

# 人参皂甙改善老龄小鼠学习记忆的研究

李 栋, 侯海峰

(泰山医学院流行病学研究所, 泰安 271016)

**【摘要】目的** 探讨人参皂甙对自然衰老的 C57BL/6J 小鼠学习记忆的改善作用及其机制。**方法** 20 月龄的 C57BL/6J 小鼠 80 只, 随机分为老年对照组和 25、50、100 mg/(kg bw·d) 人参皂甙干预组, 另设 3 月龄青龄对照组 ( $n=20$ )。人参皂甙随饮水摄入, 共干预 6 个月。干预结束后应用 Morris 水迷宫试验检测小鼠的空间学习记忆能力; 并检测各组小鼠血清中超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性及 MDA 含量; Nissl 染色观察海马神经元数量的改变; Western blot 方法观察海马区脑源性神经营养因子 (BDNF) 的表达。**结果** 50、100 mg/(kg bw·d) 人参皂甙干预 6 个月后能明显提高小鼠的空间学习记忆能力; 血清中 SOD、GSH-Px 活性明显增强, MDA 含量显著下降; 海马 BDNF 蛋白的表达明显增强。25 mg/(kg bw·d) 人参皂甙干预后血清 GSH-Px 的活性显著提高。各组动物海马神经元数量无明显差别。**结论** 50、100 mg/(kg bw·d) 人参皂甙干预能够延缓老龄小鼠学习记忆功能的减退, 减轻机体氧化损伤, 增强海马区 BDNF 蛋白的表达可能是其重要的作用机制。[营养学报, 2009, 31 (6): 596—599, 603]

关键词: 人参皂甙; 学习记忆; 衰老; BDNF

中图分类号: R151.1

文献标识码: A

文章编号: 0512-7955 (2009) 06-0596-05

## GINSENOSE FACILITATES LEARNING AND MEMORY IN AGED MICE

LI Dong, HOU Hai-feng

(Institute of Epidemiology, Taishan Medical College, Taian 271016, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of ginsenoside on degeneration of learning and memory in aged mice and the mechanism. **Method** Eighty female C57BL/6J mice aged 20-mo were randomly divided into control group and three ginsenoside treatment groups at dosage of 25, 50, 100 mg/(kg bw·d) respectively by drinking. In addition, 20 female C57BL/6J mice aged 3 mo were used to be young control group. Eight mo later, the learning and memory abilities of the mice were checked by Morris water maze. Thereafter, the mice were killed by decapitation, and their serum was collected to determine the level of SOD, GSH-Px and MDA. Hippocampal morphology was examined by Nissl stain; and the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus was studied using Western blot method. **Results** 50, 100 mg/(kg bw·d) ginsenosides administration could significantly shorten the escape latency of the aged mice in Morris water maze. Furthermore, the alleviated oxidative stress and up-regulated expression of BDNF were observed in 50, 100 (mg/kg·d) ginsenosides groups compared with aged control group. Serum level of GSH-Px was higher in 25 (mg/kg bw·d) ginsenosides group compared to that of aged control group. The number of Nissl- positive cell had no significant difference between all groups. **Conclusion** 50, 100 mg/(kg bw·d) ginsenoside can significantly delay the degeneration of learning and memory in aged mice by lowering oxidative damage and up-regulating BDNF expression in hippocampus. [ACTA NUTRIMENTA SINICA, 2009, 31(6):596—599, 603]

**Key words:** ginsenosides; learning and memory; aging; BDNF

收稿日期 2009-03-09

作者简介 李栋 (1969—), 男, 硕士, 副教授, E-mail: dli@tsmc.edu.cn

人体在衰老过程中学习记忆功能会出现明显的减退。据报道,中老年人群中 50%左右主诉有记忆功能减退,客观记忆检查依据测验方法的不同记忆力异常率可达 32%~78%。记忆减退除了影响生活质量之外,也是老年神经退行性疾病(如痴呆、帕金森病等)的早期表现之一,给个人、家庭和社会带来沉重的经济和精神负担<sup>[1,2]</sup>。迄今尚缺乏行之有效的治疗脑退行性疾病的方法。因此,通过老年人群的营养、行为干预预防老年记忆障碍的发生,对改善老年人的记忆,提高生活质量,以及实现健康老龄化均具有重要的意义。

人参属五加科植物,是我国珍贵的药食同源植物,人参皂甙被认为是人参中发挥作用的主要活性物质,已有体外试验证实人参皂甙具有保护神经细胞,减少由 A $\beta$  造成的海马神经细胞轴突萎缩及细胞的丢失等作用,提示人参皂甙可能具有预防衰老性学习记忆下降的作用<sup>[3,4]</sup>。本研究选用 20 月龄的 C57BL/6J 小鼠作为研究对象,观察人参皂甙对老龄小鼠学习记忆的改善作用,并研究其可能的作用机制,为老年记忆减退的防治提供理论依据。

## 1 材料与 方法

### 1.1 试验动物

20 月龄 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠 80 只为老龄小鼠,3 月龄 SPF 级雌性小鼠 20 只为青龄小鼠,由北京维通利华公司提供,SPF 级动物房饲养,饲养环境温度 21℃~23℃,湿度 50%~60%。

### 1.2 主要试剂和仪器

人参总皂甙(纯度为 95%,惠州市仙草植物保健科技公司),SOD、GSH-Px、MDA 试剂盒(南京建成生物制品工程研究所),anti-actin 抗体、兔抗鼠 anti-BDNF 抗体(美国 Santa Cruz 公司),ECL 化学发光试剂盒(美国 Amersham 公司),其他试剂均为分析纯。

主要仪器为 Morris 水迷宫系统(中国医学科学院药物所),离心机(Eppendorf 5840R),XH2B 型旋涡混匀器,蛋白质电转移装置(美国 Bio-Rad 公司),垂直板蛋白电泳仪(北京六一仪器厂),凝胶成像系统(上海复日公司)等。

### 1.3 方法

1.3.1 动物分组及饲养:适应性饲养 3d 后将老

龄小鼠按体重分为老龄对照组和低、中、高三个人参皂甙干预组,每组 20 只。人参皂甙随饮水摄入,浓度分别为 25、50、100 mg/(kg bw·d),老龄对照组和青龄对照组喂普通高压消毒水,隔日换水 1 次,记录动物饮水量,所有动物自由饮水进食。干预 6 个月后进行学习记忆行为测试。

1.3.2 Morris 水迷宫试验:干预结束后采用 Morris 水迷宫试验检测小鼠的空间学习记忆能力,分为定位航行实验和空间探索实验两部分。定位航行实验中,将小鼠分别从 4 个入水点将动物面向桶壁放入水中,记录小鼠爬上平台所需时间即逃避潜伏期(escape latency),以及游泳速度和游泳距离,如果 90s 内未找到平台则将其引至平台并在平台停留 10s,逃避潜伏期记录为 90s,连续进行 6d,计算每天 4 次逃避潜伏期及速度和游泳距离的平均值作为当日最终成绩进行统计分析。D7 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,自由游泳 60s 后结束试验,记录小鼠在目标象限(即平台所在象限)的持续时间及穿越平台的次数。

1.3.3 海马神经元数量检测:行为学测试后,每组取 5 只小鼠用 1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,经左心室进行灌注固定。先快速灌注冷生理盐水至流出液变清亮,再以 4%多聚甲醛(4℃)灌注 30 min,取出脑,在 4℃的 4%多聚甲醛中继续固定 24 h。进行连续冰冻切片,厚度为 10  $\mu$ m,每只小鼠取 3 张切片,进行 Nissl 染色。光镜下对海马 CA1、CA3 和 DG 区 Nissl 染色阳性的细胞进行计数:每张切片取连续的 3 个视野,3 张切片的平均值为该样本的阳性细胞数。

1.3.4 血清超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性和丙二醛(MDA)含量的测定:行为学测试结束后,按试剂盒说明测定血清中 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量。

1.3.5 Western blot 检测海马组织中脑源性神经营养因子(BDNF)的表达:每组提取 8 只小鼠海马组织的蛋白,Lowry 法测定蛋白含量。进行电泳、转膜和免疫检测,按 ECL 免疫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。

### 1.4 统计分析

所有数据应用 SPSS 统计软件进行分析,结果

以  $\bar{x} \pm s$  表示, Morris 水迷宫试验中逃避潜伏期采用重复测量的两因素方差分析 (two-way repeated measures ANOVA), 其他指标进行单因素方差分析, 两组间比较采用最小显著差异法,  $P < 0.05$  为统计检验界值。

2 结果

2.1 人参皂甙对老龄小鼠空间记忆能力的影响 (图 1, 2)

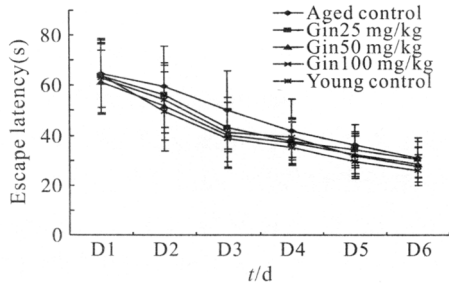
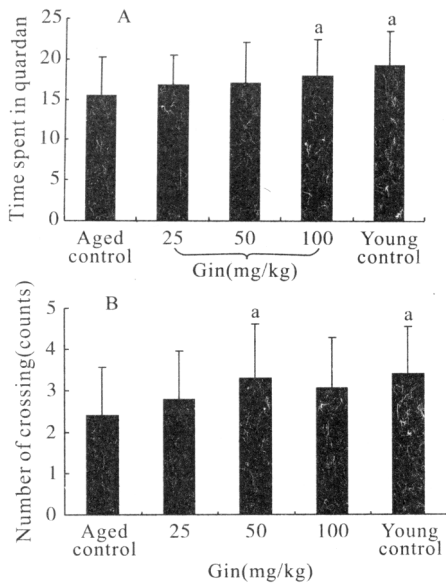


Fig.1 Effects of ginsenoside on escape latency of aged mice in Morris Water Maze



(A) the time spent in target quadrant on training days; (B) the number of crossing over the exact location of the former platform; a:  $P < 0.05$  compared with aged control  
Fig. 2 Spatial learning and memory in probe test of Morris water maze

由图 1 可见, 随着训练天数的增加, 各组动物找到平台的逃避潜伏期逐渐缩短,  $[F(5, 475) = 152.7, P < 0.01]$ , 时间与组间无交互作用,  $[F(20, 475) = 2.7, P > 0.05]$ , 各组间逃避潜伏期的差异有显著性,  $[F(4, 95) = 4.2, P < 0.01]$ , LSD 方法进行两两比较发现, 人参皂甙 50 和

100 mg/(kg bw·d) 两个干预组及青龄对照组的逃避潜伏期较老龄对照组明显缩短, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。

空间探索试验中, 与老龄对照组比, 100 mg/(kg bw·d) 人参皂甙干预 6 个月后, 小鼠在目标象限持续时间延长, 50 mg/(kg bw·d) 人参皂甙干预后穿越平台的次数增加, 有显著的统计学差异 (图 2)。

2.2 人参皂甙对海马神经元的影响 (表 1)

Table 1 Effect of ginsenoside on Nissl-positive cell numbers in hippocampal CA1, CA3 regions and DG ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

| Group            | Nissl-positive cells (numbers/0.1mm <sup>2</sup> ) |             |              |
|------------------|--|-------------|--------------|
|                  | CA1  | CA3         | DG           |
| Aged control     | 911.2±167.2  | 619.7±79.8  | 2138.6±119.5 |
| Gin-25 mg/kg bw  | 937.3±146.0  | 637.7±102.8 | 2196.2±155.0 |
| Gin-50 mg/kg bw  | 949.8±126.4  | 660.6±70.3  | 2173.8±123.1 |
| Gin-100 mg/kg bw | 921.3±137.9  | 676.7±70.9  | 2158.7±136.1 |
| Young control    | 955.6±102.5  | 745.6±135.4 | 2165.3±126.9 |

Nissl 氏染色显示, 青龄对照组锥体细胞排列整齐、密集, Nissl 氏体含量丰富。同青龄对照组相比, 老龄对照组排列相对较松散, Nissl 氏体减少, 人参皂甙干预后, 与青龄对照组无明显差异。与老龄对照组比, 青龄对照组和 3 个人参皂甙干预组海马 CA1、CA3 和 DG 区 Nissl 氏染色阳性细胞有不同程度增多, 但无统计学差异。

2.3 人参皂甙对小鼠抗氧化能力的影响 (表 2)

Table 2 Effects of ginsenoside on SOD, GSH-Px and MDA in serum ( $\bar{x} \pm s, n=15$ )

| Group           | SOD (U/mg protein)        | GSH-Px (U/mg protein)     | MDA (nmol/mg protein)   |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
|                 |                           |                           |                         |
| Aged control    | 94.65±22.42               | 383.59±46.67              | 17.93±3.89              |
| Gin-25 mg/kg bw | 123.68±24.58              | 623.23±55.02 <sup>a</sup> | 15.35±1.64              |
| Gin-50 mg/kg bw | 169.51±31.52 <sup>a</sup> | 665.16±55.39 <sup>a</sup> | 14.21±3.85 <sup>a</sup> |
| Gin-100mg/kg bw | 183.80±36.83 <sup>a</sup> | 636.32±65.11 <sup>a</sup> | 11.67±2.71 <sup>a</sup> |
| Young control   | 170.15±52.76 <sup>a</sup> | 769.35±57.69 <sup>a</sup> | 11.03±2.33 <sup>a</sup> |

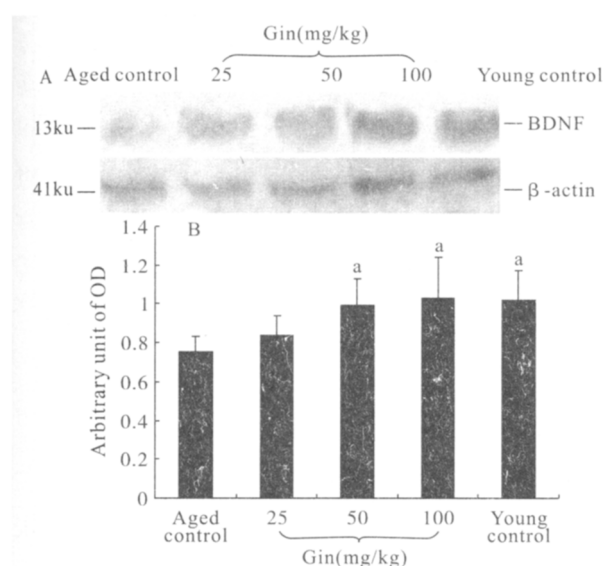
a:  $P < 0.05$  compared with aged control

结果表明, 老龄对照组血清 SOD 和 GSH-Px 活性低于青龄对照组, MDA 含量高于青龄对照组, 差异有显著性。人参皂甙 50、100 mg/(kg bw·d) 干预组的血清 SOD 及 GSH-Px 活性较老龄对照组小鼠明显的提高, 而 MDA 则明显降低。人参皂甙 50 mg/(kg bw·d) 干预组的血清 GSH-Px 活性较老龄对照组明显的增加。

2.4 人参皂甙对小鼠海马区 BDNF 蛋白表达的影响 (图 3)

采用 Western blot 方法对各组动物海马区

BDNF 蛋白的表达进行检测,结果发现同青龄对照组相比,老龄对照组的海马区 BDNF 蛋白的表达下降了 26%,两者有显著性差异。25 mg/(kg bw·d) 人参皂甙干预 6 个月后,老龄小鼠海马 BDNF 蛋白的表达升高了 10%,两者之间的差异无显著性。50 和 100 mg/(kg bw·d) 人参皂甙干预 6 个月后,老龄小鼠海马区 BDNF 蛋白的表达分别升高 23%和 27%,与老龄对照组比有显著性差异。



A: the band of Western blot; B: results of quantitative analysis;  
a:  $P < 0.05$  compared with aged control

**Fig. 3 Immunoblot analysis of BDNF in the hippocampus of the young, aged and MCP-treated mice**

### 3 讨论

衰老是一种正常而复杂的生物学过程。衰老过程中,机体出现各种功能下降及生理紊乱现象,学习记忆是脑的高级功能,伴随着机体的老化也会出现明显的减退<sup>[5]</sup>。目前由于衰老的机制尚未完全阐明,对衰老性记忆减退和一些老龄神经退行性疾病无有效的治疗方法,因此通过食物中添加有效成分进行早期干预,对预防或延缓老龄记忆能力衰退具有重要意义。

人参是我国名贵的中草药,应用于中医临床已有两千多龄的历史,有“百草药王”之称。早在《神农本草经》中就记载人参具有“开心益智”的功效,近龄来人参在抗衰老,促进学习记忆方面的功能引起人们广泛的关注。人参皂甙是人参中主要的活性物质,本研究利用老龄动物模型探讨了人参皂甙对学习记忆的作用,结果发现人参皂甙能显著提高老龄鼠的空间学习记忆能力,有一定的神经保护功能,可以预防认知功能衰退。

自由基的积累、抗氧化酶活性的降低、氧化应激损伤是衰老及衰老相关记忆减退的重要机制<sup>[6,7]</sup>。本试验结果表明,人参作为重要的天然抗氧化剂,能有效阻断自由基连锁反应,终止脂质过氧化过程,提高体内抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 的活性,降低脂质过氧化产物水平,减少了因自由基造成的神经细胞损伤以及由此带来的学习记忆能力的下降。这种抗氧化活性可能是其改善学习记忆的重要机制之一。

脑源性神经营养因子(BDNF)在中枢神经系统及周围神经系统的多种神经元均有表达,以海马和皮层含量最高。BDNF 被认为是记忆形成过程中的关键蛋白之一,可作用于突触前膜和突触后膜发挥生物学效应<sup>[8,9]</sup>,通过调节细胞内钙结合蛋白,稳定细胞内钙浓度,从而保护神经元<sup>[10,11]</sup>。

本试验结果发现,人参皂甙干预后同老龄对照组相比,海马区 BDNF 的表达显著增强,50 和 100 mg/kg bw·d 人参皂甙干预 6 个月后,老龄小鼠海马区 BDNF 蛋白的表达分别升高了 23%和 27%。提示促进 BDNF 蛋白的表达可能是人参皂甙改善老龄学习记忆的重要机制之一。

综上所述,人参皂甙具有明确的预防老龄性学习记忆能力下降的效用,这种作用可能是通过提高机体的抗氧化水平,减轻过氧化损伤,增强海马 BDNF 蛋白的表达来实现。当然,学习记忆下降的机制非常复杂,可能涉及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、突触可塑性的改变等,人参皂甙是否通过这些机制改善学习记忆仍需进一步研究。

### 【参考文献】

- [1] Small SA. Age-related memory decline: current concepts and future directions[J]. *Arch Neurol*, 2001, 58: 360-364.
- [2] 全国老龄办. 中国人口老龄化发展趋势预测报告 [R]. 2004.
- [3] Tohda C, Matsumoto N, Zou K, *et al.* A  $\beta$  (25-35)-induced memory impairment, axonal atrophy, and synaptic loss are ameliorated by M1, a metabolite of protopanaxadiol-type saponins [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2004, 29: 860-868.

(下转 603 页)

还原成 Fe (II), 其复合物中 Fe (III) 的溶出效果更好。同时, 黑木耳料渣均质后与 Fe (III) 整合制备的复合物多于黑木耳多糖的复合物, 表明黑木耳胶质与 Fe (III) 的整合效果与溶出效果均优于黑木耳多糖, 提示 AGIC 可以作为一类很有前途的营养口服补铁剂。由于黑木耳胶质组成与结构的特殊性, 我们在开发黑木耳铁复合物时, 不必只提取其中含量不高的可溶性多糖用于制备, 可以考虑黑木耳的全利用。由于活性多糖形成的铁复合物除考虑到溶解性、还原性和无铁离子存在等因素外, 还兼顾了铁释放后多糖的多种生物活性的利用, 关于 APIC 的吸收形式, 生物活性, 及黑木耳胶质与 Fe (III) 形成复合物的机制等, 尚需进一步研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] 李公斌. 黑木耳多糖分子修饰及功能与应用研究[D]. 中国期刊网, 东北林业大学博士学位论文. 2006, 6: 34—103.
- [2] Tao YZ, Zhang LN, Peter CK. Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched

mushroom polysaccharides[J]. *Carbohydr Res*, 2006, 341: 2261—2269.

- [3] 樊黎生. 黑木耳多糖 AAP-II a 级分的制备及其生物活性的研究[D]. 中国期刊网, 华中农业大学博士学位论文, 2006, 5: 20—126.
- [4] 李明静, 杨静, 王宁, 等. 怀山药多糖铁(III)的组成及性能表征[J]. 中国中药杂志, 2008, 33: 2002—2005.
- [5] 孟凡德, 刘学启, 李明霞, 等. 营养型口服补铁剂的研制及其生物利用度研究[J]. 营养学报, 2003, 25: 245—247.
- [6] Pitarresi G, Tripodo G, Cavallaro G, *et al.* Inulin-iron complexes: A potential treatment of iron deficiency anaemia[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 68: 267—276.
- [7] 张惠中. 口服补铁剂多糖铁复合物[J]. 中国药师, 2006, 9: 756.
- [8] Peter C-K Cheung. Dietary fibre content and composition of some edible fungi determined by two methods of analysis[J]. *J Sci Food Agric*, 1997, 73: 255—260.

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

(上接 599 页)

- [4] Park JH, Cha HY, Seo JJ. Anxiolytic-like effects of ginseng in the elevated plus-maze model: Comparison of red ginseng and sun ginseng[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2005, 29: 895—900.
- [5] Billard JM. Ageing, hippocampal synaptic activity and magnesium[J]. *Magnes Res*, 2006, 19: 199—215.
- [6] Yamada K, Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs[J]. *Pharmacol Ther*, 2000, 88: 93—113.
- [7] Kishida KT, Klann E. Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9:

233—244.

- [8] Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, *et al.* Trends in oxidative aging theories[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 15: 477—503.
- [9] Ying Fu, Li Li Ji. Chronic ginseng consumption attenuates age-associated oxidative stress in rats[J]. *J Nutr*, 2003, 133: 3603—3610.
- [10] Wong AA, RE Brown. Age-related changes in visual acuity, learning and memory in C57BL/6J and DBA/2J mice[J]. *Neurobiol Aging*, 2007, 28: 1577—1593.
- [11] Gomez-Palacio Schjetnan A, Escobar-Rodriguez ML. Memory coding and retention: brain-derived neurotrophic factor(BDNF) in synaptic plasticity[J]. *Rev Neurol*, 2007, 45: 409—417.

(续完)