

[科研报道]

五味子木脂素对记忆障碍模型小鼠自由基及胆碱能、单胺类神经递质的影响

谢云亮, 张 博*, 李世英, 阎 安
(北华大学附属医院, 吉林 吉林 132011)

摘要: **目的** 探讨五味子木脂素对记忆障碍模型小鼠自由基及胆碱能、单胺类神经递质的影响。**方法** 小鼠随机分为正常对照组, 模型组, 吡拉西坦 (20 mg/kg) 组及五味子木脂素低 (20 mg/kg)、中 (40 mg/kg)、高 (80 mg/kg) 剂量组, 灌胃给药, 1 次/d, 连续 28 d。末次给药 1 h 后, 除正常对照组外, 其余各组小鼠均腹腔注射东莨菪碱 (1 mg/kg) 以建立记忆障碍模型, 检测五味子木脂素对小鼠学习记忆能力、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、乙酰胆碱酯酶 (AChE)、乙酰胆碱转移酶 (ChAT), 5-羟色胺 (5-HT)、多巴胺 (DA) 的影响。**结果** 与模型组比较, 五味子木脂素低剂量组在第 5 天, 中、高剂量组在第 2~5 天时的逃避潜伏期均显著减少 ($P < 0.05$); 五味子木脂素各剂量组均能显著增加脑组织中 SOD、5-HT、DA 水平, 中、高剂量组 ChAT 水平也显著增加 ($P < 0.05$), 并可显著降低 MDA、AChE 水平 ($P < 0.05$)。**结论** 五味子木脂素具有改善记忆障碍模型小鼠学习记忆的作用, 其机制可能与减少自由基、AChE 水平, 增加 ChAT、5-HT、DA 水平有关。

关键词: 五味子木脂素; 记忆障碍; 自由基; 胆碱能神经递质; 单胺类神经递质

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2018)07-1589-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2018.07.030

随着生活条件的改善, 老年人口数量将急剧增加, 越来越多的人会受到学习、记忆能力下降相关症状的影响^[1], 故对其进行改善是目前医学研究的热点领域之一, 具有广阔的前景^[2]。目前, 预防及治疗学习、记忆能力减退的药物主要包括胆碱酯酶抑制剂、 β -淀粉蛋白沉积药、M 受体激动药、自由基清除药等, 但由于昂贵的价格及较大的副作用, 使其应用受到限制^[3]。

五味子木脂素主要包括五味子甲素、乙素、丙素、醇甲、醇乙、酯甲等, 具有减轻肝脏损伤、抗肿瘤、抗衰老、抗病毒等多种药理活性^[4], 也有着改善学习、记忆的作用, 其机制可能与抑制半胱天冬蛋白酶-3 蛋白的表达、核转录因子- κ B 的核转录有关^[5]。本实验拟通过腹腔注射东莨菪碱建立记忆障碍小鼠模型, 探讨五味子木脂素对自由基及胆碱能、单胺类神经递质的影响, 从而为相关药物或功能食品的研发提供实验基础。

1 材料

清洁级昆明种小鼠, 雄性, 体质量 (18 ± 2) g, 由吉林大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (吉) 2011-0004。五味子购自吉林省集安五味子种植基地, 经北华大学药学院苑广信副教授鉴定为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) 的干燥成熟果实。五味子木脂素 (自

制^[6]); 东莨菪碱 (含量 $> 98\%$) 对照品购于杭州民生药业集团有限公司 (批号 20130518); 吡拉西坦购于上海世康特制药有限公司 (批号 20140227); SOD、MDA、AChE、ChAT 检测试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供; 5-HT、DA 购于美国 Sigma 公司; 其余试剂均为优级纯或分析纯。Morris 水迷宫 (成都泰盟公司); MDF-192 型超低温冰箱 (日本 SANYO 公司); 732MC 型紫外分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司); LC-6A 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司)。

2 方法

2.1 分组、给药及模型制备 将小鼠随机分为正常对照组、模型组、吡拉西坦 (20 mg/kg) 组及五味子木脂素低 (20 mg/kg)、中 (40 mg/kg)、高 (80 mg/kg) 剂量组, 每组 16 只, 灌胃给药, 1 次/d, 连续 28 d, 正常对照组和模型组均灌胃给予等体积生理盐水。末次给药 1 h 后, 除正常对照组外, 其余各组小鼠均腹腔注射 1 mg/kg 东莨菪碱以建立记忆障碍模型^[7]。

2.2 Morris 水迷宫试验^[8-9] 从 4 个不同象限将小鼠放入水中, 记录并观察其寻找平台的时间, 如果大于 180 s, 则需将其引导至平台处, 此时潜伏期记为 180 s。每次训练间隔时间为 1 h, 记录小鼠寻找平台的时间, 每天训练 4 次,

收稿日期: 2017-06-22

基金项目: 吉林省教育厅“十二五”科学研究计划项目 (吉教科合字 [2014] 499)

作者简介: 谢云亮 (1980—), 男, 博士, 副主任医师, 从事神经系统疾病的诊断及治疗研究。Tel: 13944225857, E-mail: 2047415819@qq.com

* **通信作者:** 张 博 (1981—), 女, 硕士, 主治医师, 从事神经系统疾病的诊断及治疗研究

共 5 d。

2.3 脑组织 SOD、MDA、AChE、ChAT 水平检测 Morris 水迷宫试验结束后, 每组随机取 8 只小鼠, 颈椎脱臼法处死后立刻在冰上断头取脑, 预冷生理盐水漂洗后分离脑组织, 加入预冷生理盐水制备 10% 脑组织匀浆液, 离心, 取上清, -80 ℃ 低温冰箱中保存备用。然后, 按照试剂盒说明书中的操作步骤, 采用分光光度法检测水平。

2.4 脑组织 5-HT、DA 水平检测 每组取剩余 8 只小鼠, 按“2.4”项下方法分离脑组织, 精密称取 400 mg, 加入 2 mL 0.1 mol/L 高氯酸, 在冰浴上匀浆, 离心, 取上清, 0.45 μm 微孔滤膜过滤。检测条件为进样量 100 μL; 流动相柠檬酸三钠 (20 mmol/L), 用盐酸调 pH 至 4.5, 0.45 μm 微

表 1 五味子木脂素对小鼠学习、记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 16$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	逃避潜伏期/s				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
正常对照组	—	166.4 ± 21.6	147.2 ± 19.8	121.4 ± 15.5	89.5 ± 16.7	65.1 ± 9.2
模型组	—	172.7 ± 20.4	162.4 ± 24.4 *	156.6 ± 21.8 *	136.7 ± 15.6 *	129.0 ± 14.1 *
吡拉西坦组	20	168.9 ± 16.6	135.9 ± 18.7 [#]	127.8 ± 21.1 [#]	106.4 ± 14.2 [#]	71.2 ± 11.6 [#]
五味子木脂素低剂量组	20	169.6 ± 18.3	155.6 ± 21.8	140.1 ± 25.6	128.3 ± 14.9	105.6 ± 11.5 [#]
五味子木脂素中剂量组	40	167.5 ± 19.2	143.0 ± 18.3 [#]	135.7 ± 13.5 [#]	119.6 ± 12.7 [#]	97.4 ± 21.2 [#]
五味子木脂素高剂量组	80	171.3 ± 16.5	134.2 ± 12.6 [#]	129.6 ± 15.5 [#]	112.4 ± 9.4 [#]	84.3 ± 12.4 [#]

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$

3.2 五味子木脂素对小鼠自由基的影响 模型组小鼠 SOD 水平显著降低, 而 MDA 水平显著增加, 与正常对照组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 五味子木脂素各剂量组均能显著增加 SOD 水平, 降低 MDA 水平 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 五味子木脂素对小鼠自由基的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	SOD/ (U·mg prot ⁻¹)	MDA/ (nmol·mg prot ⁻¹)
正常对照组	—	256.45 ± 35.69	0.24 ± 0.03
模型组	—	143.37 ± 18.71 *	0.55 ± 0.07 *
吡拉西坦组	20	260.31 ± 41.53 [#]	0.27 ± 0.04 [#]
五味子木脂素低剂量组	20	209.97 ± 33.19 [#]	0.46 ± 0.06 [#]
五味子木脂素中剂量组	40	215.81 ± 26.03 [#]	0.42 ± 0.05 [#]
五味子木脂素高剂量组	80	247.16 ± 30.48 [#]	0.31 ± 0.02 [#]

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$

3.3 五味子木脂素对小鼠胆碱能神经递质的影响 模型组小鼠 AChE 水平显著增加, 与正常对照组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 五味子木脂素各剂量组均能显著降低 AChE 水平 ($P < 0.05$)。与正常对照组比较, 模型组小鼠 ChAT 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 五味子木脂素各剂量组小鼠 ChAT 水平均有一定程度增加, 以中、高剂量组更显著 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 五味子木脂素对小鼠单胺类神经递质的影响 与正常对照组比较, 模型组小鼠 5-HT、DA 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 五味子木脂素各剂量组均能显著增加两者水平 ($P < 0.05$)。见表 4。

4 讨论

自由基与记忆障碍的出现密不可分, 神经组织由于其

孔滤膜过滤, 加 5% 甲醇, 超声法脱气; 激发波长 280 nm; 发射波长 315 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 5 ℃。

2.5 统计学分析 所得数据均用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, SPSS 12.0 软件进行单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 五味子木脂素对小鼠学习、记忆能力的影响 除第 1 天外, 模型组小鼠逃避潜伏期与正常对照组比较均显著增加 ($P < 0.05$), 表明建模成功; 与模型组比较, 五味子木脂素各剂量组小鼠逃避潜伏期均有不同程度减少, 其中低剂量组在第 5 天, 中、高剂量组在第 2 ~ 5 天时更显著 ($P < 0.05$)。见表 1。

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	AChE/ (U·mg prot ⁻¹)	ChAT/ (U·mg prot ⁻¹)
正常对照组	—	0.64 ± 0.21	6.02 ± 1.21
模型组	—	0.98 ± 0.27 *	4.25 ± 0.82 *
吡拉西坦组	20	0.62 ± 0.15 [#]	5.84 ± 0.77 [#]
五味子木脂素低剂量组	20	0.86 ± 0.20 [#]	4.45 ± 0.64
五味子木脂素中剂量组	40	0.82 ± 0.19 [#]	5.08 ± 0.78 [#]
五味子木脂素高剂量组	80	0.71 ± 0.13 [#]	4.93 ± 0.62 [#]

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$

表 3 五味子木脂素对小鼠胆碱能神经递质的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	5-HT/ (ng·g ⁻¹)	DA/ (ng·g ⁻¹)
正常对照组	—	1.81 ± 0.37	1.68 ± 0.15
模型组	—	0.72 ± 0.26 *	1.16 ± 0.28 *
吡拉西坦组	20	1.77 ± 0.32 [#]	1.61 ± 0.21 [#]
五味子木脂素低剂量组	20	1.03 ± 0.25 [#]	1.35 ± 0.30 [#]
五味子木脂素中剂量组	40	1.19 ± 0.28 [#]	1.44 ± 0.24 [#]
五味子木脂素高剂量组	80	1.54 ± 0.20 [#]	1.57 ± 0.18 [#]

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$

表 4 五味子木脂素对小鼠单胺类神经递质的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	5-HT/ (ng·g ⁻¹)	DA/ (ng·g ⁻¹)
正常对照组	—	1.81 ± 0.37	1.68 ± 0.15
模型组	—	0.72 ± 0.26 *	1.16 ± 0.28 *
吡拉西坦组	20	1.77 ± 0.32 [#]	1.61 ± 0.21 [#]
五味子木脂素低剂量组	20	1.03 ± 0.25 [#]	1.35 ± 0.30 [#]
五味子木脂素中剂量组	40	1.19 ± 0.28 [#]	1.44 ± 0.24 [#]
五味子木脂素高剂量组	80	1.54 ± 0.20 [#]	1.57 ± 0.18 [#]

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$

结构的特殊性, 更容易受到自由基的攻击^[10], 它会加速 DNA 等生物大分子损伤, 诱导神经细胞凋亡, 最终引发记忆障碍^[11]。SOD 是体内最重要的抗氧化酶, 可通过阻止由 O₂ 启动的自由基链锁反应, 从而达到清除自由基的目的^[12]; MDA 为体内各类氧化反应的终产物, 其水平高低可以反应脂质过氧化损伤程度^[13]。本实验发现, 与模型组比较各剂量组五味子木脂素均能显著增加脑组织 SOD 水

平,降低MDA水平,表明五味子木脂素改善模型小鼠学习、记忆能力的作用可能与自由基生成的减少有关。

脑内乙酰胆碱(ACh)水平升高,可使记忆功能区的神经传导能力增强,加速信号的传递过程,从而使学习、记忆能力增强;反之,由于病变导致胆碱能系统损害时,可引起脑内ACh水平降低,从而使学习、记忆能力下降^[14]。目前,胆碱酯酶抑制剂(AChEI)是应用最广泛的改善记忆障碍药物,可通过抑制AChE活性来增加脑内ACh水平;ChAT为胆碱能神经元的标志酶,在神经细胞内合成,可将乙酰辅酶A转移到胆碱上,最终合成ACh^[15]。本实验发现,与模型组比较五味子木脂素各剂量组均能显著降低脑组织AChE水平($P<0.05$),而中、高剂量组可显著升高ChAT水平($P<0.05$),表明五味子木脂素改善模型小鼠学习、记忆能力的作用可能与增加脑内ACh水平有关。

单胺类神经递质是中枢神经系统的重要信息传递物质,参与脑内学习、记忆功能的调节,主要包括5-HT和DA,两者在脑组织中水平的高低与记忆障碍相关疾病的诊断和治疗密切相关^[16]。Meneses等^[17]研究发现,脑内5-HT水平增加可改善神经元功能,增强记忆能力;买文丽等^[18]报道,DA在学习行为、突触可塑性及与学习相关的即刻早期基因表达中发挥着重要作用。本实验发现,五味子木脂素低、中、高剂量组均能显著增加小鼠脑组织5-HT、DA水平($P<0.05$),表明五味子木脂素改善模型小鼠学习、记忆能力的作用可能与增加脑内5-HT和DA水平有关。

参考文献:

[1] Wolff J K, Warner L M, Ziegelmann J P, *et al.* Translating good intentions into physical activity: older adults with low prospective memory ability profit from planning[J]. *J Behav Med*, 2016, 39(3): 472-482.

[2] Wang X, Wang L, Jiang R, *et al.* Exendin-4 antagonizes Aβ1-42-induced attenuation of spatial learning and memory ability [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(5): 2885-2892.

[3] Liu J, Yan X, Li L, *et al.* Ginsenoside Rd improves learning and memory ability in APP transgenic mice[J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 57 (4): 522-528.

[4] 罗家洪, 庄 艳. 五味子化学成分及生理活性研究进展 [J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(10): 174-175.

[5] 谢云亮. 五味子有效成分分离纯化及对记忆障碍模型小鼠学习记忆的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2013.

[6] 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.

[7] 李 娟, 钟正灵, 储冀汝, 等. 孟鲁司特对东莨菪碱模型小鼠学习记忆及脑内胆碱能神经的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(5): 512-516.

[8] Barrientos R M, Kitt M M, D'Angelo H M, *et al.* Stable, long-term, spatial memory in young and aged rats achieved with a one day Morris water maze training protocol[J]. *Learn Mem*, 2016, 23(12): 699-702.

[9] Cai H B, Wu G L, Huang C H, *et al.* Effect of Zhuang Jing Decoction on learning and memory ability in aging rats[J]. *Rejuvenation Res*, 2016, 19(4): 303-308.

[10] Domenico F, Barone E, Perluigi M, *et al.* Strategy to reduce free radical species in Alzheimer's disease: an update of selected antioxidants[J]. *Expert Rev Neurother*, 2015, 15(1): 19-40.

[11] Palmer J C, Tayler H M, Love S. Endothelin-converting enzyme-1 activity, endothelin-1 production, and free radical-dependent vasoconstriction in Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2013, 36(3): 577-587.

[12] Nadihe V, Bae Y H. Synthesis and characterization of hemoglobin conjugates with antioxidant enzymes via poly (ethylene glycol) cross-linker (Hb-SOD-CAT) for protection from free radical stress [J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 47 (5): 603-613.

[13] 张晓菲, 路 畅, 贺晓丽, 等. 淫羊藿苷预防给药对快速老化小鼠SAMP8学习记忆能力及脑组织线粒体氧化应激的影响[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(7): 925-930.

[14] Yaguchi T, Nagata T, Nishizaki T. Dilinoleoylphosphatidylcholine ameliorates scopolamine-induced impairment of spatial learning and memory by targeting alpha 7 nicotinic ACh receptors[J]. *Life Sci*, 2009, 84(9-10): 263-266.

[15] Calabria M, Geroldi C, Lussignoli G, *et al.* Efficacy of acetylcholinesterase-inhibitor (ACHEI) treatment in Alzheimer's disease: a 21-month follow-up "real world" study[J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 2009, 49(1): e6-e11.

[16] 朱 蕾, 张 茹, 李廷利. 刺五加对睡眠剥夺大鼠学习记忆及海马单胺类神经递质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 219-223.

[17] Meneses A. 5-HT systems: emergent targets for memory formation and memory alterations[J]. *Rev Neurosci*, 2013, 24(6): 629-664.

[18] 买文丽, 刘 红, 许 薇, 等. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠空间记忆和海马单胺类递质影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(1): 35-37.