

巴戟天水提物对老年痴呆模型大鼠的保护作用研究

王馨^{1*}, 李晶^{2#}, 廖一兰¹, 邓春兰¹ (1. 重钢总医院药剂科, 重庆 400080; 2. 重庆三峡医药高等专科学校药学院, 重庆 404120)

中图分类号 R285;R96 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)31-2908-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.31.10

摘要 研究巴戟天水提物对老年痴呆模型大鼠的保护作用。方法:腹腔注射D-半乳糖(120 mg/kg)与亚硝酸钠(90 mg/kg),每天1次,连续30 d以复制大鼠老年痴呆模型。实验分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、吡拉西坦(80 mg/kg)组与巴戟天水提物高、中、低剂量(60、30、15 mg/kg)组。灌胃给药,每天1次,连续30 d。末次给药后进行跳台实验以测定大鼠学习和记忆能力;检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、单胺氧化酶(MAO)B水平;RT-PCR法测定大鼠海马匀浆中MAO-B mRNA的表达。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠学习和记忆能力显著减弱,SOD活性显著减弱,MDA含量显著增加,MAO-B活性显著增强,MAO-B mRNA表达显著增强($P<0.01$);与模型组比较,巴戟天水提物高、中剂量组大鼠学习和记忆能力显著增强,SOD活性显著增强,MDA含量显著减少,MAO-B活性显著减弱,MAO-B mRNA表达显著减弱($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:巴戟天水提物对老年痴呆模型大鼠有一定的保护作用,其机制可能与增强抗氧化能力有关。

关键词 巴戟天;老年痴呆;大鼠;单胺氧化酶B

Study on Protective Effect of Water Extract from *Morindae officinalis* on Alzheimer Disease Model Rats

WANG Xin¹, LI Jing², LIAO Yi-lan¹, DENG Chun-lan¹ (1. Dept. of Pharmacy, Chonggang General Hospital, Chongqing 400080, China; 2. Dept. of Pharmacy, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effect of water extract from *Morindae officinalis* on Alzheimer disease model rats. METHODS: The Alzheimer disease model was induced by intraperitoneal injection of D-galactose (120 mg/kg) and sodium nitrosum (90 mg/kg) once a day for consecutive 30 d. Model rats were divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), piracetam (80 mg/kg), and water extract from *M. officinalis* high-dose, medium-dose and low-dose groups (60, 30, 15 mg/kg). They were given medicines intragastrically once a day for consecutive 30 days. The learning and memory ability of rats was determined by step-down test after last administration. The levels of SOD, MDA and MAO-B were determined. The mRNA expression of MAO-B was determined by RT-PCR. RESULTS: Compared with normal control group, the learning and memory ability of rats and SOD activity in model group were decreased significantly, while the content of MDA and mRNA expression of MAO-B and activity of MAO-B were increased significantly ($P<0.01$). Compared with model group, the learning and memory ability of rats and SOD activity in *M. officinalis* high-dose and medium-dose groups were increased significantly, while the contents of MDA, mRNA expression of MAO-B and activity of MAO-B were decreased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$). CONCLUSIONS: Water extract of *M. officinalis* have a protective effect on Alzheimer disease model rats, which may be associated with the enhancement of anti-oxidant ability.

KEY WORDS *Morinda officinalis*; Alzheimer disease; Rats; MAO-B

老年性痴呆(AD)是危害老年人身心健康的重大疾病之一。有报道^[1]称,全球65岁以上的老人患AD几率约为8%,80岁以上的老年人患病率甚至超过20%,但至今现代医学仍缺乏有效的治疗方法。目前,全球AD患者约为5 600万,仅我国AD患者就达1 000万。巴戟天为双子叶植物茜草科巴戟天 *Morinda officinalis* How.的干燥根,主治阳痿遗精、宫冷不孕、月经不调、少腹冷痛、风湿痹痛、筋骨痿软。有研究报道^[2],巴戟天能显著提高小鼠在吊网上的运动能力,降低在缺氧状态下的氧耗量,延长耐缺氧持续时间,并且能增加小鼠体质量,延长

其持续游泳时间。笔者通过大鼠ip D-半乳糖与亚硫酸钠复制老年痴呆模型,以研究巴戟天水提物对其行为学与酶学的影响。

1 材料

1.1 仪器

DTT-2型大鼠跳台仪(中国医学科学院药物研究所);3K型低温离心机(美国Simga公司);UV-265型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);漩涡混悬器(北京怡美通德科技发展有限公司);Geldoc XR型凝胶成像分析系统(德国Bio Rad公司)。

1.2 药材

巴戟天产自广西,经笔者鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

* 主管药师,硕士。研究方向:药物分析与药剂学。电话:023-68840693

通信作者:讲师,博士。研究方向:药物研发与药理学。电话:023-55856819。E-mail:44067033@qq.com

D-半乳糖(美国 Simga 公司);吡拉西坦注射液(脑复康,山西太原药业有限公司,批号:20120516,规格:20 ml:4 g);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、单胺氧化酶(MAO)B 试剂盒(南京建成生物工程研究所);RT-PCR 试剂盒、RNA-Triol(大连宝生物工程有限公司);水为双蒸水。

1.4 动物

清洁级 SD 大鼠 60 只,♀♂ 兼用,体质量 200~220 g,由重庆医科大学动物实验中心提供[动物使用合格证号:SCXK(渝)20020001]。

2 方法

2.1 巴戟天水提物的制备

取巴戟天 100 g,加 1 L 双蒸水浸泡 30 min,煎煮 30 min,滤过;滤渣加 5 倍量双蒸水(m:m)煎煮 30 min,滤过;滤渣同上处理 1 次,合并 3 次滤液于 70~80℃ 水浴中浓缩至每 1 ml 药液相当于 0.5 g 生药量,贮藏,备用。

2.2 复制模型与分组、给药^[8-9]

大鼠 ip D-半乳糖(120 mg/kg)和亚硝酸钠(90 mg/kg),每天 1 次,连续 30 d,以复制老年痴呆模型。实验分为 6 组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、吡拉西坦(80 mg/kg)组与巴戟天水提物高、中、低剂量(60、30、15 mg/kg)组。复制模型结束后 ig 给药,每天 1 次,连续 30 d。

2.3 巴戟天水提物对模型大鼠跳台实验的影响

末次给药结束后进行跳台实验,测试学习成绩。将大鼠放入反应箱中适应环境 5 min,然后通电 5 min(电压:36 V),大鼠跳上跳台逃避电击,下平台会再次被电。从通电到完全稳定上台所用的时间为潜伏期,跳下时大鼠双足同时接触铜栅视为错误反应,5 min 内的潜伏期和错误次数作为学习成绩。24 h 后重测作为记忆成绩,先将大鼠放在跳台上,大鼠第一次跳下跳台时间为潜伏期,并记录错误次数作为记忆能力指标。

2.4 巴戟天水提物对模型大鼠海马 SOD、MAO-B 活性与 MDA 含量的影响

分别取大鼠 10% 海马组织匀浆 0.1 ml,按 SOD、MDA、MAO-B 说明书进行测定。

2.5 RT-PCR 法测定模型大鼠海马 MAO-B mRNA 的表达

取“2.4”项下大鼠海马匀浆,按说明书二步法进行测定。反转录反应:依次加入 MgCl₂ 2 μl、10×RT Buffer 1 μl、RNAase Free dH₂O 3.75 μl、dNTP Mixture 1 μl、RNAase Iranscriptase 0.5 μl、Random 9 mers 0.5 μl、Positive Control RNA 1 μl;反应总体积为 10 μl,42℃×60 min,74℃×5 min。PCR 反应:依次加入 5×RT Buffer 10 μl、RNAase Free dH₂O 28.75 μl、TaKaRa Ex Taq HS 0.25 μl、Control F-1 Primer 0.5 μl、Control R-1 Primer 0.5 μl;反应总体积为 40 μl,95℃×10 min,95℃×1 min,60℃×55 s,72℃×90 s,27 个循环,72℃×10 min,4℃保持。电泳:以凝胶成像分析系统分析凝胶电泳,以目的带基因面积积分灰度值与相应内参(NADPH)基因带面积灰分度值比为目地基因表达水平。

2.6 统计学方法

实验数据用 SPSS 11.0 软件分析,数据表示为 $\bar{x} \pm s$,组间

比较用 ANOVA 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 巴戟天水提物对模型大鼠跳台实验的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠学习成绩中错误次数显著增加,潜伏期显著延长;记忆成绩中错误次数显著增加,潜伏期显著缩短($P < 0.01$)。与模型组比较,巴戟天高、中剂量组大鼠学习成绩中错误次数显著减少,潜伏期显著缩短;记忆成绩中错误次数显著减少,潜伏期显著延长($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。巴戟天水提物对模型大鼠跳台实验的影响见表 1。

表 1 巴戟天水提物对模型大鼠跳台实验的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Effects of water extract of *M. officinalis* on step-down test in model rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, mg/kg	学习成绩		记忆成绩	
		错误次数	潜伏期/s	错误次数	潜伏期/s
正常对照组		1.71±0.85	58.45±10.23	1.17±0.41	183.57±28.94
模型组		5.02±1.84*	32.71±28.52*	3.89±1.16*	86.49±30.04*
吡拉西坦组	200	2.88±1.12**	68.46±10.78**	1.57±0.52**	160.07±18.94**
巴戟天水提物高剂量组	60	2.84±1.01**	65.28±11.37**	1.53±0.48**	162.62±19.05**
巴戟天水提物中剂量组	30	3.51±1.16*	49.55±15.49*	2.28±0.63*	134.51±21.17*
巴戟天水提物低剂量组	15	4.27±1.39	38.41±20.34	3.14±0.87	114.37±25.42

与正常对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.05$; vs. model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.2 巴戟天水提物对模型大鼠海马 SOD、MAO-B 活性与 MDA 含量的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠海马 SOD 活性显著减弱,MDA 含量显著增加,MAO-B 活性显著增强($P < 0.01$);与模型组比较,巴戟天高、中剂量组大鼠海马 SOD 活性显著增强,MDA 含量显著减少,MAO-B 活性显著减弱($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。巴戟天水提物对模型大鼠海马 SOD、MAO-B 活性与 MDA 含量的影响见表 2。

表 2 巴戟天水提物对模型大鼠 SOD、MAO-B 活性与 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Effects of water extract of *M. officinalis* on the activities of SOD and MAO-B and the content of MDA of model rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, mg/kg	SOD, nU/mg	MDA, nmol/mg	MAO-B, nU/mg
正常对照组		42.61±4.37	0.57±0.04	0.44±0.05
模型组		16.43±3.16*	1.86±0.23*	1.76±0.14*
吡拉西坦组	80	32.54±3.71**	0.75±0.11**	0.62±0.12**
巴戟天水提物高剂量组	60	35.08±3.09**	0.69±0.14**	0.60±0.09**
巴戟天水提物中剂量组	30	27.62±2.75*	0.95±0.17*	1.06±0.17*
巴戟天水提物低剂量组	15	20.47±2.49	1.42±2.05	1.52±0.20

与正常对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.05$; vs. model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.3 巴戟天水提物对模型大鼠海马 MAO-B mRNA 表达的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠 MAO-B mRNA 表达显著增强;与模型组比较,巴戟天水提物高、中剂量组大鼠海马

MAO-B mRNA 表达显著减弱。MAO-B mRNA 的表达见图 1。

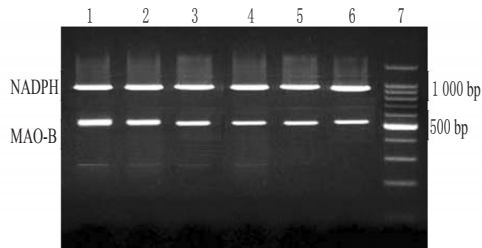


图 1 MAO-B mRNA 的表达

1.模型组;2.吡拉西坦组;3.巴戟天水提物高剂量组;4.巴戟天水提物中剂量组;5.巴戟天水提物低剂量组;6.正常对照组;7.蛋白标准品

Fig 1 mRNA expression of MAO-B

1.model group;2.piracetam group;3.water extract of *M. officinalis* high-dose group;4. water extract of *M. officinalis* medium-dose group;5.water extract of *M. officinalis* low-dose group;6.normal control group;7.protein standard

4 讨论

本研究运用已被公认的D-半乳糖及亚硝酸钠致大鼠老年痴呆模型。大鼠表现为记忆力、学习能力减弱;大鼠海马组织MDA含量增加,SOD活性减弱,MAO-B活性增强,MAO-B mRNA表达增强。

陈洁文等^[7-8]应用离体海马脑片技术发现巴戟天提取物巴戟素能使大鼠离体海马脑片CA1区锥体细胞由强直刺激(TS)诱发的诱发群锋电位(PS)幅值增大,增强大鼠离体海马脑片的突触传递长时程延长(LTP)效应,且与巴戟素的剂量呈现一定的量效关系,提示巴戟天可以增强脑的学习记忆功能。本研究中通过跳台实验再次证明了以上观点。

SOD和MDA为表现机体过氧化程度的经典指标。SOD能清除超氧自由基,同时能间接反映机体清除自由基的能力。MDA是脂质过氧化反应的代谢产物,可间接反映细胞受自由基攻击的程度。本研究表明,巴戟天水提物可明显增强模型大鼠SOD活性及减少MDA含量。

脑组织MAO-B活性增强,可使多巴胺等单胺类递质含量减少,同时MAO-B活性增强可在降解多巴胺的同时,生成大量H₂O₂,后者通过Fenton反应形成活性更高的羟自由基,该羟

自由基对神经细胞会产生明显的毒性损伤^[9]。本研究表明,巴戟天水提物可明显减弱模型大鼠海马组织MAO-B的活性及其基因的表达。

综上,巴戟天水提物对D-半乳糖与亚硝酸钠致老年痴呆模型大鼠具有一定的保护作用,该结论可为后期研究提供一定参考。

参考文献

- [1] Stricker NH, Chang YL, Fennema-Notestine C, et al. Distinct profiles of brain and cognitive changes in the very old with Alzheimer disease[J]. *Neurology*, 2011, 77(88): 713.
- [2] 潘新宇,牛岭.巴戟天对运动训练大鼠骨骼肌自由基代谢及运动能力的影响[J]. *中国临床康复*, 2005, 9(48): 162.
- [3] Dweck, AC. An introduction to valerian *Valeriana officinalis* and related species[M]. *Amsterdam: Harwood Academic Publishers*, 1996: 1.
- [4] Sun YL, Dong JS, Yong KL, et al. Inhibitory effect of sesaminol glucosides on lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation and target gene expression in cultured rat astrocytes[J]. *Neurosci Res*, 2006, 56: 204.
- [5] 徐露,董志.当归多糖抗衰老的实验研究[J]. *激光杂志*, 2008, 29(4): 89.
- [6] 张妍.复方丹参对老年性痴呆动物的作用及机制研究[D].北京:北京中医药大学, 2008.
- [7] 陈洁文,王勇,谭宝璇,等.巴戟素对大鼠海马脑片LTP和缺氧状态下诱发PS变化的影响及其NO的关系[J]. *生理通讯*, 1998, 18(增刊): 25.
- [8] 谭宝璇,苏文,陈洁文,等.巴戟素对衰老大鼠空间学习记忆力改善作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2000, 11(2): 95.
- [9] Huh JW, Choi MM, Lee JH, et al. Activation of monoamine oxidase isotypes by prolonged intake of aluminum in rat brain[J]. *J Inorg Biochem*, 2005, 99(10): 2 088.

(收稿日期:2013-04-17 修回日期:2013-05-24)

第一届食品安全国家标准审评委员会第八次主任会议在京召开

本刊讯 2013年7月15日,第一届食品安全国家标准审评委员会第八次主任会议在京召开。第一届食品安全国家标准审评委员会常务副主任委员、国家卫生和计划生育委员会副主任陈啸宏出席会议并讲话,副主任委员、技术总师陈君石院士主持会议。会议审议通过《食品安全国家标准审评委员会章程》修订建议,通报食品标准清理工作进展情况,审议通过了71项食品安全国家标准。食品安全国家标准审评委员会秘书长、副秘书长、各专业分委员会主任委员以及工业和信息

化部、商务部、农业部、质检总局、食品药品监管总局、国家标准委等部门代表参加会议。

本次会议审议通过了《食品中致病菌限量》《食品添加剂标志通则》《食品用香料通则》《特殊医学用途配方食品通则》《预包装特殊膳食用食品标签》和《特殊医学用途配方食品良好操作规范》以及一批食品添加剂质量规格标准等共计71项食品安全国家标准。