

# 沙棘叶多糖对血管性痴呆大鼠学习记忆能力的改善作用

刘松, 赵燕, 李宗树, 魏海峰\*

(吉林省人民医院, 吉林长春 130021)

**摘要:** 通过建立血管性痴呆大鼠模型, 研究沙棘叶多糖对学习记忆能力的影响。设置假手术组、模型组、低、高剂量沙棘叶多糖组 (100、200 mg/kg) 及尼莫地平组 (6.25 mg/kg), 干预治疗 28 d 后检测相关指标变化。结果显示, 与模型组比较, 低、高剂量沙棘叶多糖组逃避潜伏期降低了 24.35%、32.90% ( $P<0.01$ ), 目标象限停留时间增加了 24.35%、51.30% ( $P<0.01$ ), 平台穿越次数提升了 29.33%、60.58% ( $P<0.01$ ), 且海马组织病理形态减轻; 海马组织神经元细胞凋亡率及 B 淋巴细胞瘤 -2 (Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bax)、半胱氨酸蛋白酶 -3 (Caspase-3) mRNA 表达减少 ( $P<0.01$ ), Bcl-2 mRNA 表达增加 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 海马组织谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性及核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素氧合酶 -1 (HO-1) 蛋白表达增加 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 丙二醛 (MDA) 含量降低 ( $P<0.01$ )。以上结果表明, 沙棘叶多糖可以通过抗凋亡及抑制氧化应激发挥改善血管性痴呆大鼠学习记忆能力作用, 提示其在预防和治疗血管性痴呆方面有一定的应用前景。

**关键词:** 沙棘叶多糖; 血管性痴呆; 学习记忆能力; 凋亡; 氧化应激

文章编号: 1673-9078(2024)09-12-19

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.0965

## Ameliorative Effects of *Hippophae Rhamnoides* L. Leaf Polysaccharides on Learning and Memory Abilities of Rats with Vascular Dementia

LIU Song, ZHAO Yan, LI Zongshu, WEI Haifeng\*

(Jilin Provincial People's Hospital, Changchun 130021, China)

**Abstract:** The effect of polysaccharides from *Hippophae rhamnoides* L. leaves on learning and memory ability was using a model of rats with vascular dementia. The sham operation group, model group, low-and high-dose polysaccharide from *H. rhamnoides* L. leaf groups (100 and 200 mg/kg), and Nimodipine group (6.25 mg/kg) were set up. The changes in related indicators were detected after 28 days of intervention. The results showed that, compared with that of the model group, the escape latency of low- and high-dose polysaccharides from *H. rhamnoides* L. leaf groups decreased by 24.35% and 32.90% ( $P<0.01$ ), the target quadrant residence time increased by 24.35% and 51.30% ( $P<0.01$ ), number of platform crossings increased by 29.33% and 60.58% ( $P<0.01$ ), and pathological morphology of hippocampal tissue was alleviated,

引文格式:

刘松,赵燕,李宗树,等.沙棘叶多糖对血管性痴呆大鼠学习记忆能力的改善作用[J].现代食品科技,2024,40(9):12-19.

LIU Song, ZHAO Yan, LI Zongshu, et al. Ameliorative effects of *Hippophae rhamnoides* L. leaf polysaccharides on learning and memory abilities of rats with vascular dementia [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 12-19.

收稿日期: 2023-08-15

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (YDZJ202201ZYTS217)

作者简介: 刘松 (1981-), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 脑血管病、神经免疫及认知障碍相关疾病的诊断与治疗, E-mail: liu\_song2023@163.com

通讯作者: 魏海峰 (1978-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 脑血管疾病的营养预防与治疗, E-mail: whfweb@163.com

respectively. The apoptosis rate of hippocampal neurons decreased along with B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), associated X protein (Bax), and Caspase-3 mRNA expression ( $P<0.01$ ). The Bcl-2 mRNA levels increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The activities of glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) and expression of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in the hippocampal tissue increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), while the malondialdehyde (MDA) content decreased ( $P<0.01$ ). These results indicated that the polysaccharides of *H. rhamnoides* L. leaves had an ameliorative effect on the learning and memory abilities of rats with vascular dementia by inhibiting apoptosis and oxidative stress, suggesting their potential in the prevention and treatment of vascular dementia.

**Key words:** polysaccharides from *Hippophae rhamnoides* L. leaf (HRLPs); vascular dementia (VD); learning and memory ability; apoptosis; oxidative stress

血管性痴呆以进行性认知功能障碍和学习记忆能力减退为典型特征, 缺血性或出血性脑血管疾病、循环及心血管系统疾病引起的脑损伤是导致该病的主要原因<sup>[1]</sup>。流行病学调查结果发现<sup>[2,3]</sup>, 我国痴呆患者人数约占全球总患病人数的 25%, 65 岁以上人群痴呆的发病率为 0.039%, 其中血管性痴呆占比 68.5%, 严重影响人们的健康及生活质量。目前, 血管性痴呆药物的治疗效果难以令人满意, 且缺乏系统性的治疗方案, 而从天然植物资源库中寻找合适的功效成分用于血管性痴呆的预防及治疗已成为新的研究热点<sup>[4]</sup>。

沙棘 (*Hippophae rhamnoides* L.) 是传统的药食同源植物, 又名醋柳、酸刺等, 为胡颓子科沙棘属小浆果果树, 富含多糖、多酚及黄酮等多种营养成分, 具有止咳、止痛、活血化瘀及助消化等多种功效<sup>[5]</sup>。研究发现<sup>[6]</sup>, 沙棘中的黄酮类成分能够提高痴呆模型大鼠的学习记忆水平, 其机制涉及抑制血清肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素  $1\beta$  的表达。沙棘中的多酚类成分也可以缩短阿尔茨海默症大鼠的逃避潜伏期并减少探索次数, 通过调控胆碱能神经递质增强学习记忆能力<sup>[7]</sup>。多糖为沙棘的重要活性物质, 具有提高免疫力及抗炎等多种功效<sup>[8,9]</sup>, 但迄今为止, 关于沙棘中的多糖成分是否具有改善学习记忆能力未见报道。

血管性痴呆发病机制极为复杂, 目前并未完全阐明, 但神经元凋亡、氧化应激、炎症反应、兴奋毒性、胆碱能系统功能紊乱等机制得到了较广泛的认同<sup>[10]</sup>。既往的研究已证实, 在多种动物模型中, 沙棘多糖均表现出了较强的抗凋亡及抑制氧化应激作用, 因此推测其可能具备改善学习记忆能力的潜在价值<sup>[11,12]</sup>。鉴于以上原因, 本研究通过颈总动脉结扎法建立血管性痴呆模型, 给予沙棘叶多糖干预后, 水迷宫实验评价学习记忆能力, 苏木精伊

红 (HE) 染色及 Nissl 染色观察海马组织病理形态, 并深入分析沙棘叶多糖对模型大鼠海马组织神经元凋亡及氧化应激的影响, 初步阐明其分子机制, 为沙棘叶多糖将来用于血管性痴呆的预防和治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SD 大鼠 (7~8 周龄), 雄性, 清洁级, 体质量 220~260 g, 共 80 只, 由辽宁长生生物技术股份有限公司提供 [SCXK (辽) 2020-0001]。大鼠分笼饲养于吉林大学实验动物中心, 许可证号: SYXK (吉) 2019-0012; 自由饮水及摄食, 饲养环境的相对湿度控制在 55%~65%, 温度控制在 23~25 °C, 昼夜循环交替。本研究经吉林省人民医院伦理委员会批准 (20220415002)。

### 1.2 试剂

沙棘叶干粉 (批号 20220618), 宁夏香草生物技术有限公司; 尼莫地平 (批号 20220527), 规格每片 20 mg, 山东健康药业有限公司; HE (批号 60502ES60)、Nissl (批号 60531ES60)、Tunel (批号 40306ES50) 染色试剂盒, 上海翌圣生物科技有限公司; Trizol 试剂 (批号 15596026)、逆转录试剂盒 (批号 4368814)、实时定量 PCR 试剂盒 (批号 4462159), 美国 Thermo Fisher 公司; 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px, 批号 A005-1-2)、超氧化物歧化酶 (SOD, 批号 A001-1-2)、过氧化氢酶 (CAT, 批号 A007-2-1) 活性及丙二醛 (MDA, 批号 A003-1-2) 含量检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所; 二奎啉甲酸 (BCA, 批号 JN7462) 检测试剂盒, 上海纪宁实业有限公司; 核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2, 批号 ab137550)、血红素氧合酶 -1 (HO-1, 批号

ab305290) 多克隆抗体, 美国 Abcam 公司;  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin, 批号 ml110007) 多克隆抗体及二抗 IgG (批号 ml087252), 上海酶联生物科技有限公司。

### 1.3 仪器

FD-1A-50 型冷冻真空干燥仪, 江苏天翎仪器有限公司; VRT-50 型旋转蒸发仪, 上海贤德实验仪器有限公司; TG18K-II 型冷冻高速离心机, 上海赵迪生物科技有限公司; 折叠型 Morris 水迷宫实验系统, 上海欣软信息科技有限公司; Ts2-FL 型倒置显微镜, 日本 Nikon 公司; 1337 型实时定量 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; UV-9000 型紫外-可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; Varioskan LUX 型多功能酶标分析仪, 美国 Thermo Fisher 公司; DYY-12 型蛋白电泳仪, 北京六一仪器厂; JS-2000 型凝胶成像分析系统, 上海培清科技有限公司。

### 1.4 沙棘叶多糖的提取

参照胡盼盼等<sup>[13]</sup>的方法, 取沙棘叶干粉 500 g, 加入蒸馏水 2 500 mL, 超声波萃取 (功率 400 W、时间 30 min、温度 70 °C、萃取次数 2 次)。将 2 次萃取液合并, 用旋转蒸发仪浓缩, 得沙棘叶多糖水提液。Sevage 法去除蛋白杂质, 用蒸馏水在室温下透析 48 h, 透析结束后再次用旋转蒸发仪浓缩。加入 3 倍体积的无水乙醇使其终体积分数为 75% (V/V), 在 4 °C 冰箱中沉淀过夜, 离心得醇沉物, 鼓风干燥除去残留乙醇。冷冻干燥, 获得沙棘叶多糖。称重后计算沙棘叶多糖提取率, 通过苯酚硫酸法测总糖含量, 间羟基联苯法测糖醛酸含量, 考马斯亮蓝法测可溶性蛋白含量。

### 1.5 模型建立、分组与干预

大鼠饲养 1 周适应环境后, 随机选取 15 只为假手术组, 剩余 65 只采用颈总动脉结扎法建立血管性痴呆模型<sup>[14]</sup>。术前正常饮水, 禁食 12 h, 用 40 mg/kg 戊巴比妥钠 (3%) 麻醉, 随后进行备皮、消毒及双侧颈总动脉结扎等操作。缝合后, 创口处撒阿莫西林预防感染。假手术组不结扎, 其余操作相同。将手术成功的大鼠 60 只分为模型组、低、高剂量沙棘叶多糖组及尼莫地平组, 每组均为 15 只。假手术组及模型组大鼠灌胃生理盐水, 低、高剂量沙棘叶多糖组大鼠灌胃 100、200 mg/kg 的沙棘叶多糖<sup>[15]</sup>, 尼莫地平组灌胃 6.25 mg/kg 的尼莫地平<sup>[16]</sup>,

灌胃体积均为 10 mL/kg, 每天 1 次, 持续 28 d。

### 1.6 行为学实验

干预 28 d 后, 通过水迷宫实验检测各组大鼠学习记忆能力。在实验开始前 1 d, 大鼠从水迷宫的 4 个象限入水自由游泳 2 min, 以熟悉环境。正式实验时, 将目标象限平台置于水面下 1 cm 位置处, 记录连续 5 d 的逃避潜伏期, 评价大鼠学习能力。第 6 天, 记录撤去平台后目标象限停留时间及平台穿越次数, 评价大鼠记忆能力。

### 1.7 组织样本取材

不禁水、禁食过夜, 于水迷宫实验完成后的次日进行组织样本取材。麻醉大鼠, 每组取 5 只, 灌注后取全脑, 放入多聚甲醛溶液中保存, 用于组织染色。各组剩余 10 只大鼠, 心尖采血制备血清, 取脑后将海马组织等部位分离; 血清及海马组织均保存在 -80 °C 冰箱中。

### 1.8 指标检测

#### 1.8.1 HE 染色、Nissl 染色及 TUNEL 染色

将保存在多聚甲醛溶液中的脑组织取出, 常规方法制备石蜡切片<sup>[17]</sup>, 按照试剂盒说明书行 HE 染色及 Nissl 染色, 观察海马组织病理变化; 参照 TUNEL 试剂盒中的操作指南, 分析海马神经元细胞凋亡。

#### 1.8.2 海马组织凋亡相关基因表达检测

实时定量 PCR 实验检测海马组织凋亡相关基因 B 淋巴细胞瘤 -2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 及半胱氨酸蛋白酶 -3 (Caspase-3) mRNA 表达<sup>[18]</sup>。通过 Trizol 试剂提取海马组织总 RNA, 逆转录为 cDNA 后进行 PCR 反应, 反应条件: 95 °C、5 min; 94 °C、15 s, 55 °C、20 s, 72 °C、20 s; 72 °C、10 min; 共 35 个循环。PCR 引物由长春可研生物科技有限公司提供, 引物序列见表 1。Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 等基因的表达水平采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。

#### 1.8.3 氧化应激指标检测

取大鼠海马组织, 按质量 (g): 体积 (mL) 为 1:9 的比例加入匀浆介质, 在冰水浴环境下匀浆, 离心后的上清液即为海马组织匀浆液; 氧化应激指标 GSH-Px、SOD、CAT 活性及 MDA 含量通过比色法检测, 相关操作参照试剂盒说明书。



表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	引物 (5'→3')	长度/bp
<i>Bcl-2</i>	正向: TGCAGATGCCGGTTCAGGTAC	121
	反向: GGGAGCGTCAACAGGGAGATG	
<i>Bax</i>	正向: GAGACACTCGCTCAGCTTCTTG	174
	反向: TTGCTACAGGGTTTCATCCAGG	
<i>Caspase-3</i>	正向: GCAGCAGCCTCAAATTGTTGAC	158
	反向: TGCTCCGGCTCAAACCATC	
$\beta$ -actin	正向: CACGATGGAGGGGCCGACTCATC	240
	反向: TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	

#### 1.8.4 海马组织Nrf2及HO-1蛋白表达检测

通过 Western blot 法检测海马组织 Nrf2 及 HO-1 蛋白表达<sup>[19]</sup>。海马组织经 RIPA 裂解液处理后, BCA 法定量总蛋白。取 30  $\mu$ g 总蛋白样本行 10% SDS-PAGE 电泳, 半干法转至 PVDF 膜, 加入脱脂奶粉封闭 2 h。TBST 洗膜, 分别加入 Nrf2 (1:1 000)、HO-1 (1:1 000) 及  $\beta$ -actin (1:2 500) 多克隆抗体, 在 4  $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜。TBST 洗膜, 加入相应的 IgG 二抗 (1:5 000), 在室温环境下孵育 1 h。TBST 再次洗膜, 加入适量显影液, 曝光后用 Image J 图像软件分析目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值。

#### 1.9 数据处理与统计

所有数据均采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示, 并通过 SPSS 20.0 软件进行数据处理与统计。两组间数据统计分析采用 *t* 检验, 多组间数据统计分析采用单因素方差分析,  $P<0.05$  或  $P<0.01$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 沙棘叶多糖的提取率及含量分析

沙棘叶干粉 (500 g) 经超声波辅助法提取后, 共获得沙棘叶多糖 36.41 g, 提取率为 7.28%。制得的沙棘叶多糖的总糖含量为 76.53%, 此外还含有糖醛酸 14.45%, 可溶性蛋白质 1.71%。沙棘中的糖醛酸及可溶性蛋白质成分, 目前并未发现具有抗凋亡、抑制氧化应激及改善学习记忆能力作用; 且含量相对较低, 不能发挥主导作用。因此, 糖醛酸、可溶性蛋白质的存在, 并不会对本实验结果产生影响。

### 2.2 沙棘叶多糖对血管性痴呆大鼠学习能力的影

本研究结果发现, 第 1 天, 各组大鼠逃避潜伏

期无明显差异 ( $P>0.05$ ); 随着时间的延长, 各组大鼠逃避潜伏期均逐渐降低。模型组大鼠学习能力较差, 从第 2 天开始, 其逃避潜伏期高于假手术组 ( $P<0.01$ )。与模型组比较, 沙棘叶多糖低、高剂量组及尼莫地平组大鼠在第 2、3、4、5 天的逃避潜伏期均降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 在第 5 天, 沙棘叶多糖低、高剂量组及尼莫地平组大鼠逃避潜伏期分别降低了 24.35%、32.90% 及 41.91%, 表明沙棘叶多糖可以提高血管性痴呆大鼠的学习能力。逃避潜伏期比较结果, 见表 2。汤威威等<sup>[20]</sup>研究也证实, 沙棘中的多酚提取物、沙棘果油提取物均可以缩短阿尔茨海默病小鼠的逃避潜伏期 (20.17% 及 26.62%), 与本研究结果接近, 说明沙棘中的多种功效成分均可以有效缩短逃避潜伏期, 进而发挥改善学习能力作用; 但多酚提取物、沙棘果油提取物的干预剂量为 1.6 g/kg, 远高于本研究中沙棘叶多糖的干预剂量, 提示沙棘叶多糖的效果更好。

### 2.3 沙棘叶多糖对血管性痴呆大鼠记忆能力的影响

既往的研究发现<sup>[21]</sup>, 中、高剂量的沙棘总黄酮可以将血管性痴呆模型大鼠的目标平台穿越次数分别提升 56.94% 和 86.42%, 进而改善记忆能力。陈正爱等<sup>[22]</sup>研究证实, 在  $A\beta_{25-35}$  诱导的阿尔茨海默病模型大鼠中, 沙棘乙醇提取物也可以明显增加目标平台穿越次数, 进而提升大鼠记忆能力。本研究结果同样发现, 与模型组比较, 沙棘叶多糖低、高剂量组及尼莫地平组大鼠目标象限停留时间及平台穿越次数均明显增加 ( $P<0.01$ ), 其中目标象限停留时间分别增加了 24.35%、51.30%、88.84%, 平台穿越次数增加了 29.33%、60.58%、88.46%, 提示沙棘叶多糖具有提高血管性痴呆大鼠记忆能力的作用。目标象限停留时间及平台穿越次数比较结果, 见表 3。

表 2 逃避潜伏期比较

Table 2 The comparison of escape latent period ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=15$ )

分组	逃避潜伏期/s				
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
假手术组	55.98 ± 4.82	35.17 ± 3.29**	22.18 ± 2.35**	17.24 ± 2.02**	13.50 ± 1.49**
模型组	58.12 ± 5.30	51.60 ± 4.52	38.64 ± 3.12	34.96 ± 4.61	32.07 ± 4.10
沙棘叶多糖低剂量组	57.23 ± 3.71	47.44 ± 5.60*	33.71 ± 4.25**	27.87 ± 2.16**	24.26 ± 2.35**
沙棘叶多糖高剂量组	57.06 ± 4.05	45.89 ± 4.31**	29.38 ± 2.92**	25.53 ± 3.24**	21.52 ± 2.83**
尼莫地平组	56.34 ± 6.05	42.35 ± 4.98**	26.85 ± 3.09**	23.41 ± 2.88**	18.63 ± 2.67**

注: 与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

表 3 目标象限停留时间及平台穿越次数比较

Table 3 The comparison of target quadrant residence time and platform crossing times ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=15$ )

分组	目标象限停留时间/s	平台穿越次数/次
假手术组	20.53 ± 2.48**	6.22 ± 0.73**
模型组	8.87 ± 0.86	2.08 ± 0.36
沙棘叶多糖低剂量组	11.03 ± 1.31**	2.69 ± 0.37**
沙棘叶多糖高剂量组	13.42 ± 1.05**	3.34 ± 0.45**
尼莫地平组	16.75 ± 1.92**	3.92 ± 0.40**

注: 与模型组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

### 2.4 沙棘叶多糖对血管性痴呆大鼠海马组织病理形态的影响

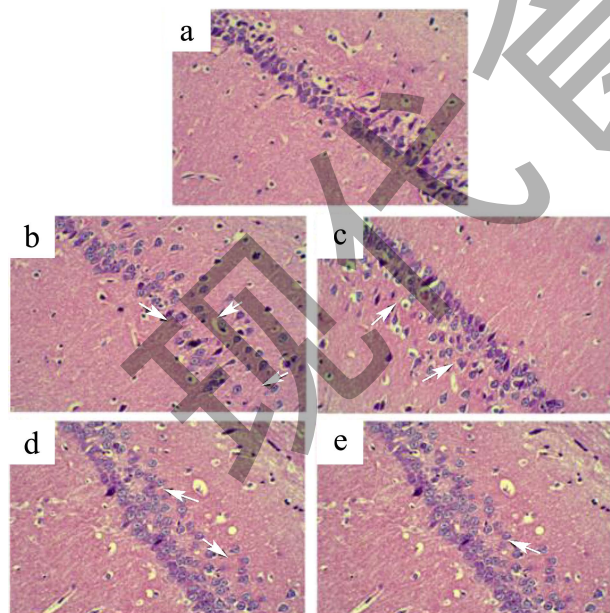


图 1 HE 染色检测海马组织 CA1 区病理形态

Fig.1 Pathological morphology of CA1 region of hippocampus detected by HE staining ( $\times 400$ )

注: (a) 假手术组; (b) 模型组; (c) 沙棘叶多糖低剂量组; (d) 沙棘叶多糖高剂量组; (e) 尼莫地平组。下图同。箭头所指位置为神经元排列稀疏、紊乱。

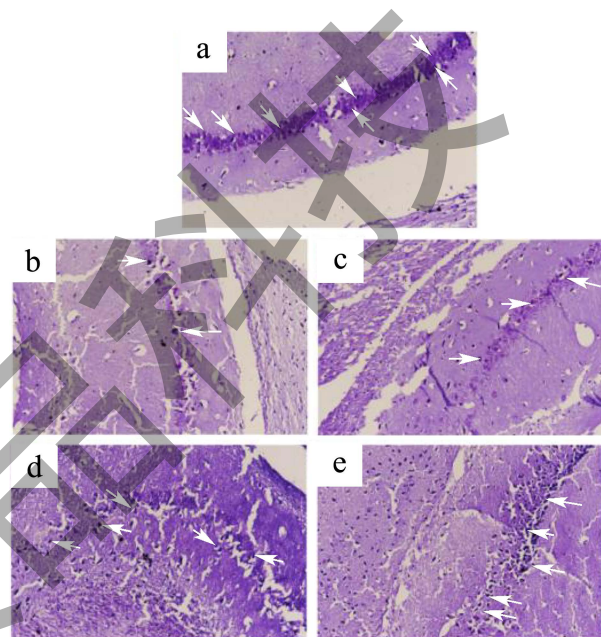


图 2 Nissl 染色检测海马组织 CA1 区病理形态

Fig.2 Pathological morphology of CA1 region of hippocampus detected by Nissl staining ( $\times 400$ )

注: 箭头所指位置为尼氏小体。

HE 染色结果显示 (见图 1), 假手术组大鼠神经元细胞紧密排列、整齐, 形态规则; 模型组大鼠神经元细胞稀疏排列, 形态不规则、间隙变大, 如箭头所指位置; 沙棘叶多糖低、高剂量组及尼莫地平组大鼠神经元细胞排列稀疏且紊乱的现象有所好转, 形态较规则。Nissl 染色结果显示 (见图 2), 假手术组大鼠尼氏小体数量较多, 如箭头所指位置; 模型组大鼠尼氏小体丢失明显, 数量减少; 同模型组比较, 沙棘叶多糖低、高剂量组及尼莫地平组大鼠尼氏小体丢失情况缓解, 尼氏小体数量增加, 且以沙棘叶多糖高剂量组及尼莫地平组效果最佳。

### 2.5 沙棘叶多糖对血管性痴呆大鼠海马组织神经元细胞凋亡的影响

海马神经元凋亡或丢失将引起海马组织接收其



它联络区域信息能力的下降，导致学习和记忆功能障碍<sup>[23]</sup>。本研究采用 Tunel 染色检测了沙棘叶多糖对血管性痴呆大鼠神经元细胞凋亡的影响，结果如图 3 及表 4 所示。正常神经元细胞核为蓝色，凋亡神经元细胞核中有棕黄色颗粒，由此可见模型组大鼠海马组织中有较多凋亡细胞存在。与模型组比较，沙棘叶多糖低、高剂量组及尼莫地平组大鼠海马组织神经元细胞凋亡率分别减少了 31.72%、45.70%、51.88% ( $P<0.01$ )，表明沙棘叶多糖具有抑制神经元细胞凋亡的作用。

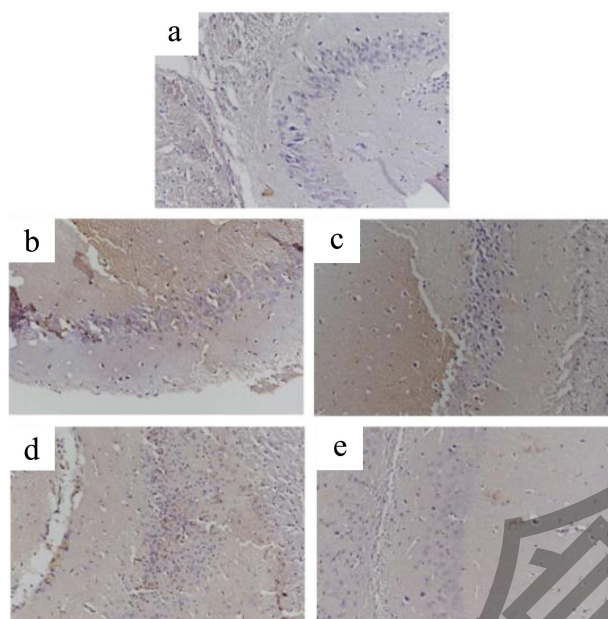


图 3 Tunel 染色检测海马组织神经元细胞凋亡  
Fig.3 Apoptosis of hippocampal neurons of CA1 region detected by HE Tunel staining ( $\times 400$ )

表 4 神经元细胞凋亡率比较

Table 4 Comparison of apoptosis rate in hippocampal neurons ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

分组	凋亡率/%
假手术组	3.23 $\pm$ 0.58**
模型组	12.80 $\pm$ 1.35
沙棘叶多糖低剂量组	8.74 $\pm$ 1.06**
沙棘叶多糖高剂量组	6.95 $\pm$ 0.73**
尼莫地平组	6.16 $\pm$ 0.84**

注：与模型组比较，\*\* $P<0.01$ 。

## 2.6 沙棘叶多糖对血管性痴呆大鼠海马组织 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 mRNA 表达的影响

本研究为了进一步验证沙棘叶多糖对血管性痴呆大鼠海马组织神经元细胞凋亡的作用，通过实时定量 PCR 法检测了海马组织 Bcl-2、Bax 及

Caspase-3 mRNA 表达，结果如表 5 所示。与模型组比较，沙棘叶多糖低、高剂量组及尼莫地平组大鼠海马组织 Bcl-2 mRNA 表达增加了 32.65%、127.27%、163.63%，Bax mRNA 表达降低了 38.41%、56.91%、66.05%，Caspase-3 mRNA 表达降低了 37.99%、45.12%、50.92%，差异均具有统计学意义 ( $P<0.05, P<0.01$ )，从基因水平上再次明确了沙棘叶多糖具有抗海马组织神经元细胞凋亡作用。沙棘多糖预处理对 LPS 诱导的 IPEC-J2 细胞损伤的保护作用，其机制主要涉及上调 Bcl-2 表达及下调 Bax、Caspase-3 表达，进而发挥抗凋亡作用，其结论与本实验结果相符<sup>[24]</sup>。

表 5 海马组织 Bcl-2、Bax 及 Caspase-3 mRNA 表达比较  
Table 5 The comparison of Bcl-2, Bax and Caspase-3 mRNA levels in hippocampal tissue ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

分组	Bcl-2	Bax	Caspase-3
假手术组	1.02 $\pm$ 0.04**	1.04 $\pm$ 0.02**	1.01 $\pm$ 0.03**
模型组	0.33 $\pm$ 0.03	4.92 $\pm$ 0.58	3.79 $\pm$ 0.46
沙棘叶多糖低剂量组	0.49 $\pm$ 0.06*	3.03 $\pm$ 0.36**	2.35 $\pm$ 0.21**
沙棘叶多糖高剂量组	0.75 $\pm$ 0.08**	2.12 $\pm$ 0.31**	2.08 $\pm$ 0.25**
尼莫地平组	0.87 $\pm$ 0.10**	1.67 $\pm$ 0.24**	1.86 $\pm$ 0.19**

注：与模型组比较，\* $P<0.05$ ，\*\* $P<0.01$ 。

## 2.7 沙棘叶多糖对血管性痴呆大鼠海马组织氧化应激水平的影响

氧化应激水平升高是血管性痴呆发病的重要环节，当双侧颈总动脉结扎后，脑组织缺血、缺氧，从而生成过量自由基，造成细胞膜破裂，导致神经细胞损伤、凋亡甚至死亡<sup>[25,26]</sup>。因而，抑制氧化应激是治疗血管性痴呆的有效策略。本研究结果发现，假手术组大鼠海马组织 GSH-Px、SOD、CAT 活性高于模型组 ( $P<0.01$ )，MDA 含量低于模型组 ( $P<0.01$ )，表明模型组大鼠海马组织存在氧化损伤。与模型组比较，沙棘叶多糖低、高剂量组及尼莫地平组大鼠海马组织 GSH-Px 活性增加了 24.47%、54.60%、90.96%，SOD 活性增加了 20.19%、98.40%、125.97%，CAT 活性增加了 12.07%、21.17%、37.76%，MDA 含量降低了 23.16%、36.25%、44.93%，差异具有统计学意义 ( $P<0.05, P<0.01$ )，结果见表 6。沙棘多糖的体外与体内抗氧化作用多见报道。Zhu 等<sup>[27]</sup>研究发现，沙棘多糖具有明显的体外抗氧化活性，能够有效清除氧阴离子自由基、OH 自由基和

DPPH 自由基。包晓玮等<sup>[28]</sup>研究发现, D- 半乳糖致亚急性衰老模型小鼠经沙棘多糖干预 30 d 后, 血清、脑组织及肝脏中 SOD、GSH-Px 活性升高, MDA 含量下降, 表现出了明显的体内抗氧化作用。氧化应激反应与血管性痴呆症状严重与否呈

正相关, 是导致脑血管损伤的重要原因。因此, 本研究结果可以证实, 在血管性痴呆大鼠模型中, 沙棘叶多糖也可以通过抑制海马组织氧化应激反应, 减轻海马组织氧化损伤, 进而发挥改善学习记忆能力作用。

表 6 海马组织GSH-Px、SOD、CAT活性及MDA含量比较

Table 6 The comparison of GSH-Px, SOD and CAT activities and MDA content in hippocampal tissue ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

分组	GSH-Px/(U/mg pro)	SOD/(U/mg pro)	CAT/(U/mg pro)	MDA/(U/mg pro)
假手术组	238.73 ± 21.65**	76.94 ± 8.02**	19.04 ± 2.24**	5.31 ± 0.61**
模型组	97.34 ± 10.30	27.58 ± 4.36	11.76 ± 0.98	13.60 ± 1.44
沙棘叶多糖低剂量组	121.16 ± 13.57**	33.15 ± 3.18**	13.18 ± 1.26*	10.45 ± 0.83**
沙棘叶多糖高剂量组	150.49 ± 17.36**	54.72 ± 6.07**	14.25 ± 1.59**	8.67 ± 1.05**
尼莫地平组	185.88 ± 16.02**	62.33 ± 8.89**	16.20 ± 1.83**	7.49 ± 0.97**

注: 与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

## 2.8 沙棘叶多糖对血管性痴呆大鼠海马组织 Nrf2 及 HO-1 蛋白表达的影响

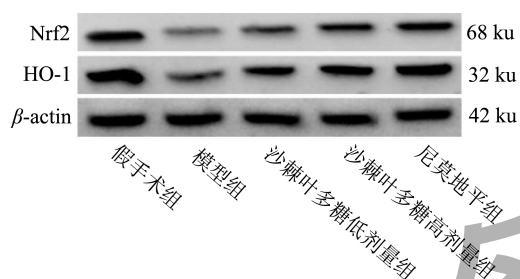


图 4 Western blot 法检测 Nrf2 及 HO-1 蛋白表达

Fig.4 The expressions of Nrf2 and HO-1 detected by Western blot assay

表 7 Nrf2及HO-1蛋白表达比较

Table 7 The comparison of Nrf2 and HO-1 expressions ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

分组	Nrf2/( $\beta$ -actin)	HO-1/( $\beta$ -actin)
假手术组	0.91 ± 0.10**	1.12 ± 0.09**
模型组	0.18 ± 0.02	0.25 ± 0.03
沙棘叶多糖低剂量组	0.32 ± 0.03**	0.53 ± 0.04**
沙棘叶多糖高剂量组	0.45 ± 0.05**	0.69 ± 0.06**
尼莫地平组	0.77 ± 0.08**	0.94 ± 0.11**

注: 与模型组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

Nrf2/HO-1 通路在机体氧化及抗氧化反应的调控中具有重要意义, 活化 Nrf2/HO-1 通路能有效降低血管性痴呆大鼠的氧化应激水平, 通过减轻氧化损伤而促进学习记忆能力的提高<sup>[29]</sup>。本研究为了进一步明确沙棘叶多糖抑制血管性痴呆大鼠海马组织氧化应激作用的机制, 检测了海马组织 Nrf2 及 HO-1 蛋白表达, 结果如图 4 及表 7 所示。与模型

组比较, 沙棘叶多糖低、高剂量组及尼莫地平组大鼠海马组织 Nrf2 及 HO-1 蛋白表达增加 ( $P < 0.01$ ), 其中 Nrf2 蛋白表达是模型组的 1.78、2.50、4.28 倍, HO-1 蛋白表达是模型组的 2.12、2.76、3.76 倍, 表明激活 Nrf2/HO-1 通路是沙棘叶多糖发挥抗氧化应激作用的潜在原因。在沙棘多糖处理的胰岛素抵抗 HepG2 细胞模型中, SOD 活性下降, MDA 含量升高, Nrf2 和 HO-1 表达增加, 提示沙棘多糖同样可以在该细胞模型中通过激活 Nrf2/HO-1 通路发挥抗氧化作用, 与本研究结论相符<sup>[30]</sup>。但也有研究证实<sup>[31]</sup>, 沙棘多糖对高脂饮食诱导的小鼠认知功能障碍的影响, 与抑制神经炎症进而改善突触功能障碍有关, 而沙棘叶多糖是否也可以通过该机制发挥改善血管性痴呆大鼠学习记忆能力作用, 有待于进一步的深入研究。

## 3 结论

本研究发现, 血管性痴呆大鼠经沙棘叶多糖干预后, 逃避潜伏期降低, 目标象限停留时间及平台穿越次数增加, 同时海马组织病理形态减轻, 表明沙棘叶多糖具有改善学习记忆能力作用。同时, 本研究结果也明确了沙棘叶多糖干预可以减少血管性痴呆大鼠神经元细胞凋亡率, 增加海马组织 Bcl-2 mRNA 表达, 降低 Bax 及 Caspase-3 mRNA 表达, 提示沙棘叶多糖具有抗海马组织神经元细胞凋亡作用。此外, 本研究结果还证实, 沙棘叶多糖能够增加模型大鼠海马组织 GSH-Px、SOD、CAT 活性及 Nrf2、HO-1 蛋白表达, 降低 MDA 含量, 说明沙棘叶多糖可以通过激活 Nrf2/HO-1 通路发挥抗氧化应激作用。

综上所述, 沙棘叶多糖具有改善血管性痴呆大

鼠学习记忆能力的作用, 该机制与抗凋亡及抑制氧化应激有关, 表明其在预防和治疗血管性痴呆方面有一定的开发前景。

### 参考文献

- [1] INOUE Y, SHUE F, BU G, et al. Pathophysiology and probable etiology of cerebral small vessel disease in vascular dementia and Alzheimer's disease [J]. *Molecular Neurodegeneration*, 2023, 18(1): 46.
- [2] WANG C, HAN X, DONG Y, et al. Associations of WWC1 variants with Alzheimer's disease and vascular dementia among rural older adults in China: a population-based study [J]. *Neurobiology of Aging*, 2023, 125: 109-114.
- [3] WANG Y, LI S, ZHOU Q, et al. Vascular dementia has the highest hospitalisation rate in China: a nationwide hospital information system study [J]. *Stroke and Vascular Neurology*, 2023, 8(1): 59-68.
- [4] WANG Z, ZHANG Z, LIU J, et al. Panax ginseng in the treatment of Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2023, 47(4): 506-514.
- [5] 宁志雪, 牛广财, 朱立斌, 等. 沙棘活性成分、生理功能及开发利用研究进展[J]. *食品与机械*, 2021, 37(11): 221-227, 240.
- [6] 乔晓鸣, 任世存. 血管性痴呆模型大鼠接受沙棘总黄酮后血清肿瘤坏死因子 $\alpha$ 及白细胞介素 $1\beta$ 的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(36): 5819-5824.
- [7] 王伟铨, 张宇, 王宇亮, 等. 沙棘果多酚提取工艺优化及其抗阿尔茨海默症活性[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(6): 135-141.
- [8] 任薇, 包晓玮, 张志芳, 等. 沙棘多糖清除自由基及抗脂质过氧化作用研究[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(8): 272-277.
- [9] 丁肇俊, 叶健文, 马佳琪, 等. 沙棘叶化学成分及药理作用研究进展[J]. *世界中医药*, 2023, 18(5): 714-720.
- [10] KUANG H, ZHOU Z F, ZHU Y G, et al. Pharmacological treatment of vascular dementia: a molecular mechanism perspective [J]. *Aging and Disease*, 2021, 12(1): 308-326.
- [11] 王慧, 张鑫, 薛乾隆, 等. 基于肝脏特异性PPAR $\gamma$ 敲除小鼠研究沙棘多糖减轻脓毒症诱导肝损伤的作用及机制[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(7): 789-794.
- [12] 刘明杰. 沙棘多糖的分离纯化及其抗运动性疲劳作用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(10): 4009-4013.
- [13] 胡盼盼. 沙棘叶多糖的提取优化及对CT-26细胞增殖的影响[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(24): 159-164.
- [14] CHEN Y X, YANG H, WANG D S, et al. Gastrodin relieves cognitive impairment by regulating autophagy via PI3K/AKT signaling pathway in vascular dementia [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2023, 671: 246-254.
- [15] 刘雅娜, 包晓玮, 王娟, 等. 沙棘多糖抗运动性疲劳及抗氧化作用的研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(10): 321-326.
- [16] 任俊豪, 徐萍, 李双阳, 等. 通窍益智颗粒对血管性痴呆大鼠血脑屏障功能及血管新生的影响及机制研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31(23): 3238-3245, 3334.
- [17] 丁航, 徐德峰, 李彩虹. 核桃蛋白水解肽改善大鼠酒精性认知下降的作用机制[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(19): 6290-6298.
- [18] 蔡茜茜, 李晨, 陈旭, 等. 笛鲷鱼鳞源功能多肽对Caco-2细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. *食品科学*, 2023, 44(7): 10-17.
- [19] 张镇涛, 周海城, 顾凌飞, 等. 番茄红素对 $\beta$ -淀粉样蛋白诱导的脉络丛上皮细胞A $\beta$ 转运相关蛋白表达及海马氧化损伤的影响[J]. *营养学报*, 2020, 42(3): 270-274.
- [20] 汤威威, 赵宏, 孔令洲, 等. 基于网络药理学及分子对接技术探讨沙棘治疗阿尔茨海默病的作用机制[J]. *中国药房*, 2020, 31(19): 2325-2332.
- [21] 乔晓鸣, 任世存. 沙棘总黄酮对血管性痴呆模型大鼠行为学和血液流变学的影响[J]. *青海医学院学报*, 2012, 33(2): 127-130.
- [22] 陈正爱, 金香子. 沙棘对阿尔茨海默病模型大鼠的影响[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(12): 3145-3146.
- [23] GAO L, LIU F, LIU R. The mechanism of aerobic exercise regulating the PI3K/Akt-mTOR signaling pathway intervenes in hippocampal neuronal apoptosis in vascular dementia rats [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2023, 20(3): 1893.
- [24] ZHAO L, GENG T, SUN K, et al. Proteomic analysis reveals the molecular mechanism of *Hippophae rhamnoides* polysaccharide intervention in LPS-induced inflammation of IPEC-J2 cells in piglets [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 3294-3304.
- [25] GUO T, FANG J, TONG Z Y, et al. Transcranial direct current stimulation ameliorates cognitive impairment via modulating oxidative stress, inflammation, and autophagy in a rat model of vascular dementia [J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2020, 14: 28.
- [26] BHATIA P, SINGH N. Tadalafil ameliorates memory deficits, oxidative stress, endothelial dysfunction and neuropathological changes in rat model of hyperhomocysteinemia induced vascular dementia [J]. *The International Journal of Neuroscience*, 2022, 132(4): 384-396.
- [27] ZHU Y, WU M, LI X, et al. Flash extraction, characterization, and immunoenhancement activity of polysaccharide from *Hippophae rhamnoides* Linn [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2023, 20(3): e202200776.
- [28] 包晓玮, 李建瑛, 任薇, 等. 沙棘多糖对D半乳糖致衰老小鼠的抗氧化作用[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(4): 293-297, 306.
- [29] YADAV A, SUNKARIA A, SINGHAL N, et al. Resveratrol loaded solid lipid nanoparticles attenuate mitochondrial oxidative stress in vascular dementia by activating Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Neurochemistry International*, 2018, 112: 239-254.
- [30] 王秋丹, 赵凯迪, 林长青. 沙棘多糖对胰岛素抵抗HepG2细胞氧化应激的保护作用与机制[J]. *食品与机械*, 2022, 38(3): 167-172.
- [31] LAN Y, MA Z, CHANG L, et al. *Sea buckthorn polysaccharide* ameliorates high-fat diet induced mice neuroinflammation and synaptic dysfunction via regulating gut dysbiosis [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 236: 123797.