

芦荟大黄素对痴呆小鼠学习记忆功能的改善研究

陶莉¹, 王诗², 谢剑梅¹, 王玉婷¹, 丁虹¹

(1. 武汉大学药学院, 湖北武汉 430071) (2. 湖北科技学院药学院, 湖北咸宁 437100)

摘要: 研究芦荟大黄素在体外对胆碱酯酶的抑制活力, 及其对阿尔茨海默病模型动物脑内胆碱酯酶水平和空间识别障碍与学习记忆能力的影响。通过体外 Ellman 比色法检测其胆碱酯酶抑制活力; 采用东莨菪碱所致小鼠记忆获得性障碍模型, 随机分为 4 组, 即空白组、模型组、石杉碱甲阳性对照组与芦荟大黄素组。以行为学实验(水迷宫法)和大脑皮层胆碱酯酶活性作为观测指标, 检测芦荟大黄素的改善作用。芦荟大黄素在体外能有效抑制胆碱酯酶活性, 其 IC₅₀ 为 18.53 μg/mL; 与模型组相比, 芦荟大黄素能显著缩短逃避潜伏期、延长目标象限游泳时间, 降低动物大脑皮层内胆碱酯酶活力, 改善模型动物的学习记忆能力。因此, 芦荟大黄素对东莨菪碱所引起的小鼠学习记忆能力障碍有改善作用, 其作用机制可能与抑制胆碱酯酶活性有关。

关键词: 芦荟大黄素; 胆碱酯酶; 水迷宫

文章编号: 1673-9078(2014)12-7-10

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.12.002

Effect of Aloe-emodin on Learning and Memory Functions in Mice with Dementia

TAO Li¹, WANG Shi², XIE Jian-mei¹, WANG Yu-ting¹, DING Hong¹

(1. Wuhan University School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan 430071, China)

(2. Department of Pharmacology, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the *in vitro* inhibitory activity of aloe-emodin on cholinesterase and the *in vivo* effect of aloe-emodin on cholinesterase activity in the brain, extent of spatial and object recognition, as well as learning and memory ability in a mouse model of Alzheimer's disease (AD). *In vitro* cholinesterase inhibitory activity was measured by the Ellman's colorimetric method, while *in vivo* effect was assessed by using a mouse model of scopolamine-induced dysmnesia. Mice were randomly divided into four groups: normal group, model group, huperzine A positive-control group, and aloe-emodin group. The learning and memory ability was measured by using the Morris water-maze. The ameliorating effect due to aloe-emodin was measured by using behavioral experimentation (water-maze task) and brain cholinesterase activity as indicators. Aloe-emodin was found to effectively inhibit cholinesterase activity *in vitro* (IC₅₀ = 18.37 μg/mL). Compared with the model group, aloe-emodin showed a significant decrease in escape latency, an increase in swimming time in the target quadrant, a reduction in brain cholinesterase activity, and an improvement in the learning and memory ability of the animal model. Thus, aloe-emodin was shown to ameliorate learning and memory deficit induced by scopolamine in mice, and the underlying mechanism may be related to inhibition of cholinesterase activity.

Key words: aloe-emodin; cholinesterase; Morris water maze

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 又叫老年痴呆, 是发生在老年期的多因素慢性进行性精神退行性疾病。随着人口的老齡化, AD 的发病率逐年上升, 严重危害老年人的身心健康和生活质量, 已成为严重的社会问题, 引起各国政府和医学界的普遍关注。虽然人类对痴呆作了大量研究, 但 AD 的发病机

收稿日期: 2014-05-19

基金项目: 国家自然科学基金 (81273523)

作者简介: 陶莉 (1989-), 女, 硕士, 研究方向神经药理学

通讯作者: 丁虹 (1964-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向神经药理学

制迄今尚不明确, 目前较为公认的机理学说为中枢胆碱能损伤学说^[1]。胆碱能神经递质是脑组织中的重要化学物质, 发生 AD 时脑内的胆碱能神经元减少^[2], 导致乙酰胆碱合成、储存和释放减少, 进而引起以记忆和识别功能障碍为主要症状的一系列临床表现。

目前, AD 的治疗尚无特效药物, 其中乙酰胆碱酯酶抑制剂一直是开发活跃、成果突出的领域, 是目前治疗 AD 的一线药物, 对轻中度 AD 治疗具有较好的效果, 常见的药物有他克林、加兰他敏、安理申、多奈哌齐等。这些药物中除了加兰他敏外, 大多数是合成的药物, 虽然有一定效果, 但是存在活性不是很

强, 选择性低、副作用较大的缺点^[1]。因此, 国内外关于乙酰胆碱酯酶抑制剂的研究热点已经转向天然药物。大量文献报道^[4], 药用植物中生物碱、萜、黄酮和香豆素等结构类型的化合物具有乙酰胆碱酯酶抑制活性, 并且其一般活性较高、选择性强、毒性小, 这些优点正是现有合成类药物所不具备的。这也暗示我们对于寻找潜在的、天然的乙酰胆碱酯酶抑制剂这一领域来说, 药用植物是非常有价值的资源之一。

芦荟是一种药用价值很高的植物, 在医药、美容、保健食品及相关领域均得到广泛的应用。很多研究表明, 它是一种安全的、绿色的多用途天然植物, 很多天然芦荟产品被研究开发, 形成了芦荟产业。芦荟含有丰富的活性成分, 主要包括蒽醌类化合物、多糖、有机酸、蛋白质、氨基酸、多肽及多种微量元素。芦荟大黄素(AE)是芦荟中含量较高且极具开发价值的生物活性物质之一。现代研究发现, AE具有抗菌、抗炎^[5]、抗氧化、抗病毒、抗肿瘤^[6]等生物学活性, 但未见有AE抑制胆碱酯酶活性的报道。为了研究AE是否具有改善老年痴呆症状的作用, 本实验采用东莨菪碱所致的小鼠学习记忆能力获得性障碍模型, 并以体内、外乙酰胆碱酯酶活性为指标, 探讨AE可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 动物

SPF级KM小鼠60只, 雌雄各半, 体质量(20±2)g, 由武汉大学动物实验中心提供, 许可证号SCXK(鄂)2008-0004。

1.1.2 药品和试剂

乙酰胆碱酯酶(AChE), 碘代硫代乙酰胆碱(ATCI), 5, 5'-二硫代双硝基苯甲酸(DTNB)和石杉碱甲均购自Sigma公司; 芦荟大黄素, 河南兴源化工产品有限公司; 氢溴酸东莨菪碱, 广州白云山明兴制药有限公司; 乙酰胆碱酯酶(AChE)试剂盒, 南京建成生物工程研究所。

1.1.3 仪器

Morris水迷宫视频分析仪, 成都泰盟科技有限公司; 离心机, 飞鸽牌系列; 匀浆机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; KHB ST-360酶标仪, 济南鑫贝西生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 芦荟大黄素对体外胆碱酯酶抑制作用的研究

研究

实验采用改良的Ellman方法^[7]进行, 利用经典的反应体系: 140 μL 0.1 mol/L PBS (pH 8.0), 20 μL 待测样品溶液, 20 μL AChE溶液, 依次加入96孔板中, 震荡混匀, 4 °C培养20 min。然后加10 μL 0.01 M的DTNB, 最后通过加10 μL 0.075 M的ATCI开始反应。37 °C培养20 min后, 用酶标仪在405 nm下测量吸光度(A)并根据下式计算抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = [1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{实验对照}}) / (A_{\text{空白}} - A_{\text{空白对照}})] \times 100$$

注: 空白组用20 μL PBS代替20 μL样品溶液; 空白对照组用20 μL PBS代替20 μL样品溶液, 再用20 μL PBS代替20 μL AChE溶液; 实验对照组用20 μL PBS代替20 μL AChE溶液。实验以石杉碱甲为阳性对照, 所有实验重复3次。

1.2.2 芦荟大黄素对痴呆小鼠学习记忆功能的影响

1.2.2.1 分组与给药

60只KM小鼠连续3d进行Morris水迷宫训练与测试, 淘汰掉逃避潜伏期有明显差异的小鼠后, 从中选取50只随机分为5组(n=10): 空白组、模型组、石杉碱甲阳性对照组(2 mg/kg)、AE低剂量组(50 mg/kg)、AE高剂量组(100 mg/kg)。各组均采用灌胃给药, 每日1次, 连续21 d。第16 d开始, 除正常组外, 其余各组均于实验前30 min给予腹腔注射(3 mg/kg)氢溴酸东莨菪碱, 制备小鼠学习记忆障碍痴呆模型。

1.2.2.2 Morris水迷宫测试

Morris水迷宫主体为直径100 cm, 高35 cm的圆形水池, 水池内加入奶粉使水不透明, 且将迷宫均分为4个象限, 水温保持在(25±2) °C。另有一个白色圆形平台(直径9 cm, 高29 cm), 置于某一象限中央, 位于水面下1~2 cm, 迷宫上方安置着连接显示系统的摄像机, 同步记录小鼠运动轨迹。测试方法参照文献^[8-9]进行。第16 d开始进行定位航行实验, 历时5 d, 每天1次。将小鼠面向池壁放入水中, 记录其在120 s内找到平台的时间(逃避潜伏期)。超过120 s找不到平台, 可引导其找到平台并在平台上滞留10 s, 逃避潜伏期记成120 s。第21 d上午进行空间探索实验, 撤除平台, 将小鼠随机从某一象限面向池壁放入水中, 记录120 s内小鼠寻找原平台的运动轨迹及其在原平台所在象限游泳时间。

1.2.2.3 生物化学检测

行为学实验测试结束后, 处死小鼠, 迅速取出脑组织, 用生理盐水制成10%匀浆, 放入低温离心机中, 3000 r/min 4 °C离心10 min, 取上清液装入试管中冷冻备用, 按照试剂盒说明书进行ACh、AChE的测定。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用方差分析。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 芦荟大黄素对体外胆碱酯酶活性的抑制作用

由图 1 所示, Ellman 法体外检测 AE (终浓度: 2.5、5、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$) 对乙酰胆碱酯酶的抑制活性。当 AE 终浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 时可强烈抑制胆碱酯酶活性 (抑制率>70%) 并且随着 AE 浓度的增加其抑制率增高, 计算得出 AE 的 IC_{50} 为 18.37 $\mu\text{g/mL}$ 。然而, 阳性对照药石杉碱甲终浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时其抑制率就高达 97.5%。虽然, 与石杉碱甲相比, AE 的胆碱酯

酶抑制作用较弱, 但是加大剂量后抑制率升高, 可达到作用效果。本实验是首次发现 AE 具有胆碱酯酶抑制作用, 提示 AE 可能用于 AD 治疗药。

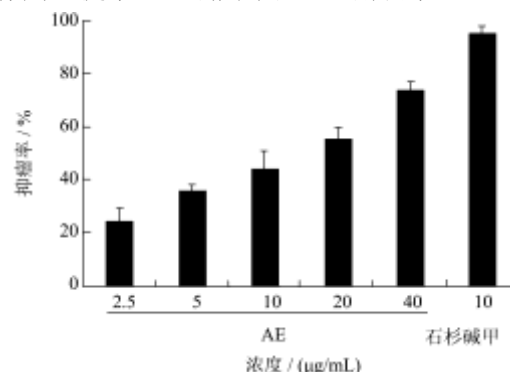


图 1 AE 对乙酰胆碱酯酶体外抑制作用

Fig.1 Effect of AE on AChE activity in vitro

2.2 芦荟大黄素改善东莨菪碱诱导的记忆障碍

表 1 各组小鼠在定位航行实验中各时段的平均潜伏期 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 1 Average escaping latency for each group in each period of the place navigation test ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	第 1 d	第 2 d	第 3 d	第 4 d	第 5 d
空白组	45.83±11.32	35.17±9.53	32.50±8.17	23.38±9.84	17.38±7.97
模型组	56.43±13.78*	51.79±11.17**	44.79±9.93**	41.38±6.09**	34.25±5.52**
石杉碱甲组	47.50±10.63#	39.50±8.04##	33.90±7.45##	25.15±9.62##	19.84±4.23##
AE 低剂量组	51.22±11.91	44.56±7.64	39.47±10.32	32.88±7.67#	27.22±6.34#
AE 高剂量组	49.89±9.59#	42.06±11.66#	37.13±8.32##	27.75±4.96##	23.25±5.85##

注: 与空白组比较, *P<0.05, **P<0.01; 与模型组比较, #P<0.05, ##P<0.01。



图 2 各组小鼠在定位航行实验中第五天的游泳路径

Fig.2 Representative swimming paths of the place navigation test on Day 5

表 2 各组小鼠在空间探索实验中目标象限游泳时间 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 2 Swimming time in the target quadrant for each group in the spatial probe test ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	目标象限游泳时间/s
空白组	27.64±8.83
模型组	14.29±7.53**
石杉碱甲组	24.64±5.48##
AE 低剂量组	18.05±7.98#
AE 高剂量组	22.13±6.01##

注: 与空白组比较, **P<0.01; 与模型组比较, #P<0.05,

##P<0.01。

从表 1 可以看出, 在定位航行实验中, 随着训练时间的延长, 各组小鼠的逃避潜伏期均逐渐缩短, 并且从实验第 2 d 开始, 模型组与空白组相比, 小鼠的逃避潜伏期明显延长 (P<0.01), 说明东莨菪碱所致小鼠学习记忆障碍模型建立成功。与模型组相比, AE 高剂量组从实验第 3 d 起逃避潜伏期明显缩短 (P<0.01), 说明 AE 对痴呆小鼠学习记忆能力有改善作用。AE 高剂量组与石杉碱甲组相比各天逃避潜伏期差异无统计学意义 (P>0.05)。各组小鼠在第五天的游泳路径, 见图 2。

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。从表 2 可以看出, 与空白组相比, 模型组小鼠在目标象限游泳时间明显缩短 (P<0.01)。与模型组相比, AE 高、低剂量组和石杉碱甲组小鼠在原平台所在象限游泳时间明显延长 (P<0.01; P<0.05; P<0.01), 说明预先给予 AE 可逆转东莨菪碱对小鼠空间记忆功能的损伤, 提高对平台

空间位置记忆的储存能力。

2.3 芦荟大黄素对痴呆小鼠脑组织匀浆中乙

酰胆碱酯酶活性的影响

大脑皮层和海马中乙酰胆碱(ACh)升高能改善学习和记忆功能。由表3可知,给予东莨菪碱造模后,模型组小鼠脑组织匀浆中ACh含量显著降低($P<0.01$),记忆缺失。给予石杉碱甲和AE治疗后,ACh含量均有一定程度的增加。然而AChE能降解ACh,故AChE水平的降低有利于学习记忆功能的改善。与空白组比较,模型组小鼠脑组织匀浆中的AChE活性显著增高,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠脑组织匀浆中的AChE活性显著降低;给药组间比较,AE高、低剂量组与石杉碱甲组则无明显差异($P>0.05$)。结合上述行为学实验结果说明,AE可能是通过抑制AChE活性,来改善痴呆小鼠的学习记忆功能。

表3 各组小鼠脑组织匀浆ACh、AChE活性比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Comparison of ACh and AChE activities of each group in brain tissue homogenates ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	ACh (pmol/mg prot)	AChE (U/mg prot)
空白组	39.39±2.50	0.67±0.19
模型组	25.61±3.20**	1.35±0.24**
石杉碱甲组	37.85±1.83##	0.72±0.56##
AE低剂量组	30.34±2.86#	1.13±0.48#
AE高剂量组	35.12±3.87##	0.81±0.38##

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3 结论

3.1 乙酰胆碱递质的减少与记忆损害有关,因而增加中枢神经系统胆碱能神经递质的含量对该病有改善作用。应用乙酰胆碱酯酶抑制剂能抑制胆碱酯酶的活性,减少其水解作用,增加脑内神经突触间乙酰胆碱的含量^[10]。乙酰胆碱酯酶抑制剂是唯一得到充分证实的能够改善老年痴呆病人症状的药物。截至目前,各种结构类型的乙酰胆碱酯酶抑制剂已经被成功的从植物体内分离出来。这些抑制剂一般可被分为生物碱类抑制剂、萜类抑制剂和酚类抑制剂。其中生物碱类乙酰胆碱酯酶抑制剂是研究的热点,一般被认为是活性最强的一类抑制剂。本实验首次发现蒽醌类化合物具有乙酰胆碱酯酶抑制活性,其抑制强度虽不及上述几类物质,但为药用植物中乙酰胆碱酯酶抑制剂的筛选提供了新的方向^[4]。

3.2 本实验表明芦荟大黄素在体外能较好地抑制乙酰胆碱酯酶活性,并能显著改善东莨菪碱所致小鼠的记忆获得性障碍作用。在水迷宫实验中,发现芦荟大黄素可有效拮抗东莨菪碱引起的脑内乙酰胆碱酯酶活力增高。本研究首次发现并证实芦荟大黄素对乙酰胆碱酯酶的抑制活性,这可能是芦荟大黄素抗老年痴呆作用的物质基础,为其进一步的研究及其开发利用提供了实验依据。

参考文献

- [1] Schelterns P, Feldman H. Treatment of alzheimer's disease; current status and new perspectives [J]. The Lancet Neurology, 2003, 2(9): 539-547
- [2] Jung H A, Jin S E, Choi R J, et al. Anti-amnesic activity of neferine with antioxidant and anti-inflammatory capacities, as well as inhibition of ChEs and BACE1 [J]. Life Sciences, 2010, 87(13): 420-430
- [3] 马涛,张文生,王永炎.天然药物治疗阿尔茨海默病的研究进展[J].北京中医药大学学报,2009,32(9):641-645
MA Tao, ZHANG Wen-sheng, WANG Yong-yan. Treatment of alzheimer's disease with natural drugs [J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2009, 32(9): 641-645
- [4] 张东博.药用植物中生物碱类乙酰胆碱酯酶抑制剂的筛选[D].兰州理工大学,2010
ZHANG Dong-bo. Alkaloids in medicinal plants cholinesterase inhibitor screening [D]. Lanzhou University of Technology, 2010
- [5] Park M Y, Kwon H J, Sung M K. Evaluation of aloin and aloe-emodin as anti-inflammatory agents in aloe by using murine macrophages [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(4): 828-832
- [6] Guo J, Xiao B, Liu Q, et al. Anticancer effect of aloe-emodin on cervical cancer cells involves G2/M arrest and induction of differentiation [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2007, 28(12): 1991-1995
- [7] Ellman G L, Courtney K D, Featherstone R M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [J]. Biochemical Pharmacology, 1961, 7(2): 88-95
- [8] Kopelman M D, Corn T H. Cholinergic 'blockade' as a model for cholinergic depletion. a comparison of the memory deficits with those of alzheimer-type dementia and the alcoholic korsakoff syndrome [J]. Brain, 1988, 111(5): 1079-1110
- [9] Tota S, Nath C, Najmi A K, et al. Inhibition of central

angiotensin converting enzyme ameliorates scopolamine induced memory impairment in mice: role of cholinergic neurotransmission, cerebral blood flow and brain energy metabolism [J]. Behavioural Brain Research, 2012, 232(1): 66-76

[10] Wang Y, Pan W L, Liang W C, et al. Acetylshikonin, a novel ache inhibitor, inhibits apoptosis via upregulation of heme oxygenase-1 expression in SH-SY5Y Cells [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 9(11): 186-197

现代食品科技