

## 五味子-淫羊藿混合提取物对 *D*-半乳糖致 脑衰老小鼠学习记忆能力的改善作用

刘聪<sup>1</sup>, 李宁<sup>1</sup>, 敬舒<sup>2</sup>, 左红香<sup>1</sup>, 王喜斌<sup>1</sup>, 王春梅<sup>1</sup>,  
孙靖辉<sup>1</sup>, 张成义<sup>1</sup>, 陈建光<sup>1</sup>, 李贺<sup>1\*</sup>

(1. 北华大学药学院, 吉林 吉林 132013; 2. 北华大学附属医院, 吉林 吉林 132013)

**[摘要]** 目的:研究五味子与淫羊藿混合提取物(SEE)对 *D*-半乳糖诱导脑衰老小鼠学习记忆的影响,并探讨其相关机制。方法:将 ICR 小鼠随机分为 5 组,即空白组(蒸馏水灌胃,生理盐水皮下注射),衰老模型组(蒸馏水灌胃,*D*-半乳糖 220 mg·kg<sup>-1</sup>皮下注射),150,300,600 mg·kg<sup>-1</sup> SEE 组(SEE 灌胃,*D*-半乳糖皮下注射)连续给药 7 周。通过避暗实验及跳台实验观察 SEE 对小鼠学习记忆能力的影响。应用水溶性四氮唑-1(water soluble tetrazolium-1,WST-1)法及硫代巴比妥酸法检测小鼠脑组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活力与丙二醛(malonic dialdehyde,MDA)含量;通过实时荧光定量 PCR 检测小鼠脑组织 p19,p53,p21 mRNA 表达情况。通过亚油酸-硫氰酸铁法及 Oyaizu 法对 SEE 体外抗氧化能力进行检测。结果:避暗实验及跳台实验结果显示 300,600 mg·kg<sup>-1</sup> SEE 可明显提高 *D*-半乳糖诱导的脑衰老小鼠的学习记忆能力( $P < 0.05, P < 0.01$ );同时,300,600 mg·kg<sup>-1</sup> SEE 组小鼠脑组织中 SOD 的活力明显增加( $P < 0.05, P < 0.01$ ),MDA 含量明显减少( $P < 0.05, P < 0.01$ ),脑组织中 p19,p53,p21 mRNA 表达量明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。亚油酸-硫氰酸铁法实验结果显示,反应体系建立 36 h 后,SEE 对亚油酸的氧化抑制强于维生素 E;Oyaizu 实验结果显示,SEE 对 Fe<sup>3+</sup> 的还原能力优于维生素 E,吸光度达到 0.711。结论:本研究明确了 SEE 能够改善 *D*-半乳糖致脑衰老小鼠的学习记忆能力,该作用可能与其提高小鼠抗氧化能力以及降低小鼠脑组织中 p19,p53,p21 基因表达水平有关。

**[关键词]** 五味子;淫羊藿;混合提取;脑衰老;学习;记忆

**[中图分类号]** R285.5;R969.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)21-0147-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017210147

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170731.1041.052.html>

**[网络出版时间]** 2017-07-31 10:41

### Improvement Effect of Schisandrae Chinensis Fructus-Epimedii Wushanensis Folium Extract on Learning-memorizing Ability in *D*-galactose Induced Brain Aged Mice

LIU Cong<sup>1</sup>, LI Ning<sup>1</sup>, JING Shu<sup>2</sup>, ZUO Hong-xiang<sup>1</sup>, WANG Xi-bin<sup>1</sup>, WANG Chun-mei<sup>1</sup>,  
SUN Jing-hui<sup>1</sup>, ZHANG Cheng-yi<sup>1</sup>, CHEN Jian-guang<sup>1</sup>, LI He<sup>1\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Beihua University, Jilin 132013, China;

2. Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin 132013, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Schisandrae Chinensis Fructus-Epimedii Wushanensis Folium extract (SEE) on the learning-memorizing ability in *D*-galactose induced brain aged mice and explore its relative mechanisms. **Method:** The ICR mice were divided into five groups randomly, including blank control group (gavage administration of distilled water, subcutaneous injection of normal saline), aging model group

**[收稿日期]** 20170303(009)

**[基金项目]** 吉林省科技厅重点科技攻关计划项目(20140204012YY);吉林省自然科学基金项目(20150101230JC);吉林市科技局项目(20166018)

**[第一作者]** 刘聪,在读硕士,从事神经药理学研究,Tel:0432-64608281,E-mail:372131552@qq.com

**[通讯作者]** \*李贺,副教授,博士,硕士生导师,从事神经药理学研究,Tel:0432-64608281,E-mail:yitonglh@126.com

(gavage administration of distilled water, subcutaneous injection of  $220 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  *D*-galactose), and three SEE groups (150, 300,  $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , gavage administration of SEE, orally, subcutaneous injection of *D*-galactose). All mice were treated for 7 weeks. By using step-through test and step-down test, the effects of SEE on learning-memorizing ability in mice were observed. Water soluble tetrazolium-1 (WST-1) and thiobarbituric acid methods were used to detect the activities of superoxide dismutase (SOD) and malonic dialdehyde (MDA) in the brain tissues of mice. Real-time PCR was used to detect the expressions of p19, p53 and p21 mRNA in the brain, and linoleic acid-ferric thiocyanate method and Oyaizu method were used to test the antioxidation *in vitro* of SEE. **Result:** Step-through test and step-down test results showed that 300,  $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  SEE could significantly improve the learning-memorizing ability ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), increase SOD activities and decrease content of MDA ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and decrease the expressions of p19, p53 and p21 mRNA significantly in *D*-galactose induced brain aged mice ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Linoleic acid-ferric thiocyanate method results showed that SEE could inhibit oxidation of linoleic acid after establishment of reaction system for 36 hours and its inhibition effect was higher than vitamin E. Oyaizu experiment showed that the reducing capacity of SEE on  $\text{Fe}^{3+}$  was stronger than vitamin E, with absorbance of 0.711. **Conclusion:** The present study demonstrated that SEE could improve the learning-memorizing ability in *D*-galactose induced brain aged mice, and this effect may be related to its antioxidative activity and decrease of expressions of p19, p53 and p21 mRNA in the brain.

[**Key words**] *Schisandrae Chinensis Fructus*; *Epimedium Wushanensis Folium*; mixed extraction; brain aging; learning; memory

脑衰老是人体衰老最明显的现象,其过程极其复杂,主要表现为学习和记忆能力的减退<sup>[1]</sup>。脑组织是高耗氧器官,脑细胞在代谢过程中产生较多的活性氧自由基,随着时间的积累,氧化产物的增多,以及清除能力有限,会引起氧化应激损伤,进而引起神经细胞死亡,最终导致大脑退行性改变,导致脑老化<sup>[2]</sup>。细胞衰老过程是借助于信号转导途径实现的,其中,由 p53 控制的信号途径至关重要。当这些途径所涉及的关键调节因子发生突变,细胞将延缓衰老或绕过衰老程序继续增殖。p53 的作用涉及细胞衰老和凋亡等过程。p19 蛋白直接结合并抑制癌基因(mdm2)的活性,使其不能介导 p53 的降解,其表达升高是 p53 激活的原因之一<sup>[3]</sup>。p53 的下游靶分子是 p21, p21 是 cyclin 依赖的蛋白激酶抑制剂,能抑制细胞周期,在 Rb 途径健全的细胞里, p53 通过诱导 p21 引起 G<sub>1</sub> 期限制点停顿<sup>[4]</sup>。

已有研究表明,五味子和淫羊藿均具有改善记忆的功效,其中五味子中的木脂素化合物与淫羊藿中的黄酮类化合物对改善脑衰老有着比较好的功效<sup>[5-8]</sup>。但目前未见关于两者复方改善记忆作用的相关报道。本研究依据中医学理论,将五味子和淫羊藿两味中药组方并进行混合提取得到五味子淫羊藿混合提取物(SEE)。通过避暗实验和跳台实验观察 SEE 对 *D*-半乳糖诱导的脑衰老小鼠学习记忆能力的影响,并通过检测 SEE 对小鼠脑内的超氧化物

歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力与丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)含量的影响,其体外抗氧化作用以及对 p19, p53, p21 基因表达的影响,探讨其改善学习记忆能力的机制。

## 1 材料

**1.1 动物、材料与试剂** 清洁级健康 ICR 小白鼠, 雄性, 体重( $20 \pm 2$ ) g, 由吉林大学实验动物研究中心提供, 合格证号 SCXK(吉)2015-0005, 本研究经过北华大学实验动物伦理委员会批准, 符合中国伦理委员会指导原则。小鼠采取分笼饲养, 且维持 12 h/12 h 昼夜循环, 饲料供给充足, 自由饮水。

五味子由集安五味子种植基地提供, 批号 20150913; 淫羊藿由河北祁新中药饮片有限公司提供, 批号 20140701-1。两种中药饮片经北华大学药学院王维副教授鉴定分别为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* 的干燥果实及小檗科淫羊藿 *Epimedium brevicornu* 的干燥叶; 采用加热回流提取法, 应用 70% 乙醇对五味子和淫羊藿混合物(1:1) 在 75 ℃ 进行料液比 1:18 提取 1.5 h。其中测得五味子醇甲含量为  $2.51 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 淫羊藿苷  $83.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ; *D*-半乳糖(张家港市华昌药业有限公司, 批号 20150317); 硫氰酸铵, 氯化亚铁, 氯化铁, 亚油酸, 三氯乙酸, 磷酸二氢钾, 磷酸氢二钾, 磷酸二氢钠, 磷酸氢二钠, 铁氰化钾(国药化学试剂有限公司, 批号分别为 20150716, 20140309, 20150607,

20160513, 20141123, 20141029, 20141029, 20150724, 20141112, 20151217); 维生素 E (VE, Genriew 公司, 批号 5016010220); SOD, MDA 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20160912, 20160908); RNA 抽提试剂盒 (Vazyme 公司, 批号 7E042J6); SYBR Green Real-time PCR Super Mix (Invitrogen 公司, 批号 15596)。

**1.2 仪器** infiniteM200 型全自动酶标仪 (瑞士 TECAN 集团公司); BA-200 型小鼠避暗仪, DT-200 型小鼠跳台测试仪 (成都泰盟科技有限公司); CFX96 型实时荧光定量聚合酶链式反应仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 将 ICR 小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 包括即空白组 (蒸馏水灌胃, 生理盐水皮下注射), 衰老模型组 (蒸馏水灌胃,  $D$ -半乳糖  $220 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  皮下注射)<sup>[10]</sup>, SEE 150, 300, 600  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组 (SEE 150, 300, 600  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃,  $D$ -半乳糖  $220 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  皮下注射), 连续给药 7 周。

**2.2 避暗实验检测小鼠潜伏期及 5 min 内出现的错误次数** 将小鼠放入避暗仪中面部背向洞口放入明室, 从小鼠进入洞口至其到达暗室的时间即为潜伏期。对小鼠训练 5 min, 记录 5 min 内小鼠的错误次数。间隔 24 h 后进行第 2 次实验。记录每只鼠的潜伏期以及在 5 min 内出现的错误次数。

**2.3 小鼠跳台实验检测潜伏期和错误次数** 将小鼠放置在跳台测试仪中使其先适应环境 5 min, 然后施加 24 V 的交流电, 将小鼠放在跳台仪平台上, 记录小鼠第 1 次跳下平台的时间 (潜伏期) 及 5 min 内受到电击的次数 (错误次数)。24 h 后进行第 2 次实验, 记录各组小鼠潜伏期和错误次数<sup>[9]</sup>。

**2.4 小鼠脑组织 SOD 活力和 MDA 含量检测** 末次给药后 30 min 后处死小鼠, 取出大脑组织, 应用 WST-1 法检测 SOD 活性, 应用 TBA 法检测 MDA 含量。具体方法参照试剂盒说明书。

**2.5 小鼠脑组织中 p19, p53, p21 基因表达的检测** 小鼠末次给药后 30 min, 每组取 3 只小鼠脑组织, 应用试剂盒提取细胞总 RNA, 按逆转录反应试剂盒说明操作合成 cDNA。按试剂盒说明操作进行实时定量 PCR 扩增反应<sup>[10]</sup>, 在 Genbank 里查找各基因序列号, 采用 primer 6.0 软件进行引物设计, 由北京鼎国昌盛生物工程公司合成, 以  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 为内参基因。p19 (160 bp): 上游 5'-ACTCAGCCAACCTCCTCC-3', 下游 5'-TCCGTGGG

CAAAGAC-3'。p53 (109 bp): 上游 5'-ATTCTATCCA GCCAGTTGTT-3'; 下游 5'-TAGCCCTTGAGATTATT GC-3'。p21 (140 bp): 上游 5'-TCCGCACAGGAG CAAA-3'; 下游 5'-AGTCAAAGTTCCACCGTTCT-3'。 $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin, 182 bp): 上游 5'-CCCATCTACGAGGGCTAT-3', 下游 5'-TGTCACGCACGATTTCC-3'。上述 PCR 扩增反应条件为 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 制备溶解曲线。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行相对定量。

## 2.6 SEE 体外抗氧化性测定

**2.6.1 总抗氧化性** 应用亚油酸-硫氰酸铁法<sup>[11]</sup>, 配制亚油酸乳状液 [亚油酸 310  $\mu\text{L}$ , 聚山梨酯-20 350 mg, 用  $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.0) 配制成 50 mL]。将配制好一定浓度的 SEE 以及阳性对照 VE 各 200  $\mu\text{L}$ , 空白组加蒸馏水, 加入 PBS 2.5 mL 中混合, 加入亚油酸乳状液 2.5 mL 混合。置于 37 °C 培养箱中培养 72 h。每隔 12 h 对培养的供试液进行取样, 每次 200  $\mu\text{L}$ , 加入 75% 乙醇 4.5 mL, 后加入 30% 硫氰酸铵 200  $\mu\text{L}$ , 充分混匀后, 加入氯化亚铁溶液 (氯化亚铁 2 g 溶于 3.5% HCl 50 mL 中) 300  $\mu\text{L}$ , 反应 3 min 后在 500 nm 处测量其吸光度  $A$ 。

**2.6.2 总还原性** SEE 还原活性用 Oyaizu 法<sup>[12]</sup> 测定, 取 SEE, 加入  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS (pH 6.6) 1.0 mL 及 1% 铁氰化钾 1.0 mL, 于 50 °C 水浴中反应 20 min 后急速冷却; 加入 10% 三氯乙酸 1.0 mL, 加蒸馏水定容到 10 mL,  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min; 取上清液 2.5 mL, 加入 0.1% 三氯化铁溶液 0.5 mL, 混匀后用蒸馏水定容至 5 mL; 10 min 后于 700 nm 测定其  $A$ 。

**2.7 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。跳台实验, 避暗实验, SOD, MDA 水平, p19, p53, p21 PCR 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间两样本均数比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为具有统计学差异。

## 3 结果

**3.1 避暗实验观察** SEE 对衰老小鼠学习记忆能力的影响 与空白组比较, 模型组小鼠潜伏期显著缩短 ( $P < 0.01$ ), 5 min 内错误次数显著增多 ( $P < 0.01$ ), 说明  $D$ -半乳糖致脑衰老小鼠造模成功。与模型组比较, 300, 600  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  SEE 组小鼠潜伏期显著延长 ( $P < 0.01$ ), 错误次数明显减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 说明 SEE 能有效改善脑衰老小鼠学习记忆能力。其中与 SEE 150  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组比较, SEE 300, 600  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组小鼠潜伏期明显延长 ( $P < 0.05$ ,  $P <$

0.01), 说明随着 SEE 有效剂量的增加, 脑衰老小鼠的学习记忆能力有明显提高。见表 1。

表 1 避暗实验观察 SEE 对脑衰老小鼠潜伏期和错误次数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of SEE on latency and error times in brain aging mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别  | 剂量<br>/mg·kg <sup>-1</sup> | 潜伏期<br>/s                      | 错误次数<br>/5 min            |
|-----|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 空白  | -                          | 171.77 ± 24.85                 | 1.66 ± 0.41               |
| 模型  | -                          | 97.42 ± 26.02 <sup>1)</sup>    | 3.45 ± 1.37 <sup>1)</sup> |
| SEE | 150                        | 116.74 ± 19.89                 | 2.84 ± 0.84               |
|     | 300                        | 144.94 ± 22.57 <sup>3,4)</sup> | 2.23 ± 0.95 <sup>2)</sup> |
|     | 600                        | 166.96 ± 25.21 <sup>3,5)</sup> | 1.94 ± 0.67 <sup>3)</sup> |

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ , 与 SEE 150 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>5)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 跳台实验观察 SEE 对衰老小鼠学习记忆能力的影响** 与空白组比较, 模型组小鼠潜伏期显著缩短 ( $P < 0.01$ ), 5 min 内错误次数显著增多 ( $P < 0.01$ ), 说明 D-半乳糖致脑衰老小鼠造模成功。与模型组比较, SEE 300, 600 mg·kg<sup>-1</sup> 组小鼠潜伏期显著延长 ( $P < 0.01$ ), SEE 150, 300, 600 mg·kg<sup>-1</sup> 组错误次数明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。说明 SEE 能够提高脑衰老小鼠的学习记忆能力。其中与 300 mg·kg<sup>-1</sup> SEE 组比较, 600 mg·kg<sup>-1</sup> SEE 组小鼠潜伏期明显延长 ( $P < 0.05$ )。以上结果进一步提示随着 SEE 有效剂量的增加, 脑衰老小鼠的学习记忆能力有明显地提高。见表 2。

表 2 跳台实验观察 SEE 对脑衰老小鼠潜伏期和错误次数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of SEE on learning and memory in aging mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别  | 剂量<br>/mg·kg <sup>-1</sup> | 潜伏期<br>/s                      | 错误次数<br>/5 min            |
|-----|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 空白  | -                          | 185.77 ± 20.04                 | 1.54 ± 0.47               |
| 模型  | -                          | 113.02 ± 22.25 <sup>1)</sup>   | 2.92 ± 1.13 <sup>1)</sup> |
| SEE | 150                        | 126.69 ± 26.21                 | 2.04 ± 0.65 <sup>2)</sup> |
|     | 300                        | 141.73 ± 23.54 <sup>3)</sup>   | 1.93 ± 0.65 <sup>2)</sup> |
|     | 600                        | 171.13 ± 26.56 <sup>3,4)</sup> | 1.65 ± 0.54 <sup>3)</sup> |

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ; 与 SEE 300 mg·kg<sup>-1</sup> 组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$  (表 3, 4 同)。

**3.3 SEE 对脑衰老小鼠脑组织 SOD 活性, MDA 含量的影响** 与空白组比较, 模型组小鼠脑组织 SOD 活性显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, SEE 300, 600 mg·kg<sup>-1</sup> 组小鼠脑组织 SOD 活性明显增高 ( $P <$

0.05,  $P < 0.01$ )。

与空白组比较, 模型组小鼠脑组织 MDA 含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, SEE 300, 600 mg·kg<sup>-1</sup> 组小鼠脑组织 MDA 含量明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。提示 SEE 可能通过增强小鼠脑组织的 SOD 活力及降低 MDA 含量而发挥抗脑衰老作用。见表 3。

表 3 SEE 对脑衰老小鼠脑组织中 SOD 活性及 MDA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of SEE on SOD activities and MDA contents in brain tissues of brain aging mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别  | 剂量<br>/mg·kg <sup>-1</sup> | SOD<br>/U·mg <sup>-1</sup>   | MDA<br>/mmol·g <sup>-1</sup> |
|-----|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 空白  | -                          | 193.82 ± 32.76               | 4.79 ± 1.21                  |
| 模型  | -                          | 133.39 ± 23.33 <sup>1)</sup> | 7.65 ± 2.02 <sup>1)</sup>    |
| SEE | 150                        | 155.61 ± 22.27               | 6.53 ± 2.06                  |
|     | 300                        | 158.20 ± 24.43 <sup>2)</sup> | 5.78 ± 1.02 <sup>2)</sup>    |
|     | 600                        | 166.76 ± 24.39 <sup>3)</sup> | 5.15 ± 1.51 <sup>3)</sup>    |

**3.4 SEE 对小鼠脑组织中 p19, p53, p21 mRNA 表达的影响** 与空白组比较, 模型组小鼠脑组织 p19, p53, p21 mRNA 表达量明显增多 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, SEE 300, 600 mg·kg<sup>-1</sup> 组小鼠脑组织 p19, p53, p21 mRNA 明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 且 p19 与 p21 mRNA 随着给药剂量的增加逐渐减少。提示 SEE 可能通过抑制 p19, p53, p21 mRNA 表达而发挥抗衰老作用。见表 4。

表 4 SEE 对小鼠脑组织 p19, p53, p21 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of SEE on p19, p53, p21 mRNA expression in brain tissues of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别  | 剂量<br>/mg·kg <sup>-1</sup> | p19                         | p21                       | p53                       |
|-----|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 空白  | -                          | 1.03 ± 1.21                 | 1.02 ± 0.14               | 1.05 ± 0.29               |
| 模型  | -                          | 2.13 ± 0.18 <sup>1)</sup>   | 1.81 ± 0.81 <sup>1)</sup> | 3.32 ± 0.30 <sup>1)</sup> |
| SEE | 150                        | 1.99 ± 0.07 <sup>4)</sup>   | 1.77 ± 0.14               | 2.84 ± 0.20               |
|     | 300                        | 1.79 ± 0.10 <sup>2)</sup>   | 1.59 ± 0.09 <sup>2)</sup> | 2.78 ± 0.09 <sup>2)</sup> |
|     | 600                        | 1.56 ± 0.08 <sup>3,4)</sup> | 1.52 ± 0.11 <sup>2)</sup> | 2.52 ± 0.15 <sup>2)</sup> |

**3.5 SEE 的抗氧化活性** 通过空白组的吸光度曲线可知, 亚油酸体系的自氧化十分迅速, 在体系中添加了 SEE 及 VE 可以有效抑制亚油酸的自氧化。在 36 h 后, 5 g·L<sup>-1</sup> SEE 对亚油酸氧化体系的抑制强于同等质量浓度 VE, 72 h 时 A 为 0.435, 而 VE A 为 0.536, 且其对抑制亚油酸自氧化强于 VE ( $P <$

0.05)。见图 1。

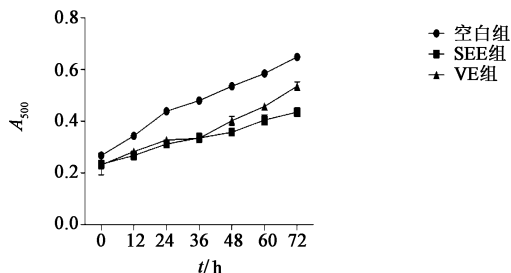


图 1 五味子淫羊藿混合提取物和 VE 在亚油酸体系抗氧化作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Antioxidation effect of SEE and VE in Linoleic acid system ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

3.6 SEE 还原能力 在 SEE  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,SEE 对  $\text{Fe}^{3+}$  的还原能力强于同等质量浓度 VE ( $P < 0.05$ ), 表明 SEE 具有较好的抗氧化能力, A 随着 SEE 浓度的增加有显著的增加。见图 2。

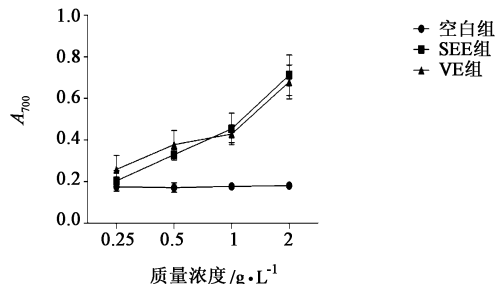


图 2 五味子淫羊藿混合提取物和 VE 对  $\text{Fe}^{3+}$  还原性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect of SEE and VE on  $\text{Fe}^{3+}$  reducibility ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

本文依据中医学理论将五味子与淫羊藿进行组方,此以五味子益气敛阴和以淫羊藿补肾壮阳,将五味子与淫羊藿进行组方并行混合提取,得到的提取物 SEE 能够明显改善 D-半乳糖致衰老小鼠的学习记忆能力,以期获得具有辅助改善记忆功能及抗氧化功能的新配方。

皮下连续注射 D-半乳糖是常用的构建脑衰老模型的方法<sup>[13-14]</sup>,本研究通过避暗实验及跳台实验来观察 SEE 对该脑衰老模型小鼠的学习记忆能力的影响。结果表明,SEE 能够显著提高脑衰老小鼠的学习记忆能力。其中跳台实验第 2 天各组小鼠潜伏期中,SEE  $150, 300, 600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  随着剂量的增加,潜伏期逐渐延长;避暗实验中,SEE  $300, 600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  随着剂量的增加,潜伏期逐渐延长,提示 SEE 对脑衰老小鼠的学习记忆能力具有明显改善作用,该作用可能存在剂量依赖性。

自由基损伤学说是关于脑衰老的机制最具影响力的学说。本研究结果显示 SEE 能够升高小鼠脑组织中的 SOD 活力,降低 MDA 含量,提示 SEE 的抗脑衰老作用可能与其抗氧化作用有关<sup>[15]</sup>。为了进一步明确 SEE 的抗氧化作用,本研究采用了亚油酸-硫氰酸铁法及 Oyaizu 法对 SEE 进行体外抗氧化能力的检测。研究表明 SEE 对亚油酸自氧化体系具有抑制作用,对  $\text{Fe}^{3+}$  具有较强的还原作用,提示应用混合提取方法所得的 SEE 具有显著的抗氧化作用,该作用可能是其改善学习记忆功效的主要机制之一。

细胞应激因素,可引发细胞周期停滞、细胞衰老或凋亡,进而限制受损细胞分裂增殖,防止细胞恶变<sup>[16-17]</sup>。p53 作为一种位于多种调控网络关键节点的蛋白,对维持细胞周期,保证细胞基因组完整以及各种细胞应激反应,都具有非常重要的作用<sup>[18]</sup>。p19<sup>ARF</sup> 是 p53 的上游基因,p19<sup>ARF</sup> 表达可阻抑 mdm2 往返于细胞核-细胞质,p19<sup>ARF</sup> 通过拖拽 mdm2 来增加 p53 表达。p53 的下游靶分子是 p21,p21 是 cyclin 依赖的蛋白激酶的抑制剂,能抑制细胞周期,使细胞进入不可逆性生长停滞。p21 是广谱的细胞周期抑制剂,通过特异性抑制 cyclin D1-CDK4/CDK6, cyclin E-CDK2, cyclin A-CDK2 的蛋白激酶活性,既可导致 G<sub>1</sub> 期停滞,也可以导致 G<sub>2</sub> 期停滞<sup>[18]</sup>。本研究在 RNA 水平上对各实验组小鼠脑组织中 p19, p53, p21 mRNA 表达进行了检测,结果显示 SEE 能够降低衰老模型小鼠脑组织中 p19, p53, p21 mRNA 的表达,提示 SEE 可能通过下调 p19, p53, p21 mRNA 而调节细胞周期发挥抗衰老作用。

综上,本研究证实了 SEE 对 D-半乳糖致脑衰老小鼠的学习记忆能力具有改善作用,该作用可能与其提高小鼠抗氧化能力以及降低小鼠脑组织中 p19, p53, p21 mRNA 表达水平有关。

#### [参考文献]

[ 1 ] Donmez G. Sirtuins as possible targets in neurodegenerative diseases [ J ]. Curr Drug Targets, 2013, 14 ( 6 ) : 644-647.

[ 2 ] Harman D A. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry [ J ]. Int J Gerontol, 1956, 11 ( 3 ) : 298-300.

[ 3 ] 韩广明. 何首乌饮对衰老大鼠脑组织细胞 Rb/p53 信号转导通路影响 [ J ]. 河北医学, 2011, 17 ( 1 ) : 126-129.

[ 4 ] Cmielová J, Rezáčová M. p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization [ J ]. J Cell

- Bio Chem, 2011, 112(12):3502-3506.
- [ 5 ] ZHANG R W, WANG Y L, ZHU D, et al. The protective effect of North Schisandra Lignans on vascular endothelial cell oxidation injuries [ J ]. Technol Health Care, 2016, doi: 10. 3233/THC-161192.
- [ 6 ] 包宇, 杨建雄. 淫羊藿苷与淫羊藿次苷 II 的体外抗氧化作用 [ J ]. 吉林大学学报: 医学版, 2012, 38(3): 423-428.
- [ 7 ] 商红军, 孟宪军, 李斌, 等. 五味子乙素体外抗氧化及抑菌作用的研究 [ J ]. 食品工业科技, 2012, 33(2): 170-173.
- [ 8 ] 王丽娟, 王庆妍, 王勇, 等. 淫羊藿对记忆障碍小鼠学习记忆能力的影响 [ J ]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(6): 665-666.
- [ 9 ] 吕珊珊, 唐桂英, 杨超, 等. 小儿黄龙颗粒对记忆障碍模型小鼠学习记忆功能的影响 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14): 172-177.
- [ 10 ] 姚宏波, 王月静, 廉洁, 等. 复方地黄对 AD 大鼠学习记忆及 Wnt 通路相关蛋白表达的影响 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(13): 107-111.
- [ 11 ] 闫旭, 刘璇, 毕金峰, 等. 干燥方法对番石榴活性物质含量及抗氧化能力的影响 [ J ]. 食品科学, 2016, 37(17): 57-64.
- [ 12 ] 李晓彤, 魏静, 谷满屯, 等. 鹧鸪茶提取物抗氧化活性研究与抗氧化特征成分的 HPLC-MS/MS 分析 [ J ]. 食品科技, 2015, 40(10): 265-269.
- [ 13 ] 斯琴, 刘铜华. 蒙药手掌参-37 味丸对亚急性衰老模型小鼠的抗衰老作用及其机制 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 194-197.
- [ 14 ] 于春艳, 于春荣, 李贺, 等. 五味子总木脂素减轻内质网途径凋亡延缓小鼠脑衰老 [ J ]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(11): 1967-1973.
- [ 15 ] 付燕, 谢攀, 李雪, 等. 长期有氧运动对大鼠脑衰老过程中学习记忆与海马 BDNF 表达的影响 [ J ]. 中国运动医学杂志, 2015, 34(8): 750-756.
- [ 16 ] Krejci O, Wunderlich M, Geiger H. p53 signaling in response to increased DNA damage sensitizes AML1-ETO cells to stress-induced death [ J ]. More Information Blood, 2008, 111(4): 2190-2198.
- [ 17 ] Cuenin S, Tinel A, Janssens S. p53-induced protein with a death domain ( PIDD ) isoforms differentially activate nuclear factor-kappaB and Caspase-2 in response to genotoxic stress [ J ]. Oncogene, 2008, 27(3): 389-396.
- [ 18 ] Ramani R G, Jacob S G. Prediction of p53 mutants ( Multiple Sites ) transcriptional activity based on structural ( 2D&3D ) properties [ J ]. PLoS One, 2013, 8(2): e55401.

[责任编辑 张丰丰]