

## 肾茶水提物喷干粉对 D-半乳糖所致衰老小鼠学习记忆功能的影响

汪泽栋<sup>1</sup>, 李宜航<sup>2,3</sup>, 陈曦<sup>2,3,4</sup>, 李光<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>温州医科大学附属第一医院针灸科, 温州 325000; <sup>2</sup>中国医学科学院药用植物研究所云南分所, 景洪 666100; <sup>3</sup>西双版纳州傣药南药重点实验室, 景洪 666100; <sup>4</sup>中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193

**摘要:**为观察肾茶水提物喷干粉(*Orthosiphon stamineus* aqueous extract, OSAE)的延缓衰老作用, 采用 D-半乳糖连续颈背部皮下注射诱导亚急性衰老小鼠模型, 造模同时给予 OSAE 低、中、高剂量灌胃, 连续 4 周。观察衰老小鼠在 Moriss 水迷宫检测学习记忆功能, 测定脑组织中一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)、单胺氧化酶(MAO)、三磷酸腺苷酶(Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase)、丙二醛(MDA)含量。结果显示, 与模型组比较, OSAE 高、中剂量组均能使小鼠逃避潜伏期明显缩短, 原平台象限游泳时间明显延长( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); OSAE 高剂量组 SOD、NO、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性显著升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), MDA、MAO 水平显著下降( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。表明 OSAE 可明显改善衰老小鼠学习记忆功能, 提高抗氧化能力, 从而可能具有较好的延缓衰老的作用。

**关键词:**肾茶; 喷干粉; 衰老; 学习记忆

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

## Effects of *Orthosiphon stamineus* Aqueous Extract on the Learning Memory and Antioxidant Capacity of D-galactose Induced Aging Mice

WANG Ze-dong<sup>1</sup>, LI Yi-hang<sup>2,3</sup>, CHEN Xi<sup>2,3,4</sup>, LI Guang<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Acupuncture and Moxibustion, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China;

<sup>2</sup>Yunnan Branch, Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Jinghong 666100, China;

<sup>3</sup>Product Research and Development Key Laboratory of Xishuangbanna National Medicine, Jinghong 666100, China;

<sup>4</sup>Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

**Abstract:** This study was conducted to investigate the anti-aging effect of *Orthosiphon stamineus* aqueous extract (OSAE). The subacute aging model mice were induced by injecting D-galactose subcutaneously. At the same time, low, medium and high dose of OSAE were administered intragastrically once daily for 4 weeks. Signs of aging were observed. The Moriss Water Maze test was used to evaluate the learning and memory function. The levels of NO, SOD, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, MAO and MDA in the serum and brain tissue were measured. The results showed that the high and middle dose of OSAE shortened the escape latency of the aging model mice, while prolonged the original platform quadrant swimming time significantly compared with the model group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). High and middle dose of OSAE increased the SOD, NO, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activities of the aging model mice, and decreased the MAO and MDA content significantly ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). It indicated that OSAE can improve the learning and memory ability and increase antioxidant capacity of aging mice, which may have a good anti-aging effect.

**Key words:** *Orthosiphon stamineus*; spray dry powder; aging; learning and memory

老年痴呆症(AD)是一种严重危害老年人群身心健康的慢性神经退行性疾病,其首要症状是智力、记忆力、感官定向能力、判断力、语言思维能力不可

逆的进行性退化,并伴有性格改变。有资料表明 5%~15% 的老年人有不同程度的痴呆症状,AD 已成为继心脏病、肿瘤和中风之后的第 4 位死亡原因,给家庭和社会带来很大负担<sup>[1]</sup>。

肾茶(*Orthosiphon stamineus*)是傣医药中常用的解药(排解人体内积蓄毒素之药物)品种,贝叶经中记载其可单方煎汤或开水浸泡当茶饮,具有清热解

收稿日期:2012-10-30 接受日期:2013-02-04

基金项目:协和青年基金,中央高校基本科研业务费专项资金(3332013081, HXYN-01);中央级公益性科研院所基本科研业务专项(YZYN-11-03, YZYN-13-01);云南省科技重大项目(2008IF018)

\* 通讯作者 Tel:86-691-2136981; E-mail:lhbg311@hotmail.com

毒,利尿消肿,利尿化石,养肾保肾,凉血止血等功能。近年来,因其显著的临床疗效,国内外学者深入研究,发现肾茶除有抗炎、保肝作用<sup>[2]</sup>外,还具有抗氧化、清除自由基及一氧化氮抑制<sup>[3,4]</sup>作用,但肾茶提取物在脑组织中的抗氧化作用还未见报道,笔者在做药效筛选发现,肾茶水提喷干粉(*Orthosiphon stamineus* aqueous extract, OSAE)能够提高D-半乳糖所致衰老小鼠学习记忆功能,并对其机理进行初步探讨。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

昆明种5周龄小鼠,体重18~22 g,雄性,购自军事医学科学院实验动物中心,动物合格证号:SCXK-(军)2007-004。小鼠于药用植物研究所SPF级动物室饲养,给予北京维通利华公司提供的标准饲料;环境:室内温度20~24℃,湿度40%~70%,12 h光照明暗交替,实验前适应性饲养5 d。

### 1.2 药品及试剂

肾茶水提物喷干粉,中国医学科学院药用植物研究所云南分所研发中心制备;脑复康口服液,武汉马应龙药业集团,批号20120528;D-半乳糖,国药集团化学试剂有限公司,批号F20120713;SOD、MAO、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 试剂盒,南京建成生物工程研究所。

### 1.3 实验仪器

TGL16M 湘智离心机,安徽诚信启动设备有限公司;数显恒温水浴锅,国华电器有限公司;电子天平,赛多利斯公司;分析天平,赛多利斯公司;德国HERAEUS Labofuge 400 R 型离心机;瑞士 Tecan M1000 酶标仪。

## 2 实验方法

### 2.1 实验小鼠分组及给药

取健康成年昆明种小鼠60只,随机均分为6组,分别为正常对照组、模型对照组、脑复康组、肾茶水提物喷干粉高、中、低剂量组。除正常对照组注射等量生理盐水外其余各组每天颈背部sc1% D-半乳糖125 mg/kg<sup>[5]</sup>。部分动物造模过程中,由于背部皮肤反复穿刺导致造模药液外漏严重,酌情更换注射部位或者剔除,补充造模确保各组可以采集10个样本。2周后除每日造模外,各组ig给予相应药物。药物剂量按照人和动物体表面积比进行折算,脑复

康对照组给药剂量相当于人日常用量(4.8 g/d)的等比剂量(0.6 g/kg);肾茶水提物喷干粉高、中、低剂量组(1.5、2.8、5.7 g/kg),大约相当于临床用量等效量的1倍、2倍和4倍,灌胃时给予不同浓度同体积药液。正常组、模型组ig等体积的蒸馏水,持续4周,摘眼球取血并处死动物。

### 2.2 指标测定

#### 2.2.1 Morris 水迷宫实验

参考文献<sup>[6,7]</sup>造模成功后,进行定向航行实验共进行7 d。每天训练分上、下午两段进行,每段训练2次,训练时随机选择一个入水点,将小鼠面向池壁放入水中,观察并记录小鼠寻找并爬上平台所需时间(潜伏期)。4次训练分别从不同的入水点入水,如果小鼠在120 s内未找到平台,将其引至平台稳定10 s,潜伏期记录为120 s,每次训练间隔60 s。记录每只小鼠潜伏期的平均值。然后把站台去掉,记录2 min内小鼠穿越站台位点的次数,记为穿越次数。

#### 2.2.2 脑组织中 SOD、MAO、NO、MAD、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 含量的测定

于“2.2.1”项下记忆功能测定结束后次日,脱颈椎处死动物,在冰台上快速取出小脑组织并置于灭菌后冰生理盐水中漂洗,除去血迹,滤纸拭干,精确称重后,将小脑组织迅速浸入9倍量冷生理盐水中,用匀浆器在冰浴中充分碾磨,制成10%脑组织匀浆,以3000 rpm离心10 min,取上清液冻存待测。测定时,待样本融化后将标准品和样品分别稀释并加入到96孔板中,于酶标仪中测定460 nm处OD值,根据不同浓度标准品OD值拟合标准曲线。根据标准曲线计算不同样本内目标成分的含量。具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

### 2.3 数据统计和分析

采用SPSS软件对数据进行统计,所有数据均以均数加减标准差表示,全部数据资料使用单因素方差分析中SNK-q检验进行多组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 实验结果

### 3.1 肾茶水提物喷干粉对衰老小鼠学习记忆功能的影响

由表1可见,模型组小鼠学习记忆潜伏时间明显缩短,平台象限游泳时间降低,穿越次数减少,与正常组比较有显著性差异( $P < 0.01$ );肾茶水提物

喷干粉高剂量组能明显增加痴呆小鼠学习记忆潜伏时间,与模型组比较( $P < 0.01$ ),同时使平台象限有用时间及穿越次数明显减少( $P < 0.01$ );肾茶水提

物喷干粉中剂量组能明显增加痴呆小鼠学习记忆潜伏时间,与模型组比较( $P < 0.05$ ),同时使平台象限有用时间及穿越次数明显减少( $P < 0.05$ )。

表 1 肾茶提取物对衰老小鼠学习记忆功能影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of OSAE on learning and memory of mice ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	潜伏期 Escape latency (s)	平台象限游泳时间 Original quadrant swimming time percentage (%)	穿越次数 Traversing times
空白组 Normal	26.38 ± 5.31	43.59 ± 6.83	12.18 ± 2.23
模型组 Model	47.19 ± 6.76**	28.42 ± 4.62**	8.34 ± 3.17**
对照组 NFK	31.53 ± 5.97 <sup>##</sup>	38.64 ± 5.17 <sup>##</sup>	11.02 ± 2.06 <sup>##</sup>
肾茶提取物低剂量组 OSAE-L	41.37 ± 4.19	32.17 ± 3.39	9.32 ± 2.67
肾茶提取物中剂量组 OSAE-M	35.72 ± 4.73 <sup>#</sup>	35.61 ± 4.73 <sup>#</sup>	10.49 ± 2.87 <sup>#</sup>
肾茶提取物高剂量组 OSAE-H	30.29 ± 3.27 <sup>##</sup>	28.19 ± 3.42 <sup>##</sup>	11.57 ± 1.91 <sup>##</sup>

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;<sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

Note:Compared with control,\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ;Compared with Model,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;<sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

### 3.2 肾茶水提物喷干粉对模型小鼠脑组织 SOD、MAO、NO、MAD、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性的影响

由表 2 可见,模型组小鼠 SOD、NO、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性明显降低,MAO、MDA 活性增高,与正

常组比较有显著性差异( $P < 0.01$ );肾茶水提物喷干粉高、中剂量组能明显升高老年痴呆小鼠 SOD、NO、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性、降低 MDA、MAO 的活性,与模型组比较有显著性差异( $P < 0.01, P < 0.05$ )。

表 2 肾茶提取物对衰老小鼠脑组织中 SOD、MAO、NO、MDA、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 含量影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of OSAE on SOD,MAO,NO,MDA and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in brain tissue of aged mice ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	SOD U/mg	MAO U/mg	NO μmol/mg	MDA nmol/mg	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase μmol · mg <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup>
空白组 Normal	26.09 ± 2.75	15.76 ± 2.06	0.98 ± 0.06	2.52 ± 0.53	6.97 ± 0.73
模型组 Model	12.43 ± 2.01**	26.37 ± 3.79**	0.57 ± 0.18**	6.12 ± 0.72**	4.23 ± 0.54**
对照组 NFK	23.68 ± 3.75 <sup>##</sup>	18.46 ± 2.48 <sup>##</sup>	0.86 ± 0.12 <sup>##</sup>	2.79 ± 0.44 <sup>##</sup>	6.04 ± 0.72 <sup>##</sup>
肾茶提取物低剂量组 OSAE-L	15.47 ± 2.31	23.75 ± 3.03	0.60 ± 0.07	5.94 ± 0.42	4.73 ± 0.41
肾茶提取物中剂量组 OSAE-M	18.39 ± 2.95 <sup>#</sup>	20.49 ± 2.39 <sup>#</sup>	0.76 ± 0.11 <sup>#</sup>	4.82 ± 1.02 <sup>#</sup>	5.34 ± 0.67 <sup>#</sup>
肾茶提取物高剂量组 OSAE-H	22.76 ± 3.76 <sup>##</sup>	19.52 ± 2.94 <sup>##</sup>	0.81 ± 0.05 <sup>##</sup>	3.01 ± 0.37 <sup>##</sup>	5.97 ± 0.84 <sup>##</sup>

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;<sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

Note:Compared with control,\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ;Compared with Model,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;<sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

## 4 讨论

D-半乳糖注入体内后经氧化酶催化氧化成半乳糖醛,进一步代谢为 CO<sub>2</sub> 和木酮糖,产生超氧阴离子自由基,自由基不仅损害生物膜系统,它还损害核酸和蛋白质的代谢,使大脑细胞的转录水平降低,蛋白质合成减少,造成神经细胞结构改变和功能退化。体液及组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 在调节细胞内外渗透压、神经和肌肉冲动传导等方面起重要作用,当衰老后造成老年痴呆时神经元、脑血管内皮细胞,特别是胶质细胞会产生大量的 NO,NO 通过介导和放大氧化应激、言行级联、兴奋性毒性反应,选择性损伤与学习记忆有关的神经元,促进 PS 和 NTE 形成,并

使老年痴呆的病理变化进行性发展<sup>[8]</sup>。在机体抗超氧阴离子自由基防御体系中,SOD、MDA、MAO 对氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用<sup>[9]</sup>。

前期研究学者对肾茶抗氧化及清除氧自由基作用进行了探讨<sup>[4,10]</sup>,但未见在脑组织中抗氧化作用及对衰老动物模型影响的相关报道,由本实验结果可知,D-半乳糖能使脑组织中 SOD、NO、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性降低,MDA 含量增加,脑组织中 MAO 活性增强,通过对模型动物口服肾茶水提物喷干粉可减缓由 D-半乳糖引起的机体衰老,使衰老小鼠脑组织中 SOD、NO、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase 活性增强,MDA 含量降低,抑制 MAO,其作用物质基础可能是肾茶中黄酮类及酚酸类<sup>[11]</sup>,需经实验进一步验证,本实

验证了肾茶水提物喷干粉具有增强小鼠体内抗氧化,延缓机体衰老的作用,这为延缓衰老保健品及药物的开发提供了一定的依据。

#### 参考文献

- 1 Yang B(杨斌). Effects of compound Rehmannia on learning and memory abilities in senile dementia mice induced by D-galactose. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志),2011,17:195-197.
- 2 Maheswari C, Maryammal R, Venkatanarayanan R. Hepatoprotective activity of "Orthosiphon stamineus" on liver damage caused by paracetamol in rats. *Jordan J Biol Sci*,2008,3:105-108.
- 3 Matkowski A. Antioxidant activity of extracts and different solvent fractions of *Glechoma hederacea* L. and *Orthosiphon stamineus* (Benth.) Kudo. *Clin Exp Med*,2008,17:615-624.
- 4 Akowuah GA, Zhari I, Norhayati I, et al. Sinensetin, eupatorin, 3'-hydroxy-5,6,7,4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of *Orthosiphon stamineus* from Malaysia. *Food Chem*,2004,87:559-566.
- 5 Yu ZJ(余资江), Ying DJ(应大君), Dong SW(董世武), et al. Study on dosage of D-galactose inducing acute aging model in mouse. *Chin J Ana*(解剖学杂志),2005,28:422-424.
- 6 Selcher JC, Atkins CM, Trzaskos JM, et al. A necessity for MAP kinase activation in mammalian spatial learning. *Learn Memory*,1999,6:478-490.
- 7 Luan ZQ(栾增强), Cao WF(曹文富), Peng S(彭爽), et al. Effects of Yanshuai mixture on the learning memory and antioxidative capacity in D-galactose induced aging mice. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2011,23:837-841.
- 8 Ma HX(马厚勋), Zeng FR(曾凡荣), Zeng ZC(曾昭淳). Study on nitric oxide biology and aging. *Fore Med Sci(Geriatrics)*(国外医学:老年医学分册),1999,20:167-172.
- 9 Song CM(宋春梅), Ma HB(马洪波), Wang CW(王长文), et al. The relationship between ageing and the level of NO, SOD and MDA in hear and brain of aged rats. *J Jilin Med Coll*(吉林医药学院学报),2005,26:130-131.
- 10 Akowuah GA, Ismail Z, Norhayati I, et al. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food Chem*,2005,93:311-317.
- 11 Wang H(王虹), Liu M(刘敏), Gu JX(顾建祥), et al. Effects of rosmarinic acid on the learning memory and antioxidative capacity in D-galactose induced aging mice. *Chin J Geron*(中国老年学杂志),2009,29:549-551.
- 12 Jiang GY(姜国银), Yang BS(杨本寿), Yu H(虞泓). Research on the influence factors on isolation of endophytes in two medicinal plants. *J Yunnan Univ, Nat Sci Ed*(云南大学学报, 自科版),2011,33:610-614.
- 13 Smith SA, Tank DC, Boulanger LA, et al. Bioactive endophytes warrant intensified exploration and conservation. *PLoS ONE*,2008,3(8):1-4.
- 14 Zhang XQ(张兴群), Yang XX(杨晓霞), Chen T(陈婷), et al. Chemical constituents of *Ammopiptanthus mongolicus*. *Acta Botan Boreal-Occident Sin*(西北植物学报),2010,30:1035-1038.

(上接第 1626 页)