

毛蕊异黄酮对衰老小鼠学习记忆能力的改善作用及机制研究

于德红,王 美,陈金铭,王 旭,耿增岩,李 颖
(华北理工大学药学院,河北唐山 063000)

摘要:目的:研究毛蕊异黄酮对 *D*-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力的改善作用及作用机制。方法:小鼠皮下注射 *D*-半乳糖 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,连续6周,造模后的小鼠分为模型组、奥拉西坦组($300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、和毛蕊异黄酮高、中、低剂量组($20,12,7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)。模型组和正常对照组小鼠给予等剂量的生理盐水。处理7 d后,利用跳台和Y迷宫实验检测空间记忆和被动学习能力,测定肝、脾、胸腺和脑器官指数,检测血清总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)含量和脑组织中乙酰胆碱酯酶(AchE)活力。结果表明,与模型组相比,毛蕊异黄酮处理组小鼠在Y迷宫中正确反应次数和主动回避率明显增加($p<0.05$),在跳台实验中逃避期均明显缩短,错误次数明显减少($p<0.05$);毛蕊异黄酮处理组小鼠肝、脾、胸腺和脑器官指数与正常对照组没有明显差异;抗氧化酶(T-SOD、GSH-Px)活力显著升高($p<0.05$),MDA含量明显降低,脑组织中AchE活性降低($p<0.05$)。结论:毛蕊异黄酮对 *D*-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力有改善作用,毛蕊异黄酮可能是通过提高内源抗氧化酶(T-SOD、GSH-Px)活力,降低脂质过氧化损伤,保护脑、脾、胸腺等器官功能和降低脑组织AchE活性来提高 *D*-半乳糖致衰老小鼠的学习记忆能力。

关键词:毛蕊异黄酮,*D*-半乳糖,器官指数,抗氧化,抗衰老

Mechanisms and effects of calycosin on learning-memory function in aging mice

YU De-hong, WANG Mei, CHEN Jin-ming, WANG Xu, GENG Zeng-yan, LI Ying

(School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China)

Abstract: Objective: The effects of calycosin on learning-memory behavior in aging mice induced by *D*-galactose were investigated in this study. Methods: The aging mice model was induced by subcutaneous injection of *D*-galactose ($150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) were established after 6 weeks. The *D*-galactose-induced aging mice were divided into model group, oxiracetam group ($300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and calycosin high, medium and low dose treated-groups ($20, 12, 7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Mice in the model group and normal control group were given normal saline. After intraperitoneal injection 7 d, the passive learning ability and memory capacity of mouse were investigated by the platform and the Y maze. Then organ index and antioxidant activity were detected, such as liver, spleen, thymus, brain and serum superoxide dismutase (T-SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA) and brain acetylcholinesterase (AchE) activity. Results: Compared with the model group, in the Y maze, the number of correct reaction and active avoidance rate of calycosin-treated mice were significantly increased ($p<0.05$), and the escape period was significantly shortened and the number of errors in the step-down test was significantly reduced ($p<0.05$). Compared with the model group, liver, spleen, thymus and brain organ index of calycosin-treated mice were significantly different ($p<0.05$). In the calycosin groups, antioxidant enzyme (T-SOD, GSH-Px) activity was significantly elevated ($p<0.05$), MDA content was significantly reduced ($p<0.05$), and brain tissue AchE activity was decreased ($p<0.05$). Conclusion: Calycosin can improve the learning-memory function of aging mice induced by *D*-galactose. The mechanism may be to increase the endogenous antioxidant enzyme activity, reduce lipid peroxidation damage, protect organ function such as brain, spleen and thymus and reduce brain tissue AchE activity.

Key words: calycosin; *D*-galactose; organ index; antioxidation; anti-aging

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)17-0292-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2017.17.057

收稿日期: 2016-12-23

作者简介: 于德红(1971-),女,博士,副教授,研究方向:中药药效的物质基础, E-mail: ydh613@163.com。

基金项目: 河北省教育厅项目(Z2011247)。

随着世界人口老龄化进程的不断加速,衰老及其相关疾病已成为当今日益严重的社会和医疗问题,抗衰老研究也成为当前科研领域中的热点问题^[1-3]。毛蕊异黄酮(Calycosin)是植物膜荚黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fish.) Bge)和蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fish.) Bge. var. *mongholicus*)的主要活性成分之一,也是紫穗槐(*Amorpha fruticosa* L.)、红车轴草(*Trifolium pratense* L.)、黄甘草(*Glycyrrhiza eurycarpa* P.C.Li)等豆科植物中含有的主要活性成分。毛蕊异黄酮为白色针状结晶,弱极性,熔点 226~228 °C^[4-6]。作为典型的植物雌激素,毛蕊异黄酮能够与机体的雌激素受体结合,产生雌激素样作用,具有抗氧化、抗过敏、抗骨质疏松、抗肿瘤、免疫调节等方面的药理作用^[7-8]。目前已有研究表明毛蕊异黄酮对神经细胞和脑缺血再灌注损伤具有保护作用^[9-11],为进一步研究毛蕊异黄酮对衰老小鼠学习记忆能力的影响,本研究建立 D-半乳糖致小鼠亚急性衰老模型^[12-13],考察毛蕊异黄酮对小鼠被动学习能力和空间记忆能力的影响,检测其对器官指数和 T-SOD、GSH-Px、AchE 等酶活力的影响,初步探讨毛蕊异黄酮对小鼠改善学习记忆能力的作用机制,为其进一步开发利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

健康 7 周龄雄性昆明小鼠 65 只,平均体重为 (27.71 ± 0.41) g,由华北理工大学动物中心提供,许可合格证号:SYXK(冀)2010-0038。

毛蕊异黄酮实验室自制(纯度 98% 以上)^[14]; D-半乳糖 上海试剂二厂出品(批号:120809); 0.9% 生理盐水 河北天成药业股份有限公司(批号:C11082501);奥拉西坦注射液 广东世信药业有限公司出品(批号:1202015);肝素钠、T-SOD 试剂盒、MDA 试剂盒、AchE 测定试剂盒 南京建成生物工程研究所。

YLS-3TB 型跳台记录仪 淮北正华生物仪器设备有限公司;MG-3s 型迷宫刺激器 淮北正华生物仪器设备有限公司;KDC-16H 高速离心机 科大创新股份有限公司中佳分公司;TU-1810 紫外可见分光光度计 北京普斯通用仪器有限责任公司;Sunrise 全波长酶标仪 瑞士 Tecan 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 造模方法 将 65 只昆明小鼠分组喂养,随机分出 10 只为对照组,其余小鼠皮下注射 D-半乳糖 150 mg·kg⁻¹·d⁻¹,对照组每天注射等体积生理盐水,连续注射 42 d^[13-14]。42 d 后,在末次注射第 2 d 对小鼠进行跳台实验,测定并记录跳上橡皮垫的逃避期、第一次跳下橡皮垫的潜伏期和 5 min 内受电击的次数(错误次数)作为学习成绩。24 h 后重复第 1 d 的实验操作并记录实验数据作为记忆成绩。与对照组比较,其他组小鼠跳上橡皮垫的逃避期明显延长,行动迟缓,喜蜷缩,毛发枯黄无光泽,第一次跳下橡皮垫的潜伏期缩短,5 min 内受电击的次数(错误次数)明显增加。对注射 D-半乳糖造模的动物进行筛选,

剔除学习成绩有显著性差异的小鼠,选取潜伏期 < 45 s 的小鼠,对其进行分组,进行后续实验。

1.2.2 动物分组及给药 通过动物行为学跳台实验进行认知检验,将造模成功的小鼠分为:阳性药物组、模型组、毛蕊异黄酮高剂量组,中剂量组和低剂量组,每组 10 只。阳性药物组给予奥拉西坦(Oxiracetam) (300 mg·kg⁻¹·d⁻¹),毛蕊异黄酮高(H)、中(M)、低(L)剂量组分别腹腔注射给予 20、12、7 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 的毛蕊异黄酮药物,模型组、对照组腹腔注射等量的生理盐水。

1.2.3 Y-型迷宫检测 6 组小鼠分别腹腔注射给予相应的药物,给药第 7 d 后进行 Y-迷宫实验,每天每鼠训练 10 次,连续训练 2 d 后,第 3 d 测定其学习记忆能力,记录每组小鼠正确反应次数,错误反应次数及各自的潜伏期^[15]。测定并记录小鼠在 10 次测定中的错误次数、被动回避次数及所用时间、主动回避次数及所用的时间。

1.2.4 跳台实验检测 给药第 7 d 后测定并记录跳上橡皮垫的逃避期、第一次跳下橡皮垫的潜伏期和 5 min 内受电击的次数(错误次数)作为学习成绩。24 h 后重复第 1 d 的实验操作并记录实验数据作为记忆成绩。

1.2.5 小鼠血清 AchE、T-SOD、GSH-Px 和 MDA 测定 1.2.3、1.2.4 行为学实验结束后,小鼠眼眶取血,置于内有肝素钠的塑料离心管中,4 °C,12000 r/min 离心 10 min,分离血清,参照试剂盒说明书测定 T-SOD 活力、GSH-Px、以及 MDA 含量。

1.2.6 小鼠脑组织中 AchE 活性测定及器官指数检测 对给药 7 d 后的小鼠进行称重,再解剖分离每只小鼠的大脑、脾脏、肝脏和胸腺,吸除血迹后进行称重,分别计算器官指数 = 器官质量(g)/体质量(kg)。取脑组织,加入 0.9% 预冷生理盐水,制成 10% 脑组织匀浆,以 3500 r/min 离心 10 min,取上清液比色法检测脑中 AchE 活性。

1.2.7 统计学处理 数据为至少 3 次的平均值 ± 标准差 (Mean ± S.D.),采用 SPSS 17.0 软件进行组间比较单因素方差分析, $p < 0.05$ 为差异有显著性, $p < 0.001$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 毛蕊异黄酮对小鼠空间记忆能力影响

Y-型迷宫主要采用灯光和电刺激,使大鼠形成回避条件反射,通过观察回避条件反射和空间辨别能力来判断小鼠空间记忆能力^[15]。如表 1 所示,与对照组相比,模型组小鼠对刺激的正确反应率和主动回避率明显降低,正确和错误的反应潜伏期明显延长 ($p < 0.05$),表明模型小鼠空间记忆能力下降。与模型组相比,毛蕊异黄酮高、中、低剂量组及阳性药物组小鼠正确反应次数和主动回避率明显增加,正确反应潜伏期以及错误反应潜伏期时间均缩短,差异均具有显著性 ($p < 0.05$)。表明毛蕊异黄酮对衰老小鼠空间记忆能力具有促进作用。

2.2 毛蕊异黄酮对小鼠被动学习记忆能力影响

跳台实验属于被动回避性条件反射,经常用来

表1 毛蕊异黄酮对 *D*-半乳糖致衰老小鼠 Y-迷宫实验行为的影响 ($\bar{x} \pm S, n=10$)Table 1 Effects of calycosin on the Y-maze test in aged mice induced by *D*-galactose ($\bar{x} \pm S, n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	正确反应率 (%)	主动回避率 (%)	正确反应潜伏期 (s)	错误反应潜伏期 (s)
对照组	—	64.6 ± 10.1	26.5 ± 7.6	6.7 ± 1.8	12.4 ± 1.3
模型组	—	35.4 ± 5.5 **	12.7 ± 4.8 *	9.9 ± 2.2 *	21.4 ± 4.0 **
奥拉西坦	300	70.5 ± 8.1 ##	36.8 ± 7.8 ##	5.8 ± 0.6 #	11.9 ± 4.5 ##
毛蕊异黄酮-H	20	76.4 ± 8.0 ##	46.8 ± 7.2 ##	5.4 ± 0.9 ##	9.6 ± 1.7 ##
毛蕊异黄酮-M	12	60.8 ± 6.7 ##	35.4 ± 6.3 #	6.0 ± 0.4 ##	15.2 ± 9.0 #
毛蕊异黄酮-L	7	57.4 ± 9.8 #	24.9 ± 5.5 #	6.9 ± 1.3 ##	15.9 ± 2.9 #

注:与对照组相比 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$;与模型组相比 # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$,表 2~表 4,图 1 同。

表2 毛蕊异黄酮对小鼠跳台成绩的影响 ($\bar{x} \pm S, n=10$)Table 2 Effects of calycosin in step-down test for mice ($\bar{x} \pm S, n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	逃避期 (s)	潜伏期 (s)	错误次数
对照组	—	27.2 ± 22.0	265.8 ± 76.5	3.2 ± 2.5
模型组	—	73.0 ± 32.6 **	128.8 ± 65.2 **	9.2 ± 1.4 *
奥拉西坦	300	12.2 ± 8.7 ##	229.8 ± 50.7 ##	3.0 ± 1.4 #
毛蕊异黄酮-H	20	4.3 ± 4.5 ##	300.3 ± 60.0 #	1.6 ± 1.6 #
毛蕊异黄酮-M	12	27.4 ± 8.5 ##	269.4 ± 69.3 #	2.8 ± 2.9 #
毛蕊异黄酮-L	7	31.0 ± 22.5 #	259.6 ± 67.2 ##	3.8 ± 3.7 #

表3 毛蕊异黄酮对小鼠的脑、脾、肝和胸腺指数的影响 ($\bar{x} \pm S, n=10$)Table 3 Effects of calycosin on indexes of brain, spleen, liver, and thymus of mice ($\bar{x} \pm S, n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	脑指数 (g/kg)	脾指数 (g/kg)	肝脏指数 (g/kg)	胸腺指数 (g/kg)
对照组	—	8.32 ± 0.07	3.10 ± 0.06	46.5 ± 0.21	1.82 ± 0.01
模型组	—	6.39 ± 0.03 **	5.22 ± 0.07 **	51.70 ± 0.54 *	0.83 ± 0.03 **
奥拉西坦	300	8.38 ± 0.18 ##	2.89 ± 0.16 #	41.93 ± 1.13 #	1.91 ± 0.16 #
毛蕊异黄酮-H	20	8.14 ± 0.01 ##	2.31 ± 0.08 ##	40.06 ± 0.22 ##	2.33 ± 0.03 ##
毛蕊异黄酮-M	12	8.02 ± 0.17 ##	2.44 ± 0.03 ##	42.85 ± 0.19 #	1.57 ± 0.11 #
毛蕊异黄酮-L	7	6.93 ± 0.06 #	2.85 ± 0.08 ##	45.71 ± 0.45 #	1.32 ± 0.08 #

测试小鼠被动学习记忆能力^[16]。如表 2 所示,与正常对照组相比,模型组小鼠跳到平台上的逃避期延长,潜伏期缩短,受到电击的错误次数增多,表明模型小鼠的被动学习记忆能力降低($p < 0.05$)。与模型组相比,毛蕊异黄酮高、中、低剂量组及阳性药物组小鼠逃避期均明显缩短,被电击的错误次数明显减少,潜伏期明显延长,且差异均具有显著性($p < 0.05$),毛蕊异黄酮高剂量组效果要好于奥拉西坦组。表明毛蕊异黄酮对衰老小鼠被动学习记忆有明显改善作用。

2.3 毛蕊异黄酮对模型小鼠脑、脾、肝脏和胸腺指数的影响

如表 3,与对照组相比,模型组小鼠脑指数明显降低,表明脑组织萎缩变小($p < 0.05$),与模型组小鼠相比,毛蕊异黄酮高、中、低剂量组及阳性药物组小鼠脑组织重量明显增加,且差异具有显著性($p < 0.05$)。与对照组相比,模型组小鼠肝脾指数升高,表明肝脾出现了代偿性增生($p < 0.05$),与模型组小鼠相比,毛蕊异黄酮高、中、低剂量组及阳性药物组小鼠脾脏指数、肝脏指数明显降低,差异具有显著性($p < 0.05$),且趋于对照组,表明毛蕊异黄酮能保护肝

脾免受损伤,使肝脾机能趋于正常。长期注射 *D*-半乳糖会导致模型小鼠胸腺指数明显下降^[17],毛蕊异黄酮和奥拉西坦均可以增高胸腺指数,提高机体免疫机能。以上结果表明毛蕊异黄酮对小鼠脑、肝、脾、胸腺等器官具有一定的保护作用,且呈剂量依赖性。

2.4 毛蕊异黄酮对衰老小鼠血清 T-SOD、GSH-Px 和 MDA 的影响

如表 4 所示,与对照组相比,模型组小鼠血清中 T-SOD 和 GSH-Px 活性明显降低($p < 0.05$),MDA 含量明显提高($p < 0.05$),表明 *D*-半乳糖致衰老小鼠存在着严重的抗氧化系统和脂质过氧化异常^[17]。与模型组相比,毛蕊异黄酮高、中、低剂量组小鼠血清中 T-SOD 活力和 GSH-Px 活力显著升高,而 MDA 含量显著降低($p < 0.01$),且毛蕊异黄酮高剂量组的效果优于奥拉西坦。以上结果表明,毛蕊异黄酮可降低脂质过氧化损伤程度,减轻自由基对组织局部的损害和保护组织,显著增强 *D*-半乳糖致衰老小鼠的抗氧化能力。

2.5 毛蕊异黄酮对衰老小鼠脑组织中 AChE 活力的影响

乙酰胆碱(Ach)是胆碱能神经介质,AChE 活性

表 4 毛蕊异黄酮对小鼠血清 T-SOD、GSH-Px、MDA 的影响($\bar{x} \pm S, n = 10$)
Table 4 Effects of calycosin on T-SOD, GSH-Px and MDA in serum of mice($\bar{x} \pm S, n = 10$)

组别	T-SOD(kU·g ⁻¹)	GSH-Px(kU·g ⁻¹)	MDA(μmol·L ⁻¹)
对照组	101.25 ± 10.58	417.47 ± 21.20	4.55 ± 0.01
模型组	72.99 ± 8.84 **	206.50 ± 48.23 **	15.57 ± 0.02 **
奥拉西坦	119.30 ± 9.38 ##	432.13 ± 75.33 ##	6.81 ± 0.02 ##
毛蕊异黄酮 H	131.86 ± 9.47 ##	477.77 ± 96.04 ##	5.92 ± 0.01 ##
毛蕊异黄酮 M	94.18 ± 8.52 ##	415.82 ± 72.46 ##	8.32 ± 0.01 ##
毛蕊异黄酮 L	91.04 ± 11.35 ##	393.25 ± 80.18 ##	10.30 ± 0.01 ##

升高,会造成脑内 ACh 含量不足,导致中枢神经系统功能障碍,出现学习记忆和认知能力下降甚至智力丧失^[18]。如图 1 所示,与正常对照组比较,衰老模型组小鼠脑中 AChE 活力明显升高($p < 0.01$)。奥拉西坦组和毛蕊异黄酮不同剂量处理 7 d 天后,奥拉西坦组和毛蕊异黄酮低、中、高三种剂量组的 AChE 的活力明显降低($p < 0.05$)。

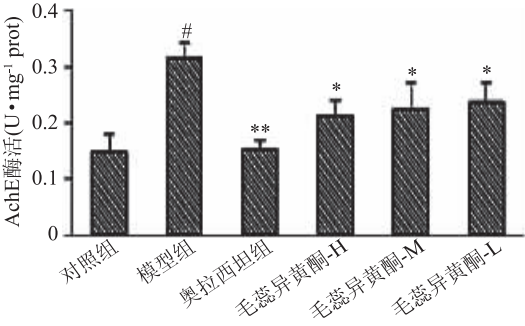


图 1 毛蕊异黄酮对小鼠脑组织中乙酰胆碱酯酶活力的影响($\bar{x} \pm S, n = 10$)
Fig.1 Effects of calycosin on AChE activities in brain tissue of mice($\bar{x} \pm S, n = 10$)

3 结论

D-半乳糖致衰老小鼠模型是目前应用最多的衰老模型,长期大量注射 D-半乳糖,体内产生的大量自由基会对组织产生过氧化损害,引发免疫功能低下,细胞生长繁殖能力下降,发生退行性病变,动物的学习记忆行为受到明显损害,这些特征与自然衰老的表现基本吻合^[17-18]。本实验研究发现毛蕊异黄酮可以通过提高内源抗氧化酶(T-SOD、GSH-Px)活力,降低脂质过氧化损伤程度,减轻自由基对组织局部的损害,提高肝、脾、胸腺等器官机能,延缓了脑的萎缩和衰老,进而提高了 D-半乳糖致衰老小鼠的学习记忆能力,该作用还可能与降低脑组织 AChE 活性有关,其作用机制有待于进一步深入的研究。

参考文献

[1] Kamat P K, Kalani A, Rai S, et al. Mechanism of oxidative stress and synapse dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease; understanding the therapeutics strategies [J]. Molecular Neurobiology, 2014, 53(1): 1-14.
[2] 宋朝春,魏冉磊,樊晓兰.衰老及抗衰老药物的研究进展[J].中国生化药物杂志,2015,35(1): 163-170.
[3] 赵芹,林栋,刘海梅.冰岛刺参胶原蛋白多肽对 PC12 细胞

氧化损伤的保护作用[J].食品工业科技,2016,37(18): 354-358.
[4] 黄胜阳,屠鹏飞.红车轴草异黄酮化合物的分离鉴定[J].北京大学学报:自然科学版,2004,40(4): 544-549.
[5] 赵昱玮.紫穗槐根异黄酮的提取、分离及抑制α-葡萄糖苷酶活性研究[D].长春:吉林农业大学,2015.
[6] 张聿梅,许旭东,胡碧煌.黄甘草异黄酮成分的研究[J].药学报,1997,32(4): 301-304.
[7] 张冬青,王海宝,王淑芳,等.毛蕊异黄酮生物活性的研究进展[J].中国中药杂志,2015,40(2): 4339-4345.
[8] Zhao X, Li X, Ren Q, et al. Calycosin induces apoptosis in colorectal cancer cells, through modulating the ERβ/MiR-95 and IGF-1R, PI3K/Akt signaling pathways [J]. Gene. 2016, 591(1): 123-128.
[9] Yu D H, Bao Y M, An L J, et al. Protection of PC12 cells against superoxid-e-induced damage by isoflavonoids from Astragalus mongholicus [J]. Biomed & enviroment sci, 2009, 22(1), 50-54.
[10] Yu D H, Duan Y L, Bao Y M, et al. Isoflavonoids from Astragalus mongbolicus protect PC12 from toxicity induced by L-glutamate [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 98(1-2): 89-94.
[11] 郭超,全黎,杨兴斌,等.毛蕊异黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].中华神经外科疾病研究杂志,2011,10(1): 34-37.
[12] 刘克明,王春花. D-半乳糖模型鼠与自然衰老鼠的比较研究[J].卫生研究,2007,36(6): 685-688.
[13] Liao C H, Chen B H, Chiang H S, et al. Optimizing a Male Reproductive Aging Mouse Model by D-Galactose Injection [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(1): 98. doi:10.3390/ijms17010098.
[14] Yu D H, Bao Y M, Wei C L, et al. Studies of chemical constituents and their antioxidant activities from Astragalus mongholicus Bunge. Biomed & enviroment sci. 2005, 18(5): 297-301.
[15] 王跃春,王子栋.动物学习记忆能力的 Y-型迷宫测试法(综述)[J].暨南大学报,2001,22(5): 137-140.
[16] 张晓菲.淫羊藿苷预防阿尔茨海默病线粒体损伤的保护作用研究[D].北京:中国医学科学院,2015.
[17] 高莉,彭晓明,霍仕霞,等.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[J].中草药,2014,45(1): 81-85.
[18] 张秀丽.梓醇对 D-半乳糖衰老小鼠的神经保护作用研究[D].大连:大连理工大学,2008.