

西红花苷-1 对急性低氧条件下大鼠学习记忆及海马 SIRT1 表达的影响

张晓岩¹, 喻静², 张先钧¹, 贾炜¹, 蒲小燕¹, 梁宏¹

1. 青海大学医学院 基础医学部, 青海 西宁 810001

2. 日本东京大学 医学系研究科, 日本 东京 113-8655

摘要:目的 研究西红花苷-1对急性低氧条件下大鼠学习记忆及海马区沉默信息调节因子1(SIRT1)表达的影响。方法 SD大鼠随即分为5组:对照组,低氧模型组,西红花苷-1低、中、高剂量(25、50、100 mg/kg)组。西红花苷-1各组每天im给药1次,给药3 d后低氧环境下刺激72 h,采用Morris水迷宫观察大鼠的学习记忆行为,免疫组化法与Western blotting法检测大鼠海马SIRT1蛋白表达。结果 与低氧模型组相比,西红花苷-1各剂量使Morris水迷宫实验中大鼠逃避潜伏期均明显缩短,且穿越平台次数增加($P < 0.05$)。免疫组化和Western blotting法检测显示,西红花苷-1各组大鼠海马组织SIRT1蛋白表达均显著高于低氧模型组($P < 0.05$),其中以中、高剂量组作用明显。结论 西红花苷-1预先给药,可增加急性低氧大鼠海马组织SIRT1蛋白表达,这可能是其改善低氧条件下大鼠学习记忆的机制之一。

关键词:西红花苷-1;急性低氧;学习记忆;海马;沉默信息调节因子1

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)10-1314-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.10.021

Effect of crocin-1 on learning, memory, and expression of SIRT1 in hippocampus of rats under acute hypoxia

ZHANG Xiao-yan¹, YU Jing², ZHANG Xian-jun¹, JIA Wei¹, PU Xiao-yan¹, LIANG Hong¹

1. Department of Basic Medicine, Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China

2. Department of Integrated Traditional Medicine Graduate School of Medicine, Tokyo 113-8655, Japan

Abstract: Objective To investigate the effect of crocin-1 on behavior of learning and memory in rats under acute hypoxia and on the expression of silent information regulator 1 (SIRT1) in hippocampus of rats. **Methods** SD rats were randomly divided into five groups: control, hypoxia model, low-, mid-, and high-dose (25, 50, and 100 mg/kg) crocin-1 groups. The SD rats in crocin-1 groups were im administered once daily for 3 d and then were stimulated for 72 h under hypoxia. Morris water maze was used to investigate the learning and memory behaviors. Immunohistochemical staining and Western blotting were used to detect the SIRT1 expression. **Results** The escape latency in crocin-1 groups was shorter than that in hypoxia model group, while the frequency of bestriding platform was increased ($P < 0.05$). Immunohistochemical staining and Western blotting both showed that the expression level of SIRT1 was higher in crocin-1 groups than that in hypoxia model group ($P < 0.05$), and the expression levels in mid- and high-dose groups were obviously higher. **Conclusion** Crocin-1 could increase the expression of SIRT1 in hippocampus of rats, which maybe one of the important mechanisms for crocin-1 improving learning and memory function of SD rats under acute hypoxia.

Key words: crocin-1; acute hypoxia; learning and memory; hippocampus; silent information regulator 1

针对高海拔低氧的特殊环境,机体的适应机制尤其是对缺血、缺氧敏感的脑海马组织的适应性对机体非常重要。西红花(又名藏红花)*Crocus sativus* L. 中主要有效成分西红花苷-1具有预防动脉粥样硬化、防治心血管疾病、抗氧化、治疗脑梗塞和神

经变性损坏等广泛的药理活性^[1-2]。沉默信息调节因子1(silent information regulator 1, SIRT1)是NAD⁺依赖的蛋白去乙酰化酶,在胚胎脑组织中的表达水平特别高,在成年大鼠脑皮质、海马和小脑中也有表达,其调节细胞的许多功能,如基因修复、抗调

收稿日期: 2013-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260685);教育部“春晖计划”合作项目(Z2010063)

作者简介: 张晓岩(1974—),男,北京通县人,副教授,研究方向为中藏药对高原低氧条件脑神经作用研究。

Tel: 13997187854 E-mail: zhxy6123949@163.com

亡、抗应激、代谢等^[3]。因此通过调节 SIRT1 的表达可以降低细胞损伤、抑制细胞凋亡、抗氧化。从天然药物和植物中开发 SIRT1 激动剂是值得关注的课题。本实验将西红花苷-1 预先给予大鼠, 观察其对低氧条件下大鼠学习和记忆能力的影响及对脑海马 SIRT1 的调控作用。

1 材料

1.1 药品与试剂

西红花苷-1, 成都普瑞科技有限公司, 批号 C110113, 质量分数 $\geq 97\%$; 兔抗大鼠 SIRT1 一抗, Santa Cruz Biotechnology 公司; 兔抗大鼠 SIRT1 二抗、辣根过氧化物酶显色试剂盒 (DAB), 北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 动物

雄性 SD 大鼠, 清洁级, 体质量 200~230 g, 购于青海省地方病防治研究所实验动物中心, 合格证号: SCXK (青) 2005-0001。

1.3 仪器

DMS-2 型 Morris 水迷宫视频跟踪分析系统, 中国医学科学院药物研究所; DYCZ-24DN 型双垂直电泳槽、DYCP-40E 型半干转移槽、DYY-7C 型电泳仪, 北京市六一仪器厂; 温控摇床, 美国 New Brunswick 公司; 化学发光型 Micro Chemi 凝胶成像系统, 以色列 DNR 公司。日本 Olympus BX51 显微镜。

2 方法

2.1 分组与给药

30 只 SD 大鼠称质量, 排序, 采用随机数字表将大鼠随机分为 5 组, 每组 6 只, 分别为低海拔 (2 260 m) 对照组, 低氧模型组 (海拔 4 000 m), 西红花苷-1 低、中、高剂量 (25、50、100 mg/kg) 组。在低氧刺激前 3 d 开始给药 (药物用量为人为药剂量的 3 倍), 每天 im 给药 1 次, 连续给药 3 d, 3 d 后将大鼠运至青海省达日县 (海拔 4 000 m) 进行低氧刺激。

2.2 Morris 水迷宫实验

大鼠于低氧刺激前 3 d 开始进行行为训练, 每天上午训练 3 次, 每次间隔 30 min。水迷宫为直径 160 cm、高 80 cm 的圆形水池, 水深 50 cm, 水温 20~24 °C, 站台高 25 cm, 直径 8 cm, 置于某一象限内的固定位置, 没入水下 2 cm, 迷宫外参照物保持固定。

2.2.1 定位航行实验 从站台所处象限外的其他 3

个象限中随机选择一个入水点, 将大鼠面向池壁放入池中, 观察并记录大鼠寻找并爬上平台的潜伏期。若 60 s 内找不到站台, 则将其放在站台上 15 s 后再放回笼中, 潜伏期记为 60 s。训练时分别从 3 个不同的入水点入水。每天测试大鼠 2 次, 每次间隔 15 min, 连续训练 3 d, 记录各组潜伏期。

2.2.2 空间探索实验 将池中站台撤除, 选定与站台区域相对的象限的中点为入水点, 记录大鼠在 2 min 内在站台所在象限探索的时间以及穿越平台区的次数, 以此评价大鼠的长时程空间记忆功能。

2.3 免疫组化法检测 SIRT1 蛋白表达

Morris 水迷宫实验完成后, 大鼠 ip 10%水合氯醛 (5 mL/kg) 麻醉, 断头处死, 快速取脑海马组织置于 4%多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 连续冠状切片 (3 μm), 切片常规脱蜡, 蒸馏水冲洗, PBS 冲洗 5 min, 共 3 次, 用枸橼酸盐缓冲液 (pH 6.0) 进行微波抗原修复, 于新配制的 0.3% H_2O_2 溶液中室温下孵育 10 min 以灭活内源性过氧化物酶; PBS 冲洗 5 min, 共 3 次, 分别滴加兔抗大鼠一抗 (1:100) 50 μL , 4 °C 孵育过夜, PBS 冲洗, 应用 SP 免疫组化检测试剂盒进行免疫组化染色, DAB 显色。免疫组化阳性反应细胞呈棕黄色, 应用 Leica QWinV3 图像分析软件, 每张切片取 2 个 400 倍视野, 测定每个视野的阳性细胞数, 计算细胞总数及灰度值、阳性细胞的平均灰度值。

2.4 Western blotting 法检测 SIRT1 蛋白表达

提取大鼠脑海马组织蛋白, 用二辛可宁酸 (BCA) 法测定蛋白的量。取 30 μL 蛋白样品上样, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 电转移 1.5 h 至硝酸纤维素膜 (NC) 上, 5%脱脂奶粉封闭 2 h 后与 1:500 稀释的兔抗大鼠 SIRT1 一抗于 4 °C 过夜, 与 1:10 000 稀释的二抗室温孵育 30 min, 再与化学发光剂 (ECL) 室温作用 1 min, 曝光、显影和定影。胶片扫描后, 采用 Quantity One 软件对显影条带进行分析, 以 SIRT1 目的条带与 β -actin 条带灰度的比值, 作为 SIRT1 蛋白的相对表达量。

2.5 统计学处理

运用 SPSS11.5 进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 对低氧刺激大鼠学习记忆的影响

定位航行实验显示, 与对照组大鼠的寻台潜伏期 (17.05 \pm 3.29) s 相比, 模型组大鼠的寻台潜伏

期为 (45.38±9.52) s, 显著延长 ($P<0.05$)。与模型组相比, 西红花苷-1 低、中、高剂量组大鼠的寻台潜伏期显著缩短 ($P<0.05$), 分别为 (32.83±4.32)、(17.85±2.01)、(16.81±3.61) s。

空间探索实验显示, 与对照组穿越平台的次数 10.17±1.47 相比, 模型组大鼠穿越平台次数明显减少 ($P<0.05$), 为 4.67±1.63。与模型组相比, 西红花苷-1 低、中、高剂量组大鼠穿越平台的次数分别为 7.50±1.22、10.33±1.37、11.17±2.40 ($P<0.05$), 表明西红花苷-1 明显改善经低氧刺激的大鼠对平台位置的记忆能力。

3.2 对大鼠海马 CA1 区 SIRT1 表达的影响

免疫组化法染色后显微镜观察可见, 对照组大鼠海马 CA1 区神经细胞中 SIRT1 蛋白相对特异地、均匀地表达, 表达位于胞浆和胞核内, 以胞浆为主, 细胞呈棕黄色着色。部分胞核中因 SIRT1 蛋白表达, DAB 初染, 苏木素复染后, 胞核并非呈蓝色, 而呈较深的棕黄色。与对照组比较, 模型组大鼠海马 CA1 区 SIRT1 表达明显下调 ($P<0.05$)。与模型组比较, 西红花苷-1 各剂量组大鼠海马 CA1 区 SIRT1 表达不同程度地上调 ($P<0.05$), 以中、高剂量作用更为显著, 而这两组间差异不显著。结果见图 1、表 1。

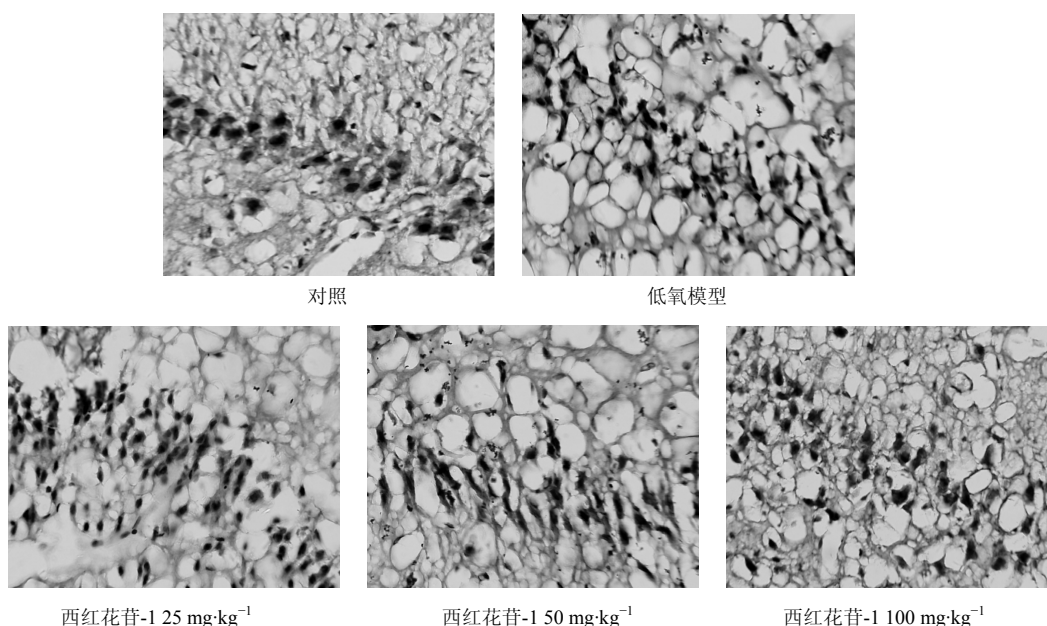


图 1 各组大鼠海马 CA1 区 SIRT1 表达的免疫组化法检测结果

Fig. 1 Immunohistochemical detection of SIRT1 expression in hippocampal CA1 region of rats in each group

表 1 西红花苷-1 对低氧大鼠 SIRT1 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of crocin-1 on relative expression level of SIRT1 in hypoxic rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	SIRT-1 阳性细胞平均灰度值	SIRT-1 相对表达量
对照	—	124.00±26.80	0.74±0.09
模型	—	53.10± 3.81 [▲]	0.53±0.09 [▲]
西红花苷-1	25	80.82± 4.17 [*]	0.63±0.04 [*]
	50	126.14±32.66 ^{*#}	0.71±0.01 ^{*#}
	100	129.18±30.47 ^{*#}	0.75±0.03 ^{*#}

与对照组比较: [▲] $P<0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$

与低剂量组比较: [#] $P<0.05$

[▲] $P<0.05$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs model group

[#] $P<0.05$ vs low-dose group

Western blotting 法检测显示, 模型组大鼠海马 CA1 区 SIRT1 蛋白相对表达量低于对照组 ($P<0.05$)。与模型组相比, 西红花苷-1 各组大鼠海马 CA1 区 SIRT1 表达均显著上调 ($P<0.05$), 以中、高剂量组作用更明显, 但这两组间差异不显著。结果见图 2、表 1。

4 讨论

在高海拔低氧环境中, 机体神经系统形态结构及功能会发生很大变化, 而对缺血、缺氧最为敏感的海马神经细胞则受到更大的影响。中枢神经系统的功能活动可通过学习记忆活动最直接表现出来, 而海马组织是人学习和记忆的关键部位。有研究表明, 西红花苷可提高慢性束缚应激模型大鼠的抗

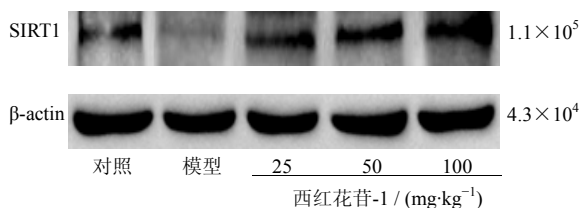


图2 各组大鼠海马CA1区SIRT1表达的Western blotting检测结果

Fig. 2 Western blotting of SIRT1 expression in hippocampal CA1 region of rats in each group

氧化酶活性,降低血浆中皮质酮水平,改善慢性应激诱导的学习与记忆损伤,减轻氧化应激对海马区的损伤;还可以改善脑缺血大鼠的空间学习及记忆功能^[4-5]。本实验发现,低氧条件在影响大鼠学习和记忆的同时抑制海马组织SIRT1表达;西红花苷-1预先给药,明显缩短大鼠在Morris水迷宫实验中潜伏期,增加穿越平台的次数,以中、高剂量组的作用尤为明显。表明西红花苷-1对大鼠脑海马神经元功能具保护作用,从而显著改善低氧应激对海马组织学习记忆功能。

SIRT1在抗氧化应激、细胞能量代谢、DNA损伤修复、抑制细胞凋亡及保护神经细胞等方面发挥重要调控作用^[6-9]。本实验发现,西红花苷-1组大鼠脑海马组织中SIRT-1表达比模型组显著增加,以中、高剂量的作用尤为明显,表明西红花苷-1对低氧应激后大鼠脑海马组织中SIRT1蛋白表达有上调作用。

白藜芦醇、漆树黄酮、紫柳因等天然产物均为SIRT1激活剂,有较强的抗氧化、清除自由基作用,这些作用主要通过激活组蛋白去乙酰化酶的活性来发挥生物活性^[10]。西红花苷-1对SIRT-1的表达的上调可能是其发挥在低氧应激下对大鼠神经保护作用的重要机制之一,但具体机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 绪广林, 钱之玉. 西红花苷对血管内皮细胞的保护作用研究 [J]. 中草药, 2002, 33(5): 439-442.
- [2] Lin B. Polyphenols and neuroprotection against ischemia and neurodegeneration [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2011, 11(14): 1222-1238.
- [3] Khalili M, Hamzeh F. Effects of active constituents of *Crocus sativus* L., crocin on streptozocin-induced model of sporadic Alzheimer's disease in male rats. [J]. *Iran Biomed J*, 2010, 14(1/2): 59-65.
- [4] Ghadrdoost B, Vafaei A A, Rashidy-Pour A, et al. Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 667(1/3): 222-229.
- [5] Hosseinzadeh H, Sadeghnia H R, Ghaeni F A, et al. Effects of saffron (*Crocus sativus* L.) and its active constituent, crocin, on recognition and spatial memory after chronic cerebral hypoperfusion in rats [J]. *Phytother Res*, 2012, 26(3): 381-386.
- [6] Wareski P, Vaarmann A, Choubey V, et al. PGC-1{alpha} and PGC-1{beta} regulate mitochondrial density in neurons [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(32): 21379-21385.
- [7] Wang Y Z, Huang Y N, Sun K Y, et al. Leptin gene transfer regulates fibromuscular development and lipid deposition in muscles via SIRT1, FOXO3a and PGC-1α in mice *in vivo* [J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28(4): 617-623.
- [8] Li K, Luo J. The role of SIRT1 in tumorigenesis [J]. *North Am J Med Sci*, 2011, 4(2): 104-106.
- [9] Koltai E, Zhao Z, Lacza Z, et al. Combined exercise and insulin-like growth factor-1 supplementation induces neurogenesis in old rats, but do not attenuate age-associated DNA damage [J]. *Rejuvenation Res*, 2011, 14(6): 585-596.
- [10] 赵静妹, 王 蓉. SIRT1功能的研究进展 [J]. 国际内分泌杂志, 2011, 31(2): 110-112.