

三七皂苷 R₁ 对 D-半乳糖诱导痴呆模型小鼠学习记忆能力的影响及抗氧化应激作用研究^Δ

黄金兰*, 秦嫦云, 周楠, 高山, 杜伟, 谢艳秋, 王霞, 施倩, 吴登攀[#](徐州医学院药学院, 江苏徐州 221004)

中图分类号 R285.5; R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4336-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.06

摘要 目的: 研究三七皂苷 R₁ (NGR₁) 对老年性痴呆模型 (即 AD 模型) 小鼠的学习记忆能力的影响及抗氧化应激作用。方法: 将小鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照 (吡拉西坦, 150 mg/kg) 组和 NGR₁ 低、高剂量 (12.5、25 mg/kg) 组, 每组 10 只。除正常组 ih 等容生理盐水外, 其余各组每日于颈背部 ih 10% D-半乳糖以复制 AD 小鼠模型, qd; 并于造模同时 ig 相应药物, 正常组和模型组 ig 蒸馏水, qd。4 周后采用 Morris 水迷宫试验检测小鼠原平台象限游泳时间百分比; 可见分光光度法检测小鼠血清、脑组织中总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性; 酶联免疫吸附法检测小鼠脑组织中 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 含量。结果: 与正常组比较, 模型组小鼠的原平台象限游泳时间百分比明显缩短, 血清和脑组织中 T-SOD、GSH-PX 和 CAT 活性明显降低, 脑组织中 8-OHdG 含量则明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠的原平台象限游泳时间百分比明显延长, 血清和脑组织中 T-SOD、GSH-PX、CAT 活性均显著提高, 脑组织中 8-OHdG 含量减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论: NGR₁ 可通过减轻氧化应激从而改善 AD 模型小鼠的学习记忆能力。

关键词 三七皂苷 R₁; D-半乳糖; 老年性痴呆模型; 学习记忆; 抗氧化应激; 小鼠

Effect of Notoginsenoside R₁ on Learning and Memory Ability and Antioxidation Stress in the Dementia Mice Induced by D-galactose

HUANG Jin-lan, QIN Chang-yun, ZHOU Nan, GAO Shan, DU Wei, XIE Yan-qiu, WANG Xia, SHI Qian, WU Deng-pan (School of Pharmacy, Xuzhou Medical College, Jiangsu Xuzhou 221004, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effect of notoginsenoside R₁ (NGR₁) on learning and memory ability and antioxidation stress in the senile dementia model (AD model) mice. **METHODS:** The mice were randomly divided into normal group, model group, positive control group (piracetam, 150 mg/kg), NGR₁ low-dose and high-dose groups (12.5, 25 mg/kg) with 10 mice in each group. The mice were ih given 10% D-galactose on neck and back, once a day, to induce AD mice model except normal group was ih given constant volume of normal saline. At the same time, they were given relevant medicine intragastrically, and normal group and model group were given distilled water intragastrically, once a day. 4 weeks later, the percentage of swimming time in original platform quadrant was assayed by Morris water maze; the activities of T-SOD, GSH-PX and CAT in serum and cerebral tissue were detected by visible spectrophotometry; the content of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) in cerebral tissue was tested by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **RESULTS:** Compared with normal group, the percentage of swimming time in original platform quadrant decreased in model group, and the activities of T-SOD, GSH-PX and CAT in serum and cerebral tissue decreased, while the content of 8-OHdG in cerebral tissue increased, with statistical significance ($P < 0.01$); compared with model group, the percentage of swimming time in original platform quadrant increased in treatment groups, and the activities of T-SOD, GSH-PX and CAT in serum and cerebral tissue increased significantly, while the content of 8-OHdG in cerebral tissue decreased, with statistical significance ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** NGR₁ can improve the learning and memory ability of AD mice by means of alleviating the oxidative stress.

KEYWORDS Notoginsenoside R₁; D-galactose; Senile dementia model; Learning and memory; Antioxidation stress; Mice

^Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.81460598); 江苏省教育厅开放研究课题 (No.KJS1404); 江苏省新药与临床药学重点实验室开放研究课题 (No.ZR-XY201402); 徐州医学院 2014 年大学生实践创新训练计划推荐项目 (No.201410313032Y); 徐州医学院优秀人才科研启动基金项目 (No.D2014017)

* 讲师, 博士。研究方向: 神经退行性疾病。电话: 0516-83262107。E-mail: hjl0221104@163.com

[#] 通信作者: 讲师, 博士。研究方向: 新药研究开发。电话: 0516-83262106。E-mail: wdpinee@163.com

本栏目协办

北京安妮福克斯信息咨询有限公司

地址: 北京市东城区宝珠寺 6 号 C 层
电话: 4000008137 邮编: 100005

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)又称老年性痴呆,好发于老年人。在众多的AD发病机制学说中,氧化应激学说越来越受到学术界的重视,从氧化应激角度研发的防治AD的新药可延缓AD病程的发展,对AD的早期治疗具有重要的意义。氧化应激是指氧化物超过了机体内源性的抗氧化能力从而引起分子氧化,产生高度活性的羟自由基及单个氧原子等活性氧类(ROS)。正常生理条件下,人体具备一个完整的抗氧化防御系统,如酶类抗氧化系统。所以机体的氧化水平与抗氧化水平在各种因素的参与下保持着动态平衡。当机体受到有害刺激时,ROS产生过多,氧化程度超出氧化物的清除能力,则可直接引起蛋白质、脂质和DNA等胞内大分子的氧化,损害细胞的基本结构,最终导致细胞死亡。研究发现,基本上所有的胞内大分子(蛋白质、DNA、脂质等)在AD患者的脑组织中都可以发现有氧化形式的存在,且氧化应激在AD患者发病早期就已经出现^[1]。

目前,已发现的碱基氧化产物超过30种,其中鸟嘌呤氧化生成的8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)是最重要的变异源性物质,被认为是DNA氧化损伤的标志物^[2]。研究发现,三七皂苷R₁(Notoginsenoside R₁, NGR₁)可通过提高抗氧化物酶的活性,从而减轻氧化应激引起的神经元损伤^[3-4];还可通过提高神经元突触可塑性而提高AD模型小鼠学习记忆功能^[5]。然而NGR₁是否可以通过减轻氧化应激而改善AD小鼠学习记忆能力尚未见相关文献报道。笔者拟以NGR₁为研究对象,通过建立D-半乳糖诱导的氧化应激痴呆小鼠模型(即AD小鼠模型),探讨NGR₁对该模型小鼠学习记忆能力的影响,并通过检测小鼠血清和脑组织中抗氧化酶系活性及脑组织内氧化产物的含量,初步阐明NGR₁影响AD模型小鼠学习记忆能力的机制,为研发防治AD的新药提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

ACT-200型水迷宫跟踪分析系统(美国Coulbourn公司);722N型可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);Elx808型酶标仪(美国BioTek公司);5804R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 药品与试剂

NGR₁(南京广润生物制品有限公司,批号:GR-133-140324,纯度:≥98.0%);吡拉西坦片(广东华南制药有限公司,批号:110102,规格:每片0.4g);D-半乳糖(上海源叶生物科技有限公司,批号:YY11147);总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(南京建成科技有限公司,批号:A001-1、A005、A007-1);小鼠8-OHdG酶联免疫分析试剂盒(徐州微科曼得生物工程公司,批号:V02165M)。

1.3 动物

昆明小鼠,50只,体质量(20±2)g,♀♂各半,由徐州医学院动物实验中心提供[合格证号:SYXK(苏)2010-0011]。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

将50只昆明小鼠随机均分为正常组、模型组、阳性对照(吡拉西坦,150mg/kg)组和NGR₁低、高剂量(12.5、25mg/kg)组(剂量根据预实验结果设置),除正常组每日颈背部ih等容生理盐水外,其余各组每日颈背部ih 10% D-半乳糖(0.01 ml/g)

以复制氧化应激引起的AD小鼠模型,qd;并于造模同时ig相应药物,正常组和模型组ig蒸馏水,qd,连续4周。

2.2 小鼠记忆行为能力测定

给药结束后,采用Morris水迷宫试验检测小鼠的记忆行为能力。水迷宫为直径150cm、高50cm的圆形水池,水深约32cm,其中放置一个直径为17cm、高30cm的圆形平台,水温保持(25±2)℃。将小鼠面向池壁由4个人水点放入池中,记录其90s内成功进驻平台(小鼠找到平台并在平台上滞留5s为成功进驻)所需时间。如在90s内不能成功进驻平台,则将其引上平台并令其停留10s。每只鼠每天训练4次,两次训练时间间隔为30~40min,共训练4d。获得性训练结束后,撤除平台,将小鼠由原先平台象限对侧放入水中,记录其在原平台所在象限游泳的时间占总游泳时间的百分比,即原平台象限游泳时间百分比。

2.3 小鼠血清及大脑组织样品的制备

实验动物行为学检测后,对小鼠眼球取血并盛于离心管中,静置30min,待血液凝固后以离心半径为8cm(下同)、3000r/min离心10min,吸取上清(即血清)备用。再于冰台上迅速剥离小鼠大脑组织,预冷生理盐水漂洗,滤纸吸干多余水分后称质量,按质量-体积比1:9加入预冷生理盐水,玻璃匀浆器制成10%的脑匀浆液,于高速冷冻离心机中以14000r/min离心10min,取上清,并用二辛可酸(BCA)法检测蛋白浓度。

2.4 指标检测

采用可见分光光度法测定小鼠血清及脑组织中T-SOD、GSH-PX、CAT活性,具体操作按T-SOD、GSH-PX、CAT试剂盒说明书进行,并按试剂盒说明书中公式计算相应酶活力。采用酶联免疫吸附法测定小鼠脑组织中8-OHdG含量,具体步骤及含量计算方法参见8-OHdG酶联免疫分析试剂盒说明书。

2.5 统计学方法

采用SPSS 11.5统计软件处理数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用t检验及方差分析(两两比较用SNK法)。P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 NGR₁对模型小鼠学习记忆能力的影响

与正常组比较,模型组小鼠的原平台象限游泳时间百分比明显降低,差异有统计学意义(P<0.01);与模型组比较,各药物组小鼠的原平台象限游泳时间百分比明显升高,差异均有统计学意义(P<0.01),结果见表1。

表1 各组小鼠的原平台象限游泳时间百分比测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 The results of the percentage of swimming time in original platform quadrant of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	原平台象限游泳时间百分比,%
正常组	24.54±2.17
模型组	16.93±2.74 [*]
NGR ₁ 低剂量组	20.35±2.89 [#]
NGR ₁ 高剂量组	24.14±2.80 [#]
阳性对照组	25.90±2.08 [#]

注:与正常组比较,^{*}P<0.01;与模型组比较,[#]P<0.01

Note: vs. normal group, ^{*}P<0.01; vs. model group, [#]P<0.01

3.2 NGR₁对模型小鼠血清及脑组织中T-SOD、GSH-PX和CAT活性的影响

与正常组比较,模型组小鼠血清和脑组织中 T-SOD、GSH-PX、CAT 的活性均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,NGR₁低、高剂量组及阳性对照组血清和脑组织中 T-SOD、GSH-PX、CAT 的活性均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),结果见表 2。

表 2 各组小鼠血清及脑组织中 T-SOD、GSH-PX 和 CAT 活性检测结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 The results of activities of T-SOD, GSH-PX and CAT in serum and cerebral tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	血清中酶活力,U/ml			脑组织中酶活力,U/mg prot		
	T-SOD	GSH-PX	CAT	T-SOD	GSH-PX	CAT
正常组	195.82 ± 2.15	540.00 ± 20.39	7.53 ± 0.16	31.24 ± 0.30	1.01 ± 0.030	1.03 ± 0.037
模型组	177.04 ± 3.73*	370.32 ± 19.39*	5.75 ± 0.12*	28.060 ± 0.38*	0.43 ± 0.085*	0.72 ± 0.016*
NGR ₁ 低剂量组	205.68 ± 3.55 ^{##}	453.55 ± 34.21 ^{##}	6.25 ± 0.12 ^{##}	28.849 ± 0.29 ^{##}	1.20 ± 0.054 ^{##}	1.00 ± 0.025 ^{##}
NGR ₁ 高剂量组	225.40 ± 4.30 ^{##}	542.58 ± 29.31 ^{##}	6.70 ± 0.24 ^{##}	29.597 ± 0.31 ^{##}	1.54 ± 0.027 ^{##}	1.01 ± 0.013 ^{##}
阳性对照组	210.85 ± 3.07 ^{##}	431.61 ± 11.78 ^{##}	6.91 ± 0.35 ^{##}	29.916 ± 0.31 ^{##}	0.92 ± 0.054 ^{##}	0.90 ± 0.041 ^{##}

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,^{##} $P < 0.05$,^{###} $P < 0.01$

Note:vs. normal group,* $P < 0.01$;vs. model group,^{##} $P < 0.05$,^{###} $P < 0.01$

3.3 NGR₁对模型小鼠脑组织中 8-OHdG 含量的影响

与正常对照组相比,模型组小鼠脑组织中 8-OHdG 含量升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,NGR₁低、高剂量组及阳性对照组小鼠脑组织中 8-OHdG 含量降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),结果见表 3。

表 3 各组小鼠脑组织中 8-OHdG 含量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 The results of content determination of 8-OHdG in cerebral tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	8-OHdG,ng/L
正常组	8.11 ± 0.14
模型组	10.07 ± 0.26*
NGR ₁ 低剂量组	8.16 ± 0.19 [#]
NGR ₁ 高剂量组	7.77 ± 0.17 [#]
阳性对照组	8.18 ± 0.12 [#]

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.01$

Note:vs. normal group,* $P < 0.01$;vs. model group,[#] $P < 0.01$

4 讨论

D-半乳糖诱导的氧化应激 AD 模型是通过 D-半乳糖诱导机体产生自由基、脂质过氧化等氧化应激反应,从而导致学习与记忆能力衰退的痴呆模型^[6]。其造模周期短、衰老变化明显、稳定性好,是目前国际上较为公认的痴呆模型。本实验建立 D-半乳糖诱导 AD 小鼠模型,并在行为学、氧化与抗氧化应激方面对其进行评价。结果发现,与正常组比较,模型组小鼠的原平台象限游泳时间百分比及血清和脑组织中 T-SOD、GSH-PX 和 CAT 的活性均明显降低($P < 0.01$),而脑组织中 DNA 的氧化产物 8-OHdG 含量则明显升高($P < 0.01$),此结果与文献[7]报道一致,提示模型小鼠出现明显衰老体征、记忆能力下降、抗氧化酶活力下降,D-半乳糖诱导的 AD 模型是成功的。

文献报道三七总皂苷(PNS)可通过降低 AD 模型大鼠脑内氧化应激水平从而改善大鼠的学习记忆功能^[9],而作为 PNS

的主要单体成分之一的 NGR₁可通过提高抗氧化酶的活性,从而减轻氧化应激引起的神经元损伤^[1-2]。吡拉西坦是一种经典的脑代谢活化剂,其能够增加脑血流量,促进代谢,增强脑部左右两半球间神经信息的传递,具有较强的抗脑缺氧作用,可保护外源性伤害性刺激对大脑的损害,改善学习和记忆等功效^[9],故本实验以其为阳性对照药物。研究结果显示,与模型组比较,给药组小鼠的原平台象限游泳时间百分比明显延长($P < 0.01$),提示 NGR₁可改善 D-半乳糖诱导的 AD 模型小鼠的学习记忆能力;生化检测结果显示药物处理组的小鼠血清和脑组织中 T-SOD、GSH-PX 和 CAT 的活性均高于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而脑组织中 DNA 的氧化产物 8-OHdG 含量则明显降低($P < 0.01$),提示 NGR₁可提高氧化应激 AD 模型小鼠血清及脑组织中 SOD、GSH 和 CAT 的活性,并可显著降低脑组织中 DNA 的氧化产物 8-OHdG 的水平。

综上所述,NGR₁可通过减轻氧化应激从而改善 AD 模型小鼠的学习记忆能力,是有潜力的 AD 治疗药物。

参考文献

- [1] Galasko D, Montine TJ. Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease[J]. *Biomark Med*, 2010,4(1):27.
- [2] 高玉楠,杨靖,宋沁馨,等. 8-羟基脱氧鸟苷作为 DNA 氧化损伤标志物在疾病诊断中的应用[J]. *药物与临床研究*,2012,2(3):223.
- [3] Meng X, Wang M, Wang X, et al. Suppression of NADPH oxidase and mitochondrion-derived superoxide by notoginsenoside R₁ protects against cerebral ischemia-reperfusion injury through estrogen receptor-dependent activation of Akt/Nrf2 pathways[J]. *Free Radic Res*, 2014, 48(7):823.
- [4] Meng X, Sun G, Ye J, et al. Notoginsenoside R₁-mediated neuroprotection involves estrogen receptor-dependent crosstalk between Akt and ERK1/2 pathways: a novel mechanism of Nrf2/ARE signaling activation[J]. *Free Radic Res*, 2014, 48(4):445.
- [5] Yan S, Li Z, Li H, et al. Notoginsenoside R₁ increases neuronal excitability and ameliorates synaptic and memory dysfunction following amyloid elevation[J]. *Sci Rep*, 2014, doi:10.1038/srep06352.
- [6] 初晓,姚如泳,韩志武,等. 茶多酚对 D-半乳糖致衰老小鼠免疫功能的调节作用[J]. *中国医院药学杂志*,2006,26(5):635.
- [7] 秦红兵,杨朝晖,范忆江,等. D-半乳糖诱导衰老小鼠模型的建立与评价[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009,13(7):1 275.
- [8] 屈泽强,谢智光,王乃平,等. 三七总皂苷抗衰老作用的实验研究[J]. *广州中医药大学学报*,2005,22(2):130.
- [9] 谢展雄,吴建伟,吴铁松,等. 吡拉西坦对 D-半乳糖致衰老模型大鼠脑组织超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量的影响[J]. *中国药房*,2009,20(19):1 459.

(收稿日期:2015-07-21 修回日期:2015-08-29)

(编辑:林 静)