

龙眼果肉提取物改善 SAMP8 小鼠学习记忆功能

冉玉兵^{1,2}, 刘磊², 张瑞芬², 黄菲², 魏振承², 张名位²

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430000) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

摘要: 探讨龙眼果肉醇提物的石油醚相 (LP) 和水相 (LW) 对小鼠学习记忆功能的改善效果及作用机制。以 SAMP8 小鼠为老年痴呆模型, 采用 Morris 水迷宫观察小鼠的学习记忆能力; 检测小鼠血清中一氧化氮 (NO)、丙二醛 (MDA) 和谷胱甘肽 (GSH) 含量及超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力; Western blot 法检测小鼠脑组织中 β -淀粉样蛋白 ($A\beta_{1-42}$) 等相关蛋白 (淀粉样前体蛋白 (APP)、 β -淀粉样前体蛋白裂解酶 1 (BACE1)) 的表达水平。研究发现, 与模型组相比, LP 和 LW 能显著改善痴呆小鼠的学习记忆功能, 分别不同程度地降低其血清中 NO 和 MDA 含量以及脑组织中 $A\beta_{1-42}$ 、APP 和 BACE1 的蛋白表达, 提高其血清中 SOD 和 GSH-Px 活力。以上结果表明 LP 和 LW 可能通过提高小鼠机体的抗氧化能力和抑制其脑组织中 $A\beta$ 等相关蛋白的表达的共同作用来改善痴呆小鼠的学习记忆功能, 具有预防老年痴呆症的潜在功效。

关键词: 龙眼果肉; 老年痴呆; 学习记忆功能; 抗氧化; β -淀粉样蛋白

文章编号: 1673-9078(2017)6-1-8

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.001

Ameliorative Effect of Longan Pulp Extracts on the Learning and Memory Deficits in SAMP8 Mice

RAN Yu-bing^{1,2}, LIU Lei², ZHANG Rui-fen², HUANG Fei², WEI Zhen-cheng², ZHANG Ming-wei²

(1. Department of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430000, China) (2. Sericultural & Agri-food Research Institute Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Foods, Ministry of Agriculture, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China)

Abstract: The effect and mechanism of the petroleum ether fraction (LP) and aqueous fraction (LW) of ethanol extract of longan pulp on improving the learning and memory of SAMP8 mice were investigated. SAMP8 mice were used as a mouse model of Alzheimer's disease, and the Morris water maze test was used to evaluate their learning and memory. Nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), and reduced glutathione (GSH) levels, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in the serum, and the protein expression levels of amyloid-beta ($A\beta_{1-42}$), amyloid precursor protein (APP), and beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in the brains of mice were measured. The results showed that, compared to the model group, LP and LW could significantly ameliorate the learning and memory deficits in Alzheimer's model mice, decrease the serum NO and MDA content and the protein expression levels of $A\beta_{1-42}$, APP, and BACE1 in the brain to various degrees, and enhance the activities of SOD and GSH-Px in the serum. These results indicate that both LP and LW of ethanol extract of longan pulp could ameliorate the learning and memory deficits in SAMP8 mice, through a combination of improved antioxidant activity and inhibition of the expression of $A\beta$ and its relevant proteins in the brain, exhibiting the potential to prevent Alzheimer's disease.

Key words: longan pulp; Alzheimer's disease; learning and memory; antioxidative ability; β -amyloid protein

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种进行性中枢神经系统退行性疾病, 主要临床表现为记

收稿日期: 2017-02-21

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31301459); 国家重点研发计划 (2016YFD0400702-2); 广东省自然科学基金项目 (2014A030313568); 广东省省级科技计划项目 (2016B070701012); 广州市珠江科技新星专项项目 (201506010028); 广州市科技计划项目 (201704020039)

作者简介: 冉玉兵 (1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 功能食品

通讯作者: 张名位 (1967-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 功能食品

忆力减退和认知障碍等, 脑组织中 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, $A\beta$) 聚集形成的老年斑 (senile plaque) 是其病理变化之一^[1]。据报道, 2013 年全球患有老年痴呆症的人口已到 4400 万, 2050 年将增加到 1.35 亿^[2], 而 AD 作为老年痴呆症中最常见的一种疾病, 如何预防 AD 的发生正得到越来越多的关注和研究, 因此, 开发具有预防老年痴呆功效的龙眼功能食品具有较大的应用价值和市场前景。

龙眼俗称“桂圆”, 是我国传统的药食两用水果,

目前已有少量研究证明龙眼果肉具有改善 AD 的功效^[3-5], 并探讨了其作用机制。阿尔茨海默病的发病机制复杂并且多样, 氧化应激学说是引发 AD 的可能机制之一, Park^[3]等人研究发现龙眼水提取物可以改善小鼠的学习记忆功能, 但未研究其对小鼠机体抗氧化系统的影响。白亚娟^[4]和骆萍^[5]等人虽然研究了龙眼果肉水提取物和醇提取物对 AD 老鼠机体内超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和丙二醛 (MDA) 的影响, 但是这些指标研究并不全面, 也不够深入, 局限于化学水平。 $A\beta$ 级联假说是目前最被认可的 AD 发病原因, 但以上关于龙眼果肉改善 AD 的研究均未涉及。大脑中 $A\beta$ 蛋白的过度聚集往往会引发神经突触丧失、炎症反应和细胞死亡等一系列问题, 在 AD 等神经退行性疾病的病程进程中起着重要作用^[6]。目前多采用 $A\beta_{1-42}$ 为 $A\beta$ 蛋白的研究对象, 其毒性较大, 在 AD 患者脑中往往会异常增加, 并且是老年斑的主要成分^[7-9]。淀粉样前体蛋白 (APP) 是 $A\beta$ 的前体蛋白, 广泛分布于正常脑组织中, 具有细胞毒性和促细胞生长分化的双重作用^[10], 但其过量表达对 $A\beta$ 的形成、聚集及 AD 的发生具有重要作用。 β -淀粉样前体蛋白裂解酶 1 (BACE1) 能够分解 APP 蛋白进而加工形成 $A\beta$, 其对大脑中 $A\beta$ 的生成起决定性作用, 因此, 抑制 BACE1 的表达能够有效地预防 AD 的发生^[11,12]。本文采用溶剂分离法得到龙眼果肉醇提取物的石油醚相和水相, 并以 SAMP8 小鼠为老年痴呆模型, 分别以不同剂量的石油醚相和水相灌胃小鼠, 研究其改善老年痴呆模型小鼠学习记忆功能的效果, 并探究其对小鼠机体抗氧化系统和 $A\beta$ 级联假说中 $A\beta_{1-42}$ 、APP 和 BACE1 蛋白表达的影响, 以期对龙眼果肉醇提取物中不同极性提取物改善小鼠学习记忆功能的效果及作用机制提供参考, 进而为开发具有预防老年痴呆功效的龙眼功能食品提供借鉴和指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

龙眼 (储良) 由广东省农科院果树研究所提供; 一氧化氮 (Nitric Oxide, NO)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 和还原型谷胱甘肽 (Reduced glutathione, GSH) 试剂盒均购于南京建成生物工程研究所; 抗 $A\beta_{1-42}$ 、APP 和 BACE1 抗体均购于英国 abcam 公司; RIPA 蛋白提取试剂盒, 美国 Bio-rad 公司; GADPH, 美国 Epitomics 公司; 95%乙

醇 (分析纯), 天津市大茂化学试剂厂; 石油醚 (30~60 °C), 天津市富宇精细化工有限公司; 羧甲基纤维素钠 (Carboxymethyl cellulose sodium, CMC), 郑州金利达化工助剂有限公司; 其余试剂均为分析纯。

1.2 动物与饲养条件

SAMR1 小鼠 10 只, SAMP8 小鼠 50 只, SPF 级, 体重 28~32 g, 均为 3 月龄雄性, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK (京)2011-0012。动物饲养条件: 单笼饲养, 饲养温度 20~26 °C, 饲养湿度: 40~70%, 采用 12 h/12 h 昼夜间断照明, 以全价颗粒饲料饲养, 自由进食和饮水。

1.3 仪器与设备

TNC-1036 全食物全营养调理机 (用于打浆), 广州政邦电器有限公司; TD6 离心机, 长沙湘智离心机仪器有限公司; FDU-2110 真空冷冻干燥机、EYELA CA-2600 旋转蒸发仪, 东京理化器械株式会社; UV1800 型紫外可见分光光度计, 日本岛津有限公司; Bio Tek Gen5 酶标仪, 美国 Bio Tek 公司; HZQXX 型振荡器, 哈尔滨东联电子开发有限公司; 冷冻离心机, 美国 Thermo Electron 公司; 磁力搅拌水浴锅, 上海乔跃电子有限公司; DYY-6C 电泳仪, 北京六一仪器厂; AX-II 暗匣, 广东粤华医疗器械厂有限公司; 感光胶片, 美国 Eastman Kodak 公司; V300 扫描仪, 日本 EPSON 公司; Morris 水迷宫, 北京中科院生理所。

1.4 方法

1.4.1 龙眼果肉醇提取物的石油醚相 (LP) 和水相 (LW) 的制备

取一定量新鲜龙眼果肉, 按 1:3 (m/V) 加入 95% 乙醇打浆, 4 °C 浸泡 7 d, 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液重复离心一次, 45 °C 减压浓缩至无乙醇蒸出, 得龙眼果肉醇提取物。取一定体积龙眼果肉醇提取物于分液漏斗中, 按 1:1 (V/V) 加入石油醚, 振摇静置, 待溶液完全分层后, 放出下层水溶液, 再重复萃取 2 次。将 3 次的石油醚层合并, 在 40 °C 下减压回收石油醚溶剂, 得龙眼果肉醇提取物的石油醚相, 即龙眼石油醚相 (LP, 含水量 2.57%); 剩余水溶液浓缩后-80 °C 真空冷冻干燥, 得龙眼果肉醇提取物的水相, 即龙眼水相 (LW, 含水量 7.25%)。

1.4.2 动物分组及给药

50 只 SAMP8 小鼠随机分成 5 组, 即模型组 (SAMP8), 龙眼石油醚相高剂量组 (LPH), 龙眼石油醚相低剂量组 (LPL), 龙眼水相高剂量组 (LWH),

龙眼水相低剂量组 (LWL), 每组 10 只。另设 10 只 SAMR1 小鼠为正常对照组 (SAMR1)。龙眼石油醚相和水相均用 0.1% 的 CMC 水溶液配置, 低剂量组和高剂量组给药剂量分别为 100 mg/kg 和 200 mg/kg (提取物剂量以干基计), 正常对照组和模型组均给予同体积的 0.1% 的 CMC 水溶液, 每天灌胃一次, 连续 3 个月。喂养结束后进行 Morris 水迷宫试验。

1.4.3 Morris 水迷宫试验

参照 Liu^[13]的方法并略作修改。

1.4.3.1 水迷宫适应性训练

训练第 1 d 撤除平台, 让小鼠在池中自由游泳 90 s, 计算游泳距离, 剔除游泳能力不正常小鼠。

1.4.3.2 定位航行试验

Morris 水迷宫试验的第 2 d 至第 8 d 进行定位航行试验, 每天训练 4 次。平台置于第一象限, 约水下 1 cm 处, 小鼠入水点为各象限池壁中点 (包括平台象限), 将小鼠面向池壁由 4 个入水点放入池中, 测其 60 s 内成功进驻平台 (小鼠找到平台并滞留上面 5 s 为进驻成功) 所需时间 (即逃避潜伏期, escape latency)。如在 60 s 内小鼠不能成功进驻平台, 则将其引上平台并令其停留 10 s, 记录逃避潜伏期为 60 s。

1.4.3.3 空间探索试验

定位航行试验结束 24 h 后, 撤除平台, 进行空间探索试验, 记录小鼠 60 s 内原平台象限停留时间和跨越平台次数等数据。

1.5 血清和脑组织样本的制备

Morris 水迷宫试验结束后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 摘眼球取血, 4 °C 下 3000 r/min 离心 15 min, 分离血清, 于 -20 °C 保存待用。颈椎脱臼处死小鼠, 迅速于冰上断头取脑, 用冰生理盐水清洗组织, 分离左右脑, 用于蛋白表达分析。

1.5.1 小鼠血清中 NO、MDA 和 GSH 含量测定及 SOD 和 GSH-Px 活力检测

按照试剂盒说明书操作, 测定方法严格参照说明书进行。

1.5.2 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测小鼠脑组织 A β ₁₋₄₂、APP 和 BACE1 的蛋白表达

取 1.5 中小鼠脑组织, 按照蛋白抽提试剂盒说明书的方法提取蛋白, Western blot 法检测小鼠脑组织中 A β ₁₋₄₂、APP 和 BACE1 的蛋白表达。结果以目的蛋白的灰度值与内参的灰度值的比值作为蛋白的相对表达量, 进行统计分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理, 数据以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (analysis of variance, ANOVA), 以 p 值表示统计学的差异, $p<0.05$ 为差异显著, $p<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 龙眼果肉提取物对 SAMP8 小鼠学习记忆功能的影响

2.1.1 水迷宫适应性训练结果

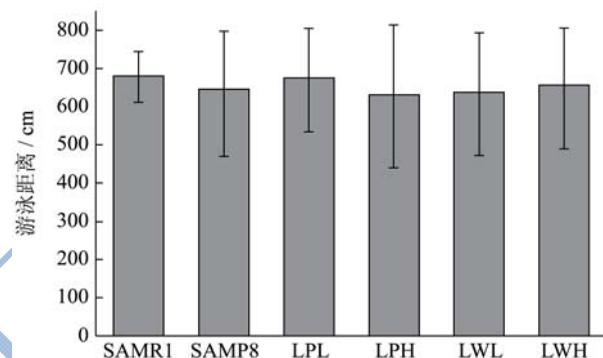


图1 龙眼果肉提取物对 SAMP8 小鼠游泳能力的影响

Fig.1 Effect of longan pulp extract on the swimming distance of SAMP8 mice

水迷宫适应性训练中小鼠的游泳距离一定程度上反映了各组小鼠的游泳能力, 利用适应性训练的结果可排除游泳能力不正常小鼠, 以消除对后续水迷宫的试验结果产生影响。不同剂量龙眼石油醚相和水相对老年痴呆模型小鼠 SAMP8 在水迷宫适应性训练中游泳能力的影响见图 1。结果表明, 各组小鼠的游泳能力无显著性差异 ($p>0.05$), 这提示灌胃龙眼果肉提取物 3 个月对各组小鼠的游泳能力无显著影响。

2.1.2 水迷宫定位航行试验结果

龙眼果肉提取物对老年痴呆模型小鼠 SAMP8 的 7 d 逃避潜伏期的影响如表 1 所示。由表 1 可知, 随着水迷宫定位航行天数的增加, 各组小鼠的逃避潜伏期均呈减小的趋势, 说明随着试验的进行, 各组小鼠的记忆能力也逐步增强。但是与正常对照组 SAMR1 相比, 模型组 SAMP8 小鼠的逃避潜伏期明显延长, 并且其逃避潜伏期的降低趋势也并不明显。而与模型组 SAMP8 相比, 灌胃龙眼果肉提取物的各组小鼠的逃避潜伏期的降低趋势明显更大, 说明龙眼果肉提取物对老年痴呆模型小鼠 SAMP8 的学习记忆功能可能起到了一定的改善效果。各组小鼠定位航行试验中逃避潜伏期的 7 d 均值结果见图 2 所示。

表1 龙眼果肉提取物对 SAMP8 小鼠逃避潜伏期的影响

Table 1 Effect of longan pulp extract on the escape latency of SAMP8 mice

组别	逃避潜伏期/s						
	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5	Day6	Day7
SAMR1	41.51±10.65	39.11±10.46	37.63±6.47	30.30±13.11	28.74±7.63	27.16±11.38	21.97±8.14
SAMP8	56.99±4.04 ^{##}	51.35±4.13	50.77±6.90 [#]	49.27±9.63 ^{##}	48.90±9.33 ^{##}	47.44±10.03	46.60±11.43 ^{##}
LPL	49.35±9.53	44.10±10.43	40.66±9.13	33.21±11.59*	30.68±18.06*	27.89±11.60	26.92±6.19*
LPH	57.28±4.88	50.66±8.46	49.53±13.36	48.66±6.25	48.13±10.40	46.57±13.37	44.87±5.69
LWL	55.15±7.04	49.37±8.13	48.74±6.98	47.92±11.45	46.32±13.39	45.86±19.31	41.42±18.96
LWH	50.39±10.06	46.23±14.10	44.40±12.38	43.52±10.72	41.02±15.97	38.79±12.79	35.33±16.48

注: ^{##} $p < 0.01$, [#] $p < 0.05$ vs SAMR1, ^{**} $p < 0.01$, ^{*} $p < 0.05$ vs SAMP8, 下同。

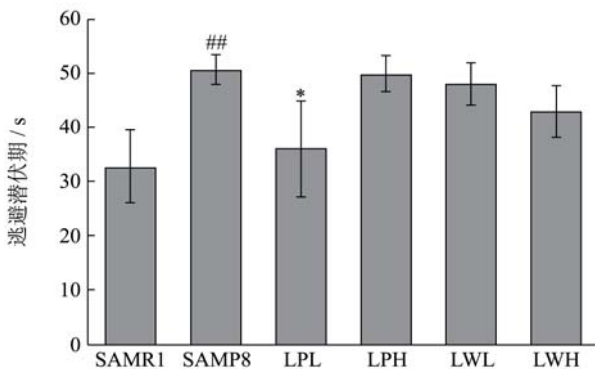


图2 各组小鼠定位航行试验中逃避潜伏期的7 d 均值结果

Fig.2 Average escape latency during spatial navigation for all mouse groups over 7 d

由图2可以看出,与正常对照组SAMR1相比,模型组SAMP8小鼠的逃避潜伏期的7 d均值显著延长($p < 0.01$),说明6月龄的老年痴呆模型小鼠SAMP8的学习记忆功能已出现明显损伤,在一定程度上说明了模型组SAMP8小鼠的老年痴呆模型是成功的,其已经进入老年痴呆的病理状态。同时,与模型组SAMP8相比,龙眼石油醚相低剂量组(LPL)小鼠的逃避潜伏期的7 d均值显著缩短($p < 0.05$),而其余组小鼠与模型组相比并无显著性差异($p > 0.05$),说明灌胃低剂量龙眼石油醚相对降低老年痴呆模型小鼠SAMP8逃避潜伏期的效果较为显著。

2.1.3 水迷宫空间探索试验结果

龙眼果肉提取物对老年痴呆模型小鼠SAMP8跨越原平台次数的影响如图3所示。由图3可以看出,与正常对照组SAMR1相比,模型组SAMP8小鼠的跨台次数显著减少($p < 0.01$),但是,与模型组SAMP8相比,龙眼石油醚相低剂量组(LPL)和龙眼水相高剂量组(LWH)小鼠的跨台次数明显增加($p < 0.05$),而其他组与模型组相比无显著性差异($p > 0.05$)。

龙眼果肉提取物对老年痴呆模型小鼠SAMP8在原平台象限停留时间的影响如图4所示。由图4可以看出,与正常对照组SAMR1相比,模型组SAMP8

小鼠在原平台象限的停留时间显著降低($p < 0.01$)。而与模型组SAMP8相比,龙眼石油醚相低剂量组(LPL)和龙眼水相高剂量组(LWH)小鼠在原平台象限的停留时间明显提高($p < 0.05$ 和 $p < 0.01$)。由此可以说明,灌胃低剂量龙眼石油醚相和高剂量龙眼水相均可以不同程度地改善老年痴呆模型小鼠SAMP8的学习记忆功能。

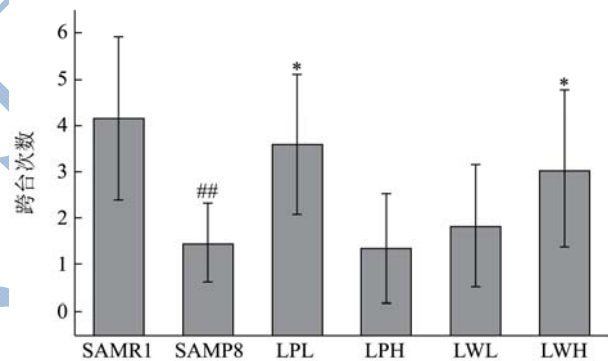


图3 龙眼果肉提取物对 SAMP8 小鼠跨越原平台次数的影响

Fig.3 Effect of longan pulp extract on the platform crossing number of SAMP8 mice

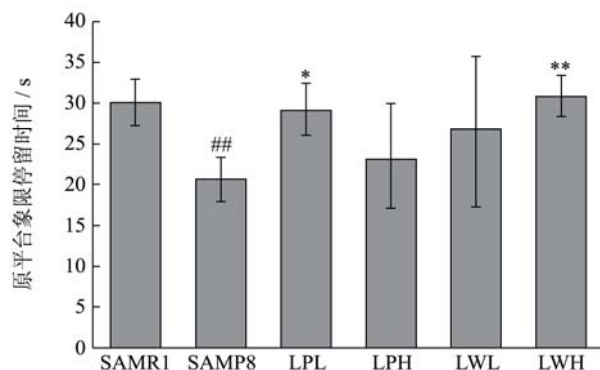


图4 龙眼果肉提取物对 SAMP8 小鼠在原平台象限停留时间的影响

Fig.4 Effect of longan pulp extract on the residence time in the original platform quadrant of SAMP8 mice

通过分析水迷宫试验结果,发现龙眼石油醚相高剂量组(LPH)小鼠的学习记忆行为明显差于龙眼石

油醚相低剂量组 (LPL) 小鼠, 且与模型组相比无明显改善效果, 其原因可能是龙眼石油醚相中含有残留有机溶剂, 而灌胃剂量大, 对小鼠产生不利作用^[12], 或与其组分的高剂量副作用相关, 具体原因还待探讨。

2.2 龙眼果肉提取物对 SAMP8 小鼠血清中 NO、MDA 和 GSH 含量及 SOD、GSH-Px 活力的影响

小鼠血清中 NO、MDA 和 GSH 含量及 SOD、GSH-Px 活力测定结果见表 2。由表 2 可以看出, 与正常对照组 SAMR1 相比, 模型组 SAMP8 小鼠血清中的 NO 和 MDA 含量显著增高 ($p < 0.01$), 而其血清中的 SOD 和 GSH-Px 活力明显下降 ($p < 0.01$), 这说明模型组 SAMP8 小鼠体内已经出现了一定程度的氧化

损伤, 其清除体内自由基的能力已明显下降。与模型组 SAMP8 相比, 龙眼石油醚相低剂量组 (LPL) 和龙眼水相低 (LWL)、高 (LWH) 剂量组小鼠血清中的 NO 含量显著降低 ($p < 0.01$), 同时, 龙眼水相高剂量组 (LWH) 小鼠血清中的 MDA 含量显著下降 ($p < 0.01$), 而灌胃龙眼提取物的其余组小鼠血清中的 MDA 含量与模型组相比无显著性差异 ($p > 0.05$)。另外, 与模型组 SAMP8 相比, 龙眼石油醚相低剂量组 (LPL)、龙眼水相低剂量组 (LWL) 和高剂量组 (LWH) 小鼠血清中的 SOD 和 GSH-Px 活力显著提高 ($p < 0.05$, $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$; $p < 0.05$, $p < 0.01$ 和 $p < 0.01$)。由此说明, 龙眼石油醚相和水相均能一定程度上抑制老年痴呆模型小鼠 SAMP8 体内的氧化损伤, 清除其体内的自由基, 从而保护小鼠的神经系统, 发挥改善学习记忆的效果。但是, 各组小鼠血清中的 GSH 含量在组间并无显著性差异 ($p > 0.05$)。

表 2 小鼠血清中 NO、MDA 和 GSH 含量及 SOD、GSH-Px 活力

Table 2 Measurements of the content of NO, MDA, and GSH, and the activities of SOD and GSH-Px in the serum of mice

指标	NO/($\mu\text{mol/L}$)	MDA/(nmol/mL)	GSH/($\mu\text{mol/L}$)	SOD/(U/mL)	GSH-Px/(U/mL)
SAMR1	2.26 \pm 0.29	7.90 \pm 0.70	38.53 \pm 12.82	121.89 \pm 10.51	306.26 \pm 14.32
SAMP8	6.73 \pm 0.22 ^{###}	11.42 \pm 0.40 ^{###}	32.86 \pm 7.35	101.11 \pm 14.39 ^{###}	271.69 \pm 26.68 ^{###}
LPL	4.75 \pm 0.16 ^{**}	10.11 \pm 0.63	37.35 \pm 11.17	118.63 \pm 2.56 [*]	304.86 \pm 9.11 [*]
LPH	6.30 \pm 0.05	11.28 \pm 0.12	30.06 \pm 12.03	113.38 \pm 8.53	288.82 \pm 22.22
LWL	3.41 \pm 0.39 ^{**}	10.34 \pm 1.67	29.97 \pm 5.99	116.99 \pm 14.17 [*]	314.39 \pm 26.62 ^{**}
LWH	2.02 \pm 0.33 ^{**}	8.18 \pm 1.57 ^{**}	33.77 \pm 7.17	121.53 \pm 7.84 ^{**}	310.57 \pm 24.19 ^{**}

2.3 龙眼果肉提取物对 SAMP8 小鼠脑组织 $A\beta_{1-42}$ 、APP 和 BACE1 蛋白表达的影响

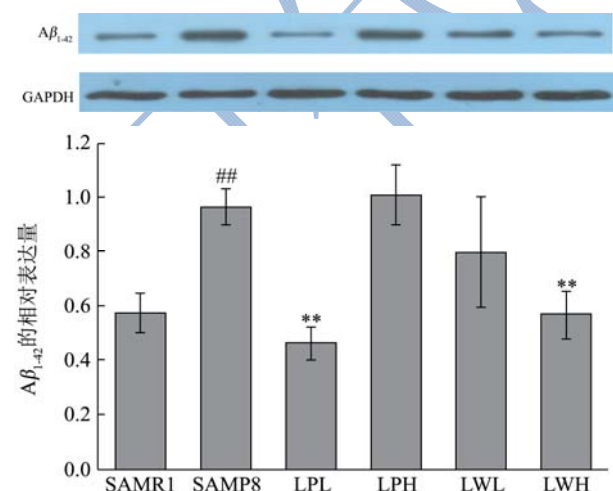


图 5 龙眼果肉提取物对 SAMP8 小鼠脑组织中 $A\beta_{1-42}$ 蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of longan pulp extract on $A\beta_{1-42}$ protein expression in the brain of SAMP8 mice

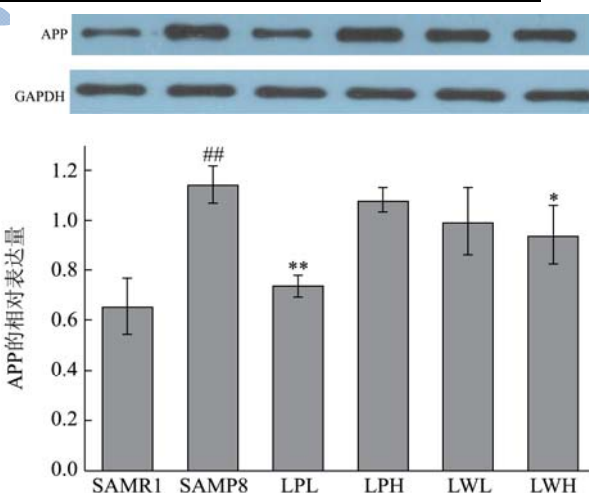


图 6 龙眼果肉提取物对 SAMP8 小鼠脑组织中 APP 蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of longan pulp extract on APP protein expression in the brain of SAMP8 mice

龙眼果肉提取物对老年痴呆模型小鼠 SAMP8 脑组织中 $A\beta_{1-42}$ 蛋白表达的影响如图 5 所示。由图 5 可以看出, 与正常对照组 SAMR1 相比, 模型组 SAMP8 小鼠脑组织中的 $A\beta_{1-42}$ 的表达量显著升高 ($p < 0.01$),

说明 $A\beta_{1-42}$ 已在模型组 SAMP8 小鼠脑组织中过量表达,可能引起小鼠老年痴呆病状。而与模型组 SAMP8 相比,龙眼石油醚相低剂量组(LPL)和龙眼水相高剂量组(LWH)小鼠脑组织中的 $A\beta_{1-42}$ 含量显著降低 ($p<0.01$),而其他组与模型组相比无显著差异 ($p>0.05$),提示低剂量龙眼石油醚相和高剂量龙眼水相能抑制老年痴呆模型小鼠 SAMP8 脑中 $A\beta$ 的形成,从而降低 $A\beta$ 的神经毒性,保护神经元细胞,改善小鼠的学习记忆功能。

龙眼果肉提取物对老年痴呆模型小鼠 SAMP8 脑组织中 APP 蛋白表达的影响如图 6 所示。由图 6 可以看出,与正常对照组 SAMR1 相比,模型组 SAMP8 小鼠脑组织中的 APP 表达量显著升高 ($p<0.01$),说明模型组小鼠脑组织中已出现过量的 APP 蛋白,可能参与 AD 形成的生理进程。与模型组 SAMP8 相比,龙眼石油醚相低剂量组(LPL)和龙眼水相高剂量组(LWH)小鼠脑组织中的 APP 表达量显著下降 ($p<0.01$ 和 $p<0.05$),而其他组与模型组相比无显著差异 ($p>0.05$),说明低剂量龙眼石油醚相和高剂量龙眼水相可不同程度地降低老年痴呆模型小鼠 SAMP8 脑中的 APP 表达,从而减少 $A\beta$ 的生成,发挥抗老年痴呆的作用。

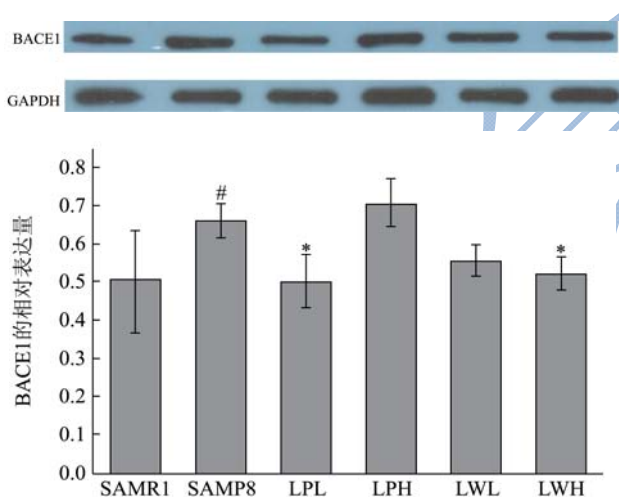


图7 龙眼提取物对 SAMP8 小鼠脑组织中 BACE1 蛋白表达的影响

Fig.7 Effect of longan pulp extract on BACE1 protein expression in the brain of SAMP8 mice

龙眼果肉提取物对老年痴呆模型小鼠 SAMP8 脑组织中 BACE1 蛋白表达的影响如图 7 所示。由图 7 可以看出,与正常对照组 SAMR1 相比,模型组 SAMP8 小鼠脑组织中的 BACE1 的表达量显著提高 ($p<0.05$),这可能直接导致了其脑组织中 $A\beta_{1-42}$ 的过量生成。而与模型组 SAMP8 相比,龙眼石油醚相低剂量组(LPL)和龙眼水相高剂量组(LWH)小鼠脑中的 BACE1 的表达量显著下降 ($p<0.05$),而其他组与模型组相比无

显著差异 ($p>0.05$),提示低剂量龙眼石油醚相和高剂量龙眼水相可降低老年痴呆模型小鼠 SAMP8 脑中 BACE1 蛋白的表达,从而抑制 $A\beta$ 的生成途径,进而保护神经系统。

3 讨论

3.1 学习记忆障碍是老年痴呆患者的主要临床症状^[4],而 Morris 水迷宫是研究学习记忆障碍的主要行为学方法之一,能直接体现动物的痴呆状态^[15]。Kim 等人^[16]采用 Morris 水迷宫研究乌梅醇提取物改善东莨菪碱诱导痴呆模型小鼠的学习记忆效果,研究发现乌梅醇提取物能显著提高痴呆模型小鼠在空间探索试验中于原平台象限的停留时间。骆萍等人^[5]也采用 Morris 水迷宫研究了龙眼提取物改善东莨菪碱所致拟痴呆大鼠学习记忆行为的效果。在本研究中,首先采用 Morris 水迷宫测定了各组小鼠的游泳能力,以排除游泳能力不正常小鼠,这样保证了后续水迷宫试验结果的可靠性,相比骆萍的试验有所改进。本研究发现,低剂量龙眼石油醚相和高剂量龙眼水相均能显著提高 SAMP8 小鼠在原平台象限的停留时间和跨台次数,同时,低剂量龙眼石油醚相能显著降低 SAMP8 小鼠的逃避潜伏期。提示龙眼果肉醇提物的石油醚相和水相均能一定程度地改善老年痴呆模型小鼠的学习记忆功能。

3.2 氧化应激 (oxidative stress) 表示机体内自由基的产生和抗氧化系统清除自由基的失衡,是引发和促进老年痴呆进程的一个重要因素^[17],因此,抑制机体内的氧化应激是有效预防老年痴呆的方法之一。Liu 等人^[18]研究发现白藜芦醇能显著提高 SAMP8 小鼠脑组织中的 SOD 和 GSH-Px 的活力,降低其 MDA 含量,从而显著改善了 SAMP8 小鼠在 Morris 水迷宫中的行为学。Rahim 等人^[19]研究发现初榨椰子油能显著提高大鼠脑组织中的 GSH 含量及 SOD 和 GSH-Px 的活力,明显降低其 MDA 和 NO 含量,从而改善大鼠的行为学表现。本研究发现,低剂量龙眼石油醚相和龙眼水相均能一定程度降低 SAMP8 小鼠血清中 NO 和 MDA 含量,提高血清中 SOD 和 GSH-Px 的活力,但各组小鼠血清中的 GSH 含量在组间无显著性差异。提示龙眼果肉醇提物的石油醚相和水相可能通过改善 SAMP8 小鼠机体内的抗氧化系统来发挥改善学习记忆功能的作用。并且,本研究相比于白亚娟^[4]和骆萍^[5]的实验增加了 NO 和 GSH 含量的测定,更加全面地反映了龙眼果肉提取物对老年痴呆模型小鼠机体内氧化应激状态的改善作用。

3.3 大脑中 $A\beta$ 的异常聚集是引发 AD 的重要原因

[20]。因此,众多研究者把“ $A\beta$ 级联假说”作为改善老年痴呆的机制进行研究。Zeng 等人^[21]研究发现,雷公藤氯内酯醇显著降低了老年痴呆模型小鼠 5XFAD 大脑皮层和海马中 $A\beta$ 的沉积以及脑匀浆中 $A\beta_{1-42}$ 的含量,其脑组织中的 BACE1 蛋白含量也显著下降,但雷公藤氯内酯醇对 5XFAD 小鼠脑组织中的 APP 蛋白的表达无显著作用。Orejana 等人^[22]研究发现西地那非能显著降低 SAMP8 小鼠海马中 BACE1 的 mRNA 和蛋白表达,同时,小鼠海马中 $A\beta_{1-42}$ 的蛋白表达也显著下降。在本研究中,低剂量龙眼石油醚相和高剂量龙眼水相均能显著降低 SAMP8 小鼠脑组织中 $A\beta_{1-42}$ 、APP 和 BACE1 的蛋白表达量,提示龙眼果肉醇提物的石油醚相和水相可能通过抑制 SAMP8 小鼠脑组织中的 $A\beta$ 等相关蛋白的表达来发挥改善学习记忆功能的作用。

3.4 综上所述,龙眼果肉醇提物的石油醚相和水相均能有效地改善老年痴呆模型小鼠 SAMP8 的学习记忆功能,石油醚相的化学成分可能主要含有烯烃、有机酸、酯类、烷烃、酮类,挥发性油和磷脂等物质^[23,24],而水相的化学成分可能主要含有酚类、黄酮类、核苷类、氨基酸类和多糖等物质^[24]。两种提取物改善小鼠学习记忆功能的作用机制可能与其改善老年痴呆模型小鼠机体内的抗氧化系统及抑制小鼠脑组织中 $A\beta$ 等相关蛋白表达的共同作用有关。低剂量龙眼石油醚相的改善效果明显较高剂量好,可能是因为高剂量龙眼石油醚相中含有较多的残留有机溶剂,对小鼠的神经系统造成损伤,或与其组分的高剂量副作用相关,而高剂量龙眼水相的改善效果明显较低剂量好,可能是因为在一一定的剂量范围内,其改善效果存在着剂量依赖关系。龙眼果肉醇提物的石油醚相和水相的化学成分尚不明确,这有待更深入的研究,因此下一步的工作重点将是对其进行分离和纯化,鉴定出活性成分的化学结构,进一步明确其改善学习记忆功能的分子机制,这对开发具有预防老年痴呆功效的龙眼功能食品具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] 王健辉.LW-AFC 对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆功能的作用及作用机理研究[D].广州:中国人民解放军军事医学科学院,2016
WANG Jian-hui. Studies on the effect and action mechanism of LW-AFC on learning and memory in the model mice of Alzheimer's disease [D]. Guangzhou: Institute of Pharmacology and Toxicology Academy of Military Medical Science, 2016
- [2] 刘一镡.基于 β -淀粉样肽的阿尔茨海默症的检测与抑制剂研究[D].北京:北京科技大学,2016
LIU Yi-biao. The detection of Alzheimer's disease and the study of $A\beta$ aggregation inhibitor based on β -amyloid peptide [D]. Beijing: University of Science and Technology Beijing, 2016
- [3] Park S J, Park D H, Kim D H, et al. The memory-enhancing effects of *Euphoria longan* fruit extract in mice [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2010, 128(1): 160-165
- [4] 白亚娟,刘磊,张瑞芬,等.龙眼果肉提取物改善东莨菪碱诱导小鼠学习记忆功能[J].中国农业科学,2016,49(21): 4203-4213
BAI Ya-juan, LIU Lei, ZHANG Rui-fen, et al. *Longan pulp* extracts ameliorate scopolamine-induced learning and memory of impairment mice [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(21): 4203-4213
- [5] 骆萍.龙眼肉提取物(ALE)对东莨菪碱所致拟痴呆大鼠学习记忆的影响及机制研究[D].南宁:广西医科大学,2011
LUO Ping. Effects of extract from arillus *Longan* (ALE) on the learning and memory abilities in scopolamine-induced dementia rats and its possible mechanism [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2011
- [6] Sujira M, Jiraporn P, Parichart B, et al. Melatonin administration reverses the alteration of amyloid precursor protein-cleaving secretases expression in aged mouse hippocampus [J]. Neuroscience Letters, 2016, 621: 39-46
- [7] 潘琢.茶多酚对阿尔茨海默病模型的神经保护作用[D].石家庄:河北师范大学,2011
PAN Zhuo. Neuroprotective effect of green tea polyphenols on Alzheimer's disease model [D]. Shijiazhuang: Hebei Normal University, 2011
- [8] Zhang Z X, Zhao R P, Wang D S, et al. Fuzhisan ameliorates the memory deficits in aged SAMP8 mice via decreasing $A\beta$ production and tau hyperphosphorylation of the hippocampus [J]. Neurochemical Research, 2016, 41(11): 3074-3082
- [9] Lars B, Rudolph E T. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2008, 9(10): 768-778
- [10] 左月明,张忠立,王秋红,等.黑水缬草提取物对老年痴呆大鼠脑内神经元中 β -APP、 $A\beta_{1-40}$ 和Caspase-3表达的影响[J].中药材,2010,33(2):233-236
ZUO Yue-ming, ZHANG Zhong-li, WANG Qiu-hong, et al. Effects of valeriana amurensis on the expressions of β -APP, $A\beta_{1-40}$ and caspase-3 in alzheimer's disease model rat's brain [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2010, 33(2):

- 233-236
- [11] ZHANG C. Natural compounds that modulate BACE1-processing of amyloid-beta precursor protein in Alzheimer's disease [J]. *Discovery Medicine*, 2012, 14(76): 189-197
- [12] 吴燕春. 绞股蓝有效部位对 SAMP8 小鼠抗老年性痴呆作用及其机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2013
- WU Yan-chun. To study anti-alzheimer's disease effect and its mechanism of effective parts of gynostemma pentaphylla on rapid aging dementia mice (SAMP8 mice) [D]. Guangzhou: Traditional Chinese Medicine University of Guangzhou, 2013
- [13] Liu L, Trinh H G, Wu H, et al. Ginsenoside Rb1 improves spatial learning and memory by regulation of cell genesis in the hippocampal subregions of rats [J]. *Brain Research*, 2011, 1382(9): 147-154
- [14] Figueiro M, Iiha J, Linck V M. The amazonian herbal marapuama attenuates cognitive impairment and neuroglial degeneration in a mouse Alzheimer model [J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(4): 327-33
- [15] Brandeis R, Brabdys Y, Yehuda S. The use of the Morris water maze in the study of memory and learning [J]. *International Journal of Neuroscience*, 1989, 48(1-2): 29-69
- [16] Kim M S, Jeon W K, Lee K W, et al. Ameliorating effects of ethanol extract of fructus mume on scopolamine-induced memory impairment in mice [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 2015: 1-8
- [17] Sandeep K S, Rudy C, George P. *Oxidative stress and Alzheimer's disease* [M]. Springer International Publishing, 2016
- [18] Liu G S, Zhang Z S, Yang B, et al. Resveratrol attenuates oxidative damage and ameliorates cognitive impairment in the brain of senescence-accelerated mice [J]. *Life Sciences*, 2012, 91(17-18): 872-877
- [19] Rahim N S, Lim S M, Mani V, et al. Enhanced memory in Wistar rats by virgin coconut oil is associated with increased antioxidative, cholinergic activities and reduced oxidative stress [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2017, 55(1): 825-832
- [20] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science*, 2002, 297(5580): 353-356
- [21] Zeng Y Q, Zhang J, Zhu Y G, et al. Tripchlorolide improves cognitive deficits by reducing amyloid β and upregulating synapse-related proteins in a transgenic model of Alzheimer's Disease [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2015, 133(1): 38-52.
- [22] Orejana L, Barros M L, Jordan J, et al. Sildenafil decreases BACE1 and cathepsin B levels and reduces APP amyloidogenic processing in the SAMP8 mouse [J]. *The Journals of Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 2015, 70(6): 675-685
- [23] 张晓卫. 龙眼抗肿瘤化学成分及其初步药理作用研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2013
- ZHANG Xiao-wei. Study on chemical constituents and preliminary pharmacological effects of anti-tumor composition from dimocarpus longan lour [D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University, 2013
- [24] 陈彦林. 不同干制方式龙眼果肉主要活性物质的比较[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014
- CHEN Yan-lin. Comparasion of different drying methods on main active substances in longan (*Dimocarpus Longan Lour.*) pulp [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014