

人参皂甙预防 SAMP8 小鼠空间参考记忆减退的作用和机制实验研究

赵海峰^{1,2}, 李琼¹, 裴新荣¹, 张召锋¹, 王军波¹, 李勇¹

1. 北京大学公共卫生学院营养与食品卫生学系, 北京 100191
2. 山西医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室, 太原 030001

摘要 为探讨人参皂甙预防 SAMP8 小鼠空间参考记忆减退的作用和机制, 本研究选用 SPF 级 4 月龄雄性 SAMP8 小鼠, 将小鼠随机分为快速老化对照组和人参皂甙低、中、高 3 个剂量干预组, 每组 17 只。人参皂甙 3 个剂量分别为 50, 100, 200 mg/(kg·d), 随饮水摄入, 共干预 7 个月。另外, 设同月龄的 SAMR1 小鼠作为正常老化对照组。干预结束后, 利用 Morris 水迷宫实验检测空间记忆参考能力。记忆检测时, 加设 4 月龄 SAMP8 小鼠作为青年对照组。行为学检测完毕后, 测定各组动物血清 T-SOD、MDA 及 GSH-Px 含量、小鼠海马神经元超微结构的改变以及海马组织中 $A\beta_{1-42}$ 的表达。结果显示, 人参皂甙 100, 200 mg/kg 可以预防老年 SAMP8 小鼠空间参考记忆的减退, 其增加小鼠体内的抗氧化水平、减轻海马神经元的氧化损伤以及减少 $A\beta_{1-42}$ 在海马组织中的沉积是改善记忆的重要机制。

关键词 人参皂甙; SAMP8 小鼠; 空间参考记忆; 氧化应激

中图分类号 R332 文献标识码 A 文章编号 1000-7857(2009)17-0052-05

The Prevention the Memory Loss Through Long-term Ginsenoside Consumption in Aged SAMP8 Mice by Decreasing Oxidative Stress

ZHAO Haifeng^{1,2}, LI Qiong¹, PEI Xinrong¹,
ZHANG Zhaofeng¹, WANG JunBo¹, LI Yong¹

1. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China
2. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract To investigate the preventive effect of ginsenoside on the spatial reference memory impairment in Senescence Accelerated Mouse Prone 8 (SAMP8) and the mechanisms, in the present study, SAMP8 mice aged 4 months were chronically treated with ginsenoside (given in drinking water: in 3 dose groups and for 7 months). The 3 dose groups were administered with ginsenoside of

50, 100 and 200 mg/kg per day, respectively. Placebo-treated aged mice and young mice (4 months old) were used as controls. In addition, Senescence Accelerated Mouse Resistant 1 (SAMR1) mice were used as "normal aging" control. The beneficial role of ginsenoside was manifested in the prevention of spatial reference memory loss in aged SAMP8 mice. The optimal dose of ginsenoside is 100 or 200 mg/kg per day. In ginsenoside treated groups, the antioxidase level in serum is significantly increased. However, the neurons damage level of the ultrastructure and the $A\beta_{1-42}$ level markedly decreased in hippocampus. These findings suggest that the increase of antioxidation may be one of mechanisms of the memory loss prevention of ginsenoside in aged SAMP8 mice.

Keywords ginsenoside; SAMP8 mice; spatial reference memory; oxidative stress

进行性记忆力丧失是阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 的最主要的表现, 并可累及语言功能直至完全失去生活自理能力而死于多种并发症。在西方国家, AD 已成为继心血管疾病、恶性肿瘤和脑卒中之后的第 4 位死因, 而中国 AD 患者的数量已经达到 600 万左右。因此, AD 相关的老年记忆障

收稿日期: 2009-08-06
基金项目: 国家“十一五”科技支撑项目 (2006BAD27B08)
作者简介: 赵海峰 (中国科协所属全国学会个人会员登记号: M102700166M), 副教授, 研究方向为营养与疾病, 电子信箱: haifengzhaolxm@yahoo.com.cn;
李勇 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: M100102956M), 教授, 研究方向为营养与疾病, 分子营养, 分子与食品毒理学, 电子信箱: liyong@bjmu.edu.cn

碍已经成为严重危害人类健康的社会问题,给个人、家庭和社会带来沉重的精神和经济负担^[1-3]。然而,目前老年记忆障碍的解决办法主要是在AD发生以后,使用乙酰胆碱酯酶抑制剂如多奈哌齐(donepezil)等治疗。这类药物对于暂时缓解记忆障碍是有效的,但并不能预防或逆转潜在的神经功能衰退^[4]。近几年提出的基因治疗虽有一定进展,但一直存在很大争议。因此,通过诸如功能性食品等干预手段早期预防与AD相关的老年记忆障碍的发生,对提高老年人的生活质量以及实现健康老龄化均具有重要的科学、经济和社会意义。

快速老化小鼠(Senescence Accelerated Mouse,SAM)是一类显示早衰的近交系小鼠,包括易快速老化小鼠(Senescence Accelerated Prone Mouse,SAMP)和抗快速老化小鼠(Senescence Accelerated Resistant Mouse,SAMR)两种品系,是日本京都大学培育而成的。SAMP8是SAMP系中的一个亚系,寿命约12~13个月,4~6个月后,SAMP8小鼠迅速出现以学习记忆能力障碍为主要表现的老化特征,并呈现出增龄性加速衰退变化,表现为被动回避和空间学习记忆能力下降。此外,中枢神经系统如皮层、海马等部位会出现病理学改变。因此,SAMP8是研究衰老与学习记忆功能和学习记忆功能障碍发生机制和评价益智药物的良好动物模型,也为这些研究提供了实验动物保证^[7-9]。

人参属五加科植物,主要药用部位是根、茎、叶也可入药。早在中国第一部药物学专著《神农本草经》中就记载了当时人们对人参的养生和治病功用的认识:“主补五脏,安精神,定魂魄,止惊悸,明目,开心益智,久服轻身延年”。但关于其预防AD相关的老年记忆障碍的研究较少,并且机制还不清楚。随着人参中活性物质(人参皂甙)的有效分离和提纯,上述研究成为可能,这也是本研究的主要目的。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

人参皂甙购买于抚顺市兴京制药有限公司(批号:20060501),淡黄色粉末状。 $\text{A}\beta_{1-42}$ 多克隆抗体购自Abcam公司,蛋白提取和定量试剂购自北京博奥森生物技术有限公司。T-SOD、GSH-Px和MDA检测试剂盒购自南京建成生物制品工程研究所,其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 主要仪器

Morris水迷宫系统(中国医学科学院药物研究所),离心机(Eppendorf 5840R),XH2B型旋涡混匀器,UV-762型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),GeneAmp PCR-9700 PCR扩增仪(美国PE公司),蛋白质电转移装置(美国Bio-Rad公司),凝胶成像系统(日本复日公司)。

1.3 实验动物和分组

SPF级4月龄雄性SAMP8和SAMR1小鼠,由北京大学医学部实验动物中心提供。SPF级动物房饲养,饲养环境温度21~23℃,湿度50%~60%RH。动物随机分为快速老化对照组和人参皂甙50,100,200 mg/(kg·d)共3个剂量组,每组17

只,人参皂甙随饮水摄入。另外设月龄相同的SAMR1正常老化对照组和4月龄SAMP8青年小鼠。所有动物自由摄食。人参皂甙干预7个月后,利用Morris水迷宫实验检测小鼠的空间参考记忆,此外,为排除自主活动能力对记忆能力的影响,本研究利用旷场实验(open-field test)检测小鼠自主活动能力。

1.4 Morris水迷宫实验

人参皂甙干预结束后,利用改良Morris水迷宫实验^[10]检测小鼠的定位航行和空间探索记忆能力。在定位航行实验中,小鼠放于水池中(直径120 cm,高30 cm)保持水温在20~21℃,池中放置一个藏于水下1 cm透明平台(直径10 cm,高24 cm)。水池人为划分为4个象限,将小鼠面向池壁放入水中,小鼠找到平台后让其在平台上停留10 s;若在90 s内小鼠不能找到平台,也将其人为引导到平台上并置于平台上停留10 s,则此小鼠的成绩即为其最大成绩90 s。连续7 d均对小鼠重复该实验,每天实验过程中小鼠初始放置的象限不同,但平台的位置始终固定在同一个象限。在训练的实验过程中,记录每次实验中小鼠找到平台的潜伏期。实验第8天时,撤离平台,进行空间探索实验,将小鼠从平台所在象限的对侧象限放入池中,小鼠自由游泳60 s后结束实验,该实验中记录小鼠在目标象限(即平台所在的象限)停留的时间以及小鼠准确穿越平台所在位置的次数。

1.5 旷场实验

木制箱尺寸(长×宽×高)为42 cm×42 cm×36 cm,内衬黑色垫纸,底部为白色,并画有5×5正方形格。将小鼠放入中央格,记录5 min内小鼠的跨格数、进入中央格的次数、外周格停留时间、直立次数以及粪粒数。

1.6 血清抗氧化水平和海马神经元超微结构测定

使用化学比色法测定血清中T-SOD、GSH-Px水平以及MDA含量,用透射电镜检测海马神经元的超微结构。

1.7 Western blot方法检测海马 $\text{A}\beta_{1-42}$ 蛋白表达

提取各组小鼠海马组织的蛋白,BCA法测定蛋白含量。进行电泳、转膜和免疫印迹,按ECL检测试剂盒进行显色、曝光、照相,Band Lead图像分析系统进行条带分析。抗体1:500稀释。

1.8 数据统计分析

行为学实验结果以 $\bar{X} \pm \text{sem}$ 表示,其他数据用 $\bar{X} \pm \text{sd}$ 表示,用SPSS 13.0进行数据统计分析。Morris水迷宫定位航行实验中的潜伏期利用重复测量的方差分析进行统计。Morris水迷宫空间探索实验中,小鼠在目标象限的停留时间,穿越平台区的次数,旷场实验的相关指标,以及SOD、MDA和GSH-Px的比较利用单因素方差分析法。两组间比较按照方差是否齐同而采用LSD或Dunnnett's T3方法进行,以 $P < 0.05$ 为统计检验的显著性界值。

2 结果

2.1 人参皂甙对小鼠自主活动能力的影响——旷场实验

除青年对照组的站立次数、跨格数较其他各组高以外,其余各组之间的各个指标均无差异(表1)。

表 1 各组小鼠自主活动能力比较

Table 1 The effect of ginsenoside on locomotor activity of aged SAMP8 mice in open field test

组别	站立次数	进入中央格次数	跨格数	外周停留时间/s
Gin-50 mg/kg	18.20±6.43	11.75±4.35	130.20±41.92	259.45±16.39
Gin-100 mg/kg	26.10±5.13	12.20±4.93	153.65±31.79	238.55±24.48
Gin-200 mg/kg	18.70±8.72	10.60±5.11	141.70±51.30	238.50±31.75
SAMP8-age-control	21.00±8.70	11.40±5.79	143.30±32.29	227.35±40.60
SAMR1-control	19.80±8.64	15.70±3.85	138.60±32.16	199.00±30.22
SAMP8-young-control	37.65±7.13*	15.85±4.21	219.45±35.24*	239.05±25.36

注: *表示与老年对照组比较 $P<0.05$ 。

Note: * means $P<0.05$ as compared with aged control group.

2.2 对小鼠空间参考学习记忆的影响——Morris 水迷宫实验

2.2.1 定位航行实验

研究结果表明,人参皂甙干预可有效预防老年 SAMP8 小鼠的空间记忆的减退,并且表现出剂量依赖性。连续 7 天检测逃避潜伏期,每天进行 4 次实验。随着学习时间的延长,各组的潜伏期都表现出了降低趋势(时间主效应统计结果是: $F(6,576)=123.46, P<0.001$)。各组的潜伏期具有显著性差异,组别主效应统计结果为: $F(5,96)=85.19, P<0.001$ 。但时间和组别的交互作用没有统计学意义 ($F(30,576)=0.602, P>0.05$)。老年对照组的逃避潜伏期较青年对照组以及 SAMR1 小鼠的逃避潜伏期长 ($F(2,51)=171.49, P<0.001$)。而人参皂甙 3 个干预组的小鼠逃避潜伏期较老年 SAMP8 小鼠的潜伏期降低 ($F(3,64)=82.84, P<0.001$), 100 和 200 mg/kg·BW 两个干预剂量组的小鼠逃避潜伏期较老年 SAMP8 小鼠的潜伏期降低明显,差异具有显著性,干预后的两组和 SAMR1 小鼠的潜伏期差异没有统计学意义。50 mg/kg·BW 的干预组有降低的趋势,但差异没有统计学意义(图 1)。

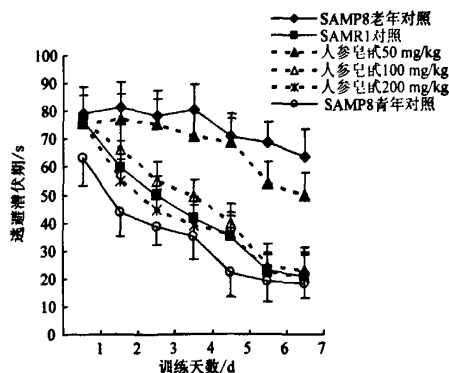


图 1 各组小鼠逃避潜伏期随时间的变化

Fig. 1 The effect of ginsenoside on the escape latency of aged SAMP8 mice in Morris water maze in a dose-dependent manner

2.2.2 空间探索实验

实验进行的第 8 天,撤离定位航行实验中的平台进行空

间探索实验。老年 SAMP8 小鼠在目的象限的停留时间较青年对照组以及 SAMR1 小鼠明显缩短,穿越平台所在的位置的次数较青年对照组也明显减少。而人参皂甙和 200 mg/kg·BW 干预的小鼠在目的象限的停留时间较老年 SAMP8 小鼠的时间明显延长 ($F=19.83, P<0.001$), 准确穿越原平台所在位置的次数明显增加 ($F=2.735, P<0.05$) (图 2)。

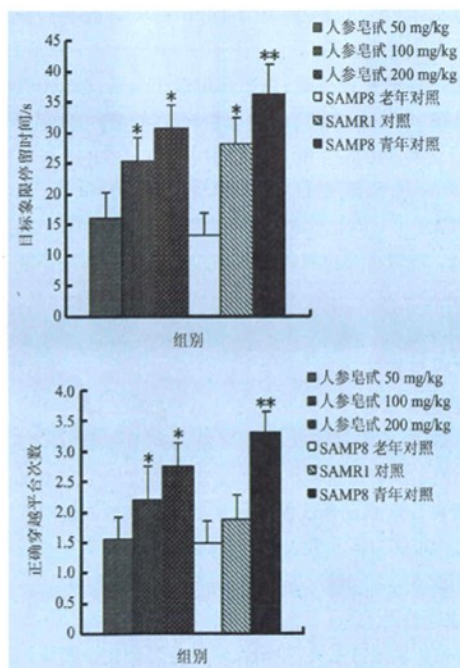


图 2 各组小鼠在目标象限停留的时间及穿越平台的数量

Fig. 2 The effect of ginsenoside increase on the time of mice spent in target quadrant and the number of platform crossing

注: *表示与老年 SAMP8 小鼠比较, $P<0.05$; **表示与青年 SAMP8 小鼠比较, $P<0.01$

Notes: * means compared to aged SAMP8 control, $P<0.05$;

** means compared to young SAMP8 control, $P<0.01$

2.3 对小鼠血清 T-SOD、MDA 和 GSH-Px 的影响

血清 T-SOD 和 GSH-Px 的活性以及 MDA 的水平常用来作为老年动物模型体内氧化和抗氧化水平的生物标致。老年对照组 SAMP8 小鼠体内 T-SOD 和 GSH-Px 活性较青年对照组以及 SAMR1 小鼠体内的活性降低,MDA 水平明显升高。人参皂甙干预后,老年小鼠体内的 GSH-Px 和 T-SOD 活性升高,而 MDA 的水平明显降低。与 SAMR1 小鼠相比,老年 SAMP8 小鼠血清 T-SOD 和 GSH-Px 的活性分别降低 44.37%

和 50.14%,而 MDA 的水平增加 27.49%。与青年对照小鼠相比,老年 SAMP8 小鼠血清 T-SOD 和 GSH-Px 的活性分别降低 44.48%和 101.01%,而 MDA 的水平增加 38.48%。人参皂甙 100 mg/kg·BW 干预组中,小鼠血清的 T-SOD 和 GSH-Px 较老年对照组增加了 94.19%和 73.40%,而 MDA 的水平降低约 20.77%。此外,人参皂甙 200 mg/kg 干预组中小鼠血清的 T-SOD 和 GSH-Px 较老年对照组增加了 79.09%和 64.32%,而 MDA 的水平降低了近 34.94%(表 2)。

表 2 人参皂甙对小鼠血清 T-SOD,GSH-Px 和 MDA 水平的影响

Table 2 The effect of ginsenoside on GSH-Px, T-SOD and MDA level in serum in aged SAMP8 mice

组别	T-SOD/(U·mL ⁻¹)	GSH-Px/U	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
Gin-50 mg/kg	245.52±36.87*	934.84±82.53*	18.42±1.97
Gin-100 mg/kg	275.70±55.24**	997.74±83.09*	17.05±1.97*
Gin-200 mg/kg	254.26±47.25*	945.48±97.66*	14.00±3.25**
SAMP8 老年对照组	141.97±33.63	575.39±70.01	21.52±4.67
SAMR1 对照组	255.23±79.14**	991.45±86.90*	16.88±1.23*
SAMP8 青年对照组	255.72±45.40*	1 154.03±86.53**	13.24±2.79**

注:与老年对照组比较,*为 P<0.05,**为 P<0.01,与青年对照组比较,*为 P<0.05,**为 P<0.01。

Notes: Compared to aged control, *P<0.05, **P<0.01, compared to young control, *P<0.05, **P<0.01.

2.4 海马神经元透射电镜的超微结构的观测

老年 SAMP8 小鼠海马神经细胞的超微结构发生了明显的改变。与青年对照组相比,老年 SAMP8 小鼠海马神经细胞内线粒体嵴断裂或空泡样变。细胞核缩小、不规则,染色质浓缩深染。而人参皂甙干预组海马神经元细胞线粒体及细胞核的变化明显改善,此外,在干预组中可见大量的神经髓鞘,有利于神经信息的传递。

图 3 所示为小鼠海马 CA1 区的超微结构改变的典型变化。放大倍数为 8 000 倍。图中箭头所指的变化如下:图 3(a)为老年 SAMP8 对照组中线粒体的断裂或缺失;图 3(b)为细胞核体积缩小,形状变的不规则状,染色质浓缩深染等;图 3(c)、(d)为人参皂甙 100 mg/kg·BW 干预组的球形的细胞核和丰富的神经髓鞘;图 3(e)、(f)为 SAMR1 小鼠海马组织中完整的球形细胞核和丰富的神经髓鞘;图 3(g)、(h)为 SAMP8 青年对照组完整的超微结构图。

2.5 减少了小鼠海马组织中 Aβ₁₋₄₂ 表达

老年 SAMP8 小鼠海马的 Aβ₁₋₄₂ 蛋白表达量较青年对照组及 SAMR1 对照组分别增加了 97%(P<0.01) 和 27%(P<0.05)。然而,在人参皂甙 100 和 200 mg/kg·BW 两个干预组中,Aβ₁₋₄₂ 蛋白表达量较老年对照组分别减少了 16.33%和 25.6%。人参皂甙 50 mg/kg 干预组中该蛋白在海马中的表达量与老年对照组差异无统计学意义(图 4)。

3 讨论

正常情况下,机体会产生少量自由基,但它们迅速被抗

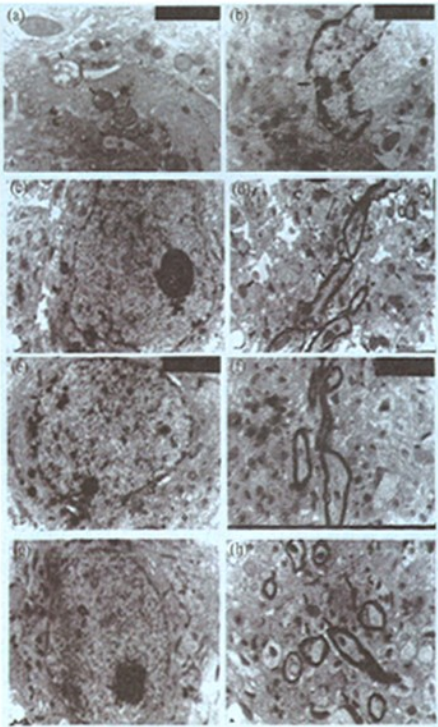


图 3 海马 CA1 区神经元超微结构的改变

Fig. 3 The effect of ginsenoside on the damage level of the neuron ultrastructure in hippocampus

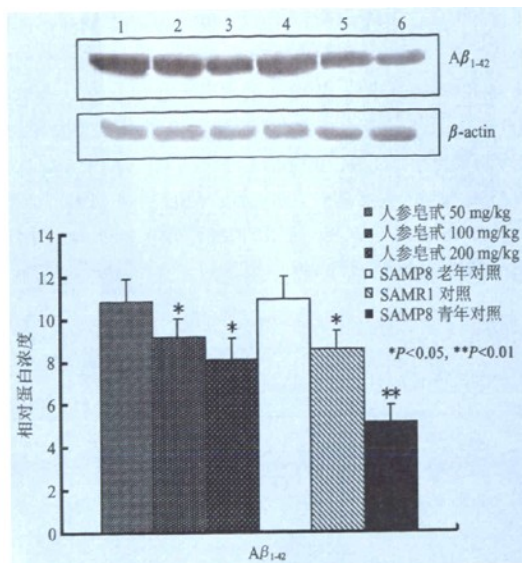


图4 海马组织中Aβ₁₋₄₂的表达

Fig. 4 The effect of ginsenoside on the expression of Aβ₁₋₄₂ in hippocampus in aged SAMP8 mice

氧化酶系统所破坏。随着年龄的增长,机体内物质代谢发生变化,酶活性改变从而使自由基产生过多或清除能力下降,对机能造成损害。实验研究发现,老年鼠在衰老过程中,由于自由基的作用而导致海马神经元死亡,而海马是动物学习记忆的重要神经解剖学结构,故导致学习记忆能力下降^[11-12]。

Aβ₁₋₄₂具有强的氧化作用,Aβ₁₋₄₂的强氧化作用又可引起线粒体膜电位降低,并且有PTP(Permeability Transition Pore)的形成,致使一系列凋亡启动因子的释放,进而出现细胞核染色体凝聚、DNA断裂等形态学改变。线粒体受损会产生氧化应激,而氧化应激又加剧了线粒体的损害作用^[13]。

已有文献报道,大鼠膳食中补充人参粉能有效减少ROS的产生、促进内源性抗氧化酶的生成,减少衰老导致的蛋白氧化以及脂质的过氧化^[14]。本研究发现,人參皂甙可以通过增强机体内的抗氧化酶的活性、减少氧化产物的形成以及Aβ₁₋₄₂在海马组织中的沉积、减少海马神经元的超微结构的改变而预防老年SAMP8小鼠的空间参考记忆的减退。

当然,记忆的机制相当复杂,如神经营养的改变、突触形态和功能的改变、中枢神经递质及受体的改变、钙离子浓度的改变、细胞凋亡及相关基因表达的改变、信号转导的改变如PKC-Ng-CaMKII途径、cAMP/PKA-CREB途径、NO/cGMP信号转导系统的改变等,这些机制仍需进一步研究。

4 结论

本实验中剂量为100,200 mg/kg的人参皂甙可以预防老年SAMP8小鼠的空间参考记忆的减退,其增加小鼠体内的抗氧化水平、减轻海马神经元的氧化损伤以及减少Aβ₁₋₄₂在海马组织中的沉积是改善记忆的重要机制。

参考文献 (References)

- [1] 裴新荣, 杨睿悦, 赵海峰, 等. 海洋胶原肽改善老年记忆作用的试验研究[J]. 科技导报, 2009, 27(16): 26-31.
Pei Xinrong, Yang Ruiyue, Zhao Haifeng, et al. Science & Technology Review, 2009, 27(16): 26-31.
- [2] Small S A. Age-related memory decline: current concepts and future directions[J]. Arch Neurol, 2001, 58: 360-364.
- [3] 全国老龄办公室. 中国人口老龄化发展趋势预测报告[R]. 北京, 2004.
China National Committee on Ageing. The report of developmental trend on China's population aging[R]. Beijing, 2004.
- [4] Harman D. Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging [J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 5: 454-460.
- [5] Zawia N H, Basha M R. Environmental risk factors and the developmental basis for Alzheimer's disease [J]. Rev Neurosci, 2005, 16 (4): 325-337.
- [6] Tohda C, Matsumoto N, Kun Z, et al. Aβ (25-35)-Induced memory impairment, axonal atrophy, and synaptic loss are ameliorated by M1, A metabolite of protopanaxadiol-type saponins[J]. Neuropsychopharmacology, 2004, 29(5): 860-868.
- [7] Butterfield D A, Poon H F. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): A model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease[J]. Experimental Gerontology, 2005, 40: 774-783.
- [8] Flood J F, Morley J E. Learning and memory in the SAMP8 mouse[J]. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 1998, 22: 1-20.
- [9] Nakayama T, Sawada T. Involvement of microtubule integrity in memory impairment caused by colchicines [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2002, 71: 119-138.
- [10] Chen G H, Wang Y J, Qin S, et al. Age-related spatial cognitive impairment is correlated with increase of synaptotagmin 1 in dorsal hippocampus in SAMP8 mice[J]. Neurobiology of Aging, 2007, 28: 611-618.
- [11] Alvarez-García O, Vega-Naredo I, Sierra V, et al. Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age [J]. Biogerontology, 2006, 7: 43-52.
- [12] Cho Y M, Bae S H, Choi, B K, et al. Differential expression of the liver proteome in senescence accelerated mice[J]. Proteomics, 2003, 3: 1883-1894.
- [13] 赵海峰, 肖荣. Alzheimer氏病基因突变及病理改变的研究进展[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(7): 880-882.
Zhao Haifeng, Xiao Rong. China Public Health, 2002, 18(7): 880-882.
- [14] Fu Y, Ji L. Chronic ginseng consumption attenuates age-associated oxidative stress in rats[J]. The Journal of Nutrition, 2003: 3603-3610.

(责任编辑 王芷)

欢迎向“学术聚焦”栏目推荐会议文集

《科技导报》“学术聚焦”栏目旨在围绕当前某一与科技相关的热点问题展开讨论,客观、简洁、集中地发表原创性科技成果或专家的创新言论。每期将从科学会议、学术沙龙的众多科研报告中精选10篇左右,从中提炼成一篇4500字左右的综述性文章,以反映研究者的重要研究成果和主要学术观点。欢迎科技会议、学术沙龙、学术论坛组织者及时提供会议论文集、主要报告材料。栏目责任编辑:陈广仁博士;投稿邮箱:chenguangren@cast.org.cn。