

· 论 著 ·

参附注射液对 β 淀粉样蛋白所致阿尔茨海默病大鼠 认知行为和脑组织氧化应激的影响

李桂琼, 柯大智

(重庆医科大学附属第二医院老年病科 400010)

摘要:目的 观察参附注射液(SF)对 β 淀粉样蛋白(amyloid beta, A β)所致阿尔茨海默病大鼠认知行为和脑组织氧化应激的影响,探讨 SF 对阿尔茨海默病的可能治疗作用及其机制。方法 30 只健康 SD 大鼠,经过水迷宫训练后随机分为 3 个组(10 只/组)。正常对照组:侧脑室注入蒸馏水(distilled water, DW)5 μ L; 模型对照组:侧脑室注入 A β 5 μ L; A β +SF 组:侧脑室注入 A β 5 μ L,腹腔注射 SF (10mL/kg, 每日 1 次)。正常对照组和模型对照组腹腔注射等量生理盐水(NS),连续 14d,每日 1 次。2 周后观察各组大鼠水迷宫潜伏期值及海马、皮质区超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的活力以及丙二醛(MDA)的表达水平。结果 A β +SF 组大鼠水迷宫潜伏期明显缩短,与模型对照组比较海马及皮质 SOD、GSH-PX 活力明显升高($P < 0.05$),MDA 水平明显降低($P < 0.05$)。结论 SF 能明显增加脑组织中 SOD 和 GSH-PX 的活力,减少脑组织 MDA 蓄积,从而改善阿尔茨海默病大鼠认知行为。

关键词:阿尔茨海默病; β 淀粉样蛋白; 参附注射液; 认知行为; 氧化应激

中图分类号: R365.749

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)02-0156-03

Effect of Shenfu Injection on cognitive behaviour and oxidative stress in β -amyloid protein-induced Alzheimer disease rats model

LI Gui-qiong, KE Da-zhi

(Department of Geriatrics, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Shenfu Injection(SF) on cognitive behaviour and oxyradicals in hippocampal and cortical regions of β -amyloid(A β) protein-induced Alzheimer disease rats model and to investigate the mechanism of Shenfu Injection for Alzheimer disease. **Methods** Thirty healthy SD rats was randomly separated into 3 groups(10/group) after training in water morris water maze. In blank control group, 5 μ L of distilled water(DW) was injected into each rat via lateral ventricle. 5 μ L of A β was injected intralateroventricularly into each rat in model control group and A β + SF group. SF(10 mg/kg) was injected intraperitoneally into each rat in A β + SF group. Equal volume of normal saline was injected intraperitoneally into each rat in A β group and blank group. The administration lasted for 14d with once a day. Latent period value and expression levels of SOD, GSH-PX and MDA in hippocampal and cortical regions of the rats were observed at 2 weeks after the injections. **Results** The latent period in A β + SF group was shortened significantly. The expression levels of SOD, GSH-PX in A β + SF group were higher than those in the model group($P < 0.05$). Meanwhile, the level of MDA in A β + SF group decreased significantly($P < 0.05$). **Conclusion** SF could alleviate A β -induced oxidative reaction by enhancing SOD and GSH-PX activities and decrease MDA accumulation in brain tissue, which might be responsible for the behavioral improvement of Alzheimer disease rats.

Key words: Alzheimer disease; β -amyloid protein; shenfu injection; cognitive behavior; oxidative stress

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一类以进行性认知障碍和记忆力损伤为主要临床表现的中枢神经系统退行性病变,主要病理改变包括皮质神经元脱失、脑组织内老年斑和神经元内纤维缠结形成。随着人口老龄化,该病已成为威胁老年人生活质量的主要疾病之一,且发病率呈逐年上升趋势。AD 的病因尚未阐明,仍然没有特效的治疗药物。

现有的研究表明,脑组织的氧化应激反应参与了 AD 的发生和发展^[1-4]。参附注射液是红参、黑附片提取物的制剂,能增强心肌收缩力、增加心输出量(CO)、舒张冠状动脉及增加脑血流量。因此,临床上将 SF 作为治疗心力衰竭、休克、心肌梗死及肿瘤放疗、化疗的辅助用药,均取得了良好的疗效。同时,研究发现,参附注射液中的某些有效成分可以减轻脑组织的氧化应激,从而抑制神经元的损伤^[5-6]。基于此,本研究采用 β 淀粉样蛋白(A β)侧脑室注射,观察其对 AD 大鼠认知行为及脑组织氧化应激的影响,探讨其对 AD 的疗效及其可能的作用机制,为 SF 临床治疗 AD 提供一定的实验依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD 大鼠 30 只(第三军医大学实验动物中心提供,SPF 级),雌雄各半,体重(250 \pm 38)g,分笼饲养(10 只/笼),自由摄食水。适应性喂养 1 周后,然后行水迷宫训练,训练动物学会迷宫为止。

1.1.2 药物与试剂 参附注射液(雅安三九药业有限公司生产,国药准字 Z20043116);A β (Sigma 公司生产)以蒸馏水溶解后保存于 -20 $^{\circ}$ C,避免反复冻融。临用前配成浓度为 2 μ g/ μ L。SOD、GSH-PX、MDA 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。具体检测方法: SOD 活力测定采用 NBT 法,其中每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个活力单位; GSH-PX 活力测定采用 DTNB 法; MDA 含量采用硫代巴比妥酸法检测。

1.1.3 主要仪器 RD1101-M 型 Morris 水迷宫(上海移数信息科技有限公司生产); MP8000 系列脑立体定位仪(深圳市瑞

沃德科技有限公司生产);752 型紫外可见分光光度计(南京第四分析仪器有限公司生产);3-18K 型高速低温冷冻离心机(Sigma 公司生产,Germany)。

1.2 水迷宫训练 水迷宫测试的原理:在定位航行试验中,AD 大鼠潜伏期延长,单位时间内跨越原平台次数减少,表明其空间记忆力受损。以直径 1.3m,高 50cm,水深 30cm,水温(20±2)℃的水迷宫东、西、南、北 4 点为标记,将水迷宫分为 4 个象限。在东南象限正中放置一个透明平台,高约 35cm,将其位置固定。以正西方向标记点为起步区,手提大鼠尾部,从起步区将大鼠放入迷宫中,训练中每次大鼠游上平台后,让其在平台上休息 60s 以强化记忆。以连续 4 次大鼠在 60s 内游上平台作为大鼠学会迷宫的标准,给药 2 周后记录大鼠在水迷宫中潜伏期值。

1.3 分组及给药 AD 大鼠模型的建立参见张文珺等^[7]实验方法,具体如下:实验大鼠 20% 的乌拉坦(1.0g/kg)腹腔注射麻醉大鼠,麻醉后固定于脑立体定位仪上。颅顶正中矢状切开,行立体定位(前囟后 3.5mm,中线旁开 2.2mm,颅骨表面下 3.1mm)。造模:正常对照组:用微量进样器吸取 DW 5μL,缓慢注入侧脑室。Aβ 组和 Aβ+SF 组:微量进样器吸取 Aβ 5μL,缓慢注入侧脑室。注射结束后消毒局部注射部位皮肤,缝合皮肤,保温促其苏醒,正常喂养。Aβ+SF 组 SF 腹腔注射,采用 10mL/kg 作为使用剂量,每日 1 次。正常对照组和 Aβ 组用等量生理盐水(NS)替代,连续 14d,每日 1 次。术后给药 2 周,再次进行水迷宫测试,记录各组大鼠从起步区入水迷宫后到游上平台的时间,即为潜伏期。

1.4 组织取材及氧化应激指标测定 待给药 2 周水迷宫测试后 2h,断颈处死大鼠,迅速取脑组织分离出海马和皮质,使用玻璃匀浆器在冰浴中制成 10% 的组织匀浆。而后将组织匀浆液以 3 000r/min 离心 10min,取上清液按试剂盒说明处理,752 可见分光光度计比色法测定 SOD、GSH-PX 活力以及 MDA 的含量。

1.5 统计学方法 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析行统计学处理,采用 SPSS 10.0 软件进行全部数据统计, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物一般情况 观察动物精神、意识、行为、进食、进水等情况。造模前各组动物均反应良好。造模后,起初兴奋不安,随后出现反应迟钝、行动缓慢、嗜卧、饮食及饮水减少等。模型组还存在体重减轻、毛发干枯等现象。给予 SF 后,上述症状均有不同程度改善。

2.2 水迷宫检测大鼠行为学改变 相对于正常对照组(水迷宫潜伏期值:5.923±1.842),两周后模型组(Aβ 组:24.368±5.759;Aβ+SF 组:20.311±3.236)大鼠水迷宫潜伏期明显延长,表明 Aβ 所致 AD 模型建模成功;相对于模型对照组,Aβ+SF 注射组可明显改善大鼠记忆力,缩短大鼠水迷宫潜伏期,且与模型组存在着差异,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠皮质区相关自由基活力与水平 相对于模型对照组,SF 可明显升高大鼠皮质匀浆中 SOD、GSH-PX 活力($P < 0.05$),降低 MDA 在皮质中蓄积量($P < 0.05$)。表明 SF 能明显增加大鼠皮质中 SOD、GSH-PX 的活力、减少 MDA 蓄积,从而减轻 Aβ 所致的氧化应激反应。见表 1。

2.4 各组大鼠海马区相关氧自由基活力与水平 相对于模型对照组,SF 同样可有效升高大鼠海马匀浆中 SOD、GSH-PX

活力($P < 0.05$),降低 MDA 在海马区中蓄积量($P < 0.05$)。表明 SF 同样能显著增加大鼠海马 SOD、GSH-PX 的活力、减少 MDA 的蓄积。见表 2。

表 1 各组大鼠皮质 SOD、GSH-PX 活力及 MDA 含量($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	n	SOD 活力 (NU/mg)	GSH-PX 活力 (NU/mg)	MDA 含量 (nmol/mg)
NS 组	10	55.386±13.741	20.432±5.266	2.810±0.803
Aβ 组	10	16.543±4.427**	11.975±3.101**	4.833±1.008*
Aβ+SF 组	10	21.039±5.101**#	15.305±4.624*#	3.729±0.896*#

与 NS 组比较,*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$;与 Aβ 组比较,#: $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠海马 SOD、GSH-PX 活力及 MDA 含量($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	n	SOD 活力 (NU/mg)	GSH-PX 活力 (NU/mg)	MDA 含量 (nmol/mg)
NS 组	10	33.461±10.089	18.665±4.378	2.039±0.571
Aβ 组	10	23.227±5.143**	10.994±3.585**	4.442±0.992*
Aβ+SF 组	10	28.254±6.793*#	13.305±4.067*#	3.218±0.835*#

与 NS 组比较,*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$;与 Aβ 组比较,#: $P < 0.05$ 。

3 讨 论

大量的研究证实,Aβ 因其神经细胞毒性及在脑组织中的聚集,在 AD 的发病中占有十分重要的作用^[8-11]。Korshunova 等^[12]研究发现,注射 Aβ 蛋白可导致记忆力损伤。在 Aβ 寡聚体的研究中,Watanabe 等^[13-14]发现,AD 时 Aβ 寡聚体合并脑缺血可引起非凋亡性记忆力损伤,而该损伤与乙酰胆碱释放减少有关。有报道指出,在 AD 发生、发展过程中 Aβ 与氧化应激关系密切^[15-17]。氧化应激反应可以激活 Aβ 前体蛋白 γ-分泌酶和 β-分泌酶的正反馈调节,从而促进 Aβ 蛋白的合成^[18]。而 Aβ 蛋白可通过氧化应激的诱导而引起钙调磷酸酶(依赖于钙调蛋白的丝氨酸-苏氨酸磷酸酶)的下调^[16]。氧化应激和 Aβ 蛋白共同作用可导致大鼠神经元死亡、淀粉样沉积、黑质和记忆力的损伤^[17]。同时,对于 AD 发病机制的研究,人们普遍认为脑内慢性炎症可能是其重要病理特征之一,从而提出了 AD 的相关炎症机制。

参附注射液的主要活力成分包括人参皂苷和乌头生物碱类,具有直接清除自由基和过氧化物,提高组织细胞的耐低氧和抗应激能力,可有效减轻脑缺血时的组织细胞损伤和再灌注损伤,同时降低血液黏度,减少血小板聚集而减轻脑缺血的发展。其强心、升压、稳压作用,可保证脑部灌注,同时能改善脑细胞对葡萄糖和氧的摄取,促进 ATP 的合成,改善病变组织的细胞能量状态,有利于神经功能的改善以及智能的恢复。鉴于此,在本研究中采用 Aβ 蛋白侧脑室注射复制 AD 大鼠模型,随后使用临床上广泛运用的参附注射液作用于 AD 大鼠,观察其对 AD 大鼠记忆力及氧化应激相关因子的影响。

研究表明,参附注射液中的有效成分之一人参皂苷 Rg1 可有效减轻 Aβ 短肽(25-35)所诱导的 AD 小鼠的学习和记忆力损伤^[19]。在随后的研究中,Chen 等^[6]也发现,人参皂苷 Rg1 可通过抑制氧化应激而减轻 AD 小鼠黑质神经元的损伤。在人参皂苷 Rd 中也发现,Rd 可减轻衰老小鼠脑组织的氧化应激^[20]。

正常情况下,机体的抗氧化能力与氧化能力之间保持着动

态平衡。若自由基产生过多或抗氧化能力下降,将导致机体损伤。大量氧自由基的产生可直接损伤线粒体、溶酶体内质网等,同时还可损伤细胞 DNA 等结构,促进某些疾病的发生、发展。而体内的 SOD、GSH-PX 则可有效地清除自由基,减轻组织损伤。SOD 与 GSH-PX 协同作用清除机体过多的自由基及有机过氧化物^[21-22]。而脂质过氧化的最终产物如 MDA 可与 DNA、RNA、蛋白质、磷脂等物质结合,损伤细胞膜,引起神经系统功能障碍,同时其细胞毒性作用是导致 AD 神经元变性坏死的重要原因^[23]。

在本研究中,观察到相类似的现象,即参附注射液明显缩短大鼠迷宫潜伏期,改善 AD 大鼠记忆力;在检测相关氧自由基水平时,作者发现参附注射液可增强 SOD 和 GSH-PX 的活力,减少有毒物质 MDA 在脑组织中的蓄积,从而减轻脑组织中氧化应激反应,保护皮质、海马的神经元,进而恢复 AD 大鼠的记忆力和认知力,达到改善 AD 动物记忆力的目的。

事实上,参附注射液是通过直接抑制氧化应激中相关自由基,还是通过某些信号途径降低 A β 所诱导的 AD 中的氧自由基水平,尚不是很清楚,这值得进一步研究。

参考文献:

- [1] Cenini G, Sultana R, Memo M, et al. Effects of oxidative and nitrosative stress in brain on p53 proapoptotic protein in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer disease[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(1): 81.
- [2] Resende R, Moreira PI, Proenca T, et al. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(12): 2051.
- [3] Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, et al. Oxidative stress and oxidative DNA damage is characteristic for mixed Alzheimer disease/vascular dementia[J]. *J Neurol Sci*, 2008, 266(1-2): 57.
- [4] Praticò D. Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1147: 70.
- [5] Fu Y, Ji LL. Chronic ginseng consumption attenuates age-associated oxidative stress in rats [J]. *J Nutr*, 2003, 133(11): 3603.
- [6] Chen XC, Zhou YC, Chen Y, et al. Ginsenoside Rg1 reduces MPTP-induced substantia nigra neuron loss by suppressing oxidative stress [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(1): 56.
- [7] 张文珺, 杨金霞, 商秀丽. 缓激肽对 β 淀粉样蛋白所致阿尔茨海默病动物模型行为学及形态学的影响 [J]. *中国医科大学学报*, 2008, 37(4): 455.
- [8] Roychoudhuri R, Yang M, Hoshi MM, et al. Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(8): 4749.
- [9] Yankner BA, Lu T. Amyloid beta-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(8): 4755.
- [10] Zaghi J, Goldenson B, Inayathullah M, et al. Alzheimer disease macrophages shuttle amyloid-beta from neurons to vessels, contributing to amyloid angiopathy [J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 117(2): 111.
- [11] 方传勤, 周华东. β 淀粉样蛋白免疫治疗阿尔茨海默病的研究进展 [J]. *重庆医学*, 2007, 36(1): 78.
- [12] Korshunova TA, Bravarenko NI, Balaban PM. Impairment of Context Memory by beta-Amyloid Peptide in Terrestrial Snail [J]. *Front Behav Neurosci*, 2008, 2: 3.
- [13] Watanabe T, Yamagata N, Takasaki K, et al. Decreased acetylcholine release is correlated to memory impairment in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Brain Res*, 2009, 1249: 222.
- [14] Watanabe T, Iwasaki K, Ishikane S, et al. Spatial memory impairment without apoptosis induced by the combination of beta-amyloid oligomers and cerebral ischemia is related to decreased acetylcholine release in rats [J]. *J Pharmacol Sci*, 2008, 106(1): 84.
- [15] Ferrera P, Mercado-Gómez O, Silva-Aguilar M, et al. Cholesterol potentiates beta-amyloid-induced toxicity in human neuroblastoma cells: involvement of oxidative stress [J]. *Neurochem Res*, 2008, 33(8): 1509.
- [16] Celsi F, Svedberg M, Unger C, et al. Beta-amyloid causes downregulation of calcineurin in neurons through induction of oxidative stress [J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 26(2): 342.
- [17] Lecanu L, Greeson J, Papadopoulos V. Beta-amyloid and oxidative stress jointly induce neuronal death, amyloid deposits, gliosis, and memory impairment in the rat brain [J]. *Pharmacology*, 2006, 76(1): 19.
- [18] Tamagno E, Guglielmotto M, Aragno M, et al. Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein [J]. *J Neurochem*, 2008, 104(3): 683.
- [19] Wang XY, Chen J, Zhang JT. Effect of ginsenoside Rg1 on learning and memory impairment induced by beta-amyloid peptide(25-35) and its mechanism of action [J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2001, 36(1): 1.
- [20] Yokozawa T, Satoh A, Cho EJ. Ginsenoside-Rd attenuates oxidative damage related to aging in senescence-accelerated mice [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2004, 56(1): 107.
- [21] Petrik MS, Wilson JM, Grant SC, et al. Magnetic resonance microscopy and immunohistochemistry of the CNS of the mutant SOD murine model of ALS reveals widespread neural deficits [J]. *Neuromolecular Med*, 2007, 9(3): 216.
- [22] Lin T, Yang MS. Benzo[a]pyrene-induced elevation of GSH level protects against oxidative stress and enhances xenobiotic detoxification in human HepG2 cells [J]. *Toxicology*, 2007, 235(1-2): 1.
- [23] Kowalczyk K, Stryjecka-Zimmer M. The influence of oxidative stress on the level of malondialdehyde (MDA) in different areas of the rabbit brain [J]. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska*, 2002, 57(2): 160.