

五味子木脂素改善衰老小鼠学习记忆能力的机制

郭笑, 叶玉洁, 宋昆, 安丽萍, 盛瑜*

(北华大学药学院, 吉林 吉林 132013)

[摘要] 目的:研究五味子木脂素(Schisandrae Chinensis Fructus lignans, SCL)对D-半乳糖(D-galactose, D-gal)所致衰老模型小鼠学习记忆能力的改善作用。方法:ICR小鼠随机分为4组,即正常组(灌胃蒸馏水,皮下注射生理盐水),模型组(灌胃蒸馏水,皮下注射200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ D-gal),吡拉西坦组(灌胃吡拉西坦200 mg·kg⁻¹·d⁻¹,皮下注射D-gal 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹),SCL低剂量组(灌胃SCL 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹,皮下注射D-gal 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹),SCL中剂量组(灌胃SCL 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹,皮下注射D-gal 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹),SCL高剂量组(灌胃SCL 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹,皮下注射D-gal 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹),连续给药10周;通过避暗实验及Morris水迷宫实验观察SCL对D-gal致衰老模型小鼠学习记忆能力的影响;通过化学比色法检测小鼠脑组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量;通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测小鼠脑组织中过氧化物还原酶-6(peroxiredoxin-6, Prdx6),谷胱甘肽过氧化物酶1(glutathione peroxidase 1, GSH-Px1) mRNA表达情况;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠组织中Prdx6, GSH-Px1蛋白表达情况。结果:行为学实验中,与正常组比较,模型组小鼠避暗错误次数明显增加($P<0.05$),潜伏期显著减少($P<0.01$),小鼠穿台次数和目标象限停留时间显著减少($P<0.01$),可作为建模成功的指标。与模型组比较,吡拉西坦组,SCL中、高剂量组小鼠避暗错误次数明显减少($P<0.05$, $P<0.01$),潜伏期明显延长($P<0.05$, $P<0.01$),同时,SCL高剂量组小鼠水迷宫穿台次数和目标象限停留时间显著增加($P<0.01$)。与正常组比较,模型组小鼠脑组织中的SOD活力显著降低($P<0.01$),MDA含量增加($P<0.05$),Prdx6, GSH-Px1 mRNA及蛋白表达量明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,吡拉西坦组,SCL低、中、高剂量组小鼠脑组织中SOD活力增高($P<0.05$),MDA水平降低($P<0.05$),Prdx6, GSH-Px1 mRNA及蛋白的表达水平显著升高($P<0.05$, $P<0.01$),说明SCL给药组具有剂量依赖性。结论:SCL能改善D-gal致衰老模型小鼠学习记忆能力,该作用可能与SCL提高小鼠抗氧化能力及上调小鼠脑组织中Prdx6, GSH-Px1的表达水平有关。

[关键词] 五味子木脂素; 学习记忆能力; 谷胱甘肽过氧化物酶1; 过氧化物还原酶-6

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)14-0085-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201226

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200414.1642.002.html>

[网络出版日期] 2020-4-15 08:53

Mechanism of Schisandrae Chinensis Fructus Lignans in Alleviating Learning and Memory Ability in D-galactose Aging Mice

GUO Xiao, YE Yu-jie, SONG Kun, AN Li-ping, SHENG Yu*

(College of Pharmacy, Beihua University, Jilin 132013, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Schisandrae Chinensis Fructus lignans (SCL) on learning and memory ability of D-galactose (D-gal)-induced aging model mice. **Method:** ICR mice were randomly divided into 4 groups: normal group (distilled water, subcutaneous injection with normal saline), model group (distilled water, subcutaneous injection with 200 mg·kg⁻¹ D-gal), piracetam group (oral administration with 200 mg·kg⁻¹ piracetam, subcutaneous injection with 200 mg·kg⁻¹ D-gal), low-dose SCL group (oral

[收稿日期] 20200402(039)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31900918);吉林省教育厅“十三五”科学技术项目(JJKH20180374KJ);吉林省科技发展计划项目(20170311039YY,20180520051JH);吉林省卫生健康青年科技骨干培养计划项目(2019Q020)

[第一作者] 郭笑,博士,讲师,从事分子生物学研究,E-mail:395798544@qq.com

[通信作者] *盛瑜,博士,讲师,从事药物分析研究,Tel:0432-64608008,E-mail:383165810@qq.com

administration with $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SCL, subcutaneous injection with $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ D-gal), medium-dose SCL group (oral administration with $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SCL, subcutaneous injection with $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ D-gal), high-dose SCL group (oral administration with $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ SCL, subcutaneous injection with $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ D-gal). The drugs were administered continuously for 10 weeks. Dark test and Morris water maze test were performed to observe the effect of SCL on the learning and memory ability of D-gal-induced aging mice. The activities of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in mouse brain tissue were detected by chemical colorimetry. The expressions of peroxiredoxin-6 (Prdx6) and glutathione peroxidase 1 (GSH-Px1) mRNA in mouse brain tissue were detected by polymerase chain reaction (PCR). The expressions of Prdx6 and GSH-Px1 protein in mouse tissues were detected by Western blot. **Result:** In behavioral experiments, compared with normal group, the number of dark avoidance errors in model group significantly increased ($P < 0.05$), the latency was significantly reduced ($P < 0.01$), and the number of mouse passes and the target quadrant residence time were significantly reduced ($P < 0.01$), which can be used as an indicator of successful modeling. Compared with the model group, the number of errors in the piracetam group, and medium and high-dose SCL groups was significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the latency was significantly prolonged ($P < 0.05$, $P < 0.01$). At the same time, the number of water maze passes and the target quadrant retention time in the high-dose SCL group increased significantly ($P < 0.01$). The results of biochemical indicators showed that compared with normal group, the SOD activity in brain tissue of model group mice was significantly reduced ($P < 0.01$), while the MDA content was increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, SOD activity in the brain tissues of piracetam group, and low, medium and high-dose piracetam groups was significantly increased ($P < 0.05$), whereas the level of MDA was reduced ($P < 0.05$). The expressions of Prdx6 and GSH-Px1 were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), indicating that the SCL administration group was dose-dependent. **Conclusion:** SCL can improve the learning and memory ability of D-gal-induced aging mice, which may be related to the anti-oxidation ability of SCL and the up-regulation of Prdx6 and GSH-Px1 expressions in mouse brain tissue.

[Key words] Schisandrae Chinensis Fructus lignans; learning and memory ability; glutathione peroxidase 1 (GSH-Px1); peroxiredoxin-6 (Prdx6)

衰老是机体各组织、器官功能随年龄增加而发生的退行性变化,受体内外诸多因素影响如环境污染、精神紧张、遗传等。大脑是所有活体动物最重要的器官之一,由于大脑中含有大量的可氧化底物,如多不饱和脂肪酸和神经递质,因此比其他器官更容易受到损伤^[1]。因而学习和记忆能力的下降是伴随衰老而出现的一种常见现象^[2]。随着社会人口老龄化趋势发展迅速,越来越多的人受到学习和记忆能力下降症状的困扰,抗衰老已成为目前研究的热点问题之一。自由基学说是具有代表性且最被科学家认可的衰老学说之一,即生物体的衰老过程是机体的组织细胞不断产生的自由基积累结果。机体内抗氧化酶类在清除过量自由基过程中发挥重要作用。已有研究表明抗氧化酶成员超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化物还原酶(Prdx)与抗衰老调控过程密切相关,他们通过有效清除机体内超氧化物、过氧化物及脂质过氧化物,阻断活性氧(ROS)对机体的损伤,被称为

体内抗衰老因子^[3]。与此同时,实验证实大多抗衰老药物都会通过调控机体内抗氧化酶的表达及活性,进而发挥其抗衰老作用。

中草药由于相对较低的毒性作用和明确的治疗效果,成为人们研究与开发改善学习、记忆能力药物的研究热点。五味子作为我国著名的中药材,因其果实甘、酸、辛、苦、咸五味俱全,故名五味子,具有收敛固涩、益气生津、补肾宁心等功效^[4]。五味子木脂素(SCL)作为其有效成分之一,具有保肝、提高免疫力、抗突变以及抗肿瘤等多重功效^[5-6]。已有报道 SCL 在治疗氧化应激所致的神经退行性疾病^[7]、脑缺血^[8]中具有较好疗效,并且本课题组前期研究显示,SCL通过调节自噬作用和抑制细胞凋亡来延缓小鼠衰老^[9]。本研究为了进一步考察 SCL 改善衰老模型小鼠学习记忆能力是否与调节相应的抗氧化酶有关,探讨其可能的作用机制。首先建立 D-半乳糖(D-gal)致衰老小鼠模型,给与 SCL 作用后,通过避暗实验及 Morris 水迷宫实验观察 SCL 对

D-gal致衰老小鼠学习记忆能力的影响,基于聚合酶链式反应(PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠脑组织中过氧化物还原酶-6(Prdx6),谷胱甘肽过氧化物酶1(GSH-Px1)mRNA及蛋白的表达情况。相关结果一定程度上是对现有SCL抗衰老作用机制的补充,为开发SCL作为具有抗衰老、改善记忆功能药物及保健食品提供重要的理论依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康雄性ICR小鼠72只,体重(20±2)g,由吉林大学实验动物研究中心提供,许可证号SCXK(吉)-2016-0003,小鼠采取分笼饲养,且维持12h:12h昼夜循环,饲料供给充足,自由饮水。本实验符合北华大学实验动物伦理委员会审查批准要求,批准号2018050207。

1.2 药物与试剂 五味子(吉林省集安五味子种植基地,由北华大学药学院生药教研室李凤丽教授鉴定为木兰科植物五味子*Schisandra chinensis*的成熟干燥果实)。SCL为实验室自己提取,参考前期研究基础^[10],五味子干燥至恒重后研磨成粉末,利用超临界CO₂流体萃取SCL,得率为18.65%。*D*-gal(美国Sigma公司,批号BG3107);吡拉西坦(东北制药集团沈阳第一制药有限公司,批号6180318);二氧化钛、无水乙醇、巯基乙醇(天津永大试剂公司,批号分别为20171122,20181006,20170612);超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20180702,20180629);RNA提取试剂盒(美国Vazyme公司,批号7E250G8);PCR试剂盒(美国Invitrogen公司,批号18064-014);过硫酸铵,30%丙烯酰胺,甘氨酸,DEPC水(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号分别为76270102100,812170102300,95050105200,TRE011-1);Tris,TEMED(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为T8060,T8133);脱脂奶粉(美国BD公司,批号8211649); β -肌动蛋白(β -actin),GSH-Px1,Prdx6兔抗鼠单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)(ABclone公司,批号分别为AC006,A1110,A2031,AS014);ECL显色液、彩虹预染蛋白Marker[赛默飞世尔科技(中国)有限公司,批号分别为7E26018,20190321]。

1.3 仪器 infinite M200型全自动酶标仪(瑞士Tecan公司);TM-100型Morris水迷宫(中国成都泰盟技术有限责任公司);BA-200型小鼠避暗仪(中国成都泰盟技术有限责任公司);SW-CJ-2D型双人净

化工作台(中国上海苏净实业有限公司);mini PROTEAN 3 cell型Western blot凝胶电泳仪,转膜仪(美国Bio-Rad公司);2720型PCR扩增仪(美国应用生物系统中国公司);DL-600C型电泳仪(东林昌盛生物);sagecreation型全自动多色荧光及化学发光凝胶成像系统(中国北京赛智创业科技有限公司);5430R型低温高速离心机(美国艾本德公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 ICR小鼠随机分为4组,每组18只,连续给药10周,给药剂量结合前期实验确定^[11]。正常组灌胃蒸馏水,颈部皮下注射生理盐水;模型组灌胃蒸馏水,颈部皮下注射*D*-gal 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹;吡拉西坦组灌胃200 mg·kg⁻¹·d⁻¹吡拉西坦,颈部皮下注射*D*-gal 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹;SCL低剂量组(灌胃SCL 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹,颈部皮下注射*D*-gal 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹);SCL中剂量组(灌胃SCL 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹,皮下注射*D*-gal 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹);SCL高剂量组(灌胃SCL 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹,皮下注射*D*-gal 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。

2.2 指标检测

2.2.1 避暗实验 给药第9周进行避暗实验,避暗仪底部通36V,50Hz交流电,先将小鼠放入反应箱中训练3min。测试开始时,将小鼠面部背对洞口放入明室中,记录5min内小鼠进入暗室的次数和首次进入暗室的时间,即错误次数和潜伏期,间隔24h后进行第2次实验。

2.2.2 Morris水迷宫实验 避暗实验结束后进行Morris水迷宫定位航行实验。首先将小鼠面向池壁从除平台所在象限之外的3个象限中分别放入水中1次,设定实验时间为120s,小鼠从入水到找到安全平台所需的时间即为逃避潜伏期(latency period)。若120s内找到平台,则使其在平台上停留10s;若120s内未找到平台,则将其引导至平台,并停留10s,潜伏期记录为120s。定位航行实验连续6d。第7天开始空间搜索,撤掉平台,将小鼠从第Ⅱ象限入水,持续时间120s。记录小鼠在第Ⅲ象限停留时间和穿台次数。

2.2.3 试剂盒检测衰老小鼠脑组织中SOD活力和MDA含量 行为学实验后,各组随机取6只小鼠断髓处死,立即开颅取脑分离出脑组织,称质量后在冰上匀浆制备成10%的小鼠脑组织匀浆液,将匀浆液4℃,3000 r·min⁻¹离心15min,留上清液按照试剂盒说明书方法测定各组小鼠脑组织中SOD活力和MDA含量。

2.2.4 逆转录(RT)-PCR检测脑组织中Prdx6, GSH-Px1 mRNA的表达水平 各组各随机取6只小鼠按照2.2.3项下方法摘取脑组织,应用试剂盒提取组织总RNA,逆转录按照PCR试剂盒说明操作,PCR反应条件:50℃ 30 min,94℃ 3 min,1个循环;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,30个循环;72℃ 5 min,1个循环。引物序列由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成,见表1。利用Image J图像处理软件分析电泳结果图,以获得内参基因 β -actin和目的基因Prdx6, GSH-Px1的吸光度比值来表示相对含量。

表1 PCR引物序列

Table1 Primer sequences

引物	序列	长度/bp
Prdx6	上游 5'-TGGGAGATTCATGGGGCATT-3'	261
	下游 5'-TGCCCAAAAGGATGGCAAGG-3'	
GSH-Px1	上游 5'-AGTCCACCGTGTATGCCTT-3'	202
	下游 5'-TGATTGCACGGGAAACCGAG-3'	
β -actin	上游 5'-GGCTGTATTCCCTCCATCG-3'	154
	下游 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'	

2.2.5 Western blot检测脑组织中Prdx6, GSH-Px1蛋白表达 将各组剩余的6只小鼠按照2.2.3项下方法摘取脑组织,加入RAPI裂解液,冰上匀浆,裂解30 min,4℃,12 000 r·min⁻¹离心5 min,取上清液,BCA试剂盒测定脑组织蛋白含量。以12%

表2 SCL对衰老小鼠学习记忆能力的影响($\bar{x}\pm s, n=18$)

Table 2 Effect of SCL on learning and memory in aging mice ($\bar{x}\pm s, n=18$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	错误次数/次		潜伏期/s	
		第1天	第2天	第1天	第2天
正常	-	6.20±2.17	4.00±2.55	49.18±23.53	118.88±24.17
模型	-	10.30±1.77 ¹⁾	6.90±2.08 ¹⁾	19.60±10.96 ¹⁾	34.66±23.71 ²⁾
吡拉西坦	200	5.20±2.20 ⁴⁾	3.20±2.90 ⁴⁾	39.70±13.00	111.73±9.85 ⁴⁾
SCL	50	9.60±2.45	6.00±1.50	20.04±8.33	40.98±7.69
	100	8.00±1.67 ³⁾	5.20±1.33 ³⁾	23.69±11.05	60.75±15.42 ³⁾
	200	5.40±1.60 ⁴⁾	3.80±2.55 ⁴⁾	28.28±16.91	105.20±23.34 ⁴⁾

注:与正常比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与模型比较³⁾P<0.05,⁴⁾P<0.01(表3~6同)。

3.2 Morris水迷宫实验观察SCL对衰老小鼠学习记忆能力的影响 与正常组比较,模型组衰老小鼠潜伏期显著增加(P<0.01),可作为衰老模型建立成功的指标。与模型组比较,吡拉西坦组小鼠潜伏期显著减少(P<0.01),SCL高剂量组小鼠潜伏期明显

减少(P<0.05)。与正常组比较,模型组小鼠穿台次数和目标象限停留时间显著减少(P<0.01),可作为模型建立成功指标之一;与模型组比较,吡拉西坦组穿台次数和目标象限停留时间明显增加(P<0.05,P<0.01),SCL中剂量组目标象限停留时间明

2.3 统计学方法 采用SPSS 17.0软件对实验数据进行统计学分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两样本间比较采用t检验,以P<0.05为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 避暗实验观察SCL对衰老小鼠学习记忆能力的影响 避暗实验显示,各组避暗错误次数第2天比第1天减少,潜伏期第2天均比第1天延长。第2天,与正常组比较,模型组小鼠避暗错误次数明显增加(P<0.05),潜伏期显著减少(P<0.01),可作为模型建立成功指标之一。与模型组比较,吡拉西坦组错误次数显著减少(P<0.01),潜伏期显著增加(P<0.01),SCL中、高剂量组错误次数减少,潜伏期增加(P<0.05,P<0.01),SCL给药组具有剂量依赖性。避暗结果表明D-gal衰老小鼠模型建立成功,且SCL能改善D-gal衰老小鼠学习记忆能力。见表2。

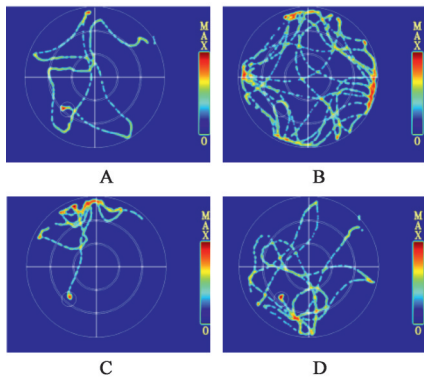
显著增加($P < 0.05$), SCL高剂量组穿台次数和目标象限停留时间明显增加($P < 0.05, P < 0.01$)。提示

D-gal致衰老小鼠模型构建成功, SCL能提高D-gal致衰老小鼠的学习记忆能力。见表3, 图1。

表3 SCL对衰老小鼠学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s, n=18$)

Table 3 Effect of SCL on Morris water maze experiment in aging mice ($\bar{x} \pm s, n=18$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	定位航行潜伏期 /s	空间探索	
			穿台次数/次	目标象限停留时间/s
正常	-	40.40±25.30	4.70±1.37	54.70±7.23
模型	-	110.10±22.25 ²⁾	2.20±0.75 ²⁾	27.60±4.65 ²⁾
吡拉西坦	200	45.32±6.44 ⁴⁾	4.20±1.83 ³⁾	45.00±7.95 ⁴⁾
SCL	50	90.20±18.62	2.50±0.45	24.10±6.56
	100	78.45±15.42	2.80±1.22	31.56±8.51 ³⁾
	200	58.93±18.09 ³⁾	3.30±1.75 ³⁾	39.60±5.10 ⁴⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 吡拉西坦组; D. SCL高剂量组

图1 典型的Morris水迷宫小鼠轨迹

Fig. 1 Typical trajectory heat map of aging mice in Morris water maze test

3.3 SCL对衰老小鼠脑组织中SOD活力和MDA含量的影响 与正常组比较, 模型组小鼠脑组织中的SOD活力显著降低($P < 0.01$), MDA含量明显增加($P < 0.05$)。与模型组比较, 吡拉西坦组的SOD活力显著升高($P < 0.01$), MDA含量显著减少($P < 0.01$), SCL中、高剂量组MDA含量明显减少($P < 0.05$), SCL高剂量组SOD活力明显升高($P < 0.05$), SCL给药组SOD活力呈剂量依赖性递升, 且MDA含量呈剂量依赖性递减。见表4。

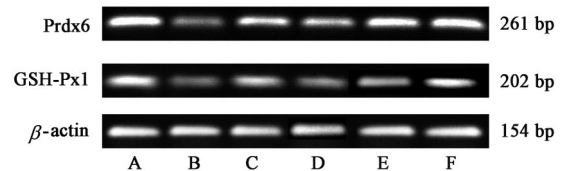
3.4 SCL对衰老小鼠脑组织中Prdx6, GSH-Px1 mRNA表达的影响 与正常组比较, 模型组衰老小鼠脑组织Prdx6 mRNA, GSH-Px1 mRNA相对表达量明显下降($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 吡拉西坦组Prdx6, GSH-Px1 mRNA表达量均明显升高($P < 0.05$), SCL中剂量组Prdx6, GSH-Px1 mRNA表达量均明显升高($P < 0.05$), SCL高剂量组小鼠

表4 SCL对衰老小鼠脑组织中氧化因子的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of SCL on oxidative factors in brain tissues of aging mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	MDA /μmol·L ⁻¹
正常	-	160.17±4.60	16.88±5.62
模型	-	55.10±6.25 ²⁾	27.41±3.61 ¹⁾
吡拉西坦	200	98.92±4.46 ⁴⁾	12.05±3.85 ⁴⁾
SCL	50	60.52±5.69	25.74±5.66
	100	69.47±6.58	18.62±5.72 ³⁾
	200	83.50±5.72 ³⁾	13.96±4.93 ³⁾

Prdx6, GSH-Px1 mRNA表达量明显升高($P < 0.05, P < 0.01$), 呈剂量依赖性递增。见图2, 表5。



A. 正常组; B. 模型组; C. 吡拉西坦组; D-F. SCL低, 中, 高剂量(50, 100, 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组(图3同)

图2 衰老小鼠脑组织中Prdx6, GSH-Px1 mRNA表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of mRNA expressions of Prdx6, GSH-Px1 genes in brain tissues of aging mice

3.5 SCL对衰老小鼠脑组织中Prdx6, GSH-Px1蛋白相对表达的影响 与正常组比较, 模型组衰老小鼠脑组织Prdx6, GSH-Px1蛋白表达水平显著下降($P < 0.01$); 与模型组比较, 吡拉西坦组小鼠Prdx6, GSH-Px1蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$), SCL低剂量组Prdx6蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$), SCL中、高剂量组Prdx6, GSH-Px1蛋白表达水平明

表5 SCL对衰老小鼠脑组织中Prdx6, GSH-Px1 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of SCL on mRNA expressions of Prdx6, GSH-Px1 genes in brain tissues of aging mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	Prdx6 /β-actin	GSH-Px1 /β-actin
正常	-	119.06±6.33	154.45±4.67
模型	-	82.25±5.33 ¹⁾	70.14±3.33 ²⁾
吡拉西坦	200	102.33±7.67 ³⁾	98.34±3.33 ³⁾
SCL	50	82.72±2.67	71.84±6.67
	100	105.95±4.33 ³⁾	82.23±7.33 ³⁾
	200	112.38±8.67 ³⁾	105.76±5.33 ⁴⁾

显升高($P<0.05, P<0.01$),且呈剂量依赖性。见图3,表6。

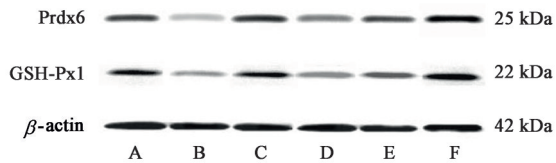


图3 衰老小鼠脑组织中Prdx6, GSH-Px1蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of Prdx6, GSH-Px1 genes in brain tissues of aging mice

表6 SCL对衰老小鼠脑组织中Prdx6, GSH-Px1蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of SCL on protein expressions of Prdx6, GSH-Px1 in brain tissues of aging mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	Prdx6 /β-actin	GSH-Px1 /β-actin
正常	-	56.52±2.33	66.38±4.67
模型	-	21.48±6.67 ²⁾	25.82±3.33 ²⁾
吡拉西坦	200	72.43±4.33 ⁴⁾	76.84±6.33 ⁴⁾
SCL	50	42.22±5.67 ³⁾	36.05±7.67
	100	63.24±2.67 ³⁾	57.66±4.33 ³⁾
	200	90.79±5.33 ⁴⁾	101.11±5.33 ⁴⁾

4 讨论

五味子最早列于《神农本草经》为上品中药,药用其成熟、干燥果实,其含有挥发油、多糖、木脂素及维生素等活性成分,在对心脑血管、神经系统、呼吸系统、免疫系统疾病及抗衰老方面具有较好的功效。基于此,古人已对五味子的药用有了极高的评价与应用,但现如今对于五味子尚缺乏深入细致的研究。木脂素是五味子重要活性成分之一,已有关于SCL抗衰老的报道,但其作用机制仍不完善,本

研究基于D-gal诱导的衰老小鼠模型,进一步对SCL抗衰老机制进行补充。

随着年龄的增加,自由基逐渐在机体中累积,最终使体内自由基的产生和机体的抗氧化防御之间产生不平衡,这被称为“氧化应激”^[12-13]。氧化应激可导致细胞和组织损伤以及氧化还原敏感信号通路的失调,与此同时氧化应激还会随着衰老而增加^[14]。D-gal通常被用作建立学习和记忆力障碍动物模型,D-gal在细胞中浓度升高,可被醛糖还原酶转化为半乳糖醇,而半乳糖醇在细胞中不能代谢;半乳糖功能障碍和代谢紊乱造成抗氧化防御系统的损害和过度激活,导致抗氧化酶活性下降,加速小鼠脑老化,导致学习和记忆障碍^[15]。本研究利用D-gal诱导衰老小鼠模型,结果表明与空白组比较,模型组小鼠的学习记忆力在避暗实验和水迷宫实验中明显下降,说明可以基于该模型研究五味子木脂素对大脑衰老的作用。当给予衰老小鼠SCL后,行为学研究结果显示SCL可以显著提高衰老小鼠学习记忆能力。

大量研究表明,机体衰老后体内抗氧化剂减少,导致自由基增加并过量积累。SOD作为机体重要的抗氧化酶能够清除超氧阴离子自由基保护机体免受氧化损伤,其通常与脂质过氧化物产物MDA共同反映出机体受自由基损伤程度^[16]。本研究结果显示,D-gal可以导致小鼠脑组织中SOD活性降低以及MDA含量升高,使小鼠脑组织受到氧化损伤,而SCL可提高D-gal致衰老小鼠脑组织中SOD活性,降低MDA含量,显示出较强的抗氧化能力。

GSH-Px和Prdx是近年来备受关注的两类抗氧化蛋白超家族,在还原过氧化氢及多种脂质过氧化物中发挥重要作用^[17]。Prdx6是Prdx家族成员中具有非硒依赖性谷胱甘肽过氧化物酶功能的蛋白,在清除活性氧簇中具有重要的抗氧化作用^[18-19]。GSH-Px1在抗氧化蛋白GSH-Px家族成员中活性最高功能最广,在机体内通过多种途径调节过氧化物水平,GSH-Px1过表达能够改善脑损伤小鼠海马区结构,进而改善其空间记忆能力^[20]。本研究RT-PCR和Western blot实验一致表明,SCL对D-gal致衰老模型小鼠的调节作用与上调Prdx6和GSH-Px1密切相关,且效果可与阳性药物媲美。由此可见,五味子作为传统天然药物,其提取物安全、有效,可避免化学药物所带来的不良反应,将五味子开发为保健食品或药品可提高种植户收入,拉动地

方食品及医药产业的发展。本研究将五味子木脂素改善小鼠学习记忆能力的作用机制与抗氧化酶联系在一起,为完善其作用机制提供理论依据。

综上所述,SCL可通过上调D-gal致衰老模型小鼠脑组织中Prdx6,GSH-Px1表达,进而保护脑组织免受活性氧的损伤,改善衰老模型小鼠学习记忆能力。该结果有助于将SCL开发具有辅助改善记忆能力的保健食品及药物,进而带来显著的社会和经济效益。

[参考文献]

[1] HUANG Y, MUCKE L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies[J]. Cell, 2012, 148(6): 1204-1222.

[2] RAFFAELLA D M. Sensing the breaks: cytosolic chromatin in senescence and cancer[J]. Trends Mol Med, 2017, 23(12): 1067-1070.

[3] 张玉串. 补肾健脾调肝法对去势雌性大鼠ER及衰老因子的研究[D]. 广州:广州中医药大学,2014.

[4] 刘杰,徐剑,郭江涛. 五味子活性成分及药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(11): 206-215.

[5] QIU F, LIU H, DUAN H, et al. Isolation, structural elucidation of three new triterpenoids from the stems and leaves of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill [J]. Molecules,2018,23(7):1624-1630.

[6] 魏雪苗,侯建成,刘洋,等. 五味子木脂素研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2018,39(2):115-118.

[7] SZOPA A, EKIERT R, EKIERT H. Current knowledge of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine) as a medicinal plant species: a review on the bioactive components, pharmacological properties, analytical and biotechnological studies[J]. Phytochem Rev,2017,16(2):195-218.

[8] ZHANG R, WANG Y, ZHU D, et al. The protective effect of north schisandra lignans on vascular endothelial cell oxidation injuries [J]. Technol Health Care,2016,29(s2): 651-657.

[9] 姜恩平,王帅群,王卓,等. 北五味子总木脂素对脑缺血模型大鼠神经细胞凋亡及p-Akt表达的影响[J]. 中国中药杂志,2014,39(9):1680-1684.

[10] 刘宏,李贺,苑荣爽,等. 北五味子总木脂素对C57BL/6小鼠高脂血症的影响[J]. 食品科学,2016,

37(11):218-221.

[11] 于春艳,于春荣,李贺,等. 北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.

[12] BERNHARD J E, MCKENNA G W, HAMILTON D A, et al. Inhibiting Ras prenylation increases the radiosensitivity of human tumor cell lines with activating mutations of Ras oncogenes [J]. Cancer Res,1998,58(8): 1754-1761.

[13] 原慧萍,杨泽. 氧化应激与衰老研究进展[J]. 中国老年保健医学,2015,13(5):14-17.

[14] HU D, YANG Z, YAO X, et al. Dibenzocyclooctadiene lignans from *Schisandra chinensis* and their inhibitory activity on NO production in lipopolysaccharide-activated microglia cells [J]. Phytochemistry, 2014, doi: 10.1016/j.phytochem.2014.04.014.

[15] CHEN L, YAO H, CHEN X, et al. Ginsenoside Rg₁ decreases oxidativestress and down-regulates Akt/mTOR signaling to attenuatecognitive impairment in mice and senescence of neural stemcells induced by D-galactose [J]. Neurochem Res, 2018, doi: 10.1007/s11064-017-2438-y.

[16] WU S X, HAN X M, JIANG X W, et al. The effects of two different multivitamins on aging mice [J]. Chinese J Physiol, 2017, 60(5):284-292.

[17] KOLTOVER V K. Free radical timer of aging: from chemistry of free radicals to systems theory of reliability [J]. Curr Aging Sci, 2017, 10(1): 12-17.

[18] KRISTINA F, FABIAN G, LINDA L, et al. Tyrosine substitution of a conserved active-site histidine residue activates plasmodium falciparum peroxiredoxin 6[J]. Protein Sci,2019,28(1):100-110.

[19] GUO J H, XING G L, FANG X H, et al. Proteomic profiling of fetal esophageal epithelium, esophageal cancer, and tumor-adjacent esophageal epithelium and immunohistochemical characterization of a representative differential protein, PRX6[J]. World J Gastroentero,2017,23(8):1434-1442.

[20] YANG Y F, XIE F Y, QIN D D, et al. The orphan nuclear receptor NR4A1 attenuates oxidative stress-induced β cells apoptosis via up-regulation of glutathione peroxidase 1 [J]. Life Sci, 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.027.

[责任编辑 张丰丰]