

大豆异黄酮对去卵巢大鼠学习记忆和脑内神经递质的影响

买文丽^{1,2}, 刘行海^{1,2}, 刘亮³, 刘红^{1,2}, 刘华^{1,2*}

(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)

[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脑内单胺类递质的影响。**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、苯甲酸雌二醇组、大豆异黄酮低、中、高剂量组。苯甲酸雌二醇组给大鼠苯甲酸雌二醇 ip 0.2 mg·kg⁻¹每周1次,IS低、中、高剂量组剂量分别 ig 给以大豆异黄酮 30, 60, 120 mg·kg⁻¹·d⁻¹,共3个月。观察各组大鼠 Morris 水迷宫学习能力,高效液相检测海马内单胺类神经递质,放射免疫法测定下丘脑内促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)的含量。**结果:**①与对照组比较,模型组前3d定位航行学习能力和空间探索能力明显降低($P < 0.05$);与模型组比较苯甲酸雌二醇组、IS中剂量组前3d定位航行学习能力和空间探索能力明显提高($P < 0.05$)。②与对照组比较模型组海马去甲肾上腺素(norepinephrine, NE),多巴胺(dopamine, DA),5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)含量明显降低($P < 0.05$);与模型组比较IS高剂量组海马NE含量增高($P < 0.05$);与模型组比较中剂量组和苯甲酸雌二醇组海马DA和5-HT含量明显增高($P < 0.05$)③与对照组比较模型组GnRH含量明显增高($P < 0.05$);与模型组比较苯甲酸雌二醇组、IS中、高剂量组GnRH含量明显降低($P < 0.05$)。**结论:**中剂量大豆异黄酮通过提高海马内NE,DA,5-HT含量,降低海马GnRH含量,提高去卵巢大鼠空间学习记忆能力。

[关键词] 大豆异黄酮; 学习记忆; 单胺类神经递质; 促性腺激素释放激素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0223-04

[doi] 10.11653/syjf2013210223

Influence of Isoflavone on Learning and Memory and Monoamine Neuro-transmitter in Ovariectomized Rats

MAI Wen-li^{1,2}, LIU Xing-hai^{1,2}, LIU Liang³, LIU Hong^{1,2}, LIU Hua^{1,2*}

(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)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects and mechanisms of isoflavone (IS) on spatial learning, memory and monoamine neuro-transmitter, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovariectomized rats. **Method:** The fifty Sprague-Dawley rats were ovariectomized. Ovariectomized rats were randomly divided into five groups, model group, estradiol benzoate (EB) group, IS low dose group, IS middle dose group, IS high dose group. EB group were treated with estradiol benzoate (0.2 mg·kg⁻¹) by intraperitoneal injection once a week. IS groups were treated with IS (30, 60, 120 mg·g⁻¹·d⁻¹) by gavage one time daily. The spatial learning and memory performance were evaluated with Morris watermaze task. The contents of monoamine neuro-transmitter in hippocampus were measured, and GnRH in hypothalamus was measured. **Result:** ① As compared with control group, the latency period of model group increased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, the

[收稿日期] 20130401(031)

[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,讲师,硕士,从事神经药理研究,E-mail:taipo1031@163.com

[通讯作者] *刘华,副教授,Tel:15508262226,E-mail:liuhua.224@163.com

latency period of EB group and IS middle dose group decreased significantly ($P < 0.05$). ②As compared with control group contents of norepinephrine (NE), dopamine (DA) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in hippocampus of model group decreased significantly ($P < 0.05$). As compared with model group, contents of NE in hippocampus of IS high dose group increased significantly ($P < 0.05$). As compared with model group, contents of DA and 5-HT in hippocampus of IS middle dose group, EB group increased significantly ($P < 0.05$). ③As compared with control group, contents of GnRH in hypothalamus of model group increased significantly ($P < 0.05$). As compared with model group, contents of GnRH in hypothalamus of IS middle and high dose group, EB group decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Isoflavone can improve the ovariectomized rats' impairment of spatial learning and memory by increasing contents of NE, DA, 5-HT in hippocampus. Otherwise, isoflavone can decrease contents of GnRH in hypothalamus.

[**Key words**] isoflavone; learning and memory; monoamine neuro-transmitter; GnRH

雌激素是维持妇女正常生理与心理所必需的内源性活性物质,它不仅作用于脑内与生殖相关的神经回路,而且还作用于与认知功能相关的神经回路从而影响学习和记忆^[1]。学习记忆是脑的重要功能,学习记忆的作用机制与单胺类神经递质 NE, DA, 5-HT 及神经肽密切相关,它们之间相互制约处于一种动态的平衡^[2]。由于雌激素治疗可能产生激素依赖恶性疾病发生的危险性^[3],使得人们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^[4-5]。大豆异黄酮(isoflavone)是大豆的一类次生代谢产物,具有对低雌激素水平者可起到雌激素样功能,对高雌激素水平者可产生抗激素功能的双相调节能力^[6-7]。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脑内单胺类递质和 GnRH 的影响,从而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,动物合格证号 SCXK(川) 2010-08。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。大鼠饲养于川北医学院动物房。每天接受 12 h 光照/12 h 黑暗。光照周期为 8:00 ~ 20:00。实验室温度(20 ± 2) °C,湿度 60%,动物可以自行摄取标准饲料和清洁饮用水。动物实验遵守国际实验动物伦理学要求。

1.2 药品和试剂 40%天然大豆异黄酮(北京康源科技发展有限公司 2010080201),苯甲酸雌二醇(上海通用药业股份有限公司 2011031109),辛烷基磺酸钠(011443 fisher scientific 公司),柠檬酸钠(1K0351 Sigma 公司),NaH₂PO₄(054K0144, Sigma 公司),乙睛(063507 Fisher Scientific 公司),5-羟色胺(5-HT, 71K0671),多巴胺(DA, 72K4491),5-羟吲哚乙酸(069K0212),高香草酸(73K04775),去甲肾上腺素

(NE, 045K0891)对照品,均为 Sigma 公司产品。

1.3 仪器 空场实验计算机图像实时分析处理系统(成都太盟有限公司),Coul-Array 高效液相检测器(美国 ESA 公司),Triathler 型液体闪烁计数器(美国 Bioscan 公司)。

2 方法

2.1 分组和造模 大鼠随机分成 6 组:假手术组、去卵巢组、大豆异黄酮(IS)低、中、高剂量组剂量分别为 30, 60, 120 mg · g⁻¹ · d⁻¹、苯甲酸雌二醇组(0.2 mg · 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 · kg⁻¹) ip 麻醉,假手术组为单纯开腹,其他 5 组在无菌条件下切除双侧卵巢,术后每组均给予青霉素 ip 3 d。伤口愈合后假手术组和去卵巢对照组每日 ig 给予 0.9% 生理盐水,低、中、高剂量组每日 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 1 次,连续 12 周。

2.2 Morris 圆形水迷宫实验 各去卵巢组及对照组在术后第 3 个月进行水迷宫测试,连续测试 5 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 ± 1) °C。测试包括:①定位航行试验,历时 5 d,每天分上、下午两个时段,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,定位航行试验结束后撤除平台,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,将大鼠断头处死,迅速取出全脑,分离海马和下丘脑。称重后将脑冻存于 -80 °C 的冰箱中待检测。

2.3 神经递质检测 -80 °C 取出海马,按 1 g:1 L 加

入 $0.15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 高氯酸,匀浆, $15\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\ ^\circ\text{C}$ 离心 20 min ,取上清,进样 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 进行分析。高效液相流动相配置 (NaH_2PO_4 5.4 g , 柠檬酸 2.4 g , 辛烷基磺酸钠 0.184 g 以上试剂加入 450 mL 双蒸水,加入乙睛 50 mL , EDTA 0.25 mL)。标准曲线及定量计算:分别选择含有对照品 $50, 100, 200, 400 \text{ Pg}$ 4 个浓度的标准液 $20 \text{ }\mu\text{L}$ 进样检测,观察线性关系,反复进行 4 次,以各对照品峰面积均数对浓度作标准曲线。样品定量依据所测物质各自的峰面积查标准曲线求其含量面积计算。

2.4 下丘脑内 GnRH 含量测定 $-80\ ^\circ\text{C}$ 取出分离好的下丘脑,称重后,加入生理盐水,煮沸,加 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 0.5 mL 于匀浆器中制成匀浆,置 $4\ ^\circ\text{C}$ $1\sim 2 \text{ h}$,再用 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaOH 0.5 mL 中和 (pH 在 $6.9\sim 8.4$),放射免疫法测 GnRH 含量。

2.5 统计学处理 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 对去卵巢大鼠空间学习记忆的影响 定位

表 1 大豆异黄酮对去卵巢大鼠空间学习记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	寻台时间/s			穿台数 /次
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	
对照	-	$47.9 \pm 7.0^{2)}$	$12.8 \pm 2.3^{2)}$	$4.9 \pm 1.4^{2)}$	$7.0 \pm 1.8^{2)}$
模型	-	$60.2 \pm 7.5^{1)}$	$16.1 \pm 5.5^{1)}$	$7.4 \pm 1.5^{1)}$	$4.2 \pm 1.2^{1)}$
苯甲酸雌二醇	0.2	51.4 ± 11.9	13.9 ± 1.9	$6.1 \pm 2.0^{2)}$	$6.6 \pm 2.5^{2)}$
IS	30	52.4 ± 11.3	13.2 ± 2.7	6.7 ± 2.5	6.0 ± 2.0
	60	$49.8 \pm 5.7^{2)}$	$12.9 \pm 2.7^{2)}$	$6.5 \pm 1.5^{2)}$	$6.8 \pm 2.6^{2)}$
	120	53.9 ± 8.9	13.3 ± 1.5	6.8 ± 1.8	6.1 ± 1.5

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

表 2 大豆异黄酮对去卵巢大鼠海马单胺类神经递质的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	NE	DA	5-HIAA	HVA	5-HT
对照	-	$42.65 \pm 9.97^{2)}$	$240.02 \pm 43.61^{2)}$	$84.69 \pm 14.76^{2)}$	27.62 ± 0.55	$186.23 \pm 23.62^{2)}$
模型	-	$30.46 \pm 6.48^{1)}$	$166.61 \pm 41.98^{1)}$	$58.13 \pm 10.25^{1)}$	$21.13 \pm 8.78^{1)}$	$136.18 \pm 30.0^{1)}$
苯甲酸雌二醇	0.2	31.98 ± 2.89	$242.4 \pm 51.66^{2)}$	$75.98 \pm 12.42^{2)}$	24.47 ± 11.04	$170.13 \pm 62.93^{2)}$
IS	30	31.75 ± 8.51	210.2 ± 67.68	69.39 ± 23.73	22.21 ± 10.22	164.74 ± 52.49
	60	34.81 ± 11.57	$239.13 \pm 72.27^{2)}$	$79.67 \pm 14.04^{2)}$	26.32 ± 10.19	$183.46 \pm 41.69^{2)}$
	120	$40.83 \pm 29.17^{2)}$	209.47 ± 93.05	$71.52 \pm 14.76^{2)}$	25.63 ± 8.72	167.41 ± 36.92

3.3 大豆异黄酮对去卵巢大鼠下丘脑内 GnRH 含量的影响 对照组 GnRH 含量明显低于模型组,有统计学差异 ($P < 0.05$),苯甲酸雌二醇组 GnRH 含量低于模型组 ($P < 0.05$);大豆异黄酮中、高剂量组

航行实验:各组大鼠平均逃避潜伏期随训练天数的增加而缩短,说明各组大鼠的游泳训练期间学习寻找平台的能力逐渐提高,前 3 d 差异较明显,第 4、5 天各组间差异不明显。训练前 3 d 对照组平均逃避潜伏期时间小于模型组 ($P < 0.05$);第 3 天苯甲酸雌二醇组平均逃避潜伏期时间小于模型组 ($P < 0.05$);训练前 3 d 大豆异黄酮中剂量组平均逃避潜伏期时间小于模型组 ($P < 0.05$)。空间探索实验:结果显示,对照组穿台次数明显多于模型组 ($P < 0.05$);苯甲酸雌二醇组穿台次数明显多于模型组 ($P < 0.05$);大豆异黄酮中剂量组穿台次数明显多于模型组 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 对去卵巢大鼠海马单胺类递质的影响 对照组 NE, DA, 5-HIAA, 5-HT 含量明显高于模型组,有统计学差异 ($P < 0.05$);苯甲酸雌二醇组 DA, 5-HIAA, 5-HT 含量高于模型组 ($P < 0.05$);大豆异黄酮中剂量组 DA, 5-HIAA, 5-HT 含量高于模型组 ($P < 0.05$);大豆异黄酮高剂量组 NE, DA 含量高于模型组 ($P < 0.05$)。见表 2。

GnRH 含量低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 3。

4 讨论

本实验研究显示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,并且大豆

表 3 大豆异黄酮对去卵巢大鼠下丘脑内 GnRH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	GnRH/pg·mg ⁻¹
对照	-	279.31 ± 22.18 ²⁾
模型	-	573.34 ± 33.41 ¹⁾
苯甲酸雌二醇	0.2	332.41 ± 30.02 ²⁾
IS	30	419.73 ± 34.65
	60	371.48 ± 32.78 ²⁾
	120	363.37 ± 31.98 ²⁾

异黄酮中剂量组大鼠在 Morris 水迷宫定位航行实验学习记忆高于苯甲酸雌二醇组,显示长期给予植物雌激素在改善去卵巢大鼠学习记忆能力方面强于苯甲酸雌二醇。

学习记忆的过程与脑内单胺类神经递质及神经肽密切相关。多巴胺(DA)在突触可塑性、行为学习及学习相关的即刻早期基因的表达中发挥作用^[8]。5-羟色胺(5-HT)能神经系统在人类情绪、认知等方面起着重要作用。本实验结果显示,正常组、苯甲酸雌二醇组、大豆异黄酮中剂量组马内的单胺类神经递质含量高于模型组,表现出统计学差异。Miller 等研究发现,脑内 5-HT 含量增加,提高记忆能力,并且 5-HT 含量在一定范围内与雌激素水平呈正相关^[9]。Leranth 等的实验表明大鼠去卵巢后,超过 30% 的多巴胺神经元死亡,而给予雌激素替代治疗后,此种死亡被阻止^[10]。而雌激素的释放与垂体-下丘脑-性腺轴功能有关。下丘脑产生多种神经递质及神经肽均参与了 GnRH 合成和分泌的调节,并共同完成机体对神经内分泌的调节^[11-12]。本实验中正常组、苯甲酸雌二醇组、大豆异黄酮中剂量组大鼠下丘脑内 GnRH 明显低于模型组,说明体内高雌激素水平通过负反馈调节降低下丘脑内 GnRH 含量,而模型组由于体内缺乏雌激素,使得垂体-下丘脑-性腺轴功能紊乱,表现出下丘脑高 GnRH 水平,从而影响海马神经内分泌细胞的功能,降低单胺神经递质的含量。

本实验结果表明给予去卵巢大鼠补充大豆异黄酮后,大鼠空间学习记忆能力明显高于模型组大鼠,同时海马内单胺类递质特别是 NE, DA, 5-HT 含量增高,下丘脑内 GnRH 含量较模型组明显下降,提示大豆异黄酮通过提高外周雌激素水平调节垂体-下丘脑-性腺轴功能,降低 GnRH,恢复垂体-下丘脑-性

腺轴的正常负反馈机制,进而有效调整中枢神经递质的合成,恢复下丘脑、海马内神经递质的平衡,改善下丘脑及海马神经内分泌细胞的功能,提高单胺神经递质的含量,从而改善去卵巢大鼠空间学习记忆能力。

[参考文献]

[1] 陈多,张冉,吴春福,等. 雌激素改善学习记忆的机制[J]. 分子科学学报,2002,18(4):230.

[2] 厚华刚,库宝善. 胆碱系统和其他神经递质/调质系统在学习记忆中的作用及相互作用[J]. 包头医学院学报,1998,14(3):79.

[3] Nelson H D, Humphrey L L, Nygren P, et al. Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review[J]. JAMA,2002,288(7):872.

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

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

[6] 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.

[7] 蔡标,彭代银,汪远金,等. 大豆异黄酮对 AD 大鼠海马 NO-cGMP 信号转导系统的影响[J]. 中国中药杂志,2011,36(2):220.

[8] 左萍萍,隋亚平,葛秦生,等. 雌激素对去卵巢大鼠黑质-纹状体多巴胺系统的影响[J]. 生殖医学杂志,2002,11(3):140.

[9] Miller D B, Ali S F, OCallaghan J P, et al. The impact of gender and estrogen on striatal dopaminergic neurotoxicity [J]. Ann N Y Acad Sci, 1998, 844:153.

[10] Leranth C, Roth R H, Elsworth J D, et al. Estrogen is essential for maintaining nigrostriatal dopamine neurons in primates: implications for Parkinson's disease and memory[J]. J Neurosci, 2000, 20(23):8604.

[11] Urban R J. Neuroendocrinology of aging in the male and female[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 1992, 21(4):920.

[12] Lee J J, Chang C K, Liu I M, et al. Changes in endogenous monoamines in aged rats [J]. Clin Exp Pharmacol Physio, 2001, 28(4):285.

[责任编辑 聂淑琴]