

# 云南野生香薷油对子代小鼠学习记忆功能的影响

张丽娟<sup>1</sup>, 尚建华<sup>2</sup>, 殷建忠<sup>3</sup>, 吴少雄<sup>3</sup>, 王琦<sup>3</sup>, 赵云丽<sup>4</sup>, 张雪辉<sup>3</sup>, 徐芳<sup>3</sup>, 杨解顺<sup>1</sup>

(1. 昆明医学院, 云南昆明 650500) (2. 云南省药物研究所, 云南昆明 650111)

(3. 昆明医学院营养与食品研究所, 云南昆明 650500) (4. 中国科学院植物研究所, 云南昆明 650204)

**摘要:** 本研究旨在探讨云南野生香薷油对子代小鼠学习记忆功能的影响。将昆明种小鼠从受孕第 1 d 开始分为空白对照、阳性对照、低、中、高剂量 5 个组, 用云南野生香薷油灌胃至断乳, 断乳♂小鼠按孕鼠剂量灌胃至出生 49 d 后做 Morris 水迷宫实验, 之后测定小鼠脑组织神经递质和肝、脑组织的脂肪酸。结果表明, 与空白对照组比较, 定位航行实验的第 5 d 各组均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。空间探索实验的阳性对照组有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。脑神经递质 TPro、NO、AChE: 阳性、中、高剂量组均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。肝脂肪酸结果中阳性和高剂量组的 ALA 有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 脑组织脂肪酸结果: 高剂量组的油酸和 ALA 有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。可见, 富含  $\alpha$ -亚麻酸的香薷油具有部分改善子代小鼠学习记忆的功能, 其作用可能与喂养此香薷油使脑组织的 TPro 升高, NO、AChE 降低; 肝和脑组织的  $\alpha$ -亚麻酸升高有关。

**关键词:** 香薷油;  $\alpha$ -亚麻酸; 子代小鼠; 学习记忆

文章编号: 1673-9078(2012)7-733-736

## Effect of Yunnan wild Elsholtzia Oil on Learning and Memory in Offspring Mice

ZHANG Li-juan<sup>1</sup>, SHANG Jian-hua<sup>2</sup>, YIN Jian-zhong<sup>3</sup>, WU Shao-xiong<sup>3</sup>, WANG Qi<sup>3</sup>, ZHAO Yun-li<sup>4</sup>, ZHANG Xue-hui<sup>3</sup>, XU Fang<sup>3</sup>, YANG Jie-shun<sup>1</sup>

(1. Kunming Medical College, Kunming 650500, China) (2. Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China) (3. Research Institute of Nutrition and Food Science, Kunming Medical College, Kunming 650500, China)

(4. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, 650204, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate the effect of Yunnan wild elsholtzia oil on learning and memory function of mouse offspring. From the first day of pregnancy, Kunming mice were divided into five groups: blank control group, positive control group, low-dose, medium-dose and high-dose groups and were intragastrically administrated with the elsholtzia oil gavage till being weaned. According to intragastric administration dose for the pregnant rats, the weaned male mouse was intragastrically administrated till 49 days after birth and then tested for the Morris water maze test. The fatty acid contents of the liver and brain organization were detected. Compared to the blank control group, navigation test showed that each group were statistically significant ( $p < 0.01$ ) in the 5<sup>th</sup> day. Space exploration experiment showed that only the positive control group was statistically significant ( $p < 0.05$ ). By analysis of TPro, NO, AChE, it was found that the positive control group, medium-dose and high-dose groups were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The contents of the fatty acids in liver of the positive control group and the high-dose group were statistically significant ( $p < 0.05$ ). Contents of oleic acid and ALA in high-dose group were statistically significant ( $p < 0.05$ ) in brain tissue. ALA-riched elsholtzia oil can partly enhance the learning and memory in mouse offspring mouse, due to the higher TPro and ALA contents but lower NO and AChE contents by feeding ALA-riched elsholtzia oil.

**Key words:** elsholtzia oil;  $\alpha$ -linolenic acid; offspring mice; learning and memory

学习记忆是人类大脑的重要功能之一, 并且是十分复杂的生物现象。学习记忆从人类出生就开始并伴

收稿日期: 2012-04-06

基金项目: 云南省教育厅基金项目 (5Y02810、08Y0239)

作者简介: 张丽娟 (1978-), 女, 硕士, 研究方向: 食品化学与营养学

通讯作者: 殷建忠 (1970-), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 云南特有

食物资源研究与开发

随至终老, 因此学习、积累和应用各种知识经验与学习记忆能力是密不可分的。当代社会人们生活质量越来越高, 对记忆能力的要求也相应提高。学习记忆能力的高低至关重要, 它既关系着个人的发展又关系着社会的进步; 因此, 人们对学习记忆的研究也从未间断。

$\alpha$ -亚麻酸 ( $\alpha$ -Linolenic Acid, ALA) 为人体必需

脂肪酸,是广泛存在于植物油中的不饱和脂肪酸。云南野生香薷油富含 ALA,含量占不饱和脂肪的 56.28%<sup>[1]</sup>。关于 ALA 促进学习记忆能力报道较多<sup>[2-4]</sup>,但对子代记忆功能的影响研究较少。本研究用云南野生香薷油对小鼠进行两代喂养,通过对子代小鼠的水迷宫实验评价香薷油对子代小鼠学习记忆功能的影响,为香薷的开发和综合利用提供科学参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 样品

香薷油,云南野生香薷籽经筛选、清洗、破碎、软化、扎胚、压榨、沉淀、过滤得到香薷油,4℃冰箱保存。

#### 1.1.2 动物

昆明种小鼠,♀160只,♂80只,昆明医学院实验动物中心提供,许可证号:SCXK(滇)2005-0008;等级:SPF级。

#### 1.1.3 主要试剂

吡拉西坦片(东北制药总厂,批号:200908113);考马斯亮兰蛋白测定试剂盒、一氧化氮试剂盒、乙酰胆碱酯酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);棕榈酸甲酯化标准品、硬脂酸甲酯化标准品、油酸甲酯化标准品、亚油酸甲酯化标准品、 $\alpha$ -亚麻酸甲酯化标准品(美国Sigma公司);无水碳酸钾分析纯(天津市风船化学试剂有限公司);正己烷分析纯(津市化学试剂三厂);甲醇分析纯(汕头市西陇化工厂有限公司);2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)、优级纯乙酰氯分析纯(Aladdin Chemistry Co., Ltd)。

### 1.2 主要实验仪器及设备

Centrifuge 5810R 高速冷冻离心机、Morris 水迷宫、CP-3800 气相色谱仪。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 子代小鼠分组及灌胃剂量

表1 实验小鼠分组及灌胃剂量

Table 1 The groups and intragastric dose of mouse

组别	配制	灌胃剂量/(mL/kg·bw)	相当人推荐剂量(倍)
空白对照组	纯水	11	-
低剂量组	香薷油	2.8	5
中剂量组	香薷油	5.6	10
高剂量组	香薷油	11	20

每天21:00~22:00将一代♀、♂鼠按2:1进行合笼,于次晨8:00♀、♂鼠分笼并检查♀鼠阴栓情况,有明显阴栓者即认定为受孕第1d,按表1分组喂养。子代21d♂小鼠各组均按孕鼠剂量继续灌胃4周后做下列

实验。

#### 1.3.2 Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫实验:正式实验前1d让子代♂小鼠在水中游泳2min,以适应环境。各组小鼠在5d定位航行实验后,第6d将平台撤出做空间探索实验。

实验动物每天灌胃,灌胃1h后进行Morris水迷宫实验。每天实验时间9:00~16:00,每组动物每天上午、下午各一半做本实验。

#### 1.3.3 脑神经递质

将做完行为学实验的子代♂小鼠脱臼处死后,低温取肝和脑组织称重;称脑组织200mg(各脑组织尽量取同一部位),加生理盐水1.8mL,手动匀浆。匀浆液3000r/min4℃下低温离心10min后,上清液待测TPro、NO、AchE(方法见试剂盒说明)。

#### 1.3.4 肝脑脂肪酸

样品的甲酯化:各组子代♂小鼠脱臼处死后,低温取肝和脑组织称重;肝、脑组织各称200mg(各组尽量取同一部位),加NS1.8mL,手动匀浆。匀浆液3000r/min,低温离心10min,取上清液100 $\mu$ L。上清液中加入甲醇:氯乙酰(10:1)的混合溶液2mL,20mmol/LBHT溶液2 $\mu$ L;沸水水浴1h。水浴后加入60g/L的碳酸钾溶液5mL和正己烷150 $\mu$ L,充分振荡混匀,3000r/min,低温离心10min后取上层用于测定。

标准曲线的建立:CP-3800气相色谱仪:FID检测器,hp-innowax石英毛细管细谱柱(30m $\times$ 0.320mm $\times$ 0.50 $\mu$ m),进样口温度260℃,检测温度280℃;柱温采用程序升温,初始温度170℃,保持0.5min,以5℃/min的升温速率升到200℃,然后以15℃/min的升温速率升至240℃保持时间3.83min;载气:N<sub>2</sub>,柱头压60kPa,氢气:32mL/min;空气:320mL/min;柱流1.5mL/min;分别将标准品配置不同浓度做标准曲线,进样量1 $\mu$ L。

### 1.4 统计学处理

应用SPSS 13.0软件包进行数据的统计分析。数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm S$ )表示,用方差分析Morris水迷宫及生化指标结果在各组间的差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Morris 水迷宫实验

子代♂小鼠香薷油喂养49d后,定位航行实验结果显示:与空白对照组比较,第1d低剂量组有统计学意义( $P < 0.01$ );第2d均无统计学意义;第3d阳性对照组、低、中剂量组有统计学意义( $P < 0.01$ ),高

剂量组有统计学意义 ( $P<0.05$ )；第 4 d 阳性对照组有统计学意义 ( $P<0.01$ )，中、高剂量组有统计学意义  $P<0.05$ ；第 5 d 各组均有统计学差异 ( $P<0.01$ )，见表 2。空间探索实验各组与空白对照组比较均无统计学意义 ( $P<0.05$ )，见表 3。香薷油喂养 49 d 的子代小鼠，定位航行实验差异明显，在同一天，各组小鼠的潜伏期均低于空白对照组，尤其是第 5 d 有统计学意义 ( $P<0.01$ )；并且在第 5 d，中剂量组的潜伏期小于阳性对照组。实验结果表明，从第一代♀鼠受孕开始喂

养香薷油，直至子代成年小鼠，香薷油能够改善子代小鼠的学习和记忆的获取能力，此效果甚至不亚于阳性对照药物。空间探索实验，用于测量小鼠学会寻找平台后，对平台空间位置记忆的保持能力。本研究中，各组潜伏期均高于空白对照组，但只有阳性对照组有统计学意义。实验结果提示，香薷油对子代小鼠的空间位置记忆的保持能力并没有改善作用。结果分析，富含 $\alpha$ -亚麻酸的香薷油具有改善子代小鼠学习记忆的功能，尤其是在学习记忆的获取方面。

表 2 定位航行实验潜伏期结果 (s)

Table 2 The incubation period of navigation test of offspring of male mouse

组别	n	第 1 d	第 2 d	第 3 d	第 4 d	第 5 d
空白对照组	18	47.9±10.9	30.4±14.7	31.8±13.6	25.7±14.3	24.9±15.8
阳性对照组	20	43.2±13.8	26.8±11.1	18.6±11.7**	12.1±9.9**	11.4±7.9**
低剂量组	17	40.2±11.9*	29.2±15.5	16.9±8.5**	19.1±12.1	14.7±10.1**
中剂量组	18	41.0±11.0	24.0±11.1	19.2±12.5**	15.4±6.0**	10.4±6.0**
高剂量组	21	45.7±8.7	26.2±11.8	21.3±9.8*	18.0±7.9**	13.3±9.5**

注：重复测量方差分析：与同一时间点上的空白对照组比较，\* $P<0.05$ ；\*\* $P\leq 0.01$ 。

表 3 子代♂小鼠空间探索实验结果

Table 3 The results of space exploration test of offspring of male mouse

组别	n	时间/s
空白对照组	18	18.6±5.8
阳性对照组	20	23.0±6.5*
低剂量组	17	21.3±8.9
中剂量组	18	24.5±7.7
高剂量组	21	20.3±8.9

注：各组与空白对照组比较：\*为  $P<0.05$ 。

## 2.2 脑神经递质测定

子代♂小鼠香薷油喂养 56 d 后，脑神经递质检测结果：相对于空白对照组比较，TPro 阳性对照组、中、高剂量组有统计学差异 ( $P<0.01$ )；NO，阳性对照组、低、中、高剂量组有统计学差异 ( $P<0.01$ )；AchE，阳性对照组、中、高剂量组有统计学差异 ( $P<0.01$ )，低剂量组有统计学差异 ( $P<0.05$ )，见表 4。

表 4 子代♂小鼠脑组织神经递质结果

Table 4 The neurotransmitter of offspring of male mouse

组别	n	TPro (g/L)	NO ( $\mu\text{mol/g prot}$ )	AchE 活力 (U/mg prot)
空白对照组	10	1.93±0.23	6.71±0.80	2.39±0.40
阳性对照组	10	2.44±0.15**	2.42±0.63**	0.49±0.20**
低剂量组	9	2.25±0.35	5.28±0.92**	1.67±0.32*
中剂量组	10	2.43±0.25**	3.08±0.44**	0.53±0.13**
高剂量组	10	2.40±0.15**	3.33±0.50**	0.46±0.19**

注：与空白对照组比较：\*\*为  $P<0.01$ ；\*为  $P<0.05$ 。

学习记忆时蛋白质合成增加并有新的蛋白质或肽产生，蛋白质水平影响子代脑发育和功能<sup>[5]</sup>。记忆的获得依赖于蛋白合成<sup>[5]</sup>，因此，脑总蛋白的多少在一定程度上反应记忆功能。本研究表明，相对于空白对照组，阳性对照、中剂量和高剂量组总蛋白量增多，结合行为学实验结果，提示香薷油对子代小鼠脑组织蛋白的影响反表现为会随喂养的时间和剂量改变，既有时效性也有量效性，小鼠脑总蛋白的含量与小鼠的学习记忆能力呈正相关。

NO 与海马长时程增强的形成有关<sup>[6]</sup>，并且释放适量的 NO 可促进学习能力<sup>[7]</sup>。本研究中阳性对照、低、中、高剂量组的 NO 含量均低于空白对照组，结合行为学实验结果可推测，低水平的 NO 对小鼠的空间学习记忆能力有促进作用。

大脑皮层和海马乙酰胆碱(Ach)升高能改善学习和记忆功能<sup>[8]</sup>。而 AchE 能降解 Ach，故 AchE 水平的降低有利于学习记忆。AchE 活力阳性对照、中、高剂量组有降低，结合行为学实验结果说明，香薷油的长期喂养与 AchE 水平降低可能对记忆功能有促进作用。

由此可推测富含 ALA 的香薷油可通过胎盘对子代小鼠的记忆功能产生影响，与小鼠脑组织的二十二碳六烯酸 ( $C_{22:6}$ , Docosahexaenoic acid, DHA) 主要是在孕 7~21 d 累积的相关报道并不冲突<sup>[9]</sup>；脑组织的总蛋白含量水平增高、NO 和 AchE 水平的降低有可能促进小鼠的学习记忆能力。

## 2.3 肝脑脂肪酸测定

子代♂小鼠香薷油喂养 56 d 后,与空白对照组比较,肝组织中,高剂量组的棕榈酸有统计学意义 ( $P<0.01$ );阳性对照组和高剂量组的 ALA 有统计学差异 ( $P<0.05$ ),见表 5。

子代雄性小鼠香薷油喂养 56 d 后,与空白对照组比较,脑组织中,高剂量组的油酸和 ALA 有统计学意义 ( $P<0.05$ ),见表 6。

n-3 多不饱和脂肪酸和 n-6 多不饱和脂肪酸是人体必需脂肪酸,在脑发育和脑功能正常发挥过程中起重要的作用<sup>[10]</sup>。大量研究报导 n-3 系多不饱和脂肪酸

(Poly Unsaturated Fatty Acid, PUFA) 中二十碳五烯酸 ( $C_{20:5}$ , Eicosapentenoic acid, EPA) 和 DHA 对记忆功能的影响<sup>[11,12]</sup>。实验结果显示,小鼠从受孕至出生后 56d 一直喂养 ALA 含量高的香薷油,对小鼠肝和脑组织的 ALA 水平的升高有影响。相关研究证实补充 n-3 PUFA 能明显提升脑中 DHA 水平<sup>[13]</sup>,但本研究显示补充香薷油能提升脑组织 ALA 的水平,而 ALA 最终主要转化成 EPA 和 DHA 来发挥作用。因此,香薷油对小鼠记忆功能的影响还需对其做更进一步研究。

表 5 子代♂小鼠肝组织脂肪酸检测结果

Table 5 The results of liver tissue fatty acid of offspring of male mouse

组别	棕榈酸 ( $\mu\text{g/mL}$ )	亚油酸 ( $\mu\text{g/mL}$ )	油酸 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\alpha$ -亚麻酸 ( $\mu\text{g/mL}$ )	硬脂酸 ( $\mu\text{g/mL}$ )	n-3/n-6
空白对照组	7.93 $\pm$ 4.17	12.87 $\pm$ 7.20	4.64 $\pm$ 3.39	2.25 $\pm$ 1.06	2.43 $\pm$ 1.32	0.20 $\pm$ 0.09
阳性对照组	10.20 $\pm$ 5.30	16.45 $\pm$ 6.39	8.83 $\pm$ 5.54	4.29 $\pm$ 2.74*	2.57 $\pm$ 1.67	0.27 $\pm$ 0.17
中剂量组	11.83 $\pm$ 4.72	15.21 $\pm$ 4.52	8.78 $\pm$ 4.75	3.24 $\pm$ 1.15	3.54 $\pm$ 1.53	0.22 $\pm$ 0.14
高剂量组	17.10 $\pm$ 7.85**	17.89 $\pm$ 6.40	7.69 $\pm$ 2.77	4.33 $\pm$ 1.03*	4.48 $\pm$ 3.07	0.23 $\pm$ 0.05

注:与空白组比较: \* $P<0.01$ ,\*\* $P<0.05$ 。

表 6 子代♂小鼠脑组织脂肪酸检测结果

Table 6 The results of brain tissue fatty acid of offspring of male mouse

组别	棕榈酸 ( $\mu\text{g/mL}$ )	亚油酸 ( $\mu\text{g/mL}$ )	油酸 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\alpha$ -亚麻酸 ( $\mu\text{g/mL}$ )	硬脂酸 ( $\mu\text{g/mL}$ )	n-3/n-6
空白对照组	29.31 $\pm$ 10.60	30.49 $\pm$ 13.72	8.52 $\pm$ 3.23	4.91 $\pm$ 2.41	3.10 $\pm$ 1.50	0.18 $\pm$ 0.08
阳性对照组	28.89 $\pm$ 11.73	25.78 $\pm$ 10.96	10.91 $\pm$ 5.06	8.62 $\pm$ 3.00*	3.12 $\pm$ 1.37	0.36 $\pm$ 0.16*
中剂量组	24.17 $\pm$ 12.27	30.90 $\pm$ 15.19	12.91 $\pm$ 8.74	6.03 $\pm$ 2.40	3.88 $\pm$ 1.52	0.22 $\pm$ 0.11
高剂量组	33.67 $\pm$ 10.85	39.00 $\pm$ 12.53	22.9 $\pm$ 15.62*	8.73 $\pm$ 3.31*	3.99 $\pm$ 3.00	0.23 $\pm$ 0.09

注:与空白组比较: \* $P<0.01$ ,\*\* $P<0.05$ 。

### 3 结论

3.1 记忆是人类从事思维和语言等高级心理活动的基础。关于记忆功能的改善一直以来受到研究人员的广泛关注,但多集中的治疗方面,对预防方面研究较少。本研究主要采用基于条件反射原理的学习记忆行为学实验,采用保健食品评价程序推荐使用的方法,评价香薷油改善学习记忆的作用<sup>[14]</sup>。

3.2 《中国居民膳食指南(2007)》推荐每人每天烹调用量不超过 25 g~30 g,据此,野生香薷油以每人每日摄入 30 g,体重 60 kg 计,则成人的推荐摄入量为 0.504 g/kg·bw·d。本研究设计的动物低、中、高剂量组喂养剂量分别相当于人类推荐摄入量的 5、10、20 倍(香薷油比重为 0.9 g/mL)。实验过程中采用的阳性对照药物“吡拉西坦片”是一种适用于记忆减退及轻、中度脑功能障碍和儿童智能发育迟缓的有效治疗药物,用其作为阳性对照的目的是便于对

实验结果做出合理分析。

3.3 综合分析实验结果认为,香薷油具有部分改善子代小鼠记忆功能的作用;可能与小鼠脑组织的 TPPO 水平升高,NO 和 AchE 水平降低,肝和脑组织的 ALA 水平有升高有关,但具体作用机制及相关性有待于更深入研究。

### 参考文献

- [1] 殷建忠,张雪辉,周建于,等.野生香薷籽油理化性质及营养成分分析与评价[J].现代食品科技,2009,25(1):101-102
- [2] 徐章华,邵玉芬.亚麻酸对第二代大鼠行为、视网膜及肝脂脂肪酸构成的影响[J].中国公共卫生,2002,18(3):301
- [3] 席小平,李学敏,边林秀,等.补充胡麻籽油研究对子代小鼠学习记忆能力的影响[J].中国药物与临床,2006,6(10):733
- [4] 吴尚霖,袁秉祥,马志义.酸枣仁油对小鼠学习记忆的影响[J].中草药,2001,32(3):246
- [5] 李永生,阎学安,邵福源.中枢神经递质与学习记忆的相关

- 性研究进展[J].实用医药杂志,2006,23(7):864-866
- [6] Melis F, Stancampiano R, Imperato A, et al. Chronic ethanol consumption in rats: correlation between memory performance and hippocampal acetylcholine release *in vivo* [J]. *Neuroscience*, 1996, 74: 155-159
- [7] Miranda ML, Lopez-Colome AM, BermudezRattoni F. Recovery of taste aversion learning induced by fetal neocortex grafts: correlation with *in vivo* extracellular acetylcholine [J]. *Brain Res*, 1997, 759: 141-148
- [8] Morgado I. The psychobiology of learning and memory: Fundamentals and recent advances [J]. *Rev Neurol*, 2005, 40(5): 289-297
- [9] 彭博,张朝东,任艳,等.蛋白激酶 B 在铅致小鼠学习记忆功能障碍中的作用[J].中华神经医学杂志,2009,8(4):363-366
- [10] 齐可民.生命早期营养状况对生命后期健康的影响[J].实用儿科临床杂志,2008,23(23):1867-1869
- [11] 田春雨,朱海燕,樊超男,等.鱼油和亚麻油 n-3 多不饱和脂肪酸饲料对小鼠脑聚集二十二碳六烯酸的影响[J].实用儿科临床杂志,2009,24(23):1813-1816
- [12] 洪昭毅.营养与小儿智能发育的关系[J].实用儿科临床杂志,2007,22(11):803-805
- [13] 梅文泉,和承尧,董宝生,等.香薷油脂脂肪酸组成分析[J].中国油脂,2004,(6):68-69
- [14] 杨萍,王璐,何首乌对记忆和抗疲劳作用的实验研究[J].食品与药品,2010,12(9):318-32