

人参皂甙 Rb1 对大鼠慢性缺氧性认知功能障碍的治疗作用 *

刘慧琳 刘 涛 徐孝娜 王冰水 王 枫[△]

(第四军医大学营养与食品卫生学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:目前尚无特效的防治慢性缺氧性认知功能障碍措施,前人的研究提示人参皂甙 Rb1 可能有上述功效,故本实验拟研究人参皂甙 Rb1 对大鼠慢性缺氧性认知功能障碍的治疗作用及其可能机制。**方法:**取雄性成年 SD 大鼠 30 只,随机分为对照组、模型组、人参皂甙 Rb1 (2 mg/kg·d) 治疗组。采用 Morris 水迷宫行为学实验检测大鼠学习记忆功能,运用膜片钳技术在脑片水平检测海马的突出可塑性。**结果:**(1) 模型组大鼠寻找平台潜伏期较对照组显著延长 ($P < 0.05$),在目标象限的停留时间较对照组明显缩短 ($P < 0.05$),人参皂甙 Rb1 治疗后,大鼠寻找平台潜伏期较模型组缩短 ($P < 0.05$),在目标象限的停留时间较模型组延长 ($P < 0.05$);(2) 在高频强直刺激(HFS)作用下,各组均有长时程增强(LTP)现象,但模型组 LTP 较对照组明显减弱 ($P < 0.05$),人参皂甙 Rb1 治疗后 LTP 明显增强 ($P < 0.05$)。**结论:**人参皂甙 Rb1 减轻了慢性缺氧大鼠在水迷宫实验中的行为学改变,并增强了慢性缺氧大鼠海马 LTP,证实人参皂甙 Rb1 可明显减轻大鼠慢性缺氧性认知功能障碍,该作用与其减轻海马 LTP 抑制有关,为高原缺氧性认知功能障碍的防治提供了新思路,但其具体机制尚有待于进一步研究,本室将在此基础上进一步深入研究人参皂甙 Rb1 改善慢性缺氧性认知功能障碍的机制。

关键词:慢性缺氧;人参皂甙 Rb1;认知功能障碍

中图分类号: Q95-3 R742.1 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2013)22-4242-04

Ginsenoside Rb1 Attenuates Chronic Hypobaric Hypoxia-Induced Cognitive Deficits*

LIU Hui-lin, LIU Tao, XU Xiao-na, WANG Bing-shui, WANG Feng[△]

(Department of Nutrition and food hygiene, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: At present, no specific drug exists to prevent, delay, or cure Chronic Hypobaric Hypoxia-Induced Cognitive Deficits. In order to provide a new window into the Chronic Hypobaric Hypoxia-Induced Cognitive Deficits, the present study was designed to investigate the effects of Ginsenoside Rb1 on cognitive deficits induced by chronic hypobaric hypoxia. **Methods:** Thirty male SD rats (200-250 g) were randomly divided into three groups with 10 rats in each group: Control group, Model group and Ginsenoside Rb1 therapy group. Cognitive function was detected by the water maze task. Hippocampal LTP at brain slices was measured by electrophysiology method. **Results:** Chronic hypobaric hypoxia can cause severe cognitive deficits, and Ginsenoside Rb1 could improve the cognitive deficits induced by chronic hypobaric hypoxia. LTP inhibition in hippocampus caused by chronic hypobaric hypoxia were markedly attenuated by administration of Ginsenoside Rb1. **Conclusion:** Ginsenoside Rb1 exhibits therapeutic potential for cognitive deficits induced by chronic hypobaric hypoxia. One of the most important mechanisms is possibly that Ginsenoside Rb1 can protect LTP in hippocampus.

Key words: Hypobaric hypoxia; Ginsenoside Rb1; Cognitive deficits

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R742.1 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2013)22-4242-04

前言

随着现代科技的进步,人类在高海拔地区的活动越来越频繁,高原缺氧的生物学效应及其防治措施逐渐成为了广大科研工作者的研究热点。目前已明确,高原慢性缺氧对人体神经系统、循环系统、造血系统等各大系统均有显著影响,可诱发机体暂时甚至永久性的病理改变,引起多种疾病。众所周知,大脑以全身 2% 的体积消耗了全身 20% 氧气,故中枢神经系统对缺氧

最敏感,是慢性缺氧损害的主要靶器官之一。人体在高原慢性缺氧环境下可出现一过性甚至不可逆的记忆力减退、反应迟缓等,对此,目前尚无特效的防治措施^[1]。多年来,广大科研工作者一直致力于寻找一种安全而有效的防治措施或药物。人参皂甙是人参中的主要生物活性物质,在人参的众多皂甙成分中以 Rb1 含量高、活性强,具有抗氧化、抗凋亡等重要的生理作用^[2]。前人的研究结果提示人参皂甙可减轻颠叶癫痫所致的大鼠认知功能障碍^[3],但人参皂甙对慢性缺氧所致的认知功能障碍是否

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81102631)

作者简介:刘慧琳(1978-),女,硕士研究生,主治医师,主要从事认知功能障碍的临床与基础研究,电话:(029) 84775439, E-mail: jhlshd@163.com

△通讯作者:王枫, E-mail: wfsheids@163.com, 电话:(029) 84775121

(收稿日期:2012-12-22 接受日期:2013-01-17)

有治疗作用尚不明确。故本实验拟利用我校自行开发的低压氧仓模拟高原环境,复制大鼠慢性缺氧性认知功能障碍模型,运用行为学及膜片钳技术研究人参皂甙 Rb1 对大鼠慢性缺氧性认知功能障碍是否有治疗作用。

1 材料方法

1.1 材料及仪器

人参皂甙 Rb1 (购自西安宝信公司,纯度>95.0%) Axopatch-700B 放大器 (Molecular Devices Corporation, 美国), 红外相差显微镜 (Olympus, 日本), Master-8 脉冲发生器 (A.M.P.I., 以色列), 1440A 模数数模转换器 (Molecular Devices Corporation, 美国), 其余试剂为国产分析纯。

1.2 实验动物及分组

雄性健康 SD 大鼠 (来自解放军第四军医大学医学实验动物中心) 30 只, 体质量 200~250 g, 将动物随机分为三组。对照组 (Control group), 每日进缺氧舱饲养 8 小时, 但不降气压, 每日腹腔注射等量生理盐水; 模型组 (Model group), 按计划每日缺氧 8 小时, 每日腹腔注射等量生理盐水; 人参皂甙 Rb1 治疗组 (Ginsenoside Rb1 group), 按计划每日缺氧 8 小时, 从第一次缺氧前开始给药, 给予人参皂甙 Rb1, 腹腔注射 $2 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$, 1 次/日。缺氧 28 天后, 先进行 Morris 水迷宫行为训练及测试, 然后麻醉后断头处死并取海马组织, 进行电生理记录。

1.3 大鼠慢性缺氧性认知功能障碍模型的复制

参照文献 [4], 利用我校自行设计的缺氧舱复制大鼠慢性缺氧性认知功能障碍模型。缺氧舱长 80 cm, 内径 45 cm, 可通过舱门的玻璃窗了解舱内动物活动情况。舱顶有进气、出气口及压力表, 其中进气口装有可调节大小的进气阀, 出气口与真空泵相连, 舱内置可吸收二氧化碳的钠石灰。置鼠笼于低压氧舱中, 封闭舱门, 开启真空泵, 通过调节进气阀大小, 使气压缓慢下降, 气压降至 380 mmHg 后, 维持此压力 8 小时, 然后缓慢调大进气阀, 降低负压, 直至常压。

1.4 Morris 水迷宫行为测试

参照闫志强等人文献 [5-6], 缺氧 28 天后进行 Morris 水迷宫训练, 共 5 天, 每天训练 2 次, 具体训练方法为: 分别从 4 个不同象限的中点将大鼠头朝池壁放入水池, 任其在水中自由游泳, 如大鼠在 60 s 内找到并爬上平台, 让其在平台上停留 30 s, 以强化记忆效果, 逃避潜伏期为实际寻找平台所用的时间, 如在 60 s 内大鼠未能找到平台, 则由实验者用工具将其引导至平台, 同样让大鼠在平台上停留 30 s, 以强化记忆效果, 同时以 60 s 为逃避潜伏期。上述运动轨迹被设在水池正上方的摄像记录系统实时记录。取每天训练所记逃避潜伏期的平均值作为当日的逃避潜伏期。②空间探索试验: 在开始训练前和训练 5 天结束后进行实验, 具体方法为: 撤除平台, 从原平台所在象限对侧象限的中点面朝池壁放入大鼠, 任其在水中自由游泳 120 s, 用设在水池正上方的摄像记录系统实时记录大鼠运动轨迹, 并计算大鼠在平台所在象限活动的时间。

1.5 海马脑片制备

异氟烷吸入麻醉后断头处死大鼠, 低温条件下快速取脑, 然后将其浸入冰浴人工脑脊液中, 该脑脊液已被预充氧气、二氧化碳混合气 (O_2 95%、 CO_2 5%) 达饱和状态, 其主要成份为

(mmol/L): glucose (11), NaCl (126), CaCl_2 (2.4), MgCl_2 (1.2), NaH_2PO_4 (1.2), KCl (2.5), NaHCO_3 (26) (用 NaOH 滴定 pH 至 7.35-7.45)。持续供氧并冰浴条件下, 利用震动切片机将鼠脑切为厚度 400 μm 的脑片, 取海马位置佳的脑片置于预充氧气、二氧化碳混合气的人工脑脊液中, 34°C 恒温条件下孵育 1 h, 以恢复脑片活性。孵育后, 小心将脑片移至记录浴槽, 浴槽中持续灌流氧饱和的人工脑脊液 (2 ml/min), 以维持脑片活性。

1.6 海马 CA1 区长时程增强 (LTP) 记录

记录电极内液为 NaCl 溶液 (3 mol/L), 外液为人工脑脊液。测试脉冲参数: 波形为方波, 频率 0.05 Hz, 波宽 100 μs , 刺激强度以能诱发 50% 最大兴奋性突出后电位 (fEPSP) 为准。高频强直刺激 (HFS) 参数为: 强度、波宽同测试脉冲, 频率 100 Hz, 时程 1 s。记录位点: 利用倒置显微镜, 将电极间距约 300 μm 的激电极置于海马 Schaffer 侧支纤维处, 将记录用玻璃微电极置于海马 CA1 锥体细胞层。测试步骤: 给予适当强度的测试脉冲, 开始记录 fEPSP, 待记录基线平稳后, 继续记录 fEPSP 30 min 以上, 给予间隔 20 s 的两次 HFS 刺激, 然后继续给予测试脉冲并记录 fEPSP, 持续 1 h 以上。将刺激后的 fEPSP 斜率标准化为刺激前 fEPSP 斜率的百分比, 该数值可作为评价 fEPSP 强度的定量客观指标。

1.7 统计学处理

实验所得数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS13.0 进行统计学分析, fEPSP 斜率和寻找平台潜伏期的组间比较采用重复测量的多因素方差分析及 Tukey-Kramer 检验, 大鼠在目标象限的停留时间用单因素方差分析进行统计学分析。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 人参皂甙 Rb1 可显著减轻慢性缺氧对大鼠寻找平台潜伏期的影响

在 Morris 水迷宫实验中模型组大鼠寻找平台的潜伏期明显长于健康对照组, 有显著统计学差异 ($P < 0.05$), 人参皂甙 Rb1 治疗后大鼠寻找平台潜伏期较模型组显著缩短 ($P < 0.05$) (Fig. 1), 提示人参皂甙 Rb1 可显著减轻慢性缺氧导致的大鼠寻找平台潜伏期延长, 减轻慢性缺氧对大鼠记忆力的损害。

2.2 人参皂甙 Rb1 可明显延长慢性缺氧大鼠在目标象限的停留时间

如图 2 所示, 空间探索试验中, 模型组大鼠在目标象限的停留时间显著短于对照组 ($P < 0.05$), 人参皂甙 Rb1 治疗组大鼠在目标象限的停留时间较模型组明显延长 ($P < 0.05$), 人参皂甙 Rb1 可显著延长慢性缺氧大鼠在目标象限的停留时间, 再次证实人参皂甙 Rb1 可减轻慢性缺氧对大鼠记忆力的损害。

2.3 人参皂甙 Rb1 可显著减轻慢性缺氧导致的大鼠海马 LTP 抑制

电生理实验证实, 给予 HFS 后各组大鼠海马 fEPSP 均较前增强, 即各组均可诱发 LTP, 并持续 1 小时以上。与对照组相比 HFS 刺激后模型组 LTP 被显著抑制 ($P < 0.05$), 人参皂甙 Rb1 治疗可显著减轻慢性缺氧导致的大鼠海马 LTP 抑制, 人参皂甙 Rb1 治疗组 LTP 较模型组显著增强 ($P < 0.05$), 从脑片电生理水平再次证实人参皂甙 Rb1 可减轻慢性缺氧对大鼠记忆

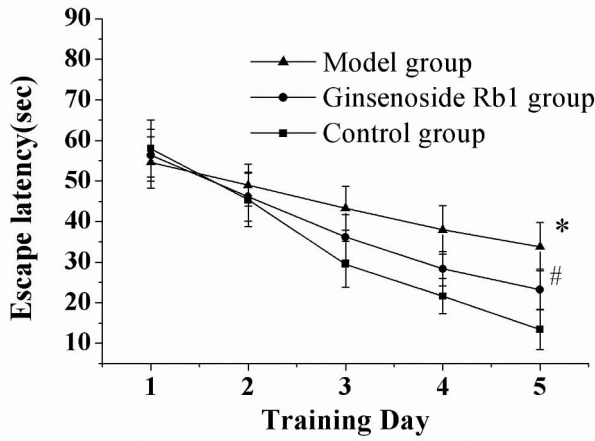


图1 人参皂甙 Rb1 对慢性缺氧大鼠寻找平台潜伏期的影响

Fig. 1 Effects of Ginsenoside Rb1 on escape latencies caused by chronic hypobaric hypoxia

Note: * $P < 0.05$ Model group compared with control group; # $P < 0.05$ Ginsenoside Rb1 group compared with model group.

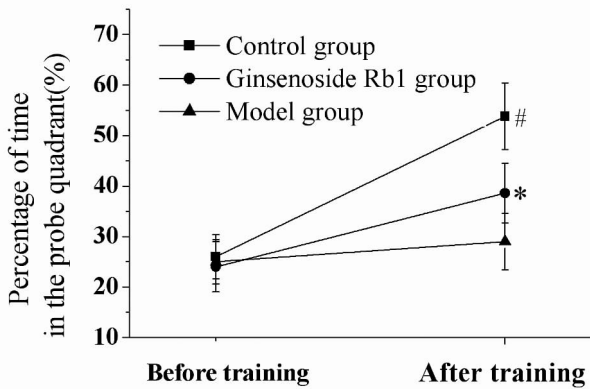


图2 人参皂甙 Rb1 对慢性缺氧大鼠在目标象限停留时间的影响

Fig. 2 Effects of Ginsenoside Rb1 on time in the probe quadrant caused by chronic hypobaric hypoxia

Note: * $P < 0.05$ Model group compared with control group; # $P < 0.05$ Ginsenoside Rb1 group compared with model group.

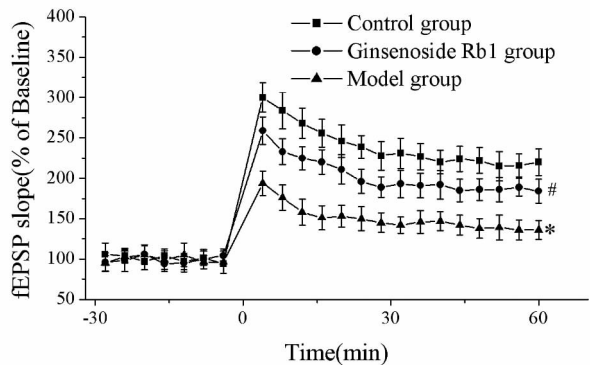


图3 人参皂甙 Rb1 对慢性缺氧大鼠海马 LTP 的影响

Fig. 3 Effects of Ginsenoside Rb1 on Hippocampal LTP inhibition induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats

Note: * $P < 0.05$ Model group compared with control group; # $P < 0.05$ Ginsenoside Rb1 group compared with model group.

3 讨论

高原慢性缺氧导致的认知功能障碍等生物学效应严重限制了人类在高原地区的活动,已成为了人类开发、利用高原的一大障碍,目前尚无一种安全而有效的防治高原缺氧性认知功能障碍的药物。本课题组长期致力于寻找防治高原缺氧性认知功能障碍的新药,在这方面积累了一定经验。人参是驰名中外的名贵中药材,在临床应用已有近千年历史,人参及其有效成分具有广泛的生物活性和医疗用途。近年来,人参的药理学研究进入了分子水平,因而人参的许多新的药理作用及其机制也逐渐被阐明。人参皂甙是人参中的主要生物活性物质,其中 Rb1 含量最高,活性最强,具有重要的生理功能^[2]。张明磊等人证实人参皂甙可显著减轻颞叶癫痫所致的大鼠认知功能障碍^[3]。江山等人证实,人参皂甙可显著减轻大鼠海马脑片的缺血损伤^[7]。上述结果均提示人参皂甙可能有改善动物认知功能的作用,但人参皂甙对慢性缺氧所致的认知功能障碍是否有治疗作用尚不明确。

水迷宫实验是由科学家 Morris 于 1881 发明的客观评价大鼠学习记忆的方法^[8],该方法问世后,很快的到了全世界相关领域科学工作者的一致认可,并被不断改进、完善,目前已成为研究学习记忆的最佳行为学方法之一^[9,10]。突触前纤维受到高频刺激后相当长一段时间内,突触的传递效率和强度会成倍增加,这种高频刺激后突触传递效率增强的现象被称为 LTP,是反映突触可塑性的客观指标,以海马最容易引出 LTP^[11]。目前已明确,海马损伤会严重影响动物和人的学习记忆功能^[12,13],缺氧引起的认知功能障碍也和海马损伤密切相关^[14]。海马 LTP 与大脑的信息存储能力密切相关,具有三大特征--特异性、时程长、可加性,可客观反映海马的突触可塑性,已成为在电生理水平研究学习、记忆的金标准^[15,16]。本实验利用我校自行设计、制造的低压氧仓复制慢性缺氧所致的大鼠认知功能障碍模型,运用水迷宫行为学实验及膜片钳技术从动物行为学及脑片电生理两个不同水平证实人参皂甙 Rb1 对大鼠慢性缺氧性认知功能障碍的治疗作用。

本实验中,水迷宫行为学实验证实慢性缺氧可导致大鼠寻找平台潜伏期延长,空间探索试验证实缺氧可导致大鼠在目标象限的停留时间缩短,提示慢性缺氧大鼠学习记忆能力较正常大鼠显著下降,与前人研究结果一致^[17-19]。缺氧对大鼠学习记忆功能的影响可被人参皂甙 Rb1 显著抑制,从行为学水平证实了人参皂甙 Rb1 对大鼠慢性缺氧性认知功能障碍的治疗作用。我们利用膜片钳技术从脑片水平验证了海马 LTP 可被慢性缺氧显著抑制,即慢性缺氧损害了海马的突触可塑性,给予人参皂甙 Rb1 治疗可显著减轻慢性缺氧对大鼠海马 LTP 的抑制,保护其突触可塑性,从脑片电生理水平证实人参皂甙 Rb1 对大鼠慢性缺氧性认知功能障碍的治疗作用。

综上所述,本实验中,人参皂甙 Rb1 减轻了慢性缺氧大鼠在水迷宫实验中的行为学改变,并增强了慢性缺氧大鼠海马 LTP,证实人参皂甙 Rb1 可明显减轻大鼠慢性缺氧性认知功能障碍,该作用与其减轻海马 LTP 抑制有关,为高原缺氧性认知功能障碍的防治提供了新思路,但其具体机制尚有待于进一步研究,本室将在此基础上进一步深入研究人参皂甙 Rb1 改善慢

力的损害。

性缺氧性认知功能障碍的机制。

参考文献(References)

- [1] Wang J, Ke T, Zhang X, et al. Effects of acetazolamide on cognitive performance during high-altitude exposure[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2012, 35(3):28-33
- [2] Wang J, Qiao L, Li S, Yang G. Protective effect of ginsenoside Rb1 against lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats [J]. *Molecules*, 2013, 18(1):1214-1226
- [3] 张明磊, 杨金升, 范磊, 等. 人参皂甙 Rd 对慢性颞叶癫痫大鼠空间学习记忆能力的影响 [J]. *癫痫与神经电生理学杂志*, 2010, 2(2): 65-68
Zhang Ming-lei, Yang Jin-sheng, Fan Lei, et al. Effect of ginsenoside Rd on spatial learning and memory abilities and Mossy fiber sprouting in hippocampus of rats with chronic temporal lobe epilepsy [J]. *Journal of Clinical Electroneurophysiology*, 2010, 12 (2):65-68 (In Chinese)
- [4] 刘曼玲, 李志超, 董明清, 等. 丹参酮 A 磺酸钠对慢性低氧性肺动脉高压大鼠的治疗作用[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(6): 723-726
Liu Man-ling, Li Zhi-chao, Dong Ming-qing, et al. The therapeutical effect of sodium tanshinone A sulphonate on hypoxic pulmonary hypertension rats [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2008, 24(6): 723-726(In Chinese)
- [5] 闫志强, 徐英, 李华, 等. 姜黄素预防高原缺氧大鼠认知功能障碍的电生理机制[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(22):4229-4231
Yan Zhi-qiang, Xu Ying, Li Hua, et al. The Electrophysiology Mechanism of Curcumin Prevent Hypobaric Hypoxia-Induced Cognitive Deficits [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11(22): 4229-4231(In Chinese)
- [6] Zheng G, Zhang W, Zhang Y, et al. Gamma-Aminobutyric acid (A) (GABA (A)) receptor regulates ERK1/2 phosphorylation in rat hippocampus in high doses of methyl tert-butyl ether (MTBE)-induced impairment of spatial memory[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 236(2): 239-245
- [7] 江山, 姜正林. 人参皂甙 Rb1 对大鼠海马脑片缺血损伤的保护作用 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2003, 20(5):415-417
Jiang Shan, Jiang Zheng-Lin. Effect of Ginsenoside Rb1 on hippocampus injury caused by ischemic [J]. *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*, 2003, 20(5):415-417(In Chinese)
- [8] Morris C. The evolution of flying animals[J]. *Science*, 1881, 2(74):552-554
- [9] Mulder GB, Pritchett K. The Morris water maze [J]. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 2003, 42(2):49-50
- [10] D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2001, 36(1):60-90
- [11] Baudry M, Bi X, Aguirre C. Progesterone-estrogen interactions in synaptic plasticity and neuroprotection [J]. *Neuroscience*, 2012, S0306-4522(12):1075-1085
- [12] 段瑞生, 刘娜, 王维平, 等. 戊四氮诱导癫痫大鼠的认知功能测定与海马超微结构观察[J]. *江苏医药*, 2009, 35(3):332-334
Duan Rui-sheng, Liu Na, Wang Wei-ping, et al. Cognitive ability and ultra-microstructure in rats hippocampus after pentetazol induced seizure [J]. *Jiangsu Medical Journal*, 2009, 35(3):332-334 (In Chinese)
- [13] 叶冰, 黄华品, 车春晖, 等. 癫痫复杂部分性发作患者认知功能与海马质子磁共振波谱改变相关性分析 [J]. *中华神经医学杂志*, 2010, 9(2): 158-161
Ye Bing, Huang Hua-pin, Che Chun-hui, et al. Correlation analysis of cognitive function and changes in proton magnetic resonance spectroscopy of the hippocampus in patients with complex partial seizures[J]. *Chinese Journal of Neuromedicine*, 2010, 9(2):158-161 (In Chinese)
- [14] 孙正启, 王唯析, 康龙丽, 等. 模拟高原低压低氧对大鼠学习记忆行为和海马 GABA 表达的影响 [J]. *现代预防医学*, 2009, 36(21): 4133-4135
Sun Zheng-qi, Wang Wei-xi, Kang Long-li, et al. The influence of simulated high-altitude hypobaric hypoxia on learning memory behaviors and expression of gaba neurons in hippocampus of rats [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2009, 36(21):4133-4135 (In Chinese)
- [15] Hai J, Wan JF, Qi L, et al. Cognitive dysfunction induced by chronic cerebral hypoperfusion in a rat model associated with arteriovenous malformations [J]. *Brain research*, 2009, 627(1):80-88
- [16] Xu B, Li XX, He GR, et al. Luteolin promotes long-term potentiation and improves cognitive functions in chronic cerebral hypoperfused rats[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 627(1):99-105
- [17] Shukitt-Hale B, Stillman MJ, Welch DI, et al. Hypobaric hypoxia impairs spatial memory in an elevation-dependent fashion [J]. *Behav Neural Biol*, 1994, 62(3):244-252
- [18] Udayabanu M, Kumaran D, Katyal A, et al. Free chelatable zinc modulates the cholinergic function during hypobaric hypoxia-induced neuronal damage: an in vivo study[J]. *Neuroscience*, 2012, 202(1):434-445
- [19] Titus AD, Shankaranarayana Rao BS, Harsha HN, et al. Hypobaric hypoxia-induced dendritic atrophy of hippocampal neurons is associated with cognitive impairment in adult rats[J]. *Neuroscience*, 2007, 145(1):265-278