

灵芝三萜类化合物对 AD 衰老模型大鼠学习记忆能力和脑能量代谢的影响

张 玥, 罗 俊*, 黄能慧, 张小毅

(贵阳医学院 药理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

摘要: 探讨了灵芝三萜类化合物(Ganoderma Lucidum Triterpenoids, GLT)对阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)的防治作用及作用机制,为临床新药的开发和应用提供参考依据。结果表明 AD 自然衰老模型大鼠 Morris 水迷宫检测显示学习记忆障碍,脑组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力降低,GLT 灌胃 2 月后,学习记忆成绩明显提高, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力增加。提示 GLT 能提高 AD 自然衰老模型大鼠的学习记忆能力,其作用可能与改善脑内能量代谢有关。

关键词: 灵芝三萜类化合物; 阿尔茨海默病; 自然衰老; 学习记忆; 能量代谢

中图分类号: S 567.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)07-0741-04

Protective Effects and Mechanism of Ganoderma Lucidum Triterpenoids on Learning and Memory Function of Alzheimer Disease Model Animals

ZHANG Yue, LUO Jun*, HUANG Neng-hui, ZHANG Xiao-yi

(Department of Pharmacology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

Abstract: In order to elucidate the protective effects and mechanism of Ganoderma Lucidum Triterpenoids (GLT) on Alzheimer Disease model animals, two different groups rats was divided. it was found that the model animals exhibited the worse ability in learning and memory and a lower $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity. The addition of GLT significantly improved the above indexes($P < 0.05$). GLT can protect AD model animals, GLT improved the learning and memory dysfunction in aging model rats, the following mechanism may be improving energy metabolism in brain.

Key words: GLT, AD, natural aging, learning and memory, energy metabolism

阿尔茨海默病(Alzheimer Disease, AD),又称老年性痴呆,是一种神经退行性病变,临床表现主

要为严重的认知和记忆功能减退,并伴有进行性的记忆、智能、言语、视空间技能障碍及人格改变

收稿日期: 2012-03-02

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目; 贵州省科技攻关项目(2004NGY031); 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金(2005-293)。

作者简介: 张玥(1982-),女,贵州贵阳人,讲师,医学硕士,主要从事神经药理学和中药新药研发研究。E-mail: 254212060@qq.com

* 通信作者: 罗俊(1963-),男,江西萍乡人,教授,医学博士,硕士研究生导师,主要从事神经药理学和中药新药研发研究。

E-mail: luojun@gmc.edu.cn

等^[1],已成为仅次于心血管疾病、肿瘤、脑卒中的第4位死亡原因,严重危害老年人的生活质量。越来越多的证据表明,AD是由不同致病因素引起的多种代谢紊乱的异质性疾病过程^[2]。AD的病因和发病机制不明,因而缺乏有效的治疗手段。鉴于传统医学认为灵芝有延年益寿之功效,且现代药理学研究表明其具有免疫调节、抗肿瘤、抗衰老、抗氧化等多种作用^[3-4]。作者曾在国内首次应用灵芝主要有效成分——灵芝三萜类化合物(GLT)进行治疗AD的研究。作者研究观察GLT对AD自然衰老模型大鼠的学习记忆能力和脑组织能量代谢的影响,探讨GLT对AD的防治作用及其可能的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物 SD大鼠:雌雄均有,24月龄及5月龄,贵阳医学院实验动物中心提供,合格证号:SCXK(黔)2002-0001。普通饲料饲养,清洁级。

1.2 药品、试剂、实验仪器 GLT:中国科学院地球化学研究所超临界流体技术研究中心提取,GLT溶液用金龙鱼食用油溶解配制,三萜质量分数52.79%;健脑胶囊:青岛国风药业股份有限公司产品;Na⁺-K⁺-ATPase试剂盒:南京建成生物工程有限公司产品;Morris水迷宫实验系统和BI2000图像分析系统:成都泰盟公司产品;5810-R型台式冷冻离心机:德国Eppendorf公司产品。

2 方法

2.1 筛选动物

取24月龄SD大鼠100只,5月龄SD大鼠10只,进行Morris水迷宫实验,以5月龄大鼠平均逃避潜伏期均数+2倍标准差为标准,24月龄大鼠平均逃避潜伏期大于该值的为AD大鼠^[5]。

2.2 分组、给药

将经Morris水迷宫训练成绩稳定后的AD大鼠60只随机分为6组,每组10只,雌雄各半,模型组(NS 10 mL/kg),GLT低、中、高(0.25、0.5、1.0 g/kg)剂量组,阳性对照组(健脑胶囊 0.38 g/kg)及溶媒对照组(金龙鱼食用油 10 mL/kg)。5月龄大鼠为正常对照组(NS 10 mL/kg)。按上述剂量灌胃给药,每日1次,连续60 d。

2.3 指标检测

2.3.1 学习记忆能力 给药前及给药结束后分别进行Morris水迷宫实验。该实验分为定向航行实验和空间探索实验。检测前将大鼠置于无安全岛的水池中游泳2 min,使其适应水环境。检测时将大鼠置于有安全岛的水池中,经BI2000图像处理系统自动记录游泳轨迹及时间,每次实验安全岛固定在同一位置。①定向航行实验:检测大鼠找到安全岛的时间(逃避潜伏期)和游泳路径长度(搜索距离);②空间探索实验:撤除安全岛后记录120 s内大鼠在原安全岛所在象限的搜索时间(探索时间),以及大鼠在原安全岛所在象限游泳距离占总距离的百分比(探索距离百分比)。以定向航行和空间探索实验的成绩,反映大鼠的空间辨别学习记忆能力,观察大鼠给药治疗后的学习记忆变化情况。

2.3.2 脑组织Na⁺-K⁺-ATPase活性检测 给药结束,将大鼠于冰台上0℃环境中断头取脑。0℃下用匀浆器制备匀浆(每1 g组织加9 mL冰生理盐水),测定Na⁺-K⁺-ATPase活性。

2.4 数据处理 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS12.0统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析处理。

3 结果

3.1 对AD自然衰老模型大鼠学习记忆的影响

水迷宫成绩稳定的7组大鼠定向航行实验成绩和空间探索实验成绩见表1。NS组与其余各组间有显著性差异($P < 0.05$),而各给药组与模型组、溶媒对照组间无显著性差异($P > 0.05$)。GLT ig后大鼠定向航行实验成绩及空间探索实验成绩显示,大鼠给予GLT ig后学习记忆水平提高,逃避潜伏期缩短、搜索距离减小、探索时间及探索距离百分比增加,与模型组相比有显著性差异($P < 0.05$ 或0.01)。

3.2 对AD自然衰老模型大鼠脑组织Na⁺-K⁺-ATPase活力的影响

模型组大鼠脑组织中Na⁺-K⁺-ATPase活力降低,与正常对照组有显著性差异($P < 0.05$),GLT灌胃给药后大鼠脑组织中Na⁺-K⁺-ATPase活力增加,与模型组有显著性差异($P < 0.05$ 或0.01)。见表2。

表 1 GLT 给药前后大鼠 Morris 水迷宫实验成绩($\bar{x}\pm s, n=10$)
Tab.1 Effects of GLT on Morris water maze test of rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	给药前				给药后			
		逃避 潜伏期/s	搜索 距离/cm	探索 时间/s	探索距离 百分比/%	逃避 潜伏期/s	搜索 距离/cm	探索 时间/s	探索距离 百分比/%
生理盐水	—	15.06± 8.26	651.40± 473.63	37.74± 5.59	37.92± 5.45	15.53± 7.94	785.86± 445.47	33.81± 5.68	34.34± 4.46
模型组	—	39.53± 19.94*	1 739.81± 988.48*	28.28± 8.99*	29.38± 4.28*	26.91± 14.34**	1 460.72± 695.58**	25.67± 5.40*	25.48± 3.61*
溶媒组	—	41.57± 23.14*	1 937.45± 1 007.10*	26.50± 9.58*	27.26± 8.59*	32.47± 21.71**	1 724.09± 1 187.59**	23.64± 5.90*	24.63± 4.81*
GLT	0.25	43.94± 21.96*	1 853.23± 1 046.16*	27.70± 9.05*	27.65± 7.16*	15.98± 10.92	900.60± 537.02	32.71± 5.97 [△]	30.71± 6.01 [△]
GLT	0.50	43.04± 23.94*	1 883.44± 1 112.92*	28.20± 8.30*	27.60± 6.00*	15.51± 8.54 [△]	709.70± 385.68 ^{△△}	31.82± 6.41 [△]	30.42± 4.80 [△]
GLT	1.00	40.68± 24.14*	1 878.27± 1 012.55*	26.68± 8.61*	27.79± 7.16*	12.42± 7.00 [△]	658.80± 378.22 ^{△△}	33.99± 4.88 ^{△△}	31.71± 2.90 ^{△△}
JNIN	0.38	41.66± 23.16*	1 750.23± 1 065.44*	26.09± 9.50*	27.64± 5.37*	21.80± 16.10	1 032.78± 865.30	31.81± 4.32 [△]	32.86± 5.07 ^{△△}

* $P<0.01$ vs NS ** $P<0.05$ vs NS [△] $P<0.05$ vs Model ^{△△} $P<0.01$ vs Model

表 2 GLT 对自然衰老模型大鼠脑组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Effects of GLT on $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in the brain of aging rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g/kg)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}/$ ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)
生理盐水	—	21.31±3.15
模型组	—	17.20±4.65*
溶媒组	—	16.48±4.01*
GLT	0.25	21.46±6.23
GLT	0.50	29.58±15.95 [△]
GLT	1.00	25.73±5.11 ^{△△}
JNIN	0.38	16.21±5.30

* $P<0.05$ vs NS [△] $P<0.05$ vs Model ^{△△} $P<0.01$ vs Model

4 讨 论

目前国内外治疗 AD 的药物,西药有脑细胞代谢激活剂、胆碱酯酶抑制剂等,近年来神经生长因子、抗氧化剂、抗炎药等方面的研究十分活跃,中药治疗也逐渐应用于临床。

自古以来,灵芝被人们视为“仙草”^[6],是一种传统的名贵中药^[7],目前国际医药学界也非常重视灵芝的研究与开发,2000 年美国出版的《美国草药

药典和治疗概要》收录了灵芝,该书仅收录 10 种中药或草药,灵芝为其中一种^[3]。现代药理学研究表明,灵芝对人体免疫系统、神经系统、心血管系统等有良好的调节作用,同时具有抗肿瘤、抗衰老、抗氧化、降血糖、促进核酸和蛋白质合成、促进学习记忆等作用^[4]。因此,灵芝除了有保健作用外,还可用于多种疾病的防治。灵芝主要有效成分之一是灵芝三萜类化合物(GLT),由于其化学结构的多样性,因而具有广泛的药理活性。据文献报道,GLT 在体内外实验证实中可拮抗四氯化碳所致的过氧化损伤,增强 SOD、GSH-Px 活力、减少 MDA 生成,显示出较好的抗氧化作用以及促进学习记忆作用^[8,9]。然而在用于治疗 AD 的研究,未见国内外相关文献报道。作者观察 GLT 对 AD 的防治作用,并探讨其作用机制。

AD 是一种年龄相关性疾病,衰老因素在其发病过程中占有重要地位。动物与人类相似,老龄动物的某些表现与老年人有一定的相似性,作者采用自然衰老认知障碍模型来观察 GLT 对 AD 的防治作用。学习记忆能力是大脑智能的重要组成部分,AD 患者重要临床表现之一为进行性学习记忆能力下降,Morris 水迷宫结果显示,与正常对照组相比,自然衰老模型大鼠学习记忆障碍明显,GLT 灌胃 60 d 后,大鼠学习记忆能力显著提高,表明 GLT 可

提高自然衰老模型大鼠的学习记忆能力。

细胞衰老是机体衰老的基础,而细胞水平的改变主要表现在细胞膜上。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 是细胞膜上重要的膜蛋白,其活性是反映机体生理功能衰退极为敏感的指标,是体内能量代谢的重要检测指标。脑能量代谢障碍是机体缺氧时最突出的变化。现已发现 AD 患者葡萄糖/能量代谢障碍往往出现在行为学、电生理或器质性损伤之前,这表明能量代谢障碍是 AD 的早期信号^[10]。Meier-Ruge 等^[11]指出,正常情况下,全身所有的细胞均可合成 β -淀粉样蛋白($\text{A}\beta$),除脑以外,其他器官均不发生 $\text{A}\beta$ 沉淀。AD 脑内易发生淀粉样沉淀的一个重要的原因

就是大脑的糖代谢显著降低及乙酰胆碱不足,机体衰老引起氧化能量代谢降低,随之出现 ATP 匮乏,最终导致蛋白质降解,突触转运和胞内离子平衡的改变。当氧化/能量代谢率下降超过 50% 时,即可触发脑内 $\text{A}\beta$ 的沉积^{[10][12]},因淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的降解直接或间接受到 ATP 不足的影响。实验结果显示,模型组大鼠脑组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力降低,与正常对照组有显著性差异,GLT 灌胃给药后大鼠脑组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力增加,与模型组有显著性差异。表明 GLT 能够改善 AD 自然衰老模型大鼠的脑内能量代谢障碍,保护脑组织。

参考文献(References):

- [1] 郭静静,廖红. 阿尔茨海默病治疗药物的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2010,41(5):395—400.
GUO Jing-jing, LIAO Hong. Development of drug for Alzheimer's disease[J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2010,41(5):395—400. (in Chinese)
- [2] Mattson, Mark P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 2004,430(5):631—639.
- [3] 鄢嫣,聂少平,陈奕,等. 灵芝氯仿提取物的 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009,28(5):589—597.
YAN-Yan, NIE Shao-ping, CHEN Yi, et al. Study on HPLC Fingerprint of Chloroform Extract of *Ganoderma lucidum* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009,28(5):589—597. (in Chinese)
- [4] 林志彬. 中西医结合研究诠释灵芝的扶正固本功效[J]. 福建中医药大学学报, 2010,20(6):1—6.
LIN Zhi-bin. Interpretation of effectiveness of strengthening and restoring the *Ganoderma lucidum* by integrated traditional and western medicine study[J]. *Journal of Fujian University of TCM*, 2010,20(6):1—6. (in Chinese)
- [5] 盛树力. 老年性痴呆:从分子生物学到临床诊治 [M]. 北京:科学技术文献出版社,1998.
- [6] 刘媛,丁重阳,章克昌,等. 10 种中药对灵芝液体发酵的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2008,27(2):123—126.
LIU Yuan, DIN Zhong-yang, ZHANG Ke-chang. The effect of 10 kinds of Chinese traditional medicines on submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008,27(2):123—126. (in Chinese)
- [7] 崔月花,丁重阳,章克昌. 一种灵芝三萜皂甙新物质的分离鉴定和结构推断[J]. 食品与生物技术学报, 2008,27(3):60—63.
CUI Yue-hua, DING Chong-yang, ZHANG Ke-chang. Separation, purification and structure deduction of a saponin from *Ganoderma lucidum*[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008,27(3):60—63. (in Chinese)
- [8] 张玥,黄能慧,张小毅,等. 灵芝三萜类化合物对衰老模型小鼠学习记忆的作用[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2007,27(8):969—971.
ZHANG Yue, HUANG Neng-hui, ZHANG Xiao-yi, et al. Effects of *ganoderma lucidum* triterpenoids on aging mice induced by D-galactose[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University: Medical Science*, 2007,27(8):969—971. (in Chinese)
- [9] You YH, Lin ZB. Free radical scavenging activity by *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide on peritoneal macrophages in mice[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2004, 9(1): 52—54.
- [10] 张均田. 脑缺血、葡萄糖/能量代谢障碍与神经退行性疾病 [J]. 中国药理学通报, 2000,16(3): 241—246.
ZHANG Jun-tian. Cerebral ischemia, glucose/energy metabolism disorders and neurodegenerative diseases[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2000,16(3): 241—246. (in Chinese)
- [11] Meier-Ruge W, Iwagoff P, Bertoni-Freddari C. What is primary and what secondary for amyloid disposition in Alzheimer's disease [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1994, 719(31): 230—237.
- [12] Blass J P. Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia [J]. *J Neurosci Res*, 2001(66): 851—856.