

马齿苋乙醇提取物对 *D*-半乳糖致衰老小鼠 学习记忆能力的影响

张良和, 张红英*, 孙晓宇

(延边大学医学部, 吉林 延吉 133002)

[摘要] **目的:**研究马齿苋乙醇提取物对 *D*-半乳糖 (*D*-gal) 致衰老小鼠的学习记忆能力, 并探讨其作用机制。**方法:**取小鼠随机分为正常组、模型组、马齿苋乙醇提取物 ($1.0, 0.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组。除正常组颈背部 sc 生理盐水外, 其他各组均 sc *D*-gal ($1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 每 d 1 次, 连续给药和造模 42 d。用避暗法、水迷宫法和 Morris 水迷宫法测定衰老小鼠学习记忆能力, 同时测定小鼠脑组织丙二醛 (MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性。**结果:**马齿苋乙醇提取物 $1.0, 0.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的潜伏期和错误次数为 ($174.14 \pm 1.85, 103.80 \pm 3.93$) s, ($0.11 \pm 0.33, 0.63 \pm 1.41$) 次, 与模型组相比可使衰老小鼠第 1 次进入暗室的潜伏期明显延长和错误次数明显减少; 到达时间和错误次数为 ($48.45 \pm 38.35, 58.25 \pm 28.41$) s, ($8.50 \pm 4.97, 11.50 \pm 5.68$) 次, 与模型组相比可使衰老小鼠到达时间缩短和错误次数明显减少; 逃避潜伏期和 1 min 站台穿越次数为 (20.33 ± 20.20) s, (3.22 ± 2.86) 次, 与模型组相比马齿苋乙醇提取物 ($1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组可使衰老小鼠逃避潜伏期明显缩短和 1 min 站台穿越次数明显增多; 同时明显降低衰老小鼠脑组织 MDA 含量。**结论:**马齿苋乙醇提取物可提高 *D*-gal 致衰老小鼠学习记忆能力, 其机制可能与降低 MDA 含量有关。

[关键词] 马齿苋; 衰老; 学习记忆; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 谷胱甘肽过氧化物酶; 小鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0229-04

Effects of Ethanol Extracts from *Portulacae Herba* on Learning and Memory Performances in Senile Mice Induced By *D*-gal

ZHANG Liang-he, ZHANG Hong-ying*, SUN Xiao-yu

(Yanbian University Medical Department, Yanji 133002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of ethanol extracts from *Portulacae Herba* on learning and memory performances in senile mice induced by *D*-gal, and its mechanisms of effects. **Method:** The mice were randomly divided into 4 groups: control group, model group and the ethanol extracts from *Portulacae Herba* ($1.0, 0.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) groups. The control group was given sc of isotonic NaCl in the cervical back part while the other all were given sc *D*-gal ($1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), once daily. The model was continuously established for 42 d, meanwhile medicine was given. Learning and memory performances were tested with step-through, water maze and Morris water maze test, and to determine the contents of malonaldehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD), and to determine the activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) in brain tissue simultaneously. **Result:** Compared with the model mice, the ethanol extract from *Portulacae Herba* could significantly prolong the latency, and reduced the error frequency. It ($1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) could obviously shorten escape latency and pass frequency of 1 min erect position in the senile mice. It could obviously reduce the content of MDA in the senile mice. **Conclusion:** The ethanol extract from *Portulacae*

[收稿日期] 20101209(001)

[第一作者] 张良和, 大学, 实验师, 研究方向为动物的中药药理研究, Tel: 0433-13704488832

[通讯作者] * 张红英, 大专, 高级实验师, 研究方向为中药心血管和抗衰老药理研究, Tel: 0433-13843366516, E-mail: zhanghongying52@163.com

Herbacan improves the learning and memory performances of senile mice, the mechanism may be related to decrease in content of MDA in brain tissue.

[Key words] Portulacae Herba; senile; learning and memory; malonaldehyde; superoxide dismutase; glutathione peroxidase; mouse

马齿苋 *Portulaca oleracea* L 广泛分布于我国南北地区,资源丰富,是一种具有很大开发潜力的植物。马齿苋科植物的全草又名长寿菜,性寒味酸具有清热解毒、散血消肿之功效。马齿苋是中国卫生部划定的药食同源的野生植物之一。马齿苋含有丰富的化学成分,具有广泛的药理活性及营养保健作用^[1]。马齿苋多糖能够明显提高血清及肝、脑等器官中 SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性,可以有效抑制 D-半乳糖所致的血清及肝、脑中 SOD 和 GSH-Px 活性的下降。同时,马齿苋多糖能显著降低衰老模型小鼠体内 MDA 的含量^[2-3]。据此推测马齿苋提取物可能具有改善学习记忆能力的作用。本实验观察,研究马齿苋乙醇提取物对 D-gal 致衰老小鼠学习记忆能力,从学习记忆能力及清除氧自由基的能力等方面初步探讨其作用,为进一步开发应用马齿苋提供实验依据。

1 材料

1.1 药物 马齿苋购于吉林省延边大学附属医院中药房,经延边大学药学院生药教研室刘永镇教授鉴定为正品。马齿苋乙醇提取物制备:称取马齿苋干草 600 g 粉碎,用 80% 的乙醇在水浴中回流提取 2 次,各用 10 倍量与 8 倍量乙醇提取 2 h 和 1 h,冷却后过滤,合并滤液浓缩,干燥成粉末,临用前配制所需浓度;D-gal 系国药集团化学试剂有限公司生产(批号 F20080429);蛋白定量, SOD, MDA, GSH-Px 试剂盒,购自南京建成生物工程研究所(批号 20081123)。

1.2 仪器 小鼠避暗仪(2H-500 型),由安徽正华教学实验机械厂生产;自动记录水迷宫(LW-II)型,由中国医学科学院药物研究所生产;Morris 水迷宫动物行为分析系统为上海吉量科技有限公司产品;电子称(YP600 型),由上海精密仪器有限公司生产;超级恒温水浴由上海安亭科学仪器厂制造;可见分光光度计(VIS-723 型)由上海精密科学仪器有限公司生产。

1.3 动物 昆明种雌性小鼠,体重为 24 ~ 26 g,由延边大学医学部实验动物科提供(动物合格证号 10-

1022)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药^[4] 小鼠随机分为 4 组,即正常组、模型组、马齿苋乙醇提取物(1, 0.5 g·kg⁻¹)组。采用无菌注射的方法,除正常组颈背部 sc 生理盐水外,其他各组均 sc D-gal(1 g·kg⁻¹)进行造模,每天 1 次,连续造模和给药 42 d。生理盐水和模型组 ig 给蒸馏水,药物组 ig 给马齿苋乙醇提取物。

2.2 小鼠避暗实验^[5] 避暗箱大小为 36 cm × 12 cm × 12 cm,分为前后明暗室两部分,两室间有直径 3 cm 的圆洞相通,底部为铜栅,暗室后半部通以 40 V 电压。训练时将小鼠背对洞口放入明室,暗室底部通电,同时启动计时器,小鼠穿过洞口进入暗室触电的时间,为实验潜伏期,进行训练 5 min。24 h 后进行正式试验,将小鼠背对洞口放入明室,同时启动计时器,记录每只小鼠第 1 次进入暗室的时间,即为潜伏期,并记录 5 min 内进入暗室的次数(即避暗错误次数)。

2.3 小鼠水迷宫实验^[6] 装置为 32 cm × 12 cm × 25 cm 双层不透明的有机玻璃槽,实验时水深为 10 cm,水温保持 25 ℃ 左右。第 1 次训练前将小鼠放在梯子附近,使其自行爬上 3 次,然后将小鼠背对出口放入 A 点开始训练。第 2 次训练前将小鼠放在梯子附近,使其自行爬上 1 次,将小鼠背对出口放入 B 点开始训练。正式试验时将小鼠背对出口从 B 点开始放入小鼠,同时按下启动键,仪器开始自动记时,小鼠到达终点或时间到 2 min 时,仪器自动停记。

2.4 Morris 水迷宫行为测试实验^[6] Morris 水迷宫为一直径 120 cm,高 50 cm 的圆柱形水池,其内部被分为 4 个大小相等的象限,在其中的一个象限中央放置 1 个直径为 9.5 cm 透明玻璃平台,此平台位置一旦被确定将在整个行为学测试中保持不变,将平台没于水下 1 cm。试验过程中控制水温在(22 ± 2)℃。

2.4.1 定位航行实验 从第 37 ~ 40 天开始进行定位航行实验,连续测试 4 d。每日分上、下午时间段,上午为 8:00 ~ 10:00,下午为 13:00 ~ 15:00,每个时

间段内每组小鼠平均连续训练2次,其时间间隔不短于10 min。训练时将小鼠在南(s)点面向池壁放入水中,记录小鼠在60 s内搜索到站台并停留10 s的时间,则此时的时间为逃避潜伏期,若小鼠在60 s内未搜索到站台,将其引至站台并停留10 s,记录逃避潜伏期为60 s。

2.4.2 空间搜索实验 定位航行试验结束后,间隔1 d。第42天游泳实验时选择SW象限中心作为入水点,将小鼠面向池壁放入水中,检测记录小鼠寻找站台时的潜伏期。间隔10 min后撤除站台,进行空间搜索实验。将站台撤除后,同样选择SW象限中心作为入水点,将小鼠面向池壁轻轻放入水中,观察并记录60 s内小鼠穿越原站台位置的次数(即1 min站台穿越次数)。

2.5 脑组织中蛋白质,MDA,SOD,GSH-Px含量及活性的测定 实验结束后,取脑组织冰浴研磨,并用冷生理盐水制成10%匀浆液,3 500 r·min⁻¹,离心10 min,取上清液按试剂盒方法测定脑组织蛋白质,MDA含量,SOD,GSH-Px活性。

2.6 统计学处理 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0统计软件分析,组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对D-gal致衰老小鼠学习记忆能力的影响(避暗法) 与正常组相比,模型组衰老小鼠潜伏期明显缩短和错误次数明显增加,与模型组相比,马齿苋乙醇提取物可使衰老小鼠潜伏期明显延长和错误次数明显减少($P < 0.01$),见表1。

表1 马齿苋乙醇提取物对D-gal致衰老小鼠学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	避暗法	
			潜伏期/s	错误数/次
正常	-	15	91.54 ± 2.80	0.87 ± 0.92
模型	-	12	29.73 ± 3.75	5.17 ± 6.94
马齿苋	1	12	174.14 ± 1.85 ²⁾	0.11 ± 0.33 ²⁾
	0.5	17	103.80 ± 3.93 ²⁾	0.63 ± 1.41 ²⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表2~4同)。

3.2 对D-gal致衰老小鼠学习记忆能力的影响(水迷宫法) 与正常组相比,模型组衰老小鼠到达时间明显延长和错误次数明显增加,与模型组相比,马齿苋乙醇提取物可使衰老小鼠到达时间缩短和错误次数明显减少($P < 0.01$),见表2。

3.3 对D-gal致衰老小鼠定位航行和空间搜索能力的影响(Morris水迷宫法) 与正常组相比,模型组衰老小鼠逃避潜伏期明显延长,与模型组相比,马齿苋乙醇提取物(1 g·kg⁻¹)组可使衰老小鼠逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$);与正常组相比,模型组衰老小鼠1 min站台穿越次数明显减少,与模型组相比,马齿苋乙醇提取物(1 g·kg⁻¹)组可使衰老小鼠1 min站台穿越次数明显增多($P < 0.05$),见表3。

表2 马齿苋乙醇提取物对D-gal致衰老小鼠学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	水迷宫法	
			到达时间/s	错误数/次
正常	-	15	58.23 ± 26.93	10.92 ± 8.69
模型	-	12	102.36 ± 30.58	24.36 ± 7.46
马齿苋	1	12	48.45 ± 38.35 ²⁾	8.50 ± 4.97 ²⁾
	0.5	12	58.25 ± 28.41 ²⁾	11.50 ± 5.68 ²⁾

表3 马齿苋乙醇提取物对D-gal致衰老小鼠定位航行和空间搜索能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	Morris水迷宫	
			逃避潜伏期/s	1 min站台穿越数/次
正常	-	15	26.80 ± 23.98	3.27 ± 1.94
模型	-	12	42.17 ± 22.45	1.50 ± 1.23
马齿苋	1	12	20.33 ± 20.20 ¹⁾	3.22 ± 2.86 ¹⁾
	0.5	12	24.75 ± 22.17	3.00 ± 1.60

3.4 对D-gal致衰老小鼠脑组织SOD,MDA,GSH-Px的影响 与正常组相比,模型组衰老小鼠脑组织MDA含量升高,与模型组相比,马齿苋乙醇提取物(1,0.5 g·kg⁻¹)组均可使衰老小鼠脑组织MDA含量明显下降($P < 0.05$),见表4。

表4 马齿苋乙醇提取物对D-gal致衰老小鼠脑组织SOD,MDA,GSH-Px的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD	MDA	GSH-Px
		/U·mg ⁻¹	/nmol·mg ⁻¹	/U·mg ⁻¹
正常	-	85.72 ± 13.57 ¹⁾	4.83 ± 0.73	62.68 ± 19.20
模型	-	41.64 ± 13.24	5.02 ± 1.44	33.21 ± 8.52
马齿苋	1	57.13 ± 12.18	3.95 ± 0.55 ¹⁾	47.98 ± 14.21
	0.5	53.21 ± 12.11	3.23 ± 0.70 ¹⁾	46.51 ± 13.13

4 讨论

衰老是生命过程中正常而又复杂的生物过程,有关衰老的学说很多,如代谢废物学说、免疫功能衰退学说、基因程序学说、自由基学说等。每种学说都

有一定的实验依据。而由 Harmangf 于 1956 年所提出的自由基衰老假说受到众多实验的支持^[7]。

D-gal 致衰老小鼠模型, *D-gal* 在半乳糖氧化酶作用下, 氧参与反应, 生成糖和过氧化氢反应过程中产生超氧阴离子自由基, 其过量损伤可产生衰老反应。该模型在一定时间内连续注射 *D-gal*, 使机体细胞内半乳糖浓度增高, 在醛糖还原酶催化下, 还原成半乳糖醇, 这种物质不能被细胞进一步代谢而堆积在细胞内, 影响正常渗透压, 致细胞肿胀, 功能障碍代谢紊乱, 氧自由基堆积最终致机体衰老^[7]。连续颈部 sc *D-gal* 造成衰老模型, 此模型造模简单易行, 不需要特殊设备, 本模型基本接近自然衰老过程。

避暗法实验中, *D-gal* 模型组可使衰老小鼠潜伏期明显缩短和错误次数明显增加, 与模型组相比, 马齿苋乙醇提取物可使衰老小鼠潜伏期明显延长和错误次数明显减少。

水迷宫法实验中, *D-gal* 模型组可使衰老小鼠到达时间延长和错误次数明显增加, 与模型组相比, 马齿苋乙醇提取物可使衰老小鼠到达时间明显缩短和错误次数明显减少。说明, 马齿苋乙醇提取物可提高衰老小鼠学习记忆能力。

Morris 水迷宫行为学检测是神经科学或相关领域较为常用的实验方法之一。在实验中, 通过反复对动物进行训练, 同时检测动物寻找平台的时间(逃避潜伏期)来评价其学习能力, 时间越短, 说明其学习能力越强。在撤除平台后, 通过检测动物游过原平台区域的次数或在原平台所在象限停留时间来评价其对于训练的记忆能力, 次数越多或时间越长, 说明其记忆力越强。Morris 水迷宫法能较好反映动物空间学习记忆的形成和维持, 是记忆量化的良好指标^[8]。

本研究结果表明, 定位航行实验中, *D-gal* 模型组衰老小鼠逃避潜伏期明显延长, 与模型组相比, 马齿苋乙醇提取物($1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组可使衰老小鼠逃避潜伏期明显缩短; 在空间探索实验中, *D-gal* 模型组衰老小鼠 1 min 站台穿越次数明显减少, 与模型组相比, 马齿苋乙醇提取物($1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组可使衰老小鼠 1 min 站台穿越次数明显增加。说明, 马齿苋乙醇提取物可提高衰老小鼠的空间学习能力。

MDA 是氧自由基攻击生物膜中的不饱和脂肪酸而形成的脂质过氧化物, 它能生成聚合物并与人体内的蛋白质和脱氧核糖核酸发生反应, 使蛋白质的结构发生变异, 导致变异蛋白质的细胞失去正常功能并向初期癌细胞转化, 从而导致癌症的发生。MDA 含量的变化可间接反应组织中氧自由基含量的变化量^[9]。实验结果表明, 与模型组相比, 马齿苋乙醇提取物($(1, 0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1})$ 组均可明显降低衰老小鼠脑组织 MDA 含量, 说明, 马齿苋乙醇提取物可能通过增加氧自由基清除能力来改善学习记忆障碍。

综上所述, 马齿苋乙醇提取物可提高衰老小鼠学习记忆能力, 其机制可能与降低 MDA 含量有关。

[参考文献]

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典(上下) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1635.
- [2] 牛广财, 朱丹, 姜述君, 等. 马齿苋多糖对 *D*-半乳糖衰老小鼠 SOD 和 MDA 的影响[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(23): 3088.
- [3] 李小兰, 周爱国. 马齿苋多糖对衰老模型小鼠的抗衰老作用[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(21): 2778.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 954.
- [5] 候悦, 吴春福, 何祥, 等. 氯氮平、奥氮平对小鼠在避暗实验中学习记忆获得、巩固和再现过程的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 38(10): 61.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 828.
- [7] 李文彬, 韦丰, 范朋, 等. *D*-半乳糖在小鼠上诱导的拟脑老化效应[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9(2): 93.
- [8] 李国才, 李铁军, 招伟贤. 氯胺酮麻醉对老年大鼠学习记忆及痛阈的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(15): 15.
- [9] Limoli C L, Kaplan M I, Giedzinski E, et al. Attenuation of radiation-reduced genomic instability by free radical scavengers and cellular proliferation[J]. Free Radio Boil Med, 2001, 31(1): 10.

[责任编辑 聂淑琴]