

马齿苋水提物对阿尔茨海默病模型小鼠学习行为的干预作用

李晶¹, 张红英^{2*} (1.延吉市中医医院, 吉林 延吉 133002; 2.延边大学医学院, 吉林 延吉 133002)

摘要: 目的 观察马齿苋水提物对 AlCl₃ 诱发阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型小鼠学习行为及脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、乙酰胆碱酯酶(Acetyl cholinesterase, AchE)活性和丙二醛(MDA)浓度的影响。方法 小鼠随机分为 2 批 6 组, 正常组、模型组、吡拉西坦(3.0 g·kg⁻¹)组、马齿苋水提物(2.6, 1.3, 0.65 g·kg⁻¹)组。正常组口服生理盐水, AlCl₃ 200 mg·kg⁻¹ 给药制备 AD 小鼠模型。连续造模和口服给药 40 d。使用避暗仪和水迷宫仪, 检测马齿苋水提物对 AD 模型小鼠的学习行为的变化, 测定脑组织中 MDA 含量、SOD 和 AchE 活性。结果 不同浓度马齿苋水提物明显延长小鼠避暗潜伏期, 减少错误次数; 缩短小鼠水迷宫到达时间和减少错误次数; 明显升高脑组织 SOD 活性, 降低 AchE 活性和 MDA 含量。结论 马齿苋对 AD 模型小鼠学习行为具有明显的改善作用, 其作用可能与升高 SOD 活性, 降低 MDA 含量和 AchE 活性有关。

关键词: 马齿苋水提物; 阿尔茨海默病; 学习行为; 避暗法; 水迷宫法

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)08-0944-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.010

Intervention Effects of Water Extracts from *Portulaca Oleracea* L. on Learning Behavior of Alzheimer Model Mice

LI Jing¹, ZHANG Hongying^{2*} (1.Yanji TCM Hospital, Yanji 133002, China; 2.Medical College of Yanbian University, Yanji 133002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observed effects of water extract from *Portulaca oleracea* L. of learning behavior and SOD, Acetyl cholinesterase(AchE) activities, MDA content in brain tissue of Alzheimer's disease(AD) mice are caused by AlCl₃. **METHODS** The mice 6 of groups of 2 batches: control group, model group, piracetam(3.0 g·kg⁻¹) group and 3 groups of water extract from *Portulaca oleracea* L. (2.6, 1.3, 0.65 g·kg⁻¹). Normal control group PO saline. Copied AD mice models by PO AlCl₃ 200 mg·kg⁻¹ for 40 d. Observed the learning memory improvement of passive avoidance with darkness avoidance test and water maze test, and determined contents of MDA, activities of SOD and AchE in brain tissues of mice. **RESULTS** The different concentration water extract from *Portulaca oleracea* L. could significantly prolong latency and reduce for error frequency of mice, it could obviously short times of arriving water maze and reduce for error frequency of mice than model group. It could substantially improve SOD activity, reduce AchE contents and activity MDA in brain tissues of mice. **CONCLUSION** The water extracts from *Portulaca oleracea* L. have obvious improvement effects of learning memory in AD model mice, its mechanism may be related to improves SOD activity, to reduce MDA content and AchE activity.

KEY WORDS: water extract from *Portulaca oleracea* L.; AD; learning behavior; darkness avoidance test; water maze test

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD), 主要症状为进行性记忆力和认知力减退、言语障碍, 精神运动异常等症状^[1], 是严重威胁老年人生命健康的疾病之一。马齿苋(*Portulaca oleracea* L.)为马齿苋科植物马齿苋的全草, 其性味酸, 寒, 无毒^[2]。现代药理研究表明, 马齿苋富含去甲肾上腺素, 它能促进胰岛分泌胰岛素, 调节人体内的糖代谢, 具有降血脂、降低血糖浓度、抗菌消炎、增强免疫等作用^[3]。本实验给予小鼠大剂量氯化铝形成 AD 模型, 观察不同浓度马齿苋水提物对 AlCl₃ 诱发 AD 模型小鼠学习行为的影响, 并探讨其作用机制。

1 材料与仪器

1.1 动物

健康昆明种 SPF 小鼠, ♂, 体质量 24~26 g, 由延边大学实验动物中心提供, 动物许可证号为 SCXK(吉)2011-0007, 动物合格证号为 10-1022。

1.2 药材、药品与试剂

马齿苋(*Portulaca oleracea* L.)购于延边大学附属医院中药局, 经延边大学药学院天然药物化学教研室刘永镇教授鉴定; 吡拉西坦(东北制药总厂, 批号: 20120617); AlCl₃(天津市化学试剂三厂, 分析纯, 批号: 20085026); 丙二醛(MDA)、

作者简介: 李晶, 女, 硕士, 主治医师 Tel: 15943398012
E-mail: zhanghongying52@163.com

E-mail: 814496381@qq.com

*通信作者: 张红英, 女, 高级实验师 Tel:

超氧化物歧化酶(SOD)、乙酰胆碱酯酶(Acetyl cholinesterase, AchE)和蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20121012, 20121016, 20121018)。

1.3 仪器

LW-II 型自动记录水迷宫(北京中国医学科学院药物研究所); 2H-500 型小鼠避暗仪(安徽淮北正华生物仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 药物的制备

马齿苋粉碎后, 用常温双蒸水浸泡 1 h, 再分别用 10 倍、10 倍、8 倍双蒸水水煎煮沸提取 3 次, 每次时间分别为 2, 1, 1 h, 冷却后过滤合并提取液, 浓缩干燥成粉末, 用前配成所需浓度。

2.2 分组、AD 模型制备与给药

健康小鼠 120 只, 体质量 24~26 g, 在实验室适应环境 2 d, 按体质量随机分为 2 批 6 组, 正常组, 模型组, 吡拉西坦组(3.0 g·kg⁻¹), 马齿苋水提取物高、中、低剂量(2.6, 1.3, 0.65 g·kg⁻¹)组, 每组 10 只。每日上午制备 AD 模型, 除正常组口服等体积生理盐水外, 其他各组口服 AlCl₃ 200 mg·kg⁻¹ 进行造模, 每日 1 次, 连续 40 d 以复制 AD 模型^[4-5]。每日下午口服给药, 正常组和模型组口服等体积生理盐水, 每日 1 次连续口服给药 40 d。

2.3 行为学实验(避暗)^[6]

口服给药 39 d 后, 各组小鼠进行实验训练, 先把小鼠背对洞口放入明室, 暗室底部通 40 V 电压, 启动计时器, 实验训练 5 min。第 40 天进行正式实验, 先将暗室底部通 40 V 电压, 再将小鼠背对洞口放入明室, 同时启动计时器, 小鼠穿过洞口进入暗室受到电击即停止计时, 取出小鼠。记录每只小鼠从放入明室到进入暗室遇电击所需时间(潜伏期), 记录第 1 次进入暗室的潜伏期和 5 min 内进入暗室的次数(错误次数)作为记忆成绩。

2.4 行为学实验(水迷宫)^[7]

水迷宫仪为双层不透明有机玻璃槽, 内设起步区, 多盲端曲折回路。实验时水深为 10 cm, 水温始终保持在 22 °C 左右。第 39 天给药 1 h 后各组小鼠进行训练, 第 1 天训练时, 将小鼠放在梯子前, 使其自行爬上 3 次。第 2 天训练时, 将小鼠放在梯子附近, 使其自行爬上 1 次。第 3 天正式实验, 将小鼠面向赤壁在起始点放入水中, 记录

每只小鼠从放入水中至到达终点 2 min 内错误次数和游出时间, 2 min 没游出来的记为 2 min。

2.5 脑组织生化指标的检测

全部实验结束后, 用电子秤称量“2.4”行为学实验中每只小鼠体质量并作记录, 然后脱颈处死小鼠, 迅速分离取出脑组织, 准确称取脑组织, 按 1:9 比例加入冷生理盐水, 然后冰水浴研磨, 用冷生理盐水制成 10%脑组织匀浆液, 离心取上清液。严格按着试剂盒说明书要求分别测定 SOD、AchE 活性和 MAD 含量, 采用考马斯亮蓝法测定组织蛋白含量。最后用光度计测定各管吸光度, 计算出 SOD、AchE 的活性和 MAD 含量。

2.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 组间比较采用 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 AD 模型小鼠学习行为的影响

连续口服给药 AlCl₃ 40 d, 可导致小鼠避暗学习记忆行为障碍, 与正常组比较, 模型组小鼠进入暗室潜伏期明显缩短, 错误次数明显增加(*P*<0.05); 马齿苋水提取物(2.6, 1.3, 0.65 g·kg⁻¹)和吡拉西坦可对抗 AlCl₃ 所致小鼠学习记忆行为障碍, 使 AD 病模型小鼠进入暗室潜伏期延长明显, 错误次数减少明显(*P*<0.01)。结果见表 1。

表 1 马齿苋水提取物对 AD 模型小鼠学习行为的影响(*n*=10, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The effect of water extract from *Portulaca oleracea* L. on learning behavior of AD model mice(*n*=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	避暗法	
		潜伏期/s	错误次数/次
正常组	-	123.6±46.0	1.5±1.3
模型组	-	50.8±25.6 ¹⁾	3.7±3.0 ¹⁾
马齿苋水提取物			
高剂量组	2.6	153.2±32.3 ²⁾	1.1±0.4 ²⁾
中剂量组	1.3	147.8±36.3 ²⁾	1.2±0.7 ²⁾
低剂量组	0.65	183.8±36.4 ²⁾	1.2±0.9 ²⁾
吡拉西坦	3.0	149.7±28.1 ²⁾	1.3±1.2 ²⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾*P*<0.05; 与模型组比较, ²⁾*P*<0.01。

Note: Compared with control group, ¹⁾*P*<0.05; compared with model group, ²⁾*P*<0.01.

3.2 对 AD 模型小鼠学习行为的影响

连续口服给药 AlCl₃ 40 d, 可导致小鼠迷宫学习记忆行为障碍, 与正常组比较, 模型组小鼠水迷宫游出到达时间明显延长, 错误次数明显增加, 差异有统计学意义(*P*<0.01)。马齿苋水提取物(2.6,

1.3, 0.65 g·kg⁻¹)和吡拉西坦可对抗 AlCl₃ 所致小鼠学习记忆障碍,使 AD 模型小鼠进水迷宫游到到达时间缩短明显,错误次数明显减少,差异有统计学意义($P<0.01$)。结果见表 2。

表 2 马齿苋水提取物对 AD 模型小鼠学习行为的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The effect of water extract from *Portulacu oleracea* L. on learning behavior of AD model mice($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	水迷宫法	
		到达时间/s	错误次数/次
正常组	-	56.2±22.9	10.9±5.7
模型组	-	101.4±31.6 ¹⁾	24.4±6.5 ¹⁾
马齿苋水提取物			
高剂量组	2.6	53.7±31.3 ²⁾	11.2±9.1 ²⁾
中剂量组	1.3	52.3±16.5 ²⁾	12.4±6.4 ²⁾
低剂量组	0.65	51.3±13.5 ²⁾	13.3±5.4 ²⁾
吡拉西坦	3.0	50.1±13.6 ²⁾	14.5±6.1 ²⁾

注:与正常组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较,²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$.

3.3 对 AD 模型小鼠脑组织 SOD、AChE 活性及 MDA 含量的影响

连续口服给药 AlCl₃ 40 d, 可导致小鼠脑组织内 SOD 活性降低,使小鼠脑组织内 AChE 活性和 MDA 含量增加,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,马齿苋水提取物(2.6, 1.3, 0.65 g·kg⁻¹)和吡拉西坦可使 SOD 活性升高明显, AChE 活性和 MDA 含量明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。结果见表 3。

表 3 马齿苋水提取物对 AD 模型小鼠脑组织 SOD、AChE 活性及 MDA 含量的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 3 The effects of water extracts from *Portulacu oleracea* L. on SOD, AChE activity and MDA content in brain tissue of AD mice($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	SOD/ U·mgprot ⁻¹	AChE/ nmol·mg ⁻¹	MDA/ nmol·mgprot ⁻¹
正常组	-	15.83±5.32	1.03±0.23	1.59±2.10
模型组	-	9.51±3.12 ²⁾	2.13±0.99 ²⁾	2.39±0.25 ¹⁾
马齿苋水提取物				
高剂量组	2.6	16.12±3.51 ³⁾	0.80±0.17 ³⁾	0.80±0.20 ³⁾
中剂量组	1.3	16.17±4.06 ³⁾	0.90±0.20 ³⁾	0.81±0.19 ³⁾
低剂量组	0.65	15.03±3.12 ³⁾	0.91±0.21 ³⁾	0.82±0.20 ³⁾
吡拉西坦组	3.0	17.06±5.16 ³⁾	0.93±0.22 ³⁾	0.76±0.28 ³⁾

注:与正常组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较,³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with model group, ³⁾ $P<0.01$.

4 讨论

实验通过连续口服 AlCl₃ 造成慢性铝中毒的方法复制 AD 模型,来观察马齿苋水提取物对 AD 模型小鼠学习行为。选用避暗仪和水迷宫仪来测定小鼠学习记忆行为。在避暗实验中发现, AlCl₃ 可使避暗实验小鼠学习记忆行为下降,与模型组相比,马齿苋水提取物可使小鼠潜伏期明显延长,错误次数明显减少。水迷宫实验中, AlCl₃ 可使水迷宫实验小鼠学习记忆行为出现障碍,与模型组相比,马齿苋水提取物可使小鼠到达时间明显缩短,错误次数明显减少。说明,马齿苋水提取物很好的拮抗 AD 模型小鼠学习记忆行为。

近年来自由基学说与 AD 的关系越来越引起学者的关注,被认为是 AD 的一个重要治病因素,而且大量实验也证明抗氧化剂对 AD 的发病有保护和延缓进程的作用^[8]。其中 SOD 和 MDA 与其有着密切的联系。SOD 活性高低间接反映机体清除氧自由基的能力^[9],而 MDA 含量反映细胞受自由基损伤程度。马齿苋水提取物显著提高 AD 模型小鼠脑组织 SOD 活性,降低 MDA 含量,表明马齿苋水提取物可能直接或间接清除 AlCl₃ 引起的自由基增多所造成的损害,避免抗氧化物质消耗导致的脑组织损伤。马齿苋水提取物具有一定清除氧自由基能力和抗氧化作用。

AD 发展变化与学习记忆功能有关,参与和影响学习记忆功能最重要的是中枢胆碱能系统。乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)是中枢胆碱能通路的重要神经递质。当海马与大脑皮质细胞减少时,脑内的 ACh 水平下降,学习记忆能力下降^[10],通过测定脑内 AChE 的活性可判断 ACh 含量的变化,而 AChE 是脑内与学习记忆相关的重要酶类之一,可分解突触间隙的神经递质 ACh, AChE 活性增加会导致脑内学习记忆活动障碍^[11]。本实验结果显示,模型组小鼠脑组织中 AChE 活性明显增加,马齿苋水提取物可显著降低 AChE 活性,相对提高脑组织中 ACh 的含量来增强学习记忆功能,说明马齿苋水提取物有很好的抗氧化能力。

以上结果表明,马齿苋水提取物具有改善 AD 模型学习记忆行为的作用,马齿苋水提取物与吡拉西坦作用相似,其作用机制可能与 SOD 活性提高,MDA 含量降低,机体抗氧化能力增强,清除了体内产生过量的自由基,降低 AChE 活性,维持脑内 ACh 的含量有一定关系。

REFERENCES

- [1] HAN H H, MA J Y. Effect of isoflavone extract from *Cicer Arietinum* on learning memory abilities and expressions of TNF- α and IL-6 in hippocampus of Alzheimer's disease model rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2014, 31(6): 689-692.
- [2] 江苏新医学院编. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社. 2003: 299.
- [3] 冯长根, 赵军, 刘霞. 马齿苋治疗心血管疾病的研究进展[J]. *中药材*, 2004, 27(12): 955-958.
- [4] ZHAO L, HE M, WEI M J. Effects of tetramethylpyrazine on learning and memory in aluminium trichloride induced Alzheimer's disease mice [J]. *Chin J Behav Med Sci*(中国行为医学科学), 2008, 17(10): 878-880.
- [5] DAI X L, MA Y K. Effects of curcumin on Alzheimer's disease in a rat model induced by $AlCl_3$ [J]. *Food Drug*(食品与药品), 2011, 13(7): 257-259.
- [6] ZHANG H J, ZHANG H Y, WANG Y. Effects of n-butanol extracts from *Portulaca oleracea* on the learning and memory performances of senile mice induced by D-Gal [J]. *Food Sci*(食品科学), 2011, 32(3): 204-207.
- [7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2003, 828.
- [8] YI H. Protective effects of *Panax notoginseng* extracts on Alzheimer's disease model mice [J]. *J China Pharm*(中国药房), 2011, 22(39): 3667-3668.
- [9] YANG B. Effects of compound rehmannia on learning and memory abilities in senile dementia mice induced by D-galactose [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(3): 195-197.
- [10] XIAO Y, WU C X, HUANG Y, et al. Effect of Nao Tong compound preparation on learning, memory and ChE activity in hippocampus tissue of vascular dementia rats [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2010, 30(8): 627-630.
- [11] 赵爽, 张胜昌, 王淑秋. 灵芝孢子粉对戊四氮慢性点燃大鼠学习记忆及胆碱乙酰转移酶、乙酰胆碱酯酶活性的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 1(33): 354-356.

收稿日期: 2015-01-29

响应面法优化超声波提取昆仑雪菊总黄酮的工艺研究

黄涵, 曾令杰*, 莫运才, 冯鸿耀, 廖素溪, 郭玉梅, 李振桦(广东药学院, 广州 510006)

摘要: 目的 优化昆仑雪菊的超声提取工艺。方法 以总黄酮提取量为指标, 在单因素试验基础上, 通过 Box-Behnken 响应面法考察乙醇体积分数、料液比、超声时间和温度对总黄酮提取效果的影响。结果 最佳超声提取工艺为乙醇体积分数 65%, 料液比 40 g·mL⁻¹, 超声时间 34 min, 超声温度 62 °C; 总黄酮提取量为 207.32 mg·g⁻¹(RSD=1.45%), 与预测值(208.81 mg·g⁻¹)的偏差较小。结论 优选的提取工艺可行, 为昆仑雪菊的开发应用提供实验依据。

关键词: 昆仑雪菊; 总黄酮; 超声波提取; 单因素试验; Box-Behnken 响应面

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)08-0947-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.011

Optimization of Ultrasonic Extraction of Total Flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt. Using Response Surface Methodology

HUANG Han, ZENG Lingjie*, MO Yuncai, FENG Hongyao, LIAO Suxi, GUO Yumei, LI Zhenhua(*Guangdong Pharmacy University, Guangzhou 510006, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize ultrasound extraction technology of total flavonoids from *Coreopsis tinctoria* Nutt.. **METHODS** With the content of total flavonoids as index, effects of ethanol concentration, solid-liquid ratio, ultrasonic time and temperature on extraction technology were investigated by single factor tests and Box-Behnken response surface methodology. **RESULTS** Optimum ultrasound extraction technology was as following: ultrasonic extracted 34 min with 40 times of 65% ethanol to the herb at 62 °C. Under these conditions, the average extraction rate of flavonoids was 207.32 mg·g⁻¹(RSD=1.45%), which was very close to the predicted value of 208.81 mg·g⁻¹. **CONCLUSION** This optimized technology is stable and feasible to provide a basis for development and application of total flavonoids in *Coreopsis tinctoria* Nutt..

KEY WORDS: *Coreopsis tinctoria* Nutt.; total flavonoids; ultrasonic extraction; single factor test; Box-Behnken response surface methodology

作者简介: 黄涵, 男, 硕士生 Tel: (020)39352176 E-mail: huanghandd@163.com

E-mail: huanghandd@163.com

*通信作者: 曾令杰, 男, 博士, 教授

Tel:

(020)39352176 E-mail: zlj334477@aliyun.com