

## 汉黄芩素对 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 和 D-半乳糖诱导的小鼠学习记忆损害的改善作用

章琪露<sup>1</sup>, 聂睿哲<sup>1</sup>, 魏立彬<sup>2,3</sup>, 郭青龙<sup>2,3</sup>, 唐苏苏<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国药科大学药学院药理学系, 南京 211198; <sup>2</sup> 中国药科大学基础医学与临床药学院生理学系, 南京 211198; <sup>3</sup> 山东益康药业股份有限公司, 山东省晶型药物重点实验室, 滕州 277500)

**摘要** 研究汉黄芩素对小鼠学习记忆的改善作用。分别采用侧脑室注射 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 建立小鼠学习记忆损害模型与腹腔注射 D-半乳糖建立小鼠急性衰老模型, 连续 28 d 灌胃给予 75、150 和 300 mg/kg 汉黄芩素, 采用 Morris 水迷宫、新物体识别、旷场实验检测汉黄芩素对小鼠学习记忆的影响。结果显示, 在 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 诱导的学习记忆损害模型中, 与模型组相比, 150 mg/kg 和 300 mg/kg 汉黄芩素给药组小鼠在新物体识别实验中对新物体的识别指数显著增加; 150 mg/kg 汉黄芩素给药组小鼠在 Morris 水迷宫实验测试期目标象限停留时间百分比显著增加, 而在旷场实验中各组小鼠的运动总距离无显著变化。在 D-半乳糖诱导的急性衰老模型中, 与模型组相比, 150 mg/kg 汉黄芩素组小鼠在 Morris 水迷宫实验测试期穿越平台次数显著增加, 75、150 和 300 mg/kg 汉黄芩素组小鼠在 Morris 水迷宫实验测试期目标象限停留时间百分比显著增加; 而在旷场实验中各组小鼠的运动总距离无显著变化。研究提示汉黄芩素对 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 和 D-半乳糖诱导的小鼠学习记忆损害均具有改善作用, 并对小鼠自发活动无显著影响。此外, 采用 Western blot 实验检测发现, 汉黄芩素可显著减少 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 和 D-半乳糖诱导的小鼠海马区神经细胞凋亡。这些结果表明, 汉黄芩素可能对阿尔茨海默病和衰老相关的学习记忆损害具有改善作用。

**关键词** 汉黄芩素; A $\beta$ <sub>1-42</sub>; D-半乳糖; 记忆损害; 细胞凋亡

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2025)02-0207-09

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024091301

引用本文 章琪露, 聂睿哲, 魏立彬, 等. 汉黄芩素对 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 和 D-半乳糖诱导的小鼠学习记忆损害的改善作用 [J]. 中国药科大学学报, 2025, 56(2): 207–215.

Cite this article as: ZHANG Qilu, NIE Ruizhe, WEI Libin, *et al.* Wogonin ameliorates A $\beta$ <sub>1-42</sub> and D-galactose-induced learning and memory impairment in mice[J]. *J China Pharm Univ*, 2025, 56(2): 207–215.

## Wogonin ameliorates A $\beta$ <sub>1-42</sub> and D-galactose-induced learning and memory impairment in mice

ZHANG Qilu<sup>1</sup>, NIE Ruizhe<sup>1</sup>, WEI Libin<sup>2,3</sup>, GUO Qinglong<sup>2,3</sup>, TANG Susu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; <sup>2</sup>Department of Physiology, School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; <sup>3</sup>Shandong Provincial Key Laboratory of Polymorphic Drugs, Shandong Yikang Pharmaceutical Co., Ltd., Tengzhou 277500, China

**Abstract** To investigate the effects of Wogonin (WO) on learning and memory impairment, A $\beta$ <sub>1-42</sub> was injected intracerebroventricularly to induced a mouse learning and memory impairment model, and D-galactose was injected intraperitoneally to induced a mouse acute aging model. Mice were administered WO (75, 150, or 300 mg/kg) by oral gavage for 28 consecutive days. Cognitive function was assessed using the Morris water maze (MWM), novel object recognition (NOR), and open field tests (OFT). In the A $\beta$ <sub>1-42</sub> model, WO treatment (150 and 300 mg/kg) significantly improved the recognition index in the NOR test, while the 150 mg/kg group showed increased target quadrant preference in the MWM test. No changes in the total distance traveled in OFT. In the D-

收稿日期 2024-09-13 \* 通信作者 Tel: 15905184382 E-mail: tang\_susu@126.com

基金项目 山东省中央引导地方科技发展资金项目 (YDZX2023082); 泰山产业领军人才工程; 枣庄英才集聚工程基金项目: 山东省枣庄英才计划 (2021 年, 产业创新类); 泰山产业创新领军人才; 山东省技术创新引导计划 (中央引导地方科技发展资金) 项目 (YDZX2023082)

galactose aging model, the 150 mg/kg WO group exhibited increased platform crossings in the MWM test, and all WO doses (75, 150, and 300 mg/kg) enhanced target quadrant preference, with no alterations in spontaneous movement. Western blot analysis revealed that WO significantly attenuated hippocampal apoptosis in both models. These findings suggest that WO ameliorates learning and memory impairment associated with Alzheimer's disease and aging.

**Key words** wogonin;  $A\beta_{1-42}$ ; D-galactose; memory impairment; apoptosis

This study was supported by Shandong Central Government Guiding Local Science and Technology Development Funds Program (YDZX2023082), Taishan Industrial Leadership Talent Program, Zaozhuang Talent Aggregation Project Fund: Shandong Zaozhuang Talent Program (2021, Industrial Innovation Category), Taishan Industrial Innovation Leading Talent, and Shandong Technological Innovation Guiding Program (Central Government Guiding Local Science and Technology Development Funds) (YDZX2023082)

汉黄芩素(wogonin, WO)是一种从清热解毒中药黄芩、半枝莲根中提取的黄酮类成分。研究发现汉黄芩素能够诱导线粒体介导的凋亡和细胞周期阻滞、抑制侵袭和转移、抗耐药性和抗炎,具有显著的防治癌症作用<sup>[1]</sup>;通过抑制TLR4介导的JAK/STAT/AIM2信号通路减轻糖尿病肾病损伤<sup>[2]</sup>;通过影响AKT-SREBP1-FASN信号通路诱导人前列腺癌细胞凋亡<sup>[3]</sup>。还有研究表明汉黄芩素具有抗氧化、抗炎作用,能有效地改善由缺血引发的过度氧化应激、炎症和血管功能障碍导致的组织稳态破坏、细胞死亡<sup>[4]</sup>。另有报道,汉黄芩素可减轻三甲基素诱导的大鼠海马神经元损伤和认知功能障碍,减轻胆碱能免疫反应性损伤,并提高海马BDNF、CREB蛋白及其编码的mRNA水平<sup>[5]</sup>;还可减轻红藻酸盐诱导的大鼠颞叶癫痫神经炎症反应,具有明显的神经保护作用<sup>[6]</sup>。然而,汉黄芩素是否对阿尔茨海默病和衰老相关的学习记忆损害具有改善作用尚不清楚,本研究分别建立小鼠阿尔茨海默病和衰老相关的学习记忆损害模型,探究汉黄芩素对小鼠学习记忆的影响。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

汉黄芩素(南京芩领医药科技有限公司);多奈哌齐片(浙江华海药业股份有限公司); $A\beta_{1-42}$ 、D-半乳糖(美国Sigma-Aldrich公司);二甲双胍片(悦康药业集团股份有限公司);异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司);脱脂奶粉(上海碧云天生物工程有限公司);Bcl-2抗体、Bax抗体(北京Bioworld生物科技有限公司);Cleaved caspase-3抗体(美国CST生物有限公司);羊抗兔二抗HRP(上海翌圣生物科技股份有限公司),其他试剂均为市售分析纯。

### 1.2 动物

ICR小鼠,SPF级,8周龄,体重22~24 g,雌雄各半,购自扬州大学比较医学中心,合格证号:[SCXK(苏)2022-0009]。实验动物饲养于12 h昼夜交替的环境中,室温维持在 $(24\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ,湿度 $(55\pm 5)\%$ ,动物可以自由饮水和摄食,实验开始前先适应性饲养1周。对动物的所有处理均遵循中国药科大学动物伦理委员会标准(中国药科大学动物伦理批准号:2024-10-014)。

### 1.3 仪器

电子分析天平(德国Sartorius公司);Morris水迷宫、新物体识别、旷场行为学检测系统(上海吉量软件科技有限公司);脑立体定位仪、70-4507微量注射泵(美国Harvard Apparatus公司);ZH-GSZ高速颅骨钻(淮北正华生物仪器设备有限公司);11012VMR小动物专用吸入麻醉机(美国Midmark公司);DYY-6C型电泳仪电源、DYCP-28D双板夹芯垂直槽、DYCP-40A型转移电泳槽(北京市六一仪器厂);Tanon 4200型化学发光成像分析系统(上海天能科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 建立 $A\beta_{1-42}$ 诱导的小鼠学习记忆损害模型

60只成年小鼠,按体重随机分为6组,每组10只,雌雄各半。适应性饲养1周。采用脑立体定位注射技术向正常组小鼠侧脑室注射无菌生理盐水( $2.5\ \mu\text{L}$ ),模型组、多奈哌齐组、低剂量汉黄芩素组、中剂量汉黄芩素组、高剂量汉黄芩素组侧脑室注射 $A\beta_{1-42}$ 溶液( $1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ,  $2.5\ \mu\text{L}$ )。造模后第3天开始给药。阳性药组小鼠灌胃给予1 mg/kg多奈哌齐,低剂量、中剂量和高剂量汉黄芩素组小鼠分别灌胃给予75、150和300 mg/kg汉黄芩素,正常对

照组和模型组小鼠灌胃给予等体积溶剂(0.1%吐温和 0.5%羧甲基纤维素钠混合溶液),每天 1 次,连续 28 d。

## 2.2 建立 D-半乳糖诱导的急性衰老小鼠学习记忆损害模型

48 只成年小鼠,按体重随机分为 6 组,每组 8 只,雌雄各半。适应性饲养 1 周。对除正常组外,其他各组小鼠每天腹腔注射 D-半乳糖溶液(120 mg/kg),连续注射 6 周。造模第 3 周开始给药。阳性药组小鼠灌胃给予 250 mg/kg 二甲双胍,低剂量、中剂量和高剂量汉黄芩素组小鼠分别灌胃给予 75、150 和 300 mg/kg 汉黄芩素,正常对照组和模型组小鼠灌胃给予等体积溶剂(0.1%吐温和 0.5%羧甲基纤维素钠混合溶液),每天 1 次,连续 28 d。

## 2.3 脑立体定位注射

根据本课题组先前报道的实验方法<sup>[7]</sup>,采用异氟烷吸入麻醉动物,将小鼠头部毛发剔除后,放置于定位框架上,碘伏消毒,随后用手术剪刀将小鼠头皮剪开大约 1 cm 小口,用颅骨钻在合适位置钻孔,脑立体定位注射  $A\beta_{1-42}$  溶液(1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 2.5  $\mu\text{L}$ ),用可吸收缝合线缝合头部皮肤。侧脑室注射位点,AP: -0.2 mm, ML:  $\pm 1.0$  mm, DV: -2.4 mm<sup>[8]</sup>。

## 2.4 旷场实验

旷场实验检测小鼠自发活动。旷场实验测试系统由 50 cm $\times$ 50 cm $\times$ 40 cm 的塑料箱和视频采集系统组成。软件自动划分中间区域和角落区域。测试开始时,将实验小鼠面向一壁轻轻放入测试箱中,自由活动 6 min,摄像系统自动记录小鼠移动总距离。

## 2.5 新物体识别实验

新物体识别实验检测小鼠工作记忆能力,分为适应期、学习期和测试期。适应期:将小鼠面壁放入 50 cm $\times$ 50 cm $\times$ 50 cm 的塑料箱中,让其自由探索 6 min 后放回鼠笼,并用 75%乙醇清理箱内,以减少小鼠残留的气味和排泄物。学习期:小鼠在适应期 24 h 后开始学习。将两个圆柱体(相同颜色、材质和大小)分别放置在离两侧箱壁 5 cm 处的位置。小鼠面壁放入箱中,其自由探索 6 min 后放回笼中,并用 75%乙醇清理箱内和物体。测试期:学习期 24 h 后将箱内其中一个圆柱体换成一个正方体(颜色、材质和大小完全不同于圆柱体)作为新物

体。小鼠面壁放入箱中,自动采集系统记录小鼠 6 min 内探索各物体时间,测试结束后将其放回笼中,并用 75%乙醇清理箱内和物体。测试结束后计算:识别指数=新物体探索时间/(新物体探索时间+旧物体探索时间) $\times$ 100%。

## 2.6 Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫实验检测小鼠空间学习记忆能力。水迷宫实验分为 3 个阶段:第一阶段(可见平台训练期),实验第 1~2 天进行,依次将小鼠从水池 I、II、III 和 IV 象限面壁放入水中,让其自由游泳,小鼠自入水至爬上站台(携带旗子,放置在第 IV 象限)所用时间为潜伏期,自动采集系统记录小鼠潜伏期;若小鼠游泳 90 s 仍未发现站台,则引导小鼠爬上站台并停留 30 s,潜伏期记为 90 s。第二阶段(隐藏平台训练期),实验第 3~5 天进行,移走站台旗帜,训练方法同可见平台训练。第三阶段(空间探索测试阶段),实验第 6 天进行,移除水池内部站台,将小鼠从 II 象限(与第 IV 象限成对角)面壁放入水池中,自动采集系统记录小鼠 90 s 的游泳活动情况,并使用 DigBehv 动物行为视频分析系统分析小鼠运动轨迹、第 IV 象限游泳时间及穿越原平台次数。

## 2.7 Western blot 实验检测小鼠海马脑区 Bcl-2、Bax、Cleaved caspase-3 蛋白表达

小鼠处死后,于冰上迅速取出脑组织。将脑组织放入脑模具中,用刀片将脑组织切成 1 mm 左右的薄片并放在体式显微镜下观察,用镊子取出海马,放入 2 mL 研磨管中。在研磨管中加入脑组织重量 10 倍的裂解液(裂解液-PMSF-磷酸酶抑制剂-蛋白酶抑制剂,100:1:1:1),在冷冻研磨仪中研磨 10 min。再 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min 后,12000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,弃沉淀。BCA 试剂盒定量蛋白浓度,加入上样缓冲液使最终蛋白浓度为 1.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。配制 12% 下层分离胶和 5% 上层浓缩胶。每个泳道上样 10  $\mu\text{L}$ ,80 V 电泳 20 min。随后 120 V 电泳 90 min。按照彩色预染蛋白 Marker 和目标分子量切胶,采用 300 mA 电流,转膜 50 min 至 PVDF 膜上。再将 PVDF 膜放置于 5% 脱脂奶粉中,室温孵育 90 min。TBST 稀释一抗 Bcl-2 (1:1000)、Bax (1:500)、Cleaved caspase-3 (1:1000),将条带置于一抗中 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。再置于 TBST 中洗 3 次 $\times$ 10 min, TBST 稀释二抗 (1:5000),并将条带置于二抗室温孵育 90 min。TBST 清洗 3 次 $\times$ 10 min 后,采用



化学发光显影液显影, 化学发光成像系统成像, 并用 Image J 软件分析。

## 2.8 统计学方法

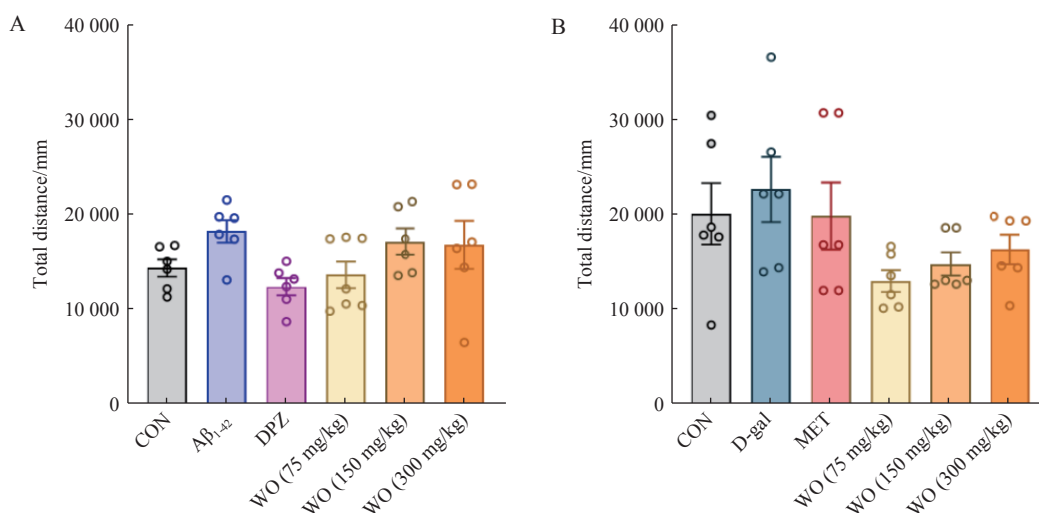
采用 GraphPad Prism 9 软件进行分析, 所有数据均用均值±标准误(mean±SEM)表示。水迷宫可见平台潜伏期及隐藏平台潜伏期采用双因素方差分析; 其余数据采用单因素方差分析。\* $P<0.05$  表示有统计学差异, \*\* $P<0.01$  表示有显著统计学差异,

\*\*\* $P<0.001$  表示有极显著统计学差异。

## 3 结果

### 3.1 汉黄芩素对小鼠自发活动的影响

如图 1 所示, 与正常组相比,  $A\beta_{1-42}$  和 D-半乳糖诱导的小鼠学习记忆损害模型组及各给药组在旷场实验中运动总距离无显著差异( $P>0.05$ ), 说明各组小鼠的自发活动无显著差异。



**Figure 1** Effect of wogonin (WO) on spontaneous activity in mice

A: Total distance in each group of  $A\beta_{1-42}$ -induced learning and memory impairment mice in open field test (mean±SEM,  $n=6-7$ ); B: Total distance in each group of D-galactose-induced acute aging mice in open field test (mean±SEM,  $n=6$ )

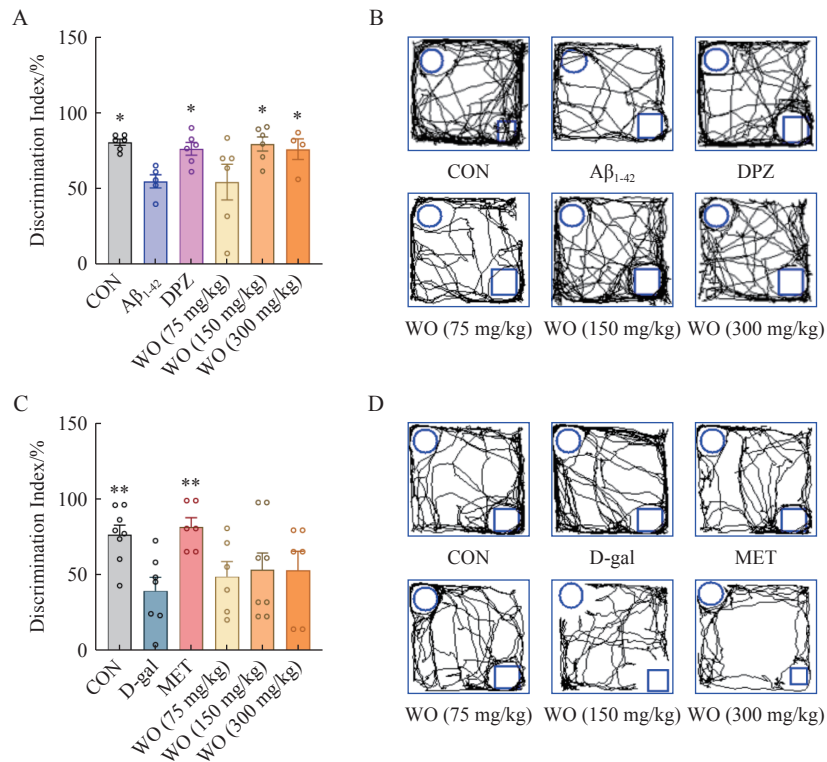
CON: Control; DPZ: Donepezil; MET: Metformin

### 3.2 汉黄芩素对小鼠工作记忆的影响

采用新物体识别实验检测小鼠的工作记忆。如图 2-A, 2-B 所示, 在  $A\beta_{1-42}$  诱导的小鼠学习记忆损害模型中, 与正常组相比, 模型组小鼠对新物体的识别指数显著降低( $P<0.05$ ); 与模型组相比, 多奈哌齐组、中剂量和高剂量汉黄芩素组小鼠对新物体识别指数显著增加( $P<0.05$ ); 与阳性药多奈哌齐组相比, 中剂量和高剂量汉黄芩素组小鼠对新物体的识别指数无显著性差异( $P>0.05$ )。如图 2-C, 2-D 所示, 在 D-半乳糖诱导的小鼠急性衰老模型中, 与正常组相比, 模型组小鼠对新物体识别指数显著降低( $P<0.01$ ); 与模型组相比, 各剂量汉黄芩素组小鼠对新物体识别指数均无显著性差异( $P>0.05$ )。这些结果提示, 汉黄芩素可改善  $A\beta_{1-42}$  诱导的小鼠工作记忆损害。

### 3.3 汉黄芩素对小鼠空间学习记忆的影响

采用 Morris 水迷宫实验检测小鼠空间学习记忆能力。结果发现, 在  $A\beta_{1-42}$  诱导的小鼠学习记忆损害模型中, 可见平台训练期间, 各组小鼠潜伏期无显著差异(图 3-A,  $P>0.05$ ), 说明小鼠视力、对目标的识别能力和运动能力无显著差异。在隐藏平台训练第 2~3 天, 与正常组相比, 模型组小鼠潜伏期增加; 与模型组相比, 多奈哌齐组和各剂量汉黄芩素组小鼠潜伏期减少, 但均无统计学差异(图 3-B,  $P>0.05$ )。在空间探索测试期, 如图 3-C, 3-D, 与正常组相比, 模型组小鼠在目标象限停留时间百分比和穿越原平台次数均显著减少( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 与模型组相比, 多奈哌齐组和中剂量汉黄芩素组小鼠在目标象限停留时间百分比显著增加( $P<0.001$ ), 并且与阳性药多奈哌齐组相比, 中剂量汉黄芩素组小鼠在目标象限停留时间百分比无显著性差异( $P>0.05$ )。



**Figure 2** Effect of wogonin on working memory in  $A\beta_{1-42}$ -induced learning and memory impairment mice (A, B) and D-galactose-induced acute aging mice (C, D). A: Discrimination index in new object recognition (NOR) test (mean $\pm$ SEM,  $n=4-6$ ); B: Representative tracks in NOR test; C: Discrimination index in NOR test (mean $\pm$ SEM,  $n=6-8$ ); D: Representative tracks in NOR test

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs  $A\beta_{1-42}$  or D-gal group

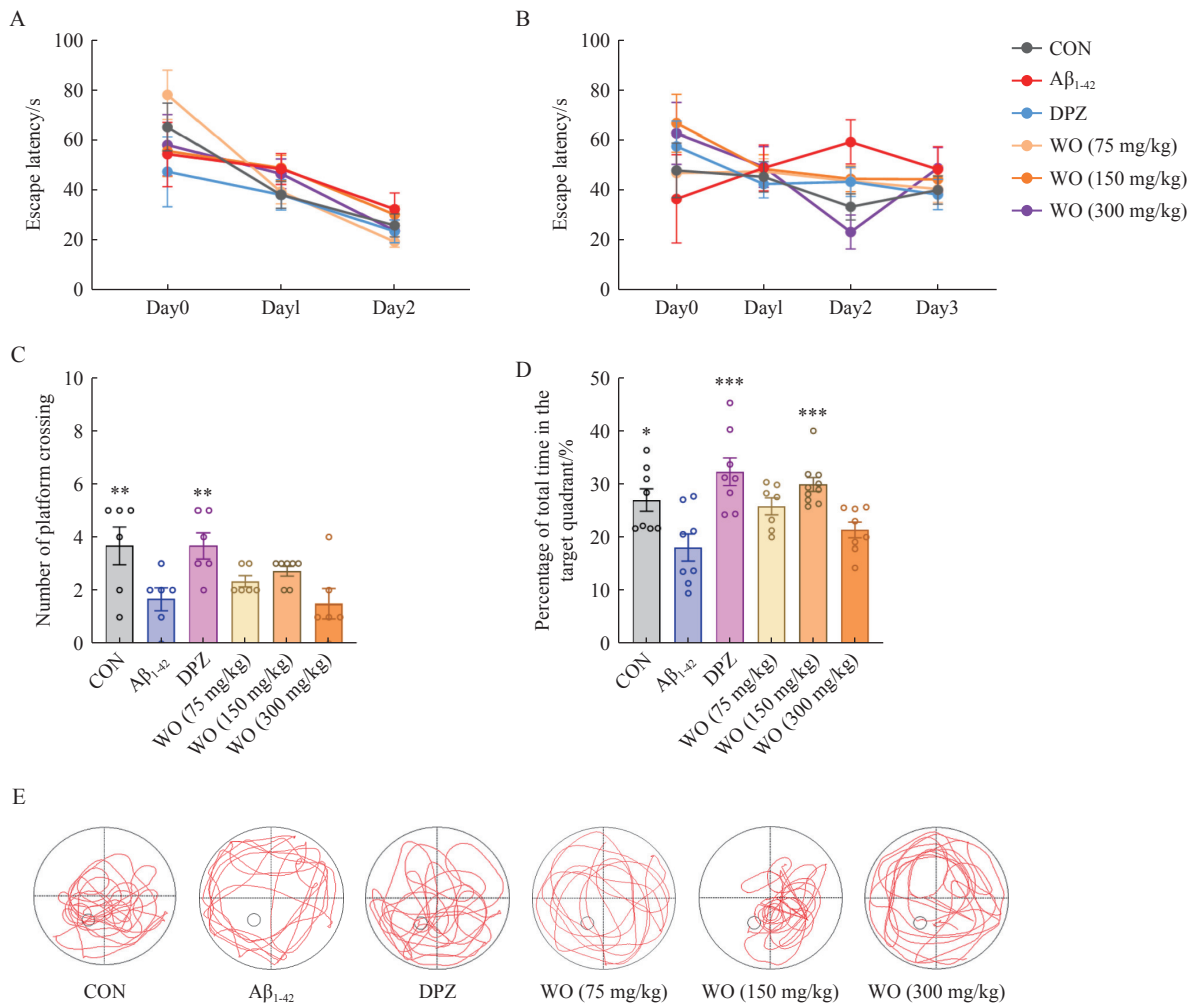
在 D-半乳糖诱导的小鼠急性衰老模型中, 可见平台训练期间, 各组小鼠潜伏期无显著差异 (图 4-A,  $P>0.05$ ), 说明小鼠视力、对目标的识别能力和运动能力无显著差异。在隐藏平台训练期间, 与正常组相比, 模型组小鼠潜伏期增加; 与模型组相比, 二甲双胍组潜伏期减少, 但均无统计学差异 (图 4-B,  $P>0.05$ )。在空间探索测试期, 如图 4-C, 4-D, 与正常组相比, 模型组小鼠在目标象限停留时间百分比和穿越原平台次数均显著降低 ( $P<0.01$  或  $P<0.001$ ); 与模型组相比, 二甲双胍组和中剂量汉黄芩素组小鼠穿越原平台次数显著增加 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ), 并且与阳性药二甲双胍组相比, 中剂量汉黄芩素组小鼠穿越原平台次数无显著性差异 ( $P>0.05$ ); 此外, 与模型组相比, 二甲双胍组和各剂量汉黄芩素组小鼠在目标象限停留时间百分比显著增加 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$  或  $P<0.001$ ), 并且与阳性药二甲双胍组相比, 各剂量汉黄芩素组小鼠在目标象限停留时间百分比无显著性差异 ( $P>0.05$ )。这

些结果提示, 汉黄芩素可改善  $A\beta_{1-42}$  和 D-半乳糖诱导的小鼠空间学习记忆损害。

### 3.4 汉黄芩素对小鼠海马脑区神经细胞凋亡的影响

采用 Western blot 实验检测小鼠海马脑区凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 Cleaved caspase-3 的表达。结果发现, 如图 5-A~5-D 所示, 在  $A\beta_{1-42}$  诱导的小鼠学习记忆损害模型中, 与正常组相比, 模型组小鼠海马脑区 Bcl-2 蛋白表达显著减少, Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白表达显著增加 ( $P<0.001$ ); 与模型组相比, 多奈哌齐组小鼠海马脑区 Bcl-2 蛋白表达显著增加, Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白表达显著减少 ( $P<0.001$ ); 与模型组相比, 中剂量汉黄芩素组小鼠海马脑区 Bcl-2 蛋白表达显著增加 ( $P<0.001$ ), 低剂量和中剂量汉黄芩素组小鼠海马脑区 Bax 蛋白表达显著降低 ( $P<0.01$  或  $P<0.001$ ), 各剂量汉黄芩素组小鼠海马脑区 Cleaved caspase-3 蛋白表达显著降低 ( $P<0.001$ ); 并且与阳性药多奈哌齐组相比均无显著差异 ( $P>0.05$ )。

在 D-半乳糖诱导的小鼠急性衰老模型中,



**Figure 3** Effect of wogonin on spatial learning and memory in  $A\beta_{1-42}$ -induced learning and memory impairment mice

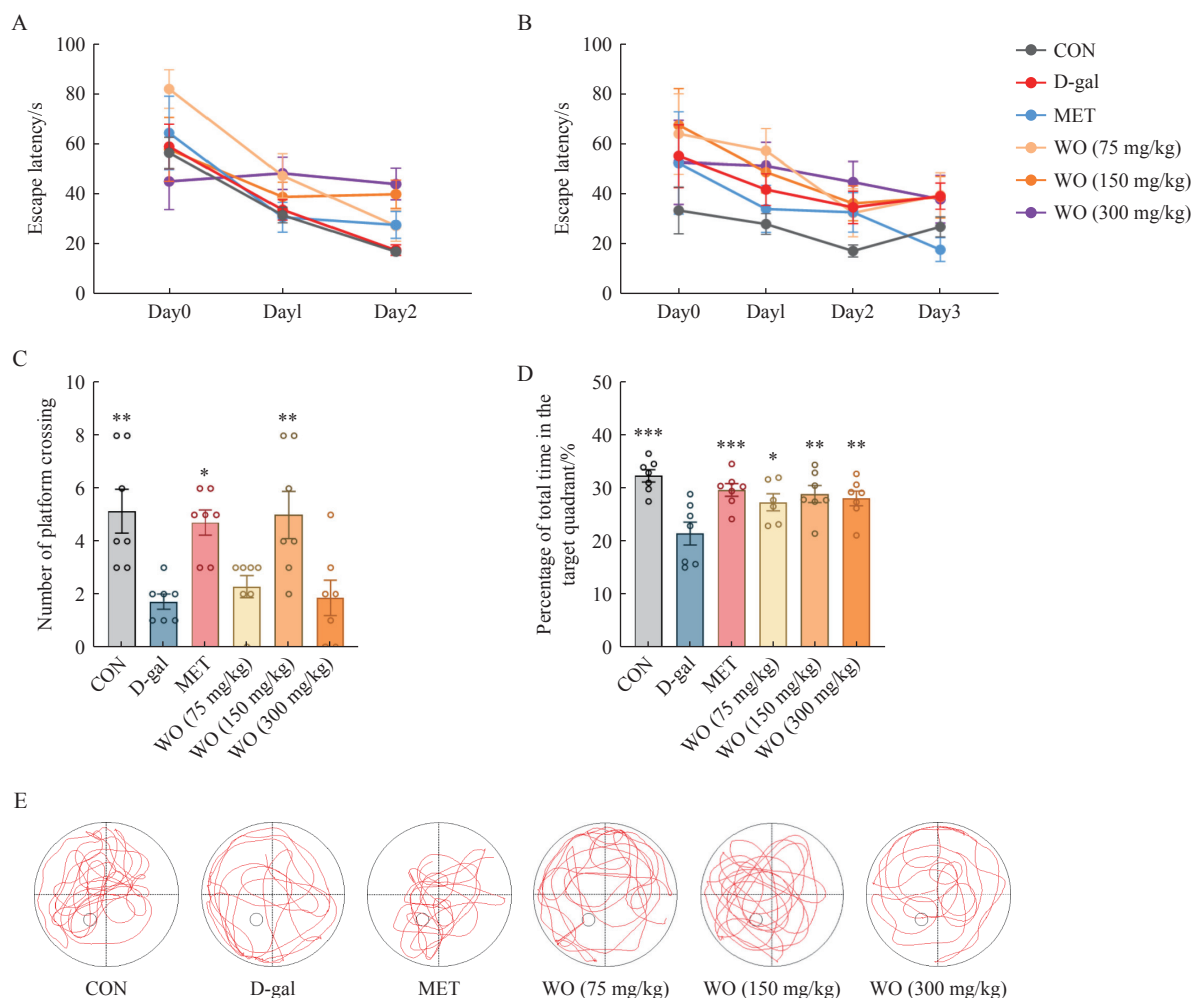
A: Escape latency to the visible platform of Morris water maze (MWM) test; B: Escape latency to the hidden platform of MWM test; C: Number of platform location crossings during the probe trial (mean  $\pm$  SEM,  $n=5-7$ ); D: Percentage of time spent in the target quadrant during the probe trial (mean  $\pm$  SEM,  $n=7-10$ ); E: Representative swimming path during the probe trial

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs  $A\beta_{1-42}$  group

如图 5-E~5-H 所示, 与正常组相比, 模型组小鼠海马脑区 Bcl-2 蛋白表达显著减少, Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白表达显著增加 ( $P<0.01$  或  $P<0.001$ ); 与模型组相比, 二甲双胍组小鼠海马脑区 Bcl-2 蛋白表达显著增加, Bax 和 Cleaved caspase-3 蛋白表达减少 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$  或  $P<0.001$ ); 与模型组相比, 中剂量汉黄芩素组 Bcl-2 蛋白表达显著增加 ( $P<0.001$ ), 低剂量和中剂量汉黄芩素组 Bax 蛋白表达显著降低 ( $P<0.05$  或  $P<0.001$ ), 中剂量汉黄芩素组 Cleaved caspase-3 蛋白表达显著降低 ( $P<0.01$ ); 并且与阳性药多奈哌齐组相比均无显著差异 ( $P>0.05$ )。这些结果提示, 汉黄芩素可改善  $A\beta_{1-42}$  和 D-半乳糖诱导的小鼠海马脑区神经细胞凋亡。

#### 4 讨论

本实验采用侧脑室注射  $A\beta_{1-42}$  建立的小鼠学习记忆损害模型与腹腔注射 D-半乳糖诱导的小鼠急性衰老模型, 研究汉黄芩素对小鼠学习记忆的影响。现常用的模拟动物学习记忆损害的模型主要是化学诱导和转基因动物模型, 转基因动物模型动物繁育周期长、成本高, 而化学诱导模型中, 侧脑室注射  $A\beta_{1-42}$  和腹腔注射 D-半乳糖具有实验成本低、实验结果稳定、成模时间短等优点, 被广泛使用。 $\beta$  类淀粉样蛋白 ( $\beta$  amyloid protein,  $A\beta$ ) 是脑组织内的正常代谢产物。淀粉样前体蛋白经  $\beta$  分泌酶和  $\gamma$  分泌酶水解形成的  $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$  和  $A\beta_{1-43}$  是  $A\beta$  主要的 3 种类型。其中  $A\beta_{1-42}$  更容易聚集且



**Figure 4** Effect of wogonin on spatial learning and memory in D-galactose-induced acute aging mice.

A: Escape latency to the visible platform of MWM test; B: Escape latency to the hidden platform of MWM test; C: Number of platform location crossings during the probe trial (mean±SEM,  $n=7$ ); D: Percentage of time spent in the target quadrant during the probe trial (mean±SEM,  $n=6-7$ ). E: Representative swimming path during the probe trial

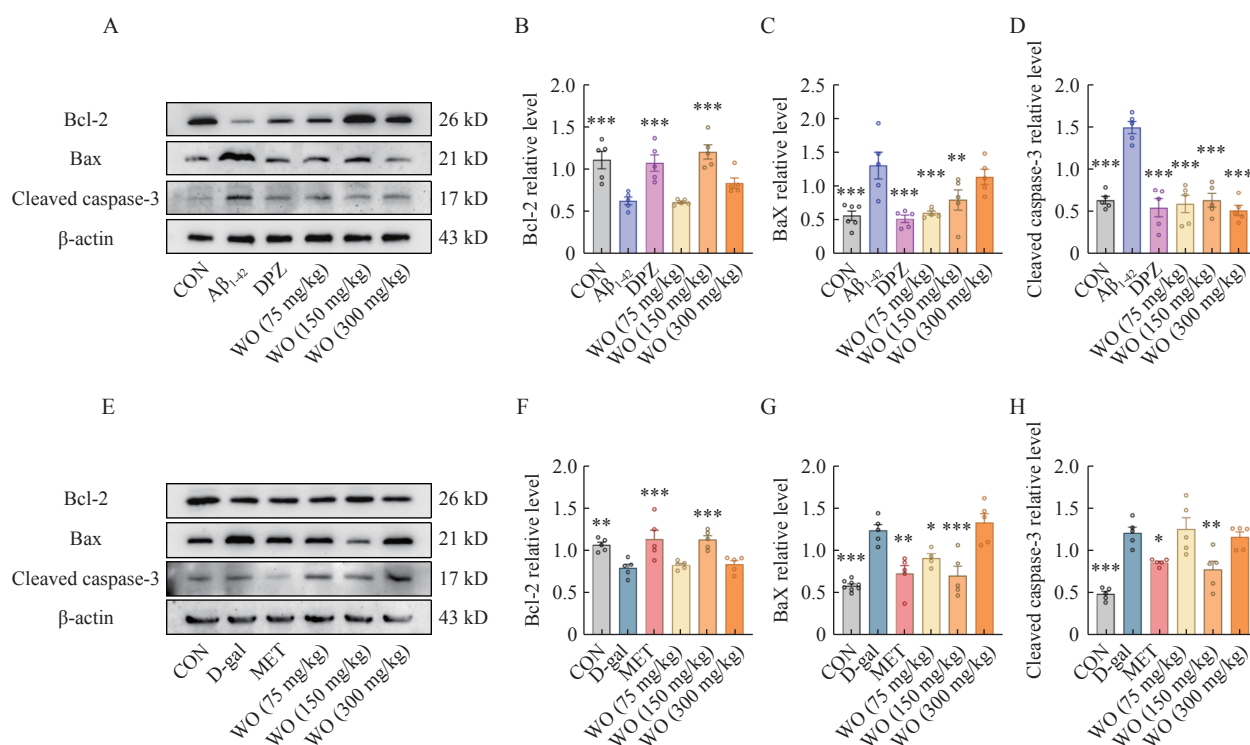
\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs D-gal group

毒性更强<sup>[9-10]</sup>。研究表明,侧脑室内注射  $A\beta_{1-42}$  可以促进脑组织内胶质细胞的激活,诱发神经炎症反应;可以损害神经细胞线粒体功能,引起神经细胞能量代谢障碍,功能代谢异常导致细胞内生成过多的氧自由基,从而导致神经细胞的氧化应激损害;还可以激活细胞凋亡途径,介导细胞的凋亡;甚至还可以损害胆碱能神经元,引起乙酰胆碱系统病变<sup>[11-13]</sup>。采用侧脑室内注射  $A\beta_{1-42}$  可使实验动物出现学习记忆障碍,神经系统功能紊乱,能较好模拟阿尔茨海默病病理特征<sup>[14]</sup>。大剂量 D-半乳糖腹腔注射是最常用的制备急性衰老动物模型的方法, D-半乳糖可以诱导晚期糖基化产物和活性氧物质的产生,升高的晚期糖基化终产物可以加速衰老。有

证据表明大剂量 D-半乳糖腹腔注射可模拟 16~24 个月龄的老化动物<sup>[15-17]</sup>。D-半乳糖在正常情况下可经肝脏代谢成葡萄糖,但在较高浓度时, D-半乳糖的积累不但会导致细胞渗透压变化,细胞肿胀,膜脂损伤,脑神经退化,而且还可以触发活性氧的生成,活性氧自由基再与氨基酸和蛋白质反应形成高级糖基化终产物<sup>[18-19]</sup>。基于此,选择这两种模型以模拟阿尔茨海默病和衰老相关的学习记忆损害。

采用旷场实验检测小鼠的自发活动水平,结果发现,各组小鼠的运动距离无显著性差异,说明汉黄芩素不影响小鼠的自发活动水平。选用新物体识别实验<sup>[20]</sup>和 Morris 水迷宫实验<sup>[21]</sup>来检测小鼠的学习记忆功能。小鼠进行新物体识别实验以评价





**Figure 5** Effect of wogonin on apoptosis in  $A\beta_{1-42}$ -induced learning memory impairment mice (A-D) and D-galactose-induced acute aging mice (E-H)  
A: Representative bands of Bcl-2, Bax and Cleaved caspase-3 in the hippocampus in  $A\beta_{1-42}$  model; B-D: Quantification of Bcl-2, Bax and Cleaved caspase-3 protein levels in  $A\beta_{1-42}$  model(mean $\pm$ SEM,  $n=5$ ); E: Representative bands of Bcl-2, Bax and cleaved caspase-3 in the hippocampus in D-galactose model; F-H: Quantification of Bcl-2, Bax and cleaved caspase-3 protein levels in D-galactose model(mean $\pm$ SEM,  $n=5$ )

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs  $A\beta_{1-42}$  or D-gal group

其工作记忆能力。实验结果显示,在  $A\beta_{1-42}$  诱导的学习记忆损害模型中,给予 150 和 300 mg/kg 汉黄芩素显著改善模型小鼠对新物体识别能力的缺陷;而在 D-半乳糖模型中给予汉黄芩素对模型小鼠无明显影响。小鼠进行 Morris 水迷宫实验以评价其空间学习记忆能力。实验结果显示,  $A\beta_{1-42}$  模型小鼠和 D-半乳糖模型小鼠穿越平台次数和在目标象限停留时间百分比与对照组相比都明显下降;在  $A\beta_{1-42}$  模型中,150 mg/kg 汉黄芩素组小鼠在 Morris 水迷宫实验测试期目标象限停留时间百分比显著增加;在 D-半乳糖模型中,150 mg/kg 汉黄芩素组小鼠在 Morris 水迷宫实验测试期穿越平台次数显著增加,75、150 和 300 mg/kg 汉黄芩素组小鼠在 Morris 水迷宫实验测试期目标象限停留时间百分比显著增加。以上这些实验结果提示,150 mg/kg 汉黄芩素能够较好地改善阿尔茨海默病和衰老相关的学习记忆损害,而 75 和 300 mg/kg 汉黄芩素的改善作用较弱。

已有报道显示,汉黄芩素在体内和体外均有

抗炎作用,能抑制脂多糖诱导的屏障破坏、细胞黏附分子的表达以及单核细胞向内皮细胞的黏附/跨内皮迁移,在体内抑制脂多糖诱导的高渗透性和白细胞迁移<sup>[22]</sup>。还有研究表明,汉黄芩素能够降低血管平滑肌细胞中的 ROS 水平以抑制氧化应激<sup>[23]</sup>,抑制 STAT3 信号通路激活,减少神经元炎症和细胞凋亡<sup>[24]</sup>。本研究发现,汉黄芩素可改善  $A\beta_{1-42}$  模型小鼠和 D-半乳糖模型小鼠海马脑区神经细胞凋亡。这提示,汉黄芩素可能通过抑制神经细胞凋亡改善小鼠学习记忆。此外,与行为学结果一致,150 mg/kg 汉黄芩素对  $A\beta_{1-42}$  模型小鼠和 D-半乳糖模型小鼠海马脑区神经细胞凋亡有较好的改善作用,而 75 mg/kg 和 300 mg/kg 汉黄芩素的改善作用较弱,这提示高剂量汉黄芩素可能存在毒性作用。在今后的研究中,将更深入地探究汉黄芩素改善阿尔茨海默病和衰老相关学习记忆损害的作用和机制。

## References

- [1] Kong ZH, Shen QL, Jiang J, *et al.* Wogonin improves function-



- al neuroprotection for acute cerebral ischemia in rats by promoting angiogenesis via TGF- $\beta$ 1[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(22): 639.
- [2] Liu YF, Zhang MB, Zeng L, *et al*. Wogonin upregulates SOCS3 to alleviate the injury in diabetic nephropathy by inhibiting TLR4-mediated JAK/STAT/AIM2 signaling pathway[J]. *Mol Med*, 2024, 30(1): 78.
- [3] Sun YN, Guo WJ, Guo YJ, *et al*. Apoptosis induction in human prostate cancer cells related to the fatty acid metabolism by wogonin-mediated regulation of the AKT-SREBP1-FASN signaling network[J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 169: 113450.
- [4] Pan L, Cho KS, Yi I, *et al*. Baicalein, baicalin, and wogonin: protective effects against ischemia-induced neurodegeneration in the brain and retina[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8377362.
- [5] Lee B, Sur B, Cho SG, *et al*. Wogonin attenuates hippocampal neuronal loss and cognitive dysfunction in trimethyltin-intoxicated rats[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2016, 24(3): 328-337.
- [6] Guo XY, Wang JY, Wang NN, *et al*. Wogonin preventive impact on hippocampal neurodegeneration, inflammation and cognitive defects in temporal lobe epilepsy[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2020, 27(8): 2149-2156.
- [7] Huang WG, Jiang WK, Shao YW, *et al*. Reward effect of flubromazolam and its underlying neural circuit mechanism[J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2024, 55(3): 390-396.
- [8] Ali T, Kim MO. Melatonin ameliorates amyloid beta-induced memory deficits, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration via PI<sub>3</sub>/Akt/GSk3 $\beta$  pathway in the mouse hippocampus[J]. *J Pineal Res*, 2015, 59(1): 47-59.
- [9] Monteiro KLC, Dos Santos Alcântara MG, Freire NML, *et al*. BACE-1 inhibitors targeting Alzheimer's disease[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2023, 20(3): 131-148.
- [10] Johnson ECB, Bian SJ, Haque RU, *et al*. Cerebrospinal fluid proteomics define the natural history of autosomal dominant Alzheimer's disease[J]. *Nat Med*, 2023, 29(8): 1979-1988.
- [11] Fan M, Liu S, Sun HM, *et al*. Bilateral intracerebroventricular injection of streptozotocin induces AD-like behavioral impairments and neuropathological features in mice: Involved with the fundamental role of neuroinflammation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113375.
- [12] Li YM, Zhang J, Wan JL, *et al*. Melatonin regulates A $\beta$  production/clearance balance and A $\beta$  neurotoxicity: a potential therapeutic molecule for Alzheimer's disease[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110887.
- [13] Thal DR, Rüb U, Orantes M, *et al*. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD[J]. *Neurology*, 2002, 58(12): 1791-1800.
- [14] Mao X, Liao ZZ, Guo L, *et al*. Schisandrin C ameliorates learning and memory deficits by A $\beta$ <sub>1-42</sub>-induced oxidative stress and neurotoxicity in mice[J]. *Phytother Res*, 2015, 29(9): 1373-1380.
- [15] Burns EA, Leventhal EA. Aging, immunity, and cancer[J]. *Cancer Control*, 2000, 7(6): 513-522.
- [16] Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus[J]. *Science*, 1996, 273(5271): 70-74.
- [17] Lu J, Wu DM, Zheng YL, *et al*. Ursolic acid attenuates D-galactose-induced inflammatory response in mouse prefrontal cortex through inhibiting AGEs/RAGE/NF- $\kappa$ B pathway activation[J]. *Cereb Cortex*, 2010, 20(11): 2540-2548.
- [18] Wu DM, Lu J, Zheng YL, *et al*. Purple sweet potato color repairs d-galactose-induced spatial learning and memory impairment by regulating the expression of synaptic proteins[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2008, 90(1): 19-27.
- [19] Pertynska-Marczewska M, Diamanti-Kandarakis E. Aging ovary and the role for advanced glycation end products[J]. *Menopause*, 2017, 24(3): 345-351.
- [20] Aisa B, Tordera R, Lasheras B, *et al*. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2007, 32(3): 256-266.
- [21] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. *J Neurosci Meth*, 1984, 11(1): 47-60.
- [22] Lee W, Ku SK, Bae JS. Anti-inflammatory effects of Baicalin, Baicalein, and Wogonin *in vitro* and *in vivo*[J]. *Inflammation*, 2015, 38(1): 110-125.
- [23] Lu LH, Li YN, Dong Q, *et al*. Wogonin inhibits oxidative stress and vascular calcification via modulation of heme oxygenase-1[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 958: 176070.
- [24] Shao WB, Zhang CX, Li K, *et al*. Wogonin inhibits inflammation and apoptosis through STAT3 signal pathway to promote the recovery of spinal cord injury[J]. *Brain Res*, 2022, 1782: 147843.