

文章编号:1001-6880(2017)8-1302-05

锁阳乙酸乙酯提取物改善慢性应激小鼠 认知功能障碍的神经保护机制

马素亚¹, 郑俊超¹, 畅洪昇², 田方泽¹, 程丹¹, 王旭¹, 鲁艺^{1*}¹北京中医药大学中医学院, 北京 100029; ²北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要:本实验以去卵巢后慢性应激模型, 探究锁阳乙酸乙酯提取物(ECS)改善慢性应激小鼠认知功能障碍的神经保护机制。采用 Morris 水迷宫检测小鼠空间学习记忆能力, Western Blot 检测海马组织突触蛋白中突触囊泡蛋白(synaptophysin, Syn)和突触后致密蛋白(Postsynaptic density protein 95, PSD-95)表达量, 通过海马组织形态学改变进一步证明 ECS 的神经保护作用。Morris 水迷宫结果显示雌鼠锁阳乙酸乙酯组穿越平台次数增加($P < 0.01$)。Western Blot 结果显示, ECS 可增加 Syn($P < 0.05$)与 PSD-95($P < 0.05$)蛋白表达量。HE 染色结果显示 ECS 可减轻海马神经元损伤, 改善海马 CA1 区锥体细胞形态。结果表明 ECS 能够增加去势后慢性应激小鼠突触蛋白中 Syn 与 PSD-95 的表达量, 保护海马神经元, 改善慢性应激所致学习记忆障碍。

关键词:锁阳乙酸乙酯提取物; 认知功能; 慢性应激; 神经保护; Syn; PSD-95

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.8.007

Effect of *Cynomorium songaricum* Ethyl Acetate Extract on Cognitive Dysfunction Induced by Chronic Stress

MA Su-ya¹, ZHENG Jun-chao¹, CHANG Hong-sheng², TIAN Fang-ze², CHENG Dan¹, WANG Xu¹, LU Yi^{1*}¹School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;²School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: The mice given chronic unpredictable stress after ovariectomized was used to observe the effect of *Cynomorium songaricum* methyl acetate extract (ECS) on cognitive dysfunction induced by chronic stress. The Morris water maze was applied to test the spatial learning and memory ability. Western blot assay was used to test the expression of Syn and PSD95 in the hippocampus. HE staining was used to observe morphological change of hippocampal neurons. The results showed that the explore time of targeted quadrant of mice from ECS group increased ($P < 0.01$) in the Morris water maze test. In addition, ECS can improve the expression of Syn ($P < 0.05$) and PSD-95 ($P < 0.05$) in Western blot assay. Compared with model group, the neurological form of pyramidal cells in hippocampus were improved by HE staining. Hippocampus nerve cell injury was improved. In conclusion, ECS can improve the expression of Syn and PSD-95, protect hippocampus nerve cell and improve the cognitive dysfunction.

Key words: *Cynomorium songaricum* methyl acetate extract; cognitive function; chronic stress; neuroprotection; Syn; PSD-95

研究显示慢性应激易导致学习记忆障碍^[1,2], 雌激素则具有抗氧化应激的作用。雌激素可提高突触萌芽抗损伤能力, 促进突触形成^[3], 发挥神经保护作用^[4]。突触是突触可塑性变化的敏感部位, 突触可塑性是学习和记忆的细胞分子学基础。在突触前、后膜积聚了许多可导致突触可塑性调节的信号分子, 突触部位的这些分子对于神经传递是非常必

要的^[5]。Syn 是广泛分布于突触前囊泡膜上的钙结合酸性糖蛋白, 是突触小泡特异性的外侧膜蛋白^[6]。突触后致密物质(postsynaptic density, PSD)是突触后膜内侧胞质面一层均质的致密物质, 包含有神经递质受体、细胞骨架和信号分子, 在突触可塑性中起重要作用。突触后致密蛋白-95(postsynaptic density protein-95, PSD-95)是其主要蛋白质成分之一^[5]。本实验以去卵巢后慢性应激模型, 探究锁阳乙酸乙酯提取物(ECS)改善慢性应激小鼠认知功能障碍的神经保护机制。

收稿日期:2017-04-10 接受日期:2017-06-05

基金项目:教育部新世纪优秀人才项目(NCET-13-0695);国家自然科学青年基金(81102623)

*通信作者 E-mail:luyi@bucm.edu.cn

1 材料与仪器

1.1 动物

ICR 小鼠, 雌性, SPF 级, 56~62 d, 30 只。北京维通利华实验动物技术有限公司提供。许可证编号: SCXK(京)2012-0001。

1.2 药品与试剂

锁阳乙酸乙酯部位提取物的提取方法: 取购置于河北安国药材市场的锁阳药材饮片 20 kg, 每次加入 70% 乙醇溶液 160 kg, 加热回流提取 3 次, 每次 1.5 h, 回收溶剂, 减压浓缩至无醇味, 再分别用石油醚、乙酸乙酯, 进行萃取, 回收溶剂, 得到乙酸乙酯萃取的极性部位。Synaptophysin 抗体 (Abcam 公司), PSD-95 (Abcam 公司), β -actin (康为世纪公司), RIPA 裂解液 (碧云天公司), PMSF (碧云天公司), 蛋白酶抑制剂 (Roche 公司), BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo 公司), 预染蛋白 marker (Thermo 公司)。

1.3 仪器

101FAB-2 型电热鼓风干燥箱 (上海树立仪器仪表有限公司); Morris 水迷宫 (中国医学科学院药物研究所研制); 电泳仪, 电转仪 (Bio-Rad 公司), 酶标仪 (Thermo 公司), 凝胶成像系统 (azure), 石蜡切片机 (德国 Leica 公司)。

2 实验方法

2.1 分组、造模及给药

动物分组: 将实验动物采用随机数字法分为对照组、模型组、锁阳乙酸乙酯组, 每组 7 只。适应性饲养一周后, 7% 水合氯醛 0.06 mL/10 g 麻醉, 摘除双侧卵巢。去势休养 7 d 后开始造模给药。造模采用夹尾、昼夜颠倒、束缚、冷刺激、热刺激、禁水 24 h、禁食 24 h 7 种方法随机刺激模型组及锁阳乙酸乙酯组。给药锁阳乙酸乙酯提取物浓度为 0.47 mg/mL, 给药量为 0.1 mL/10 g, 药效学所用剂量为成人口服剂量的 10 倍。药物采用蒸馏水超声溶解。

2.2 指标检测

2.2.1 Morris 水迷宫

预实验 1 d, 定位航行实验 5 d, 空间探索实验 1 d, 平台位于西南象限。定位航行实验中东南、东北、西北三个象限为入水点。记录搜索平台时间即逃避潜伏期, 如小鼠在 60 s 内未找到平台, 则由实验者将其引向平台, 其潜伏期记录为 60 s。空间探索实验在第 6 d 撤平台, 入水点为平台对侧, 记录穿越原

平台次数。

2.2.2 Western Blot

提取小鼠海马组织蛋白进行蛋白定量, 配制 12% 分离胶, 5% 浓缩胶。采用湿转法, 电泳 80V 0.5 h, 100 V 1 h。转膜条件: 75 V 恒压 1.5 h; 0.45 μ m 孔径 PVDF 膜。封闭后一抗孵育过夜。次日, 洗膜并进行二抗孵育。最后凝胶成像系统曝光。

2.2.3 HE 染色

7% 水合氯醛麻醉小鼠, 先用生理盐水冲净血液, 再用 4% 多聚甲醛 (pH 7.4, 4 °C) 灌注固定, 待充分固定后取出脑组织, 用多聚甲醛后固定 6~8 h。常规梯度酒精脱水、石蜡包埋, 4 μ m 厚连续冠状切片, 分别进行 HE 染色。

2.3 统计学方法

行为学检测结果采用 SPSS20 软件进行统计学处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 分别进行单因素方差分析, 继以 LSD 进行多重比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 Morris 水迷宫结果

定位航行结果显示, 各组小鼠逃避潜伏期逐渐缩短, 实验第 1~4 d 各组小鼠逃避潜伏期差异无统计学意义; 实验第 5 d, 与雌鼠对照组比较, 雌鼠模型组潜伏期延长, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与雌鼠模型组比较, 雌鼠锁阳乙酸乙酯组逃避潜伏期缩短, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。空间探索实验结果显示, 与雌鼠对照组比较, 雌鼠模型组穿越平台次数减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与雌鼠模型组比较, 雌鼠锁阳乙酸乙酯组穿越平台次数增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。

3.2 Western Blot 分析

结果显示: Syn 蛋白表达量雌鼠模型组较雌鼠对照组显著减少, $P < 0.01$; 雌鼠锁阳乙酸乙酯组较雌鼠模型组显著增加, $P < 0.05$; PSD-95 蛋白表达量雌鼠模型组较雌鼠对照组显著减少, $P < 0.05$; 雌鼠锁阳乙酸乙酯组较雌鼠模型组显著增加, $P < 0.05$, 结果见图 1、2 及表 2。

3.3 HE 染色

HE 染色结果显示: 模型组海马 CA1 区锥体细胞排列紊乱、稀疏, 细胞体积缩小, 胞核固缩, 胞浆深染, ECS 组海马 CA1 区锥体细胞形态基本正常, 排列较为均匀、整齐, 结构清晰, 结果见图 3。

表 1 各组小鼠学习记忆行为结果比较($n=7, \bar{x} \pm s$)Table 1 Comparison of learning and memory behavior of all groups ($n=7, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	逃避潜伏期 Latency to platform(s)					西南象限穿越次数 In Quadrants Southwest Frequency
	Day1	Day2	Day3	Day4	Day5	
对照 Control	26.0 ± 12.7	20.7 ± 7.9	18.3 ± 7.2	11.0 ± 4.3	10.0 ± 4.1	8.3 ± 0.82
模型 Model	36.7 ± 14.7	26.0 ± 12.6	25.6 ± 11.4	18.0 ± 12.9	22.0 ± 7.8 *	4.8 ± 2.0 **
锁阳乙酸乙酯 ECS	33.9 ± 15.3	24.4 ± 8.4	20.3 ± 9.7	15.3 ± 7.9	13.0 ± 6.8 #	7.2 ± 0.4 ##

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

表 2 蛋白表达量各组结果比较($n=4, \bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of proteins expression of all groups ($n=4, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	Syn/β-actin 灰度值 Gray value of Syn/β-actin	PSD-95/β-actin 灰度值 Gray value of PSD-95/β-actin
对照 Control	0.9434 ± 0.21176	0.9467 ± 0.21297
模型 Model	0.3884 ± 0.14859 **	0.4693 ± 0.11451 *
锁阳乙酸乙酯 ECS	0.8431 ± 0.08906 #	0.8968 ± 0.321346 #

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

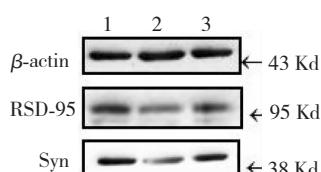


图 1 对照组(1)、模型组(2)、ECS 组(3)海马组织 PSD-95、Syn 蛋白表达情况

Fig. 1 Expression of PSD-95 and Syn in hippocampus from control group (1), model group (2) and ECS group (3)

4 讨论与结论

锁阳是补肾益精的要药,《本草纲目》言其“甘、

温、无毒。大补阴气,益精血,利大便……润燥养筋,治痿弱”。现代研究表明:锁阳能够促进细胞再生和分化,促进神经突触增长并改善记忆功能,具有明显延缓衰老作用^[7,8],锁阳乙酸乙酯提取物可能是其抗氧化活性成份的主要富集部位^[9],本实验以锁阳乙酸乙酯提取物为研究药物。因雌激素在学习记忆、神经保护、情感认知等方面具有重要作用^[10],故实验采用摘除小鼠双侧卵巢,复制雌激素快速撤退效应,与慢性应激结合制造认知功能障碍模型。因中枢神经系统的突触可塑性与学习记忆密切相关,神经细胞的树突数目和密度对雌激素的浓度变化非常敏感,雌激素水平增高时海马神经元可产生新的

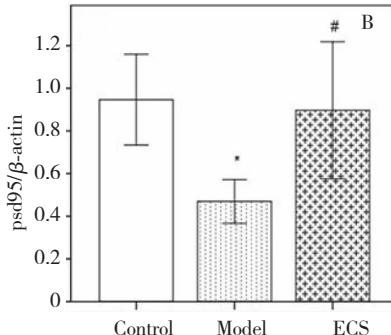
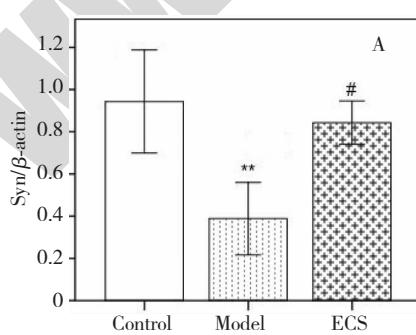
图 2 各组中 Syn/β-actin (A) 及 PSD-95/β-actin (B) 灰度值($n=4, \bar{x} \pm s$)

Fig. 2 The content of grey value of Syn/β-actin (A) and PSD-95/β-actin (B) in different groups ($n=4, \bar{x} \pm s$)

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

Note: compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with model, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

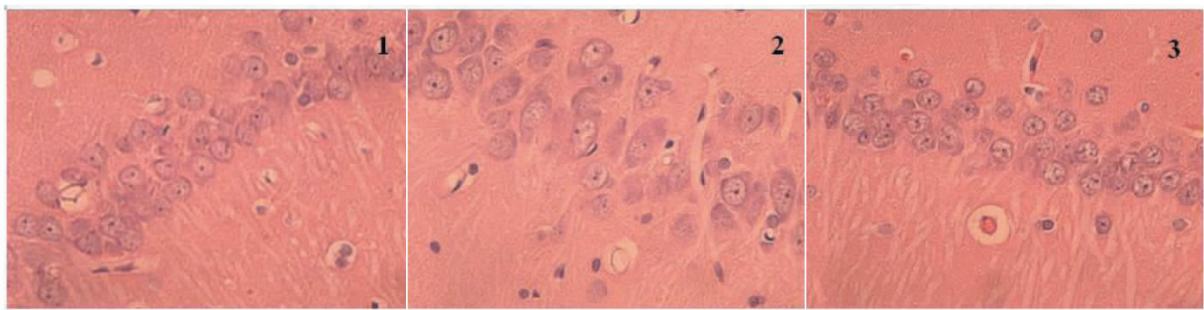


图3 对照组(1)、模型组(2)、ECS组(3)海马病理变化(HE染色, $\times 40$)

Fig. 3 Neurological form of pyramidal cells in hippocampus from control group (1), model group (2) and ECS group (3) (HE staining, $\times 40$)

树突和突触^[11],故本实验检测突触可塑性相关蛋白Syn及PSD-95表达量探究锁阳乙酸乙酯提取物对去势后慢性应激小鼠认知功能障碍的影响。并在海马组织形态学上探究ECS的神经保护作用。

突触可塑性是指神经元之间信息传递效能随神经活动变化而进行动态调节的特性,包括突触结构可塑性和突触功能可塑性两部分。功能可塑性直接影响生命活动,结构可塑性是功能可塑性的形态学基础。突触结构可塑性主要表现为突起的生长及突起密度的增大等。大量的实验研究证明^[12,13]:改变突触可塑性的效能,可影响学习和记忆能力。

Syn是突触囊泡膜上的一种含糖膜结构蛋白,是突触小泡囊泡膜上最重要的跨膜蛋白,参与突触小泡的胞吐作用及突触小泡和突触前膜的融合过程,与神经递质的释放密切相关^[14]。同时,Syn也参与突触形成的过程,与突触的可塑性关系密切^[15,16]。在胚胎发育中,Syn的表达和突触的形成是一致的,是突触发生的一个标志,其数量和分布密度可间接反应突触的密度,它的表达可以作为突触前终末的特异性标志物,用来反映突触的密度和分布^[17]。

PSD-95是在谷氨酸能突触的突触后密集区发现的一种分子量为90~95 kDa的脚手架蛋白,其作为突触后膜标记物^[18,19],是谷氨酸N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体介导的长时程增强(long-term potentiation,LTP)形成和维持学习记忆功能的主要蛋白质^[20]。其中LTP是突触可塑性的主要形式,学习记忆的生物学基础^[21]。结果显示,PSD-95对突触的发育、突触稳定和突触可塑性方面起重要作用^[20]。敲除PSD-95基因可以引起小鼠突触LTP的改变和学习记忆功能障碍^[22]。

实验水迷宫行为学结果显示锁阳乙酸乙酯组穿越平台次数增加($P < 0.01$),在动物行为指标上锁阳乙酸乙酯提取物表现出改善去势后慢性应激小鼠空间记忆障碍作用。Western blot结果显示雌鼠锁阳乙酸乙酯组Syn及PSD-95表达量显著增加($P < 0.05$),在突触可塑性相关蛋白中锁阳乙酸乙酯提取物表现出可增加认知相关突触蛋白表达量的作用。HE染色结果显示ECS组海马CA1区锥体细胞形态基本正常,排列较为均匀、整齐,结构清晰,减轻了海马区神经元损伤,表现出神经保护作用。综上所述,锁阳乙酸乙酯提取物可增加突触可塑性相关蛋白Syn和PSD-95的表达量,发挥神经保护作用,改善去势后慢性应激小鼠认知功能障碍。

参考文献

- Coburn-Litvak PS, Pothakos K, Tata DA, et al. Chronic administration of corticosterone impairs spatial reference memory before spatial working memory in rats. *Neurobiol Learn Memory*, 2003, 80:11-23.
- de Quervain DJF, Roozendaal B, MeGaugh JL. Stress and glucocorticoids impair retrieval of longterm spatialmemory. *Nature*, 1998, 394:787-790.
- Spence RD, Hamby ME, Umeda E, et al. Neuroprotection mediated through estrogen receptor- α in astrocytes. *PNAS*, 2011, 208:8867-8872.
- Qin P(秦需). Neuroprotective effects of endogenous estrogen, Xian: Fourth Military Medical University(第四军医大学), MSc. 2014.
- Guo M(郭敏), Li G(李刚). An update on key proteins involved in synaptic plasticity. *Acta Neuropharmacol(神经药理学报)*, 2013, 3(6):57-64.
- Pu ZX(蒲昭霞), Zhao CM(赵聪敏), Li YL(李亚伶), et al.

- al. Influence of environmental enrichment at different stages of development on the expression of p38 in hippocampus of hypoxia ischemic brain damaged rats. *Chin J Child Health Care* (中国儿童保健杂志), 2007, 15:632-634.
- 7 Liu K(刘凯), Wu JJ(吴建军). Effect of *Cynomoriumsongaricum* drug-containing serum on mesenchymal stem cells into neural cells *in vitro*. *Tradit Chin Med Res*(中医研究), 2010, 5(23):24-27.
- 8 Zhao YQ(赵永清), Wang ZW(王振武), Jing YH(景玉宏). The study on the effect of Suoyang on ultrastructural in the relevant brain areas of learning and memory in the rat's model of Alzheimer's disease. *Chin J Clin Recur*(中国临床康复), 2002, 8:2220-2212.
- 9 Lu Y(鲁艺), Cheng FF(程发峰), Wang QG(王庆国), et al. Antioxidant activities of different extracts of *Cynomoriumsongaricum* and their protective effects against hypoxanthine/xanthine oxidase-induced cell injury: a comparative study. *J Anhui Tradit Chin Med Coll*(安徽中医药大学学报), 2012, 31(4):57-60.
- 10 Liu H(刘华), Hu Y(胡瑶), Zhu DY(朱东亚). Estradiol reverses spatial learning and memory deficit induced by chronic mild stress in female ovariectomized mice. *Acta Univ Med Nanjing*, 2015, 35:992-998.
- 11 Luo P(罗鹏), Xing FK(邢方凯), Wu ZX(武泽新), et al. Progress in the study of estrogen replacement therapy on Alzheimer's disease from basic and clinical. *Chongqing Med* (重庆医学), 2011, 40:2384-2386.
- 12 Gordon-Weeks PR. Microtubules and growthcone function. *J Neurobiol*, 2004, 58(1):70-83.
- 13 Yoshimura T, Arimura N, Kaibuchi K. Molecular mechanisms of axon specific action and neuronal disorders. *Ann NY Acad* Sci, 2006, 1086:116-125.
- 14 Arthur CP, Stowell MH. Structure of synaptophysin: a hexameric MARVEL-domain channel protein. *Structure*, 2007, 15: 707-714.
- 15 Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, et al. Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays*, 2004, 26:445-453.
- 16 Honer WG, Falkai P, Chen C, et al. Synaptic and plasticity-associated proteins in anterior frontal cortex in severe mental illness. *Neuroscience*, 1999, 91:1247-1255.
- 17 La Vecchia C. Oral contraceptives, menopause or mone replacement therapy, and risk of stroke. *Maturitas*, 2004, 47: 265-268.
- 18 Takeuchi M, Hirao K, Toyoda A, et al. SAPAPS. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density. *J Biol Chem*, 1997, 272:11943-11951.
- 19 Liu Q, Trotter J, Peters MM, et al. Neuronal LRP1 knockout in adult mice leads to impaired brain lipid metabolism and progressive, age-dependent synapse loss and neurodegeneration. *J Neurosci* 2010, 30:17068-17078.
- 20 El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, et al. PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. *Science*, 2000, 290:1364-1368.
- 21 Sacktor TC. Pkmzeta, LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage. *Prog Brain Res*, 2008, 169:27-40.
- 22 Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, et al. Enhanced longterm potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature*, 1998, 396:433-439.

(上接第 1283 页)

- 15 Parker VD. Homolytic bond (H-A) dissociation free energies in solution. Applications of the standard potential of the (H⁺/H. bul.) couple. *J Am Chem Soc*, 1992, 11: 7458-7462.
- 16 Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, et al. Gaussian03 [CP]. Gaussian Inc, Pittsburgh PA, 2003.
- 17 Fifen JJ, Nsangou M, Dhaouadi, et al. Solvent effects on the antioxidant activity of 3,4-dihydroxyphenylpyruvic acid: DFT and TD-DFT studies. *ComputTheoretic Chem*, 2011, 66: 232-243.
- 18 Wright JS, Johnson ER, DiLabio GA. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J Am Chem Soc*, 2001, 123:1173-1183.
- 19 Francisco-Marquez M, Galano A. On the OH and OOH scavenging activity of 3-methyl-1-pyridin-2-yl-5-pyrazolone: Comparisons with its parent compound, Edaravone. *Int J Quantum Chem*, 2012, 112:3441-3448.
- 20 Li MJ, Liu WX, Peng CR, et al. A DFT study on reaction of eupatilin with hydroxyl radical in solution. *Int J Quantum Chem*, 2013, 113:966-974.
- 21 Zhang HY, Ji HF. How vitamin E scavenges DPPH radicals in polar protic media. *New J Chem*, 2006, 30, 503-504.