

- 21-amino-steroids[J]. J Neurotrauma, 1996, 13(2): 139-147.
- 4 Smith SL, Hall ED. Mild per-and posttraumatic hypothermia attenuates blood brain barrier damage following controlled cortical impact injury in the rats[J]. J Neurotrauma, 1996, 13(1): 1-9.
- 5 吴江, 林晓云, 徐建民, 等. 亚低温对重型颅脑损伤患者血糖和代谢相关激素水平的影响[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(1): 29-31.
- 6 Xu W, Zha RP, Wang WY, et al. Effects of scutellarin on PKCgamma in PC12 cell injury induced by oxygen and glucose deprivation [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(10): 1573-1579.
- 7 罗成义, 王清华, 徐如祥. 大鼠大脑损伤后皮质 NMDA 受体活性变化与脑水肿的关系[J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(4): 203-205.
- [收稿日期 2009-06-04][本文编辑 谭毅 黄晓红]

论 著

二苯乙烯苷对 SAMP8 鼠学习记忆和自由基清除的影响

黄日材, 黄忠仕, 黎 昀, 赖 术, 黄 健

基金项目: 广西高等学校优秀人才资助计划项目(编号: 桂教人才 0829)

作者单位: 533600 广西, 田阳县人民医院神经内科(黄日材); 百色右江民族医学院(黄忠仕, 黎 昀, 赖 术, 黄 健)

作者简介: 黄日材(1968-), 男, 大学本科, 主治医师, 研究方向: 神经内科学。E-mail: LCL18464@163.com

通讯作者: 黄忠仕, 男, 右江民族医学院, 医学博士, 副教授, 研究方向: 抗痴呆药物研究。E-mail: hzs1004@163.com

[摘要] 目的 观察二苯乙烯苷(TSG)对老年性痴呆模型 SAMP8 鼠学习记忆能力和自由基清除的影响。方法 选用 6 月龄 SAMP8 鼠 50 只, 随机均分为 5 组, 每组 10 只: SAMP8 对照组、阳性药石杉碱甲对照组、TSG 低、中、高剂量组, 另选用 6 月龄 SAMR1 鼠 10 只作正常对照组。各组分别灌胃相应药物 50 d 后, 应用 Morris 水迷宫检测各组小白鼠学习记忆能力的变化和采用分光光度法测定各组小白鼠脑组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量。结果 与 SAMR1 对照组比较, SAMP8 鼠在隐蔽平台试验中表现出明显的学习记忆障碍, 逃避潜伏期显著延长($P < 0.05$), TSG 组从第 3 天起逃避潜伏期较 SAMP8 对照组显著缩短($P < 0.05$); 探索试验中二苯乙烯苷组原平台象限的停留时间和穿越原平台次数明显多于 SAMP8 对照组。SAMP8 组脑组织 SOD、GSH-Px 活性明显降低, MDA 含量明显升高, 而 TSG 组能明显提高脑组织 SOD、GSH-Px 活性, 降低 MDA 含量($P < 0.05$)。结论 二苯乙烯苷能改善 SAMP8 鼠的学习记忆能力及有效清除脑组织自由基。

[关键词] 二苯乙烯苷; 学习记忆能力; 自由基; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 丙二醛

[中图分类号] R 749.1 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2009)09-0893-04

doi: 10.3969/j.issn.1674-3806.2009.09.02

Effects of TSG on learning and memory abilities and free radical scavenging in SAMP8 mice HUANG Ri-cai, HUANG Zhong-shi, LI Yun, et al. Department of Internal Neurology, People's Hospital of Tianyang, Guangxi 533600, China

[Abstract] **Objective** To observe the effects of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O- β -D-glycoside (TSG) on learning and memory abilities and free radical scavenging in senescence accelerated-prone mouse/8 (SAMP8). **Methods** Fifty 6-month-old SAMP8 mice were randomized to 5 groups: SAMP8 group, huperzine A control group, low-, mid- and high-dose groups of TSG, with 10 mice in each group. Another 10 6-month-old SAMR1 mice were assigned to normal control group. After medication for 50 days, Morris water maze test was used to assess the change of learning and memory abilities and spectrophotometry was used to detect SOD and GSH-Px activity and MDA contents in each mouse brain. **Results** Compared with normal control group, SAMP8 mice showed significant impairments in learning and memory in hidden platform test, and the escape latency was significantly longer than that of TSG-treated

group ($P < 0.05$). TSG-treated group could significantly increase the time and times of swim in original platform quadrant in spatial probe test ($P < 0.05$). SOD and GSH-Px activity decreased significantly and MDA contents increased significantly in SAMP8 brain. Compared with the SAMP8 group, TSG-treated groups could enhance SOD and GSH-Px activity and decrease MDA contents significantly in SAMP8 brain ($P < 0.05$). **Conclusion** TSG could improve the learning and memory abilities and scavenge free radicals effectively in SAMP8 mice.

[Key words] 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O- β -D-glycoside (TSG); Learning and memory abilities;

Free radical; Superoxide dismutase; Glutathione peroxidase; Malondialdehyde

二苯乙烯苷(2,3,5,4'-四羟基-二苯乙烯- β -D-葡萄糖苷,TSG)是何首乌中的主要水溶性成分。近年来发现二苯乙烯苷对神经具有保护作用,其机制可能通过钙通道拮抗作用、抗氧化作用、胆碱脂酶抑制剂作用、调节细胞凋亡等途径而起作用的,因此对老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD)等神经退行性病变的防治具有很好的应用价值,可开发研制为治疗老年性痴呆的新药物^[1,2]。快速老化小白鼠(Senescence accelerated-prone mouse/8, SAMP8)具备均一的遗传背景和稳定老化病理特征,具有认知障碍,伴快速老化自然发生,与临床痴呆的渐进性发生极为相似。此外脑中主要出现明显的 β -淀粉样蛋白(A β)沉积、PAS(希夫过碘酸)染色阳性颗粒状结构(PGS)和海绵样病变,其行为学、形态学、神经生化、多种酶类以及蛋白质和基因表达均出现异常,是比较理想的研究脑老化和痴呆的模型^[3,4]。本研究从何首乌提取二苯乙烯苷成分,以SAMP8鼠为老年性痴呆动物模型,通过观测二苯乙烯苷干预后SAMP8鼠行为学的改变和测定SAMP8鼠脑组织SOD(超氧化物歧化酶)、GSH-Px(谷胱甘肽过氧化物酶)活性和MDA(丙二醛)含量,探讨二苯乙烯苷对老年性痴呆动物模型学习记忆能力及自由基清除的影响,为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6月龄SAMP8和SAMR1(Senescence accelerated-resistant mouse/1,正常老化小白鼠),雄性,体重22~26 g,清洁级,由天津中医学院第一附属医院提供(动物质量合格证号:W-J津实动质M准字第006号)。

1.1.2 实验药物 二苯乙烯苷(由本右江民族医学院生化教研室根据有关文献^[5,6]提取,纯度为73%),石杉碱甲(豫中制药厂生产,批号:HI0940156);SOD、GSH-Px、MDA和TP(总蛋白)测试盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.1.3 仪器 Morris水迷宫(中国科学院药研所制);TU-1800 SPC紫外可见分光光度计(北京普析

通用仪器有限责任公司);RA-50半自动化分析仪(Bayer Diagnostics Mfg. Ltd);FJ-200高速分散匀质机(上海标本模型厂)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与给药 选择6月龄SAMP8雄性鼠50只,随机分为SAMP8对照组、阳性药(石杉碱甲)对照组、TSG低剂量组、TSG中剂量组、TSG高剂量组,每组10只。另外选择6月龄SAMR1雄性鼠10只,作为SAMR1对照组。SAMP8对照组、SAMR1对照组:生理盐水30 ml $\cdot$ kg⁻¹;阳性药对照组:石杉碱甲0.02 mg $\cdot$ kg⁻¹;TSG低剂量组:TSG 0.033 g $\cdot$ kg⁻¹;TSG中剂量组:TSG 0.1 g $\cdot$ kg⁻¹;TSG高剂量组:TSG 0.3 g $\cdot$ kg⁻¹。以上各组每日灌胃给药1次,连续50 d。喂养结束后采用Morris水迷宫进行试验。

1.2.2 行为学测试

1.2.2.1 隐蔽平台试验 Morris水迷宫为一不锈钢的圆形水池,内壁黑色,直径100 cm,高50 cm,水温控制在(22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C。水池等分为4个象限,任选其中1个象限,正中放置1个安全平台。平台为圆形,直径10 cm,没于水下1 cm。水池放在一间小屋的中央,室内的门、窗、摄像头等构成视觉暗示。迷宫上方安装有摄像机,并和计算机连接,自动录入小鼠游泳轨迹并进行分析。历时5 d,每天上下午各1次,入池位置为平台所邻2个象限的池壁中点。将小鼠面向池壁分别从入水点放入水中,记录其在100 s内寻找到平台的时间(逃避潜伏期,escape latency)。如果小鼠在100 s未找到平台,则由实验者用手牵引其至平台上,停留10 s,逃避潜伏期记成100 s。每天以两次潜伏期算术均值作为这一天的成绩进行统计分析。

1.2.2.2 探索试验 撤除平台,任选1个入水点将小鼠放入水中,使小鼠在无平台情况下寻找记忆中的平台,记录其100 s的游泳轨迹,计算其在原平台象限游泳的时间和穿越原平台次数。

1.2.3 脑组织SOD、GSH-Px活性和MDA含量测定 行为学测试结束后,将小白鼠处死,同时迅速剥离脑

组织于 4℃ 预冷的生理盐水漂洗除去血液,用滤纸吸干多余水分,于电子天平上称重,并加 9 倍体积(重量/体积)的冰生理盐水,用高速分散匀质机制成 10% 的脑匀浆,脑组织 SOD、GSH-Px、MDA 和 TP 测定按试剂盒操作说明进行。以 SOD、GSH-Px 活性或 MDA 含量除以脑组织 TP(总蛋白)含量作为脑组织 SOD、GSH-Px 或 MDA 单位。

1.3 统计学处理 应用 SPSS11.0 软件进行统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学显著性意义。

表 1 二苯乙烯苷对 SAMP8 隐蔽平台试验逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$, 单位: s)

组 别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
SAMR1 对照组	60.93 ± 22.13 ^c	52.10 ± 27.90 ^c	42.62 ± 25.24 ^c	35.75 ± 9.70 ^d	25.44 ± 8.50 ^d
SAMP8 对照组	83.34 ± 14.58 ^a	78.72 ± 19.82 ^a	70.34 ± 24.27 ^{ac}	68.02 ± 31.36 ^{bc}	59.63 ± 33.17 ^{bc}
阳性药对照组	73.89 ± 18.14	63.27 ± 33.55	42.68 ± 31.46 ^c	35.82 ± 29.90 ^c	30.30 ± 19.66 ^c
TSG 低剂量组	68.72 ± 29.83	68.07 ± 23.92	45.33 ± 25.74 ^c	36.27 ± 15.47 ^c	33.80 ± 19.25 ^c
TSG 中剂量组	69.58 ± 23.07	67.74 ± 33.83	45.12 ± 23.80 ^c	31.66 ± 10.74 ^d	28.09 ± 7.96 ^d
TSG 高剂量组	68.21 ± 24.53	59.93 ± 19.28 ^c	37.15 ± 2.036 ^d	30.86 ± 8.11 ^d	25.88 ± 6.03 ^d

注:同日各组与 SAMR1 对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$;与 SAMP8 对照组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$;与阳性药对照组比较, ^e $P < 0.05$

2.2 探索试验结果 实验结果发现 SAMR1 对照组、阳性药对照组和 TSG 各组运动轨迹大部分位于原平台象限,其次较多地在原平台象限相邻的左右两侧象限寻找,但 SAMP8 对照组基本围绕池壁游泳,其运动轨迹呈随机分布于各象限之中。SAMR1 对照组、阳性药对照组和 TSG 各组的停留原平台象限时间和穿越原平台次数均明显多于 SAMP8 对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明正常老化老鼠和用药后各组的记忆能力比快速老化老鼠强,提示 TSG 能增强痴呆模型鼠的记忆能力。见表 2。

表 2 二苯乙烯苷对 SAMP8 探索试验的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	停留原平台象限时间(s)	穿越原平台次数(次)
SAMR1 对照组	28.12 ± 7.62 ^d	2.60 ± 1.71 ^c
SAMP8 对照组	17.91 ± 6.83 ^{bc}	1.10 ± 1.10 ^{cd}
阳性药对照组	26.08 ± 6.92 ^c	2.50 ± 0.97 ^d
TSG 低剂量组	24.62 ± 6.66 ^c	2.40 ± 1.07 ^c
TSG 中剂量组	26.39 ± 8.32 ^c	2.30 ± 1.34 ^c
TSG 高剂量组	29.01 ± 9.41 ^d	2.70 ± 1.16 ^d

注:与 SAMR1 对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$;与 SAMP8 对照组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$;与阳性药对照组比较, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$

2.3 TSG 对 SAMP8 鼠脑组织 SOD、GSH-Px 和

2 结果

2.1 隐蔽平台试验结果 从第 1 天起, SAMR1 对照组的逃避潜伏期即明显短于 SAMP8 组,差异具有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明同一种系的 SAMR1 鼠学习记忆能力比快速老化老鼠强。阳性药对照组和 TSG 组从第 3 天起,逃避潜伏期明显短于 SAMP8 组,差异具有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明用石杉碱甲或 TSG 干预后能改善 SAMP8 鼠的学习记忆能力。TSG 组与阳性药对照组比较无显著性差异($P > 0.05$)。见表 1。

MDA 的影响 SAMP8 对照组脑组织 SOD、GSH-Px 活性较 SAMR1 对照组低,MDA 含量较 SAMR1 对照组高。TSG 和阳性药能提高小鼠血清 SOD 和 GSH-Px 活性,降低 MDA 含量。TSG 各组与 SAMP8 对照组比较,此三项指标差异均有统计学显著性意义($P < 0.05$);而与阳性药对照组和 SAMPR1 对照组比较,则差异无统计学显著性意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 TSG 对 SAMP8 鼠脑组织 SOD、GSH-Px 和 MDA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	SOD (U · mg ⁻¹)	GSH-PX (U · mg ⁻¹)	MDA (nmol · mg ⁻¹)
SAMR1 对照组	172.87 ± 36.61 ^b	100.39 ± 40.45 ^b	16.18 ± 4.76 ^b
SAMP8 对照组	119.07 ± 55.98 ^{cd}	65.63 ± 31.94 ^{cd}	20.15 ± 3.52 ^{ac}
阳性药对照组	168.29 ± 30.06 ^b	95.95 ± 30.83 ^b	15.55 ± 2.08 ^c
TSG 低剂量组	171.74 ± 36.30 ^b	102.24 ± 39.95 ^b	17.36 ± 3.05
TSG 中剂量组	164.86 ± 29.58 ^b	102.98 ± 34.58 ^b	16.86 ± 3.16 ^b
TSG 高剂量组	165.92 ± 31.64 ^b	106.73 ± 37.87 ^b	15.77 ± 3.41 ^b

注:与 SAMR1 对照组比较, ^a $P < 0.05$;与 SAMP8 对照组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$;与阳性药对照组比较, ^d $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$

3 讨论

3.1 AD 是以近期记忆障碍为主要临床症状,以老年斑、神经元纤维缠结和神经元丢失为主要病理改

变的进行性神经变性疾病,故检测药物干预后痴呆动物的学习记忆能力是判断药物疗效的重要指标之一。一方面,本实验采用 Morris 水迷宫对痴呆动物行为学进行测定,评估二苯乙烯苷对痴呆动物学习记忆的影响。Morris 水迷宫有明显的优越性,它避免了电击等刺激因素对学习记忆的影响,而且反映动物空间认知功能方面较为简单,动物更容易学习和记忆,是一种非常理想而有效的测试方法^[7]。其中的隐蔽平台试验是测量动物空间记忆的获得情况,即学习能力;探索试验是测量动物的记忆保持能力^[8]。另一方面,本实验通过测定痴呆动物脑组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量,评估二苯乙烯苷对痴呆动物脑组织自由基清除的影响。目前 AD 发病机制尚未完全清楚,其中与自由基损伤密切相关,因此 Markesbery 等^[9]提出了 AD 发病的自由基学说。神经组织由于结构和代谢的特殊性,极易受到自由基的攻击^[10]。自由基的毒副作用可引起与痴呆机体组织、细胞的退行性变化,从而损害细胞膜、细胞器,并使 DNA 发生突变、交联,单链断裂等结构和功能改变,进而致使细胞退化、变性、凋亡,线粒体膜流动性下降,黏滞性增加^[11]。大量研究表明^[12,13]:随着年龄的增长,机体抗氧化酶活性不断下降,导致体内氧自由基不能及时清除,自由基异常堆积。SOD 是体内清除自由基的重要抗氧化酶,它可以催化 O_2^- 歧化反应生成 H_2O_2 。GSH-Px 是机体广泛存在的一种重要的催化 H_2O_2 分解的酶,它特异地催化还原型谷胱甘肽对 H_2O_2 的还原反应,可以起到保护细胞膜结构和功能完整的作用,属于体内较为主要的抗氧化酶之一。MDA 是脂质过氧化作用的终产物,可促进生物大分子物质蛋白质,核酸发生交联从而破坏细胞的正常结构,改变其功能,其含量高低可以反映脂质过氧化水平,在一定程度上间接反映细胞损伤的程度^[14]。

3.2 本实验结果显示 SAMP8 鼠的学习记忆能力明显低于 SAMR1 鼠,具体表现为:逃避潜伏期明显延长,原平台象限的停留时间缩短,再学习能力下降,分析判断能力低下。隐蔽平台试验中,TSG 组小白鼠的逃避潜伏期明显缩短,提示经二苯乙烯苷治疗后 SAMP8 鼠的学习记忆能力得以明显改善。探索试验结果显示,SAMR1 对照组、阳性药对照组和 TSG 各组的停留原平台象限时间和穿越原平台次数均明显多于 SAMP8 组,差异具有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明正常老化小鼠和用药后各组小鼠的记忆保持能力比快速老化老鼠强。以上结果表明

二苯乙烯苷能显著改善痴呆动物的学习能力及记忆巩固能力。

3.3 另一实验结果显示 SAMP8 鼠脑组织 SOD、GSH-Px 活力下降,MDA 含量升高,其表现与 SAMP8 鼠学习记忆减弱一致。而二苯乙烯苷可升高 SAMP8 鼠脑组织 SOD、GSH-Px 活力,降低其 MDA 含量,提示二苯乙烯苷可通过清除自由基的产生而发挥其抗痴呆作用。

参考文献

- 1 韩晓,吴成爱,王伟,等.何首乌二苯乙烯苷降血脂作用机理研究[J].中华中医药学刊,2008,26(8):1687-1689.
- 2 张兰,李林,李雅莉.何首乌有效成分二苯乙烯苷对神经细胞保护作用的机制[J].中国临床康复,2004,8(1):118-120.
- 3 Zhang L, Li Q, Wolff LT, et al. Changes of brain activity in the aged SAMP mouse [J]. Biogerontology, 2007, 8(2): 81-88.
- 4 Butterfield DA, Poon HF. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease [J]. Exp Gerontol, 2005, 40(10): 774-783.
- 5 朱海升,蔡光明,刘鄂湖,等.大孔吸附树脂分离纯化何首乌有效成分二苯乙烯苷的研究[J].解放军药学报,2006,22(4):269-273.
- 6 江涛涛,欧阳臻,缪亚东,等.大孔树脂吸附纯化何首乌中二苯乙烯苷的研究[J].中国中药杂志,2006,31(8):646-649.
- 7 Gandhic CC, Kelly RM, Wiley RG, et al. Impaired acquisition of a Morris water maze task following selective destruction of cerebellar purkinje cells with OX7-saporin [J]. Behav Brain Res, 2000, 109(1): 37-47.
- 8 Pouzet B, Zhang WN, Feldon J, et al. Hippocampal lesioned rats are able to learn a spatial position using non-spatial strategies [J]. Behav Brain Res, 2002, 133(2): 279-291.
- 9 Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease [J]. Free Radic Biol Med, 1997, 23(1): 134-147.
- 10 Shi Q, Gibson GE. Oxidative stress and transcriptional regulation in Alzheimer disease [J]. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2007, 21(4): 276-291.
- 11 Nunomura A, Moreira PI, Takeda A, et al. Oxidative RNA damage and neurodegeneration [J]. Curr Med Chem, 2007, 14(28): 2968-2975.
- 12 Zablocka A, Janusz M. The two faces of reactive oxygen species [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2008, 62: 118-124.
- 13 Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, et al. Effects of antioxidant supplementation on the aging process [J]. Clin Interv Aging, 2007, 2(3): 377-387.
- 14 Manczak M, Anekonda TS, Henson E, et al. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression [J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(9): 1437-1449.

[收稿日期 2009-06-17][本文编辑 韦挥德 黄晓红]