

马齿苋乙醇及其正乙醇提取物对 *D*-半乳糖致衰老小鼠的学习记忆作用

金英子¹, 李迎军², 张红英^{2,*}

(1. 延边大学医学部实验动物科, 吉林 延吉 133002;

2. 延边大学医学部基础医学院机能学实验中心, 吉林 延吉 133002)

摘要: 目的: 研究马齿苋不同提取物对 *D*-半乳糖致衰老小鼠的学习记忆能力及其作用机制。方法: 取小鼠随机分为正常组、模型组、马齿苋正丁醇提取物组(0.5、0.25g/(kg·d), 以体质量计)和马齿苋乙醇提取物组(1、0.5g/(kg·d), 以体质量计)。除正常组颈背部皮下注射生理盐水外, 其他各组均皮下注射 *D*-半乳糖(1g/(kg·d), 以体质量计), 注射后每天下午灌胃给药, 连续 42d。采用避暗法和水迷宫法测定衰老小鼠学习记忆能力, 同时测定衰老小鼠脑组织丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。结果: 马齿苋正丁醇提取物(0.5、0.25g/(kg·d))均可提高衰老小鼠学习记忆能力($P < 0.01$), 0.5g/(kg·d)剂量组可显著提高衰老小鼠脑组织 SOD 和 GSH-Px 的活性($P < 0.05$, $P < 0.01$), 0.25g/(kg·d)剂量组马齿苋正丁醇提取物可显著降低 MDA 含量($P < 0.05$); 马齿苋乙醇提取物可极显著提高衰老小鼠学习记忆能力($P < 0.01$), 显著降低脑组织 MDA 含量($P < 0.05$)。结论: 马齿苋不同提取物能明显改善衰老小鼠学习记忆能力, 其机制可能与提高 SOD、GSH-Px 活性, 降低 MDA 含量有关。马齿苋正丁醇提取物好于马齿苋乙醇提取物。

关键词: 马齿苋; 学习记忆; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 衰老小鼠

Effects of Ethanol and *n*-Butanol-soluble Extract from *Herba Portulacae* on Learning and Memory Performance in *D*-Galactose-induced Senile Mice

JIN Ying-zi¹, LI Ying-jun², ZHANG Hong-ying^{2,*}

(1. Experimental Animal Room, Yanbian University Health Science Center, Yanji 133002, China;

2. Functional Laboratory Center, Basic Medical College, Yanbian University Health Science Center, Yanji 133002, China)

Abstract: Objective: To study the effects and mechanisms of ethanol extract and its *n*-butanol-soluble fraction from *Herba Portulacae* on learning and memory performance in senile mice induced by *D*-galactose. Method: Mice were randomly divided into 6 groups: control group, model group and *n*-butanol-soluble fraction treatment (0.5 g/(kg·d) and 0.25 g/(kg·d)) groups and ethanol extract treatment groups (1 g/(kg·d) and 0.5 g/(kg·d)) groups. Normal saline was given to control group once daily for 42 consecutive days by subcutaneous injection in the neck back, and 1 g/(kg·d) *D*-galactose to the other 5 groups using the same administration route before intragastric administration of the same volume of distilled water and corresponding drugs (in aqueous solution) every afternoon during the administration period. Mouse learning and memory performance were tested by step-through test and water maze test, and MDA content and SOD and GSH-Px activities in the brain of senile mice were assayed. Results: Both dosages of *n*-butanol-soluble fraction could significantly improve mouse learning and memory performance ($P < 0.01$), and the dosage of 0.5 g/(kg·d) resulted in a significant increase in the activities of SOD and GSH-Px in the brain ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the other dosage significantly decreased MDA content in the brain ($P < 0.05$). Meanwhile, ethanol extract from *Herba Portulacae* had a highly significant improving effect on mouse learning and memory performance ($P < 0.01$) and significantly reduced MDA content in the brain ($P < 0.05$). Conclusion: From these results, we concluded that ethanol extract and its *n*-butanol-soluble fraction from *Herba Portulacae* are capable of significantly improving senile mouse learning and memory performance. The possible mechanisms may be through increasing SOD and GSH-Px activities and decreasing MDA content in

收稿日期: 2010-12-07

作者简介: 金英子(1958—), 女, 实验师, 本科, 主要从事实验动物的药理研究。E-mail: QCL-2@hotmail.com

* 通信作者: 张红英(1952—), 女, 高级实验师, 本科, 主要从事中药心血管和抗衰老的药理研究。

E-mail: zhanghongying52@163.com

the brain. Furthermore, ethanol extract from *Herba Portulacae* is superior to its *n*-butanol-soluble fraction.

Key words: *Herba Portulacae*; learning and memory; MDA; SOD; GSH-Px; senile mouse

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)15-0265-04

马齿苋(*Portulaca oleracea* L.)广泛分布于我国南北地。资源丰富,是一种具有很大开发潜力的植物,马齿苋科植物的全草又名长寿菜,性寒味酸具有清热解毒、散血消肿之功效。马齿苋是中国卫生部划定的药食同源的野生植物之一。马齿苋含有丰富的化学成分,具有广泛的药理活性及营养保健作用^[1]。曾小玲报道鲜马齿苋沸水提取物对 $O_2\cdot$ 和 $\cdot OH$ 均有显著的清除作用^[2]。马齿苋水提液可明显延长模型小鼠的缺氧生存时间、爬杆时间,提高其高温存活率^[3],据此推测马齿苋不同提取物可能具有改善学习记忆的作用。本研究马齿苋不同提取物对 *D*-半乳糖致衰老小鼠学习记忆的影响,从清除氧自由基能力方面初步探讨其作用机制。

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物

昆明种小鼠(普通级),雌性,体质量 24~26g,由延边大学医学部实验动物科提供,动物合格证号:10-1022。

1.2 材料与试剂

马齿苋购于吉林省延边大学附属医院中药房,经延边大学药学院生药教研室刘永镇教授鉴定为真品。马齿苋正丁醇和乙醇提取物由药学院植物教研部提供。

D-半乳糖(批号 F20080429) 国药集团化学试剂有限公司; SOD、MDA、GSH-Px、蛋白定量试剂盒(批号 2008.11.23) 南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器与设备

2H-500 型小鼠避暗仪 安徽正华教学实验机械厂; LW-Ⅱ型自动记录水迷宫仪 中国医学科学院药物研究所; YP600 型电子称、VIS-723 型可见分光光度仪 上海精密仪器有限公司; 超级恒温水浴 上海安亭科学仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 马齿苋不同提取物的制备

马齿苋正丁醇提取物的制备^[4-5]:称取马齿苋干草 600g 粉碎,用 80% 乙醇在水浴中反复回流提取 3 次,时间分别为 2、2、1h,合并提取液,减压浓缩为浸膏,然后再用正丁醇依次萃取 3 次,合并提取物,回收正丁醇,得到正丁醇浸膏,干燥备用,临用前用蒸馏水配成所需浓度。

马齿苋乙醇提取物制备^[5-6]:称取马齿苋干草 600g 粉碎,用 80% 的乙醇在水浴中回流提取 2 次,各用 10 倍量与 8 倍量乙醇提取 2h 和 1h,冷却后过滤,合并滤液浓缩,干燥成粉末,临用前用蒸馏水配成所需浓度。

1.4.2 实验分组及给药

取雌性昆明种小鼠,按体质量随机分为 6 组,即正常组、模型组、马齿苋正丁醇提取物组(0.5、0.25g/(kg·d),以体质量计)和马齿苋乙醇提取物组(1、0.5g/(kg·d),以体质量计)。除正常组颈背部皮下注射生理盐水外,其他各组均皮下注射 *D*-半乳糖(1g/(kg·d),以体质量计)进行造模^[7],每天 1 次连续造模 42d,正常组皮下注射等量生理盐水。注射 *D*-半乳糖后每日下午给药。药物组溶剂为蒸馏水,生理盐水组和模型组灌胃给等体积蒸馏水,药物组灌胃给马齿苋不同提取物,每天 1 次,连续灌胃给药 42d。

1.4.3 小鼠避暗实验^[8]

避暗箱大小为 36cm × 12cm × 12cm,分为前后明暗室两部分,两室间有直径 3cm 的圆洞相通,底部为铜栅,暗室后半部通以 40V 电压。训练时将小鼠背对洞口放入明室,暗室底部通电,同时启动计时器,小鼠穿过洞口进入暗室触电的时间,为实验潜伏期,进行训练 5min,24h 后进行正式实验,将小鼠背对洞口放入明室,同时启动计时器,记录每只小鼠第 1 次进入暗室的时间,即为潜伏期,并记录第 1 次和 5min 内进入暗室的次数(即避暗错误次数)。

1.4.4 小鼠水迷宫实验^[9]

装置为 32cm × 12cm × 25cm 双层不透明的有机玻璃槽,实验时水深为 10cm,水温保持 25℃ 左右。第一次训练前将小鼠放在梯子附近,使其自行爬上 3 次,然后将小鼠背对出口放入 A 点开始训练。第二次训练前将小鼠放在梯子附近,使其自行爬上 1 次,将小鼠背对出口放入 B 点开始训练。正式实验时将小鼠背对出口从 B 点开始放入小鼠,同时按下启动键,仪器开始自动计时,小鼠到达终点或时间到 2min 时,仪器自动停记。

1.4.5 脑组织蛋白质、MDA、SOD、GSH-Px 含量及活性的测定

实验结束后,取脑组织冰浴研磨,并用冷生理盐水制成 10% 脑组织匀浆液,3500r/min 离心 10min,取上清液按试剂盒方法,测定脑组织蛋白质、MDA 含量和 SOD、GSH-Px 活性。

1.5 统计学分析

所有实验数据均以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 SPSS11.0 统计软件分析,用方差分析进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异显著,有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 马齿苋不同提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力的影响(避暗法)

表 1 马齿苋不同提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力的影响(避暗法)($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of ethanol extract and its *n*-butanol-soluble fraction from *Herba Portulacae* on step-through test results of learning and memory performance in senile mice induced by D-gal($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g/(kg·d))	动物数	避暗法	
			潜伏期/s	错误次数
正常组		15	91.54 ± 2.80	0.87 ± 0.92
模型组		12	29.73 ± 3.75	5.17 ± 6.94
马齿苋正丁醇组	0.25	17	140.63 ± 4.12**	0.18 ± 0.53**
	0.5	12	109.78 ± 5.51**	0.42 ± 0.67**
马齿苋乙醇组	0.5	17	103.80 ± 3.93**	0.63 ± 1.41**
	1	12	174.14 ± 1.85**	0.11 ± 0.33**

注: *.与模型组相比, 差异显著($P < 0.05$); **.与模型组相比, 差异极显著($P < 0.01$)。下同。

由表 1 可知, 与正常组相比, 模型组小鼠潜伏期明显缩短和错误次数明显增加, 与模型组相比, 马齿苋正丁醇提取物组(0.5、0.25g/(kg·d))和马齿苋乙醇提取物组(1、0.5g/(kg·d))均可使衰老小鼠潜伏期明显延长和错误次数明显减少($P < 0.01$)。

2.2 马齿苋不同提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力的影响(水迷宫法)

表 2 马齿苋不同提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力的影响(水迷宫法)($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of ethanol extract and its *n*-butanol-soluble fraction from *Herba Portulacae* on water maze test results of learning and memory performance in senile mice induced by D-gal($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g/(kg·d))	动物数	水迷宫法	
			到达时间/s	错误次数
正常组		15	58.23 ± 26.93	10.92 ± 8.69
模型组		12	102.36 ± 30.58	24.36 ± 7.46
马齿苋正丁醇组	0.25	17	58.25 ± 28.41**	11.50 ± 5.68**
	0.5	12	48.45 ± 38.35**	8.50 ± 4.97**
马齿苋乙醇组	0.5	17	56.25 ± 25.41**	10.50 ± 5.38**
	1	12	47.45 ± 35.35**	8.30 ± 4.97**

由表 2 可知, 与正常组相比, 模型组小鼠到达时间明显延长和错误次数明显增加, 与模型组相比, 马齿苋正丁醇提取物组(0.5、0.25g/(kg·d))和马齿苋乙醇提取物组(1、0.5g/(kg·d))均可使衰老小鼠到达时间明显缩短和错误次数明显减少($P < 0.01$)。

2.3 马齿苋不同提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠脑组织 SOD、MDA、GSH-Px 的影响

由表 3 可知, 与正常组相比, 模型组小鼠脑组织 SOD、GSH-Px 活性明显下降, 与模型组相比, 马齿苋正丁醇提取物(0.5g/(kg·d))组 SOD、GSH-Px 活性明显

升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与正常组相比, 模型组小鼠脑组织 MDA 含量明显升高, 与模型组相比, 马齿苋正丁醇提取物组(0.25g/(kg·d))和马齿苋乙醇提取物组(1、0.5g/(kg·d))均可使衰老小鼠脑组织 MDA 含量明显下降($P < 0.05$)。

表 3 马齿苋不同提取物对 D-半乳糖致衰老小鼠脑组织 SOD、MDA、GSH-Px 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of ethanol extract and its *n*-butanol-soluble fraction from *Herba Portulacae* on cerebral SOD and GSH-Px activities and MDA content in senile mice induced by D-gal($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g/(kg·d))	动物数	SOD/ (U/mg pro)	MDA/ (nmol/mg pro)	GSH-Px/ (U/mg pro)
正常组		10	89.8 ± 14.6	4.8 ± 0.7	62.7 ± 19.2
模型组		10	42.6 ± 13.2	5.0 ± 1.5	3.33.2 ± 8.5
马齿苋正丁醇组	0.25	10	63.5 ± 14.7	3.3 ± 0.8*	48.9 ± 19.9
	0.5	10	81.0 ± 33.5*	4.0 ± 0.9	51.4 ± 12.9**
马齿苋乙醇组	0.5	10	59.2 ± 11.6	3.2 ± 0.7*	46.2 ± 15.8
	1	10	61.3 ± 12.5	3.9 ± 0.5*	47.2 ± 15.6

3 讨论

实验结果表明, 马齿苋不同提取物避暗法实验中, 可使衰老小鼠潜伏期明显延长和错误次数明显减少; 水迷宫法实验中, 可使衰老小鼠到达时间明显缩短和错误次数明显减少; 说明, 马齿苋不同提取物可明显提高衰老小鼠学习记忆能力。同时马齿苋正丁醇提取物可使衰老小鼠脑组织 SOD 活性、GSH-Px 活性明显升高, 马齿苋正丁醇提取物组(0.25g/(kg·d))可使衰老小鼠脑组织 MDA 含量明显下降, 而马齿苋乙醇提取物只能使 MDA 含量下降。所以马齿苋正丁醇提取物好于马齿苋乙醇提取物。

D-半乳糖致衰老小鼠模型, D-半乳糖在半乳糖氧化酶作用下, 参与氧化反应, 生成糖和过氧化氢反应过程中产生超氧阴离子自由基, 其过量损伤可产生衰老反应。该模型在一定时间内连续注射 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, 还原成半乳糖醇, 这种物质不能被细胞进一步代谢而堆积在细胞内, 影响正常渗透压, 致细胞肿胀, 功能障碍代谢紊乱, 氧自由基堆积, 最终致机体衰老^[10]。连续颈背部皮下注射 D-半乳糖造成衰老模型, 此模型造模简单易行, 不需要特殊设备, 本模型基本接近自然衰老过程。

避暗法实验中, D-半乳糖模型组可使衰老小鼠潜伏期明显缩短和错误次数明显增加, 与模型组相比, 马齿苋正丁醇提取物组(0.5、0.25g/(kg·d))均可使衰老小鼠潜伏期明显延长和错误次数明显减少; 马齿苋乙醇提取物组(1、0.5g/(kg·d))均可使衰老小鼠潜伏期明显延

长和错误次数明显减少。

水迷宫法实验中, *D*-半乳糖模型组可使衰老小鼠到达时间延长和错误次数明显增加, 与模型组相比, 马齿苋正丁醇提取物组(0.5、0.25g/(kg·d))均可使衰老小鼠到达时间明显缩短和错误次数明显减少; 马齿苋乙醇提取物组(1、0.5g/(kg·d))均可使衰老小鼠到达时间明显缩短和错误次数明显减少。马齿苋不同提取物可提高衰老小鼠学习记忆能力。

SOD 作为机体内主要的抗氧化酶对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用。此酶可促使超 $O_2\cdot$ 转变为过氧化氢, 从而减少脂质过氧化反应使机体细胞和组织免受损害, 其活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力, 并与衰老、肿瘤、炎症、等有着密切关系^[11-12]。马齿苋正丁醇提取物组(0.5g/(kg·d))可提高衰老小鼠脑组织 SOD 活性。

MDA 是氧自由基攻击生物膜中的不饱和脂肪酸而形成的脂质过氧化物, 它能生成聚合物并与人体内的蛋白质和脱氧核糖核酸发生反应, 使蛋白质的结构发生变异, 导致变异蛋白质的细胞失去正常功能并向初期癌细胞转化, 从而导致癌症的发生。MDA 含量的变化可间接反应组织中氧自由基含量的变化量^[13]。马齿苋正丁醇提取物(0.25g/(kg·d))组和马齿苋乙醇提取物(1、0.5g/(kg·d))组可明显降低衰老小鼠脑组织 MDA 含量。

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 H_2O_2 的还原反应, 可以起到保护细胞膜结构和功能完整作用, 从而减缓衰老过程^[14]。马齿苋正丁醇提取物组(0.5g/(kg·d))可提高衰老小鼠脑组织 GSH-Px 活性。

综上所述, 马齿苋不同提取物可提高衰老小鼠学习记忆能力, 其机制可能与提高 SOD、GSH-Px 活性, 降

低 MDA 含量有关。马齿苋正丁醇提取物作用好于马齿苋乙醇提取物。

参考文献:

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典(上下)[M]. 上海: 科学技术出版社, 2006: 1635-1758.
- [2] 曾小玲. 马齿苋水提取物对氧自由基清除作用的研究[J]. 湖南医科大学学报, 1999, 24(2): 133-135.
- [3] 杜历生. 衰老机理和延缓衰老的措施[J]. 广西中医学院学报, 2001, 4(4): 108-135.
- [4] 刘净, 于志斌, 叶蕴华, 等. 马齿苋活性部位化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19(1): 398-399.
- [5] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 70.
- [6] 钟志溪, 冯艳. 马齿苋提取物及其药理作用研究进展[J]. 中国临床医药研究杂志, 2008, 183: 41-42.
- [7] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2版. 上海: 科学技术出版社, 2006: 10.
- [8] 候悦, 吴春福, 何祥, 等. 氯氮平、奥氮平对小鼠在避暗实验中学习记忆获得、巩固和再现过程的影响[J]. 中国临床康复, 2006, 10(38): 61-64.
- [9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 828.
- [10] 李文彬, 韦丰, 范朋, 等. *D*-半乳糖在小鼠上诱导的拟脑老化效应[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9(2): 93-95.
- [11] GIARDINO R, GIAVARESI G, FINI M, et al. The role of different chemical modifications of superoxide dismutase in preventing a prolonged muscular ischemia/reperfusion injury[J]. Arit Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2002, 30(1): 189-198.
- [12] 张洪江, 张红英, 王玉. 马齿苋正丁醇提取物对 *D*-半乳糖致衰老小鼠学习记忆作用的研究[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 204-208.
- [13] LIMOLI C L, KAPLAN M I, GIEDZINSKI E, et al. Attenuation of radiation-reduced genomic instability by free radical scavengers and cellular proliferation[J]. Free Radio Boil Med, 2001, 31(1): 10-15.
- [14] LASCO M A, FUNK W, VILLEPONTEAU B, et al. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA[J]. Science, 1995, 269: 1267-1271.