

# 大豆异黄酮对去卵巢大鼠学习记忆 和海马谷氨酸细胞及 NR2B 受体的影响

买文丽<sup>1,2</sup>, 刘行海<sup>1,2</sup>, 刘亮<sup>3</sup>, 董雯<sup>4</sup>, 陈建林<sup>5</sup>, 刘华<sup>1,2\*</sup>

- (1. 川北医学院生理教研室, 四川 南充 637000; 2. 川北医学院机能中心, 四川 南充 637000;  
3. 川北医学院实验动物中心, 四川 南充 637000;  
4. 北京中医药大学东方学院 临床教研室, 河北 廊坊 065000;  
5. 四川大学生命科学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

**[摘要]** **目的:**探讨大豆异黄酮(isoflavone, IS)对去卵巢大鼠空间学习记忆和海马谷氨酸(Glu)细胞及谷氨酸受体 2B(NMDAR2B)的影响。**方法:**选用青年 SD 雌性大鼠,去除双侧卵巢造模。随机分为 6 组,对照组、模型组、苯甲酸雌二醇(estradiol benzoate, EB)组、大豆异黄酮低、中、高(IS1, IS2, IS3, 分别为 20, 40, 80 mg·kg<sup>-1</sup>, ig)剂量组。EB 组给苯甲酸雌二醇 ip 0.2 mg·kg<sup>-1</sup>, 每周 1 次, 共 6 个月。观察各组大鼠 Morris 水迷宫学习能力, 海马 Glu 神经元的表达及 NR2B 蛋白的表达。**结果:**与对照组比较, 模型组定位航行和空间探索能力下降( $P < 0.05$ ); EB 组、IS3 组定位航行学习能力和空间探索能力明显高于模型组( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 模型组海马 Glu 阳性细胞染色强度和 NR2B 蛋白表达均显著降低( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, EB 组和 IS3 组海马 Glu 阳性细胞染色强度和 NR2B 蛋白表达均显著增加( $P < 0.05$ )。**结论:**大豆异黄酮能提高去卵巢大鼠空间学习能力, 机制可能与影响 Glu 含量, 提高 NR2B 蛋白表达有关, 并且大豆异黄酮的作用具有剂量依赖性。

**[关键词]** 大豆异黄酮; 学习记忆; 谷氨酸; *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 2B 亚单位

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0160-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150160

## Regulation of Glu Neuro-transmitter System and NR2B by Isoflavone in Ovariectomized Rats Brain

MAI Wen-li<sup>1,2</sup>, LIU Xing-hai<sup>1,2</sup>, LIU Liang<sup>3</sup>, DONG Wen<sup>4</sup>, CHEN Jian-lin<sup>5</sup>, LIU Hua<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Physiology, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China;

2. Functional Experiment Center, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China;

3. Laboratory Animal Centre, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China;

4. Clinical Department, Beijing University of Chinese Medicine Oriental Institute, Langfang 065000, China;

5. Laboratory of Biological Resources and Ecological Environment, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effects and mechanisms of isoflavone (IS) on spatial learning and memory and glutamate (Glu), *N*-methyl-*D*-aspartate receptor 2B (NR2B) in ovariectomized rats brain. **Method:** The young femal Sprague-Dawley rats were ovariectomized. Ovariectomized rats were randomly divided into five groups, model group, estradiol benzoate (EB) group, IS low dose group (IS1), IS middle dose group (IS2) and IS high dose group (IS3). EB group were treated with estradiol benzoate (0.2 mg·kg<sup>-1</sup>, once each week) by intraperitoneal injection once a week. IS groups were treated with Isoflavone (20, 40, 80 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) by gavage once daily. The spatial learning and memory performance of all rats were evaluated by Morris watermaze

**[收稿日期]** 20140311(015)

**[基金项目]** 四川省教育厅课题(09ZB121 11ZD159);川北医学院校级重点课题(CBY11-A-ZP17)

**[第一作者]** 买文丽, 硕士, 讲师, 从事神经药理研究, Tel:15881726382, E-mail:taipo1031@163.com

**[通讯作者]** \* 刘华, 硕士, 副教授, 从事药理学研究, Tel:15508262226, E-mail:liuhua.224@163.com

task. The change of Glu was measured by immunohistochemistry. The levels of NR2B protein was measured by Western blotting. **Result:** Compared with control group, the latency period of model group increased apparently ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the latency period of control group and IS3 group decreased apparently ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, the magnitude of tinction of glutamic acid in hippocampus and the protein levels of NR2B in model group decreased apparently ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the magnitude of tinction of glutamic acid in hippocampus and the protein levels of NR2B in EB group, IS3 group increased apparently ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Isoflavone can promote the ovariectomized rats' impairment of spatial learning and memory by changing the contents of Glu and increasing the protein levels of NR2B in hippocampus.

[**Key words**] isoflavone; learning and memory; glutamate; *N*-methyl-*D*-aspartate receptor 2B

大量研究证实雌激素与认知功能密切相关<sup>[1]</sup>,如阿尔茨海默病等认知障碍疾病的发生均与雌激素减退有关,但长期激素替代疗法会产生激素依赖恶性疾病发生的危险性<sup>[2]</sup>,因此目前越来越关注从植物中提取和筛选安全性优于雌激素的植物雌激素<sup>[3-4]</sup>。大豆异黄酮(isoflavone)是典型的植物雌激素,其化学结构与 17- $\beta$  雌二醇相似,具有对体内雌激素双相调节能力<sup>[5]</sup>。海马是学习记忆的重要区域,其学习记忆过程与海马内谷氨酸(Glu)与 *N*-甲基-*D* 天冬氨酸(*N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA)受体结合,致使  $Ca^{2+}$  通道开放, $Ca^{2+}$  增加有关<sup>[6]</sup>。本研究通过大豆异黄酮对去卵巢大鼠空间学习记忆能力及对海马 Glu 和 NMDA 受体含量的改变,探讨大豆异黄酮改善去卵巢大鼠认知功能的可能机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级 SD 大鼠,均选用雌性,4 周龄,体重 120 ~ 130 g,60 只,购自华西实验动物中心,饲养于川北医学院动物中心。动物实验遵守国际实验动物伦理学要求。动物合格证号 SCXK(川)2010-13。

**1.2 药品和试剂** 40%天然大豆异黄酮(购自北京康源科技发展有限公司 2011091120),苯甲酸雌二醇(上海通用药业股份有限公司 2011050812),I 抗(1106812A),II 抗(1106822A),SP(1125412),DAB(12196A10)均购于博奥森有限公司,NR2B(100768)免疫组化试剂盒,NR2B 多克隆抗体(100587),ABC 试剂盒(2100A51)均购于武汉博士德生物工程公司。

**1.3 仪器** 水迷宫计算机图像实时分析系统(成都泰盟有限公司),转移脱色摇床(海门其林贝尔仪器制造公司),电泳仪(北京六一仪器厂),Gel Dox-XR 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),多功能真彩色细胞图像分析管理系统(美国 Media

Cybernetics 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组和造模** 大鼠随机分成 6 组:对照组、模型组、大豆异黄酮低、中、高剂量组(IS1,IS2,IS3 分别为 20,40,80  $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ ),苯甲酸雌二醇组(0.2  $mg \cdot kg^{-1}$ ,每周 1 次)。共同饲养 7 d 后,所有大鼠均用 3%戊巴比妥钠溶液(30  $mg \cdot kg^{-1}$ )ip 麻醉,对照组为单纯开腹,其他 5 组在无菌条件下切除双侧卵巢,术后每组均 ip 给予青霉素 3 d。伤口愈合后对照组和模型组每日 ig 给予 0.9%生理盐水,IS1,IS2,IS3 组每日 ig 给予大豆异黄酮,雌激素对照组每周给予苯甲酸雌二醇 ip,连续 6 个月。

**2.2 Morris 圆形水迷宫实验** 大鼠术后第 6 月进行水迷宫测试,测试 7 d(继续给药),Morris 水迷宫平台固定置于第 4 象限中央,浸没于水下 2 cm,水温( $25 \pm 1$ ) $^{\circ}C$ 。测试包括:①定位航行试验,历时 5 d,每天分上、下午 2 个时段,每个时段 1 次,分别从 4 个不同的标记点,将大鼠于象限边缘中点头朝池壁放入水中,记录 2 min 内寻找平台所需时间(逃避潜伏期)。②空间探索试验,定位航行试验后 2 d,撤除平台,任选一个入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录 2 min 内大鼠在各象限的游泳时间和跨越原平台所在位置的次数。实验完毕后,取脑组织冻存待检。

**2.3 免疫组化检测海马 Glu 的表达** 水迷宫测试结束后,每组剩余 5 只灌注、固定、切片、免疫组化按免疫组化试剂盒说明进行,每张片选 5 个 400 倍视野,采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统,分析阳性表达强度<sup>[7]</sup>。

**2.4 检测海马组织 NR2B 蛋白表达** 称取海马组织,提取总蛋白,用 Nano Drop 法进行蛋白浓度定量,上样量 40  $\mu g$ ,10% SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,抗体孵育(I 抗浓度 1:300),4  $^{\circ}C$  孵育过夜,TBST 漂

洗 10 min × 3 次, 加入 II 抗 (1:3 000), 温室杂交 1 h, TBST 漂洗 5 min × 3 次. 采用化学发光法显色, 分析蛋白条带灰度值<sup>[8]</sup>. 计算各组 NR2B 蛋白相对表达水平.

**2.5 统计学处理** 实验所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间自主活动数据运用 SPSS 16.0 统计软件单因素方差分析法进行比较.  $P < 0.05$  为有统计学意义.

### 3 结果

**3.1 一般状态观察** 各组大鼠运动、进食、饮水、大小便均正常. 大鼠初始体重各组无显著差异 ( $P < 0.05$ ); 6 个月后对照组、EB 组和 IS3 组大鼠体重增长率均明显低于模型组 ( $P < 0.05$ ). 见表 1.

表 1 大豆异黄酮给药 6 个月对去卵巢大鼠体重的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	初始体重/g	终末体重/g
对照	-	124 ± 2	297 ± 1 <sup>1)</sup>
模型	-	127 ± 1	331 ± 2
EB	0.2	125 ± 1	287 ± 2 <sup>1)</sup>
IS1	20	126 ± 2	324 ± 2
IS2	40	124 ± 2	317 ± 1
IS3	80	127 ± 2	289 ± 2 <sup>1)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$  (表 2 ~ 3 同).

**3.2 对去卵巢大鼠空间学习记忆的影响** 与对照组比较, 模型组大鼠平均寻台时间显著延长、穿台次数显著减少 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, EB 组, IS3 组大鼠平均寻台时间显著缩短、穿台次数显著增加 ( $P < 0.05$ ). 见表 2.

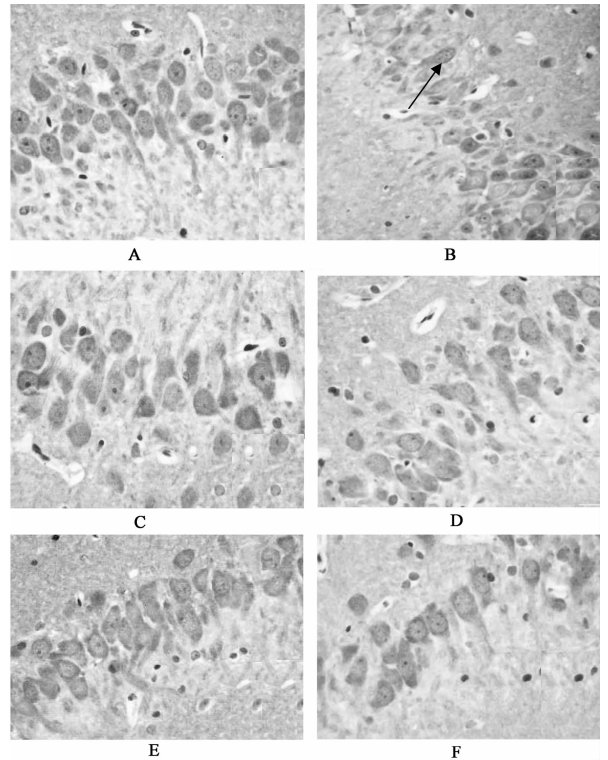
表 2 大豆异黄酮对去卵巢大鼠寻台时间和穿台次数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	寻台时间/s	穿台数/次/min
对照	-	4.6 ± 1.2 <sup>1)</sup>	7.12 ± 1.33 <sup>1)</sup>
模型	-	7.7 ± 1.5	4.24 ± 1.17
EB	0.2	6.1 ± 2.0 <sup>1)</sup>	6.72 ± 1.58 <sup>1)</sup>
IS1	20	6.9 ± 1.5	6.04 ± 2.01
IS2	40	6.8 ± 1.5	6.53 ± 1.63
IS3	80	6.3 ± 1.7 <sup>1)</sup>	6.92 ± 1.18 <sup>1)</sup>

**3.3 对去卵巢大鼠海马 Glu 阳性细胞 Glu, NR2B 表达的影响** 与对照组比较, 模型组海马 Glu 阳性细胞染色强度和 NR2B 蛋白表达灰度值均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较 EB 组和 IS3 组海马 Glu 阳性细胞染色强度和 NR2B 蛋白表达灰度值均显著升高 ( $P < 0.05$ ). 见表 3, 图 1 ~ 2.

表 3 大豆异黄酮对去卵巢大鼠海马 Glu 阳性细胞 Glu, NR2B 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	Glu 阳性细胞染色强度/A	NR2B 灰度值
对照	-	37.3 ± 3.17 <sup>1)</sup>	1.97 ± 0.13 <sup>1)</sup>
模型	-	13.0 ± 2.11	1.16 ± 0.28
EB	0.2	31.3 ± 2.08 <sup>1)</sup>	1.67 ± 0.15 <sup>1)</sup>
IS1	20	21.7 ± 2.26	1.17 ± 0.1
IS2	40	24.7 ± 3.05	1.47 ± 0.27
IS3	80	28.4 ± 2.67 <sup>1)</sup>	1.71 ± 0.16 <sup>1)</sup>



A. 对照组; B. 模型组; C. 苯甲酸雌二醇 0.2 mg·kg<sup>-1</sup> 组; D. IS1 20 mg·kg<sup>-1</sup> 组; E. IS2 40 mg·kg<sup>-1</sup> 组; F. IS3 80 mg·kg<sup>-1</sup> 组

图 1 各组大鼠海马 Glu 阳性细胞染色强度 (免疫组化, ×400)

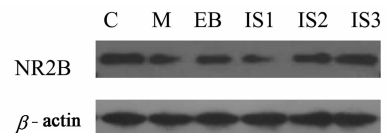


图 2 各组大鼠海马内 NR2B 的表达 (Western blotting 检测)

### 4 讨论

本实验结果显示去卵巢大鼠在术后 6 月的学习记忆能力明显低于正常组, 证明雌激素在神经系统的认知过程中的重要作用. 给予雌激素治疗后去卵

巢大鼠空间学习记忆能力明显高于模型组大鼠,显示长期给予植物雌激素能很好的改善去卵巢大鼠学习记忆能力。

Glu 是脑内调节学习记忆的重要神经递质<sup>[9-10]</sup>, Glu 通过 NMDA 受体介导学习记忆的过程。NMDA 受体有多个亚基,其中 NR2B 亚基主要影响学习记忆,被称为聪明基因<sup>[11-12]</sup>。大鼠去卵巢后伴随雌激素水平的迅速下降,与激素相关的神经元功能也相应退化,因此本实验选择 NMDA 的 NR2B 受体作为海马学习记忆研究的靶点。

实验中观察到模型组大鼠学习记忆能力下降,并且海马 Glu 阳性细胞染色强度和 NR2B 蛋白表达均显著降低;而 EB 组和 IS3 组大鼠学习记忆明显提高,同时海马 Glu 阳性细胞染色强度和 NR2B 蛋白表达均显著升高。由此,可以推测去卵巢大鼠学习记忆的下降与雌激素减退,致使海马内 Glu 介导的学习环路受损有关。而大豆异黄酮能增加去卵巢大鼠海马中 Glu 含量和 NMDA 受体的 NR2B 蛋白表达增加,改善去卵巢大鼠学习记忆的能力。因此,证实猜测大豆异黄酮改善去卵巢大鼠海马空间学习能力是通过调节 Glu 信号系统:Glu 含量增加,突触后膜去极化程度增加,NMDA 受体增加,使突触后膜  $Ca^{2+}$  通道开放增加, $Ca^{2+}$  内流增多,诱发 LTP,从而促进学习记忆的能力。

综上所述,海马 Glu 含量和 NR2B 蛋白含量减少是去卵巢大鼠空间学习记忆减退的原因之一,大豆异黄酮可以通过提高去卵巢大鼠海马 Glu 含量,增加 NR2B 蛋白及其磷酸化水平表达,从而提高去卵巢大鼠空间学习记忆能力。

#### [参考文献]

[ 1 ] Shang X L, Zhao J H, Cao Y P, et al. Effects of synaptic plasticity regulated by 17beta-estradiol on learning and memory in rats with Alzheimer's disease [J]. *Neurosci Bull*,2010,26(2):133.

[ 2 ] Stanculescu A, Bembinster L A, Borgen K, et al.

Estrogen promotes breast cancer cell survival in an inhibitor of apoptosis (IAP)-dependent manner [J]. *Horm Cancer*,2010,1(3):127.

[ 3 ] Mun J G, Grannan M D, Lacheik P J, et al. Tracking deposition of a <sup>14</sup>C-radiolabeled kudzu hairy root-derived isoflavone rich fraction into bone [J]. *Exp Biol Med(Maywood)*,2010,235(10):1224.

[ 4 ] Belcher S M, Zsarnovszky A. Estrogenic action in the brain: estrogen, phytoestrogen and rapid intracellular signaling mechanisms [J]. *J Pharmacol Exper Thera*, 2001,299(2):408.

[ 5 ] 刘葵,张恩娟.大豆异黄酮的药理作用及临床应用研究进展[J]. *中国药房*,2006,17(1):67.

[ 6 ] Junfang W, Kuo P H, Freesia L H, et al. Role of hippocampal  $Ca_v1.2$   $Ca^{2+}$  channels in NMDA receptor-independent synaptic plasticity and spatial memory[J]. *J Neurochem*,2005,25(43):9883.

[ 7 ] 邹志坚,刘海云,王晓敏.地锦草水提液对移植性肝癌的抑制作用及对凋亡蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*,2013,19(21):241.

[ 8 ] 樊慧杰,柴智,闫润红,等.补中益气汤对脾气虚症大鼠伤口肌肉组织 Hyp,VEGF, $\alpha$ -SMA 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*,2013,19(21):214.

[ 9 ] Luo J, Min S, Wei K, et al. Propofol protects against impairment of learning-memory and imbalance of hippocampal Glu/GABA induced by electroconvulsive shock in depressed rats [J]. *J Anesth*, 2011, 25(5):657.

[10] Edwards F A. Anatomy and electrophysiology of fast central synapses lead to a structural model for long-term potentiation[J]. *Physiol Rev*,1995,75(4):759.

[11] Cui Y, Jin J, Zhang X, et al. Forebrain NR2B overexpression facilitates the prefrontal cortex long-term potentiation and enhancing working memory function in mice[J]. *PLoS One*,2011,6(5):20312.

[12] Cao X, Cui Z, Feng R, et al. Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing[J]. *Eur J Neurosci*,2007,25(6):1815.

[责任编辑 聂淑琴]