



大豆黄酮对衰老小鼠脑组织神经递质含量的调节

才金玲¹, 单群², 陆军², 郑元林²

(1. 天津市海洋资源与化学重点实验室, 天津科技大学海洋科学与工程学院, 天津 300457;
2. 徐州师范大学生命科学学院, 徐州 221116)

摘要: 研究大豆黄酮对 D-半乳糖致衰老小鼠脑神经递质水平的调节. 连续背部注射 D-半乳糖 6 周, 建立衰老模型, 然后灌胃大豆黄酮 5 周(实验组 I、II 的剂量分别为 5、10 mg/(kg·d)), 监测不同脑区乙酰胆碱、乙酰胆碱酯酶、多巴胺和 5-羟色胺含量变化, 探讨大豆黄酮对衰老小鼠脑组织神经递质水平的影响. 结果表明, 灌胃衰老小鼠大豆黄酮后, 大脑皮质和海马中乙酰胆碱、乙酰胆碱酯酶、多巴胺和 5-羟色胺含量明显上升, 并且具有一定的剂量效应. 说明大豆黄酮可以改善衰老小鼠脑组织中神经递质含量, 具有明显的抗衰老作用.

关键词: 大豆黄酮; 抗衰老; 乙酰胆碱; 乙酰胆碱酯酶; 多巴胺; 5-羟色胺

中图分类号: Q956 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2011)06-0016-04

Regulation of Daidzein on Neurotransmitter Levels in Brain of Aged Mice

CAI Jin-ling¹, SHAN Qun², LU Jun², ZHENG Yuan-lin²

(1. Tianjin Key Laboratory of Marine Resources and Chemistry, College of Marine Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. School of Life Science, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China)

Abstract: To observe daidzein on the effects of D-galactose induced senescence in mice, D-galactose was injected in the dorsal of mice for 6 weeks as an aged model. The aged mice were fed daidzein with the doses 5 mg/(kg·d) (Test I) and 10 mg/(kg·d) (Test II) for 5 weeks. The levels of acetylcholine, acetylcholinesterase, dopamine, and 5-hydroxytryptamine in brain of the aged mice were examined. The results showed that daidzein could increase acetylcholine, acetylcholinesterase, dopamine, and 5-hydroxytryptamine levels in cortex and hippocampus of aged mice. Daidzein could increase neurotransmitter levels of the mice's brain and have antisenesence in some degree.

Keywords: daidzein; antisenesence; acetylcholine; acetylcholinesterase; dopamine; 5-hydroxytryptamine

神经系统是机体的重要调控系统之一, 通过神经递质发挥生物学作用, 伴随增龄, 神经递质的代谢会发生紊乱. 研究表明, 神经递质数量和功能的变化, 不仅与心血管活动有关^[1], 而且也与脑功能的退行性变化有很大的关系^[2]. 乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)是中枢神经系统的重要神经递质. 它由乙酰胆碱转移酶(ChAT)合成, 乙酰胆碱酯酶分解, 通过乙酰胆碱受体(Ach-R)发挥生物学效应. ChAT和Ach合成酶(acetylcholinesterase, AchE)共同维持Ach平衡. 生物体随年龄增长, 胆碱能系统功能逐渐衰退, 表现为代谢失调、受体数目和亲和力发生变化, 导致中枢神经

生理异常^[3]. 人类中枢神经系统中Ach的浓度和AchE有随年龄增长而降低的趋势^[3]. 多巴胺(dopamine, DA)和5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)等神经递质因只含有一个胺基统称为单胺类神经递质. 单胺类神经递质的代谢失衡或障碍在衰老和一些神经系统疾病的发生发展过程中具有重要作用^[4]. 大脑多巴胺含量降低与衰老及认知、运动能力的损害有关, 即随着年龄的增长, 多巴胺含量降低^[4]. 神经递质含量的变化可在一定程度上反应人类衰老的程度以及反映因衰老而引起的神经系统的改变, 包括记忆力减退和认知能力下降. 因此, 在衰老的研究中, 测定脑

收稿日期: 2011-06-03; 修回日期: 2011-10-08

基金项目: 天津市海洋资源与化学重点实验室开放基金课题(200913); 天津科技大学引进人才科研启动基金资助项目(20100410)

作者简介: 才金玲(1976—), 女, 黑龙江人, 助理研究员, 博士; 通信作者: 郑元林, 教授, 博士生导师, ylzhang@xznz.edu.cn.

组织胆碱能神经递质及单胺类神经递质或其代谢产物含量变化及受体亲和力和数目的变化,可在一定程度上证实药物的抗衰老作用。

本文通过测定衰老小鼠脑组织的乙酰胆碱、乙酰胆碱酯酶、多巴胺含量的变化,研究大豆黄酮对衰老模型小鼠的抗衰老作用的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

清洁级昆明种小白鼠 80 只,8 周龄,体重 (24.6 ± 4.24) g,雌雄各半,购于徐州医学院实验动物中心,许可证号:SCXK(苏)2005-0005。

D-半乳糖,上海试剂二厂;大豆黄酮(4',7-二羟基异黄酮,纯度 $\geq 98.0\%$)由南京农业大学农业部动物生理生化重点实验室陈杰教授提供,其化学结构为如图 1 所示。总蛋白定量测试盒、5-羟色胺测试盒(5-HT),南京建成生物工程研究所。

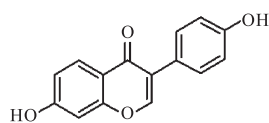


图 1 大豆黄酮(4',7-二羟基异黄酮)结构式

Fig.1 Structure of daidzein(4', 7-dihydroxy isoflavone)

DG5031 型酶标仪,国营华东电子管厂;TGL-16G 型高速冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及给药

小鼠适应喂养 1 周后,随机分为 4 组:正常对照组、衰老对照组、实验组 I 和实验组 II 每组各为 20 只,雌雄各半。衰老对照组、实验组 I、实验组 II 小鼠采用颈背部皮下注射 *D*-半乳糖 50 mg/(kg·d) 建立衰老模型^[5],正常对照组注射等量的生理盐水,连续 6 周。第 7 周开始,一方面继续每天给实验组 I、实验组 II、衰老对照组小鼠注射 *D*-半乳糖;同时,实验组 I 和实验组 II 分别按 5 mg/(kg·d) 和 10 mg/(kg·d) 剂量灌胃大豆黄酮(大豆黄酮用含 1%吐温 80 助溶);衰老对照组和正常对照组灌胃等量的不含大豆黄酮的助溶剂,连续 5 周。

1.2.2 检测指标

将小鼠拉断颈椎处死后,迅速断头取脑剥离出大脑皮质和海马,分别称质量,再分别加入 9 倍组织质量预冷的生理盐水,匀浆,制成 10%和 1%的组织匀

浆液;4℃、4 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,待测。

蛋白质含量和 5-HT 含量测定按照试剂盒说明书测得。ACh 测定参考鲁祖荪等的方法^[6]。AChE 活性根据羟胺比色法测定^[7]。多巴胺测定根据 Jacobowitz 和 Richardson 方法测定^[8]。

1.2.3 统计学处理

各组数据用平均值 \pm 标准差表示,采用 SPSS 13.0 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 蛋白质质量浓度标准曲线

在波长 595 nm 处测得蛋白质的吸光度与蛋白质浓度之间相关曲线。如图 2 所示,回归方程为 $y = 6.8225x + 0.0026$, $R^2 = 0.9986$ 。

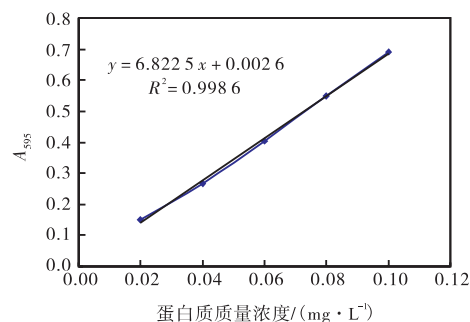


图 2 蛋白质质量浓度标准曲线

Fig.2 Standard curve of concentration of protein

2.2 大豆黄酮对衰老小鼠脑组织乙酰胆碱(ACh)含量的影响

大豆黄酮对衰老模型小鼠大脑皮质和海马的乙酰胆碱含量的影响见表 1。

表 1 大豆黄酮对衰老模型小鼠乙酰胆碱含量的影响($n = 20$)
Tab.1 Effects of Daidzein on levels of acetylcholine in cortex and hippocampus of aged mice($n = 20$)

组别	大脑皮质乙酰胆碱/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	海马乙酰胆碱/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
衰老对照组	41.36 \pm 1.28 ^a	154.28 \pm 6.07 ^a
正常对照组	66.00 \pm 4.72 ^c	254.54 \pm 19.67 ^c
实验组 I	56.38 \pm 2.10 ^b	180.45 \pm 14.81 ^{ab}
实验组 II	63.24 \pm 2.66 ^c	187.17 \pm 14.12 ^b

注: a、b、c 是 Duncan 检验结果, $P < 0.05$ 。

由表 1 可知,衰老对照组小鼠大脑皮质和海马中的乙酰胆碱含量与正常对照组相比都显著下降,降幅分别为 37.33% ($P < 0.05$) 和 39.39% ($P < 0.05$)。可见

D-半乳糖可降低小鼠大脑皮质和海马中的 Ach 的含量,具有致衰老作用.连续灌胃大豆黄酮 5 周后,实验组 I 和实验组 II 小鼠大脑皮质中 Ach 含量与衰老对照组相比有所上升,其 Ach 的含量分别增加 36.32% ($P < 0.05$) 和 52.90% ($P < 0.05$). 同样,实验组 I 和实验组 II 小鼠海马中 Ach 含量与衰老对照组相比显著上升,分别上升了 16.96% ($P < 0.05$) 和 21.32% ($P < 0.05$). 说明大豆黄酮可以增加衰老小鼠大脑皮质和海马中 Ach 的含量,并且具有一定的剂量效应.

2.3 大豆黄酮对衰老小鼠脑组织乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性的影响

大豆黄酮对衰老模型小鼠大脑皮质和海马的乙酰胆碱酯酶活性的影响见表 2.

表 2 大豆黄酮对衰老模型小鼠乙酰胆碱酯酶活性的影响 ($n = 20$)

Tab.2 Effects of Daidzein on levels of acetylcholinesterase in cortex and hippocampus of aged mice ($n = 20$)

组别	大脑皮质乙酰胆碱酯酶/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	海马乙酰胆碱酯酶/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
衰老对照组	0.522±0.039 ^a	4.14±0.27 ^a
正常对照组	0.883±0.034 ^d	5.28±0.37 ^c
实验组 I	0.612±0.055 ^b	4.67±0.23 ^b
实验组 II	0.751±0.040 ^c	4.95±0.16 ^b

注: a、b、c、d 是 Duncan 检验结果, $P < 0.05$.

由表 2 可知,衰老对照组小鼠大脑皮质和海马中的乙酰胆碱酯酶含量与正常对照组相比都显著下降,降幅分别为 69.16% ($P < 0.05$) 和 27.49% ($P < 0.05$). 可见 D-半乳糖可降低小鼠大脑皮质和海马中的 AchE 的含量,具有致衰老作用.连续灌胃大豆黄酮 5 周后,实验组 I 和实验组 II 小鼠大脑皮质中 AchE 含量与衰老对照组相比有所上升,其 Ach 的含量分别增加 17.24% ($P < 0.05$) 和 36.97% ($P < 0.05$). 同样,实验组 I 和实验组 II 小鼠海马中 Ach 含量与衰老对照组相比显著上升,分别上升了 12.82% ($P < 0.05$) 和 19.55% ($P < 0.05$). 说明大豆黄酮可以增加衰老小鼠大脑皮质和海马中 AchE 的含量,并且具有一定的剂量效应.

2.4 大豆黄酮对衰老小鼠脑组织多巴胺 (DA) 含量的影响

衰老对照组小鼠大脑皮质的多巴胺含量与正常对照组相比显著下降(见表 3),降幅为 69.25% ($P < 0.05$). 衰老对照组小鼠海马的多巴胺含量与正常对照组相比显著下降,降幅为 61.04% ($P < 0.05$). 灌胃大豆黄酮后实验组 I 和实验组 II 小鼠大脑皮质和海

马中多巴胺含量均有显著增加 ($P < 0.05$). 说明大豆黄酮可以增加衰老小鼠脑组织中多巴胺的含量.

表 3 大豆黄酮对衰老模型小鼠多巴胺含量的影响 ($n = 20$)

Tab.3 Effects of Daidzein on levels of dopamine in cortex and hippocampus of aged mice ($n = 20$)

组别	大脑皮质多巴胺/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	海马多巴胺/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
衰老对照组	0.119±0.009 ^a	0.247±0.01 ^a
正常对照组	0.387±0.012 ^c	0.634±0.02 ^c
实验组 I	0.144±0.009 ^b	0.293±0.01 ^b
实验组 II	0.149±0.002 ^b	0.324±0.02 ^b

注: a、b、c 是 Duncan 检验结果, $P < 0.05$.

2.5 大豆黄酮对衰老小鼠脑组织 5-羟色胺 (5-HT) 含量的影响

衰老对照组小鼠大脑皮质的 5-HT 含量与正常对照组相比显著下降(见表 4),降幅为 58.45% ($P < 0.05$). 衰老对照组小鼠海马的 5-HT 含量与正常对照组相比显著下降,降幅为 69.37% ($P < 0.05$). 灌胃大豆黄酮后实验组 I 脑组织中 5-HT 含量变化不明显,实验组 II 小鼠大脑皮质和海马中 5-HT 含量分别显著增加了 29.68% ($P < 0.05$) 和 44.48% ($P < 0.05$). 说明大豆黄酮可以增加衰老小鼠脑组织中 5-HT 的含量,并具有明显的剂量效应.

表 4 大豆黄酮对衰老模型小鼠 5-HT 含量的影响 ($n = 20$)

Tab.4 Effects of Daidzein on levels of 5-hydroxytryptamine in cortex and hippocampus of aged mice ($n = 20$)

组别	大脑皮质 5-HT/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	海马 5-HT/ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
衰老对照组	0.219±0.019 ^a	0.335±0.024 ^a
正常对照组	0.347±0.022 ^c	0.554±0.032 ^c
实验组 I	0.239±0.019 ^a	0.374±0.018 ^a
实验组 II	0.284±0.021 ^b	0.484±0.021 ^b

注: a、b、c 是 Duncan 检验结果, $P < 0.05$.

3 讨论

在衰老过程中,生物体变化最显著的是一些与学习和记忆密切相关的脑区,如海马、皮层和纹状体等^[9]. 脑老化时不同脑区的乙酰胆碱转移酶和胆碱脂酶有增龄性降低^[3]. 壳核区神经元的多巴胺含量百岁老人与 20 岁个体相比下降 25%^[10]. 多巴胺水平与认知功能呈正相关,与年龄呈负相关.

本文研究结果表明,灌胃衰老小鼠大豆黄酮后,在大脑皮质和海马中乙酰胆碱、乙酰胆碱酯酶、多巴

胺和 5-HT 的含量显著上升. 实验组 I 和实验组 II 相比较具有差异,随着大豆黄酮灌胃剂量的增加,乙酰胆碱、乙酰胆碱酯酶、多巴胺和 5-HT 含量升高幅度加大,表明大豆黄酮可增加乙酰胆碱、乙酰胆碱酯酶、多巴胺和 5-HT 含量,具有一定的剂量效应. 从而促进衰老小鼠神经传递的顺利进行,起到改善脑功能衰退,达到益智、健脑、抗衰老的作用. 这也可能是大豆黄酮抗衰老的神经生物学机制之一.

参考文献:

- [1] Protas L, Qu J, Robinson R B. Neuropeptide Y: Neurotransmitter or trophic factor in the heart? [J]. *News Physiol Sci*, 2003, 18: 181-185.
- [2] Kanitz E, Otten W, Hameister T, et al. Age-related changes in corticosteroid receptor expression and monoamine neurotransmitter concentrations in various brain regions of postnatal pigs[J]. *Journal Neurosci Res*, 2011, 89(7): 1134-1141.
- [3] Okuma Y, Murayama T, Tha K K, et al. Learning deficiency and alterations in acetylcholine receptors and protein kinase C in the brain of senescence-accelerated mouse (SAM)-P10[J]. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2000, 114(3): 191-199.
- [4] Niimi K, Takahashi E, Itakura C. Age dependence of motor activity and sensitivity to dopamine receptor 1 agonist, SKF82958, of inbred AKR/J, BALB/c, C57BL/6J, SAMR1, and SAMP6 strains[J]. *Brain Research*, 2009, 1250: 175-182.
- [5] 龚国清,徐猷本. 小鼠衰老模型研究[J]. *中国药科大学学报*, 1991, 22(2): 101-103.
- [6] 鲁祖菽,叶菲,都本业. 碱性羟胺比色法测定全血乙酰胆碱[J]. *临床检验杂志*, 1992, 10(2): 84-85.
- [7] 李凤珍,孙曼霁. 微量羟胺比色法测量胆碱酯酶活性[J]. *军事医学科学院院刊*, 1986, 10(3): 211-214.
- [8] Jacobowitz D M, Richardson J S. Method for the rapid-determination of norepinephrine, dopamine, and serotonin in same brain region[J]. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1978, 8(5): 515-519.
- [9] Volkow N D, Gur R C, Wang G J, et al. Association between decline in brain dopamine activity with age and cognitive and motor impairment in healthy individuals [J]. *The American Journal of Psychiatry*, 1998, 155(3): 344-349.
- [10] 宋士一,马宏,王金玲. 雄性大鼠海马多巴胺受体的增龄性改变[J]. *沈阳师范学院学报:自然科学版*, 2001, 19(3): 52-54.