

## 三、辅助改善记忆检验方法

### 1 动物实验

#### 1.1 跳台实验

##### 1.1.1 原理

反应箱底铺有通 36v 电的铜栅，动物受到电击，其正常反应是跳上箱内绝缘的平台以避免伤害性刺激。多数动物可能再次或多次跳至铜栅上，受到电击又迅速跳回平台，如此训练 5min，并记录每鼠受到电击的次数或叫错误次数，以此作为学习成绩。24h 或 48h 重作测验，此即记忆保持测验。记录受电击的动物数、第一次跳下平台的潜伏期和 3min 内的错误总数。停止训练 5 天后（也可以在训练后的一周、两周或其它时间点）进行记忆消退实验。

##### 1.1.2 仪器与试剂

跳台仪：该装置为  $10 \times 10 \times 60 \text{cm}^3$  的被动回避条件反射箱，用黑色塑料板分隔成 5 间。底面铺以铜栅，间距为 0.5cm，可以通电，电压强度由一变压器控制。每间左后角置一高和直径均为 4.5cm 的绝缘平台。

试剂：樟柳碱、东莨菪碱、环己酰亚胺、乙醇。

##### 1.1.3 实验方法

1.1.3.1 实验动物 推荐使用近交系小鼠。断乳鼠或成年鼠（18—22g）。用于改善老年人记忆的产品必须采用成年鼠。雌雄均可，单一性别，每组 10—15 只。

##### 1.1.3.2 剂量分组及受试样品给予时间

实验设三个剂量组和一个阴性对照组，以人体推荐量的 10 倍为其中的一个剂量组，另设二个剂量组，必要时设阳性对照组。受试样品给予时间 30 天，必要时可延长至 45 天。

##### 1.1.3.3 实验方法及步骤

###### 1.1.3.3.1 受试样品对正常小鼠记忆的影响

末次给样后次日（或一次给样后 1h）开始训练。将动物放入反应箱内（台上、台下）适应环境 3min，然后将动物放置反应箱内的铜栅上，立即通以 36v 的交流电。动物受到电击，其正常反应是跳回平台（绝缘体），以躲避伤害性刺激。多数动物可能再次或多次跳至铜栅上，受到电击又迅速跳回平台上。训练一次后，将动物放在反应箱内的平台上，记录 5min 内各鼠跳下平台的错误次数和第一次跳下平台的潜伏期，以此作为学习成绩。24 或 48h 后进行重测验，将小鼠放在平台上，记录各鼠第一次跳下平台的潜伏期、各鼠 3min 内电击次数和受电击的动物数总数，同时计算出出现错误反应的动物的百分率（受电击的动物数占该组动物总数的百分率）。停止训练 5 天后（包括第 5 天）可以在不同的时间进行一次或多次记忆消退实验（方法同重测验）。

###### 1.1.3.3.2 受试样品对记忆障碍模型小鼠的影响

###### 1.1.3.3.2.1 造模

记忆获得障碍模型制造：训练前 10min 腹腔注射樟柳碱或东莨菪碱 5mg/kg BW；

记忆巩固障碍模型制造：训练前 10min 腹腔注射环己酰亚胺 120mg/kg BW；

记忆再现障碍模型制造：重测验前 30min 灌胃 30%的乙醇 10mL/kg BW。

1.1.3.3.2.2 记忆测试的操作方法：同 1.1.3.3.1。

#### 1.1.4 数据处理及结果判定

潜伏期结果为计量资料，可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算  $F$  值， $F$  值  $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； $F$  值  $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

错误次数和 3min 内跳下平台的动物数均为记数资料，可用  $\chi^2$  检验，四格表总例数小于 40，或总例数等于或大于 40 但出现理论数等于或小于 1 时，应改用确切概率法。

若受试样品组与对照组比较，潜伏期明显延长，错误次数或跳下平台的动物数明显少于对照组，差异有显著性，以上三项指标中，任一项指标阳性，均可判定该项实验阳性。

#### 1.1.5 注意事项

1.1.5.1 动物在 24h 内有其活动周期，不同时相处于不同的觉醒水平，故每次实验应选择同一时相（上午 8—12 点或下午 1—4 点）。

1.1.5.2 实验应在隔音，光强度和温、湿度适宜且保持一致的行为实验室进行。

1.1.5.3 推荐使用纯系动物，实验前数天将动物移至实验室以适应周围环境。

1.1.5.4 实验者必须每天与动物接触，如：喂水、喂食和抚摸动物。

1.1.5.5 减少非特异性干扰，如：情绪、注意、动机、觉醒、运动活动水平、应激和内分泌等因素。

1.1.5.6 考虑动物种属差异。

## 1.2 避暗法

### 1.2.1 原理

利用小鼠嗜暗的习性设计一个装置，一半是暗室，一半是明室，中间有一小洞相连。暗室底部铺有通电的铜栅，并与一计时器相连，计时器可自动记录潜伏期的时间。小鼠进入暗室即受到电击，计时自动停止。

### 1.2.2 仪器和试剂

避暗仪：该装置分明暗两室。明室大小为  $12\text{cm} \times 4.5\text{cm}$ ，其上方约 20cm 处悬一 40w 钨灯丝。暗室较大，大小为  $17\text{cm} \times 4.5\text{cm}$ ，两室之间有一直径约 3cm 的圆洞。两室底部均铺以铜栅。暗室底部中间位置的铜栅可以通电，电击强度可在一旋钮上任意选择。一般采用 40v 电压。暗室与一计时器相连，计时器可自动记录潜伏期的时间。

试剂：樟柳碱、东莨菪碱、环己酰亚胺、乙醇。

### 1.2.3 实验方法

1.2.3.1 实验动物 同 1.1.3.1

1.2.3.2 剂量设计和分组 同 1.1.3.2

1.2.3.3 实验方法及步骤

1.2.3.3.1 受试样品对正常小鼠记忆的影响

末次给样后次日（或一次给样后 1h）开始训练。实验时将小鼠面部背向洞口放入明室，同时启动计时器。动物穿过洞口进入暗室受到电击，计时器自动停止，取出小鼠，记录每鼠从放入明室至进入暗室遭电击所需的时间，此即潜伏期，训练 5min，并记录 5min 内电击次数。24h 或 48h 后重作测验，记录每只动物进入暗

室的潜伏期和 5min 内的电击次数，并计算 5min 内进入暗室（错误反应）的动物百分率。停止训练 5 天后可以在不同的时间进行一次或多次记忆消退实验。

1.2.3.3.2 受试样品对记忆障碍模型小鼠的影响：

1.2.3.3.2.1 模型制造：方法同 1.1.3.3.2.1

1.2.3.3.2.2 操作方法：同 1.2.3.3.1

1.2.4 数据处理及结果判定

潜伏期时间为计量资料，可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算  $F$  值， $F$  值  $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； $F$  值  $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

5min 内进入暗室的次数和 5min 内进入暗室的动物数均为计数资料，可用  $\chi^2$  检验，四格表总例数小于 40，或总例数等于或大于 40 但出现理论数等于或小于 1 时，应改用确切概率法。

若受试样品组小鼠进入暗室的潜伏期明显长于对照组，5min 内进入暗室的错误次数或 5min 内进入暗室的动物数少于对照组，且差异有显著性，以上三项指标中任一项指标阳性，均可判定该项实验阳性。

1.2.5 注意事项：同 1.1.5

### 1.3 穿梭箱实验（双向回避实验）

1.3.1 原理：条件反射

1.3.2 仪器与试剂

仪器：大鼠穿梭箱。该装置由实验箱和自动记录打印装置组成。实验箱大小为 50cm×16cm×18cm。箱底部格栅为可以通电的不锈钢棒，箱底中央部有一高 1.2cm 挡板，将箱底部分隔成左右两侧。实验箱顶部有光源和蜂鸣音控制器，自动记录打印装置可连续自动记录动物对电刺激（灯光或/和蜂鸣器）的反应和潜伏期，并将结果打印出来。

试剂：樟柳碱，东莨菪碱，环己酰亚胺，乙醇

1.3.3 实验方法

1.3.3.1 实验动物 Wistar 或 SD 大鼠，断乳鼠或成年鼠，雄、雌均可。

1.3.3.2 剂量设计和分组 同 1.1.3.2。

1.3.3.3 实验方法及步骤

1.3.3.3.1 受试样品对正常大鼠条件反射建立的影响

末次给样后次日（或一次给样后 1h）开始训练。将大鼠放入箱内任何一侧，20s 后开始呈现灯光或蜂鸣音，持续 20s，后 10s 内同时给以电刺激（100V，0.2mA，50Hz，AC）。大鼠在遭电击后即逃避，必须跑到对侧顶端，挡住光电管后才可中断电击，此为被动回避反应，在每次电击前给予条件刺激，反复强化后，大鼠在接受条件刺激后即跳向对侧并挡住光电管而逃避电击，此为主动回避反应，每隔天训练一回，每回 50 次，连续训练 4—5 回后，动物的主动回避反应率可达 80—90%以上。根据打印结果分析如下指标：动物反应次数，动物主动回避时间，动物被动回避时间，动物主动回避率。停止训练 5—50 天内，分 2—3 次测定其记忆消退情况。

1.3.3.3.2 受试样品对记忆障碍模型大鼠条件反射建立的影响

1.3.3.3.2.1 模型制造：同 1.1.3.3.2.1

1.3.3.3.2.2 操作方法：同 1.3.3.3.1。

#### 1.3.4 数据处理及结果判定

动物主动回避时间和被动回避时间为计量资料，可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算  $F$  值， $F$  值  $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； $F$  值  $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

若实验组主动和/或被动回避时间明显短于对照组，差异有显著性，可判定为该指标阳性。

1.3.5 注意事项 同 1.1.5。

### 1.4 水迷宫实验

#### 1.4.1 原理

动物都有一种“探索”和“更替”倾向，当离开一个臂时，总是跑向“久”未跑过的“新”臂。小鼠不愿在水中，因而寻找能爬出水面的阶梯，训练后，小鼠能记住找到阶梯的路线。

#### 1.4.2 仪器与试剂

水迷宫自动记录仪。该仪器是由迷宫游泳箱和自动记录仪两部分组成。迷宫游泳箱由聚乙烯塑料制成，长 100cm、宽 100cm、高 30cm；内径长 90cm、宽 90cm、高 30cm，泳道宽 12cm，泳道走向固定。见附图。

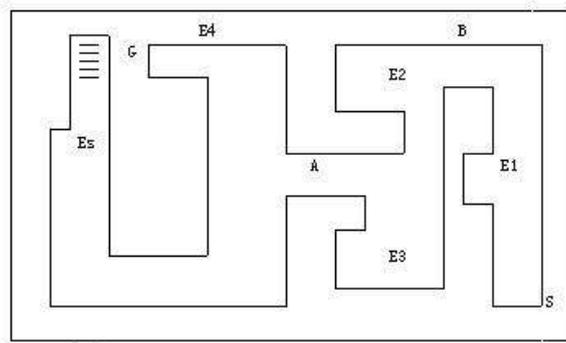
#### 1.4.3 实验方法

1.4.3.1 实验动物 推荐使用近交系小鼠，断乳鼠或成年鼠，单一性别，雌雄均可。

1.4.3.2 剂量设置、给样途径和期限 均同 1.1.3.2。

#### 1.4.3.3 实验方法

1.4.3.3.1 受试样品对正常小鼠记忆的影响



连续给样 30 天，末次给样次日开始训练。训练期间继续给样，每天一次。迷宫泳道水深 9cm，水温约 20℃（ $\leq 15^\circ\text{C}$ ）。将小鼠训练时间限定为 2min，在 2min 内未到达终点的小鼠均记为 2min。

第一次训练前将小鼠放在梯子附近，使其自动爬上 3 次。以后每次训练前将小鼠放在梯子附近，背朝楼梯，使其自动爬上 1 次。实验分阶段进行，视动物学习成绩逐步加长路程。第一次训练时用一挡板在 A 处档死，从 A 处开始训练，记录从 A 点到达终点的时间。第二次训练加长路程，从 B 处开始，此路程约训练 3

次，至动物数 80%以上在 2min 内达到终点后再延长路程，分别记录各鼠每次从 B 点到达终点所需的时间和发生错误的次数（进入任何一个盲端一次均算一次错误）。末次测试从起点进行，将小鼠放在起点，记录从起点到达终点所需的时间和发生错误的次数。每次训练时，对 2min 内未达到终点的小鼠，应引导其到达终点，从终点的楼梯上来，达到训练的目的。每次训练或测验时均将头朝起始点。最后计算各组动物 5 次训练和测试的总错误次数，到达终点的总时间及 2min 内到达终点的总动物数（百分率），停止训练 5 天后可在不同的时间从起点进行消退实验。

#### 1.4.3.3.2 受试样品对记忆障碍模型小鼠的影响

##### 1.4.3.3.2.1 模型制造方法:同 1.1.3.3.2.1

##### 1.4.3.3.2.2 操作方法:同 1.4.3.3.1。

#### 1.4.4 数据处理及结果判定

到达终点的时间属计量资料，可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算  $F$  值， $F$  值  $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性； $F$  值  $\geq F_{0.05}$ ， $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和一个对照组间均数的两两比较方法进行统计；对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计；若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

错误次数和到达终点的动物数（百分率）两指标为计数资料，可用  $\chi^2$  检验，四格表总例数小于 40，或总例数等于或大于 40 但出现理论数等于或小于 1 时，应改用确切概率法。

试验组与对照组比，试验组到达终点所用的时间或到达终点前的错误次数明显少于对照组，或 2min 内到达终点的动物数明显多于对照组，且经统计学检验差异有显著性。其中任一项指标为阳性，可判为该项实验阳性。

#### 1.4.5 注意事项

1.4.5.1 训练时在目标区（终点）停留的时间不能太短，否则失去强化效果。

1.4.5.2 每天训练结束后，要对实验箱进行清洗，以清除动物留下的气味。

1.4.5.3 实验前可对动物进行初筛，经训练后，2min 内仍不能游至终点者淘汰。

1.4.5.4 其余同 1.1.5。

记忆测试指标一览表

	测 试 项 目	评 价 指 标	所用仪器
被 动 回 避	跳台实验	被动回避时间、错误次数和动物出现错误反应百分率	跳台仪
	避暗实验	同上	避暗仪
主 动 回 避	单向回避实验	达标所需的训练次数	穿梭箱
	双向回避实验	回避时间和回避率	穿梭箱
迷 宫 试	水迷宫实验	到达安全台的时间和达标所需的训练次数、动物出现错误反应的动物百分率	水迷宫仪

## 1.5 结果判定

跳台实验、避暗实验、穿梭箱实验、水迷宫实验四项实验中任二项实验结果阳性。且重复实验结果一致（所重复的同一项实验两次结果均为阳性），可以判定该受试样品辅助改善记忆动物实验结果阳性。

## 2 人体试食试验

### 2.1 改善记忆的保健食品人体试食试验的一般原则

2.1.1 受试者应本着自觉自愿的原则。

2.1.2 应以保障受试者的健康为前提。

2.1.3 主试者必须经过必要的培训。

### 2.2 选择受试者的原则

2.2.1 从比较集中、各方面影响因素大致相同的群体中挑选受试者，比如学校、部队或其它群体。

2.2.2 文化程度基本一致。

2.2.3 属同一年龄组，如不在同一年龄组，则应对量表分进行校正。

2.2.4 未接受过类似测试。

2.2.5 排除短期内服用与受试功能有关的物品，影响到对结果的判断。

### 2.3 试验设计和分组

2.3.1 试验原则：对照、双盲、随机

2.3.2 对照：记忆测试是一种心理测试，易受迁移学习和心理暗示的影响，第二次测验的记忆商一般比第一次高，有时对照组前后两次测试的记忆商差异有显著性，因此，不能仅以服样前后自身比较的结果下结论，必须设置平行对照。

2.3.3 双盲：对照组必须服用安慰剂（不含有有效成分，但其剂型、色泽、外观、口感、包装等均与受试样品相同），以消除心理暗示的影响；主试者在施测时不知道谁服样品，谁服安慰剂，以消除主试者主观偏向的影响，保证测试结果客观可靠。

2.3.4 同一受试者前后两次测试由同一主试者进行。

2.3.5 施测顺序一般是先听觉测验后视觉测验。具体测验顺序是：（1）指向记忆，（2）联想学习，（3）无意义图形再认，（4）图象自由回忆，（5）人像特点联系回忆。

2.3.6 分组方法：服样前对受试者进行第一次记忆商测试后，然后按记忆商随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如文化水平、年龄等，进行均衡性检验，以保证组间可比性。每组受试者不少于50例。

2.3.7 受试样品的剂量和使用方法：试食组按样品的推荐剂量和方法服用受试样品，对照组服用安慰剂。受试样品给予时间30天，必要时可延长至45天。

### 2.4 观察指标

#### 2.4.1 安全性指标

2.4.1.1 一般状况 包括精神、睡眠、饮食、大小便、心率等（儿童只要求进行心肺听诊、肝脾触诊等一般体