

## 马齿苋不同提取物对 *D*-半乳糖致衰老小鼠空间学习能力的影响

金英子<sup>1</sup>, 张红英<sup>2\*</sup>, 孙晓宇<sup>3</sup>

(延边大学医学部: 1. 实验动物科; 2. 基础医学院机能实验中心; 3. 06 级口腔专业, 吉林 延吉 133002)

**[摘要]** 目的: 研究马齿苋不同提取物对 *D*-半乳糖致衰老小鼠空间学习能力的影响, 并探讨其作用机制。方法: 小鼠随机分为正常组、模型组、马齿苋正丁醇提取物(0.5, 0.25 g·kg<sup>-1</sup>) 组和马齿苋乙醇提取物(1, 0.5 g·kg<sup>-1</sup>) 组。除正常组颈背部 SC 生理盐水外, 其他各组均 *sc* *D*-半乳糖(1 g·kg<sup>-1</sup>) 连续给药和造模 42 d。用 Morris 水迷宫测定衰老小鼠空间学习记忆能力。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: 马齿苋正丁醇提取物(0.5, 0.25 g·kg<sup>-1</sup>) 组和马齿苋乙醇提取物(1 g·kg<sup>-1</sup>) 组均可使衰老小鼠逃避潜伏期明显缩短; 马齿苋正丁醇提取物(0.5 g·kg<sup>-1</sup>) 组和马齿苋乙醇提取物(1 g·kg<sup>-1</sup>) 组均可使衰老小鼠 1 min 站台穿越次数明显增多; 马齿苋正丁醇提取物(0.5, 0.25 g·kg<sup>-1</sup>) 组可降低脑组织 MDA 含量, 提高 SOD 和 GSH-Px 活性; 马齿苋乙醇提取物(1 g·kg<sup>-1</sup>) 组可降低脑组织 MDA 含量。结论: 马齿苋不同提取物均能明显改善衰老小鼠空间学习记忆能力, 其机制可能与提高 SOD, GSH-Px 活性, 降低 MDA 含量有关。马齿苋正丁醇提取物好于马齿苋乙醇提取物。

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

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0178-04

## Effects of Different Extracts from *Portulacae Herba* on Spatial Learning Performance in Senile Mice Induced by *D*-Gal

JIN Ying-zi<sup>1</sup>, ZHANG Hong-ying<sup>2\*</sup>, SUN Xiao-yu<sup>3</sup>

(Medical Department, Yanbian University 1. Experimental Animal Room;

2. Function Test Centre of Based Medical College; 3. Oral Cavity special of 2006 Grade, Yanji 133002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study effects of extracts from *Portulacae Herba* on spatial learning performance in senile mice induced by *D*-gal, and to explore the related mechanism. **Method:** The experimental mice were randomly divided into 5 groups; control group, model group and the *n*-butanol extracts from *Portulacae Herba* (0.5, 0.25 g·kg<sup>-1</sup>) groups, the ethanol extracts from *Portulacae Herba* (1, 0.5 g·kg<sup>-1</sup>) groups. Except the control group was given *sc* normal saline in the cervical back part. The rest of the mice were given *sc* *D*-gal(1 g·kg<sup>-1</sup>) once daily continually for 42 days, while the mice were given medicines accordingly. Learning and memory performances were tested with Morris water maze test, and the content of malondialdehyde (MDA) in brain tissue of the senile mice, and the activities of superoxide dismutase(SOD) and glutathione peroxidase(GSH-Px) were determined. **Result:** The *n*-butanol extracts from *Portulacae Herba* (0.5, 0.25 g·kg<sup>-1</sup>) groups and the ethanol extracts from *Portulacae Herba* (1 g·kg<sup>-1</sup>) group could obviously shorten the escape latency in senile mice. The *n*-butanol extract (0.5 g·kg<sup>-1</sup>) and the ethanol extracts from *Portulacae Herba* (1, 0.5 g·kg<sup>-1</sup>) groups showed increase in the frequency of passing the platform within 1 min for the mice. The ethanol extracts (1 g·kg<sup>-1</sup>) groups could decrease content of

**[收稿日期]** 20101129(001)

**[第一作者]** 金英子, 大学, 实验师, 从事实验动物的药理研究, Tel: 0433-13324486618

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

MDA and improve activity of SOD and GSH-Px in brain tissue. The ethanol extracts ( $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) groups could decrease content of MDA. **Conclusion:** The different extract from Portulacae Herba can ameliorate the spatial learning and memory performances of senile mice. The mechanism may be related to decrease in MDA in brain tissue and increase in activities of SOD and GSH-Px. The n-butanol extract from Portulacae Herba appears to be better than the ethanol extract from Portulacae Herba.

[**Key words**] Portulacae Herba; learning and memory; malondialdehyde; superoxide dismutase; luthathione peroxidase; senile 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<sup>[1]</sup>。曾小珍报道鲜马齿苋沸水提取物对O和·OH均有显著的清除作用<sup>[2]</sup>。马齿苋水提液可明显延长模型小鼠的缺氧生存时间、爬杆时间,提高其高温存活率<sup>[3]</sup>,据此推测马齿苋提取物可能具有改善学习记忆的作用。本实验研究马齿苋不同提取物对D-半乳糖致衰老小鼠空间学习记忆的影响,从清除氧自由基能力等方面初步探讨其作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 昆明种小鼠,雌性,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)。

**1.2 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真品。马齿苋正丁醇提取物的制备:称取马齿苋干草600 g,用75%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,蒸出溶剂,水层用正丁醇萃取,正丁醇层浓缩得浸膏,干燥备用。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,两药均临用前用蒸馏水配成所需浓度,D-半乳糖系国药集团化学试剂有限公司生产,(批号F20080429),超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒购置南京建成生物工程研究所(批号20081123)。

**1.3 仪器** Morris水迷宫,由安徽正华科技有限公司生产,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。

## 2 方法

**2.1 造模分组及给药** 取雌性昆明种小鼠,随机分为6组,即正常组(15只)、模型组(12只)、马齿苋正丁醇提取物( $0.5, 0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )组(12只,17只)和马齿苋乙醇提取物( $1, 0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )组(13只)。除正常组颈背部sc生理盐水外,其他各组均sc D-半乳糖( $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )进行造模,每日1次,连续给药和造模42 d。生理盐水和模型组ig给蒸馏水,药物组ig给马齿苋正丁醇提取物和马齿苋乙醇提取物。

**2.2 Morris水迷宫行为测试实验**<sup>[6]</sup> 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一直径为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( $22 \pm 2$ )℃。

**2.2.1 定位航行实验** 第37~40天训练,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。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,训练时将其引至站台并停留10 s,潜伏期记录为60 s。

**2.2.2 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)。

**2.3 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% 脑组织匀浆,3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液按试剂盒方法测定脑组织蛋白质,MDA 含量和 SOD,GSH-Px 活性。

**2.4 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 对衰老小鼠定位航行和空间搜索能力的影响

与正常组相比,模型组小鼠逃避潜伏期明显延长,与模型组相比,马齿苋正丁醇提取物(0.5,0.25 g·kg<sup>-1</sup>)组和马齿苋乙醇提取物(1 g·kg<sup>-1</sup>)组均可使衰老小鼠逃避潜伏期明显缩短( $P < 0.05$ );与正常组相比,模型组小鼠 1 min 站台穿越次数明显减少,与模型组相比,马齿苋正丁醇提取物(0.5 g·kg<sup>-1</sup>)组和马齿苋乙醇提取物(1 g·kg<sup>-1</sup>)组均可使衰老小鼠 1 min 站台穿越次数明显增多( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 马齿苋不同提取物对 D-半乳糖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 <sup>-1</sup>	n	Morris 水迷宫	
			逃避潜伏期 /s	1 min 站台 穿越数/次
正常	-	15	26.8 ± 23.9	3.3 ± 1.9
模型	-	12	42.2 ± 22.4	1.5 ± 1.2
正丁醇提取物	0.5	12	18.3 ± 15.7 <sup>1)</sup>	4.3 ± 1.3 <sup>1)</sup>
	0.25	17	19.1 ± 20.5 <sup>1)</sup>	2.8 ± 2.3
乙醇提取物	1	13	20.3 ± 20.2 <sup>1)</sup>	3.2 ± 2.9 <sup>1)</sup>
	0.5	13	24.7 ± 22.2	3.0 ± 1.6

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

#### 3.2 对衰老小鼠脑组织 SOD,MDA,GSH-Px 的影响

与正常组相比,模型组衰老小鼠脑组织 SOD,GSH-Px 活性显著下降,与模型组相比,马齿苋正丁醇提取物(0.5 g·kg<sup>-1</sup>)组 SOD,GSH-Px 活性明显升高( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ );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,马齿苋正丁醇提取物(0.25 g·kg<sup>-1</sup>)组和马齿苋乙醇提取物(1,0.5 g·kg<sup>-1</sup>)组均可使衰老小鼠脑组织 MDA 含量明显下降( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 马齿苋不同提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠脑组织 SOD,MDA,GSH-Px 的影响( $\bar{x} \pm s$ ,n = 10)

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	SOD /U·mg <sup>-1</sup>	MDA /nmol·mg <sup>-1</sup>	GSH-Px /nmol·mg <sup>-1</sup>
正常	-	89.8 ± 14.6	4.8 ± 0.7	62.7 ± 19.2
模型	-	42.6 ± 13.2	5.0 ± 1.5	33.2 ± 8.5
正丁醇提取物	0.5	81.0 ± 33.5 <sup>1)</sup>	4.0 ± 0.9	51.4 ± 12.9 <sup>2)</sup>
	0.25	63.5 ± 14.7	3.3 ± 0.8 <sup>1)</sup>	48.9 ± 19.9
乙醇提取物	1	64.3 ± 11.5	3.6 ± 0.3 <sup>1)</sup>	46.3 ± 14.6
	0.5	62.2 ± 11.6	3.1 ± 0.1 <sup>1)</sup>	45.1 ± 13.3

### 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<sup>[7]</sup>。

D-半乳糖致衰老小鼠模型,D-半乳糖在半乳糖氧化酶作用下,参与氧化反应,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。上述反应与老龄动物是一致的。该模型在一定时间内连续注射 D-半乳糖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<sup>[7]</sup>。

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。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<sup>[8]</sup>。

定位航行实验中,D-半乳糖模型组小鼠逃避潜伏期明显长于对照组,马齿苋正丁醇提取物(0.5,0.25 g·kg<sup>-1</sup>)组和马齿苋乙醇提取物(1 g·kg<sup>-1</sup>)组均可使衰老小鼠逃避潜伏期明显缩短;在空间探索实验中,D-半乳糖模型组 1 min 站台穿越次数明显少于对照组,马齿苋正丁醇提取物(0.5 g·kg<sup>-1</sup>)组和马齿苋乙醇提取物(1 g·kg<sup>-1</sup>)组均可使 1 min 站台穿越次数明显增加,马齿苋不同提取物可提高衰老小鼠的空间学习记忆能力。

SOD 作为机体内主要的抗氧化酶,对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用。此酶可促使超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )转变为过氧化氢,从而减少脂质过氧化反应使机体细胞和组织免受损害,其活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力,并与衰老、肿瘤、炎症等有着密切关系<sup>[9]</sup>。马齿苋正丁醇提取物( $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组可提高衰老小鼠脑组织 SOD 活性。

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<sup>[10]</sup>。马齿苋正丁醇提取物( $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组和马齿苋乙醇提取物( $1,0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组均可降低衰老小鼠脑组织 MDA 含量。

GSH-Px 是机体广泛存在的一种重要的催化  $H_2O_2$  分解的酶,它特异地催化还原型谷胱甘肽  $H_2O_2$  的还原反应,可以起到保护细胞膜结构和功能完整作用,从而减缓衰老过程<sup>[11]</sup>。马齿苋正丁醇提取物( $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组可提高衰老小鼠脑组织 GSH-Px 活性。结果表明,D-半乳糖模型组可使衰老小鼠脑组织 SOD, GSH-Px 活性显著下降,MDA 含量上升。马齿苋正丁醇提取物( $0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组可使衰老小鼠脑组织 SOD 活性, GSH-Px 活性明显升高,马齿苋正丁醇提取物( $0.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组可使 MDA 含量明显下降,而马齿苋乙醇提取物( $1,0.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组只能降低 MDA 含量。

综上所述,马齿苋不同提取物可明显改善 D-半乳糖致衰老小鼠定位航行和空间搜索能力,提高空间学习记忆能力,其机制可能与提高 SOD, GSH-Px 活性,降低 MDA 含量有关。马齿苋正丁醇提取物好

于马齿苋乙醇提取物。

#### [参考文献]

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:1635.
- [2] 曾小玲. 马齿苋水提取物对氧自由基清除作用的研究[J]. 湖南医科大学学报,1999,24(2):133.
- [3] 杜历生. 衰老机理和延缓衰老的措施[J]. 广西中医学院学报,2001,4(4):108.
- [4] 陈琦. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2006:955.
- [5] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,2006:10.
- [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] Giardino. R, Giavaresi G, Fini M, et al. The role of different chemical modifications of superoxide dismutase in preventing a prolonged muscular ischemia/reperfusion injury[J]. Arit Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2002,30(1):189.
- [10] 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 Radic Boil Med, 2001,31(1):10.
- [11] lasco M A, Funk W, Villeponteau B, et al. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA[J]. Science, 1995,269(5228):1267.

[责任编辑 聂淑琴]