.6mg/kg/d	918 ±81 ^{**}	880 ±102	1146 ±251 [*]
ZMS18mg/kg/d	929 ±91 ^{**}	1028 ±145 [*]	1423 ±180 ^{**}
ZMS90mg/kg/d	956 ±115 ^{**}	1035 ±174 ^{**}	1425 ±294 ^{**}

表 3 ZMS 整体给药对脑 M1 和 M2 亚型受体密度的影响 (括号内为 n 数)

组别	自然衰老 M1 亚型 (10)	自然衰老 M2 亚型 (10)	脑内注射 Ab ₁₋₄₀ 加鹅膏蕈酸, M1 亚型 (9)
模型对照	238 ±77	99 ±39	493 ±54
正常对照 (青年或假手术)	491 ±115 ^{**}	234 ±117 ^{**}	669 ±35 ^{**}
ZMS3.6mg/kg/d	373 ±56 ^{**}	214 ±78 ^{**}	580 ±70
ZMS18mg/kg/d	432 ±67 ^{**}	211 ±72 ^{**}	680 ±66 ^{**}
ZMS90mg/kg/d	478 ±117 ^{**}		

表 4 ZMS 对不同离体培养细胞 M 受体密度的影响

细胞种类	对照组密度 fmol/mg 蛋白	ZMS 组 fmol/mg 蛋白	ZMS 上调 %
原代培养脑细胞 (5)	218 ±58	315 ±43 ^{**}	45
原代培养心肌细胞 (8)	86 ±24	118 ±22 [*]	38
CHOm1 细胞 (8)	381 ±68	511 ±81 ^{**}	34
CHOm2 细胞 (20)	93 ±27	147 ±57 ^{**}	58
HEK293 细胞 (6)	207 ±47	247 ±42 ^{**}	19

因素的间接效应,而是对靶细胞的直接作用。

3. ZMS对 M1受体和 M2受体亚型与 G蛋白偶联的影响

参照 Zahn等的报道^[18], CHOm1和 CHOm2细胞按常规方法培养,测定 M1或 M2受体密度,同时还测定 carbachol刺激后的³⁵S - GTP S结合量。GTP S是 GTP类似物,但和 G - 蛋白的结合是不可逆的。³⁵S - GTP S的比活度和标本中的蛋白量换算成 fmol/mg蛋白,通常简称 G蛋白偶联活性。进一步将 G蛋白偶联活性被同一标本的 M受体密度除,则反映单位受体的偶联活性,通常称为 M受体与 G蛋白偶联的效率。M1和 M2两种受体亚型的结果列于表 5。

可以看出,两种亚型情况类似,ZMS使 G蛋白偶联活性显著升高,但同时也使 M受体密度升高。若计算 M受体与 G蛋白的偶联效率,则 ZMS组在两种受体中都和溶媒对照组无显著差异。所以,可以认为,ZMS确能使 M1和 M2受体和 G蛋白的偶联活性增加,但主要是由于提高了受体的密度,并不是提高偶联效率。

我们曾以 Western blot方法观察到在 ZMS的作用下与 M1受体偶联的 G_{11/14}蛋白量也有一定增加,增加的%和 M受体密度增加的%相仿,推测很可能也是从属于 M受体增加的结果。

三、ZMS促进 M受体密度增加的分子机理研究

1. M受体动力学实验发现 ZMS能显著提高脑 M受体的生成速率

同一批老年 Balb/c小鼠喂服 26mg/kg/d ZMS 2个月,注射 M受体不可逆阻断剂 BCM(苯甲基偶酰基胆碱氮芥)^[19],不同时间取脑用³H - QNB测定 M受体密度,得到新生受体密度逐步升高的时相曲线,计算出受体生成速率(Pr, fmol/mg蛋白/h)和降解速率常数(K, 1/h)。老年小鼠和青年小鼠相比,M受体的生成速率和降解速率常数都变慢,前者变慢的程度大于后者,因此 M受体密度水平较低;ZMS老年小鼠 M受体生成加快大于降解加快,因此 M受体密度在较高水平上达到平衡(表 6)。

2 用逆转录 - 聚合酶链反应 (RT - PCR) 观察 ZMS对 M受体 mRNA表达的影响

采用实时定量 RT - PCR^[20]。RT - PCR所得电泳图清晰显示 mRNA的条带(图 2)。计算每一时间点 ZMS组和 DMSO的比值对用药时间作图(图 3),可以见到,M1和 M2受体的 mRNA和 DMSO组的差异($P < 0.05$)都随 ZMS作用时间延长而逐渐加大,M2受体差异更大。所以,本实验的结果清楚说明,ZMS能直接作用于细胞,使 M1和 M2受体的 mRNA显著增加。

表 5 ZMS对 M1和 M2受体和 G蛋白偶联的影响

组别	G蛋白偶联活性 fmol/mg蛋白	M受体密度 fmol/mg蛋白	M受体与 G蛋白的偶联效率
M1受体 DMSO组(5)	137 ±15	713 ±50	0.193 ±0.017
M1受体 ZMS组(5)	185 ±34*	885 ±36**	0.210 ±0.043
M2受体 DMSO组(5)	146 ±12	144 ±26	1.000 ±0.180
M2受体 ZMS组(5)	204 ±36*	204 ±21**	1.010 ±0.160

表 6 ZMS对老年小鼠脑 M受体生成速率和降解速率常数的影响

组别	降解速率常数 K (1/h)	生成速率 Pr (fmol/mg蛋白/h)
青年	0.0505 ±0.0015**	70.32 ±2.13**
老年	0.0369 ±0.0011	47.18 ±1.51
老年 + ZMS	0.0457 ±0.0017**	62.82 ±2.13**
ZMS引起的相对增值	35%	48%

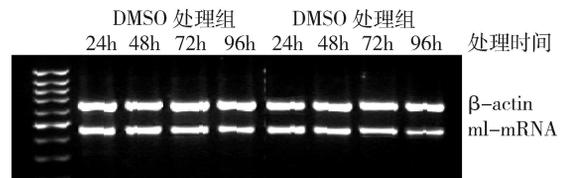


图 2 RT - PCR所得电泳图中 M1受体的 mRNA 条带示例

3. RT-PCR观察 ZMS对 M受体 mRNA稳定性的影响

用上述测定 mRNA 相同的方法培养 CHOm2 和 CHOm1 细胞,在加 ZMS 或 DMSO 24h 后加放线菌素 D (Actinomycin D) 5 μ g/mL (终浓度),以终止 mRNA 的合成,然后在不同时间取样用上述相同的 RT-PCR 方法测定残存 mRNA 的量,得到 m1 或 m2 mRNA 的降解时相曲线,在半对数坐标上呈直线 (图 4)。直线回归求出斜率,再计算半衰期 (半衰期 = -0.693 斜率)。半衰期的长短反映 mRNA 的稳定性。

CHOm1 和 CHOm2 细胞加 DMSO 后的 m1 mRNA 和 m2 mRNA 降解曲线下降较快,算得半衰期在 3h 左右。加 ZMS 的细胞降解曲线斜率较平坦,算得的 m1 mRNA 或 m2 mRNA 半衰期分别比 DMSO 组延长 1 倍和 2 倍左右 (图 4 表 7)。说明 ZMS 提高细胞中的 m1 mRNA 和 m2 mRNA 和 mRNA 的稳定性,使 mRNA 的寿命延长有密切关系。

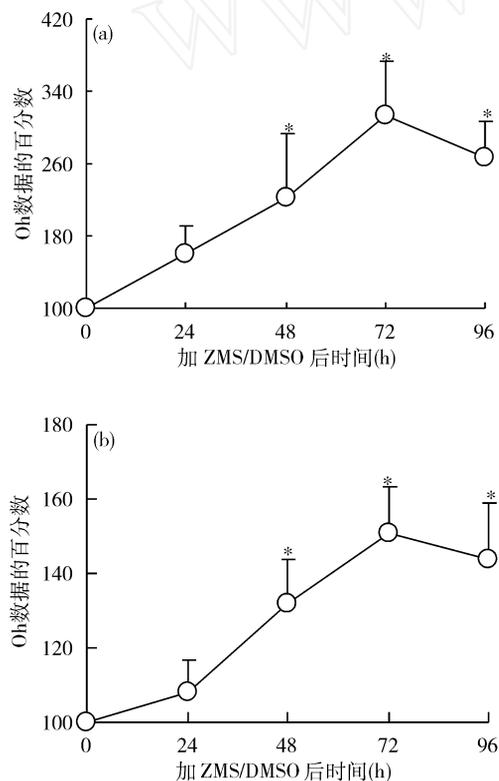


图 3 ZMS 对 M2 受体 mRNA (A) 和 M1 受体 mRNA (B) 表达的影响

4. 实时定量 RT-PCR 实验发现, ZMS 提高 M 受体 mRNA 的稳定性需要某种蛋白质的合成

实时定量 RT-PCR 技术,以 CHOm2 细胞为代表进行。细胞分为 4 组,1、2 两组在分别加 ZMS 或 DMSO 前 4h 先加蛋白质合成酶抑制剂 cycloheximide; 3、4 两组不加 cycloheximide,然后 4 个组都再培养 24h,计算半衰期以比较各组 mRNA 的稳定性。结果显示,不加 cycloheximide 的两组中,ZMS 显著延长半衰期,而加 cycloheximide 的两组,这种差异消失,说明没有蛋白质的新合成,ZMS 不再能增强 m2 mRNA 的稳定性 (表 8)。

四、讨论与结论

近年来针对 AD 发病机理的药物研究倍受重

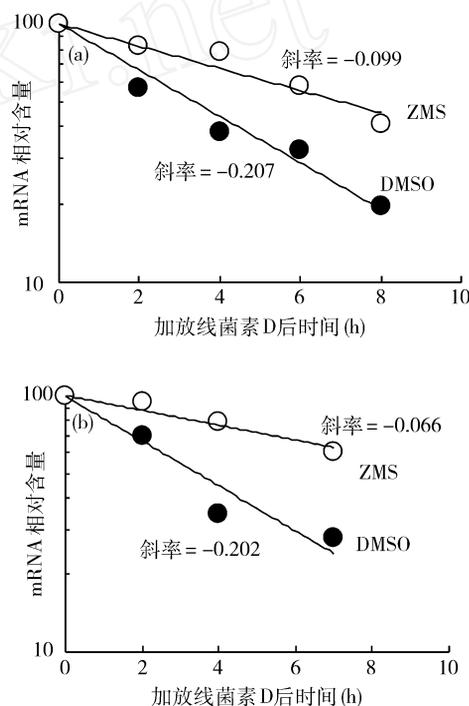


图 4 RT-PCR 测定 m1 mRNA (A) 和 m2 mRNA (B) 半衰期的结果

表 7 ZMS 对 m1 和 m2 mRNA 半衰期 (h) 的影响

组别 (n=3)	m1 mRNA	m2 mRNA
DMSO 组	3.35 \pm 0.06	3.43 \pm 0.68
ZMS 组	7.00 \pm 0.20 ^{**}	10.50 \pm 1.90 ^{**}

视,如 A 分泌酶抑制剂(如^[10MOO-3]DR9、DAPT)、tau 蛋白酶过度磷酸化的抑制剂(抑制 CDK5 或 GSK-3)、A 纤维化抑制剂(如 NC-531)、Ab 免疫治疗制剂(如 AN1792)等,但是都还处于实验室研究阶段^[7]。已经被证明对 AD 有一定疗效的谷氨酸受体的不可逆阻断剂 memantine 和正在进行 2 期临床试验初步表明对 AD 有一定疗效的 GABAB 受体拮抗剂 SGS742,都不可避免存在其它副作用^[21]。ZMS 是从中药知母中提取的活性成分,副作用很低。药效实验证明 ZMS 是一种新型的能显著改善学习记忆功能的药物,它不同于目前已知的胆碱脂酶抑制剂或 M 受体的激动剂、拮抗剂。ZMS 改善学习记忆功能的机理在于能使降低的脑 M 受体密度提高到接近正常水平,在体内需要一个较长期的调整过程,作用缓慢而持久。由于脑 M 受体降低是老年痴呆症(AD)等疾病时的一个重要病理变化,ZMS 显然有改善病理变化的作用,不是单纯改善症状。

发现 ZMS 上调脑 M 受体有以下特点: 整体和离体实验都证明,ZMS 能显著提高 M1 和 M2 亚型受体的密度,而且对几个重要脑区的 M1 亚型都有明显提高作用。ZMS 能提高多种离体培养细胞的 M 受体密度,说明它主要不是通过远处的神经体液调节机制间接影响靶细胞,而是直接作用于靶细胞起上调作用。ZMS 只使降低的 M 受体密度升高到正常或接近正常的水平,并不使原本正常的 M 受体密度上升到超过正常的水平。ZMS 只是使受体密度增加,不影响受体和配基的亲合力,提示它不改变 M 受体的构象。ZMS 能提高 M1 和 M2 受体与 G 蛋白的偶联量,但这是因为 ZMS 提高了 M1 和 M2 受体的密度,偶联效率并未提高,这也从另一个侧面反映,ZMS 并不

引起 M1 和 M2 受体的构象变化。

测定脑 M 受体代谢动力学的方法,以考察 ZMS 对 M 受体生成和降解速率的影响。M 受体的增加又与它的 mRNA 表达和 mRNA 的稳定性有关,由于有不少 mRNA 的稳定性调节需要某些短寿命蛋白质的参与^[22]。结果发现,ZMS 既促进 M 受体的生成,也促进 M 受体的降解,但生成增加超过降解增加,所以生成增加处于主导地位,其结果是使 M 受体在较高水平上达到新的平衡。这种促进合成是由于 ZMS 能提高细胞的 m1 mRNA 和 m2 mRNA 水平,从而促进 M1 和 M2 受体蛋白的表达。其中提高 mRNA 的稳定性,延长其半衰期有重要意义。

细胞经放线菌酮预处理后,ZMS 不能稳定 M2 mRNA;相反,ZMS 处理后加入 cycloheximide 则不影响 ZMS 对 CHOM2 mRNA 的稳定作用。说明 ZMS 延长 M2 mRNA 半衰期必须新合成某种蛋白质,而这种蛋白质也能较长时间的发挥稳定 M2 mRNA 的作用。蛋白质因子参与 mRNA 稳定性的调控已有文献报道^[23],本实验是何种蛋白质及 RNA 结合区参与调控,这将有待应用蛋白芯片或蛋白质双向电泳等方法进一步研究。

参考文献

- 1 Decker MW, Gill TM, McLaugh JL. Concurrent muscarinic and beta-adrenergic blockade in rats impairs place-learning in a water maze and retention of inhibitory avoidance. *Brain Research*. 1990, 513(1) 81~5.
- 2 Bigl V, Arendt T. Cholinergic neurons of the central nervous system: morphofunctional aspects. *Acta Psychiatrica Scandinavica Supplementum*, 1991, 366 7~13.
- 3 Leanza G, Muir J, Nilsson OG, et al. Selective immunolesioning of the basal forebrain cholinergic system disrupts short-term memory in rats. *Eur J Neurosci*. 1996, 8 1535~44.
- 4 Introni-B, Collison B, McLaugh JL. Modulation of memory by post-training epinephrine: Involvement of cholinergic mechanisms. *Psychopharmacology*, 1988, 94 379~85.
- 5 Schwarz RD, Callahan MJ, Coughenour LL, et al. Milameline (CI-979/RU B5926): a muscarinic receptor agonist with cognition-activating properties: biochemical and in vivo characterization. *J Pharmacol and Exp Therapeutics*. 1999, 291 812~22.
- 6 Lyketsos CG, Reichman WE, Kershaw P, et al. Long term outcomes of galantamine treatment in patients with Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 2004, 12 473~82.
- 7 Blennow K, de Leon M, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet*, 2006, 368 387~403.
- 8 常富业,王永炎,高颖,等. 病络机制与痴呆证治述要. *中医研究*, 2005, 18(5) 1~3

表 8 蛋白质合成酶抑制剂对 ZMS 所致 m2 mRNA 半衰期延长的影响

	DMSO 组的 半衰期	ZMS 组的 半衰期
先 ZMS 作用 24h	3.06 ± 0.41	6.02 ± 2.37*
后再加 cycloheximide		
加 cycloheximide 后 4h	3.00 ± 0.34	2.98 ± 0.70
再加 ZMS 作用 24h		

- 9 丁元生, 易宁育, 夏宗勤, 等. 中药知母有效组分 - 知母皂甙元“滋阴”作用的研究. 核技术, 1991, 14: 262 ~ 265.
- 10 易宁育, 夏宗勤, 胡雅儿, 等. 一些滋阴助阳药调整 M 受体 cGMP 系统及 受体 cAMP 系统分子机理的研究. 中药药理与临床, 1994, 10(6): 10.
- 11 Levin, N. C. Christopher, T. Weaver, *et al*. Ventral hippocampal ibotenic acid lesions block chronic nicotine - induced spatial working memory improvement in rats. *Cognitive Brain Research*, 1999, 7: 405 ~ 410.
- 12 Morimoto K, Yoshimi K, Tonohiro T, *et al*. Co - injection of b - amyloid with ibotenic acid induces synergistic loss of rat hippocampal neurons. *Neurosci*, 1998, 84: 479 ~ 87.
- 13 Heyser CJ, McDonald JS, Jeffrey S, *et al*. Strain distribution of mice in discriminated Y - maze avoidance learning: Genetic and procedural differences. *Behavioral Neuroscience*, 1999, 113: 91 ~ 102.
- 14 Moreira KM, Hipolide DC, Nobrega JN, *et al*. Deficits in avoidance responding after paradoxical sleep deprivation are not associated with altered [3H]pirenzepine binding to M1 muscarinic receptors. *Brain Research*, 2003, 977: 31 ~ 7.
- 15 胡雅儿, 卞以洁, 易宁育, 等. 用放射配基结合分析法测定甲低小鼠脑 M 受体. 中华核医学杂志, 1989, 9(2): 91 ~ 94.
- 16 Hu YE, Xia ZQ, Sun QX, *et al*. A new approach to the pharmacological regulation of memory: sarsasapogenin improves memory by elevating the low muscarinic acetylcholine receptor density in brains of memory - deficit rat models. *Brain Research*, 2005, 1060: 26 ~ 39.
- 17 胡梅, 胡雅儿, 张蔚, 等. 知母活性成分 ZMS 对老年大鼠脑 M 受体的调节作用. 中华核医学杂志, 2001, 21(3): 158 ~ 161.
- 18 Zahn K, Eckstein N, Trankle C, *et al*. Allosteric Modulation of Muscarinic Receptor Signaling: Alcuronium - Induced Conversion of Pilocarpine from an Agonist into an Antagonist. *Pharmacology and Experimental Therapy*, 2002, 301(2): 720 ~ 728.
- 19 范国煌, 易宁育, 夏宗勤. 知母皂甙元对原代培养的神经细胞 M 受体密度和代谢动力学的影响. 中国中医基础医学杂志, 1997, 3(6): 15 ~ 17.
- 20 张永芳, 胡雅儿, 夏宗勤. 知母活性成分 ZDY101 调节 M2 受体 mRNA 稳定性的研究. 上海第二医科大学学报, 2005, 25(4): 368 ~ 370.
- 21 Sonkusare SK, Kaul CL and Ramarao P. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders - memantine, a new hope. *Pharmacological Research*, 2005, 51: 1 ~ 7.
- 22 Webb H, Bums R, Ellis L, *et al*. Developmentally regulated instability of the GPI - PLC mRNA is dependent on a short - lived protein factor. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(5): 1503 ~ 12.
- 23 Manohar CF, Short ML, Nguyen A, *et al*. HuD, a Neuronal - specific RNA - binding Protein, Increases the in Vivo Stability of MYCN RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(3): 1967 ~ 1973.

A new approach to the pharmacological regulation of memory: sarsasapogenin improves memory by elevating the low muscarinic acetylcholine receptor density in brains of memory - deficit rat models

Yaer Hu, Zongqin Xia, Qixiang Sun

(Research Laboratory of Cell Regulation, Shanghai Jiaotong University Medical School, Shanghai 200025, China)

The purpose of this work is to study the basic pharmacological action of sarsasapogenin, a saponin from the Chinese medicinal herb *Rhizoma Anemarrhenae*, (abbreviated as ZMS in this paper), on learning ability and memory of three animal models: aged rats and two neurodegeneration models produced either by single unilateral injection of beta - amyloid 1 - 40 (A 1 - 40) plus ibotenic acid (IbotA) or by bilateral injection of IbotA alone into nucleus basalis magnocellularis. Y - maze test and step through test revealed that learning ability and memory was impaired in the models and was improved by oral administration of ZMS. ZMS did not inhibit acetylcholinesterase, nor did it occupy the binding sites of muscarinic acetylcholine receptor (M receptor). On the other hand the densities of total brain M receptor and its M1 and M2 subtypes was significantly lower than control rats and ZMS significantly raised the densities of total M receptors and its M1 and M2 subtype. Linear regression revealed significant correlation between the learning ability/memory and the density of either total M receptor or its M1 and M2 subtypes. Therefore, ZMS seems to represent a new approach to the pharmacological regulation of learning and memory and appears to be not simply palliative but may modify the progression of the disease. Mechanistic studies revealed that the increase of brain M receptor caused by ZMS is due to the increase of synthesis rate of M receptor molecules. The increase of synthesis rate in turn is due to the increase of mRNA of M1 and M2 receptor subtypes. Measurement of the half - life of M1 and M2 receptors by RT - PCR showed that ZMS could prolong the half - life of both subtypes. This effect of ZMS requires a synthesis of certain unknown protein since if cycloheximide was added prior to the addition of ZMS in the cultured cells, the effect of ZMS was abolished.

Keywords: sarsasapogenin; learning ability and memory; muscarinic acetylcholine receptor; mRNA stability

(责任编辑:王 瑀, 责任编辑:张志华)