

## 灵芝多糖对实验性衰老大鼠海马内 NR2B 表达的影响

袁电杰<sup>1\*</sup>, 张印发<sup>2</sup>, 姚春香<sup>3</sup>

(1. 宝丰县食品药品检验所, 河南 宝丰 467400; 2. 郟县食品药品检验所, 河南 郟县 467400;  
3. 宝丰县妇幼保健院, 河南 宝丰 467400)

[摘要] 目的: 观察灵芝多糖对试验性衰老大鼠海马内离子型谷氨酸受体-N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDA受体) 2B亚单位(NR2B)表达的影响。方法: 健康SD大鼠, 雌雄各半, 颈背部皮下注射(sc) D-半乳糖(D-gal)制成亚急性衰老模型, 用不同浓度的灵芝多糖溶液灌胃(ig)治疗10d, Morris水迷宫试验检测动物学习记忆能力, 采用免疫组织化学染色法, Western Blotting技术检测各组大鼠海马CA1, CA3区NR2B表达的变化。结果: 与模型组相比, 灵芝多糖125, 100 mg·kg<sup>-1</sup>能显著降低大鼠水迷宫试验的平均潜伏期, 升高跨越平台次数及在象限内的游泳时间占整个游泳时间的百分率, 亦能显著升高大鼠海马内CA1, CA3区NR2B的表达( $P$ 均 $<0.01$ )。结论: 灵芝多糖能提高试验性衰老大鼠的学习记忆能力; 升高此大鼠海马内降低的NR2B表达, 可能是其增强大鼠学习记忆的机制之一。

[关键词] 灵芝多糖; 试验性衰老; 海马; 离子型谷氨酸受体-N-甲基-D-天门冬氨酸受体(NMDA受体) 2B亚单位

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0147-04

## Effects of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides on Expression of Hippocampal NR2B in Aging Rats Induced by D-gal

YUAN Dian-jie<sup>1\*</sup>, ZHANG Yin-fa<sup>2</sup>, YAO Chun-xiang<sup>3</sup>

(1. Baofeng Institute for Food and Drug Control, Baofeng 467400, China; 2. Jiaxian Institute for Food and Drug Control, Jiaxian 467400, China; 3. The Maternal and Child Health Hospital of Baofeng, Baofeng 467400, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effects of ganoderma lucidum polysaccharides on expression of hippocampal N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor 2B (NR2B) in aging rats induce by D-gal. **Method:** The permanent dosage (sc) of D-gal was applied to SD rats to establish the aging model. Different concentrations of *Ganoderma lucidum* polysaccharides were individually administrated (ig) for 10 days. The Morris water maze was applied to validate the learning in rats. With immunohistochemistry and Western Blotting, the expression of NR2B was detected on tissues of CA1 and CA3 regions in hippocampus in rats. **Result:** As compared with the model, rats treated with *G. lucidum* polysaccharides (125, 100 mg·kg<sup>-1</sup>) had longer durations of crossover platform and the percentage of swimming time in quadrant, as well as the increased expression of NR2B in hippocampus ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** *G. lucidum* polysaccharides would play important roles in promoting learning ability for aging rats induced by D-gal. The up-regulation of NR2B expression in hippocampus could be contributed to one of the related mechanisms.

[Key words] *Ganoderma lucidum* polysaccharides; experimental aging; hippocampus; N-methyl-D-aspartate receptor 2B

衰老的重要表现之一是学习记忆能力产生障碍。而广泛分布于中枢神经系统的离子型谷氨酸受体 *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸受体(NMDA 受体)参与了学习记忆障碍的发病过程,在发病的众多环节中起关键性的作用<sup>[1]</sup>;NMDA 受体的 2B 亚单位(NR2)亚单位则是调节 NMDA 受体活性的功能亚基,又报道 NR2 亚单位的组成之一 NR2B 在学习记忆中的作用非常关键,甚被命名为“记忆基因”<sup>[2]</sup>,是目前关于学习记忆研究的热点。灵芝多糖是多孔菌科灵芝属真菌菌丝体的次生代谢产物,近年来的研究已证明,它能够通过提高海马 SOD 活性、降低 *c-fos* 基因的表达等提高学习记忆能力产生抗衰老作用;那么此作用与“记忆基因”——NR2B(NMDA 受体的亚单位)有无关系呢?国内外文献尚未报道。由于海马是与学习记忆相关的重要脑区,衰老发生时它的结构和功能应激变化较早<sup>[3]</sup>,因而以海马为切入点研究抗衰老机制具有重要意义。为此,本试验以 *D*-半乳糖致衰老大鼠为研究对象,通过观察灵芝多糖对此大鼠的治疗作用,并检测海马内 NR2B 表达变化,探讨其作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康 SD 大鼠,雌雄各半,月龄 2 月左右,体重 160 ~200 g,郑州大学药学院提供,合格证号 SYXK-(豫)2007-0009,试验前适应性饲养 1 周。

**1.2 试剂与仪器** 灵芝多糖,购自浙江方格药业有限公司,制成 25, 20, 15 g·L<sup>-1</sup> 3 种浓度的溶液;*D*-半乳糖(批号 091016),上海海曲化工有限公司;Rabbit Anti-NMDAR2B、免疫组化试剂盒(编号 SA1020),武汉博士得生物工程有限公司;辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG(bse-0296G)、辣根过氧化物酶标记羊抗兔(IgGbse-0295G)、-肌动蛋白抗体(bs-0061R),北京博奥森生物技术有限公司;BCA 蛋白试剂盒,江苏碧云天生物公司;Morris 水迷宫,中国医学科学院药物研究所研制;LEICA-200 图像分析仪,德国 LEICA MICROSYSTEMS LTD。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 60 只大鼠随机分为生理盐水(NS)对照组、*D*-半乳糖模型组(模型组)、灵芝多糖 125, 100, 75 mg·kg<sup>-1</sup> 高、中、低剂量治疗组共 5 组,每组 12 只。

**2.2 建立试验性衰老大鼠模型** 除 NS 对照组外,其余各组大鼠(上午 8 00)按 150 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 均行

颈背部 sc *D*-半乳糖,连续 45 d,NS 对照组大鼠除给予等量 NS 替代 *D*-半乳糖外,其余处理皆同。

**2.3 药物治疗** 试验的第 36 天(下午 16 00)开始,NS 对照组和模型组灌注(按 5 mL·kg<sup>-1</sup>)生理盐水;灵芝多糖高、中、低治疗组灌注(按 125, 100, 75 mg·kg<sup>-1</sup>)灵芝多糖溶液;每天 1 次,连续 10 d。

**2.4 Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆能力** 模型建立后,应用 Morris 水迷宫测定大鼠空间学习记忆能力,参考马原野等的方法。空间探索试验(spatial probe):记录大鼠在 2 min 中内的游泳轨迹,分别计算其跨越象限内的游泳时间占整个游泳时间的百分率、跨越平台次数;定位航行试验(place-navigation):用 60 s 内寻找到隐藏在水面下平台的时间(逃避潜伏期, escape latency)表示。

**2.5 免疫组化染色检测 NR2B 表达** 经 Morris 水迷宫测试后,每组取 6 只大鼠 2% 异戊巴比妥 ip 麻醉,用 4% 多聚甲醛经心脏灌注固定,开颅取脑,根据大鼠脑立体定位图谱切取含海马脑区。后固定、常规脱水、包埋并连续冠状切片,片厚 4 μm。然后选取海马组织结构完整的切片,每间隔 20 μm 取一,每鼠取 6 张,按免疫组织化学染色方法操作,进行染色。试验同时设阴性对照,除磷酸缓冲液替代一抗外,其他染色步骤相同。Leica Qwin 细胞图象分析系统观察海马 NR2B 免疫反应产物,并在每张切片的 CA1, CA3 区相同光学条件下随机各取 3 个视野拍照(400 倍),Image-Pro Plus 软件计算每张照片的平均吸光度(*A*)。

**2.6 Western blot 检测 NR2B 表达** 取余每组 6 只大鼠,迅速断头,在超净台内冰上取脑,依照脑立体定位图谱剥离出海马脑区,置于 4℃ 预冷的裂解缓冲液中,匀浆,离心后取上清。用 BCA 蛋白试剂盒测蛋白,然后用 10% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质,每孔蛋白加样量为 20 μg。电泳后转膜,封闭,加一抗(NR2B 浓度 1 2 000)、二抗,最后用化学发光法显色,X 线显影。Image-Pro Plus 软件计算每张胶片的 *A* 值,与相应的 *-action* 的 *A* 值相除,得出各检测指标的相对比值。

**2.7 数据统计** 所得数据均用 SPSS 16.0 for windows 软件统计处理,所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组资料的比较采用单因素方差分析(ONEWAY ANOVA)进行检验,2 组资料的比较,采用两两比较 *t* 检验。*P* < 0.05 有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 Morris 水迷宫试验结果** 由表 1 可见: 与 NS 对照组比较, 模型组的平均潜伏期(反映大鼠记忆能力)显著升高( $P < 0.01$ ), 而跨越平台次数、在象限内的游泳时间占整个游泳时间的百分率均降低(反映大鼠空间学习能力)( $P$  均  $< 0.01$ )。与模型组比较, 灵芝多糖高、中剂量组的平均潜伏期显著降低( $P$  均  $< 0.01$ ), 跨越平台次数及在象限内的游泳时间占整个游泳时间的百分率均升高( $P$  均  $< 0.01$ ); 提示灵芝多糖高、中剂量能明显增强试验性衰老大鼠学习记忆能力。

表 1 各组 Morris 水迷宫试验结果 (  $\bar{x} \pm s, n = 12$  )

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	平均潜伏期/s	跨越平台次数/次	在象限内的游泳时间/总游泳时间/%
NS 对照	-	31.24 $\pm$ 2.11 <sup>1)</sup>	10.26 $\pm$ 0.86 <sup>1)</sup>	42.36 $\pm$ 2.21 <sup>1)</sup>
模型	-	45.28 $\pm$ 1.69	5.41 $\pm$ 0.72	25.78 $\pm$ 2.02
灵芝多糖	125	33.16 $\pm$ 1.31 <sup>1)</sup>	9.89 $\pm$ 1.32 <sup>1)</sup>	40.61 $\pm$ 1.86 <sup>1)</sup>
	100	30.19 $\pm$ 1.06 <sup>1)</sup>	9.36 $\pm$ 1.01 <sup>1)</sup>	39.62 $\pm$ 1.68 <sup>1)</sup>
	75	44.01 $\pm$ 1.53	5.32 $\pm$ 0.89	24.36 $\pm$ 0.98

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 ~3 同)。

### 3.2 免疫组化染色结果

在 CA1 和 CA3 区, 镜下可见 NR2B 免疫反应阳性产物呈浅黄色或棕黄色颗粒状沉积, 分布在神经元细胞核四周; 定量结果显示, 模型组与 NS 对照组比较, NR2B 的平均 A 明显降低( $P < 0.01$ ); 经灵芝多糖高、中剂量治疗后, 该数值显著增高( $P < 0.01$ ), 接近对照组(表 2、图 1)。

表 2 免疫组化检测各组大鼠 CA1 和 CA3 区 NR2B 平均 A 比较 (  $\bar{x} \pm s, n = 6$  )

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	CA1 区	CA3 区
NS 对照	-	0.41 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>	0.43 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>
模型	-	0.22 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.05
灵芝多糖	125	0.42 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>	0.41 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>
	100	0.39 $\pm$ 0.03 <sup>1)</sup>	0.40 $\pm$ 0.05 <sup>1)</sup>
	75	0.26 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.04

**3.3 Western blot 检测结果** 模型组与 NS 对照组的相对比值(NR2B 与  $\beta$ -action 的 A 相除)比较, 显著性降低( $P < 0.01$ ); 经灵芝多糖高、中剂量治疗后, 显著升高( $P < 0.01, P < 0.01$ ), 亦接近对照组(详见表 3)。

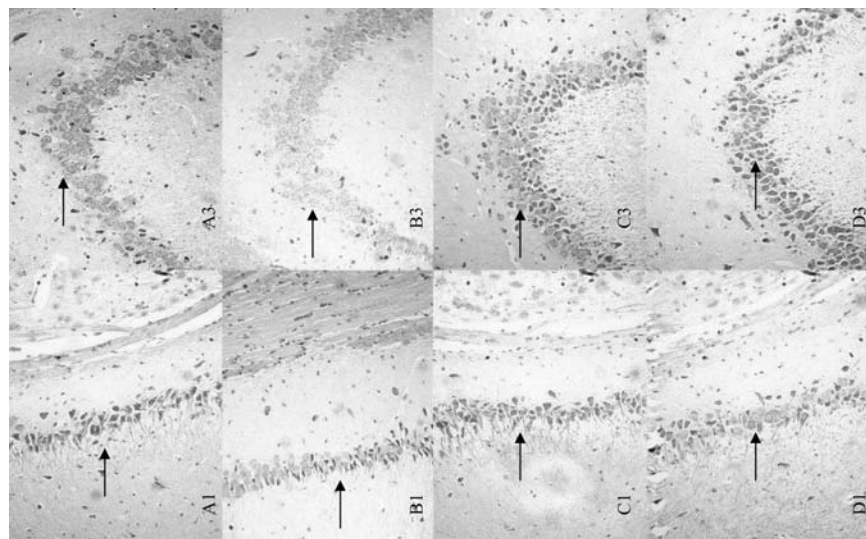


图 1 各组大鼠海马 CA1, CA3 区 NR2B 表达免疫组化结果 (  $\times 200$  )

CA1 区: A1, B1, C1, D1; CA3 区: A3, B3, C3, D3; A1, A3: NS 对照组; B1, B3: 模型组; C1, C3: 灵芝多糖 125  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; D1, D3: 灵芝多糖 100  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  组; “ ” 指示 NR2B 的阳性表达

表 3 Western blot 检测各组大鼠海马区 NR2B 与  $\beta$ -action 平均 A 的相对比值 (  $\bar{x} \pm s, n = 6$  )

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	NR2B 相对表达量
NS 对照	-	0.893 $\pm$ 0.046 <sup>1)</sup>
模型	-	0.431 $\pm$ 0.030
灵芝多糖	125	0.841 $\pm$ 0.041 <sup>1)</sup>
	100	0.832 $\pm$ 0.039 <sup>1)</sup>
	75	0.461 $\pm$ 0.028

### 4 讨论

目前, Morris 水迷宫试验是经典的用于检测大鼠学习记忆能力的方法, 因此, 本研究选用该方法检测 D-半乳糖(此模型是国内公认的衰老和脑老化动物模型)致衰老大鼠的学习记忆能力。本试验, 模型组大鼠平均潜伏期显著升高, 而跨越平台次数及在象限内的游泳时间占整个游泳时间的百分率均降低, 说明此大鼠学习记忆能力明显降低; 通过灵芝多糖治疗后, 上述指标均逆转性接近 NS 对照组, 这提示灵芝多糖具有明显改善 D-半乳糖所致大鼠学习记忆能力的作用; 这与邵华强等得出的结果一致<sup>[4]</sup>。又通过免疫组织化学染色、Western blotting 技术及图像分析方法对各组海马 CA1, CA3 区 NR2B 表达进行检测, 结果显示, 模型组大鼠 NR2B 平均 A 及比值明显低于 NS 对照组, 说明在 D-半乳糖所致大鼠学习记忆能力下降的同时伴有 NR2B 表达的降低(与 Clayton 的研究发现一致), 而通过灵芝多糖治疗后, 此数值又逆转性升高; 最值得注意的是, NR2B 平均 A 及比值的上升与大鼠的学习记忆能力被增强相一致。

大量的电生理、生化和药理学研究表明, 海马 NMDA 受体与空间学习记忆和新事物探究能力有关<sup>[5-6]</sup>, 又是海马神经元长时程增强效应(LTP)的主要调控者<sup>[7]</sup>; NR2B 在该调控过程中起到重要作用, 在 NR2B 基因敲除的动物模型中发现, LTP 丧失同时空间学习记忆能力受损<sup>[8]</sup>。NR2B 是 NMDA 受体复合物的调节亚单位, NR1 是其功能性亚单位, NR2B 和 NR1 亚单位形成的异聚体 NR2B/NR1 是 NMDA 受体复合物的主要形式之一; NMDA 受体的活性与此异聚体构成或功能的变化密切相关<sup>[9-10]</sup>, 而本试验, 通过免疫组化染色及 Western blotting 技术两种方法共同证实了, 灵芝多糖提高大鼠学习记忆能力的同时, 能提高海马内 NR2B 的表达; 故我们推测, 一定浓度的灵芝多糖通过增加 D-半乳糖致衰大鼠海马内 NR2B 的表达, 来改变异聚体 NR1/NR2B 的构成, 增强调节亚基 NR2B 的功能, 使 NMDA 受体的活性发生了改变, 诱导了与学习记忆密切相关的 LTP 的产生, 从而增强学习记忆能力。那么, 灵芝多糖提高学习记忆能力, 是否还和 NR1 有关? 有待进一步研究。综上, 灵芝多糖能显著升高试验性衰老大鼠海马内降低的 NR2B, 可能是其增强大鼠学习记忆的机制之一; 本试验从形态学角度为临床应用提供一定的理论依据。

#### [参考文献]

[ 1 ] 唐敬龙, 高维娟. 谷氨酸 NMDA 受体与学习记忆的关系[ J ]. 中国老年学杂志, 2009, 18( 29 ): 2408.  
[ 2 ] 宋月晗, 李峰, 刘晓兰, 等. 大鼠吗啡精神依赖时伏核和前额叶皮质中 NR2A, NR2B 表达的变化[ J ]. 中

国药物依赖性杂志, 2008, 17( 6 ): 419.

[ 3 ] Blum S, Moore A N, Adams F, et al. Amitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory[ J ]. Neurosci, 1999, 19: 3535.  
[ 4 ] 邵华强, 卢连华. 灵芝抗衰老作用的试验研究[ J ]. 山东中医药大学学报, 2002, 26( 15 ): 385.  
[ 5 ] REED J M, SQUIRE L R. Impaired recognition memory in patients with lesions limited to the hippocampal formation[ J ]. Behav Neurosci, 1997, 111 ( 4 ): 667.  
[ 6 ] LU KOYANOV N V, PAULA-BARBOSA M M. A single high dose of dizocilpine produces long-lasting impairment of the water maze performance in adult rats[ J ]. Neurosci Lett, 2000, 285( 2 ): 139.  
[ 7 ] Lou J H, Fu Z Y, Losi G, et al. Functional expression of distinct NMDA channel subunits tagged with green fluorescent protein in hippocampal neurons in culture [ J ]. Neuropharmacology, 2002, 42( 3 ): 306.  
[ 8 ] Clayton D A, Mesches M H. A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer344 rat[ J ]. Neurosci, 2002, 22: 3628.  
[ 9 ] Narita M, Aoki T, Suzuki T. Molecular evidence for the involvement of NR2B subunit containing N-methyl-D-aspartate receptors in the development of morphine-induced place preference[ J ]. Neuroscience, 2000, 101 ( 3 ): 601.  
[ 10 ] Kohr G. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution[ J ]. Cell Tissue Res, 2006, 326( 2 ): 439.

[责任编辑 聂淑琴]