

人参二醇皂苷和番茄红素对寰枢椎失稳所致老龄小鼠学习记忆障碍的影响

范文静^{1,2} 朱彤彤¹ 郭亚雄¹ 林桂渺^{1,3} 赵丽娟^{1,4}

摘要 **目的:**比较人参二醇皂苷(panaxadiol saponins, PDS)、番茄红素(lycopene)对寰枢椎失稳老龄小鼠记忆的影响。**方法:**小鼠寰枢椎周围注射 30%乳酸溶液复制小鼠颈椎失稳致慢性脑损伤模型。水迷宫测试小鼠学习、记忆能力;碱羟胺比色法测定脑组织乙酰胆碱(Ach)含量,试剂盒检测脑组织胆碱酯酶(AchE)活性;免疫组化观察小鼠脑海马区 β -淀粉样蛋白表达。**结果:**与模型组比较,PDS 组小鼠游全程时间缩短、错误次数减少($P<0.01$),而 lycopene 组小鼠学习、记忆能力有提高趋势;PDS 组和 lycopene 组脑 AchE 活性降低($P<0.01$),Ach 含量增加($P<0.01$),且见脑海马 CA1 区 β -淀粉样蛋白表达减弱;两用药组间差异不显著。**结论:**PDS 与 lycopene 对长期乳酸堆积引起的老龄小鼠寰枢椎失稳所致脑损伤均具有一定的保护作用,可改善小鼠学习记忆能力和脑的代谢。

关键词 人参二醇皂苷;番茄红素;学习记忆;寰枢椎关节;胆碱酯酶;乙酰胆碱; β -淀粉样蛋白

中图分类号: R741, R285, R681.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2009)-08-0731-03

Effects of panaxadiol saponins and lycopene on abilities of learning and memory of senile mice with atlanto-axial joint instability/FAN Wenjing, ZHU Tongtong, GUO Yaxiong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009, 24(8): 731-733

Abstract **Objective:** To compare the effects of panaxadiol saponins (PDS) with lycopene on the abilities of learning and memory in senile mice with learning and memory disorder by atlanto-axial joint instability. **Method:** The atlanto-axial joint instability model was established by injection with 30% lactic acid around the atlanto and axial vertebrae, 30 μ l once weekly, three times totally. The changes of abilities of learning and memory in mice were observed with water-maze test. The activities of acetylcholine esterase (AchE) and the content of acetylcholine (Ach) in brain tissue were tested. Immunohistochemical staining with β -amyloid protein in mice hippocampus was demonstrated. **Result:** The model mice had longer swimming time and more errors ($P<0.05$) in water maze test compared with control group. PDS mice had significant short latency period and less errors in water-maze test ($P<0.01$), but the difference between PDS and lycopene groups was not obvious. Compared with model group, the activities of AchE reduced ($P<0.01$), and the content of Ach increased in PDS and lycopene groups ($P<0.01$). And in the two therapy groups, expressions of β -amyloid protein in mice hippocampus were less than that in model group. **Conclusion:** This study indicate that PDS and lycopene can improve the learning and memory abilities of mice and the metabolism of senile mice brain, which may be the mechanism of its protective effect to cerebral damage. **Author's address** Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine Sciences, Jilin University, Changchun, 130021

Key words panaxadiol saponins; lycopene; learning and memory; atlanto-axial joint; acetylcholine esterase; acetylcholine; β -amyloid

人参皂苷是人参生理活性的物质基础, 目前研究表明人参皂苷可调节大脑皮质的兴奋和抑制过程, 使两者平衡^[1]; 还可降低大脑兴奋过程的疲惫性, 易化学习记忆的获得、巩固和再现, 具有益智、抗衰老的功效。番茄红素(lycopene), 又名茄红素, 因最早发现于番茄中而得名。国内外研究发现, lycopene 具有多种重要的生理功能, 如抗氧化、清除自由基、预防肿瘤及调节机体免疫功能、抗衰老等作用。lycopene 是天然类胡萝卜素中最有效的单线态氧清除剂, 其作用是日常常用抗氧化剂 β_2 胡萝卜素的 2 倍、维生素 E 的 100 倍^[2]。此外, lycopene 还可诱导某

些内源性抗氧化酶, 如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽还原酶(GR)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH2Px)的活性^[3]。本研究采用人参二醇皂苷(panaxadiol saponins, PDS) 和番茄红素比较两者对寰枢椎失稳致脑供血障碍、脑慢性损伤的老龄小鼠记忆的影响。

1 吉林大学白求恩医学院, 长春, 130021

2 上海中医药大学护理学院

3 北京大学深圳研究生院

4 通讯作者

作者简介: 范文静, 女, 硕士, 助教

收稿日期: 2009-03-02

1 材料与方法

1.1 药品试剂

PDS 由吉林大学药学院天然药物化学教研室分离、提纯,制成试剂,其浓度为 10g/L,灭菌蒸馏水稀释;lycopene 购于西安大恒制药有限责任公司,食用色拉油稀释;AChE 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; β -amyloid(1—40)抗体,购于武汉博士德生物有限公司。

1.2 实验动物

雌性 10 月龄 ICR 小鼠 32 只,体重(40±2)g,清洁级,由吉林大学实验动物中心提供。随机分为 4 组,正常对照组、模型组、PDS 组和 lycopene 组,每组 8 只。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备:除正常对照组,其余所有小鼠第 1,2 颈椎关节处注射 30%乳酸溶液 30 μ l/次,1 次/周,连续 3 周^[4-5]。首次造模后 24h 开始给药,PDS 组:PDS 28mg/kg 体重,灌胃;lycopene 组:lycopene 5mg/kg 体重,灌胃,1 次/d,连续给药 100d;正常对照组和模型组给予等体积色拉油,灌胃。

1.3.2 水迷宫实验:水迷宫由黑色有机玻璃板制成,水温(23±1)℃,分成 A、B、C、D 区。终点区有一高出水平的安全平台。各区至终点区为一阶段训练,每一阶段训练 3 次。每次到达平台上休息 30s,再行下次实验。记录小鼠从起点 A 区游至终点台阶处的时间为游全程时间,其进入盲端次数为错误次数,以此作为学习成绩;24h 复测,作为记忆成绩,若动物 120s 内未游到终点则以 120s 计算。实验采用电脑监测记录。

1.3.3 脑组织 AChE、Ach 测定:末次给药次日断头处死小鼠,于冰盘上迅速分离其大脑,称重后以生理盐水 1:9 在冰水浴中匀浆制成 10%脑匀浆,分装并-80℃冻存备用。碱羟胺比色法测定 Ach 含量,AChE

按试剂盒说明书进行测定。

1.3.4 免疫组化染色 按试剂盒说明书操作,采用 SABC 法,检测脑皮质神经细胞异常结构蛋白 β -淀粉样蛋白(1—40)的表达,400 倍物镜下观察细胞内见棕色颗粒者为阳性细胞。

1.4 统计学分析

采用 SPSS12.0 软件,数据均以均数±标准差表示,进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 水迷宫实验检测结果

与正常对照组相比,模型组游全程时间延长,错误次数增加($P<0.05$),游泳速度无差异;与模型组比较,PDS 组游全程时间缩短,错误次数减少($P<0.01$);而 lycopene 组错误次数也明显减少($P<0.01$),游泳速度无差异;而记忆检测期,lycopene 组与 PDS 及正常对照组间游泳速度比较差异有显著性意义($P<0.05$),见表 1。

2.2 生化指标检测结果

与正常对照组比较,模型组 AChE 活性增强,Ach 含量降低($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,PDS 组和 lycopene 组 AChE 活性降低,Ach 含量升高($P<0.01$, $P<0.01$);PDS 与 lycopene 组间比较无显著性差异,见表 2。

2.3 β -淀粉样蛋白免疫组化检测结果

正常对照组脑海马 CA1 区神经细胞 β -淀粉样蛋白呈阴性表达,而模型组神经细胞膜呈棕黄染色的阳性细胞随处可见,PDS 组和 lycopene 组 β -淀粉样蛋白表达介于以上两组之间,见图 1(见彩色插图)。

3 讨论

血管性痴呆是由脑急性慢性缺氧性导致脑组织损

表 1 水迷宫实验检测结果

($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	学习能力			记忆能力		
	游全程时间(s)	错误次数(t)	游泳速度(cm/s)	游全程时间(s)	错误次数(t)	游泳速度(cm/s)
正常对照组	45±14.66	1.86±0.90	3.6±1.1	52.29±21.13	4±2.12	4.57±1.25
模型组	117.8±5.67 ^①	15.14±4.06 ^①	3.77±1.45	116.7±8.69 ^①	16±2.83 ^①	4.56±0.89
PDS 组	29.42±12.64 ^②	1.71±0.75 ^②	3.84±1.9	39.28±18.37 ^②	3.6±0.89 ^②	3.15±1.06
lycopene 组	68.43±46.34	3±1.15 ^②	3.05±1.13	107.85±21.77	6.6±3.85 ^②	5.18±1.76 ^{③④}

与正常对照组比较:① $P<0.05$,与模型组比较:② $P<0.01$,与 PDS 组比较:③ $P<0.05$

表 2 脑组织 Ach 含量及 AChE 活性检测结果 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	AChE 活性	Ach 含量
正常对照组	11.4±2.57	68.4±3.95
模型组	17.7±2.55 ^①	9.05±0.59 ^②
PDS 组	11.1±1.74 ^③	38.6±18.11 ^④
lycopene 组	8.62±1.77 ^④	55.7±18.44 ^④

与正常对照组比较:① $P<0.05$,② $P<0.01$;

与模型组比较:③ $P<0.05$,④ $P<0.01$

害引起的以认知功能障碍为特征的痴呆综合征,是老年期痴呆的主要类型之一^[5]。随着人口平均寿命的逐年增加和社会人口的老齡化,老年痴呆发病率呈上升趋势。对于痴呆的防治及改善老年患者的生存质量,成为当今医学界面临的重大课题。

本实验采用小鼠寰枢椎关节周围长期注射

30%乳酸的方法,使颈椎周围韧带、筋膜,以及肌肉等软组织受到化学刺激,呈现慢性炎症损伤,致颈椎失稳引发机体发生一系列的病理变化,如:自由基生成增加、压迫椎-基底动脉和交感神经受刺激等;导致个体衰老和记忆损伤,制作血管痴呆模型^[4,6]。颈交感神经受刺激又会引起椎-基底动脉缺血,而椎-基底动脉系统通过后交通动脉对边缘系统中海马回、下丘脑等重要组织结构供血,当椎-基底动脉供血不足,导致边缘系统、特别是海马功能障碍将引起小鼠记忆障碍、情绪不稳定等症状^[7]。海马是与学习记忆相关的重要解剖部位,海马神经细胞的突触信息传递、递质释放、酶系统的激活和突触可塑性改变等多种生物学效应,对学习、记忆起着重要作用。水迷宫实验结果表明,模型组游全程时间延长,错误次数增加($P<0.05$),记忆障碍明显;PDS 组游全程时间缩短,错误次数减少($P<0.01$);lycopene 组错误次数也明显减少($P<0.01$),模型组与正常组比较前后期游泳速度均无显著性差异,结果排除了个体疲劳因素的影响,而 lycopene 组、PDS 组与正常对照组间游泳速度比较,差异有显著性意义($P<0.05$)。形态学可见脑组织海马 CA1 区锥体细胞形态学变化,正常对照组小鼠海马 CA1 区锥体细胞形态规则,紧密排列 3—4 层,细胞结构清晰。而模型组小鼠海马 CA1 区锥体细胞层减少,排列紊乱稀疏,细胞脱失明显;细胞周围出现间隙,细胞固缩,结构不清。

老年斑(senile plaques, SP)是脑衰老的特征性表现之一,其主要成分为 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid, A_{β}),多分布在皮质、海马、杏仁核等脑区。研究发现 A_{β} 浓度升高可使 A_{β} 自动聚集,同时 AchE 又加速这个聚集过程。而 A_{β} 浓度升高对 AchE 的活性升高也有促进作用, AchE 的活性升高很可能是 AchE 蛋白量升高所致^[8]。AchE 蛋白含量的增加又进一步促使 A_{β} 的聚集,而且 AchE-A 的复合物比单 A_{β} 的聚集物的毒性更大,进一步增加了对细胞的毒害作用,促使 AD 疾病的产生或恶化^[9]。 A_{β} 在脑内大量沉积可导致神经细胞毒性,结果使神经细胞凋亡脱失,影响其学习记忆功能。本实验结果显示,模型组 AchE 活性高于正常对照组 ($P<0.01$); A_{β} 阳性表达多见,神经细胞脱失明显;PDS 组和 lycopene 组 AchE 活性较模型组有所降低, β -淀粉样蛋白阳性表达介于以上模型组和正常组之间。结果为阐明二者的药用机制提供了新的实验依据。

目前对人参皂苷抗衰老的实验性研究较为广泛,我们前期行为学实验已经证明 PDS 对小鼠学习记忆能力具有很好的保护作用^[7]。lycopene 作为一种

强抗氧化剂,在抗癌、治疗心血管疾病研究方面已取得一定进展,与 PDS 相比,lycopene 以其价格低廉,存在广泛等优势,更具有潜在的开发价值,当前备受研究者的关注;Rinaldi^[10]的临床研究发现,增加 lycopene 等抗氧化剂的摄入可预防轻度认知障碍的患者发展成老年痴呆;Kuhad^[11]实验证实 lycopene 可以提高链脲霉素诱导的糖尿病大鼠的学习记忆能力;动物实验表明 lycopene 只有维持保护脑功能的作用,但对其并无改善和提高^[11-13];本实验结果显示,与模型组比较,lycopene 对小鼠脑慢性损伤所造成的空间学习记忆能力有一定的改善作用,但不及 PDS 作用显著;但二者均可降低 AchE 活性,减少衰老小鼠脑海马区 A_{β} 表达。乙酰胆碱是中枢胆碱能系统与学习记忆有关的重要递质,常作为研究胆碱能神经元的指标,其被胆碱酯酶水解后失活^[14]。实验中 PDS 和 lycopene 是否同时通过对胆碱能系统的调节来影响小鼠记忆的学习记忆能力,还需进一步证明。

参考文献

- [1] Rudakewich M, Ba F, Benishin CG. Neurotrophic and neuroprotective actions of ginsenosides Rb-1 and Rg (1) [J]. *Planta Med*, 2001, 67(6): 533—537.
- [2] Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, β 2 carotene and other carotenoids as antioxidants[J]. *Am J Clin Nutr*, 1995, 62:1315—1321.
- [3] Breinholt V, Lauridsen ST, Daneshvar B, et al. Dose response effects of lycopene on selected drug metabolizing and antioxidant enzymes in the rat [J]. *Cancer Lett*, 2000, 15 (4): 201—210.
- [4] 王立石. 難病のメカニズム及びその治療法[P]. 日本国特許庁, W00095-1110 号, 11 月 10 日 1996.
- [5] 魏居端, 刘喆, 何方, 等. 血管性痴呆临床诊治研究进展[J]. *中国康复医学杂志*, 2009, 24(1): 92—95.
- [6] 林桂渺, 何静春, 赵洪艳, 等. 寰枢椎长期乳酸堆积对老年小鼠学习记忆能力的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2006, 32(6): 968—970.
- [7] 范文静, 何静春, 崔巍, 等. PDS 对小鼠颈椎稳定性异常致脑功能损伤的影响[J]. *中国康复理论与实践*, 2007, 13(4): 316—317.
- [8] Cottingham MG, Hollinshead MS, Vaux DJ. Amyloid fibril formation by a synthetic peptide from a region of human acetyl cholinesterase that is homologous to the Alzheimer's amyloid- β peptide[J]. *Biochemistry*, 2002, 41:13539—13547.
- [9] 金其煌, 张学军. 乙酰胆碱酯酶(AchE)与 β 淀粉样肽(A_{β})的相互关系[J]. *生命科学*, 2004, 16(1): 11—16.
- [10] Rinaldi P, Polidori MC, Metastasio A, et al. Plasma antioxidants are similarly depleted in mild cognitive impairment and in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiology of Aging*, 2003, 24 (2): 915—919.
- [11] Kuhad A, Sethi R, Chopra K. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats [J]. *Life Sci*, 2008, 83(3—4): 128—34.
- [12] 毕立茹, 周冬, 王凤阳, 等. 番茄红素对训练小鼠力竭运动能力的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(6): 537—539.
- [13] Hiroyuki Suganuma, Takaaki Hirano, Sachiko Kaburagi, et al. Ameliorative effects of dietary carotenoids on memory deficits in senescence-accelerated mice (SAMP8) [C]. *International Congress Series*, 2004, 60 (12): 129—135.
- [14] 张军艳, 张博爱, 朱红灿, 等. 学习记忆训练对全脑缺血大鼠认知能力的影响及其胆碱能机制 [J]. *中国康复医学杂志*, 2008, 23(4): 305—308.