

# 松果菊苷对低压低氧环境下小鼠空间认知功能的改善作用及机制研究<sup>△</sup>

郑洪南<sup>1,2\*</sup>, 苏钰婷<sup>3</sup>, 赫雪峰<sup>1</sup>, 王剑波<sup>1,4#</sup>(1.空军军医大学中药与天然药物学教研室, 西安 710032; 2.中国人民解放军南部战区海军第一医院药剂科, 广东湛江 524005; 3.西安工程大学新媒体艺术学院, 西安 710048; 4.四川省中医药转化医学中心, 成都 610041)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)03-0328-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.03.10

**摘要** 目的:研究松果菊苷(ECH)对低压低氧环境下小鼠空间认知功能的改善作用及其作用机制。方法:将60只小鼠随机分为空白组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、阳性组(银杏叶提取物片, 100 mg/kg)和ECH低、中、高剂量组(50、75、100 mg/kg), 每组10只。除空白组外, 其余各组小鼠均饲养于低压氧仓模拟低压低氧, 各组小鼠每天灌胃给药1次, 连续给药7 d(给药后立即放入低压氧仓内); 以2 min内小鼠水平与垂直活动次数为指标, 评价其负面情绪与空间认知功能; 苏木精-伊红染色后显微镜观察小鼠海马组织病理学变化; 并检测小鼠海马组织中的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)的水平。结果:与空白组比较, 模型组小鼠水平活动次数、MDA水平均显著增加/升高( $P<0.05$ ); 垂直活动次数, SOD、CAT、GSH-Px水平均显著减少/降低( $P<0.05$ ); 海马组织CA1区锥体细胞排列疏松, 多数锥体细胞紧缩深染。与模型组比较, 阳性组和ECH高剂量组小鼠水平活动次数、MDA水平显著减少/降低( $P<0.05$ ); 垂直活动次数, SOD、CAT、GSH-Px水平显著增加/升高( $P<0.05$ ); 海马组织CA1区锥体细胞数量丰富, 排列紧密, 少量锥体细胞紧缩深染。结论: ECH对低压低氧环境下小鼠空间认知功能障碍具有一定的改善作用, 其机制可能与升高海马组织中SOD、CAT、GSH-Px水平及降低MDA水平有关。

**关键词** 松果菊苷; 低压低氧; 空间认知功能; 海马组织; 小鼠

## Improving Effects of Echinacoside on Spatial Cognitive Function in Mice under Hypobaric Hypoxia Environment and Its Mechanism Study

ZHENG Hongnan<sup>1, 2</sup>, SU Yuting<sup>3</sup>, HE Xuefeng<sup>1</sup>, WANG Jianbo<sup>1, 4</sup> (1.TCM and Natural Medicine Teaching and Research Section, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2.Dept. of Pharmacy, the First Naval Hospital of Southern Theater Command, Guangdong Zhanjiang 524005, China; 3.School of New Media Art, Xi'an Polytechnic University, Xi'an 710048, China; 4.Sichuan Institute for Translational Chinese Medicine, Chengdu 610041, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the improving effects of echinacoside (ECH) on spatial cognitive function in mice under hypobaric hypoxia environment and its mechanism. METHODS: Totally 60 mice were randomly divided into blank group (normal saline), model group (normal saline), positive group (Ginkgo leaf extract tablet, 100 mg/kg) and ECH low-dose, medium-dose and high-dose groups (50, 75, 100 mg/kg), with 10 mice in each group. Except for blank group, other groups were cultured in hypobaric oxygen chamber to simulate hypobaric hypoxia; they were given relevant medicine intragastrically once a day, for consecutive 7 d (Placing into hypobaric oxygen chamber immediately after medication). Using the times of horizontal and vertical activities of mice in 2 min as index, negative emotions and spatial cognitive function were evaluated. Histopathological changes of hippocampus in mice were observed by microscopy after HE staining. The levels of SOD, CAT, GSH-Px and MDA in hippocampal tissue of mice were detected. RESULTS: Compared with blank group, the times of horizontal activities, MDA level were increased significantly in model group ( $P<0.05$ ), while the times of vertical activities, the levels of SOD, CAT and GSH-Px were decreased significantly ( $P<0.05$ ); the pyramidal cells in the CA1 area of the hippocampal tissue were arranged loosely, and many pyramidal cells were compressed and stained deeply. Compared with model group, the times of horizontal activities and MDA level were decreased significantly in positive group and ECH high-dose group ( $P<0.05$ ), while the times of vertical activities, the levels of SOD, CAT and GSH-Px were increased significantly ( $P<0.05$ ); the pyramidal cells in the CA1 region of the hippocampal tissue were abundant and closely arranged, and a few of them are constricted and deeply stained. CONCLUSIONS:

<sup>△</sup> 基金项目:陕西省大型科学仪器协作共用项目(No.2015TG-01); 四川省2017年“千人计划”引进人才项目(No.川组通[2018]27号)

\* 药师, 硕士研究生。研究方向: 中药药理。电话: 028-84348180。E-mail: 422856837@qq.com

# 通信作者: 主任药师, 博士。研究方向: 中药药理。电话: 028-84348180。E-mail: yyswbj@fmmu.edu.cn

ECH can improve spatial cognitive impairment of mice under hypobaric hypoxia environment, the mechanism of which may be associated with up-regulation of SOD, CAT and GSH-Px, down-regulation of MDA in the hippocampal tissue.

**KEYWORDS** Echinacoside; Hypobaric hypoxia; Spatial cognitive function; Hippocampal tissue; Mice

高原低压低氧环境对人体的各种机能不同程度地损伤,尤其是中枢神经系统(CNS)对低压低氧尤为敏感,海马区是中枢神经系统中空间认知功能最为密切的脑部区域;脑部功能的正常运转需要消耗机体大约20%的氧气,在低压低氧环境中暴露能引起海马组织的氧化应激损伤,从而造成认知功能障碍<sup>[1-3]</sup>。在高原低压低氧条件下,极易使机体产生一系列生理及心理的变化,如损伤空间认知能力,衰退记忆能力,出现眩晕、头痛、恶心、呕吐、反应迟钝等一系列反应。松果菊苷(Echinacoside, ECH)是从管花肉苁蓉中提取分离的一种天然化合物<sup>[4]</sup>。研究表明,ECH可以提高人体内重要的抗氧化物质超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性以及降低自由基损伤不饱和脂肪酸生成的脂类过氧化分解产物丙二醛(MDA)的含量,从而达到神经保护的作用<sup>[5]</sup>,还具有抗神经细胞凋亡、抗炎、抗肿瘤和改善学习记忆能力以及免疫调节<sup>[6-7]</sup>等一系列作用。但是,对在高原低压低氧的条件下引起的负面情绪增长与空间认知探索能力减退,ECH是否依然可以起到保护作用尚不明确。本实验通过使用低压氧舱模拟低压低氧环境,观察ECH对低压低氧环境下小鼠的行为学以及海马组织形态学的影响,并初步研究其对小鼠空间认知功能改善作用的机制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

小型低压低氧舱(空军军医大学军事生物医学工程系自制);7420动物行为学分析仪(意大利Ugo公司);Microfuge 20高速低温离心机(美国Bio-Rad公司);BX-51光学显微镜(日本Nikon公司);A6半自动生化仪(北京松上技术有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

松果菊苷标准品(西安昊轩生物科技有限公司,批号:S-003-20170119,纯度:99.43%);银杏叶提取物片(德国威玛舒培博士药厂,批号:1041216,含银杏叶黄酮苷24%、萜类内酯6%);SOD(批号:20171228)、CAT(批号:20171203)、GSH-Px(批号:20180102)、MDA(批号:20171211)试剂盒均购自北京华英生物技术研究所。

### 1.3 动物

SPF级C57小鼠60只,♂,6~8周龄,体质量(20±2)g,购于空军军医大学实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(陕)2014-002。实验期间小鼠自由饮食水,饲养环境的温度为21~23℃,相对湿度为40%~60%,明暗各12h交替。

## 2 方法

### 2.1 分组与给药

将小鼠适应性饲养3d后,随机分成空白组、模型组、阳性组和ECH高、中、低剂量组,每组10只。ECH高、中、低剂量组(100、75、50 mg/kg)<sup>[8-10]</sup>,空白组和模型

组给予等体积生理盐水,阳性组参照银杏叶提取物片说明书中小鼠药理毒理实验研究给予100 mg/kg。除空白组外,其余各组均放置于模拟6 100 m海拔低压低氧仓中饲养,自由饮食和水,每天早上8:00灌胃给药1次,连续给药7 d。

### 2.2 小鼠负面情绪与空间认知功能评价

灌胃给药7 d后,采用动物行为学分析仪测试小鼠负面情绪与空间认知能力。首先将每只小鼠置于黑暗环境中适应5 min,然后将每只小鼠头朝壁放入动物行为学分析仪中,记录小鼠在2 min内的水平与垂直活动次数,水平活动的情况体现小鼠的负面情绪,活动次数越多,负面情绪越大;垂直活动情况体现小鼠的空间探索能力,活动次数越多,空间认知能力越强<sup>[11-12]</sup>。

### 2.3 小鼠海马组织的形态学观察

行为学实验结束后,各组取5只小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉后,暴露出小鼠胸腔,手术剪从小鼠的左心室心尖插入到主动脉,剪开心耳,用40 mL生理盐水冲洗,再用4%多聚甲醛40 mL灌注后,立即断头;在冰上迅速取脑,放入4%的多聚甲醛中固定、脱水、石蜡包埋,切成10 μm薄片,行苏木精-伊红(HE)染色<sup>[13-14]</sup>,使用光学显微镜观察各组小鼠海马组织形态学变化。

### 2.4 小鼠海马组织SOD、CAT、GSH-Px、MDA水平的测定

将各组剩余的5只小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉后,按“2.3”项下“暴露出小鼠胸腔……用40 mL生理盐水冲洗”处理后立即断头,在冰上迅速取脑,剥离小鼠海马组织,生理盐水清洗后用滤纸吸干多余水分,于离心管中冻存过夜。次日取出复苏解冻,称取0.1 g放入玻璃匀浆管口剪碎,加入9倍体积的生理盐水进行匀浆,制成10%的匀浆液,然后在4℃条件下3 000 r/min离心10 min,收集上清液,按照相应试剂盒说明书操作,检测SOD、CAT、GSH-Px、MDA的水平。

### 2.5 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Tukey检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 小鼠负面情绪与空间认知功能评价结果

与空白组比较,模型组小鼠水平活动次数显著增加( $P < 0.05$ ),垂直活动次数显著减少( $P < 0.05$ )。与模型组比较,ECH高剂量组、阳性组水平活动次数显著减少( $P < 0.05$ ),ECH高剂量组和阳性组垂直活动显著增加( $P < 0.05$ )。结果表明,ECH可明显改善低压低氧所致的小鼠负面情绪,提高其空间认知能力。各组小鼠水平与垂直活动次数见表1。

### 3.2 小鼠海马组织的形态学观察结果

各组小鼠海马组织形态学观察结果见图1。

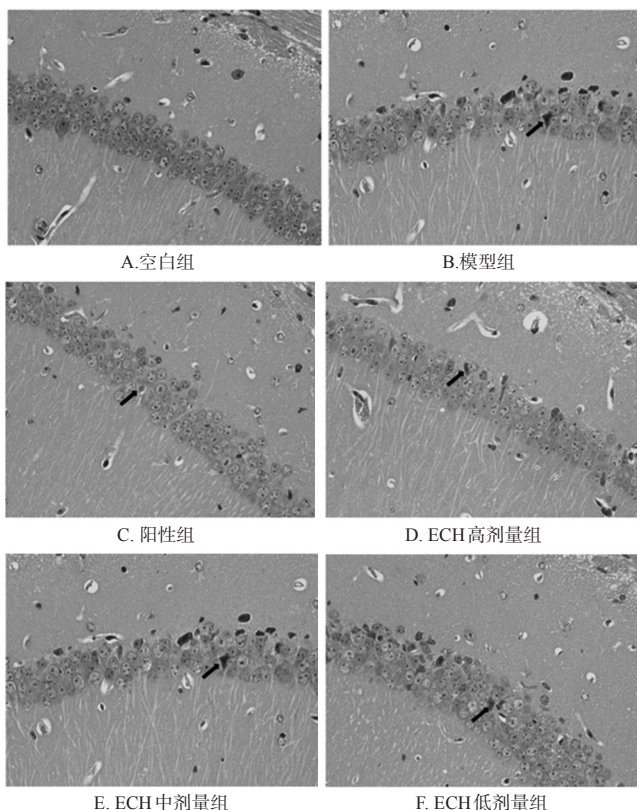
表1 各组小鼠水平与垂直活动次数( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 1 The times of horizontal and vertical activities of mice( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	水平活动次数	垂直活动次数
空白组	247.60 ± 8.94	27.60 ± 2.09
模型组	332.10 ± 17.53*	10.70 ± 2.16*
阳性组	268.80 ± 10.56#	18.80 ± 1.38#
ECH高剂量组	264.40 ± 13.25#	19.50 ± 2.06#
ECH中剂量组	279.80 ± 10.56	14.40 ± 1.66
ECH低剂量组	301.60 ± 19.69	12.00 ± 1.87

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$

Note:vs. blank group,\* $P < 0.05$ ; vs. model group,# $P < 0.05$



注:图中箭头指紧缩深染的锥体细胞

Note:The arrow in the figure refers to the constricted hyperchromatic pyramidal cells

图1 各组小鼠海马组织的形态学观察结果(HE,×400)

Fig 1 Morphology observation of hippocampal tissue in mice(HE,×400)

如图1所示,与空白组比较,模型组小鼠海马CA1区锥体细胞排列疏松,多数锥体细胞紧缩深染。与模型组比较,阳性组小鼠海马CA1区锥体细胞排列较紧密,少量锥体细胞紧缩深染,ECH高剂量组小鼠海马CA1区锥体细胞数量丰富,排列紧密,极少量锥体细胞紧缩深染,ECH中剂量组小鼠海马CA1区锥体细胞排列较紧密,少量锥体细胞紧缩深染,ECH低剂量组小鼠海马CA1区锥体细胞排列较疏松,较多锥体细胞紧缩深染。

### 3.3 小鼠海马组织中SOD、CAT、GSH-Px、MDA水平检测结果

与空白组比较,模型组小鼠海马组织中SOD、CAT、GSH-Px水平均显著降低( $P < 0.05$ ),MDA水平均显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,阳性组和ECH高剂量组小鼠海马组织中SOD、CAT、GSH-Px水平均显著升高( $P < 0.05$ ),MDA水平均显著降低( $P < 0.05$ );ECH中剂量组CAT水平显著升高( $P < 0.05$ ),MDA水平显著降低( $P < 0.05$ )。各组小鼠海马组织中SOD、CAT、GSH-Px、MDA水平测定结果见表2。

表2 各组小鼠海马组织中SOD、CAT、GSH-Px、MDA水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 2 Levels of SOD, CAT, GSH-Px and MDA in hippocampal tissue of mice( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	SOD,U/mL	CAT,U/mL	GSH-Px,U/mL	MDA,nmol/mL
空白组	15.73 ± 2.32	10.19 ± 0.83	139.64 ± 6.01	0.70 ± 0.02
模型组	6.65 ± 0.59*	3.06 ± 0.19*	68.53 ± 18.02*	1.48 ± 0.14*
阳性组	9.18 ± 0.41#	7.76 ± 2.40#	109.84 ± 12.83#	0.85 ± 0.05#
ECH高剂量组	9.63 ± 0.70#	8.40 ± 0.40#	122.89 ± 8.15#	0.72 ± 0.10#
ECH中剂量组	8.57 ± 0.38	7.43 ± 0.74#	92.86 ± 3.55	1.07 ± 0.13#
ECH低剂量组	8.02 ± 0.38	6.60 ± 0.83	89.54 ± 25.09	1.40 ± 0.25

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$

Note:vs. blank group,\* $P < 0.05$ ; vs. model group,# $P < 0.05$

## 4 讨论

有关研究表明,高原条件下的低氧可以诱导人高级神经功能紊乱,从而导致人学习记忆能力衰退和动作的协调性降低等<sup>[15-17]</sup>。相关研究表明<sup>[18]</sup>,高原条件下大脑认知功能损伤的作用机制可能与大脑海马组织氧化应激水平的改变有关。低压低氧能够引起小鼠的氧化应激损伤从而导致脑部海马组织的空间认知功能障碍。急性低压低氧是一种单因素温和暴露刺激<sup>[19]</sup>,低氧可引起小鼠空间认知功能的损害,并可引起小鼠活动量的异常<sup>[12,20]</sup>。低氧后小鼠水平活动度的增加可能与低氧引起运动皮层脑细胞组织的结构发生改变有一定关联,急性低压低氧可降低小鼠的空间学习记忆能力,其作用机制可能与海马细胞组织中SOD、CAT、GSH-Px、MDA水平变化有关<sup>[21-23]</sup>。

银杏叶提取物是从银杏叶中提取的活性物质,主要成分为黄酮苷及银杏内酯,具有强抗氧化和清除自由基活性作用<sup>[24]</sup>,主要用于治疗脑部、周围血流循环障碍等<sup>[25]</sup>。ECH具有多种功效,如抗氧化、抗炎、护肝、保护神经、改善学习记忆以及免疫调节等<sup>[26]</sup>,尤其是在保护抗氧化应激损伤水平上具有巨大的潜力,其分子结构中含有的苯丙烯基和苯乙醇基,均带有邻位酚羟基,具有清除活性氧、自由基的作用<sup>[27-28]</sup>,因此,推测其可能对大脑海马组织具有保护作用<sup>[29-30]</sup>。本实验结果也证明ECH可以减少小鼠负面情绪(水平活动次数),并同时提高小鼠空间认知能力(垂直活动的次数);HE染色结果也表明,ECH可减轻低压低氧对小鼠海马组织锥体细胞的损伤。

综上所述,ECH对低压低氧环境下小鼠空间认知障碍具有明显的改善作用,其作用机制可能与上调海马组

织中SOD、CAT、GSH-Px水平以及下调MDA水平有关,该实验结果可为后续ECH的临床应用提供参考。

## 参考文献

- [1] 高钰琪,牛文忠,谢印芝,等.高原军事医学[M].重庆:重庆出版社,2005:549.
- [2] MAITI P, SINGH SB, MALLICK B, et al. High altitude memory impairment is due to neuronal apoptosis in hippocampus, cortex and striatum[J]. *J Chem Neuroanat*, 2008, 36(4):227-238.
- [3] MAITI P, MUTHURAJU S, ILAVAZHAGAN G, et al. Hypobaric hypoxia induces dendritic plasticity in cortical and hippocampal pyramidal neurons in rat brain[J]. *Behav Brain Res*, 2008, 189(2):233-243.
- [4] LI XH, GOU CY, YANG HS, et al. Echinacoside ameliorates D-galactosamine plus lipopolysaccharide-induced acute liver injury in mice via inhibition of apoptosis and inflammation[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2014, 49(8):993-1000.
- [5] PELLATI F, BENVENUTI S, MAGRO L, et al. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of Echinacea spp.[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, 35(2):289-291.
- [6] DENG M, ZHAO JY, TU PF, et al. Echinacoside rescues the SHSY5Y neuronal cells from TNF alpha-induced apoptosis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 505(3):11-18.
- [7] GUSTAVO C. ROMAN. Facts, myths, and controversies in vascular dementia [J]. *J Neurol Sci*, 2004, 226(1/2):49-52.
- [8] PENG L, DAN Z, MANTIAN M, et al. Quercetin ameliorates hypobaric hypoxia-induced memory impairment through mitochondrial and neuron function adaptation via the PGC-1-pathway[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2015. DOI:10.3233/RNN-140446.
- [9] 骆新,李建英,陶义存,等.肉苁蓉苯乙醇苷对大鼠高原脑水肿的防治作用[J].*中南药学*, 2014, 8(12):747-750.
- [10] 田枫,张阔,郑振辉,等.松果菊苷改善SAM-P/8小鼠学习记忆能力作用机制初探[J].*实验动物科学与管理*, 2006, 2(23):14-15.
- [11] DUSEK JA, EICHENBAUM H. The hippocampus and memory for orderly stimulus relations[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(13):7109-7114.
- [12] LEVSHINA IP, MATS VN, PASIKOVA NV, et al. Comparison of the behavior of rats after immobilization with structural changes in the motor cortex[J]. *Neurosci Behav Physiol*, 2009, 39(9):915-919.
- [13] 姚茹,张锐虎,陈朝阳,等.莲心碱对佛波酯所致耳肿胀炎症模型小鼠的抗炎作用及机制研究[J].*中国药房*, 2018, 29(17):2364-2368.
- [14] 郑伟,海军,杜立学,等.甲基莲心碱对肝缺血再灌注损伤模型小鼠氧化应激和炎症反应的影响[J].*中国药房*, 2018, 29(15):2068-2072.
- [15] XIAO J, HUANG Y, LI X. TNP-ATP is beneficial for treatment of neonatal hypoxia-induced hypomyelination and cognitive decline[J]. *Neurosci Bull*, 2016, 32(1):99-107.
- [16] WEI B, LI L, HE A. Hippocampal NMDAR-Wnt-Catenin signaling disrupted with cognitive deficits in adolescent offspring exposed to prenatal hypoxia[J]. *Behav Brain Res*, 2016. DOI:10.1016/j.brainres.2015.11.041.
- [17] PAVILCEK V, SCHINLO C, NEDEL A, et al. Cognitive and emotional processing at high altitude[J]. *Aviat Space Environ Med*, 2005, 76(1):28-33.
- [18] MAITI P, SINGH S B, MALLICK B, et al. High altitude memory impairment is due to neuronal apoptosis in hippocampus, cortex and striatum[J]. *J Chem Neuroanat*, 2008, 36(3/4):227-238.
- [19] 尉晓娜,谢于鹏.低氧对小鼠旷场行为的影响[J].*温州医学院学报*, 2012, 42(1):17-18.
- [20] DUSEK JA, EICHENBAUM H. The hippocampus and memory for orderly stimulus relations[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(13):7109-7114.
- [21] 林建雄,隋建峰.急性低压低氧对大鼠空间学习记忆的影响及与海马内孤啡肽的关系[J].*中国应用生理学杂志*, 2004, 20(1):12-13.
- [22] SHUKITT HB, STILLMAN MJ, WELCH DI, et al. Hypobaric hypoxia impairs spatial memory in an elevation-dependent fashion[J]. *Behav Neural Biol*, 1994, 62(3):244-252.
- [23] ABD-ELHADY RM, ELSHEIKH AM, KHALIFA AE. Anti-amnesic properties of ginkgo biloba extract on impaired memory function induced by aluminum in rats[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2013, 31(7):598-607.
- [24] 王晓霞,王颖超,赵明.银杏叶提取物对糖尿病外周血内皮祖细胞超氧化物歧化酶及凋亡的影响[J].*医学研究生学报*, 2012, 25(3):244-248.
- [25] 李洋,洪莉,刘成,等.松果菊苷药理作用研究进展[J].*药学进展*, 2017, 36(1):56-60.
- [26] 古力努尔·木特列夫,雷丽,屠鹏飞,等.松果菊苷抗衰老作用机制研究[J].*生物物理学报*, 2004, 20(3):183-187.
- [27] 刘晓明,崔晓燕,甄晓兰.黄芩提取物对阿尔茨海默病模型小鼠的抗氧化作用[J].*中国药房*, 2015, 26(19):2651-2653.
- [28] CERVELLATI R, RENZULLI C, GUERRA MC, et al. Evaluation of antioxidant activity of some natural polyphenolic compounds using the briggs-rauscher reaction method[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(26):7504-7509.
- [29] HU C, KITTS DD. Studies on the antioxidant activity of echinacea root extract[J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(5):1466-1472.

(收稿日期:2018-09-21 修回日期:2018-11-22)

(编辑:唐晓莲)