

毛蕊花糖苷改善 *D*-半乳糖致亚急性衰老小鼠脑损伤的作用

高莉¹, 彭晓明², 霍仕霞², 林娟², 闫明^{2*}, 张富春¹

1. 新疆大学生命科学与技术学院 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046

2. 新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所 新疆维吾尔医方剂学重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830049

摘要: **目的** 研究毛蕊花糖苷对 *D*-半乳糖致亚急性衰老小鼠脑损伤的改善作用。**方法** 建立 *D*-半乳糖致亚急性衰老小鼠模型, 以其学习、记忆成绩, 免疫器官指数, 脑中胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 和乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性, 小鼠海马 CA1 区细胞形态为指标, 对毛蕊花糖苷改善 *D*-半乳糖致亚急性衰老小鼠脑损伤的作用进行研究。**结果** 与模型组比较, 毛蕊花糖苷可恢复 *D*-半乳糖致亚急性衰老小鼠的学习记忆损伤; 拮抗脑组织和免疫器官萎缩; 提高脑中 ChAT 活性, 降低 AChE 活性; 改善脑组织海马 CA1 区锥体细胞的数量和排列。**结论** 毛蕊花糖苷能明显改善 *D*-半乳糖致亚急性衰老小鼠的学习记忆能力障碍, 可以调节脑组织 ChAT 和 AChE 活性, 保护脑组织海马 CA1 区神经元细胞, 提高脑组织和免疫器官指数, 改善模型小鼠的脑损伤, 提示毛蕊花糖苷的作用可能与其增强中枢胆碱能功能和保护神经元细胞有关。

关键词: 毛蕊花糖苷; *D*-半乳糖; 学习记忆能力; 胆碱乙酰转移酶; 乙酰胆碱酯酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)01-0081-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.016

Improvement of acteoside on cerebral injury in subacute aging mice induced by *D*-galactose

GAO Li¹, PENG Xiao-ming², HUO Shi-xia², LIN Juan², YAN Ming², ZHANG Fu-chun¹

1. Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

2. Prescription Laboratory of Xinjiang Traditional Uyghur Medicine, Xinjiang Institute of Traditional Uyghur Medicine, Urumqi 830049, China

Abstract: Objective To investigate the effect of acteoside on cerebral injury in subacute aging mice induced by *D*-galactose. **Methods** The aging model of mice was established by sc administration of *D*-galactose, taking learning, memory, index of immune organs, activities of choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE) in mice brain, and cell morphology of hippocampal CA1 region as indicators to study the effect. **Results** Compared with the model group, acteoside could recover the learning and memory capacity, resist immune organs atrophy, enhance the activity of ChAT, inhibit the activity of AChE, and improve the number and arrangement of cerebral pyramidal cells in hippocampal CA1 region. **Conclusion** Acteoside has remarkably reduced the cerebral injury of mice induced by *D*-galactose, and could increase the activities of ChAT and AChE in mice brain, protect the brain cells in hippocampal CA1 region, improve immune organs index, and enhance the learning and memory capacity. Acteoside has the protective effects on cerebral injury induced by *D*-galactose, and the mechanism may be related to the improvement of the central cholinergic system and the protection of nerve cells.

Key words: acteoside; *D*-galactose; learning and memory capacity; choline acetyltransferase; acetylcholinesterase

毛蕊花糖苷 (洋丁香苷, acteoside) 是肉苁蓉中的主要有效成分, 研究已证明其具有免疫调节^[1]、神经保护^[2]、肝脏保护^[3]、补肾壮阳^[4]、增强记忆力^[5]等药理作用。目前已有研究表明, 毛蕊花糖苷可通

过调节胆碱乙酰转移酶 (choline acetyltransferase, ChAT) 和乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 活性改善东莨菪碱造成的动物学习记忆损伤^[5-6]。为进一步研究毛蕊花糖苷改善动物学习记忆能力和脑

收稿日期: 2013-04-24

基金项目: 新疆维吾尔自治区科研机构创新发展专项资金 (2012015); 新疆维吾尔自治区公益性科研院所基金 (KY2012114)

作者简介: 高莉 (1980—), 女, 博士研究生, 副研究员, 主要从事中药新药筛选研究。E-mail: gaoli_535@163.com

*通信作者 闫明 E-mail: yanming21cn@sohu.com

损伤的作用机制,本研究通过建立 *D*-半乳糖亚急性衰老模型,检测和分析小鼠免疫器官指数、学习记忆能力、AChE 和 ChAT 活性、脑组织海马 CA1 区椎体细胞形态等指标,探讨毛蕊花糖苷改善亚急性衰老小鼠脑损伤的作用,为其进一步开发提供理论依据。

1 材料

1.1 药物与试剂

毛蕊花糖苷(质量分数>90%),新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所自制;石杉碱甲片,河南太龙药业股份有限公司。*D*-半乳糖,美国 sigma 公司;0.9%氯化钠注射液,西安京西双鹤药业有限公司;考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、AChE 测定试剂盒、ChAT 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物

SPF 级昆明种小鼠,雌雄各半,体质量(20±2)g,购自新疆实验动物研究中心提供,许可证号:SCXK(新)2003-0002。

1.3 仪器

YLS-3TB 小鼠跳台记录仪,济南益延科技发展有限公司;GBC 紫外可见分光光度计,澳大利亚 BGC 公司;RM2235 切片机,德国 Leica 公司;DM2500 显微镜,德国 Leica 公司;全波长酶标仪, Multiskan GO, 美国 Thermo Scientific 公司。

2 方法

2.1 模型制备、分组与给药

昆明种小鼠 72 只适应性饲养 7 d 后,采用 PEMS 3.1 医用统计软件,以体质量为指标,随机分为对照组、模型组、石杉碱甲 [0.051 mg/(kg·d)] 组和毛蕊花糖苷低、中、高剂量 [30、60、120 mg/(kg·d)] 组,每组 12 只。对照组颈背部 sc 生理盐水,其余各组按 150 mg/(kg·d) 颈背部 sc *D*-半乳糖造模,连续 90 d。从第 71 天开始石杉碱甲组和毛蕊花糖苷组分别

ig 给药,连续 20 d。空白对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水。

2.2 小鼠跳台测试^[7]

实验时将小鼠放置于跳台仪中,适应环境 3 min,然后通以 36 V, 2 mA 交流电 5 min,记录小鼠第 1 次跳下绝缘平台的时间,作为潜伏期,同时记录 5 min 内小鼠跳下平台遭受电击的次数,即错误次数,作为学习成绩。24 h 后重复进行,测其记忆保持能力,作为记忆成绩。

2.3 小鼠脑中 AChE 和 ChAT 活性测定

跳台实验结束后,立即断头处死,取脑组织,分离出大脑,称质量,加入 0.9% 预冷生理盐水,制成 10% 脑组织匀浆,以 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液比色法检测脑中 AChE 和 ChAT 活性;取胸腺、脾脏、大脑称质量,计算脏器指数。脏器指数=脏器质量/体质量。

2.4 对海马细胞形态学观察

小鼠跳台实验结束后,立即处死,迅速取脑组织 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,切片,HE 染色,光学显微镜下观察海马细胞形态变化。

2.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPASS 13.0 统计学软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对小鼠胸腺指数、脾脏指数、脑指数的影响

与对照组比较,模型组小鼠的免疫器官和脑组织出现了明显萎缩,其胸腺指数、脾脏指数、脑指数显著降低($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较,毛蕊花糖苷低、中剂量组和石杉碱甲组胸腺指数、脾脏指数、脑指数均显著升高($P < 0.05$ 、 0.01)。提示毛蕊花糖苷对衰老小鼠免疫器官和脑组织萎缩具有明显的抑制作用。结果见表 1。

表 1 毛蕊花糖苷对小鼠胸腺指数、脾脏指数、脑指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 1 Effects of acetoside on indexes of thymus, spleen, and brain of mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	胸腺指数 / (mg·g ⁻¹)	脾脏指数 / (mg·g ⁻¹)	脑指数 / (mg·g ⁻¹)
对照	—	25.79±2.39	43.39±1.35	0.89±0.11
模型	—	16.17±2.03*	22.87±2.39**	0.61±0.09*
毛蕊花糖苷	30	21.58±2.32 [#]	38.79±2.54 [#]	0.84±0.15 [#]
	60	23.57±2.54 [#]	37.79±2.42 [#]	0.85±0.28 [#]
	120	20.76±1.24	30.72±2.76	0.79±0.14 [#]
石杉碱甲	0.051	22.30±2.05 [#]	40.69±2.37 ^{##}	0.88±0.18 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$, 下表同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group, same as below

3.2 对小鼠学习、记忆功能的影响

与对照组比较,模型组小鼠逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性对照组可延长小鼠逃避潜伏期 ($P < 0.05$ 、 0.01),而毛蕊花糖苷低、中、高剂量组也均可显著延长小鼠逃避潜伏期 ($P < 0.05$ 、 0.01)和降低跳台错误次数 ($P < 0.05$ 、 0.01)。提示毛蕊花糖苷可以明显改善 *D*-半乳糖造成的小鼠学习记忆能力障碍。结果见表 2。

3.3 对小鼠脑组织 AchE 和 ChAT 活性的影响

与对照组相比较,模型组小鼠脑组织 AchE 活性明显升高 ($P < 0.01$),ChAT 活性降低 ($P < 0.05$),可以提示 *D*-半乳糖导致小鼠衰老和记忆障碍的机制之一是损伤胆碱能系统。与模型组相比较,毛蕊花糖苷低、中、高剂量组和石杉碱甲组 AchE 活性均显著降低 ($P < 0.01$),ChAT 活性明显升高 ($P < 0.05$),提示毛蕊花糖苷可以一定程度上改善 *D*-半乳糖对小鼠造成的胆碱能系统损伤。结果见表 3。

表 2 毛蕊花糖苷对小鼠跳台成绩的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effects of acetoside in step-down test for mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	学习		记忆	
		潜伏期 / s	触电次数	潜伏期 / s	触电次数
对照	—	40.5 ± 15.6	3.5 ± 0.8	185.9 ± 34.2	2.3 ± 0.5
模型	—	12.4 ± 2.6**	10.8 ± 2.1**	10.5 ± 3.9**	10.5 ± 2.9**
毛蕊花糖苷	30	25.3 ± 12.8 [#]	4.2 ± 0.5 [#]	64.5 ± 14.5 ^{##}	3.8 ± 0.8 [#]
	60	29.5 ± 11.2 ^{##}	3.4 ± 0.3 ^{##}	72.3 ± 15.2 ^{##}	2.9 ± 0.6 ^{##}
	120	30.2 ± 15.3 ^{##}	2.7 ± 0.4 ^{##}	76.4 ± 19.2 ^{##}	2.1 ± 0.9 ^{##}
石杉碱甲	0.051	28.4 ± 10.4 [#]	3.8 ± 1.7 [#]	88.4 ± 23.4 ^{##}	3.1 ± 1.2 ^{##}

表 3 毛蕊花糖苷对小鼠脑组织中 ChAT、AchE 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of acetoside on activities of ChAT and AchE in brain tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	AchE / (nmol·mg ⁻¹)	ChAT / (U·g ⁻¹)
对照	—	3.79 ± 0.58	272.32 ± 47.05
模型	—	5.62 ± 0.90**	102.14 ± 30.73*
毛蕊花糖苷	30	3.80 ± 0.70 ^{##}	244.06 ± 55.36
	60	3.97 ± 0.61 ^{##}	231.84 ± 44.74 [#]
	120	4.35 ± 0.54 [#]	201.06 ± 73.34 [#]
石杉碱甲	0.051	3.93 ± 0.59 ^{##}	256.82 ± 45.05 [#]

3.4 对小鼠海马细胞形态的影响

对照组海马 CA1 区锥体细胞排列整齐,相对稠密,未见炎细胞浸润,未见细胞空泡变性和细胞坏死。模型组海马 CA1 区锥体细胞排列紊乱,明显变稀疏,部分细胞出现空泡变性,细胞出现固缩坏死。与模型组比较,石杉碱甲组海马 CA1 区锥体细胞排列整齐,相对稠密,未见细胞出现空泡、固缩坏死;毛蕊花糖苷低、中、高剂量组海马 CA1 区锥体细胞排列整齐,相对比较稠密,除低剂量部分细胞出现空泡变性,均未见细胞坏死,小鼠脑组织细胞的数量和排列均得到明显改善。结果见图 1。

4 讨论

目前,用于研究衰老和痴呆的动物模型很多,

其中最早是由我国学者龚国清等^[8]提出的,给小鼠慢性注射 *D*-半乳糖已成为一种常见的模拟衰老动物模型的方法,广泛用于阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)等神经退行性疾病的药理学研究,它可以导致全身代谢紊乱,引起动物中枢神经系统的退行性变化,从而较好地模拟自然老化小鼠^[9]。

大脑胆碱能系统与学习记忆密切相关,Ach 是由胆碱能神经末梢释放的用于维持高级神经功能的一种重要神经介质,Ach 的量与 ChAT 和 AchE 活性有关,二者相辅相成共同维持脑内 Ach 量的动态平衡,AchE 分解 Ach,而 ChAT 则是催化 Ach 合成的限速酶^[10]。

Takashi 等^[11]报道毛蕊花糖苷具有改善正常小

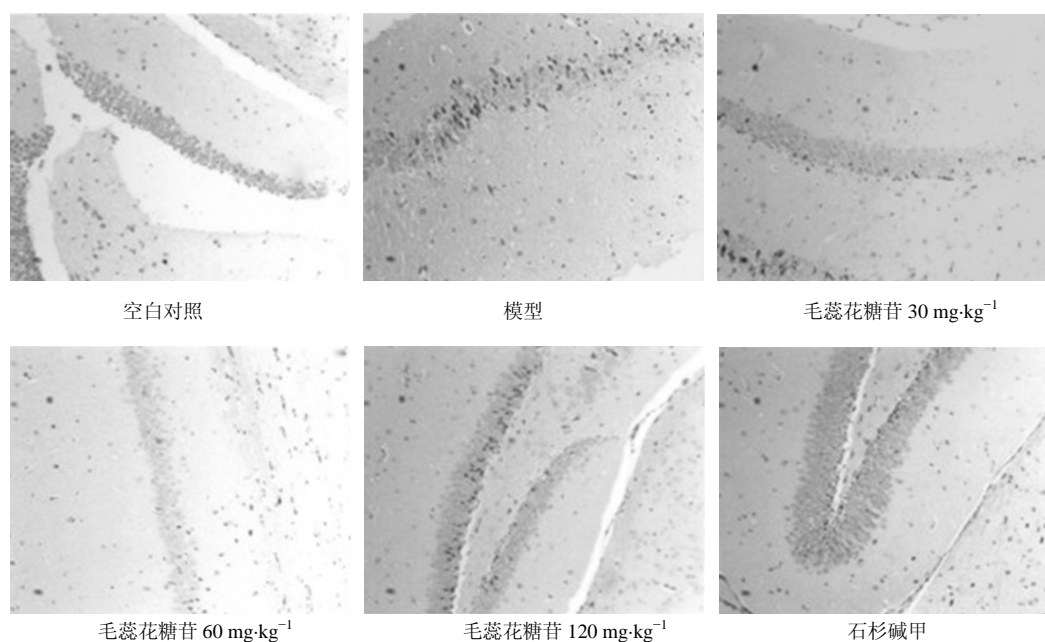


图 1 各组小鼠脑组织海马 CA1 区细胞形态 (×10)

Fig. 1 Cell morphology of hippocampus CA1 region in brain tissue of mice in each group (×10)

鼠学习记忆的作用。林娟等^[5]和朴景华等^[6]通过实验发现在东莨菪碱致小鼠记忆障碍模型中,毛蕊花糖苷可延长跳台实验的平台停留期,显著减少错误次数,并能拮抗东莨菪碱所引起的大脑组织的 AchE 和 ChAT 活性改变。但毛蕊花糖苷是否通过以上机制对其他衰老动物模型的脑损伤起改善作用,本实验对小鼠学习记忆成绩、免疫器官指数以及脑组织 ChAT 和 AchE 活性、小鼠海马 CA1 区细胞形态进行了考察。实验采用 D-半乳糖致小鼠衰老模型,结果显示,模型组小鼠免疫器官指数下降,学习记忆能力减退,脑组织 AchE 活性升高、ChAT 活性降低,海马 CA1 区锥体细胞排列紊乱,与 AD 患者大脑的病理变化相似,表明该模型成功模拟了 AD 的部分病理学和行为学改变,可适用于 AD 的药物治疗研究。连续给予毛蕊花糖苷治疗,小鼠脑组织指数和免疫器官指数升高,学习记忆能力增强,脑组织 AchE、ChAT 活性以及海马 CA1 区锥体细胞的数量和排列均明显得到改善。因此,调节中枢胆碱能功能和保护神经元细胞,可能是毛蕊花糖苷促智和抗衰老的作用机制之一。

正常小鼠在衰老过程中,常伴随着自主活动减少,学习记忆能力下降,机体免疫系统功能退化,胸腺和脾细胞对丝裂原的应答能力减弱,降低其指数^[12]。中枢胆碱能系统是学习、记忆的主要通路,

而胆碱能特异性标志 ChAT 和 AchE 活性与 Ach 水平紧密相关。本实验从胆碱能神经系统、免疫器官指数和海马 CA1 区神经元细胞形态的角度探讨了毛蕊花糖苷对 D-半乳糖小鼠脑损伤的改善机制,为今后进一步探索毛蕊花糖苷预防和治疗 AD 等神经性疾病奠定基础。

参考文献

- [1] 唐永富, 黄丹菲, 谢明勇, 等. 毛蕊花苷和异毛蕊花苷对树突状细胞增殖的影响 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(23): 1785-1787.
- [2] He J, Hu X P, Zeng Y. Advanced research on acteoside for chemistry and bioactivities [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13(5): 449-464.
- [3] Lee K J, Woo E, Chor C Y, *et al.* Protective effect of acteoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity [J]. *Life Sci*, 2004, 74(8): 1051-1064.
- [4] 马晶晶, 赵帆, 孙云, 等. 类叶升麻苷对肾虚小鼠补肾壮阳作用的研究 [J]. 扬州大学学报, 2009, 30(1): 22-25.
- [5] 林娟, 高莉, 闫明, 等. 类叶升麻苷对东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的改善作用 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(19): 2956-2959.
- [6] 朴景华, 蒲小平, 马建, 等. 类叶升麻苷对东莨菪碱所致记忆获得性障碍的改善作用 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(6): 625-627.

- [7] 张均田, 张庆柱. 神经药理学研究技术与方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [8] 龚国清, 徐黻本. 小鼠衰老模型的研究 [J]. 中国药科大学学报, 1991, 22(2): 101-103.
- [9] 陆盈盈, 高良才, 袁崇刚. *D*-半乳糖致老年性痴呆模型的评价和海马脑区甘丙肽表达研究 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2007, 14(4): 191-200.
- [10] 潘振宇, 汪旭明, 王照宇, 等. 葛根素对 *D*-半乳糖模型鼠记忆能力及大脑皮质胆碱能系统的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(12): 2308-2309.
- [11] Takashi S, Satoru K, Kumiko K, *et al.* Pharmacological Studies on *Cistanchis Herba*. I effects of the constituents of *cistanchis herba* on sex and learning behavior in chronic stressed mice [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1985, 105(12): 1134-1144.
- [12] 乔萍, 杨贵贞. 三七皂苷单体 R_{g1} 对 *D*-半乳糖模型鼠学习记忆和免疫功能的影响 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2003, 29(3): 267-269.