

# 花椒多酚类化合物对衰老小鼠记忆障碍的改善作用

张锋<sup>1</sup>, 尤文挺<sup>2</sup>(1.舟山市普陀区人民医院, 浙江 舟山 316100; 2.温州医学院药学院, 浙江 温州 325035)

**摘要:** 目的 探讨花椒多酚类化合物总提取物(ZPPC)对D-半乳糖致衰老模型小鼠学习记忆能力及抗氧化能力的影响。方法 模型组, ZPPC低、中、高剂量组和阳性对照组皮下注射10%D-半乳糖6周建立衰老小鼠模型, ZPPC低、中、高剂量组同时灌胃给予ZPPC, 正常对照组和模型组给予等量的生理盐水, 阳性对照组同时灌胃给予维生素E。用Morris水迷宫实验检测小鼠的学习记忆能力, 同时检测小鼠脑组织超氧化物歧化酶(SOD)活力以及丙二醛(MDA)含量。结果 与正常对照组比较, 模型组小鼠学习记忆能力降低, 脑组织SOD活力下降, MDA含量增加, 均有统计学差异( $P<0.01$ )。灌胃给予高中低不同剂量的ZPPC后, 小鼠上述变化明显改善, 与模型组比较有统计学差异( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论 ZPPC可改善D-半乳糖衰老模型小鼠的学习记忆能力, 其作用机制可能与ZPPC具有抗氧化能力有关。

**关键词:** 花椒; 多酚类化合物; D-半乳糖; 学习记忆; 超氧化物歧化酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2011)05-0409-03

## Effect of Polyphenol Extract from *Zanthoxylum Bungeanum* Maxim. on Learning and Memory Abilities in Senile Mice Induced by D-Galactose

ZHANG Feng<sup>1</sup>, YOU Wenting<sup>2</sup>(1.The People's Hospital of Putuo District, Zhoushan 316100, China; 2. School of Pharmacy, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To observe the effects of polyphenol extract from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. (ZPPC) on learning and memory function and in senile model mice induced by D-galactose. **METHODS** The senile model mice were established by D-galactose hypodermic injection for 6 weeks and given ZPPC in therapeutic group and the same normal saline in the normal control group and model group at the same time. The mice of positive control group were given with vitamin E. The learning and memory ability of all mice were tested with Morris water maze. Then the mice were killed and biochemically assayed of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in the brain were detected. **RESULTS** Compared with normal control group, the learning and memory abilities in model group were lowered ( $P<0.01$ ), SOD activity in the brain decreased ( $P<0.01$ ) and the MDA content increased ( $P<0.01$ ). And after given ZPPC, all the abilities were significantly improved ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **CONCLUSION** ZPPC can improve the learning and memory abilities which may be related to the modulation of the anti-oxidative ability.

**KEY WORDS:** *Zanthoxylum bungeanum* maxim.; polyphenols; D-galactose; learning and memory; SOD

花椒为芸香科植物青椒(*Zanthoxylum schinifolium* Sieb. Et Zucc.)或花椒(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.)的干燥成熟果皮, 味辛, 性温, 小毒, 具有“温中止痛, 驱虫, 外用燥湿, 杀虫止痒”的功效<sup>[1]</sup>, 其主要化学成分有生物碱、酰胺、木脂素、香豆素、挥发油和脂肪酸等, 而花椒多酚类化合物抗抑郁作用的相关研究报道较少。多酚类化合物是广泛存在于植物界的一类具有多种生理功能的活性物质, 有较强的还原能力, 能够抑制脂质体过氧化, 有清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 自由基的活性<sup>[2]</sup>。本实验以D-半乳糖(D-gal)致衰老小鼠为模型, 观察花椒总多酚类化合物对D-gal衰老小鼠的学习记忆力的影响, 从而为临床预防老年痴呆

提供实验依据。

### 1 实验材料

#### 1.1 动物

ICR小鼠50只, ♂, 二级, 体重23~25g。购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物合格证号: SCXK(沪)2002-0010。饲养条件: 每笼5只, 温室( $23\pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 湿度( $50\pm 10$ )%, 自然光照, 自由摄食饮水。

#### 1.2 药品与试剂

花椒购自四川省雅安市汉源县九襄医药公司, 由温州医学院周桂芬研究员鉴定。粉碎, 丙酮-水溶液(7:3)浸提, 减压除去浸提液中丙酮, 然后过滤残留水液, 将滤液经醋酸乙酯萃取分离, 脱水干燥,

作者简介: 张锋, 男, 副主任药师 Tel: (0580)3030648 E-mail: zhangfeng4058@yahoo.com.cn

得到花椒多酚类化合物总提取物(ZPPC), 得率为 0.033%。ZPPC 为黄棕色粉末, 实验前用双蒸水配成所需浓度。

D-gal, 购自 Sigma 公司, 用生理盐水配成 10% 的浓度; SOD、MDA 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

### 1.3 仪器

UV-3100紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组

随机分为6组: 正常对照组, 模型组, ZPPC 低、中、高剂量组和阳性对照组, 每组10只。

### 2.2 模型制备

模型组, ZPPC 低、中、高剂量组和阳性对照组每日给小鼠颈背部皮下注射 10% D-gal  $0.25 \text{ mL} \cdot (20 \text{ g})^{-1}$ , 连续6周, 正常对照组注射等量的生理盐水。从第1天开始, ZPPC 低、中、高剂量组, 分别按为 50, 100, 200  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量灌胃进行实验干预, 模型组及正常对照组灌胃等量的生理盐水。阳性对照组灌胃 80  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的维生素 E。

### 2.3 学习记忆能力测试

采用改良的 Morris 水迷宫实验, 参考聂荣庆等<sup>[3]</sup>的方法, 水迷宫为圆形水槽, 直径 60 cm, 高 17 cm, 水深 11 cm, 测试过程中室温保持在 18~22 °C。在槽壁上等距离地标记 4 个点分别为 NESW, 这 4 个点作为实验起始点。在 NW 象限中间固定位置处放一透明玻璃平台, 高 9.5 cm, 直径 6 cm, 使其低于水面 1.5 cm。在水面覆盖一层大小相似, 直径约为 1.5 mm 的泡沫颗粒屑, 使平台不可见。水槽周围有丰富的固定不变的参照物(包括试验者本身), 以供小鼠定位。参考 Williams 等<sup>[4]</sup>的方法, 共训练 5 d, 分为每天上午及下午两个时段, 每个时段训练 4 次。训练开始将平台放在 NW 象限的固定位置处, 将小鼠从槽壁 4 个起始点分别放入水槽中, 记录从放入小鼠到小鼠找到平台的时间(逃避潜伏期, escape latency), 4 次训练分别从不同的起点放入小鼠, 小鼠找到平台后, 让小鼠在平台上休息 30 s, 再进行下一次训练。如小鼠 120 s 仍找不到平台, 则由实验者将小鼠放置于平台上, 逃避潜伏期记为 120 s, 也让小鼠在平台上休息 30 s。

### 2.4 脑SOD、MDA 检测

实验结束后取同一部位的脑组织150 mg, 吸干水渍后置入液氮保存。测定前称重, 剪取适量脑组织块, 研磨成 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 匀浆, 低温离心, 取上清液, 测定上清液中SOD、MDA 含量。SOD 测定采用羟胺法, MDA 测定采用TBA 法, 按试剂盒说明书进行操作。

### 2.5 统计学分析

数据均采用SPSS 13.0软件进行统计学处理, 结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 药物作用以 One-way ANOVA 方法分析, 组间差异采用 Dunnett's t-test,  $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 3 结果

### 3.1 ZPPC对衰老模型小鼠学习记忆的影响

模型组逃避潜伏期延长, 与正常组相比有统计学差异( $P < 0.01$ ), 灌胃给予ZPPC后, 逃避潜伏期缩短, 与模型组相比有统计学差异( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。这与阳性对照药维生素E改善模型组学习记忆的结果相似, 结果见表1。

表 1 ZPPC 对衰老模型小鼠学习记忆的影响( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Effects of ZPPC on learning and memory in senile model mice induced by D-gal( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	潜伏期/s
正常对照组	—	26.24±4.68
模型组	—	34.33±5.14 <sup>1)</sup>
ZPPC 低剂量组	50	33.07±4.92
ZPPC 中剂量组	100	28.95±5.13 <sup>2)</sup>
ZPPC 高剂量组	200	26.95±3.25 <sup>3)</sup>
阳性对照组	80	27.23±4.17 <sup>3)</sup>

注: 与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$   
Note: Compared with normal control group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$

### 3.2 ZPPC对衰老模型小鼠脑组织SOD 活性、MDA 含量的影响

模型组小鼠脑组织SOD 活性降低, MDA 含量升高, 与正常对照组比较有统计学差异( $P < 0.01$ ), ZPPC低中高剂量组组织中SOD 活性增加, MDA 含量下降, 与模型组比较有统计学差异( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。这与阳性对照药维生素E作用的结果相似, 结果见表2。

## 4 讨论

老年痴呆的发生发展与氧化应激有密切关系, 正常机体的活性氧生成和消除趋于平衡状态。若发生失衡则机体处于氧化应激状态, 而脑组织

表 2 ZPPC 对衰老模型小鼠脑组织 SOD 活性、MDA 含量的影响( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Effects of ZPPC on SOD and MDA in the brain tissues of senile model mice induced by D-gal( $n=10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	SOD	MDA
		活性/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	含量/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$
正常对照组	-	351.04 ± 15.44	37.32 ± 5.28
模型组	-	280.37 ± 17.71 <sup>1)</sup>	45.76 ± 5.00 <sup>1)</sup>
ZPPC 低剂量组	50	289.80 ± 21.61	43.32 ± 3.12
ZPPC 中剂量组	100	304.29 ± 14.97 <sup>2)</sup>	40.21 ± 3.80 <sup>2)</sup>
ZPPC 高剂量组	200	343.66 ± 17.69 <sup>3)</sup>	37.48 ± 4.45 <sup>3)</sup>
阳性对照组	80	346.43 ± 18.9 <sup>3)</sup>	36.98 ± 3.76 <sup>3)</sup>

注: 与正常对照组比较, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$   
 Note: Compared with normal control group, <sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; compared with model group, <sup>2)</sup> $P < 0.05$ , <sup>3)</sup> $P < 0.01$

由于其耗氧量大, 不饱和脂类含量高, 活性氧消除系统水平较低及活性氧产生的途径多于其他系统或器官, 因此大脑是氧自由基优先攻击的靶器官。氧自由基是物质代谢的有氧代谢产物, 它可以造成各种组织损伤, 自由基与抗自由基之间的不平衡是衰老的重要原因之一, 也是诱发老年痴呆神经病理过程的主要原因。D-gal在体内利用过程中, 可产生过量的自由基, 诱发动物的衰老, 引起痴呆样的行为及病理性改变, 导致细胞肿胀、代谢紊乱、体内活性氧水平升高、细胞膜脂质受损, 以至引起多器官系统功能的衰退<sup>[5]</sup>。本实验发现, 模型组小鼠脑组织SOD活性明显下降, MDA含量显著增加。SOD是清除氧自由基最有效的酶<sup>[6]</sup>, SOD活性高低及MDA含量多少可间接反映

体内自由基清除能力。

D-gal衰老模型小鼠灌胃ZPPC后, 学习记忆能力明显优于模型组小鼠, SOD活性升高, MDA含量减少, 表明ZPPC可减轻脂质过氧化反应、降低脂质过氧化物的含量、提高机体抗氧化能力和清除自由基能力, 这也可能是ZPPC提高D-gal衰老模型小鼠学习记忆能力、改善老年痴呆症状的作用机制之一。

## REFERENCES

- [1] LING Z Q, WEI J G, CHENG B H, et al. Preliminary research for the efficacy of pepper [J]. J Shanxi Coll Tradit Chin Med(山西中医学院学报), 2008, 31(4): 73-76.
- [2] LING Z Q, WAN J, HU M M, et al. Effects of polyphenol extract from *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. on active oxygen species and lipid peroxidation [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2009, 20(8): 1941-1943.
- [3] NIE R Q, ZHANG J, HU G Z, et al. Brain cell activity factor on the digestive elements of learning and memory ability [J]. Chin J Behav Med Sci(中国行为医学科学), 2002, 11(5): 488-489.
- [4] WILLIAMS M T, MORFORD L L, WOOD S L, et al. Developmental D-methamphetamine treatment selectively induces spatial navigation impairments in reference memory in the Morris water maze while sparing working memory[J]. Synapse, 2003, 48(3): 138-148.
- [5] LI W B, WEI F, FAN M, et al. Minetic brain aging effect induced by D-galactose in mice[J]. Chin J Pharmacol Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 1995, 9(2): 93-95.
- [6] CUI A, LI W B, ZHANG B L, et al. Studies on the relationship between cell senescence induced by D-galactose and injurious effects of free radical [J]. Basic Med Sci Clin(基础医学与临床), 2000, 20(1): 24-26.

收稿日期: 2010-10-25