

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2021.03.008

葛根素对去势脑缺血大鼠学习记忆功能的影响^{*}

杜海娜 齐汝霞[△] 石宏 栾天 丛群又 公毅
(济宁医学院基础医学院, 济宁 272067)

摘要 目的 探讨葛根素对去势脑缺血大鼠学习记忆功能的保护作用。方法 将 SD 雌性大鼠随机分为正常对照组、OVX+2VO 组、Sham-OVX+2VO 组和葛根素低剂量组(25mg·kg⁻¹)、中剂量组(50mg·kg⁻¹)、高剂量组(100mg·kg⁻¹)。利用去卵巢(Ovariectomy, OVX)与双侧颈总动脉结扎(2-vessel occlusion, 2-VO)结合的方法建立去势脑缺血(OVX+2VO)大鼠模型。给药组腹腔注射葛根素注射液, 每天 1 次。跳台实验检测其学习记忆功能; TTC 染色观察脑缺血情况; WST-1 法和 TBA 法测定海马中超氧化物歧化酶(SOD)活力和丙二醛(MDA)含量; 分光光度计和酶标仪分别检测乙酰胆碱酯酶(AchE)活性和乙酰胆碱(Ach)含量。结果 与 OVX+2VO 组比较, 葛根素干预组脑缺血情况得到明显改善, SOD 活力升高($P<0.05$), MDA 含量降低($P<0.05$), AchE 活性减弱($P<0.05$), Ach 含量升高($P<0.05$), 跳台实验潜伏期延长($P<0.05$)、错误次数减少($P<0.05$)。结论 葛根素能改善去势脑缺血大鼠的学习记忆功能, 其作用机制可能与降低 AchE 活性、增加 Ach 和 MDA 含量、降低 SOD 活力有关。

关键词 葛根素; 去势脑缺血; 学习记忆功能

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2021)06-184-05

Effects of puerarin on learning and memory function of ovariectomized rats with cerebral ischemia

Du Haina, Qi Ruxia[△], Shi Hong, Luan Tian, Cong Qunyou, Gong Yi
(College of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract; Objective To investigate the protective effect of puerarin on learning and memory function in ovariectomized rats with chronic cerebral ischemia. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, low (25mg·kg⁻¹), medium (50mg·kg⁻¹) and high (100mg·kg⁻¹) dose of puerarins group. The model of ovariectomy (OVX) with the bilateral common carotid artery ligation (2VO) were established. Puerarin injection was given intraperitoneally once a day. Learning and memory function was measured by Step-down test. Cerebral ischemia was observed by TTC staining. The activity of SOD and MDA in hippocampus were determined by WST-1 and TBA methods. The activity of AchE and content of Ach were measured by spectrophotometer and microplate reader separately. **Results** Compared with OVX+2VO group, the cerebral ischemia was significantly relieved, the activity of SOD was higher ($P<0.05$), the content of MDA and the activity of AchE were weakened ($P<0.05$), the content of Ach was elevated ($P<0.05$). Step down latency was prolonged ($P<0.05$) and the numbers of errors was fewer ($P<0.05$). **Conclusion** Puerarin can improve the learning and memory function of ovariectomized rats with cerebral ischemia, which may be related to decrease the activity of AchE, increase the content of MDA and reduce SOD activity.

Keywords: Puerarin, Ovariectomized rats with cerebral ischemia, Learning and memory function

* [基金项目] 济宁医学院大学生创新训练计划项目 (cx2019115)

△ [通信作者] 齐汝霞, E-mail: 2256105340@qq.com

缺血性卒中发病率高于出血性卒中,占脑卒中总数的 60%~70%。已成为老年人致残致死的最主要原因,给社会和家庭带来沉重经济和精神负担。对女性来讲,绝经前卒中发病率显著低于同年龄段男性,但绝经后则显著高于同年龄段男性,且预后更差^[1],说明雌激素对脑卒中具有保护作用^[2]。Gibson 等^[3]证实雌激素能够减少脑卒中梗死容积。大样本临床研究显示,雌激素可减轻脑卒中发病率和死亡率,但同时也可以增加乳腺癌和子宫内膜癌等风险^[4]。而植物雌激素对乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌等多种肿瘤细胞的增殖均有抑制作用^[5]。葛根素是从野葛的根部分离出的一种异黄酮类化合物,属于植物性雌激素,具有和雌激素相似的作用,其对不同类型的神经性疾病具有一定保护作用,并且能增强去势大鼠的学习和记忆认知功能,减少海马 CA1 区神经元的凋亡^[6]。

葛根素对去势脑缺血大鼠有何影响未见报道,本课题组拟利用去势脑缺血大鼠模型,观察葛根素对其学习记忆功能的影响并进一步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验仪器 低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂, LDZ5-2);组织匀浆机(IKA, KB5/10);722 型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司, 707040913);跳台仪(中国医学科学院药研所);Multiskan FC 型酶标仪(赛默飞世尔上海仪器有限公司, 357-906301);电热恒温培养箱(上海龙跃仪器设备有限公司, LI-9082)。

1.1.2 试剂 葛根素注射液(山东方明药业集团股份有限公司, H20033292);TTC 染色液(美国索来宝公司, T8170);丙二醛(MDA)测试盒(南京建成生物工程研究所, A003-1-2);超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(南京建成生物工程研究所, A001-3-2);总蛋白定量测试盒(BCA 法)(南京建成生物工程研究所, A045-4-2);乙酰胆碱(Ach)测试盒(南京建成生物工程研究所);乙酰胆碱酯酶(AchE)测试盒(南京建成生物工程研究所, A024)。

1.1.3 实验动物及分组 清洁级健康 SD 雌性大鼠, 15 月龄, 体重约 220g, 山东鲁抗医药股份有限公司提供(许可证号: SCXK(鲁)20130001)。实验前在恒温、恒湿实验室饲养 1 周, 自由进食进水。将大鼠随机分为 6 组, 正常对照组、OVX+2VO 组、

Sham-OVX+2VO 组、葛根素低剂量组($25\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中剂量组($50\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、高剂量组($100\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 8 只。葛根素低剂量组($25\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、中剂量组($50\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、高剂量组($100\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)在 OVX 和单侧颈总动脉结扎后, 分别给予葛根素注射液 $0.2\text{ml} \cdot 100\text{g}^{-1}$ 腹腔注射, 每天 1 次。其它组给予等体积蒸馏水, 方法同上。所有动物实验符合动物伦理学要求。

1.2 方法

1.2.1 OVX+2VO 大鼠模型制备 10%水合氯醛($0.35\text{ml}/100\text{g}$)腹腔注射将大鼠麻醉后, 俯卧位固定, 备皮并消毒, 于雌性大鼠背外侧髋关节部位纵行剪开皮肤约 1.5cm, 钝性分离皮下组织和肌层, 于腹腔内找到“菜花样”卵巢组织, 结扎输卵管, 切除双侧卵巢后闭合伤口。接着行颈部手术, 暴露一侧颈总动脉, 小心将血管和神经分离, 结扎血管远心端和近心端, 从中间将血管剪断, 缝合伤口。1 周后相同方法结扎另一侧颈总动脉, OVX+2VO 模型制备成功。Sham-OVX+2VO 大鼠只结扎双侧颈总动脉不切除卵巢。

1.2.2 TTC 染色 将大鼠麻醉(方法同上)后断头取脑, 在 -18°C 冰箱中冷冻约 20min, 将鼠脑置入专用脑槽, 连续切成 6 片, 厚度 2mm, 依次放入十二孔板中, 注入 2% TTC 染色液, 避光, 放入 37°C 恒温培养箱 25min 后, 用无菌注射器将染色液抽出后, 用 4%多聚甲醛固定 24h, 正常大脑组织染成鲜红色, 缺血组织呈苍白色, 将染色完成的大脑组织按切片顺序排列, 用数码相机拍照^[7]。

1.2.3 WST-1 法测定 SOD 活力 将大鼠麻醉后断头取脑, 立即放入装有冷生理盐水培养皿中, 取出海马, 称重后加 9 倍体积的生理盐水, 剪碎组织, 冰水浴制备匀浆, 3000rpm, 离心 10min, 取上清即 10%组织原浆备用。严格按照试剂盒说明书提供步骤进行操作, 各孔混匀后, 37°C 孵育 20min, 450nm 处酶标仪读数, 得到各孔 OD 值, 将数据代入公式进行计算: $\text{SOD 活力}(\text{U}/\text{mgprot}) = \text{SOD 抑制率} \div 50\% \times \text{反应体系稀释倍数} (0.24\text{ml}/0.02\text{ml}) \div \text{待测样本蛋白浓度}(\text{mgprot}/\text{ml})$ 。

1.2.4 TBA 法测定 MDA 含量 按以上方法制备海马组织匀浆, 严格按照试剂盒说明书提供步骤进行操作, 离心管混匀后, 95°C 水浴 40min, 取出后流水冷却, 然后 4000rpm 离心 10min。取上清, 532nm 处, 1cm 光径, 蒸馏水调零, 测各管 OD 值。利用公

式计算 MDA 含量:MDA 含量(nmol/mgprot)=(测定 OD 值-对照 OD 值)/(标准 OD 值-空白 OD 值)×标准品浓度(10nmol/ml)÷待测样本蛋白浓度(mgprot/ml)。

1.2.5 AchE 测定 按以上方法制备海马组织匀浆,严格按照试剂盒说明书步骤操作。各管混匀后静置 15min,波长 412nm,0.5cm 光径,双蒸水调零,测定各管 OD 值,利用公式计算组织中的 AchE 活力: AchE 活力(U/mgprot)=(测定 OD 值-对照 OD 值)/(标准 OD 值-空白 OD 值)×标准品浓度(1μmol/ml)÷待测样本蛋白浓度(mgprot/ml)。

1.2.6 Ach 测定 按以上方法制备海马组织匀浆,严格按照试剂盒说明书步骤操作。各孔混匀后,静置 10min,550nm 处,取 200ul 于 96 孔板在 550nm 处酶标仪测定各孔 OD 值,利用公式计算 Ach 含量: Ach 含量(ug/mgprot)=(测定 OD 值-测定空白 OD 值)/(标准 OD 值-空白 OD 值)×标准品浓度(400μg/ml)×样本测试前稀释倍数÷蛋白浓度(mgprot/ml)。

1.2.7 跳台实验 实验分为训练期和实验期。训练期,将大鼠放到跳台箱内熟悉 3min,然后通 36V 交流电 5min,大鼠受到电击后,正常反应是跳上平台逃脱电击。如果大鼠始终没有跳上平台则弃去不用。训练结束 24h 后,再次将大鼠放入跳台内适应 3min,通电 5min,记录大鼠第一次跳上平台的时间(即跳台潜伏期),观察大鼠在 5min 内跳下平台的次数(即错误次数),若 5min 内大鼠未跳下平台,错误次数为 0,跳台潜伏期为 5min^[8]。

1.3 统计学方法

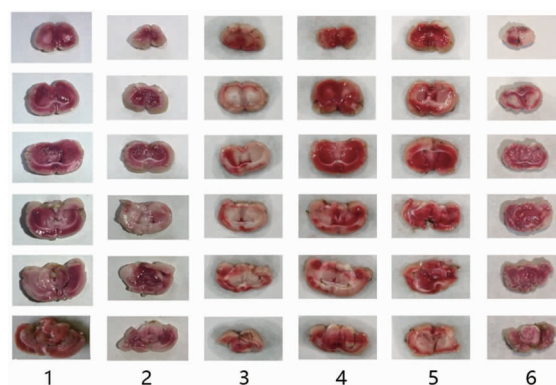
应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,进一步两两比较采用 Dunnett-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠脑缺血情况

正常对照组大鼠脑组织染成鲜红色,Sham-OVX+2VO 组和 OVX+2VO 组脑缺血组织呈苍白色,给予葛根素治疗后,葛根素干预组脑缺血情况得到明显改善,随剂量增加,缺血面积逐渐减少。见图 1。



注:1-正常对照组;2-Sham-OVX+2VO 组;3-OVX+2VO 组;
4-葛根素低剂量组;5-葛根素中剂量组;6-葛根素高剂量组。

图 1 TTC 染色后各组大鼠脑切片缺血区比较

2.2 各组大鼠 SOD、MDA、AchE、Ach 的活性含量水平

与正常对照组比,Sham-OVX+2VO 组和 OVX+2VO 组 SOD 活力均降低、AchE 活性升高、Ach 含量减少($P < 0.05$),OVX+2VO 组 MDA 含量明显升高($P < 0.05$)。与 OVX+2VO 组比,葛根素使 SOD 活力升高,且随剂量增加,作用明显增强($P < 0.05$);葛根素 100mg·kg⁻¹ 组能减低 MDA 含量($P < 0.05$),降低 AchE 活性($P < 0.05$)升高 Ach 含量($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组 SOD 活力、MDA 含量、AchE 活性及 Ach 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD 活力/U·mgprot ⁻¹	MDA 含量/nmol·mgprot ⁻¹	AchE/U·mgprot ⁻¹	Ach/μg·mgprot ⁻¹
正常对照组	8	107.34±16.42	7.83±3.09	0.32±0.12	283.37±28.67
Sham-OVX+2VO 组	8	76.26±9.83 [#]	10.05±4.42	0.89±0.46 [#]	156.40±60.31 [#]
OVX+2VO 组	8	35.40±17.15 [#]	24.87±5.73 [#]	1.11±0.14 [#]	147.49±35.69 [#]
葛根素低剂量组	8	69.34±17.28 ^{&}	16.42±11.90	0.95±0.38	208.33±77.53
葛根素中剂量组	8	69.45±8.17 ^{&}	14.45±7.73	0.92±0.20	233.27±52.38
葛根素高剂量组	8	85.17±17.73 ^{&}	9.32±5.35 ^{&}	0.50±0.07 ^{&}	261.12±90.30 ^{&}
F 值		18.36	39.61	132.06	10.45
P		P<0.001	P<0.001	P<0.001	P<0.001

注:与正常对照组相比,[#] $P < 0.05$;与 OVX+2VO 组相比,[&] $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠跳台实验结果

与正常对照组相比, Sham-OVX + 2VO 组和 OVX+2VO 组的潜伏期明显缩短 ($P<0.05$), 错误次数增多 ($P<0.05$); 与 OVX+2VO 组相比, 葛根素 50mg/kg 组、葛根素 100mg/kg 组潜伏期明显延长 ($P<0.05$), 错误次数减少 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠跳台实验潜伏期和错误次数比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	潜伏期(S)	错误次数(次)
正常对照组	8	231.54±97.09	1.50±1.91
Sham-OVX+2VO 组	8	125.55±128.08 [#]	7.75±6.95 [#]
OVX+2VO 组	8	81.48±57.48 [#]	11.00±9.49 [#]
葛根素低剂量组	8	153.77±206.54	5.50±7.79
葛根素中剂量组	8	300.00±0 ^{&}	1.50±2.38 ^{&}
葛根素高剂量组	8	234.68±130.65 ^{&}	1.75±3.50 ^{&}
F 值		46.83	105.24
P		$P<0.001$	$P<0.001$

注:与正常对照组相比, [#] $P<0.05$;与 OVX+2VO 组相比, [&] $P<0.05$ 。

3 讨论

绝经后女性缺血性脑卒中发病率逐年上升, 其所致患者死亡数约占女性死亡人数的 1/6^[9]。缺血后的后遗症多见, 除引起运动和感觉异常外, 还伴有认知功能障碍, 严重影响患者的生活质量^[10]。如何防治绝经后女性脑卒中已成为亟待解决的社会和医学难题。

本课题组采用 OVX 合并 2VO 制备去势脑缺血实验模型, 能够较好地模拟绝经后女性伴发脑缺血的状态。TTC 染色后, Sham-OVX + 2VO 组和 OVX+2VO 组脑缺血组织呈苍白色, 且 OVX+2VO 组脑缺血更明显, 说明 OVX 合并 2VO 加重脑缺血, 可以解释为何绝经后女性缺血性脑卒中的发病率高于男性, 且更严重。葛根素随剂量增加, 大鼠脑缺血情况逐渐减轻, 提示其对 OVX 合并 2VO 大鼠的缺血性损伤有保护作用。

脑组织发生缺血缺氧后, 通过酶系或非酶系统产生氧自由基, 过量的自由基攻击细胞膜中的多不饱和脂肪酸, 引起脂质的过氧化反应, 并形成 MDA、酮基、羟基等脂质过氧化物, 以及新的氧自由基。可见测定 MDA 含量能够反映体内脂质过氧化程度, 间接反映缺血对细胞造成的损伤^[11]。SOD 对机体氧自由基具有清除能力, 以防止自由

基对细胞造成的损伤^[12]。葛根素能降低 MDA 含量并随剂量增加升高 SOD 活力升高, 提示其对缺血性脑损伤具有保护作用。

Ach 是第一个被发现的脑内神经递质, 主要涉及记忆、学习、运动和觉醒的调节。胆碱能神经末梢以胆碱和乙酰辅酶 A 为原料, 在胆碱乙酰化酶的作用下合成 Ach, 合成后储存在突触前膜的囊泡内。当神经冲动到达神经末梢时, 突触前膜与囊泡膜融合发生破裂, 以胞裂外排的方式释放 Ach, 释放出的 Ach 在 AchE 的作用下水解失活。脑内的 AchE 主要分布在大脑额叶、顶叶和海马, 而海马与学习记忆的关系最为密切, 若海马组织中 AchE 活性增强, 可降低神经突触间隙 Ach 水平, 影响神经突触传递, 导致学习记忆和认知功能降低^[13-14]。本实验中, OVX+2VO 组大鼠海马组织中 AchE 活性升高, Ach 含量降低。葛根素干预海马组织中 AchE 活性降低, Ach 含量提高。在跳台实验中, 葛根素组大鼠跳台潜伏期明显延长, 错误次数减少, 说明葛根素可能通过增强 AchE 活性提高去卵巢合并慢性脑缺血大鼠的学习记忆功能。

综上所述, 葛根素对去势脑缺血大鼠的学习记忆功能有改善作用, 其机制可能与其抗氧化自由基作用减轻脑缺血所致损伤, 同时抑制 AchE 活力, 促进 Ach 的突触传递功能有关。

利益冲突: 所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Haast RA, Gustafson DR, Kiliaan AJ. Sex differences in stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32(12): 2100-2107. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.121.141.
- [2] Persky RW, Turtzo LC, McCullough LD. Stroke in women: disparities and outcomes [J]. Curr Cardiol Rep, 2010, 12(1): 6-13. DOI: 10.1007/s11886-009-0080-2.
- [3] Gibson CL, Gray LJ, Murphy SP, et al. Estrogens and experimental ischemic stroke: a systematic review [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2006, 26(9): 1103-1113. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600270.
- [4] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial [J]. JAMA, 2002, 288(3): 321-333. DOI: 10.1001/jama.288.3.321.
- [5] Ward HA, Kuhnle GG, Mulligan AA, et al. Breast, color-

- ectal, and prostate cancer risk in the European Prospective investigation into cancer and Nutrition-Norfolk in relation to phytoestrogen intake derived from an improved database[J]. *Am J Clin Nutr*, 2010, 91 (2) : 440-448. DOI:10.3945/ajcn.2009.28.282.
- [6] 王爱岳,王良,李强,等.葛根素联合胞磷胆碱钠治疗脑梗塞的临床观察[J].*海南医学*,2005,16(4):63.
- [7] Li H, Zhang N, Lin HY, et al. Histological, cellular and behavioral assessments of stroke outcomes after photothrombosis-induced ischemia in adult mice [J]. *BMC Neurosci*, 2014, 15 (1) : 58-66. DOI: 10.1186/1471-2202-15-58.
- [8] Ning N, Hu JF, Sun JD, et al. Clausenamide facilitates synaptic transmission at hippocampal Schaffer collateral-CA1 synapses [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 682 (1) : 50-55. DOI:10.1016/j.ejphar.2012.02.004.
- [9] Caso V, Falorni A, Bushnell CD, et al. Pregnancy, Hormonal Treatments for Infertility, Contraception, and Menopause in women after ischemic stroke: a consensus document [J]. *Stroke*, 2017, 48 (2) : 501-506. DOI: 10.1161/STROKEAHA.116.013964.
- [10] Robinson RG, Jorge RE. Post-stroke depression: a review [J]. *Am J Psychiatry*, 2016, 173 (3) : 221-231.
- [11] Gao Q, Ji ZH, Yang Y, et al. Neuroprotective effect of Rhizoma *Atractylodismacrocephalae* against excitotoxicity-induced apoptosis in cultured cerebral cortical neurons [J]. *Phytother Res*, 2012, 26 (4) : 557-561. DOI: 10.1002/ptr.3595.
- [12] Liu C, Zhao H, Ji ZH, et al. Neuroprotection of atractylenolide III from *Atractylodis macrocephalae* against glutamate-induced neuronal apoptosis via inhibiting caspase signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39 (9) : 1753-1758. DOI:10.1007/s11064-014-1370-7.
- [13] Zhang H, Lai Q, Li Y, et al. Learning and memory improvement and neuroprotection of *Gardenia jasminoides* (*Fructus gardenia*) extract on ischemic brain injury rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 196 : 225-235. DOI: 10.1016/j.jep.2016.11.042.
- [14] Liu JM, Wu PF, Rao J, et al. ST09, a novel thioester derivative of tacrine, alleviates cognitive deficits and enhances glucose metabolism in vascular dementia rats [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2016, 22 (3) : 220-229. DOI: 10.1111/cns.12495.

(收稿日期 2020-12-16)

(本文编辑:石俊强)

(上接第 183 页)

- [16] Seminara RS, Jeet C, Biswas S, et al. The Neurocognitive Effects of Ghrelin-induced Signaling on the Hippocampus; A Promising Approach to Alzheimer's Disease [J]. *Cureus*, 2018, 10 : e3285. DOI: 10.7759/cureus.3285; 10.7759/cureus.3285.
- [17] Wang H, Dou S, Zhu J, et al. Ghrelin mitigates MPP (+) -induced cytotoxicity: Involvement of ERK1/2-mediated Nrf2/HO-1 and endoplasmic reticulum stress PERK signaling pathway [J]. *Peptides*, 2020, 133 : 170374. DOI: 10.1016/j.peptides.2020.170374; 10.1016/j.peptides.2020.170374.
- [18] Wang H, Dou S, Zhu J, et al. Ghrelin protects against rotenone-induced cytotoxicity: Involvement of mitophagy and the AMPK/SIRT1/PGC1 α pathway [J]. *Neuropeptides*, 2021, 87 : 102134. DOI: 10.1016/j.npep.2021.102134; 10.1016/j.npep.2021.102134.
- [19] Park JS, Davis RL, Sue CM. Mitochondrial dysfunction in parkinson's disease: new mechanistic insights and therapeutic perspectives [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2018, 18 : 21. DOI: 10.1007/s1191001808293; 10.1007/s11910-018-0829-3.

(收稿日期 2021-03-29)

(本文编辑:石俊强)