

· 论著 ·

## 毛蕊花苷对高原缺氧小鼠记忆损伤的改善及机制研究

朱玉婷<sup>1,2</sup>, 王谨慧<sup>3</sup>, 李茂星<sup>1,2,4</sup>, 李晓琳<sup>2,4</sup>, 陶文迪<sup>1,2</sup>, 刘延彤<sup>2</sup> (1. 兰州大学药学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州总医院全军高原环境损伤防治重点实验室, 甘肃 兰州 730050; 3. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃 兰州 735000; 4. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000)

**[摘要]** 目的 探讨毛蕊花苷对高原缺氧记忆损伤的改善作用及其可能机制。方法 采用八臂迷宫训练小鼠的空间记忆能力, 训练成功后随机分为5组: 常氧对照组(蒸馏水 0.1 ml/10 g)、缺氧模型组(蒸馏水 0.1 ml/10 g)、毛蕊花苷低(50 mg/kg)、中(150 mg/kg)、高(300 mg/kg)剂量组, 灌胃给药7 d。第4天给药完毕后, 除常氧对照组置于饲养室(1 500 m)外, 剩余4组置于大型低压氧舱模拟高原缺氧环境(7 500 m, 3 d)。行八臂迷宫测试(4 000 m), 解剖取血浆和脑组织, 测定脑组织活性氧(ROS)、血浆和脑组织丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)含量, 总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力。结果 与常氧对照组相比, 缺氧模型组八臂迷宫实验各项指标、脑组织 ROS、MDA 及血浆 MDA 显著升高, 脑组织和血浆 GSH 含量、T-SOD 活力显著降低; 与缺氧模型组相比, 毛蕊花苷各剂量组八臂迷宫实验各项指标、脑组织 ROS、MDA 及血浆 MDA 都呈现不同程度的降低, 脑组织和血浆 GSH 含量、T-SOD 活力呈现不同程度的升高。结论 毛蕊花苷对高原缺氧记忆损伤有较好的改善作用, 可能与其稳定机体抗氧化酶系统的平衡, 减轻氧化应激有关。

**[关键词]** 毛蕊花苷; 高原记忆损伤; 八臂迷宫; 氧化应激

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2019)01-0023-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.006

## Ameliorate effect and mechanism of verbascoside on memory impairment in hypoxic mice

ZHU Yuting<sup>1,2</sup>, Wang Jinhui<sup>3</sup>, LI Maoxing<sup>1,2,4</sup>, LI Xiaolin<sup>2,4</sup>, TAO Wendi<sup>1,2</sup>, LIU Yantong<sup>2</sup> (1. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital & Key Laboratory of the Prevention and Cure for the Plateau Environment Damage of PLA, Lanzhou 730050, China; 3. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 4. Department of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects and mechanism of verbascoside on hypoxia-induced memory impairment. **Methods** The eight-arm maze was used to train mice's spatial memory ability. After successful training, mice were randomly divided into five groups: a normoxic control group (distilled water, 0.1 ml/10 g), hypoxic model group (distilled water, 0.1 ml/10 g), the verbascoside low dose group (50 mg/kg), medium dose group (150 mg/kg), and high dose group (300 mg/kg) were administered orally once a day for a total of 7 days. After administration on the fourth day, except for the normoxic control group was placed in the animal room (1 500m), the remaining four groups were placed in a large-scale hypobaric chamber to simulate the hypoxic environment of the plateau (7 500 m, 3 days). Eight-armed maze test (4 000 m) was used and the plasma and brain tissues were dissected out and measured for reactive oxygen species (ROS) in the brain, malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) and total superoxide dismutase (T-SOD) activity in plasma and brain. **Results** Compared with the normoxic control group, the indexes of the eight-armed maze, ROS and MDA in the brain, MDA in the plasma of the hypoxia model group were significantly increased, and the GSH and T-SOD enzyme activities in the brain and plasma were notably decreased. Compared with the hypoxic model group, the indexes of the eight-armed maze, ROS and MDA in the brain, MDA in the plasma in the various groups of verbascoside were reduced more or less, the GSH and T-SOD enzyme activities in the brain and plasma slightly were increased. **Conclusion** Verbascoiside could ameliorate the hypoxic memory impairment at high altitude, which might be related to the stabilization of the body's antioxidant enzyme system balance and

**[基金项目]** 全军医学科技青年培育拔尖项目(16QNP055); 全军医药卫生科研课题(C LZ15JA05, CLZ15JB04); 甘肃省自然科学基金项目(17JR5RA332); 甘肃省中医药管理局课题(GZK-2015-59)

**[作者简介]** 朱玉婷, 硕士研究生, 研究方向: 天然药物化学及中药新药研究与开发, Tel: (0931)8994676, Email: yuting1461@126.com

**[通讯作者]** 李茂星, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 高原军事药理学, Email: limaox2005@aliyun.com

reduce oxidative stress.

[Key words] verbascoside; memory impairment in hypoxic; eight-arm maze; oxidative stress

随着越来越多的人进入高原地区生活、工作,高原上的低压缺氧环境作为一种损伤和致病因素逐渐凸显出来。缺氧可激发机体产生应激反应,引起高山病、肺水肿、脑水肿、感觉及运动功能障碍等一系列急慢性疾病<sup>[1-2]</sup>,导致记忆损伤,作业效能下降。

毛蕊花苷(图1)是一种广泛分布于苜蓿、马先蒿、螃蟹甲等多种双子叶植物的苯乙醇苷类化合物,又称类叶升麻苷、麦角甾苷。研究发现,毛蕊花苷具有显著的抗氧化<sup>[3]</sup>、抗菌抗炎<sup>[4-5]</sup>、抗病毒<sup>[6]</sup>、抗肿瘤<sup>[7]</sup>、增强记忆力<sup>[8]</sup>等生理活性。课题组前期研究表明,从藏药马先蒿中提取到的苯乙醇苷富含毛蕊花苷,具有明显的高原缺氧记忆损伤保护作用<sup>[9]</sup>。本实验采用毛蕊花苷干预高原缺氧时小鼠八臂迷宫实验,从氧化应激方面探究其对高原记忆的改善作用,阐明其可能的机制。

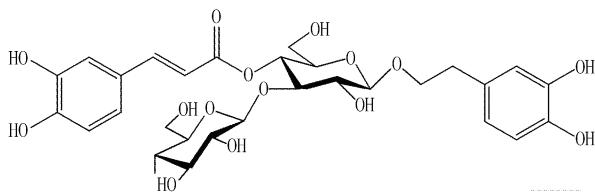


图1 毛蕊花苷结构式

## 1 实验材料

### 1.1 实验动物

SPF级雄性 BALB/C 小鼠 90 只,体重(20±2)g,兰州总医院动物实验科提供,实验动物生产许可证号:SCXK(军)2012-0020,使用许可证号:SYXK(军)2012-0029。饲养室温度为(25±2)℃,每12 h明暗交替,维持饲料喂养,自由进水。为了保证小鼠能健康生长并顺利实验,进行八臂迷宫训练过程中限制其饮食,使体重维持在自由进食的80%~85%。

### 1.2 药品与试剂

毛蕊花苷为实验室自制(HPLC法测定含量,以毛蕊花糖苷计为81.39%);总蛋白定量试剂盒(BCA法,批号:20170726)、活性氧(ROS)测试盒(批号:20170724)、微量还原型谷胱甘肽(GSH)测试盒(批号:20170724)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒(批号:20170724)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号:20170726),均由南京建成生物工程研究所生产。

### 1.3 实验器材

RM-200 八臂迷宫分析测试系统(成都泰盟科

技术有限公司);DYC-3070 大型低压氧仓(贵州风雷航空军械有限公司);BP210S 电子天平(赛多利斯有限公司);全自动样品快速研磨仪 JXFSTPRP-24 (上海净信科技);Sigma 3K15 低温离心机(德国 Sigma 公司)。

## 2 方法

### 2.1 八臂迷宫训练

八臂迷宫实验开始前先让小鼠在迷宫内适应环境,2次/d,一次3~4只。适应环境时在每臂都放置食物,小鼠自由摄取食物180 s。开始训练后,只在迷宫的4个臂放置食物(1、2、4、6臂),并贴信号图片,维持此顺序至实验结束。起初先将小鼠置于迷宫中央区的透明舱内,15 s后撤除透明舱,让小鼠自由觅食,待180 s末或动物完成所有放食臂的觅食时作为一次训练结束。检测的指标为:①工作记忆错误(working memory errors, WME):小鼠在同一次训练中第二次或多次进入已经吃过食物的臂;②参考记忆错误(reference memory errors, RME):小鼠进入无食物臂;③错误总数(total errors, TE):180 s内的错误总数;④潜伏期(total reaction times, TT):小鼠完成一次训练所用时间。当连续5次TE≤1,同时WME=0则可视为训练成功(连续训练25 d)。

### 2.2 动物分组及给药方式

从训练成功的小鼠中挑选出50只随机分为5组(常氧对照组,缺氧模型组,毛蕊花苷低、中、高剂量组),每组10只。自分组起,毛蕊花苷低、中、高剂量组分别给予50、150、300 mg/kg 药物灌胃,常氧对照组和缺氧模型组给予等体积的蒸馏水(0.1 ml/10 g)灌胃,连续7 d,1次/d。

### 2.3 高原低压低氧模型的制备

给药第4天,用八臂迷宫测试系统测试各组小鼠的WME、RME、TE及TT,每只测试2次,取平均值。测试后,常氧对照组置于饲养室(海拔约1500 m),剩余各组置于大型低压氧舱中,模拟海拔7500 m高原环境(舱内压力:35.9 kPa,氧分压:8.0 kPa),每天上午9点以2 m/s匀速下降至4000 m(舱内压力:62.1 kPa,氧分压:13.0 kPa),实验员进入在舱内灌胃给药并加水补食,连续3 d。给药结束后,将低压氧舱以2 m/s匀速上升至7500 m,在氧舱中的小鼠可自由饮水、摄食。

## 2.4 八臂迷宫实验测定小鼠空间记忆能力

第7天,对5组小鼠进行八臂迷宫测试(在海拔4 000 m低压氧舱内进行),记录各组小鼠 WME、RME、TE 及 TT,每只测试2次,取平均值。对照前后2次测试结果,考察在高原缺氧环境下毛蕊花苷对小鼠记忆损伤的改善作用。

## 2.5 血浆和脑组织 MDA、GSH 含量、T-SOD 活力、脑组织 ROS 含量测定

各组小鼠八臂迷宫测试完毕后,眼球取血,脱臼处死。在冰盘上剥取脑组织。BCA 法测定脑组织匀浆蛋白含量,按试剂盒说明书测定血浆和脑组织的 MDA、GSH 含量和 T-SOD 活力,脑组织 ROS 含量。

## 2.6 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学处理,

结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示,进行正态分布检验,符合正态分布的两组间均数比较采用两独立样本  $t$  检验。当  $P < 0.05$  时认为差异有统计学意义。

## 3 实验结果

### 3.1 毛蕊花苷对高原记忆损伤小鼠八臂迷宫测试结果的影响

与常氧对照组比较,缺氧模型组 WME、RME、TE 及 TT 分别增加 933%、294%、390% 和 157% ( $P < 0.01$ )。与缺氧模型组比较,毛蕊花苷高剂量组 WME、RME、TE 及 TT 分别降低 58.1%、59.7%、59.2% 及 46.3% ( $P < 0.01$ );毛蕊花苷中剂量组 WME、RME、TE 及 TT 分别降低 54.8%、56.7%、56.1% 及 42.5% ( $P < 0.01$ );毛蕊花苷低剂量组 TT 降低 27.6% ( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 毛蕊花苷对小鼠八臂迷宫测试结果的影响( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	WME(次)	RME(次)	TE(次)	TT (t/s)
常氧对照组	0.30±0.50	1.70±0.80	2.00±0.90	62.82±18.77
缺氧模型组	3.10±1.80**	6.70±2.70**	9.80±3.80**	161.64±27.07**
低剂量组	2.60±1.50	5.10±2.80	7.70±3.00	117.07±50.69#
中剂量组	1.40±1.00##	2.90±2.10##	4.30±2.30##	93.01±49.52##
高剂量组	1.30±0.70##	2.70±1.80##	4.00±1.30##	86.74±47.40##

\*\* $P < 0.01$ ,与常氧对照组比较;# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ,与缺氧模型组比较

### 3.2 毛蕊花苷对小鼠血浆 MDA、脑组织 MDA 和 ROS 的影响

与常氧对照组比较,缺氧模型组小鼠血浆 MDA、脑组织 MDA 和 ROS 含量分别增加 74.8%、122% 和 92.2% ( $P < 0.01$ )。与缺氧模型组比较,毛蕊花苷高剂量组小鼠血浆 MDA、脑组织 MDA 和 ROS 含量分别降低 31.7%、34.7% 和 32.8% ( $P < 0.01$ );毛蕊花苷中剂量组小鼠脑组织 MDA 和 ROS 含量分别降低 30.2% 和 23.2% ( $P < 0.01$ ),见表 2。

### 3.3 毛蕊花苷对小鼠血浆和脑组织 GSH 含量、T-

### SOD 活力的影响

与常氧对照组比较,缺氧模型组小鼠血浆和脑组织 GSH 含量、T-SOD 活力分别降低 32.4%、36.8%、18.7% 和 31.6% ( $P < 0.01$ )。与缺氧模型组比较,毛蕊花苷高剂量组小鼠血浆和脑组织 GSH 含量、T-SOD 活力分别升高 39.0%、51.6%、20.5% 及 37.8% ( $P < 0.05, P < 0.01$ );毛蕊花苷中剂量组小鼠血浆 GSH 含量、T-SOD 活力和脑组织 GSH 含量分别升高 34.5%、16.4% 及 48.3% ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),见表 3。

表 2 毛蕊花苷对小鼠血浆 MDA、脑组织 MDA 和 ROS 的影响( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	血浆 MDA ( $\text{cB}/\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	脑 MDA ( $\text{nmol}/\text{mg prot}$ )	脑 ROS ( $\times 10^4 \text{U}/\text{mg prot}$ )
常氧对照组	21.20±4.21	6.71±1.76	6.79±1.09
缺氧模型组	37.05±8.29**	14.89±3.95**	13.05±2.70**
低剂量组	37.07±6.21	13.64±3.25	13.39±2.87
中剂量组	30.05±6.71	10.40±4.35#	10.02±2.51#
高剂量组	25.32±5.57##	9.27±2.98##	8.77±2.92##

\*\* $P < 0.01$ ,与常氧对照组比较;# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ,与缺氧模型组比较

表3 毛蕊花苷对小鼠血浆和脑组织 GSH 含量、T-SOD 活力的影响(n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	血浆 GSH ( $\rho_B/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	脑 GSH ( $\text{mg}/\text{g prot}$ )	血浆 T-SOD ( $z_B/\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$ )	脑 T-SOD ( $\text{U}/\text{mg prot}$ )
常氧对照组	14.77±3.98	25.75±5.01	0.487±0.065	0.433±0.093
缺氧模型组	9.99±3.23*	16.28±3.89**	0.396±0.052**	0.296±0.119*
低剂量组	10.17±3.28	17.11±3.99	0.399±0.074	0.288±0.097
中剂量组	13.44±2.98#	24.14±4.68##	0.461±0.051#	0.359±0.111
高剂量组	13.89±3.69##	24.68±3.43##	0.477±0.089#	0.408±0.083#

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,与常氧对照组比较; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ,与缺氧模型组比较

#### 4 讨论

学习记忆的能力直接反映了大脑作为高级中枢对其他组织器官信息的整合能力。高原缺氧使得进入该环境的人产生不同程度的脑损伤,导致记忆功能障碍,作业效能下降。研究发现,高原低压低氧暴露能改变人的睡眠模式,增加觉醒次数;使人变得压抑、焦躁;分散注意力,降低记忆力和执行力<sup>[10]</sup>。

本实验中,八臂迷宫测试结果显示,缺氧模型组小鼠的 WME、RME、TE 和 TT 与常氧对照组相比明显升高,表明高原缺氧的确造成了动物的记忆损伤。给予毛蕊花苷干预后,各组 WME、RME、TE 和 TT 相比于缺氧模型组则有显著降低,表明毛蕊花苷确实对高原缺氧记忆损伤有改善作用。

高原缺氧环境可激发机体氧化应激反应,组织中的氧自由基和氮自由基生成增多,进一步造成器官损伤。脑组织(特别是大脑皮质、海马和纹状体)抗氧化系统非常薄弱,对氧异常敏感。本实验通过对血浆和脑组织 MDA、GSH 含量、T-SOD 活力和脑组织 ROS 含量进行测定,结果表明氧化应激可能是引起神经元损伤的重要因素之一。相比而言,毛蕊花苷干预后,血浆和脑组织中的 ROS、MDA 含量显著降低,GSH 含量、T-SOD 活力明显升高,提示毛蕊花苷对高原缺氧小鼠记忆损伤的改善作用可能是通过稳定机体抗氧化酶系统的平衡,减轻氧化应激来实现的。

本实验选择毛蕊花苷低(50 mg/kg)、中(150 mg/kg)、高(300 mg/kg)3个剂量组灌胃给药,考察毛蕊花苷对小鼠高原缺氧记忆损伤改善作用的量-效关系。结果显示,低剂量组八臂迷宫测试和氧化应激指标大多与缺氧模型组无统计学差异,可能是因为剂量未达到最小有效量。中、高剂量组的各项指标显示毛蕊花苷的确有较好的抗高原缺氧记忆损伤的效果。

综上所述,毛蕊花苷对高原缺氧记忆损伤改善作用的机制之一可能是稳定机体抗氧化酶系统的平衡、减轻氧化应激,是否还有其他机制尚待研究。

#### 【参考文献】

- [1] RISDALL J E, GRADWELL D P. Extremes of barometric pressure [J]. Anaesth Intens Care Med, 2017, 18 (6): 304-308.
- [2] 周保柱, 张泉龙, 李茂星, 等. 高原环境对记忆功能影响的研究进展[J]. 解放军药学报, 2015, 31(1):75-79.
- [3] CARDINALI A, PATI S, MINERVINI F, et al. Verbascoside, isoverbascoside, and their derivatives recovered from olive mill wastewater as possible food antioxidants[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(7):1822-1829.
- [4] OYOUROU J N, COMBRINCK S, REGNIER T, et al. Purification, stability and antifungal activity of verbascoside from *Lippia javanica* and *Lantana camara* leaf extracts[J]. Ind Crop Prod, 2013, 43:820-826.
- [5] SPERANZA L, FRANCESCHELLI S, PESCE M, et al. Anti-inflammatory effects in THP-1 cells treated with verbascoside[J]. Phytother Res, 2010, 24(9): 1398-1404.
- [6] SONG X, HE J, XU H, et al. The antiviral effects of acteoside and the underlying IFN- $\gamma$ -inducing action [J]. Food Funct, 2016, 7(7), 3017-3030.
- [7] ESPOSITO E, DAL TOSO R, PRESSI G, et al. Protective effect of verbascoside in activated C6 glioma cells: possible molecular mechanisms [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2010, 381(1):93-105.
- [8] ZHOU B, LI M, CAO X, et al. Phenylethanoid glycosides of *Pedicularis muscicola* maxim ameliorate high altitude-induced memory impairment[J]. Physiol Behav, 2016, 157: 39-46.
- [9] 李茂星, 周保柱, 刘延彤, 等. 藜生马先蒿苯乙醇苷对高原记忆损伤的改善作用及机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(9):703-707.
- [10] DE AQUINO LEMOS V, ANTUNES H K, DOS SANTOS R V, et al. High altitude exposure impairs sleep patterns, mood, and cognitive functions[J]. Psychophysiology, 2012, 49(9):1298-1306.

【收稿日期】 2018-05-14 【修回日期】 2018-07-07

【本文编辑】 李睿曼