

珍珠贝肉提取液抗衰作用的动物实验

Animal Experiment of Pearl Oyster Extract on Anti-aging

李永华
Li Yonghua

吴馥梅
Wu Fumei

(广西南珠研究开发中心 钦州 535000) (南京大学生物科学与技术系 南京 210093)
(Guangxi Nanzhu Research and Development Centre, Qinzhou, 535000) (Department of Biological Science and Technology, Nanjing University, Nanjing, 210093)

摘要 在实验室检测马氏珍珠贝肉提取液对老龄小白鼠分辨学习及记忆保持能力的影响,并于行为实验结束后测定海马突触体内游离钙水平变化。小白鼠16~17月龄,体重(65±4)g,雌雄兼用,共30只,分为天然提取液组10只,强化提取液组(天然提取液+牛磺酸)10只,对照组(饮用普通清水)10只。平均每只小鼠每天服用量为5ml,共服用40d。珍珠贝肉天然提取液和牛磺酸强化提取液与对照组相比,都明显增强老龄鼠在Y-迷宫中的分辨学习能力和学习速度,减少训练次数($P < 0.05$);对记忆保持率的提高具有促进作用,尤其是牛磺酸强化提取液使记忆保持率大幅度提高($P < 0.01$)。天然提取液与强化提取液都一致降低鼠脑的海马突触体游离钙离子水平,提示这种提取液对衰老脑细胞的“钙超载”有拮抗效应。

关键词 珍珠贝 肉提取液 钙离子 衰老 学习记忆 动物实验

中国法分类号 Q25; R97

Abstract The effect of the pearl oyster extract on both discrimination learning and memory maintenance of aging mice are examined in lab. The Ca^{2+} level in hippocampal synaptosomes of mice is tested after behavioral observation. Thirty mice of female and male aged 16~17 months are divided into three groups; A. Natural group (the pearl oyster extract), B. Reinforced group (Natural group plus taurine) and C. Control group (drinking water), ten mice for each group. Each mouse a day takes a dose of 5 ml for 40 days. The discrimination-learning ability and learning speed of the aging mice in Y-maze are markedly enhanced, and the training times obviously decreased in Groups A and B ($P < 0.05$), as compared with the control group. The percentage of memory maintenance of the mice in Groups A and B increased, especially Group B ($P < 0.01$). The Ca^{2+} level in hippocampal synaptosomes of the mice in Groups A and B obviously decreased, indicating that pearl oyster extract has antagonism to “ Ca^{2+} overload” in brain cells.

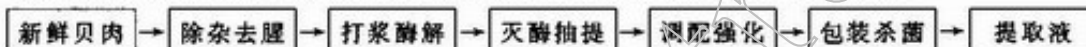
Key words pearl oyster, extract, Ca^{2+} , aging, learning-memory, animal experiment

珍珠贝肉提取液是从马氏珍珠贝 (*Pinctada martensii* Dunker) 软体部提取的 1 种天然营养液, 含有多种氨基酸, 尤其含有较丰富的牛磺酸。牛磺酸即 2-氨基乙磺酸 ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3$), 有广泛的生物效应, 具有调节细胞渗透压, 清除氧自由基, 抑制脂质过氧化物的生成以及稳定细胞膜结构等功能, 是脑发育必需的营养物质^[1-3]。由于脑内牛磺酸含量在出生后迅速下降, 并且机体合成能力有限, 不断向体内补充牛磺酸显然很有必要。我们的实验已经证明这种富含牛磺酸及多种氨基酸的珍珠贝肉提取液对幼龄鼠的学习记忆能力有增强作用 (待发表)。为了探讨这种提取液对老龄鼠的学习记忆能力衰退的影响, 本实验以学习记忆为指标检测了这种提取液对老龄小白鼠分辨学习及记忆保持能力的影响, 并于行为实验结束后测定海马突触体内游离钙水平的变化。

1 材料与方 法

1.1 药 品

珍珠贝肉提取液由广西南珠研究开发中心提取, 提取工艺流程为:



本实验中使用的提取液分天然提取液和在天然提取液基础上根据牛磺酸添加标准添加牛磺酸称牛磺酸强化提取液 2 种。钙离子荧光探针 Fura-2/AM 为美国 Sigma 公司产品。Hepes-Na 为上海生化试剂商店的进口分装药品。其他一般性药品为国产市售, 分析纯。

1.2 实验动物

昆明品系小白鼠, 16~17 月龄 (12 月龄为进入老龄期), 体重为 (65 ± 4) g, 雌雄兼用, 共 30 只, 其中天然组提取液组 10 只, 强化提取液组 (天然提取液组 + 牛磺酸) 10 只, 对照组 (饮用普通清水) 10 只, 由南京大学实验动物中心饲养。珍珠贝肉提取液加入水供动物服用, 平均每只小鼠每天服用量为 5 ml, 共服用 40 d。同龄对照小鼠饮用普通清水。

1.3 仪 器

氨基酸分析仪为日本产日立 853-50 型。AR-CM-MIC 阳离子测定系统为美国 spex 公司产品。Diapho-TMD 型荧光偏置显微镜为日本 Nikon 公司产品, 与阳离子测定系统配套使用。

1.4 Y-迷宫分辨学习模型

小鼠服用提取液 35 d 开始进行 Y-迷宫训练^[4], 以达到 90% 正确反应率的训练次数代表学习能力, 训练次数越少说明学习速度越快, 或学习能力越强。训练期间的继续服用提取液至 40 d。训练结束后 24 h 检测其记忆保持百分率。结果以每组平均值用 *t* 检验法统计处理。

1.5 突触体游离钙测定

行为检测结束后杀鼠剥脑, 取出双侧海马按常规方法分离制备突触体^[5,6], 一切操作在 0~4℃ 下进行。以冰冷的 Na^+ 介质 (含有 NaCl 132 mmol/ml, KCl 1 mmol/ml, MgCl_2 1.4 mmol/ml, NaH_2PO_4 1.2 mmol/ml, Glucose 10 mmol/ml, Hepes-Na 10 mmol/ml, pH 值 7.4) 将突触体制成悬浮液, 在制备后 2~3 h 内进行 Ca^{2+} 测定。测定时将突触体悬液与 Fura-2/AM 在 Na^+ 介质中一同孵育, 具体步骤按文献 [7] 的方法进行。最后取出含有一定量蛋白质的突触体悬液于测量皿中经 AR-CM-MIC 阳离子测定系统检测其荧光强度, 用公式^[7]计算出突触体内 Ca^{2+} 浓度。结果以平均值用 *t* 检验法统计处理。

2 实验结果

2.1 珍珠贝肉提取液的氨基酸含量分析

珍珠贝肉提取液样品氨基酸分析测试结果(表1)表明,珍珠贝肉提取液除含有较丰富的牛磺酸外,还含有多种氨基酸。

2.2 珍珠贝肉提取液对老龄鼠分辨学习与记忆保持能力的影响

分辨学习与记忆保持能力的检测结果见表2。从表2可以看出,珍珠贝肉天然提取液和牛磺酸强化提取液与对照组相比,都明显增强老龄鼠在Y-迷宫中的分辨学习能力,提高学习速度,减少训练次数($P < 0.05$);对记忆保持率的提高具有促进作用,尤其是牛磺酸强化提取液使记忆保持率大幅度提高($P < 0.01$)。

表1 珍珠贝肉提取液游离氨基酸组成

名称	含量 (mg/100 ml)	名称	含量 (mg/100 ml)
ASP (门冬氨酸)	28.2	Met (蛋氨酸)	40.2
Thr (苏氨酸)	57.6	Ile (异亮氨酸)	62.0
Ser (丝氨酸)	39.9	Leu (亮氨酸)	115.7
Glu (谷氨酸)	92.2	Tyr (酪氨酸)	66.5
Pro (脯氨酸)	32.9	Phe (苯丙氨酸)	71.7
Gly (甘氨酸)	44.6	Lys (赖氨酸)	62.5
Ala (丙氨酸)	73.7	His (组氨酸)	14.6
Cys (胱氨酸)	17.6	Arg (精氨酸)	70.1
Val (缬氨酸)	69.6	TAU (牛磺酸)	90.5

表2 衰老鼠Y-迷宫分辨学习与记忆保持能力($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (例)	学习能力 (达到90%正确反 应率的训练次数,次)	记忆保持 (24h后记忆 保持百分率,%)
对照组	10	38.6±19.2	68±18.2
天然提取液组	10	25.9±15.6*	80±8.8
强化提取液组	10	23.8±11.9*	91±10.2**

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, 与对照组相比。

2.3 珍珠贝肉提取液对老龄鼠海马突触体游离钙水平的影响

游离钙离子测定结果见表3。表3表明,天然提取液与强化提取液都一致降低鼠脑的海马突触体游离钙离子水平,提示这种提取液对衰老脑细胞的“钙超载”有拮抗效应。

3 讨论

近年来,脑钙超载与记忆衰退的关系已引起重视,脑细胞 Ca^{2+} 水平过高造成神经元损伤及功能障碍已有不少研究报道^[8-11]。钙离子拮抗剂(如 Nimodipine)正被作为益智药物进行研究^[8,12]。新的观点认为,脑内“钙稳态”失调影响脑功能,衰老状态下中枢神经系统会发生钙调节紊乱^[13]。而且还发现,细胞质 Ca^{2+} 和细胞核 Ca^{2+} 信号通过不同的机制影响基因转录, Ca^{2+} 是细胞内的多功能信使^[14]。本实验结果显示,老龄动物服用珍珠贝肉提取液一段时间以后,其学习记忆衰退有明显改善,而且这种改善作用与降低海马突触体的游离钙水平相一致。同时实验结果也表明,珍珠贝肉提取液对老龄鼠学习记忆能力衰退的改善作用

表3 衰老鼠海马突触体游离钙离子水平($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (例)	突触体内 Ca^{2+} 水平 (nmol/l)
对照组	10	122.2±20.8
天然提取液组	10	88.5±5.5**
强化提取液组	10	36.5±10.8**

** $P < 0.01$, 与对照组相比。

可能也与牛磺酸有关。众所周知，海马是与学习记忆密切相关的脑区，而突触是神经信息传递的关键结构，本实验既检测了动物学习记忆行为，又测定了海马突触体内 Ca^{2+} 水平，显然是很有意义的。脑老化时海马 Ca^{2+} 水平过高和钙稳态失调影响脑功能必然会反映在学习记忆的功能上，珍珠贝肉提取液降低脑钙水平也许正是它抗衰促智的重要机理之一。本实验为马氏珍珠贝肉作为抗衰促智的营养保健品开发提供了一定的理论依据，关于用珍珠贝肉进行营养保健品的进一步研制开发，还有待更深入的研究。

参考文献

- 1 Ogasawara M, Nakamura T, Koyama T et al. Reactivity of taurine with aldehydes and its physiological role. *Chem Pharm Bull Tokyo*, 1993, 41: 2172~2175.
- 2 韩小滨, 牛磺酸对人脑神经细胞增殖、分化的影响. *生理科学进展*, 1992, 23 (4): 339~341.
- 3 安文林, 王惠琴, 李林. 牛磺酸对中枢神经系统生长发育及对衰老过程影响的研究进展. *生理科学进展*, 1997, 28 (2): 154~156.
- 4 梅镇彤. 迷宫学习模型, 见: 梅镇彤著. *学习与记忆的神经生物学*. 上海: 上海科技教育出版社, 1997. 25.
- 5 Hajos F. An improved method for the preparation of synaptosomes in high purity. *Brain Res*, 1975, 93: 485~489.
- 6 吴馥梅, 杨丽娅, 萧信生. 突触体研究简介. *神经科学*, 1995, 2 (2): 93~96.
- 7 张维宁, 吴馥梅, 张祖暄等. 神经肽 DGAVP 和 Org2766 对神经细胞内游离 Ca^{2+} 的影响. *药学学报*, 1993, 28 (9): 655~660.
- 8 张均田. 老化, 老年痴呆与钙代谢失衡及其治疗新途径. *药学学报*, 1993, 28 (9): 641~646.
- 9 张维宁, 陆汉新, 吴馥梅等. 海马内钙离子水平对小鼠记忆巩固的影响. *中国药理学通报*, 1994, 10 (4): 262~267.
- 10 王良斌, 张维宁, 邵悦等. 大鼠不同脑区突触体钙水平的年龄差异. *动物学研究*, 1995, 16 (4): 373~377.
- 11 Foster T C, Norris C M. Age-associated changes in Ca^{2+} -dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus*, 1997, 7: 602~612.
- 12 Deyo R A, Straube K T, Disterhaft J F. Nimodipine facilitates associate learning in aging rabbits. *Science*, 1989, 243: 809.
- 13 冯征, 张均田. 中枢神经系统钙稳态失调和老龄脑功能. *生理科学进展*, 2000, 31 (2): 102~108.
- 14 刘健, 何作云, 王培勇等. 核钙信号与基因表达调节. *生理科学进展*, 2001, 32 (2): 146~148.

(责任编辑: 邓大玉)