

白藜芦醇对D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力和脑组织抗氧化能力的影响

刘贵珊^{1,2}, 杨 博³, 张泽生^{2*}, 范艳丽¹, 贺 伟²

(1.宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021; 2.天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457;

3.宁夏大学新华学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 探讨白藜芦醇对D-半乳糖致衰老小鼠脑组织抗氧化与学习记忆的影响, 揭示白藜芦醇延缓脑衰老的作用。将50只雄性ICR鼠随机分为正常对照组, 模型组, 白藜芦醇低、中、高剂量组。模型组及白藜芦醇治疗组连续8周于小鼠颈背部皮下注射D-半乳糖120 mg/(kg·d), 给予不同剂量白藜芦醇(25、50、100 mg/(kg·d))灌胃; 正常对照组注射、灌胃等量生理盐水。采用Morris水迷宫检测各组小鼠的学习记忆能力, 并测定各组小鼠脑组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量。白藜芦醇能够显著缩短D-半乳糖致衰老小鼠Morris水迷宫中找到隐藏平台时间($P<0.01$), 提高游泳速度($P<0.01$)和穿越目标象限的次数($P<0.01$); 提高衰老模型小鼠脑组织SOD($P<0.01$)、T-AOC活性($P<0.05$), 降低MDA含量($P<0.01$)。白藜芦醇能够改善D-半乳糖致衰老模型小鼠的学习记忆能力, 提高脑组织的抗氧化能力, 具有一定延缓脑衰老的作用。

关键词: 白藜芦醇; D-半乳糖; 学习记忆能力; 抗氧化

Effects of Resveratrol on Learning, Memory and Brain Antioxidant Abilities in D-Galactose-Induced Aging Mice

LIU Gui-shan^{1,2}, YANG Bo³, ZHANG Ze-sheng^{2*}, FAN Yan-li¹, HE Wei²

(1. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 3. Xinhua College, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: Objective: To investigate the effects of resveratrol (Res) on learning, memory and brain antioxidant capacities in D-galactose-induced aging mice. Methods: Fifty ICR mice were randomly divided into five groups, designated as normal control, model, resveratrol low-dose, moderate-dose and high-dose groups. The normal control group was given normal saline by gavage, and all other groups were given D-galactose solution by neck back subcutaneous injection at the daily dose of 120 mg/(kg·d) for 8 consecutive weeks. At the same time, Res-treated mice were administered Res by gavage at the daily doses of 25, 50 and 100 mg/(kg·d) body weight per day, respectively. The learning and memory abilities of mice were determined by Morris water maze test. Superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (T-AOC) and malondialdehyde (MDA) in the brain of mice were determined at the end of 12 h of fasting after the last administration. Results: Res could reduce the time mice spent on finding platform ($P<0.01$), improve the swimming speed ($P<0.01$) and the number of times mice crossed the platform ($P<0.01$) in Morris water maze test, increase SOD ($P<0.01$) and T-AOC activities ($P<0.05$) and decrease the content of MDA ($P<0.01$) in brain tissue. Conclusion: Res can ameliorate the degeneration of learning and memory abilities in D-galactose-induced aging mice, improve brain antioxidant abilities and thus delay brain aging.

Key words: resveratrol; D-galactose; learning and memory abilities; antioxidation

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)05-0204-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201405040

随着人类平均预期寿命的不断延长, 世界人口结构的老齡化趋势日益突显, 一个人口老齡化的时代已经来

临^[1]。衰老又称老齡, 通常是指在正常状况下生物发育成熟后, 随年龄增加, 自身机能减退, 内环境稳定能力与

收稿日期: 2013-04-07

基金项目: 2012年度宁夏大学科学研究基金项目(ZR1201); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20101208110001)

作者简介: 刘贵珊(1979—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为天然产物生物转化及功能食品。E-mail: guishanliu2008@sina.com

*通信作者: 张泽生(1956—), 男, 教授, 博士, 研究方向为天然产物生物转化及功能食品。E-mail: zhangzesheng@tust.edu.cn

应激能力下降, 结构、组分逐步退化性变, 趋向死亡, 不可逆转的现象。研究和阐明衰老机理, 延缓人类衰老进程, 提高生存质量, 具有重要的医学价值和社会意义。因此, 关于衰老和抗衰老的研究已成为21世纪世界生命科学研究的热点之一。

白藜芦醇(resveratrol, Res), 化学名为3,4',5-三羟基-反式-二苯乙烯(3,4',5-trihydroxy-trans-stilbene), 是广泛存在于葡萄、藜芦、虎杖等植物中的一种含有芪类结构的非黄酮类多酚类化合物, 以新鲜葡萄皮中含量最高。研究表明, 白藜芦醇具有抗癌^[2]、抗菌^[3]、抗炎^[4-5]、保肝^[6]、植物雌激素样作用^[7]、心血管系统的保护作用^[8]等多种生物学活性, 但其抗氧化与抗衰老作用的研究却鲜见报道。本课题组之前对白藜芦醇的体外抗氧化作用进行了研究^[9], 本研究采用D-半乳糖致衰老模型小鼠, 探讨白藜芦醇对其学习记忆能力以及脑组织抗氧化能力的影响, 旨在评价白藜芦醇的抗衰老作用及其机制, 从而为深入开发白藜芦醇保健产品提供理论和技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

白藜芦醇(纯度97%) 天津尖峰天然产物研究开发有限公司; D-半乳糖 上海蓝季科技发展有限公司; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测试盒、总抗氧化力(total antioxidant capacity, T-AOC)测定试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒 南京建成生物工程中心; 其余试剂为国产分析纯。

DFT-200手提式高速万能粉碎机 温岭市林大机械有限公司; DZKW-0-2电热恒温水浴锅 北京市永光明医疗仪器厂; MK3酶标仪、冷冻离心机 美国Thermo公司; Morris水迷宫 中国医学科学院药物研究所。

1.2 动物分组及处理

SPF级8周龄雄性ICR小鼠50只, 体质量(24±2)g, 由天津中医药大学第一附属医院实验动物中心提供(合格证号: W-J津实动质M准字第006号); 动物饲养在天津科技大学清洁级动物实验房(环境设施合格证号: SYXK(津)2006-0005)。

小鼠饲养在室温为18~22℃, 相对湿度50%~60%, 12h昼夜交替的动物房内, 自由摄食和饮水。适应1周后, 用Morris水迷宫筛选游泳距离不低于2600cm/2min、体质量不低于18g的50只健康雄性ICR小鼠。按随机区组设计分为5组, 即正常对照组(normal group, NG)、模型组(model group, MG)、白藜芦醇低剂量组(low dose of resveratrol-treated group, RESL)、白藜芦醇中剂量组(moderate dose of

resveratrol-treated group, RESM)、白藜芦醇高剂量组(high dose of resveratrol-treated group, RESH), 每组10只。除正常对照组外, 其余4组均颈背部皮下注射用生理盐水配制的灭菌D-半乳糖120mg/(kg·d), 正常对照组注射等量生理盐水, 连续8周。同时, 白藜芦醇低、中、高剂量组分别以25、50、100mg/(kg·d)剂量灌胃白藜芦醇(1%羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose sodium, CMC)助溶)的生理盐水溶液, 正常对照组和模型组灌胃等量生理盐水。实验期间每周称质量1次, 并根据小鼠体质量变化调整灌胃剂量和注射剂量。

1.3 脑组织抗氧化指标的测定

末次给药后禁食12h, 将各组小鼠脱臼处死, 迅速取右侧大脑组织(在冰面上操作), 制成10%组织匀浆, 测定脑组织SOD、T-AOC活力和MDA的含量。

1.4 Morris水迷宫行为测试实验

Morris圆形水迷宫主要由圆形不锈钢水池(直径120cm, 高50cm)和隐藏平台(直径9cm, 高27cm)组成, 水池上空通过一个数字摄像机与计算机相连接。实验时将水池内的水用黑色墨汁染色, 以隐藏平台, 水面高出平台表面1cm, 水温控制在(22±0.5)℃。整个实验过程分为隐藏平台获得实验和空间探索实验两部分^[10-12]。各组小鼠末次给药前6d Morris水迷宫训练。

隐藏平台获得实验: 旨在评价小鼠的学习和记忆能力。实验开始前, 让小鼠自由游泳2min以适应周围环境。正式实验开始时, 随机从东、西、南、北4个入水点选择一个, 将小鼠面向池壁放入水中, 记录其寻找并爬上平台所需时间即逃避潜伏期。如果小鼠在120s内未找到平台, 将其引至平台, 逃避潜伏期记为120s; 若小鼠找到平台, 需停留20s。实验历时4d, 每天每只小鼠训练4次, 共训练16次。计算每天各组4次寻找平台潜伏期和游泳速度的平均值记为当天的寻找平台潜伏期和游泳速度^[13]。

空间探索实验: 旨在评价小鼠空间位置记忆保持的能力。实验第5天去除平台, 任选一个入水点将小鼠放入水中, 记录120s内, 小鼠在目标象限(原平台所在象限)穿越目标次数, 记为穿越次数^[14]。

1.5 统计方法

各组隐藏平台实验指标用SPSS13.0进行重复测量的数据分析, 各组空间探索实验, 脑组织SOD、T-AOC、MDA检测进行多个样本均数的方差分析以及均数间两两比较, 以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 白藜芦醇对D-半乳糖致衰老小鼠一般状态观察

观察结果表明: 正常对照组小鼠饮食正常, 行动敏捷, 毛色光亮, 皮肤有弹性, 精神状态良好; 与正常

对照组比较,模型组则精神萎靡,眯眼,扎堆,皮肤粗糙,反应迟钝,毛色暗淡,尤其是腹部毛发逐渐变得无光泽、稀疏并渐有脱毛现象;白藜芦醇低、中、高剂量组小鼠在行动、皮肤及毛发状态方面均较模型组好。

2.2 白藜芦醇对小鼠体质量的影响

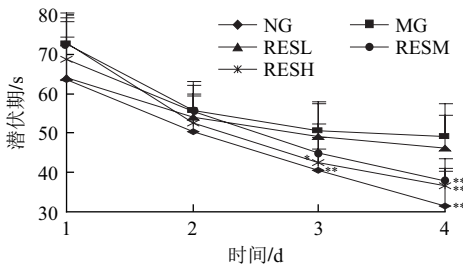
表1 实验期间小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Changes in mouse body weight during the experiment ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

周次	NG	MG	RESL	RESM	RESH
1	25.3±2.0	24.7±2.3	24.3±1.8	26.6±1.5	23.8±1.7
2	26.6±1.3	25.8±2.5	23.6±2.0	27.1±2.1	23.0±2.0
3	28.2±1.3	28.1±1.9	23.8±1.8	27.4±2.6	24.4±1.8
4	29.4±2.2	28.6±2.1	25.8±2.3	28.4±3.1	25.8±2.5
5	29.7±2.5	29.9±2.9	27.4±2.8	29.2±2.6	28.4±2.2
6	32.3±1.7	33.2±2.1	28.9±3.1	29.9±2.7	29.7±2.8
7	32.0±2.5	32.5±2.2	30.4±3.2	30.6±3.4	29.5±2.4
8	33.5±2.6	32.3±3.5	30.8±2.6	30.7±2.8	31.1±3.0

小鼠的体质量增长情况是反应生长发育的一个重要指标,每周测定一次小鼠的体质量。如表1所示,各实验组小鼠在实验初期的平均体质量基本相同,组间无显著差异($P>0.05$)。通过灌胃白藜芦醇后,对各组、各时间点小鼠体质量变化方差分析结果显示:各组间小鼠体质量无显著性差别($P>0.05$),组别与时间点无交互作用,说明白藜芦醇对小鼠的生长发育无不良影响。给药1周后,小鼠体质量普遍下降的原因可能是由于灌胃操作对食道黏膜有一定刺激,影响到小鼠的食欲,造成体质量下降,但经过一定的适应期,小鼠体质量又有所回升。

2.3 白藜芦醇对小鼠隐藏平台实验逃避潜伏期和游泳速度的影响



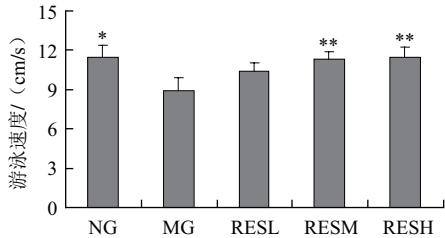
**与MG比较,有极显著性差异($P<0.01$)。

图1 Morris水迷宫的4 d隐藏平台获得性训练测试中,白藜芦醇对小鼠寻找平台潜伏期的影响

Fig.1 Dose-dependent effects of resveratrol on latency to find the platform during the 4-day hidden-platform acquisition training in Morris water maze in mice model

由图1可知,在4 d隐藏平台获得性训练测试中,模型组逃避潜伏期均明显长于正常对照组($P<0.01$);与模型组比较,白藜芦醇低、中、高剂量组从第2天开始逃避潜伏期明显缩短,至第4天作用最明显($P<0.01$),

并且作用随剂量增加而增强,说明白藜芦醇对D-半乳糖诱导的衰老小鼠的学习记忆能力具有改善和促进作用。



*与MG比较,有显著性差异($P<0.05$); **与MG比较,有极显著性差异($P<0.01$)。下同。

图2 Morris水迷宫的4 d隐藏平台获得性训练测试中,白藜芦醇对小鼠游泳速度的影响

Fig.2 Dose-dependent effect of resveratrol on swimming speed during the 4-day hidden-platform acquisition training in Morris water maze in mice model

如图2所示,4 d隐藏平台获得性训练测试中,白藜芦醇对小鼠游泳速度的影响。与模型组相比,正常对照组游泳速度明显加快($P<0.05$);白藜芦醇中剂量组和高剂量($P<0.01$)组也快于模型组。上述结果表明,随着白藜芦醇剂量的增大,游泳速度加快;说明白藜芦醇能增强D-半乳糖致衰老小鼠的体能和适应能力,提高小鼠的学习记忆能力。

2.4 白藜芦醇对小鼠空间探索实验的影响

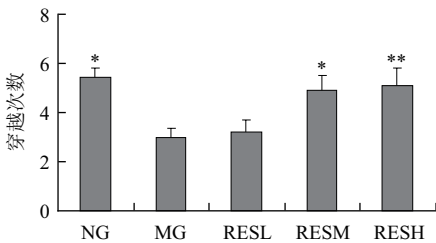


图3 Morris水迷宫的空间搜索测试中,白藜芦醇对小鼠穿越目标象限次数的影响

Fig.3 Dose-dependent effect of resveratrol on the number of times mice crossed the platform during spatial probe trial in MWM in mice model

第5天撤掉平台后,测试5组小鼠的空间探索能力。由图3可知,小鼠穿越目标象限次数存在组间差异。与模型组相比,对照组穿越次数显著增多($P<0.05$);3个白藜芦醇剂量组的小鼠在目标象限的穿越次数显著增多,尤其其中剂量组($P<0.05$)和高剂量组($P<0.01$),提示白藜芦醇对小鼠记忆能力的改善随着剂量增加而疗效有增强的趋势。

2.5 白藜芦醇对小鼠脑组织抗氧化指标的影响

由表2可知,与正常对照组相比,D-半乳糖诱导的衰老模型组小鼠脑组织中SOD活力显著下降($P<0.05$);T-AOC活力虽然有所降低,但无显著性($P>0.05$);

MDA含量显著增加 ($P<0.05$)。与模型组比较,白藜芦醇治疗组的SOD活力显著提高,尤其高剂量组 ($P<0.01$);白藜芦醇低、中、高剂量组的T-AOC活性显著提高 ($P<0.05$);白藜芦醇治疗组的MDA含量降低,尤其是高剂量组 ($P<0.01$)的MDA含量显著降低。以上结果说明白藜芦醇具有抑制脂质过氧化,延缓衰老的作用。

表2 白藜芦醇对小鼠脑组织中SOD、T-AOC活力和MDA含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	SOD活力/ (U/mg pro)	T-AOC活力/ (U/mg pro)	MDA含量/ (nmol/mg pro)
NG	228.79 \pm 34.38*	3.66 \pm 0.67	3.35 \pm 0.68*
MG	173.48 \pm 16.05	3.45 \pm 0.92	4.25 \pm 0.65
RESL	195.47 \pm 10.60*	4.32 \pm 0.48*	3.66 \pm 0.39*
RESM	191.90 \pm 13.08*	4.34 \pm 0.56*	3.37 \pm 0.43**
RESH	200.15 \pm 13.00**	4.41 \pm 0.63*	3.24 \pm 0.41**

3 讨论

D-半乳糖建立的衰老模型是目前国内较常应用的衰老和脑老化动物模型,其衰老反应接近于自然衰老。研究表明^[15],D-半乳糖造成的衰老模型可使实验动物出现认知功能障碍。本实验所采用的Morris水迷宫行为模型是英国心理学家Morris于20世纪80年代初设计并应用于脑学习记忆机制研究的一种实验方法,广泛应用于神经药理学、神经生理学、神经心理学、老年病学等的研究中。该装置通过实验动物游泳的方式,学习寻找隐藏在水中的平台,获得丰富的数据诸如穿越平台的次数、潜伏期、游泳速度等参数,从而评价实验动物的空间学习记忆能力^[16]。

本研究结果表明,各组小鼠逃避潜伏期随着游泳天数的增加而逐渐缩短,说明各组小鼠在4d游泳训练中对于寻找平台均有一定的学习记忆能力,但其学习记忆能力有很大差异。模型组大鼠Morris水迷宫潜伏期4d内下降很慢,游泳速度较慢,与正常对照组比较有统计学意义 ($P<0.05$),表明模型组小鼠学习记忆能力严重受损。通过白藜芦醇的干预,白藜芦醇的低、中、高剂量组小鼠较模型组小鼠逃避潜伏期缩短 ($P<0.01$),游泳速度加快 ($P<0.01$),穿越目标象限的次数增加 ($P<0.01$),表明白藜芦醇对D-半乳糖所致衰老模型小鼠的学习记忆障碍具有改善作用。

D-半乳糖致衰老小鼠模型中过量的氧自由基使细胞膜脂质受损,导致脑组织中清除自由基酶类SOD、T-AOC的活性下降及脂质过氧化产物MDA升高等^[17]。SOD是生物体内清除活性氧的抗氧化酶,它可清除自由基,减轻和阻断脂质过氧化,保护机体免受自由基的损伤,延续细胞的衰老^[18-19];T-AOC是反应机体防御

体系抗氧化能力强弱的重要指标之一^[20];MDA是过氧化脂质的分解产物,它产量的多少可表示过氧化程度的大小^[21-22]。本研究表明:D-半乳糖致衰老小鼠脑组织中SOD、T-AOC活性下降,MDA含量增加。分别给予25、50、100 mg/(kg·d)白藜芦醇灌胃后能使衰老模型小鼠脑组织SOD及T-AOC的活性不同程度升高,MDA含量下降。表明白藜芦醇能提高衰老小鼠脑组织清除自由基的能力,减少过氧化产物对脑组织的损伤,进而降低脑老化的程度,发挥其抗衰老作用。

综上所述,白藜芦醇具有明显的保护D-半乳糖所致小鼠衰老的作用,具有提高衰老小鼠的学习记忆能力,在抗衰老方面,有着可观的发展和开发前景。

参考文献:

- [1] 杨靖. 四君子汤对D-gal衰老模型小鼠抗自由基损伤及端粒酶活性影响的实验研究[D]. 沈阳: 辽宁中医学院, 2004.
- [2] JANG M, PEZZUTO J M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol[J]. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 1999, 25(2/3): 65-77.
- [3] CREASY L, COFFEE M. Phytoalexin production potential of grape berries[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1988, 113: 230-234.
- [4] UENOBE F, NAKAMURA S, MIYAZAWA M. Antimutagenic effect of resveratrol against Trp-P-1[J]. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1997, 373: 197-200.
- [5] 王冲, 华子春. 白藜芦醇的免疫调节作用研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 2012, 33(1): 84-87.
- [6] KAWADA N, SEKI S, MOUE M, et al. Effect of antioxidants resveratrol quercetin and N-acetylcysteine on the function of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells[J]. *Hepatology*, 1998, 27: 1265-1274.
- [7] GEHM B D. Grapes and wine, is agonist for the estrogen receptor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94: 14138-14143.
- [8] KOPP P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine, a possible explanation for the 'French Paradox'?[J]. *European Journal of Endocrinology*, 1998, 138(6): 619-620.
- [9] 张泽生, 贺伟, 刘甜甜, 等. 白藜芦醇的体外抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2012, 33(11): 266-268.
- [10] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 149.
- [11] 李爱平, 赵慧, 李韶. 不同鼠种在Morris水迷宫学习记忆行为中的种属差异[J]. *中国行为医学科学*, 2005, 14(1): 29-31.
- [12] ANISMAN H, MCLINTYRE D C. Conceptual, spatial, and cue learning in the Morris water maze in factor slow kindling rats: attention deficit comorbidity[J]. *Neuroscience Biobehavioural Reviews*, 2003, 27(7): 639-651.
- [13] BUCEARUSCE J J. Methods of behavior analysis in neuroscience [M]. New York: CRC Press LLC, 2001: 148-162.
- [14] 刘金凤, 聂坤, 栗振杰, 等. Morris水迷宫测评方法的改进及对快速老化痴呆小鼠SAMP8认知功能的再评[J]. *中国急症病症*, 2013, 22(1): 5-7.
- [15] 朱坤杰, 孙建宁. 六味地黄丸对D-半乳糖所致衰老大鼠学习记忆的改善作用及机理[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2006, 12(8): 44-46.
- [16] MORRIS R G M, GARRUD P, RAWLINS J N P, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions[J]. *Nature*, 1982, 297: 681-683.
- [17] 秦粉菊, 袁红霞, 邵爱华, 等. 纳米硒对衰老小鼠学习记忆的保护作用[J]. *中国老年学杂志*, 2008, 38(5): 512-513.
- [18] 杨兰泽, 王宜娟, 李三强, 等. 白藜芦醇的抗衰老作用[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(2): 628-629.
- [19] 董亮, 何永志, 王远亮, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2013, 15(5): 53-58.
- [20] 邓洋, 许秀举, 于海平. 啤酒对大鼠血清的LDH和T-AOC的影响[J]. *食品科技*, 2009, 34(5): 120-122.
- [21] 朱静, 周青青, 朱琳玲, 等. 白藜芦醇对高脂饲养小鼠脂肪组织氧化还原状态及血脂的影响[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(6): 832-837.
- [22] 张娣慧, 彭晓琳, 田翀, 等. 白藜芦醇对大鼠肾氧化损伤保护作用[J]. *中国公共卫生*, 2012, 28(4): 477-479.