慢性槲皮素增强小鼠空间学习记忆*

刘建才^① 余胡清^② 宁新宝^{①**}

(南京大学 ①电子科学与工程系生物医学电子工程研究所近代声学国家重点实验室; ② 生物科学与技术系, 南京 210093)

摘要 利用小鼠 D-半乳糖衰老模型,通过 Morris 水迷官(MWM)等动物行为实验和小鼠皮层与海马组织还原型谷胱甘肽和羟自由基含量测定等生化指标实验,对槲皮素延缓脑衰老作用和机制进行了研究.实验结果表明, 槲皮素能提高 D-半乳糖衰老模型小鼠的空间搜索学习和记忆能力,这些作用与槲皮素改善衰老小鼠皮层和海马的功能、抑制氧化应激反应有关,与增加还原型谷胱甘肽含量以减少羟自由基含量有关.为充分利用槲皮素作为一种天然的抗衰老药物奠定了良好的实验基础.

关键词 槲皮素 衰老 学习记忆 自由基 活性氧 还原型谷胱甘肽

槲皮素是一种在植物界分布很广的具有多种生物活性的黄酮类化合物.它广泛存在于蔬菜和水果之中,如洋葱、马铃薯、卷心菜、生菜、苹果、芒果和黑加仑等,多种中草药中也含有槲皮素.近年对它的生物学活性和药用价值研究日益增多,已发现槲皮素具有扩张冠状血管,降低血脂,抗血小板聚集,抗炎、抗过敏,抗糖尿病并发症,防止冠心病、心率失常,抗氧化、清除自由基,以及抗癌、抗肿瘤等药理作用.

槲皮素具有很强的抗氧化和清除自由基的能力. 槲皮素及其衍生物具有亲水性和亲脂性,其主要的 抗氧化活性基团是酚羟基. 槲皮素在高胆固醇模式 大鼠体内抑制脂质过氧化作用,降低血脂及胆固醇. 人体内槲皮素抑制细胞膜脂质的过氧化过程,增强机体抗活性氧防御系统的能力,保护细胞不受过氧化作用破坏 [1.2]. 槲皮素及其衍生物被证实是超氧阴离子自由基捕获剂,它们抗自由基和抑制脂质过氧化机制是: 螯合过渡金属离子形成不活泼的离子复合物,阻止离子参与许多自由基形成的生化反应,其中铁离子复合物仍保持自由基捕获剂活性 [3.4].它们阻止自由基在机体内产生的三个阶段:与超氧阴离子(O_2)反应阻止自由基反应的引发;与过渡金属离子螯合阻止羟自由基(OHT)生成;与脂质过氧基(ROO)反应阻止脂质过氧化过程 [5].

槲皮素的化学名为 3,5,7,3',4'-五羟基黄酮, 多酚 类化合物, 化学式 $C_{15}H_{10}O_7$, 分子量 302.24, 其分子

收稿日期: 2005-11-21; 接受日期: 2006-03-14

^{*} 江苏省药用植物重点实验室开放基金资助项目(批准号: KJS03078)

^{**} 联系人, E-mail: xbning@nju.edu.cn

结构如图 1 所示.

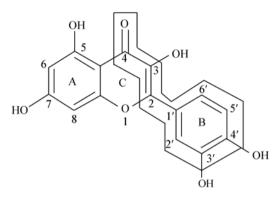


图 1 槲皮素的化学结构

槲皮素还可以抑制氧化应激对神经细胞的损伤, 对神经细胞有一定的保护作用.本文利用小鼠水迷 宫实验,通过观察槲皮素对 D-半乳糖半急性致衰老 模型小鼠学习记忆行为的影响,探讨槲皮素作为抗 氧化剂延缓神经系统衰老的可能性.

1 材料与方法

1.1 实验材料与动物

槲皮素、D-半乳糖购于 Sigma 公司; 甘露醇、蔗糖和 EDTA 购于上海试剂一厂; 还原型谷胱甘肽试剂盒、羟自由基试剂盒购于南京建成生物制剂公司.

昆明种雄性小鼠 50 只((20±1.0) g, 普通级)购于南京中医药大学动物中心, 随机分笼饲养, 每笼 10 只小鼠, 室温控制在(22±1)℃, 在 12 h 明暗环境条件下饲养, 自由喂食、饮水.

实验时将其中 4 组小鼠每天颈后皮下注射 50 mg/kg *D*-半乳糖,同时分别口腔灌服生理盐水、50 mg/kg 槲皮素、75 mg/kg 槲皮素和 100 mg/kg 槲皮素 (4组分别命名为 Dgal, Dq50, Dq75 和 Dq100).另一组小鼠作为正常对照组每天只用生理盐水处理.

用药 8 周后, 将 5 组小鼠分别进行行为测试和生化指标测试.

1.2 Morris 水迷宫实验

小鼠水迷宫为直径 120 cm, 高 50 cm的圆形水池, 周围放有视觉提示物体. 将水迷宫分为东南、西南、东北、西北 4 个象限, 其中一个象限之中置一平台,

平台高 15 cm, 表面直径为 6 cm, 水面高出平台 1 cm(图 2), 并加入黑色食用色素, 使动物在水面不能看见水下平台. 实验时将小鼠随机从一个象限面向池壁放入水迷宫, 通过迷宫上方的摄像头和图像采集系统记录小鼠找到平台休息的运动轨迹. 每天进行 4 次游泳训练, 每次令动物从不同的象限入水. 对第 1 天在 60 s内未找到平台的小鼠, 人为引导其找到平台, 以后几天记录的最长时间为 60 s, 持续实验 6 天 [6.7]. 第 7 天, 去掉平台, 将小鼠随机从一个象限面向池壁放入迷宫, 记录小鼠 90 s内穿越原平台位置的次数.

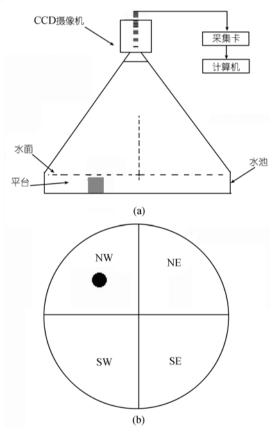


图 2 Morris 水迷宫装置示意图 (a) 系统切面示意图; (b) 系统俯示图

1.3 小鼠脑组织匀浆的制备

取小鼠,迅速断头,在冰块上分离出新皮层和海马,用 4℃生理盐水冲洗干净,置于玻璃匀浆器中,加入脑组织重量9倍的冷生理盐水,在冰水浴中匀浆,充分研磨,使组织块匀浆化.

1.4 脑组织中还原型谷胱甘肽(GSH)的测定

还原型谷胱甘肽是一种低分子自由基清除剂, 它可清除O₂-, H₂O₂等. GSH是蛋氨酸、甘氨酸和半胱 氨酸组成的一种小分子肽, 是组织中主要的非蛋白 质巯基化合物,并且是GPX和GST两种酶类的底物, 为这两种酶分解氢过氧化物所必需, 并且能稳定含 巯基的酶和防止血红蛋白及其他辅因子受氧化损伤. 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)在有GSH存在时,可 清除过氧化物如H2O2,同时消耗GSH. 二硫代二硝基 苯甲酸(DTNB)被GSH还原成TNB-SH₂,生成黄色化 合物. 取脑组织匀浆(Cys含量不大于 20 mmol/L; GSH浓度小于 0.9 g/L)1 mL, 加入 0.25 mol/L pH 8.0 的Tris-HCl缓冲液 3 mL, 再加入 1 mL 3%甲醛, 混匀, 室温下分别准确静置 60 min后, 取 1 mL加入预先恒 温于 25℃水浴中的 5 mL DTNB分析溶液, 混匀, 静 置 5 min后, 于波长 412 nm处测定吸光 [8]. 用考马斯 亮蓝法测定蛋白质含量, 计算每毫克蛋白质中GSH 的含量.

1.5 脑组织中羟自由基(OHT)的测定

通过比色法检测抗氧化物质总抗氧化以及清除活性氧能力. 因为 Fenton 反应产生的 OH⁻量与 H_2O_2 的量成正比, 当用 Gress 试剂显色时, 形成红色物质, 其星色与 OH⁻的多少成正比关系. 利用这一原理, 进行清除活性氧能力的测定. 实验方法按照总抗氧化能力检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)要求准备工作液. 取 0.1 mL 脑组织匀浆的待测样品液置于试管中, 加入检测试剂 2.0 mL, 混合均匀, 在 37°C恒温水浴箱反应 30 min, 于 520 nm 处测定吸收度值(A_{520}). 在 37°C时,每分钟每毫升样品液使反应体系的吸光度值每增加 0.01 时,为一个抗氧化能力单位. 计算公式:总抗氧化能力=(测定管 A-对照管 A)×反应液(mL)×样品测试前稀释倍数÷ 0.01 ÷ 30 ÷ 取样量(mL).

1.6 数据的统计处理

所有实验数据均经一元方差分析过程进行单变 量方差分析.

2 实验结果

2.1 槲皮素对 D-半乳糖处理小鼠 Morris 水迷宫 实验的影响

Morris 水迷宫用于检测小鼠的空间探索学习和 记忆的能力. 从图 3(a)可见: 训练的第 1 天各组小鼠 入水后到达平台的逃避潜伏期都比较长, 随着训练 天数的增加, 除 D-半乳糖衰老模型组小鼠外, 其余 4 组小鼠的逃避潜伏期逐渐缩短; 到第6天时, 灌喂槲 皮素的小鼠和 Dgal 组相比都体现出显著差异. 图 3(b) 显示 D-半乳糖组小鼠的游泳速度明显低于青年组小 鼠,呈衰老特性而槲皮素可明显提高小鼠的游泳速 度. 图 3(c)显示小鼠到达平台的游泳距离, 在第一轮 的训练中,各组动物几乎都不能自己到达平台,因此 游泳的时间基本是 60 s. 由于青年组和槲皮素中高剂 量组的动物游泳速度比较快, 在训练初始时游泳路 程明显长于 D-半乳糖衰老组的动物. 但是, 随着训 练天数的增加, 青年组和槲皮素中高剂量组的动物 的游泳距离明显缩短, 能自己找到平台的动物数量 也明显增加; 而 D-半乳糖衰老组和槲皮素低剂量组 的动物能够找到平台的数量没有明显变化. 在第五 轮和第六轮训练中(图 4)青年组小鼠有 70%可找到平 台, 灌喂槲皮素 100 和 75 mg/kg 的小鼠分别有 41.32%和 45.45%可找到平台, D-半乳糖衰老组和灌 喂槲皮素 50 mg/kg 组中只有 8.33%和 18.18%的动物 可找到平台.

6 天训练结束后将水下平台撤出,观察小鼠在 90 s 的游泳时间穿越原平台所在位置的次数和小鼠 在原平台所在象限游泳时间占总游泳时间的百分比, 结果显示: 槲皮素可以使 *D*-半乳糖衰老小鼠穿越平 台的次数有所增加,但与青年组动物比较仍有一定 的差距(表 1). 槲皮素剂量的增加可以使 *D*-半乳糖衰 老小鼠在撤除平台后,在原平台所在象限游泳时间 有所增加(图 5).

表 1 小鼠水迷宫去平台后穿越平台的次数(n=10)

组别	Young	Dgal	Dq50	Dq75	Dq100
穿越次数 a)	4.50±2.50	0.70±0.26	0.67±0.22	1.00±0.43	1.42±0.36

a) 表中数值为平均值±标准误

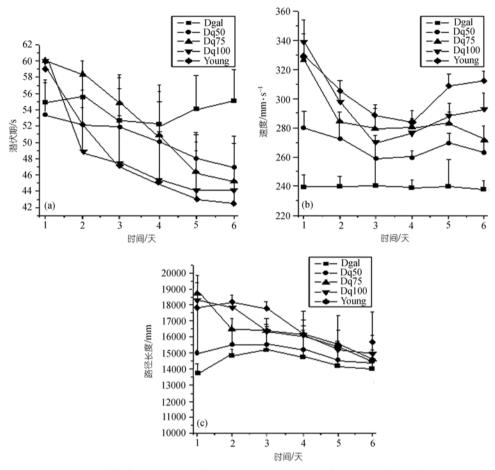


图 3 槲皮素对 D-半乳糖处理小鼠 Morris 水迷宫记忆行为的影响

(a)~(c)分别为潜伏期、平均速度、路程随天数的变化。图中数值示每天每组小鼠从 4 个入水点到达平台的平均值。其中, Dgal 示注射 50 mg/kg *D*-半乳糖衰老组; Dq50, Dq75, Dq100 分别示灌喂槲皮素 50, 75, 100 mg/kg 组; Young 示青年组小鼠

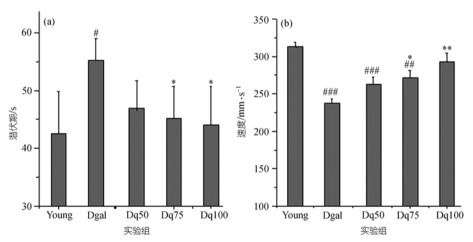
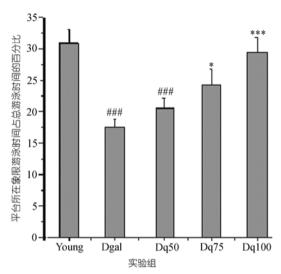


图 4 小鼠水迷宫第六轮实验时小鼠潜伏期(a)和平均速度(b)的变化

数值示每组小鼠从 4 个入水点到达平台的平均值,* $\overline{\pi}$ P<0.05,** $\overline{\pi}$ P<0.01(与 Dgal 组比较); # $\overline{\pi}$ P<0.05, ## $\overline{\pi}$ P<0.01, ### $\overline{\pi}$ P<0.01(与 Young 组相比较). 其中, Dgal 示注射 50 mg/kg D-半乳糖衰老组; Dq50, Dq75, Dq100 分别示灌喂槲皮素 50, 75, 100 mg/kg 组; Young 示青年组小鼠



382

图 5 撤除平台后小鼠在原平台所在象限游泳时间占总游 泳时间的百分比

数值示每组小鼠从 4 个入水点到达平台的平均值.* 示 P<0.05, *** 示 P<0.001(与 Dgal 组比较); ### 示 P<0.001(与 Young 组相比较). 其中, Dgal 示注射 50 mg/kg D-半乳糖衰老组; Dq50, Dq75, Dq100 分别示灌 喂槲皮素 50, 75, 100 mg/kg 组; Young 示青年组小鼠

2.2 槲皮素对 D-半乳糖处理小鼠皮层和海马组织中 GSH 的影响

正常状态下, GSH 作为细胞的一种重要的氧化还原缓冲剂. 细胞内有毒的氧化物通过被 GSH 还原而定期去除, 氧化型的 GSH 又可被 GSH 还原酶迅速还原, 因此被认为是体内最好的清除自由基的物质. 衰老时体内各种自由基增加, 提高机体内 GSH 水平可以抑制过多自由基的产生, 从而起抗衰老的作用. 通过检测槲皮素对小鼠皮层和海马组织中 GSH 的含量的影响, 观察其对小鼠皮层和海马抗氧化能力的促进作用. 图 6 表明槲皮素剂量的增加能明显提高小鼠脑组织中 GSH 的含量, 当槲皮素浓度为 50 mg/kg时, 与 Dgal 组相比 GSH 含量已有明显差异, 而且当槲皮素浓度为 100 mg/kg 时, GSH 含量与青年小鼠脑组织中的含量相当.

2.3 槲皮素对 D-半乳糖处理小鼠皮层和海马组织 中羟自由基的影响

羟自由基(OH⁻)是化学性质最活泼的活性氧,它 几乎和细胞内的每一类有机物如糖、氨基酸、磷脂、 核苷酸和有机酸等都能反应,且有非常高的速度常 数,因此它破坏性特强. 羟自由基测试盒为活性氧试剂盒,使样本产生羟自由基,其测试结果显示组织抗氧化能力的大小. 图 7显示随着槲皮素剂量的增加,组织的抗氧化能力增强,当槲皮素浓度为 100 mg/kg时,使皮层和海马组织的抗氧化能力与青年小鼠组相当.

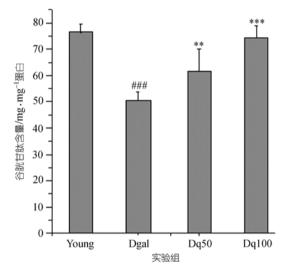


图 6 槲皮素 D-半乳糖处理小鼠皮层和海马中 GSH 含量的

数值示平均值±标准误,** π P<0.01,*** π P<0.001(与 Dgal 组比较); ###示 P<0.001(与 Young 组相比较). 其中, Dgal 示注射 50mg/kg D-半 乳糖衰老组; Dq50, Dq75, Dq100 分别示灌喂槲皮素 50, 75, 100 mg/kg 组; Young 示青年组小鼠

3 讨论

机体衰老是一种必不可免的生理过程,随着年龄的增长,机体的生理状态和运动功能逐步下降. 机体在正常代谢中, 会产生许多自由基, 如细胞氧化代谢产生的超氧阴离子自由基可与组织中的H₂O₂ 产生更活泼的羟自由基, 它们可诱发机体内不饱和脂肪酸的一系列脂质氧化连锁反应, 造成生物膜结构和功能损伤, 还会使DNA发生氧化破坏或交联, 使核酸变性, 扰乱DNA的正常复制与转录, 使蛋白质发生交联变性, 形成无定性沉淀物, 降低各种酶活性, 并导致因某些异性蛋白出现而引起的机体自身免疫现象等, 这些都可加速细胞的衰老 [9]. 同时, 机体内又存在着自由基防御系统, 如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、GSH-Px等, 保护机体免

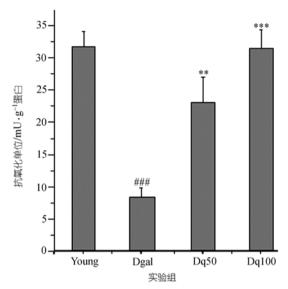


图 7 槲皮素对 D-半乳糖处理小鼠皮层和海马中抗氧化单 位的影响

数值示平均值±标准误 ** 示 *P*<0.01, *** 示 *P*<0.001(与 Dgal 组比较); ###示 *P*<0.001(与 Young 组相比较). 其中, Dgal 示注射 50 mg/kg *D*-半 乳糖衰老组; Dq50, Dq75, Dq100 分别示灌喂槲皮素 50, 75, 100 mg/kg 组; Young 示青年组小鼠

受损伤 [10]. SOD和GSH-Px是机体清除自由基的主要抗氧化酶,其含量可间接反映机体清除自由基的能力. 丙二醛(MDA)是体内自由基引发脂质过氧化的产物之一,其含量反映了机体脂质过氧化的程度,可间接判断机体和细胞受脂质过氧化损伤的程度以及衰老的程度. 当年老时,机体自由基防御系统功能下降,体内SOD逐渐下降,MDA则逐渐上升,引起大量不饱和脂肪酸氧化,对生物膜,DNA,蛋白质等造成破坏,说明了机体的衰老与自由基的关系.

本实验采用 D-半乳糖致小鼠衰老模型,在连续一段时间内给小鼠注射 D-半乳糖,使机体细胞内半乳糖浓度增高,在醛糖还原酶催化下,还原为半乳糖醇.这种物质不能被细胞进一步代谢从而堆积在细胞内,影响正常渗透压,导致细胞肿胀、功能障碍、代谢紊乱,破坏并消耗机体抗氧化防御系统,使自由基累积.同时在半乳糖还原过程中又产生活性氧,这样使细胞膜受损,过氧化脂质等增高,出现衰老.

槲皮素是有效的自由基捕获剂和抗氧剂. 有实验表明黄酮类化合物对超氧阴离子 (O^{2-}) 、 羟自由基和单线态氧 $(^{1}O_{2})$ 均有良好的清除作用,且这种作用

可能与其化学结构上的3,7-羟基有关[11]. 进一步的研究表明槲皮素可与Cu²+, Fe¹+及Mn²-结合, 其抗氧化作用可能是通过影响金属离子的体内平衡, 从而改变细胞内氧化状态而实现的. 槲皮素能与超氧离子络合减少氧自由基的产生, 与铁离子络合阻止羟自由基的形成, 与脂质过氧化基(ROO)反应抑制脂质过氧化过程; 同时, 槲皮素可抑制醛糖还原酶减少二核苷酸磷酸(NADPH)消耗, 从而提高机体抗氧能力[12]. 槲皮素的抗氧化作用已有很多报道, 但基本是中枢神经系统以外的工作, 仅有的文献也是对体外培养的神经细胞的作用. 本实验表明: 槲皮素能改善衰老动物学习和记忆活动, 推测其机制与其抗氧化的功能有关. 小鼠的新皮层和海马是与学习记忆相关的重要脑区 [13], 但槲皮素是否对这两个脑区的衰老性氧化损伤有抑制作用尚未见报道.

以往研究发现, 引起脑老化的神经系统增龄性退行性变化与学习记忆能力衰退存在一致性. 老龄动物的学习记忆能力下降, 探究反应减弱, 自发行为减少. 在 Morris 水迷宫实验中槲皮素可以明显缩短衰老模型小鼠的逃避潜伏期, 并改善衰老模型小鼠的空间搜索学习能力. 这表明, 长期给小鼠灌喂槲皮素能使小鼠的空间学习能力和记忆的保持能力得到显著改善.

本实验显示,灌喂槲皮素的衰老小鼠皮层和海马组织内羟自由基含量下降,同时使GSH含量增加.GSH具有清除自由基的作用,而且GSH含量的增加促进了GSH-Px的活性,而GSH-Px的主要生物作用是清除脂质过氧化物,并在CAT含量很少的组织中代替CAT清除H₂O₂.作为抗活性氧酶之一的GSH-Px具有防止畸变,参与前列腺素(PGs)合成等重要病理生理作用,从而增强机体抗氧化抗自由基防御系统的功能,预防衰老 [14].由此可见槲皮素可以通过抑制D-半乳糖引起的小鼠皮层和海马GSH的减少而改善衰老模型小鼠的脑认知功能.

综上所述, 槲皮素可明显改善 *D*-半乳糖引起的小鼠脑功能的衰退, 包括自发探究活动和空间搜索学习记忆行为等. 其作用机制主要包括增加还原型谷胱苷肽以减少小鼠皮层和海马羟自由基. 这项研究为充分利用槲皮素作为一种天然的抗衰老制剂,

奠定了良好的基础.

参 考 文 献

- 1 Schmitt-Schillig S, Schaffer S, Weber C C, et al. Flavonoids and the aging brain. J Physiology and Pharmacol, 2005, 56(1): 23—36
- 2 Maria F M, Isabel S R, Irene I, et al. Quercetin, a flavonoid anti-oxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. Biol Pharm Bull, 2003, 26(10): 1398—1402[DOI]
- 3 Kuo S M, Leavitt P S, Lin C P. Dietary flavonoids interact with trace metals and affect metallothionein level in human intestinal cells. Biol Trace Elem Res, 1998, 62(3): 135—153
- 4 Morel I, Lescoat G, Cogrel P, et al. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoid catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. Biochem Pharmacol, 1993, 45: 13—19[DOI]
- 5 Diana M, Anil K J, Narimantas C, et al. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. Free Radical Biol Med, 1999, 26: 107— 116[DOI]
- 6 Biessels G J, Kamal A, Urban I J, et al. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozocin-diabetic rats: effects of insulin treatment. Brain Research, 1998, 800: 125—

135[DOI]

- 7 Donald P C, Koorosh I, Francis B. Individual and combine manipulation of muscarinic, NMDA, and benzodiazepine receptor activity in the water maze task: implications for a rat model of Alzheimer dementia. Behavioural Brain Research, 2000, 111: 125—137[DOI]
- 8 Buzadzic B, Korac A. Glutathion content, rate of apoptosis, and brown adipose tissue mass in rats exposed to different ambient temperatures. J Thermal Biol, 2004, 29: 503—507[DOI]
- 9 Harman D. The free radical theory of aging: the "free radical" diseases. Age, 1984, 7: 111—131[DOI]
- 10 Gutteridge J M. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. Chem Biol Interact, 1994, 91(2~3): 133—140[DOI]
- 11 夏维木, 陈 杞, 张丽民, 等. 几种黄酮类化合物清除活性氧的实验研究. 第二军医大学学报, 1997, 18(4): 363—365
- 12 Kuo S M, Leavitt P S, Lin C P. Dietary flavonoids interact with trace metals and effect metallothionein level in human intestinal cell. Bio Trace Elem. Res, 1998, 62(3): 135~139
- 13 季今朝,张雪寒,李葆明. 大鼠海马CA1 区β受体参与长时程增强和空间学习. 中国科学, C辑, 2003, 33(4): 354—361[摘要]
- Bolanos J P, Almeida A, Stewart V, et al. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. J Neurochem, 1997, 68(6): 2227— 2240