# 金丝桃苷对低压低氧时大鼠认知功能损伤的改善作用

李锦松[1],陈剑鸿[2],孟民杰[1] (1. 广东药学院生命科学与生物制药学院,广东 广州 510006;2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所药学部,重庆 400042)

[摘 要] **目的** 研究金丝桃苷(Hyperoside,Hyp)对低压低氧诱导大鼠认知功能损伤的预防作用。**方法** 将大鼠分为空白组与用药组,空白组分为平原空白组和高原空白组,用药组分为平原 Hyp 低、中、高剂量组(10 mg/kg,20 mg/kg,40 mg/kg)和高原 Hyp 低、中、高剂量组(10 mg/kg,20 mg/kg,40 mg/kg)。高原各组置入模拟海拔 6 100 m 低压舱内 7 d,平原各组置于常氧环境饲养,利用 Morris 水迷宫观察 Hyp 对大鼠认知功能损伤的影响;检测大鼠海马组织中的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)和过氧化氢酶(catalase,CAT)的活性、以及丙二醇(malondialdehyde,MDA)和还原型谷胱甘肽(reduced glutathione,GSH)的含量变化。**结果** 低压低氧暴露后大鼠在目标象限的时间、距离和经过平台的次数均显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$);Hyp 治疗组显著削弱这一效应,相对低氧组,大鼠在目标象限的时间、距离以及经过平台的次数均显著提升($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。Hyp 治疗组海马组织中的 SOD、CAT 的活性和 GSH 含量均显著升高,MDA 水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** Hyp 对低压低氧引起的记忆损伤具有预防作用,其机制可能是通过上调 SOD、CAT 等蛋白的抗氧化活性,减轻低氧引起的氧化应激损伤。

[关键词] 金丝桃苷;低压低氧;认知功能;抗氧化活性
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)02-0181-04

## Hyperoside attenuated hypoxia-induced memory impairment by antioxidative activity

LI Jin-song[1], CHEN Jian-hong[2], MENG Min-jie[1] (1. College of Life Science and Biopharmaceutical, Guandong Pharmaceutical University, Guangzhou Guangdong 510006, China; 2. Department of Pharmacy, Daping Hosipital and Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To determine the effects of Hyperoside (Hyp) on the memory impairment induced by hypobaric hypoxia. **Methods** SD rats were exposed in hypobaric hypoxia chamber which simulated 6 100 m high altitude for 7 days to induce memory impairment. Morris maze was applied to determine the effects of Hyp on memory in hypobaric chamber. The activities of SOD and CAT and levels of GSH and MDA in rat hippocampus were measured by assay kit (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute). **Results** In target quadrant, the time

doi:10.11659/jjssx.11E014043
[基金项目] 国家自然科学基金(81273608)
[通讯作者] 孟民杰,E-mail:mminjie@163.com;陈剑鸿,E-mail:chenjh-110@263.net
[收稿日期] 2014-11-12 [修回日期] 2014-12-17

[5] Piotin M, Blanc R, Spelle L, et al. Stent-assisted coiling of intracranial aneurysms: clinical and angiographic results in 216 consecutive aneurysms[J]. Stroke, 2010, 41(5): 110 – 115.
[6] Youn SO, Lee JI, Ko JK, et al. Endovascular treatment of wide-necked intracranial aneurysms using balloon-assisted technique with hyper form balloon[J]. J Korean Neurosurg Soc, 2010, 48(3): 207 – 212.
[7] 孟 雷,栾立明,许尚臣,等. 蛛网膜下腔出血急性期采用双微导管技术治疗破裂性宽颈动脉瘤(附 21 例报道)[J]. 中国急救医学, 2011, 31(6): 567 – 568.
[8] Baxter BW, Rosso D, Lownie SP. Double microcatheter technique for detachable coil treatment of large, wide-necked intracranial aneury sms[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 1998, 19(6): 1176 – 1178.
[9] 喻 博,洪 杨,陈亮宇,等. 双微导管技术栓塞颅内动脉瘤(附 58 例报告)[J]. 中华神经外科杂志, 2013, 29(7): 693 – 697.
[10] Rooij WJ, Sluzewski M, Beute GN, et al. Procedural complications of coiling of ruptured intracranial aneurysms: incidence and risk factors in a consecutive series of 681 patients[J]. AJNR AM J Neuroradiol, 2006, 27(7): 1498 – 1501.
[11] Chiaradio JC, Guzman L, Padilla L, et al. Intravascular graft stent treatment of a ruptured fusiform dissecting aneurysm of the intracranial vertebral artery: technical case report[J]. Neurosurgery, 2002, 50(2): 213 – 216.
[12] Alexander MJ, Smith TP, Tucci DL. Treatment of an iatrogenic petrous carotid artery pseudoaneuryssm with a Symbiot covered stent: technical case report[J]. Neurosurgery, 2002, 50(3): 658 – 662.
[13] Chalouhi N, Campbell P, Makke Y, et al. Treatment of complex intracranial aneurysms with a telescoping stent technique[J]. Neurol Surg A Cent Eur Neurosurg, 2012, 73(3): 281 – 288.
[14] Lord AS, Fermandez L, Schmidt JM, et al. Effect of rebleeding on the course and incidence of vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. Neurology, 2012, 78(1): 31 – 37.
[15] Guo LM, Zhou HY, Xu JW, et al. Risk factors related to aneurismal rebleeding[J]. World Neurosurg, 2011, 76(3): 292 – 298.

(编辑:周小林)

and path and the frequency to cross platform were reduced under hypobaric hypoxia as compared with normoxia group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Administration of Hyp significantly attenuated the hypoxia-induced the memory impairment responses ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The activities of SOD and CAT in rats hippocampus exposed to hypobaric hypoxia were significantly improved in the presence of Hyp as compared with the absence of Hyp ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), so did GSH level ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Significant decrease of MDA levels was observed in the hippocampus on exposure to hypobaric hypoxia with Hyp as compared without Hyp. **Conclusion** Hyp reduces hypoxia-induced oxidative stress injury by upregulating activity of antioxidant proteins such as SOD, CAT in hippocampus of rats, which contribute to attenuate memory impairment induced by hypobaric hypoxia.

**Keywords**: hyperoside; hypobaric hypoxia; memory; antioxidant activity

大脑的正常运转大约需要机体 20% 的氧气,因此中枢神经系统对低压低氧环境尤其敏感[1]。研究表明,长期或者短期暴露于低压低氧环境中,都能够引起大鼠海马组织的氧化应激损伤从而导致记忆损伤[2-4]。金丝桃苷(Hyperoside, Hyp)又名槲皮素-3-O-β-D-吡喃半乳糖苷,是一种从天然植物中提取的黄酮醇苷类化合物,具有抗氧化应激、抗细胞凋亡和抗抑郁等广泛的药理学活性[5-8]。我们前期研究证实了 Hyp 以浓度剂量方式改善了过氧化氢、四氯化碳等引起的肝细胞氧化应激损伤[9-10],但是关于 Hyp 对于低压低氧引起的氧化应激损伤的防治作用未见报道。本文利用低压舱模拟高原环境,建立低压低氧引起大鼠氧化应激而导致认知功能损伤模型,观察不同剂量的 Hyp 对于大鼠学习记忆能力的影响,并探究其可能的抗氧化机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

高原低压环境模拟舱(第三军医大学高原医学系与中国贵航集团风雷军械厂联合研制);Morris 水迷宫(上海移数信息科技有限公司);Synergy HT 多功能酶标仪(美国 Bio-TEK);Hyp(浓度为 98%,分子式 $C_{21}H_{20}O_{12}$,相对分子质量为 463.3,批号 ZL130306582,南京泽朗医药科技有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢(CAT),丙二醇(MDA)以及还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

### 1.2 大鼠空间认知训练

健康 SD 雄性大鼠 80 只,5 到 7 周龄,体质量(220 ± 20) g,购于第三军医大学实验动物中心,实验动物许可证证号:SYXK(渝)2007-0002。参考 Morris 等[11]所示的方法进行,略有改进。动物适应环境 1 d 后,进行 Morris 定位航行实验。大鼠在开始训练前取出平台在水中适应 15 s,每次实验将大鼠从 4 个不同象限头朝池壁放入 Morris 水迷宫的水池中,次序随机,连续训练 8 d,每天 4 次,记录大鼠寻找平台的时间,即逃避潜伏期。如果时间超过 60 s 大鼠未寻找到平台,则引导大鼠至平台并停留 15 s,每次试验结束后用毛巾擦干放进笼中。第 9 天(低氧暴露前)进行空间探索实验,记录大鼠穿越平台的次数、在目标象限停留的时间和距离。定位航行与空间探索实验过程保持实验室灯光和环境布局不变。当大鼠穿越平台的次数、在目标象限停留的时间和距离等指标显示获得较为一致的空间认知(记忆)后,进行随后的实验。

### 1.3 给药与缺氧

大鼠获得空间认知后,随机分组,分别按低(10 mg/kg)、中(20 mg/kg)、高(40 mg/kg)3 种单次给药量,将 Hyp 溶解于生理盐水中,按 1 mL/kg 腹腔给药,1 h 后,将动物放置于模拟海拔 6 100 m的低压舱饲养(高原给药组),置平原饲养者作为平原给药组。自由饮食和水。每天给药 1 次,连续 7 d。

### 1.4 记忆能力检测

低压舱内低压低氧 8 d 后,采用 Morris 水迷宫法。按照 1.2 所述方法,进行水迷宫空间探索性实验,记录大鼠在目标象限停留的时间,停留距离和穿越平台次数。

### 1.5 海马组织氧化应激损伤水平检测

大鼠进行空间探索性实验后,用 13% 乌拉坦深度麻醉,迅速取脑(15 s 内),放置于已在冰上遇冷的锡箔纸上,手术刀片将大脑分成左右半脑,剥离海马组织,用预冷的 0.9% 生理盐水清洗后干净滤纸吸干,放入冻存管,液氮保存。第 2 天取出配置 10% 海马组织匀浆,3 000 r/min,4 ℃,离心 10 min,取上清分装,放置 -80 ℃冰箱,取适量组织匀浆测定 MDA 和 GSH 含量,MDA 测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法,GSH 含量测定采用二硫代二硝基笨甲酸(DTNB)法,具体操作和计算按说明书进行。

### 1.6 海马抗氧化酶活性检测

同上取材,SOD 活性测定采用通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下显紫红色。CAT 活性测定采用 CAT 分解过氧化氢($H_2O_2$)的反应可通过加入钼酸胺而迅速中止,剩余的 $H_2O_2$ 与钼酸胺作用产生一种淡黄色的络合物,在 405 nm 处测定其生产量,具有操作和计算按说明书进行。

### 1.7 统计学处理

各实验组数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 16.0 软件进行数据分析。低压低氧给药后 2 组之间比较采用双因素方差分析,方差齐性事后检验采用 LSD 方法进行两两比较,方差不齐事后检验采用 Tambane's T2 法。$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Hyp 对低压低氧大鼠认知损伤的改善作用

Morris 水迷宫定位航行训练第 1 ~ 8 天的潜伏期分别为

(51.4 ± 1.0) s、(44.9 ± 1.0) s、(30.9 ± 3.6) s、(23.8 ± 2.8) s、(20.1 ± 1.6) s、(17.2 ± 0.7) s、(13.5 ± 1.8) s、(10.9 ± 0.5) s。实验结果表明,随着训练天数的延长大鼠达到平台的潜伏期逐渐减少,大鼠经过 8 d 水迷宫训练后获得了平台位置的空间记忆。大鼠低压低氧前空间探索性实验结果显示大鼠在目标象限(Ⅰ象限)所停留时间和距离显著比其他象限的延长($P<0.01$),即大鼠在原平台所在的象限(Ⅰ象限)停留时间和距离分别为(23.2 ± 1.7) s 和(535.5 ± 35.8) cm,而在Ⅱ象限、Ⅲ象限、Ⅳ象限停留时间和距离分别为(12.9 ± 0.8) s 和(337.0 ± 18.6) cm、(11.9 ± 0.6)s 和(315.1 ± 27.8)cm 和(11.3 ± 1.8) s 和(291.0 ± 52.9) cm。

经过模拟 6 100 m 海拔,连续 7 d 低压低氧后,高原空白组(未用药组)大鼠在目标象限时间所待的时间、距离和经过平台次数与平原空白组(未用药组)相比均显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。而与高原空白相比,Hyp 高原用药中剂量和高剂量组在目标象限所待时间、距离和经过平台次数显著增加($P<0.05$),Hyp 高原用药低剂量组在目标象限所待距离和经过平台次数也具有统计学差异($P<0.05$),见表 1。然而,在平原 Hyp 用药组与平原空白组之间不存在统计学差异($P>0.05$)。

**表 1 Hyp 对低氧大鼠学习记忆能力的影响**

| Hyp (mg/kg) | $n$ | 组别 | 原平台限象滞留时间(s) | 原平台限象滞留距离(cm) | 穿过平台(次) |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 8 | 平原 | 24.7 ± 10.3# | 577.6 ± 209.1# | 5.20 ± 0.70* |
| | 10 | 高原 | 15.4 ± 6.7△ | 370.6 ± 178.6△ | 1.80 ± 0.50▲ |
| 10 | 8 | 平原 | 23.5 ± 6.3 | 492.3 ± 111.2 | 5.40 ± 0.75 |
| | 9 | 高原 | 21.7 ± 4.0 | 560.3 ± 141.5# | 3.50 ± 0.85# |
| 20 | 8 | 平原 | 25.3 ± 10.4 | 590.6 ± 171.2 | 5.70 ± 0.68 |
| | 9 | 高原 | 24.4 ± 6.8# | 537.6 ± 140.7# | 4.20 ± 0.65# |
| 40 | 8 | 平原 | 24.0 ± 9.6 | 542.3 ± 192.3 | 5.50 ± 0.82 |
| | 7 | 高原 | 23.4 ± 7.5# | 547.4 ± 131.7# | 4.60 ± 0.70# |

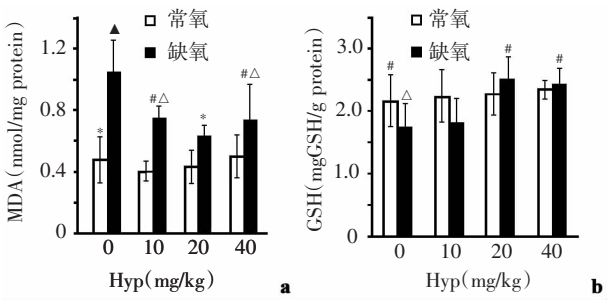
#:与高原空白组比较,$P<0.05$; *:与高原空白组比较,$P<0.01$;△:与平原空白组比较,$P<0.05$;▲:与平原空白组比较,$P<0.01$

### 2.2 Hyp 对海马组织氧化应激损伤的改善作用

与平原空白组相比,高原空白组海马匀浆组织中 MDA 显著增加,见图 1a,。而高原给药各组(Hyp 10 mg/kg,20 mg/kg,40 mg/kg)的 MDA 含量显著低于高原空白对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),并具有剂量依赖关系。GSH 含量是组织内氧化还原状态的另一重要指标,与平原空白组相比,高原空白组海马组织中 GSH 的含量显著减少($P<0.05$),见图 1b。高原用药组(Hyp 20 mg/kg、40 mg/kg)的 GSH 含量显著高于高原空白组($P<0.05$)。

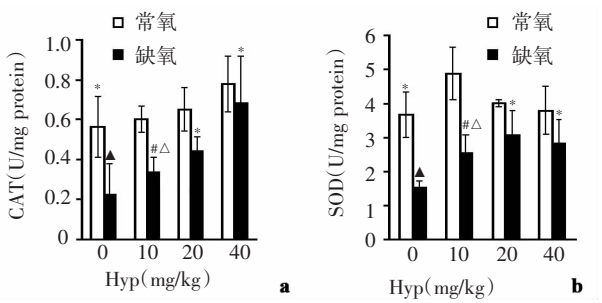
### 2.3 Hyp 对海马组织抗氧化蛋白活性的影响

与平原空白组相比,高原空白组海马组织中 GSH 的含量和 CAT、SOD 活性显著减少($P<0.01$)。高原治疗组(10 mg/kg,20 mg/kg,40 mg/kg)均能显著增强 SOD 和 CAT 的活性($P<0.05$或 $P<0.01$),并具有剂量依赖关系,见图 2a、b。




a:Hyp 对 MDA 的影响;b:Hyp 对 GSH 的影响;*:与高原空白组比较,$P<0.01$;#:与高原空白组比较,$P<0.05$;△:与平原空白组比较 $P<0.05$;▲:与平原空白组比较,$P<0.01$($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

**图 1 Hyp 对低氧大鼠海马组织 MDA 和 GSH 的影响**




a:Hyp 对 CAT 的影响;b:Hyp 对 SOD 的影响;*:与高原空白组比较,$P<0.01$;#:与高原空白组比较,$P<0.05$;△:与平原空白组比较,$P<0.05$;▲:与平原空白组比较,$P<0.01$($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

**图 2 Hyp 对低氧大鼠海马组织 CAT 和 SOD 活性的影响**

## 3 讨论

在高海拔地区氧分压下降导致机体组织中可用的氧减少,在全身各器官和组织的代谢反应中,脑组织主要以高耗氧的有氧代谢为主,并且组织代谢率可变动范围很窄,脑细胞对低氧尤其敏感[1]。高原低压低氧环境使机体产生氧化应激,会使机体内自由基增多,实验研究也证实了急性高原暴露后导致全脑内自由基增多[12]。体内如果不能及时处理过多自由基,就会导致机体产生氧化应激损伤。

Morris 水迷宫是一种常用的检测动物学习记忆的实验,实验通常分成为定位航行实验和空间探索性实验两部分。定位航行实验是训练大鼠获得空间学习记忆的过程,空间探索性实验是测验大鼠对已获得的空间学习记忆的提取、判断、重现的过程。大鼠进行低压低氧暴露后,空间探索性实验结果显示,相对于平原空白组,高原空白组的大鼠在原平台象限的滞留时间、距离和穿过平台的次数等指标均显著下降,表明低压低氧影响了大鼠在定位航行实验中已获得的学习记忆的提取过程,从而显著降低了大鼠在空间探索性实验中

对学习记忆的重现过程。这实验结果证明了低压低氧对大鼠学习记忆的功能造成了损伤,同时国外其他研究也证实了相类似的实验结果[13-14]。

高原组用 Hyp 处理后,实验结果显示大鼠显著提高了在原平台象限滞留时间滞留时间、距离和穿过平台的次数。然而在平原给予 Hyp 处理后,与平原空白相比,其并没有显著提高平原大鼠的学习记忆能力。高原组的低压低氧导致大鼠大脑产生氧化应激,从而影响大鼠的学习记忆的重现,Hyp 给药后显著削弱了低压低氧引起学习记忆损伤,并呈剂量依赖性。由于平原组并没有产生氧化应激,Hyp 并没有产生这种作用,实验结果证实了 Hyp 具有抗低压低氧损伤效应。

大脑海马组织在学习记忆的过程中发挥着重要的作用,因此我们从大鼠大脑中分离海马组织,检测了其氧化应激水平和抗氧化应激能力。丙二醇(MDA)是膜脂质过氧化的产物,其水平反映氧化应激损伤程度。本实验结果显示,高原空白组的海马组织中 MDA 含量显著高于平原空白组,表明低压低氧引起了海马组织氧化应激损伤。同时本实验结果也显示,Hyp 用药组较未用药 MDA 含量显著降低,说明用药后大鼠海马组织脂质过氧化损伤得到明显改善,Hyp 发挥了抗氧化损伤的作用。

还原型谷胱甘肽(GSH)是机体内最重要的非酶性抗氧化物,是一种低分子清除剂,可清除机体内产生的过氧化氢($H_2O_2$),因而 GSH 量的多少是衡量机体抗氧化能力大小的重要因素。本实验结果显示低压低氧能导致大鼠海马组织内的 GSH 含量显著下降,然而在低压低氧下给予 Hyp 后,其可提高海马组织内 GSH 含量,以中剂量组(20 mg/kg)的效果最佳。超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢(CAT)是机体内 2 种重要的抗氧化应激蛋白酶,SOD 能清除超氧阴离子自由基,保护细胞免受损失;CAT 可清除机体内产生 $H_2O_2$。本实验结果显示,低压低氧后大鼠海马组织中的 SOD 和 CAT 的活性显著降低,而低压低氧给药后,海马组织中的 SOD 和 CAT 活性显著提高,并呈一定剂量依赖型关系。实验结果进一步表明 Hyp 能增强抗氧化蛋白的活性,促进海马组织启动抗氧化机制,发挥抗氧化作用。

综上所述,Hyp 具有减轻低压低氧认知功能损伤的作用,其机理可能是降低大鼠海马组织低氧时的 MDA 水平,提高 GSH 含量,并增强 SOD 和 CAT 等抗氧化酶的活性,从而减轻低氧导致的海马组织的氧化应激损伤。本研究提示,Hyp 有望成为预防低氧引起的氧化应激损伤,提升高原脑力劳动能力的有效药物。

## [参考文献]


[1] 高钰琪,牛文忠,谢印芝,等. 高原军事医学[M]. 重庆:重庆出版社,2005:549.

[2] Maiti P, Singh SB, Mallick B, et al. High altitude memory impairment is due to neuronal apoptosis in hippocampus, cortex and striatum[J]. J Chem Neuroanat, 2008, 36(3-4): 227 – 238.

[3] Maiti P, Muthuraju S, Ilavazhagan G, et al. Hypobaric hypoxia induces dendritic plasticity in cortical and hippocampal pyramidal neurons in rat brain[J]. Behav Brain Res, 2008, 189(2): 233 – 243.

[4] Titus AD, Shankaranarayana Rao BS, Harsha HN, et al. Hypobaric hypoxia-induced dendritic atrophy of hippocampal neurons is associated with cognitive impairment in adult rats[J]. Neurosci, 2007, 145(1): 265 – 278.

[5] Li ZL, Hu J, Li YL, et al. The effect of hyperoside on the functional recovery of the ischemic/reperfused isolated rat heart: potential involvement of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling path way[J]. Free Radical Biol Med, 2013, 57: 132 – 140.

[6] Zheng M, Liu C, Pan F, et al. Antidepressant-like effect of hyperoside isolated from Apocynum venetum leaves: possible cellular mechanis ms[J]. Phytomed, 2012, 19(2): 145 – 149.

[7] Zhang XN, Li JM, Yang Q, et al. Anti-apoptotic effects of hyperoside via inhibition of NR2B-containing NMDA receptors[J]. Pharmacol Rep, 2010, 62(5): 949 – 955.

[8] Liu Z, Tao X, Zhang C, et al. Protective effects of hyperoside (quercetin-3-o-galactoside) to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide[J]. Biomed Pharmacother, 2005, 59(9): 481 – 490.

[9] Xing HY, Liu Y, Chen JH, et al. Hyperoside attenuates hydrogen peroxide-induced L02 cell damage via MAPK-dependent Keap(1)-Nrf(2)-ARE signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 410(4): 759 – 765.

[10] 黄明春,陈剑鸿,胡小刚,等. 金丝桃苷对 CCl4 诱导大鼠急性肝损伤抗氧化应激研究[J]. 局解手术学杂志,2013,22(6):588 – 590.

[11] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. J Neurosci Method, 1984, 11: 47 – 60

[12] Christina L, Joe M, Swapan B, et al. Nrf2 activation: A potential strategy for the prevention of acute mountain sickness[J]. Free Radical Biolo Med, 2013, 63: 264 – 273.

[13] Hota SK, Barhwal K, Ray K, et al. Ceftriaxone rescues hippocampal neurons from exci-totoxicity and enhances memory retrieval in chronic hypobaric hypoxia[J]. Neurobiol Learn Mem, 2008, 89(4): 522 – 532.

[14] Muthuraju S, Maiti P, Solanki P, et al. Cholinesterase inhibitors ameliorate spatial learning deficits in rats following hypobaric hypoxia[J]. Exp Brain Res, 2010, 203(3): 583 – 592.


(编辑:魏 源)