

# 白朮對老化促進小白鼠學習記憶能力影響之研究

王銘富<sup>1</sup> 杜易潔<sup>2</sup> 賴貞秀<sup>3</sup> 黃克峰<sup>2</sup>

靜宜大學<sup>1</sup> 食品營養研究所<sup>2</sup> 應用化學研究所<sup>3</sup> 化粧品科技學系

臺中，台灣

(2003年8月1日受理，2003年9月4日收校訂稿，2003年10月20日接受刊載)

白朮 (*Atractylodes macrocephala* Koidz.) 為補益良藥，具有益氣健脾、利尿及止瀉的作用。本研究旨在探討長期餵食白朮萃取物對2月齡及7月齡老化促進小白鼠 (SAMP8) 學習記憶能力及腦部病理變化之影響，並比較不同月齡間之差異。實驗結果顯示，無論2月齡組或7月齡組小白鼠，實驗期間體重變化、攝食量及活動量各組間均無顯著差異。在學習記憶能力方面，2月齡不論雄性或雌性被動迴避試驗，各組間均無顯著差異，但7月齡組小白鼠，則有顯著之差異 ( $p < 0.05$ )；添加不同濃度白朮萃取物之實驗組，其學習記憶能力有呈現越佳的狀態。另外，經主動迴避試驗測試後發現，無論2月齡組或7月齡組小白鼠餵食添加0.5%及1.0%白朮萃取物，有較佳之學習記憶能力，而且腦中海馬迴空泡數及脂褐質堆積均有明顯的改善效果 ( $p < 0.05$ )。

本研究結果可以證實白朮萃取物具有改善學習記憶的作用。

關鍵字：白朮，老化促進小白鼠，學習記憶。

## 前 言

近年來，臺灣在經濟及醫療等各方面之進步，國人之平均壽命不斷延長，根據民國八九年行政院內政部之人口統計<sup>1</sup>，老年人口約佔總人口之百分八點五七，表示臺灣已邁入高齡化社會，根據行政院經濟建設委員會<sup>2</sup>的推估，依賴人口比率將從2001年的9%增至2011年10.4%，2031年22.6%。相對的高齡化社會中普遍存在的老年性失智症 (senile dementia) 或早老年性失智症 (presenile dementia) 的患者，在臺灣社會中亦有逐年上升的趨勢<sup>3</sup>，其主要的特徵為記憶力及其他智能的逐漸減退。因此，智能增進劑 (cognition enhancing drug) 之開發是近代醫藥學家重視及努力之目標。1997年Le Bars等<sup>4</sup>之研究，首先證實銀杏萃取物是臨床上第一個可以治療老人癡呆症的藥物。1999年中國醫藥學院校長謝明村教授<sup>5</sup>之研究發現「六味

地黃丸」具有增強記憶之特殊療效，引起國內一陣搶購風潮。可見中草藥中含有豐富的化學物質，是一個新藥開發的寶庫。而從不同的角度將中草藥開發成為可以增進智能的藥材，是值得進一步探討的。

白朮 (*Atractylodes macrocephala* Koidz.)<sup>6</sup> 具有健胃、利尿及止瀉的功效。在【神農本草經】中收錄為上品，久服具有輕身延年不老的功效。本研究目的，在探討給予不同濃度的白朮萃取物，對學習記憶缺損的老化促進小白鼠 (SAMP8)，其學習記憶的行為表現及腦部病理變化之關聯，並比較不同月齡間之差異。期望藉由本實驗能對老化所引起智能衰退或腦部病變有改善或預防之功效，並經由持續的研究對中草藥之科學化有所助益。

## 材料與方法

### 一、白朮之萃取

白朮 (*Atractylodes macrocephala* Koidz.) 藥材切片購自臺中市 (產地為中國大陸浙江省地區)，經中國醫藥學院技正邱年永先生鑑定無誤後，以粉碎機粉碎成細小碎片；每 600 g 白朮以水+95 % 酒精 (1 : 1) 為溶劑熱迴流 3 小時後收集萃取液，重新加入溶劑再進行熱迴流 6 小時後收集萃取液 (9 小時方法亦同)，集合三次萃取液經濃縮乾燥，並以真空冷凍乾燥機乾燥，最後記錄其重量。所得之萃取物，分別以 0 %、0.25 %、0.5 % 及 1.0 % 之劑量做成實驗飼料。

### 二、實驗動物與飼料

本實驗以自行繁殖飼養的老化促進小白鼠 (senescence-accelerated mouse prone-8; SAMP8) 為實驗動物模型<sup>7</sup>。此老化促進品系之老鼠<sup>8-15</sup> 係由日本京都大學所研發出來的，平均壽命約 299 日 (10 個月)，早期即會產生停止體重增加、毛髮呈現脫落、類澱粉蛋白沉積增加與免疫系統較差等現象；它的腦部病理特徵與老化相關之形態變化，包括神經元細胞喪失、皮質萎縮、脂褐質、腦幹網狀組織的海綿樣變性等特徵。由延遲辨別學習 (delayed-discrimination learning) 測得 SAM-P8 具有短期記憶缺失之特性。被動迴避試驗 (step down test) 中 SAM-P8 之學習獲得與記憶保留能力均較同月齡之其他鼠顯著降低；主動迴避試驗 (shuttle box test and lever press test) 及水迷路試驗 (water maze) 亦有與上述相同之結果。此外，12 月齡 SAM-P8 腦內海馬脂褐質沉積量 (28.0) 約為 4 月齡 SAM-P8 (2.9) 之 10 倍。以上均顯示 SAM-P8 為一適合老化相關研究之實驗動物。

動物飼養在 30 (長) × 20 (寬) × 10 (高) cm 之透明塑膠籠中。動物房為一無塵自動控制室，溫度維持在 25 ± 2 °C、相對濕度 65 ± 5 % 之條件，並以自動定時器控制光照週期為 07 : 00 - 19 : 00 屬於黑暗期 (light period)，19 : 00 - 翌日 07 : 00 屬於光照期 (dark period)。據研究得知，此品系之小白鼠在黑暗中自發性行為較高，因此本實驗所有行為測試皆在黑暗環境下進行。

小白鼠離乳後，以一般固型飼料飼養至 2 月齡 (低月齡組) 及 7 月齡 (高月齡組) 為對象，每組雄性及雌性小白鼠隻數各為 10 隻；同時在實驗初體重等各項條件也盡量相似，以求實驗誤差減至最小。實驗設

**Table 1. Compositions of the experimental diets**

Ingredient ( g/kg diet )	*Group			
	A	B	C	D
Casein <sup>1</sup>	217.0	217.0	217.0	217.0
$\alpha$ - starch <sup>2</sup>	435.3	433.7	432.0	428.7
Sucrose <sup>2</sup>	217.7	216.8	216.0	214.3
<i>Atractylodes macrocephala</i> extracts	0	2.5	5.0	10.0
Vitamin mixture <sup>3</sup>	10.0	10.0	10.0	10.0
Mineral mixture <sup>4</sup>	50.0	50.0	50.0	50.0
Cellulose	20.0	20.0	20.0	20.0
Corn oil	50.0	50.0	50.0	50.0

\*A = control

B = *Atractylodes macrocephala* extract 0.25 %

C = *Atractylodes macrocephala* extract 0.50 %

D = *Atractylodes macrocephala* extract 1.00 %

<sup>1</sup>Casein ( 92 % crude protein ) was purchased from Oriental Yeast Co. ( Tokyo, Japan )

<sup>2</sup> $\alpha$ - starch : sucrose, 2 : 1 ratio

<sup>3</sup>Obtained from Oriental Yeast Co. (Tokyo, Japan). The composition was as follows (g/kg): thiamin HCl, 12; riboflavin, 40; pyridoxine HCl, 8; vitamin B<sub>12</sub>, 50; ascorbic acid, 300; D-biotin, 0.2; folic acid, 2; calcium pantothenate, 50; *p*-aminobenzoic acid, 50; niacin, 60; inositol, 60; choline chloride, 2000; all-*rac*- $\alpha$ -tocopheryl acetate, 50; menadione, 52; retinyl acetate, 0.025; ergocalciferol, 10.

<sup>4</sup>Obtained from Oriental Yeast Co. (Tokyo, Japan). The composition was as follows (g/kg): CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 14.56; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25.72; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9.35; NaCl, 4.66; Ca-lactate, 35.09; Fe-citrate, 3.19; MgSO<sub>4</sub>, 7.17; ZnCO<sub>3</sub>, 0.11.

計是將小白鼠分為對照組及不同劑量的實驗組，分別以投食的方式給予混有不同濃度白朮萃取物的實驗飼料，實驗飼料組成如(表 1)所示，其調配以 20 % 酪蛋白為主，混合 1 % vitamin mixture、5 % mineral mixture、2 % cellulose powder、5 % corn oil，實驗組再分別添加 0.25 %、0.5 % 及 1.0 % 的白朮萃取物；其餘部分為玉米澱粉及蔗糖以 2 : 1 之比例組合。

### 三、實驗流程與方法<sup>7</sup>

實驗流程如圖 1 所示。實驗進行前動物先經 3-5 天之適應期，餵飼一般固型飼料，實驗開始以 20 酪蛋白 (casein) 為對照組，以 20 % 酪蛋白 (casein) 分別添加 0.25 %、0.50 % 及 1.0 % 不同濃度白朮萃取物為實驗組，全程為期 16 週。實驗期間，小白鼠的飼料及飲水採自由攝取，每兩天給予飼料一次並記錄小白鼠之體重及攝食量。餵飼期間進行 2 月齡及 7 月齡各組小白鼠活動量 (locomotion) 測試。單次被動迴避試驗 (single-trial passive avoidance test) 及主動迴避試驗 (active shuttle avoidance test)。實驗結束後將動物犧牲，取腦部海馬迴 (hippocampus) 區切片，作病理組織之觀察。

#### (一) 活動量測試 (Open field activity test)

飼養至第 13 週進行活動量測試，首先將小白鼠置於 25 (長) × 25 (寬) × 25 (高) cm 之鋁箱中央 (activity monitor video path analyzer, Coulbourn Instruments Model E61-21)，測其局部活動量之情形。整個實驗進行的

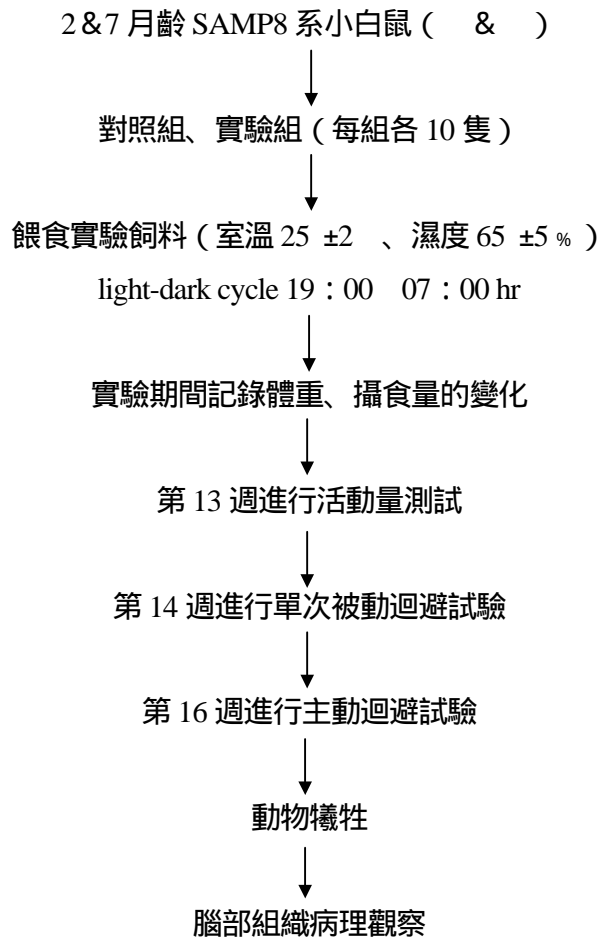


圖 1：實驗流程

過程乃在光線微弱且寂靜的環境下操作，每隻小白鼠可由錄影觀測其平面移動量 (locomotion; sec/5 mins) 之情形，每 5 分鐘透過記錄器記錄一次，全程為 10 分鐘。基於被動迴避試驗與主動迴避試驗法為一平面移動之行為表現，因此測試平面移動量之主要目的在於瞭解小白鼠平面步移的活動情形，作為活動量評估的依據，同時並篩選活動異常的小白鼠，如順或逆時鐘同一方向轉圈次數高者皆予以淘汰。

#### (二)單次被動迴避試驗 (Single-trial passive avoidance test)

經過活動量測試後，於第 14 週進行單次被動迴避試驗 (step-through type)。依鼠類之嗜暗性而設計的一種實驗方法，以觀測小白鼠學習記憶能力之情形。此乃使用一 35 (長)×17 (寬)×20 (高)cm 之鋁箱 (shuttle cage, Coulbourn Instruments Model E10-15)，分成明室及暗室，中央有一 7.5 (長)×6.5 (寬)cm 之小閘門 (guillotine door, Coulbourn instruments Model E10-15GD) 中隔，箱底設有間隔 1 cm 平行排列的金屬桿，並接上電流器。整個實驗過程全由電腦程式設計控制其時間、電擊能力及小閘門打開等動作。首先，將小白鼠置於明室，待適應 10 秒鐘後，電腦會自動打開中隔之小閘門，使其自由探索。一旦小白鼠進入暗室，則電腦會迅速關閉此小閘門，五秒後電腦隨即出現 0.5 毫安培 (0.5 mA) 1 秒之電擊 (shock)，每間隔 5 秒電擊一次，共電擊三次，此即完成學習訓練。每次測試時間最高期限為 180 秒，因此，若小白鼠在明室 180 秒後仍

未進入暗室，則強迫其進入暗室，並同樣施予電擊，使其完成學習訓練之過程。在完成學習訓練後，以同樣操作方法測試每隻小白鼠在 24、48、72 小時及 7 天的記憶能力，但此時不再給予任何電擊。實驗求小白鼠滯留在明室的時間，以判定不同月齡間小白鼠學習記憶能力之差異。滯留時間愈長，表示學習訓練及記憶能力愈佳。

### (三)主動迴避試驗 (Active shuttle avoidance test)

經過活動量測試之後，於第 16 週進行主動迴避試驗。此乃使用一 35 (長) × 17 (寬) × 20 (高) cm 之鋁箱 (shuttle cage, Coulbourn Instruments Model E10-15)，分成兩個箱室，其中央有一 7.5 (長) × 6.5 (寬) cm 之小閘門中隔可相通，箱底設有間隔 1 cm 平行排列的金屬桿，並接上電流器。整個實驗過程全由電腦程式設計控制其時間、聲光及電擊等動作。首先，將小白鼠放置於一邊，待適應 10 秒後 (intertrial interval)，電腦隨即出現 10 秒鐘的光 (紅、黃、綠燈) 及聲音的刺激 (conditioned stimulus; CS)，此時小白鼠將有兩種反應結果產生：若小白鼠在光及聲音刺激 (CS 系統下) 之 10 秒鐘後仍停留在同一邊，無任何動作反應，則電腦會隨即給予持續 5 秒 0.3 毫安培 (0.3 mA) 的電擊一次 (unconditioned stimulus; UCS)，此時，小白鼠在 UCS 系統下所表現來回穿梭的行為，稱之為逃脫反應 (escape response)；若小白鼠在 CS 系統下已進入另一邊，則電腦不會給予任何電擊，此時小白鼠於 CS 系統期間所表現來回穿梭的行為，稱之為迴避反應 (avoidance response)。每隻小白鼠每次接受 5 回的 CS-UCS 測試，之後將小白鼠放回鼠籠中，間隔 20 ~ 25 分鐘後，再以相同的方法操作一次，一天共四次，連續四天。

在整個實驗過程中，小白鼠停留在同一邊，表示其尚未學會，則會給予電擊，此為學習訓練的歷程；若小白鼠移動至另一邊，表示已經學會，則不會給予電擊，此行為是記憶能力的表現。電腦會依小白鼠的反應，自動出現 CS 及 UCS 的狀態，並自動記錄小白鼠反應的次數。實驗求小白鼠在 CS 系統下的迴避反應次數及 UCS 系統下之逃脫反應次數，以判定不同月齡間小白鼠學習記憶能力之差異。若逃脫反應次數愈多，表示有較差的學習能力；若迴避反應次數愈少，表示記憶能力是愈不好的。

### (四)病理組織切片

將腦組織採橫切的方式切取 Brain 部位，經染色後觀察各組小白鼠腦部海馬迴區之海綿樣變性 (空泡數目之變化) 及脂褐質所佔百分比之改變，探討餵食白朮萃取物是否有改善之效果。

#### 1. 蘇木精與伊紅染色 (hematoxylin and eosin: H&E stain)

H&E stain 是屬於常規染色 (routine staining)，主要可針對全腦中之細胞核 (呈藍色) 與細胞質 (呈不同深淺的粉紅色) 的染色法。染色流程為先脫蠟並置於蒸餾水中後，將其置於 Mayer 氏蘇木紫溶液 15 分鐘，之後沖水 20 分鐘，並以蒸餾水洗 2 次後，以伊紅溶液作對比染色 5 分鐘後，沖水 5 分鐘，利用 95 % 酒精、絕對酒精及二甲苯脫水，最後封片並進行病理切片的觀察。

#### 2. Periodic acid schiff (PAS) 法

PAS 法是屬於特殊染色 (special staining)，其主要可針對組織中之細胞核 (呈藍色) 與多醣體 (呈紅色紫色) 的染色法。染色流程為先脫蠟並置於蒸餾水中後，將其置於 0.5 % 過碘酸溶液 10 分鐘，沖水 5 分鐘後以蒸餾水洗 2 次，然後置於 schiff 溶液中 10 分鐘後，於還原洗滌用工作液中 3 次，每次各 2 分鐘後，沖水

5 分鐘，並且利用 Mayer 氏蘇木紫作對比染色 30 秒，沖水 5 分鐘後，利用 95%酒精、絕對酒精及二甲苯脫水，最後封片並進行病理切片的觀察。

## 統計分析

本實驗所得之資料以 SPSS 套裝軟體進行統計分析，實驗結果數值皆為平均值  $\pm$  平均標準誤差 (mean  $\pm$  S.E.M.) 表示。體重、攝食量、活動量、學習記憶、腦部組織病理變化，是利用單因子變異數分析 (one-way analysis of variance; one-way ANOVA)，以檢定飼食不同飼料各組間之差異。當  $p < 0.05$  表示具有顯著性差異。

## 結果與討論

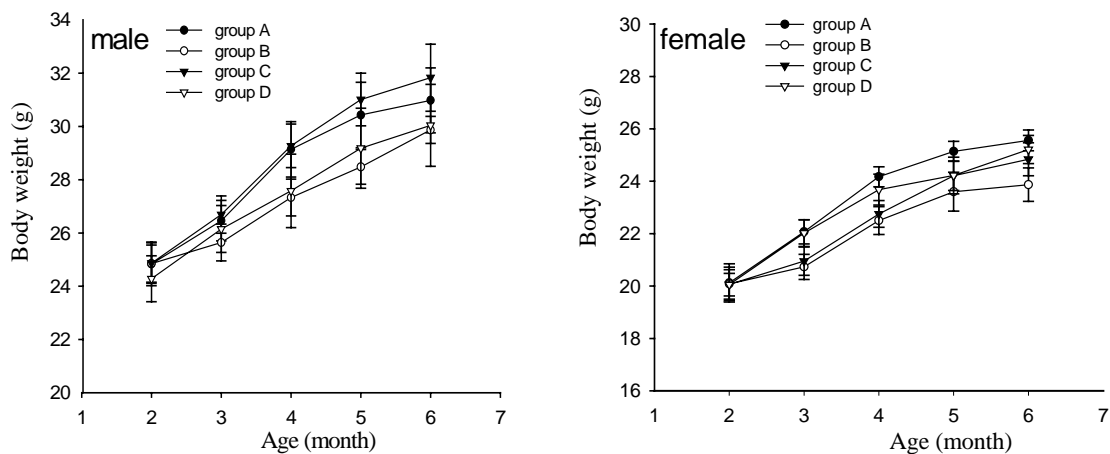
### 一、白朮之萃取產率

白朮乾燥切片以水 + 95%酒精 (1:1) 之溶劑比例萃取，並經真空冷凍乾燥後所得之產率結果顯示：乾重 1800 g 的白朮切片，經由溶劑萃取濃縮後，得到 987.7 g 的白朮萃取產物，其產率為 54.9%。

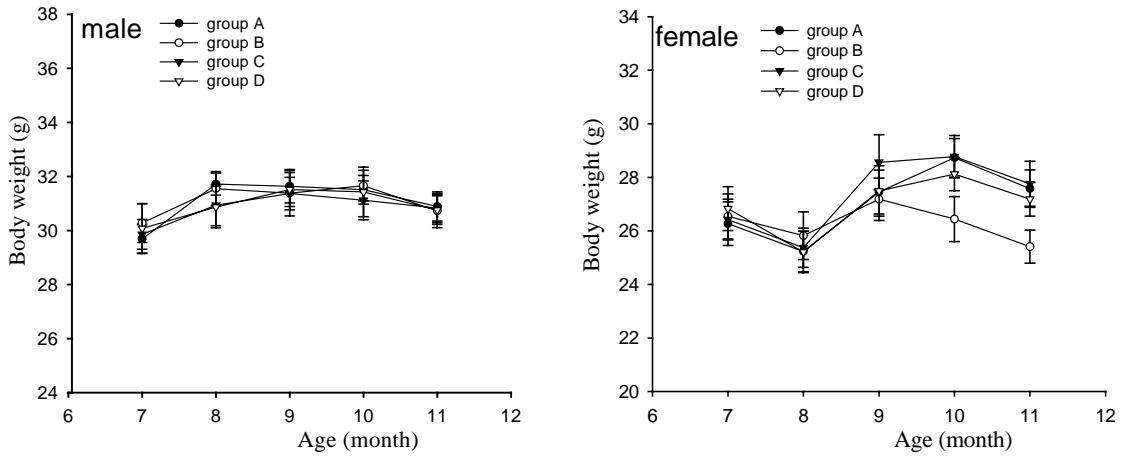
### 二、體重及攝食變化量

實驗期間，2 月齡及 7 月齡雄性與雌性 SAMP8 小白鼠，經飼食添加不同濃度白朮萃取物之實驗飼料 16 週後，四組間體重之變化情形，如圖 2、3 所示；攝食量變化情形，如圖 4、5 所示。

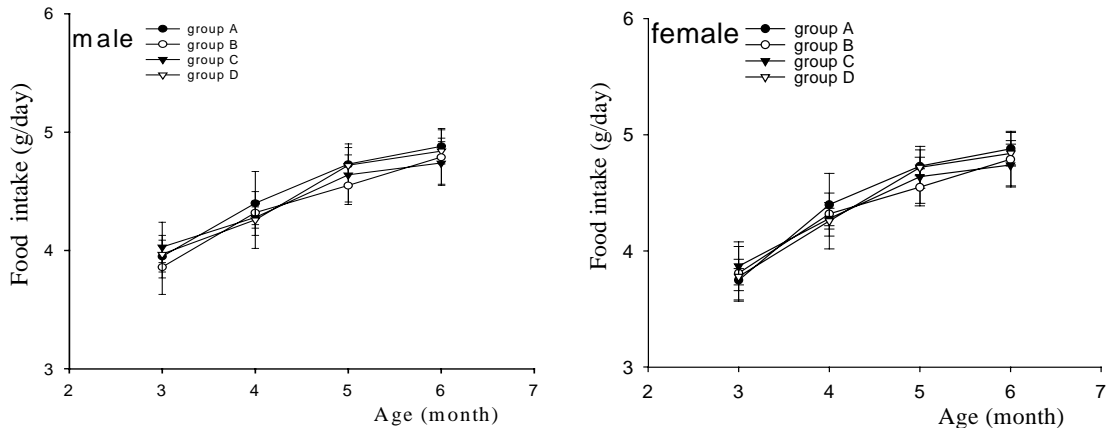
在 2 月齡組方面，無論是雄性或雌性小白鼠，隨著飼食時間的增加，四組體重均有隨之上升的現象，但各組間無顯著的差異。而在 7 月齡組方面，雌性小白鼠，體重會隨著飼食時間的增加而逐漸下降，但各組間亦無顯著的差異。無論 2 月齡或 7 月齡組雄性及雌性小白鼠，在實驗期間實驗組之攝食量的變化情形均與對照組無明顯差異；但是，7 月齡組小白鼠的攝食量較 2 月齡組隨年齡的增加而有減少的情形。



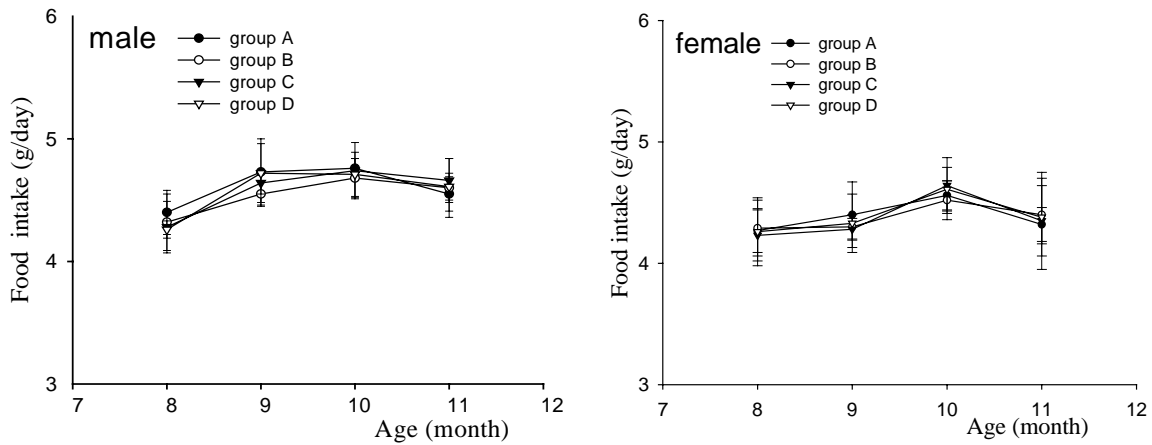
**Fig. 2. Comparisons of body weight change of 2 month-old SAMP8 mice**  
**A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %**  
**C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %**



**Fig. 3. Comparisons of body weight change of 7 month-old SAMP8 mice**  
**A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %**  
**C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %**



**Fig. 4. Comparisons of food intake of 2 month-old SAMP8 mice**  
**A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %**  
**C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %**



**Fig. 5. Comparisons of food intake of 7 month-old SAMP8 mice**  
**A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %**  
**C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %**

**Table 2. Comparisons of locomotion of 2 month-old SAMP8 mice after 16 weeks**

Male	N	Locomotor activity (counts/5 min)	
		0-5 min	6-10 min
A	10	106 ± 5	94 ± 3
B	10	105 ± 4	94 ± 5
C	10	107 ± 3	95 ± 4
D	10	107 ± 6	96 ± 5

Female	N	Locomotor activity (counts/5 min)	
		0-5 min	6-10 min
A	10	109 ± 5	94 ± 4
B	10	113 ± 6	94 ± 6
C	10	112 ± 5	96 ± 5
D	10	110 ± 4	96 ± 4

Values were expressed as mean ± S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA

Group A = Control

Group B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %

Group C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %

Group D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %

**Table 3. Comparisons of locomotion of 7 month-old SAMP8 mice after 16 weeks**

Male	N	Locomotor activity (counts/5 min)	
		0-5 min	6-10 min
A	10	94 ± 4	83 ± 6
B	10	96 ± 7	84 ± 4
C	10	97 ± 4	85 ± 5
D	10	100 ± 5	86 ± 4

Female	N	Locomotor activity (counts/5 min)	
		0-5 min	6-10 min
A	10	94 ± 6	81 ± 7
B	10	96 ± 6	85 ± 5
C	10	101 ± 4	86 ± 6
D	10	102 ± 8	90 ± 7

Values were expressed as mean ± S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA

A = Control

B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %

C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %

D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %

### 三、活動量

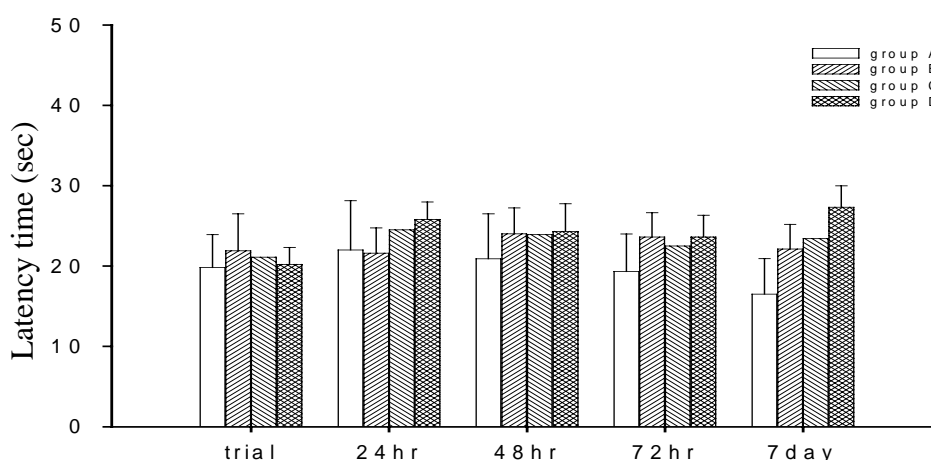
2 月齡及 7 月齡 SAMP8 小白鼠經餵食添加不同濃度白朮萃取物之實驗飼料後，各組小白鼠平面步移之活動量情形，如表 2、3 所示。由結果得知，四組間無論是 2 月齡及 7 月齡之雄性或雌性小白鼠，其 0-5 分



鐘及 6-10 分鐘平面步移情形皆無達統計上差異，且不同月齡間亦無顯著差異。但是，在 0-5 分鐘及 6-10 分鐘的活動情形比較之下，發現 6-10 分鐘之活動量表現較 0-5 分鐘低，其推測原因可能是小白鼠在同一環境下一段時間後，對環境適應力增強，便導致活動量低下的情形，可能會影響往後學習記憶能力試驗的結果。因此，往後本實驗學習記憶能力測試均在 5 分鐘之內完成。

#### 四、學習記憶能力

本實驗分別以單次被動迴避試驗及主動迴避試驗方法，測定 2 月齡組及 7 月齡組 SAMP8 小白鼠之學習

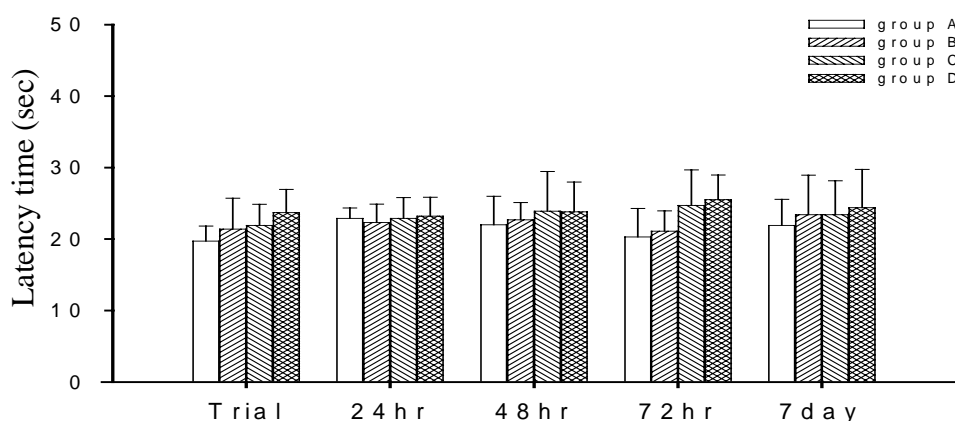


**Fig. 6. Comparisons of latency time of 2 month-old male SAMP8 mice after 16 weeks by single-trial passive avoidance test**

**A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %**

**C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %**

**Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA**



**Fig. 7. Comparisons of latency time of 2 month-old female SAMP8 mice after 16 weeks by single-trial passive avoidance test**

**A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %**

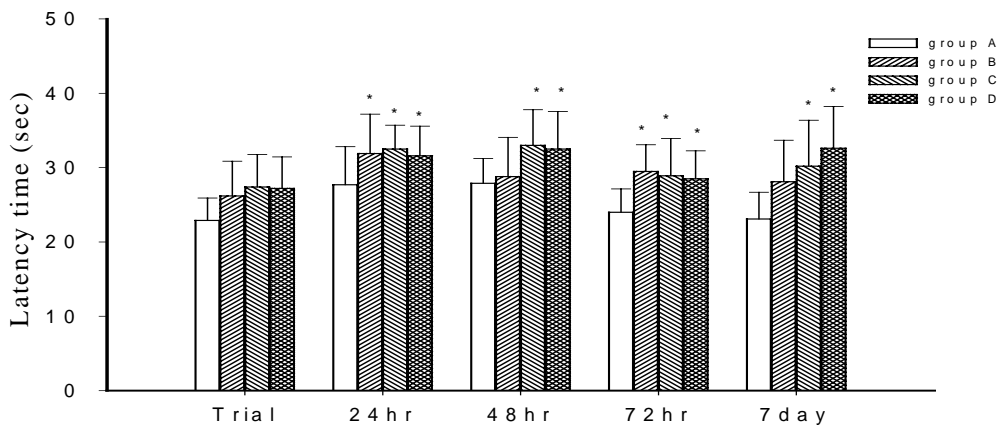
**C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %**

**Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA**

與記憶能力。單次被動迴避試驗是以小白鼠滯留在明室的時間為依據，而主動迴避試驗是以小白鼠迴避的反應次數多寡，來判斷添加不同濃度之白朮萃取物對小白鼠學習記憶之改善程度。

(一)單次被動迴避試驗

2月齡組之雄性及雌性 SAMP8 小白鼠餵食實驗飼料 16 週後，經被動迴避試驗測試後，其滯留在明室的時間，如圖 6、7 所示，當滯留的時間愈長，表示學習記憶能力愈佳。結果發現，四組間無論是雄性或雌性小白鼠，在學習訓練後第 24、48、72 小時及第 7 天時，停留在明室的時間均無顯著性的差異。而 7 月齡組方面，餵食實驗飼料 16 週後，經被動迴避試驗測試後，其滯留在明室的時間，如圖 8、9 所示。結果發現，在雄性小白鼠方面，給予添加不同濃度白朮萃取物之實驗組，其於明室滯留的時間均高於對照組，而且有隨



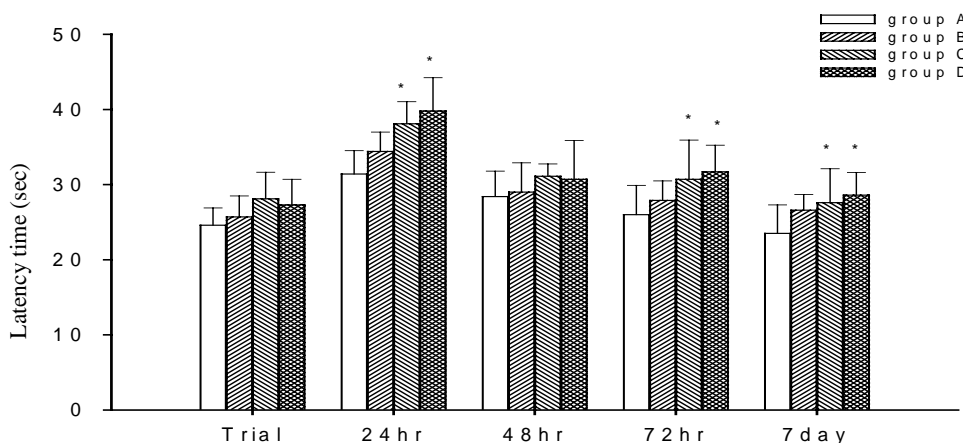
**Fig. 8. Comparisons of latency time of 7 month-old male SAMP8 mice after 16 weeks by single-trial passive avoidance test**

**A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %**

**C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %**

**Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA**

**\* $p < 0.05$ , as compared with the corresponding group A**



**Fig. 9. Comparisons of latency time of 7 month-old female SAMP8 mice after 16 weeks by single-trial passive avoidance test**

**A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %**

**C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %**

**Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA**

**\* $p < 0.05$ , as compared with the corresponding group A**

著添加的濃度越高，小白鼠的學習記憶能力有呈現越佳的狀態，達統計上差異 ( $p < 0.05$ )。在雌性小白鼠方面，給予添加白朮萃取物 0.5 % 及 1.0 % 之兩組實驗組小白鼠，經學習訓練後第 24、72 小時及第 7 天的明室滯留時間均較對照組高，且達統計上差異 ( $p < 0.05$ )。

經單次被動迴避試驗的結果發現，給予添加白朮萃取物之實驗飼料，對 2 月齡組小白鼠而言，並無顯著增進學習記憶能力的效果；但對 7 月齡組小白鼠卻有改善學習記憶能力的表現。

(二)主動迴避試驗

2 月齡 SAMP8 雄性及雌性小白鼠，餵食添加不同濃度白朮萃取物之實驗飼料 16 週後，經主動迴避試驗之測試後，其迴避反應顯示如圖 10、11 所示，當迴避反應的次數愈多，表示學習記憶能力愈佳。在雄性

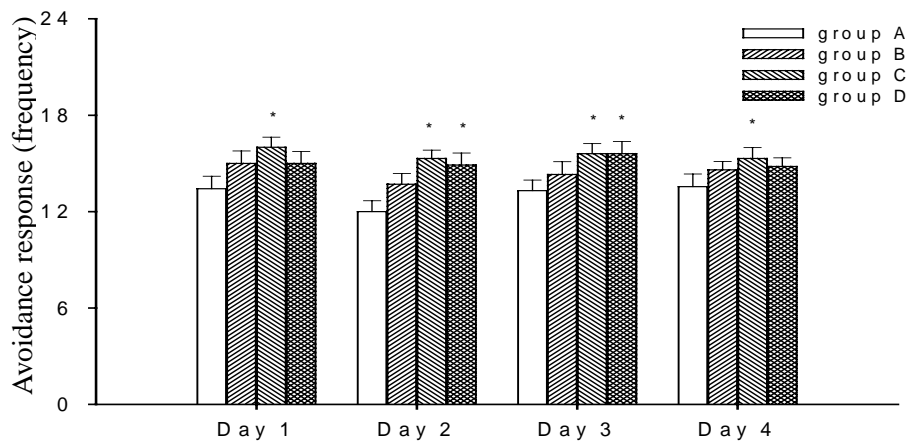


Fig. 10. Comparisons of latency time of 2 month old male SAMP8 mice after 16 weeks by active shuttle avoidance test

A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %

C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %

Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA \* $p < 0.05$ , as compared with the corresponding group A

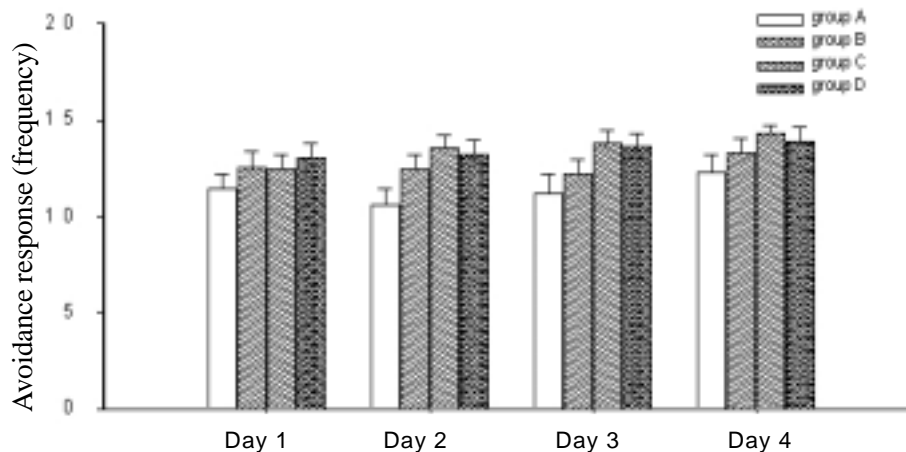


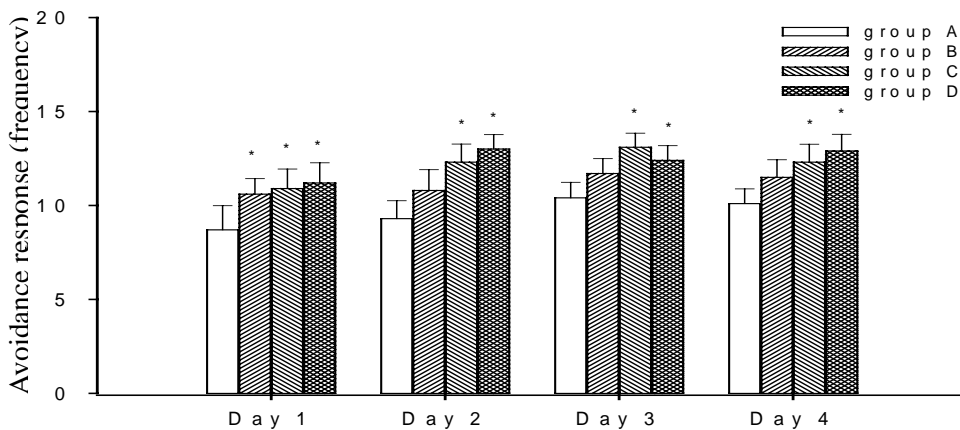
Fig. 11. Comparisons of latency time of 2 month-old female SAMP8 mice after 16 weeks by active shuttle avoidance test

A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %

C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %

小白鼠方面，實驗進行第一天，添加 0.5 % 白朮萃取物之實驗組，其迴避反應的次數高於對照組；而第二天及第三天，添加 0.5 % 及 1.0 % 白朮萃取物之實驗組，其迴避反應的次數也顯高於對照組，且達統計上之差異 ( $p < 0.05$ )。在雌性小白鼠方面，實驗進行的第一天及第四天，添加 0.25 %、0.5 % 及 1.0 % 白朮萃取物之三組實驗組，其迴避反應的次數皆高於對照組，其迴避反應的次數皆高於對照組，由以上結果得知，給予 2 月齡小白鼠不同濃度的白朮萃取物後，經主動迴避試驗之測試，發現有提升學習記憶能力之效果。

7 月齡 SAMP8 雄性及雌性小白鼠，餵食添加不同濃度白朮萃取物之實驗飼料 16 週後，經主動迴避試驗之測試後，其迴避反應顯示如圖 12、13 所示。結果顯示，無論是雄性或雌性小白鼠，在實驗進行的第一

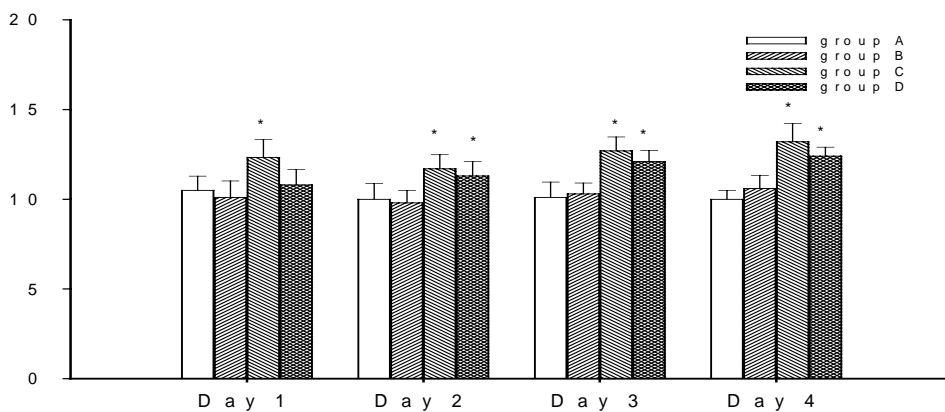


**Fig. 12.** Comparisons of latency time of 7 month-old male SAMP8 mice after 16 weeks by active shuttle avoidance test

A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %

C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %

Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA \* $p < 0.05$ , as compared with the corresponding group A



**Fig. 13.** Comparisons of latency time of 7 month-old female SAMP8 mice after 16 weeks by active shuttle avoidance test

A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %

C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %

Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA \* $p < 0.05$ , as compared with the corresponding group A

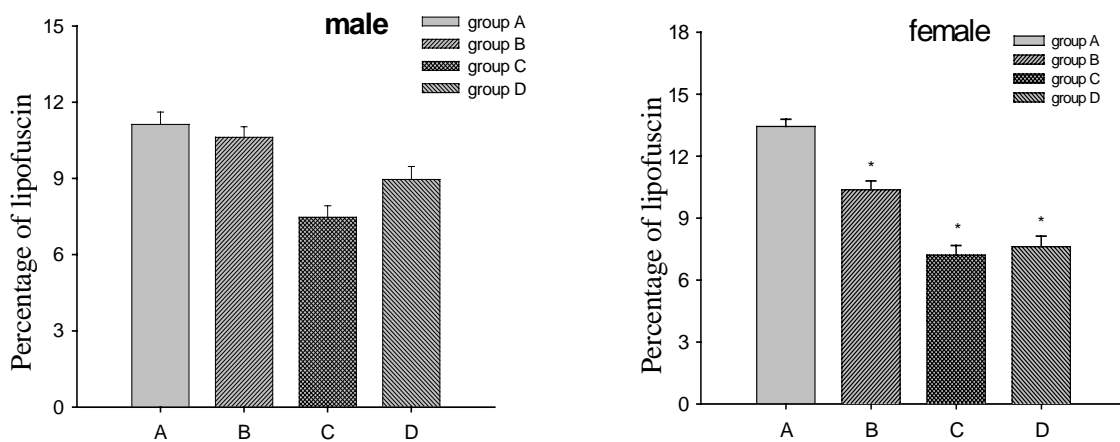
天到第四天，皆以添加 0.5 % 及 1.0 % 白朮萃取物之實驗組的迴避反應次數顯高於對照組，且達統計上之差異 ( $p < 0.05$ )

綜合以上兩種不同形式的學習記憶能力測試方法，得知飼料中以添加 0.5 % 及 1.0 % 白朮萃取物，對於 2 月齡及 7 月齡 SAMP8 系小白鼠，有較佳的改善學習記憶能力的效果。

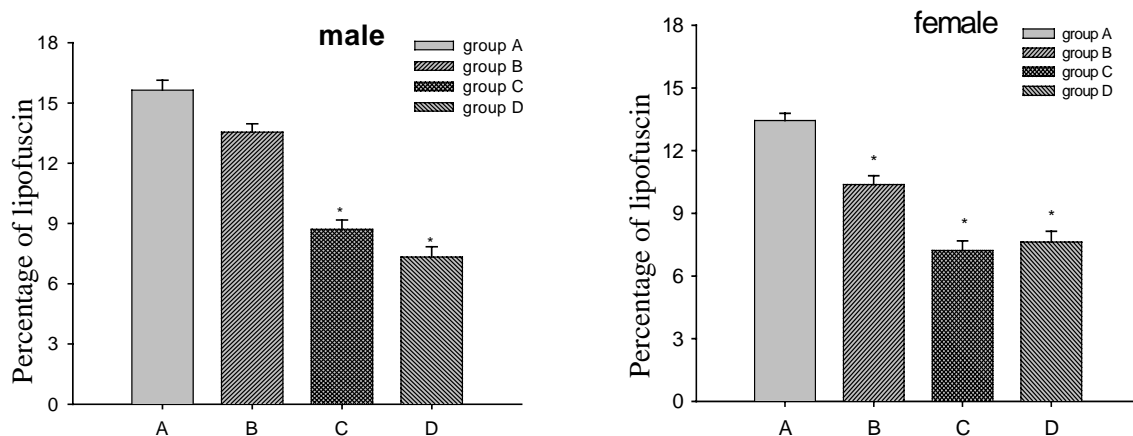
## 五、腦部病理組織變化

### (一)腦中脂褐質百分比

在顯微鏡倍率 200 倍之下，觀察 2 月齡及 7 月齡 SAMP8 小白鼠經餵食添加不同濃度之白朮萃取物飼料



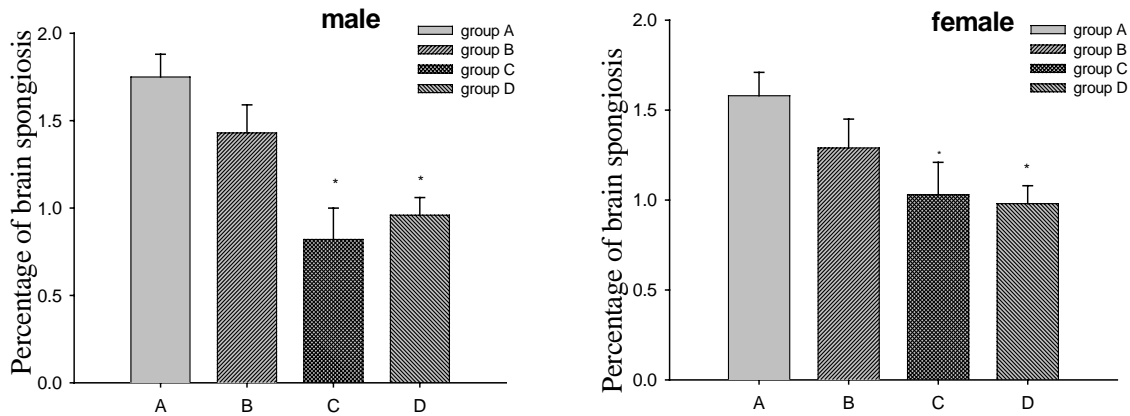
**Fig. 14. Comparisons of percentage of lipofuscin of 2 month-old SAMP8 mice after 16 weeks**  
**A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %**  
**C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %**  
**Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA**  
**\* $p < 0.05$ , as compared with the corresponding group A**  
**Lipofuscin (%) = number of positive lipofuscin / number of total nerve cells  $\times$  100**



**Fig. 15. Comparisons of percentage of lipofuscin of 7 month-old SAMP8 mice after 16 weeks**  
**A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %**  
**C = *Atractylodes macrocephala* 0.5; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %**  
**Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA**  
**\* $p < 0.05$ , as compared with the corresponding group A**  
**Lipofuscin (%) = number of positive lipofuscin / number of total nerve cell  $\times$  100**

16 週後，腦部切片中海馬迴區的所有細胞數目及脂褐質數目，以計算此區域所含脂褐質的細胞百分比，結果如圖 14、15 所示。

在 2 月齡組方面，無論是雄性或雌性小白鼠，經餵食 16 週後，發現腦中海馬迴區所含脂褐質百分比皆有低於對照組的情形，其中以添加白朮萃取物 0.5 % 及 1.0 % 之實驗組，達統計上之差異 ( $p < 0.05$ )。在 7 月齡組方面，結果亦發現無論是雄性或雌性小白鼠，經餵食 16 週後，腦中海馬迴區所含脂褐質百分比皆低於對照組。在雄性小白鼠中，以添加白朮萃取物 0.5 % 及 1.0 % 之兩組實驗組，達統計上之差異 ( $p < 0.05$ )；而雌性小白鼠方面，添加白朮萃取物 0.25 %、0.5 % 及 1.0 % 三組實驗組，均與對照組有顯著差異，達統計上之差異 ( $p < 0.05$ )。



**Fig. 16. Comparisons of spongy degeneration of 2 month-old SAMP8 mice after 16 weeks**

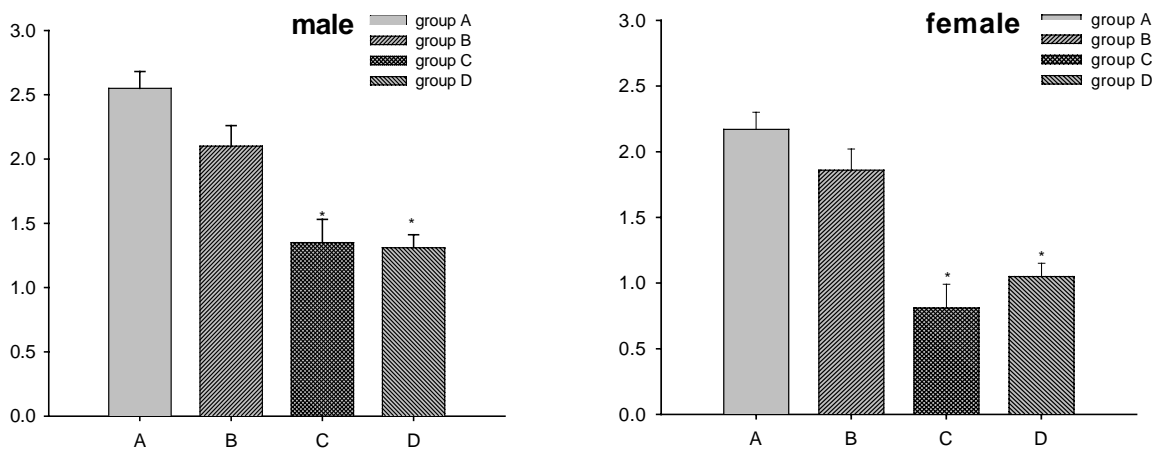
A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %

C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %

Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA

\* $p < 0.05$ , as compared with the corresponding group A

Assessment standard in 100X photomicroscopy: areas of brain spongiosis/areas of total file  $\times 100$



**Fig. 17. Comparisons of spongy degeneration of 7 month-old SAMP8 mice after 16 weeks**

A = Control; B = *Atractylodes macrocephala* 0.25 %

C = *Atractylodes macrocephala* 0.5 %; D = *Atractylodes macrocephala* 1.0 %

Values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and analyzed by one-way ANOVA

\* $p < 0.05$ , as compared with the corresponding group A

Assessment standard in 100X photomicroscopy : areas of brain spongiosis/areas of total file  $\times 100$

## (二)腦部海綿變性

2 月齡及 7 月齡 SAMP8 小白鼠經餵食添加不同濃度之白朮萃取物飼料 16 週後，腦部海馬迴區空泡數目變化情形如圖 16、17 所示。結果顯示，2 月齡組雄性小白鼠，以添加白朮萃取物 0.5 % 及 1.0 % 之兩組實驗組，其腦部海馬迴區之空泡數目，有顯著少於對照組，且達統計上之差異 ( $p < 0.05$ )；而雌性小白鼠方面，則以添加白朮萃取物 1.0 % 之實驗組與對照組達統計上之差異 ( $p < 0.05$ )。7 月齡方面，無論是雄性或雌性小白鼠，給予添有白朮萃取物 0.5 % 及 1.0 % 之兩組實驗組，其腦部海馬迴區之空泡數目，皆有顯著低於對照組，且達統計上之差異 ( $p < 0.05$ )。

Kawamate 教授等<sup>16</sup>之研究發現，SAMP8 小白鼠的腦部最早會出現的病理特徵為海綿樣變性及空泡數目，這些病理特徵皆會隨年齡增加而增多，同時會影響學習記憶能力的表現。因此，學習記憶表現較差的小白鼠，其腦中空泡化的區域及數目均相對增多。

## 結 論

由以上之實驗結果顯示，飼料中長期添加白朮萃取物，對於 SAMP8 小白鼠的學習記憶能力有增強之作用，且腦部海馬迴區脂褐質含量及空泡數目，相對於未添加白朮萃取物之對照組逐漸減少，均有顯著的改善效果。由三組實驗組所添加的白朮萃取物之濃度來看，以添加 0.5 % 及 1.0 % 白朮萃取物之兩組實驗組，在實驗的結果中有較佳的改善效果，其效果也較另一組實驗組（添加 0.25 % 白朮）顯著。

我們已經證實白朮萃取物對於學習記憶有改善之效果，相關的研究仍持續進行中，期望能更進一步了解白朮與其所含成分對學習記憶能力影響的可能作用機轉。

## 誌 謝

本研究蒙 行政院國科會經費補助 (NSC89-2314-B126-001)，中國醫藥學院技正邱年永先生鑑定藥材，中興大學獸醫病理學研究所林正忠老師於腦部組織病理切片之指導與協助，日本京都大學結核胸部病患研究所提供老化促進小白鼠實驗動物於本研究室繁殖飼育，特此一併誌謝。

## 參考文獻

1. 行政院內政部統計處：89 年專題分析研究報告—老年人口主要指標分析，2000。
2. 行政院經濟建設委員會：新世紀人力發展方案，2001。
3. 劉秀枝，世紀的悲哀 — 癡呆症（失智症），臨床醫學，23：1-5，1989。
4. Le Bars PL, Katz MM, Berman N, Itil TM, Freedman AM, Schatzberg AF, Brazin M, Ferguson J, Freedman AM, Jordan B, Mendels J, Schatzberg AF. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of *Ginkgo biloba* for dementia. J. Am. Med. Assoc. 278: 1327-1332, 1997.
5. 謝明村，六味地黃丸增加學習記憶能力之藥理學研究，行政院衛生署中醫藥年報，18：399-430，2000。

6. 樓之岑、秦波，常用中藥材品種整理和質量研究，第 3 冊，中國協和醫科大學聯合出版社，北京，pp. 780-808，1995。
7. 王銘富、陳永裕、賴貞秀、黃克峰，枸杞子對老化促進小白鼠學習記憶能力影響之研究，中醫藥雜誌，13：171-189，2002。
8. Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Itino M, Higuchi K, Matsushita T, Yomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M, Yamamuro T. A new murine model of accelerated senescence, *Mech. Ageing Der.*, 17: 183-194, 1981.
9. Miyamoto M, Kiyoto Y, Yamazaki M, Nagaoka A, Matsuo T, Nagawa Y, Takeda T. Age-related changes in learning and memory in the Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Physiol. Behav.*, 38: 399-406, 1986.
10. Yagi H, Katoh S, Akiguchi I, Takeda T. Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence accelerated mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory. *Brain Res.*, 474: 86-93, 1988.
11. Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM): A novel murine model of accelerated senescence. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 39: 911-919, 1991.
12. Kawamata T, Akiguchi I, Yagi H, Irino M, Sugiyama H, Akiyama H, Shimada A, Takemura M, Ueno M, Kitabayashi T, Ohnishi K, Seriu N, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Neuropathological studies on strain of senescence- Accelerated mouse (SAM) with age-related deficits in learning and memory. *Exp. Gerontol.* 32: 161-169, 1997.
13. Flood JF, Morley JE. Learning and Memory in the SAMP8 Mouse. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22: 1-20, 1998.
14. Okuma Y, Nomura Y. Senescence-accelerated mouse (SAM) as an animal model of senile dementia: pharmacological, neurochemical and molecular biological approach. *Japanese Journal of Pharmacology.* 78: 399-404, 1998.
15. Wei X, Zhang Y, Zhou J. Alzheimer's disease-related gene expression in the brain of senescence accelerated mouse. *Neurosci. Lett.* 268: 139-142, 1999.
16. Kawamate T, Akiguchi I, Yagi H, Irino M, Sugiyama H, Akiyama H, Shimada A, Takemura M, Veno M, Kitabayashi T, Ohnishi K, Seriu N, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Neuropathological studies on strain of senescence accelerated mice (SAM) with age-related deficits in learning and memory. *Exp. Gerontol.* 32: 161-169, 1997.



## EFFECT OF ATRACTYLODIS RHIZOMA ON LEARNING AND MEMORY ABILITY IN SENESCENCE-ACCELERATED MICE

Ming-Fu Wang<sup>1</sup>, Yih-Jye Du<sup>2</sup>, Jeng-Shiow Lai<sup>3</sup> and Keh-Feng Huang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Food and Nutrition, <sup>2</sup>Institute of Applied Chemistry,*

<sup>3</sup>*Department of Cosmetic Science, Providence University,*

*Taichung, Taiwan*

*(Received 1<sup>st</sup> August 2003, revised Ms received 4<sup>th</sup> September 2003, accepted 20<sup>th</sup> October 2003 )*

Baizhu, *Rhizoma Atractylodis macrocephalae*, is the dry rootstock of *Atractylodes macrocephala* Koidz (Asteraceae). It is listed officially in the Chinese pharmacopoeia and is recommended in traditional Chinese medicine as a digestive, diuretic and antihifrotic. In this project, we attempt to investigate the effect of Baizhu on learning and memory in two-month-old and seven-month-old senescence acceleration mice (SAM-P8) for 16 weeks. The locomotion, single-trial passive avoidance test and active shuttle avoidance test will be conducted and variation of brain histopathology will be observed. By the way, we obtained significant results of Baizhu extracts in senescence-accelerated mice. The effect doses are 2.5, 5.0 and 10.0 g/Kg diet/day on seven-month-old senescence-accelerated mice for 16 weeks with single-trial passive avoidance test ( $p < 0.05$ ). The effective doses are 5.0 and 10.0 g/Kg diet/day on two-month-old and seven-month-old senescence-accelerated mice for 16 weeks with active shuttle avoidance test ( $p < 0.05$ ). The study of brain histopathology on seven-month-old senescence-accelerated mice also showed the significant results ( $p < 0.05$ ). The result could be confirmed the potential of as a cognition enhancing agent.

**Keywords:** Baizhu (*Rhizoma Atractylodis macrocephalae*), Senescence-accelerated mice (SAM-P8), Learning and memory.