

积雪草乙酸乙酯提取物对快速老化模型小鼠SAMP8记忆行为及脑内基因APP和BACE1表达影响的研究

黄金兰¹, 李 霏², 吴登攀¹, 田 新³, 景 鑫³, 夏 星³, 钟振国^{3,*}

(1.徐州医学院, 江苏徐州 221004;

2.广西桂东卫生学校, 广西贺州 543100;

3.广西中医药大学, 广西南宁 530001)

摘要:目的:探讨积雪草乙酸乙酯提取物对快速老化模型小鼠SAMP8记忆行为和大脑淀粉样肽前体蛋白(APP)、淀粉蛋白前β位分解酶1(BACE1)基因表达的影响。方法:将SAMP8随机分为模型对照组、积雪草乙酸乙酯提取物高、中、低剂量组(以生药量计为40、20、10 g·kg⁻¹)和石杉碱甲组(0.386 mg·kg⁻¹), 8只/组, 各药物组按设计剂量连续给药2个月, 模型对照组给予等体积双蒸水灌服。采用Morris水迷宫(MWM)方法观察SAMP8行为学改变, 应用半定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定SAMP8脑内APP和BACE1 mRNA含量的变化。结果:Morris水迷宫测试中, 与模型对照组比较, 积雪草乙酸乙酯提取物高、中剂量组和石杉碱甲组的逃避潜伏期显著缩短($p < 0.01$)、停留时间显著延长($p < 0.01$)及平台象限百分比显著增大($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$), 积雪草乙酸乙酯提取物中剂量组和石杉碱甲组的寻求次数比模型对照组明显增多($p < 0.01$); RT-PCR结果显示积雪草乙酸乙酯提取物高、中剂量组和石杉碱甲组SAMP8大脑的APP和BACE1 mRNA表达水平显著降低($p < 0.05$)。结论:积雪草乙酸乙酯提取物对SAMP8学习记忆功能有明显改善作用, 并能降低脑内APP和BACE1 mRNA的表达。

关键词:积雪草乙酸乙酯提取物, SAMP8, 记忆行为, 大脑淀粉样肽前体蛋白, 淀粉蛋白前β位分解酶1

Influence of ethyl acetate extract of *Centella asiatica* on abilities of learning and memory and the expressions of APP and BACE1 in SAMP8

HUANG Jin-lan¹, LI Fei², WU Deng-pan¹, TIAN Xin³, JING Xin³, XIA Xing³, ZHONG Zhen-guo^{3,*}

(1.Xuzhou Medical College, Xuzhou 221004, China;

2.Guangxi Guidong Healthy School, Hezhou 543100, China;

3.Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

Abstract: Objective: To investigate Ethyl acetate extract of *Centella asiatica* on the abilities of learning and memory and contents of APP, BACE1 mRNA in SAMP8 with Alzheimer's disease. Methods: SAMP8 were randomly divided into 5 groups: the model control group, Ethyl acetate extract of *Centella asiatica* high-dose (40 g·kg⁻¹), mid-dose (20 g·kg⁻¹), low-dose (10 g·kg⁻¹) group and huperzin A group (0.386 mg·kg⁻¹). Each mouse was administered intragastrically for 2 months. The same amount of double distilled water was given to the model control group. The test of Morris water maze (MWM) was used to examine the changes of the abilities of learning and memory. The contents of APP and BACE1 mRNA in brain tissue were assayed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Results: Morris water maze demonstrated that mice treated with Ethyl acetate extract of *Centella asiatica* and huperzine A, mean escape latencies were significantly decreased ($p < 0.01$), the residence times were significantly prolonged ($p < 0.01$), the percentages of total swimming distance in the platform quadrant were significantly increased ($p < 0.01$, $p < 0.05$) and seek times in mid-dose group of the ethyl acetate extract of *Centella asiatica* and huperzine A group were more than that of the model control group ($p < 0.01$). The result of RT-PCR showed that high, mid-dose groups of the ethyl

收稿日期: 2015-07-23

作者简介: 黄金兰(1982-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 神经退行性疾病, E-mail: hjl0221104@163.com

* 通讯作者: 钟振国(1956-), 男, 博士, 研究方向: 新药研究与开发, E-mail: zhongzg@gxtcmu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(81460598); 徐州医学院优博项目(D2014017); 江苏省麻醉重点实验室开放课题(KJS1404); 江苏省新药与临床药理学重点实验室主任基金(ZR-XY201402); 广西自然科学基金项目(2012GXNSFBA053090)。

acetate extract of *Centella asiatica* and huperzine A group could reduce the contents of APP and BACE1 mRNA. Conclusion: Ethyl acetate extract of *Centella asiatica* had a significant relieving effect on the lesion of the abilities of learning and memory, it could reduce the contents of APP and BACE1 mRNA in SAMP8.

Key words: ethyl acetate extract of *Centella asiatica*; SAMP8; learning and memory; APP; BACE1

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2015)24-0338-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.24.065

积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 为伞形科植物的干燥全草^[1], 有祛脂降压、利尿消肿、提高免疫力、健脑、益肝、消炎止痛、养阴补虚等功效。由于积雪草制剂对人体非常安全, 即使每日口服 20 g 以上, 亦未见任何毒副作用^[2], 在国外已被开发成保健品^[3]。在傣族, 积雪草作为药食两用的食品而被长期食用^[4]。因此, 积雪草是一个值得开发利用的重要植物资源。研究发现, 复方积雪草和积雪草水提物能显著改善阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 模型大鼠学习记忆能力^[5-6]。而积雪草乙酸乙酯提取物能否提高 AD 学习记忆能力尚未见文献报道。本课题组前期研究发现, 积雪草乙酸乙酯提取物对 AD 细胞模型有较好的保护和治疗作用^[7], 然而, 在动物水平, 积雪草乙酸乙酯提取物是否对快速老化小鼠 SAMP8 AD 模型小鼠的记忆行为有改善作用仍不清楚。为此, 本研究拟采用 Morris 水迷宫检测 SAMP8 小鼠的记忆行为能力, 半定量反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测脑内 β 淀粉样蛋白前体蛋白 (APP)、 β 分泌酶 (BACE1) mRNA 等 AD 发病相关基因表达的影响, 为开发积雪草提供更多的实验依据。

1 材料与仪器

1.1 材料与仪器

积雪草 (拉丁名: *Centella asiatica*) 广西中医药大学刘寿养教授鉴定; 石杉碱甲 (Huperzine A) 浙江震元制药有限公司, 批号 110401; RNA proppure Tissue Kit (批号: DP431), Quant script.RT.Kit (批号: KR103-03) 北京天根公司; Trizol Invitrogen 公司; 100 bp DNA Ladder Omega Biootek 公司; 引物 上海生工公司合成; 普通试剂 分析纯, 南宁松颖生物有限公司; 3 月龄健康快速老化痴呆模型小鼠 SAMP8 40 只, 雄性, 体重 20~30 g, 天津中医药大学 (合格证号: SCXX (津) 2008-0001)。

Morris 水迷宫 包括 Morris 水迷宫、电脑摄像系统、配套软件分析系统, 北京中科院生理所生产; XH-C 型旋涡混合器 金坛市医疗仪器厂; 1-14 型高速离心机 德国; 全自动凝胶电泳图象分析系统 Amersham phemacia biotech 公司; DU-640 型紫外分光光度计 Beckman 公司; 扩增仪 Tgradient Biometra 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 积雪草乙酸乙酯提取物的制备 粉碎积雪草全草, 依次用浓度为 95%、70%、50% 乙醇浸渍提取 3 次, 合并滤液, 回收得总提物。将总提物制成混悬液, 用石油醚萃取后, 所剩残液再用乙酸乙酯萃取, 得乙酸乙酯提取物。

1.2.2 动物分组及给药 SAMP8 40 只, 随机分为模型对照组、积雪草乙酸乙酯提取物高、中、低剂量组 (以生药量计为 40、20、10 g·kg⁻¹) 和石杉碱甲组

(Huperzine A), 即阳性对照组 0.386 mg·kg⁻¹, 参考临床成人用量: 每天 0.3 mg/70 kg, 8 只/组, 动物适应性喂养 2 周后每天灌胃 1 次, 模型对照组给予相同容积的双蒸馏水灌胃, 连续灌胃 2 个月。

1.2.3 SAMP8 学习与记忆行为测试 SAMP8 给药完毕后采用 Morris 水迷宫 (Morris Water Maze, MWM) 测试法对 SAMP8 进行空间学习记忆与行为能力测试。MWM 参照有关文献制作并稍微改良^[8]。迷宫分 4 个象限, 隐藏平台位于第二象限, 水温保持在 (26±1) °C, 迷宫正上方装一个小型摄像机, 与录像机和监视器连接, 计算机配套软件系统记录小鼠的游泳轨迹和游泳时间。进行历时为 5 d 的定位航行实验。定位航行实验的评价指标有潜伏期、寻求次数、停留时间及平台象限百分比。

潜伏期是实验动物在规定时间内成功进驻平台 (找到平台并滞留其上 5 s 为进驻成功) 所需时间, 其能综合反映出小鼠的学习、记忆及运动行为能力。寻求次数为小鼠找到但未必成功进驻站台的次数, 反映小鼠学习、记忆能力的变化。停留时间为小鼠各次经过平台而滞留其上的总时间, 与寻求次数相结合可合理反映出小鼠学习、记忆和行为运动能力的综合变化。平台象限百分比为小鼠在平台所在象限游泳的时间占总游泳时间的百分比, 可反映出小鼠模糊的记忆能力和空间识别能力。

1.2.4 SAMP8 脑内 APP 和 BACE1 mRNA 含量的测定 采用 RT-PCR 法。动物行为学测试完毕后, 颈椎脱臼处死小鼠, 按 RNA proppure Tissue Kit 操作说明提取总 RNA, 并应用紫外分光光度分析和琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的纯度、含量及完整性。按照 Quantscript RT kit 第一链合成试剂盒说明书合成 cDNA, 反应参数: 42 °C 反应 1 h, 70 °C 10 min 终止反应。

PCR 扩增按说明操作, 设置 PCR 反应体系并优化扩增反应条件, 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s; 56 °C 退火 45 s; 72 °C 延伸 1 min, 完成 35 个循环后 72 °C 延伸 10 min。最后扩增产物与 100 bp DNA Ladder 在 2% 琼脂糖凝胶电泳, 全自动凝胶成像系统检测产物是否为单一特异性扩增条带。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列	长度 (bp)
APP	上游 5'-GATGGCGTGAAGACAAAGTA-3'	421
	下游 5'-GGGGAAGAGGTTCACTGGTAG-3'	
BACE1	上游 5'-TATGTGGAGATGACCGTAGGC-3'	370
	下游 5'-CAAAGAAGGGCTCCAAAGACT-3'	
β -actin	上游 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'	263
	下游 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3'	

表2 各组MWM定位航行相关参数5 d均值总体比较

Table 2 The comparison of relevant parameters in place navigation test from the Morris Water Maze test for 5 days

实验组别	潜伏期(s)	寻求次数	停留时间(s)	平台象限百分比(%)
模型对照	55.94±11.46	0.22±0.43	0.78±1.71	21.68±21.61
Huperzine A	53.84±8.11**	0.35±0.52**	1.16±2.04**	24.34±22.12*
高剂量	53.51±14.78**	0.27±0.46	1.10±2.01**	26.73±22.50**
中剂量	51.12±15.76**	0.41±0.58**	1.55±2.30**	30.36±23.53**
低剂量	55.38±12.01	0.24±0.46	1.00±1.92	23.12±44.54

注:与模型对照组相比,* $p<0.05$,** $p<0.01$;表3同。

1.2.5 统计学处理 所有数据用SPSS 11.5统计软件进行统计分析,实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组间差异采用单因素方差分析,同时进行Levene方差齐性检验,方差齐性资料采用 F 检验,组间差异采用LSD法或SNK法比较;方差不齐资料采用近似 F 检验Welch法,组间采用Dunnett's T3或Dunnett's C法比较。方差齐性检验水平取 $\alpha=0.05$,方差检验显著性水平取 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 积雪草乙酸乙酯提取物对SAMP8学习与记忆行为的影响

5 d均值总体变化的结果详见表2。结果显示,与模型对照组相比,积雪草乙酸乙酯提取物高、中剂量组和Huperzine A组的逃避潜伏期明显缩短($p<0.01$)、停留时间明显延长($p<0.01$)及平台象限百分比明显增大($p<0.01$ 或 $p<0.05$);Huperzine A组和积雪草乙酸乙酯提取物中剂量组的寻求次数比模型对照组明显增多($p<0.01$)。

2.2 积雪草乙酸乙酯提取物对SAMP8脑内APP和BACE1 mRNA表达水平的影响

由表3结果可知,积雪草乙酸乙酯提取物和Huperzine A干预SAMP8 2个月后,与模型对照组相比,积雪草乙酸乙酯提取物高、中剂量组和Huperzine A组的APP和BACE1 mRNA表达水平明显降低($p<0.05$ 或 $p<0.01$)。

表3 各组SAMP8大脑组织APP和BACE1 mRNA含量比较

Table 3 The comparison of contents of APP and BACE1 mRNA in the brain of SAMP8

实验组别	APP/Beta-actin	BACE1/Beta-actin
模型对照	1.117±0.319	1.798±0.372
Huperzine A	0.856±0.132*	1.301±0.221**
高剂量	0.901±0.113*	1.472±0.155*
中剂量	0.869±0.292*	1.310±0.184**
低剂量	1.040±0.034	1.533±0.266

2%琼脂糖凝胶电泳图谱显示APP、BACE1和Beta-actin的扩增产物相应地在421、370 bp和263 bp附近有清晰的目的基因和内参基因PCR扩增带,与相应设计的扩增长度相符,未见其他扩增产物,见图1。

3 结论与讨论

积雪草作为药食两用的食品在民间食用很多年^[4],因其有改善记忆、防止记忆衰退等作用在国外已被制成保健品^[5]。本实验采用自然发病的有学习记忆功

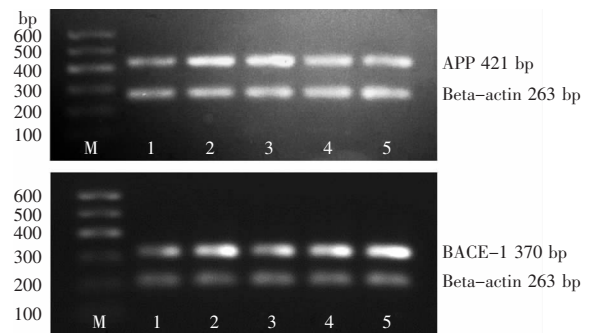


图1 2%琼脂糖凝胶电泳产物图

Fig.1 2% agarose gel electrophoresis of PCR products

注:M: Marker; 1: 模型对照组; 2: Huperzine A组; 3: 中剂量组; 4: 低剂量组; 5: 高剂量组。

能障碍的SAMP8 AD模型小鼠为动物模型,研究积雪草乙酸乙酯提取物对记忆能力的改善作用,为将积雪草开发成益智保健品提供更多实验依据。

MWM实验是英国心理学家Morris于20世纪80年代初设计并用于空间学习记忆的大脑机制研究领域^[6],可用来评估啮齿动物由于衰老、药物和外伤等因素所造成的影响,并且该装置的使用简便易学,目前已被认为是此类研究的经典方法。在定位航行实验的5 d训练中,模型对照组小鼠的各指标均劣于给药组,表明造模使小鼠智能发生严重障碍,学习记忆获得能力及记忆的存储、加工和提取能力均严重受损。除积雪草乙酸乙酯提取物低剂量组外,其他给药组的各项指标与模型对照组相比有明显的差异,以积雪草乙酸乙酯提取物中剂量组表现最优,说明积雪草乙酸乙酯提取物对痴呆小鼠的学习记忆行为能力有不同程度的改善作用。

AD病理机制的中心环节是老年斑的主要成分 β 淀粉样蛋白($A\beta$)的生成、代谢及毒性作用。研究表明, $A\beta$ 的大量产生,并在大脑中沉积可以导致氧化应激、 Ca^{2+} 内流,进而损伤线粒体,导致神经细胞产能障碍,激活凋亡相关蛋白和因子,最终启动神经元的凋亡过程,在整体上体现神经功能障碍和行为学的改变^[10]。研究发现, $A\beta$ 由APP经过 β -分泌酶(BACE1)剪切生成^[11]。为进一步评价积雪草乙酸乙酯提取物对AD模型小鼠学习记忆改善的机制,本研究采用RT-PCR方法检测APP和BACE1在小鼠脑内的表达情况,实验结果表明,积雪草乙酸乙酯提取物高、中剂量组和Huperzine A组均能明显降低APP和BACE1

(下转第344页)

损伤有一定的保护作用。方伟等研究表明茶多糖对CCl₄引起的小鼠急性肝损伤有一定的保护作用的机理可能与其清除自由基、降低肝内脂质过氧化反应、保护肝细胞膜以及维持膜的正常通透性有关^[13]。CCl₄通过肝脏代谢产生大量自由基,自由基诱发脂质过氧化,产生大量脂质过氧化物,它可使含氨基的蛋白质、核酸、脑磷脂发生交联而丧失活性^[14]。肝损伤是涉及多因素的复杂病理过程,其中体内多种酶的生化代谢途径均有较大的紊乱^[15-16]。当肝脏受到损害时,如肝细胞变性坏死,丙氨酸氨基转移酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)等会从肝组织中逸出,故血清中这些物质的活性会升高^[17]。

4 结论

本研究采用CCl₄导致小鼠急性肝损伤模型,探究了AARP是否对CCl₄引起的小鼠急性肝损伤有一定的保护作用。实验结果表明,AARP中(50 mg/(kg·d))、高(100 mg/(kg·d))剂量组均可极显著抑制由CCl₄造成的小鼠血清中AST活性升高,极显著降低小鼠肝组织中MDA的含量,并且提高肝组织中SOD活性。同时观察肝组织切片得知,AARP低、中、高剂量组均可减轻CCl₄造成的小鼠肝组织损伤,使肝细胞变性减轻、肝细胞索排列趋于整齐,组织趋于正常化。综上所述,研究表明AARP对CCl₄所致急性肝损伤具有一定的保护作用,也为AARP的进一步开发和综合利用提供了依据。

参考文献

- [1] 吴瑞究. 黑木耳的质量标准及营养成分[J]. 中国林副产, 1996, 36(1): 21-22.
- [2] 黄滨南, 张秀娟, 邹翔, 等. 黑木耳多糖抗肿瘤作用的研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2004, 20(6): 648-651.
- [3] 周国华, 于国萍. 黑木耳多糖降血脂作用的研究[J]. 现代食品科技, 2004, 21(1): 46-48.
- [4] 周慧萍, 陈琼华, 王淑如. 黑木耳多糖和银耳多糖的抗衰老作用[J]. 中国药科大学报, 1989, 20(5): 303-306.

[5] 宗灿华, 于国萍. 黑木耳多糖对糖尿病小鼠降血糖作用的研究[J]. 食用菌, 2007(4): 60-61.

[6] 魏远安, 方积年. 高效凝胶渗透色谱法测定多糖的纯度及分子量[J]. 药学学报, 1989, 24(7): 532-536.

[7] Fu D, O'Neill RA. Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography[J]. Analytical Biochemistry, 1995, 227(2): 377-384.

[8] 许青松, 宫德正, 谭成玉, 等. 壳寡糖对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国海洋药物, 2006, 25(5): 31-33.

[9] 任丹丹, 汪秋宽, 张甜翠, 等. 海带岩藻聚糖硫酸酯对四氯化碳致肝损伤小鼠的保护作用[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(6): 764-766.

[10] Zhang H, Wang Z, Zhang Z, et al. Purified *Auricularia auricular-judae* polysaccharide (AAP I-a) prevents oxidative stress in an ageing mouse model[J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 84: 638-648.

[11] Zeng W, Zhang Z, Gao H, et al. Characterization of antioxidant polysaccharides from *Auricularia auricular* using microwave-assisted extraction[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 89: 694-700.

[12] Xu S, Xu X, Zhang L. Branching Structure and chain conformation of water-soluble glucan extracted from *Auricularia auricular-judae*[J]. Agric Food Chem, 2012, 60: 3498-3506.

[13] 方伟, 陈彦, 孙玉军. 茶多糖对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 茶叶科学, 2008, 28(1): 67-71.

[14] 王巨存, 刑国胜, 胡文铎, 等. 有机锗Ge-132对氧自由基和由羟自由基诱导的脂质过氧化的影响[J]. 中国药理学杂志, 1994, 29(1): 23-25.

[15] 黄兆胜, 黎俏梅. 虎金丸对CCl₄所致实验性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(2): 21-22.

[16] 张国民, 万绍晖, 蒲晓辉, 等. 肝宁颗粒剂对四氯化碳所致大鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(7): 70-71.

[17] 周铁成, 卢宝砾. 天门冬氨酸氨基转移酶测定诊断肝病的意义[J]. 第四军医大学学报, 1993, 14(1): 77-78.

(上接第340页)

mRNA表达水平。

综合上述实验结果,推测积雪草乙酸乙酯提取物可通过抑制APP和BACE1基因表达而显著改善SAMP8 AD小鼠的学习记忆能力。本实验结果将为进一步开发积雪草提供实验依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010年版一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 266-267.
- [2] 王卫霞, 王巍. 改善认知功能的传统植物药研究现状[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(6): 53.
- [3] 黄美娥, 肖银波. 积雪草保健饮料的研制[J]. 食品开发与机械, 2008, 33(7): 86-89.
- [4] 段立胜, 彭朝忠. 傣族民间积雪草用于食疗[J]. 中国民族医药杂志, 2008, 2(2): 43.
- [5] 陈明亮, 房娜, 葛振英, 等. 复方积雪草对阿尔茨海默病大鼠学习记忆的影响[J]. 河南外科学杂志, 2007, 13(4): 6-7.

[6] Kumar MH, Gupta YK. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2002, 79(2): 253-260.

[7] 李霏, 黄金兰, 崔雯, 等. 积雪草乙酸乙酯提取物对AB25-35片段所致的PCI2细胞损伤模型及SAMP8小鼠脑内SOD, GSH-PX的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(4): 111-114.

[8] Morris R. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. J Neurosci, 1984, 11: 47.

[9] Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions[J]. Nature, 1982, 297: 681.

[10] Soldano A, Hassan BA. Beyond pathology: APP, brain development and Alzheimer's disease[J]. Curr Opin Neurobiol, 2014, 27: 61-67.

[11] Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A, et al. Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome[J]. Prog Neurobiol, 2013, 106-107: 33-54.