

文章编号:1001-6880(2016)12-2011-07

非瑟酮对 $\text{A}\beta_{42}$ 诱导 AD 痴呆 模型大鼠的保护作用及其机制研究

武雪玲¹, 李筱筱¹, 贾世亮¹, 张 静¹, 戴雪伶², 孙雅煊^{1,2*}

¹北京联合大学应用文理学院; ²北京联合大学生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100191

摘要:采用双侧海马 CA1 区注射 $\text{A}\beta_{42}$ 构建 AD 动物模型, 通过穿梭箱被动回避记录行为学数据; 以大鼠脑组织中的 GSH、MDA 和 PC 含量作为评价指标, 观察非瑟酮对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠记忆力以及体内抗氧化活性的影响; 以脾脏、胸腺和肝脏指数以及 GFAP 的表达初步评估非瑟酮对 AD 模型大鼠的抗炎、抗衰老作用。结果表明, 模型组动物的记忆能力显著下降,而非瑟酮组可改善 AD 模型大鼠的记忆损伤; 同时,发现非瑟酮组能显著提高 AD 大鼠脑组织中的 GSH 含量,降低 MDA 和 PC 含量水平; 增加大鼠的脾脏、胸腺和肝脏指数,并降低 GFAP 的表达水平,且灌胃剂量为 100 mg/kg 的非瑟酮组效果最佳。综合上述结果可知,非瑟酮对 $\text{A}\beta_{42}$ 诱导 AD 痴呆大鼠具有较好的保护作用,其机制可能是非瑟酮抑制脑组织氧化损伤并抑制星型胶质细胞的活化与增生进而减少神经炎症的发生。

关键词:非瑟酮; $\text{A}\beta_{42}$; 阿尔茨海默病; 保护作用

中图分类号:R749.1

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.028

Protective Effect and Mechanism of Fisetin on $\text{A}\beta_{42}$ -induced Rat Model of Alzheimer's Disease

WU Xue-ling¹, LI Xiao-xiao¹, JIA Shi-liang¹, ZHANG Jing¹, DAI Xue-ling², SUN Ya-xuan^{1,2*}

¹Beijing Key Laboratory of Bioactive Substances and Functional Food, Beijing Union University; ²Research Institute of Science and Technology of Functional Food, Beijing Union University, Beijing 100191, China

Abstract: Rats were administered bilaterally in hippocampal CA1 area by injecting $\text{A}\beta_{42}$ to produce an animal model of AD, where animal behaviors were detected by the passive-avoidance test. The contents of GSH, MDA, and PC in brain tissues were extensively evaluated to investigate the effect of fisetin on antioxidant activity and memory function. In addition, the spleen index, thymus index, liver index and the expression of GFAP were used to preliminarily assess the anti-inflammatory and anti-aging effect of fisetin on AD model rats. The results showed that the memory function was significantly reduced in model group of rats, and fisetin can improve memory impairment of AD model rats. Moreover, compared with the model group, the spleen index, thymus index, liver index and the content of GSH in brain tissues were significantly enhanced whereas the expression of GFAP, MDA and PC contents were decreased, especially in the group that received 100 mg/kg fisetin. Thus fisetin might be a potential agent for treatment of Alzheimer's disease via inhibiting oxidative damage and activation and proliferation of astrocyte reducing and further reducing nerve inflammation.

Key words: fisetin; $\text{A}\beta_{42}$; Alzheimer's disease; protective effect

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是以记忆力衰退、认知功能障碍、人格异常为临床特征的慢性中枢性神经系统退行性疾病,大约有 60% 的老年性痴呆患者属于 AD^[1]。根据最新研究报道,2015 年全世界 AD 患者将达到 4680 万,并推测 2050 年

AD 患者将达到 1.3 亿多^[2]。随着世界人口的老龄化的不断加快,AD 也逐渐成为严重威胁老年人生命健康的疾病,但 AD 病因至今尚未明了,所以对 AD 的治疗和预防也成了较为棘手的待解决问题^[3]。AD 的病理特征表现:额叶和海马等部位神经元的丢失;细胞内神经原纤维缠结(Neurofibrillary tangles, NFTs),以及纤维状淀粉样 β 蛋白多肽(amyloid- β , A β)在神经组织中沉积所形成的老年斑(Senile Plaque, SP)等^[4,5]。其中, A β 过量聚集形成

收稿日期:2016-08-23 接受日期:2016-09-29

基金项目:北京市教委面上项目(SQKM201411417014);北京联合
大学校级科研项目(ZK70201402)

* 通讯作者 E-mail:sunxx@buu.edu.cn

的寡聚体具有神经毒性,被认为是AD发病的中心环节^[6,7]。而这些过量产生的A β 来源于淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)的异常裂解^[8],APP蛋白经 β -和 γ -分泌酶依次切割,形成A β 多肽,但由于 γ -分泌酶有不同的酶切位点,可以产生不同C末端氨基酸的A β 多肽,如A β_{42} 、A β_{40} 、A β_{38} 、A β_{37} 等。其中A β_{40} 无论在正常人还是在AD患者脑中含量均最高,但A β_{42} 疏水性强、毒性高,且有更强聚集成纤维丝的能力,是老年斑的主要组成部分,所以大部分研究都采用A β_{42} 作为研究对象^[9,10]。目前,AD尚无有效防治手段,对AD的治疗仅限于延缓发病和疾病的进展。因此,结合我国丰富的天然产物资源,探寻对AD具有良好治疗效果且副作用低的活性物质,将会对AD的治疗与预防起到积极的作用。

非瑟酮(Fisetin)是一种黄酮类化合物,又称非瑟素、漆黄素、漆黄酸、紫铆素,分子式为C₁₅H₁₀O₆,分子量286.23,学名为3,3',4',7-四羟基黄酮(结构式见图1所示)^[11]。非瑟酮是一种黄色针状结晶,溶于酒精、丙酮和乙酸,但几乎不溶于水、苯、乙醚和氯仿。天然存在于漆树科植物木蜡树(*Rhus succedanea* L.)的木材中,但在蔬菜、水果等植物中也都含有一定量的非瑟酮活性成分,其中草莓中的含量尤其丰富^[12]。已被证实非瑟酮具有抗氧化、延缓衰老、保护肝脏、神经保护和提高记忆力等作用^[13-16]。本研究采用双侧海马CA1区微注射A β_{42} 建立AD痴呆大鼠模型,检测模型大鼠海马区的氧化应激和胶质炎性反应,并借助非瑟酮所特有的生物活性,来探究非瑟酮对A β_{42} 诱导的AD痴呆大鼠模型的保护作用,进而为非瑟酮治疗或预防AD提供一定的理论依据。

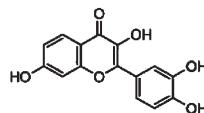


图1 非瑟酮分子结构式

Fig. 1 Structure of fisetin

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与动物

非瑟酮(纯度,>80%)购自于西安璟程生物科技有限公司(批号,XAJCOL50406);还原型谷胱甘肽(glutathione,GSH)测定试剂盒、丙二醛(malondi-

aldehyde, MDA)测定试剂盒和蛋白质羰基(protein carbonyl, PC)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;A β_{42} 购自吉尔生化(上海)有限公司;兔抗-胶质纤维酸性蛋白(anti-GFAP, DAKO, 美国),羊血清封闭液和羊抗兔辣根过氧化物酶标记Ig G(中杉金桥生物技术有限公司,北京),DAB显色试剂(Sigma, 美国),其他试剂均为分析纯级。

6周龄SPF级SD雄性大鼠,体重180~200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2012-0001]。饲养条件:室温22±1℃,相对湿度50%~60%,交替12 h光照/黑暗条件下饲养。

1.2 仪器与设备

AR1530精密电子天平,奥豪斯仪器(上海)有限公司;分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;正置显微镜和图像采集系统,日本Olympus公司;Eppendorf 5804R台式冷冻离心机,Eppendorf中国有限公司;RephiLe超纯水系统,上海乐枫生物科技有限公司;DK-98-IIA电热恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司;脑立体定位仪,上海美谱达仪器有限公司;穿梭箱被动回避装置,TSE Systems德国总公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组及给药

6周龄SD雄性大鼠于北京联合大学应用文理学院保健食品功能检测中心SPF动物房饲养一周后,将72只大鼠随机分成6组,分别为:对照组(Control组,注射生理盐水+灌胃蒸馏水)模型组(Model组,注射A β_{42} +灌胃蒸馏水),阳性组(Huperzine-A组,注射A β_{42} +灌胃石杉碱甲阳性药,0.2 mg/kg),非瑟酮高剂量组(Fis-H组,注射A β_{42} +灌胃剂量100 mg/kg),非瑟酮中剂量组(Fis-M组,注射A β_{42} +灌胃剂量50 mg/kg),非瑟酮低剂量组(Fis-L组,注射A β_{42} +灌胃剂量25 mg/kg),每组12只,手术后第一天开始给药,连续给药15 d,每天给药一次。

1.3.2 手术造模

实验大鼠经腹腔注射2%戊巴比妥钠(0.35 mL/100 g体重)麻醉后,固定于脑立体定位仪上,并参照Paxinos G等^[17]的《大鼠脑立体定位图谱》,确定大鼠海马CA1区立体定位坐标:前囟后3.3 mm、矢状缝旁左右开2.0 mm,硬脑膜下下3.4 mm。骨钻打开颅骨后,用微量进样器自颅骨表面垂直进针进行注射A β_{42} (2.5 μ g/ μ L),双侧各注射5 μ L,10 min内注射完毕,留针5 min使溶液充分弥散。注射

后缝合肤,每只大鼠肌注 8 万单位青霉素钠盐防止感染。同样方法对 Control 组大鼠双侧海马 CA1 区相同坐标位点注射等体积的无菌生理盐水。

1.3.3 穿梭箱被动回避实验

给药第 13 d,进行穿梭箱被动回避试验。将大鼠头朝室壁放入明室,明暗两室之间的门洞敞开,让大鼠在两室内自由活动 3 min。第 14 d 进行明暗穿梭箱被动回避训练实验,将大鼠头朝室壁放入明室,明暗两室之间的门洞敞开,当大鼠四肢完全进入暗室后,门洞立即关闭,给予一次电刺激(持续 2 s),并记录每只大鼠从放入明室至首次进入暗室遇到电击所需的时间(潜伏期,s)。第 15 d,开始进行被动回避的测试(训练 24 h 以后),不给予足底电刺激,并记录每只大鼠 5 min 内进入暗室的潜伏期和错误次数。另外,不进入暗箱的大鼠,潜伏期记为 300 s。

1.3.4 大鼠样本的采集

手术后第 16 d,每组随机选取 8 只大鼠股动脉取血处死,迅速断头,剥离颅骨,分离出海马组织,将剩余的脑和海马组织分装于冻存管后放液氮中速冻,-80 ℃保存,用于 GSH、MDA、蛋白质羰基以及蛋白含量的测定。

另外,将每组的 4 只大鼠用 2% 戊巴比妥钠深度麻醉,迅速打开大鼠胸腔,暴露心脏。先以预冷的生理盐水 250 mL 灌流,冲洗干净血液,再用预冷的 4% 多聚甲醛 250 mL 灌流固定。然后断头取脑,分离出完整的脑组织,置于 4% 多聚甲醛中,于 4 ℃ 固定 48~72 h 后,包埋成蜡块,用于免疫组化的测定。

1.3.5 GFAP 免疫组化实验

标本包埋后,进行切片(厚 4 μm)处理,65 ℃ 烤片 2 h 后,先二甲苯脱蜡 2 缸,10 min/每缸,再用 100%、100%、95%、75% 的梯度酒精清洗(2 min/每

表 1 非瑟酮对 AD 痴呆大鼠学习记忆行为的影响($n = 12$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 The effect of fisetin on learning and memory in A_β₄₂-induced rat model of AD ($n = 12$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	潜伏期 Escape latency (s)	错误次数 Number of errors
对照组 Control	-	300.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组 Model]	-	164.60 ± 121.46 [#]	0.58 ± 0.51 [#]
阳性组 Huperzine-A	0.2	300.00 ± 0.00 [*]	0.00 ± 0.00 [*]
非瑟酮高剂量组 Fisetin-H	100	300.00 ± 0.00 [*]	0.00 ± 0.00 [*]
非瑟酮中剂量组 Fisetin -M	50	300.00 ± 0.00 [*]	0.00 ± 0.00 [*]
非瑟酮低剂量组 Fisetin -L	25	292.75 ± 18.18 [*]	0.17 ± 0.39

注:与对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

缸),然后再用 PBS 清洗 5 次,2 min/每次。修复方式:高压 EDTA 为 8.0,高压锅冒气加阀计时 2 min,计时的同时将电磁炉从高火调至中火,计时结束,离火自然晾凉,PBS 清洗 5 次,2 min/每次。3% 过氧化氢,15 min,蒸馏水清洗干净,PAP 笔画圈,PBS 清洗 5 次,2 min/每次,5% 血清封闭,10 min,PBS 清洗 5 次,2 min/每次,滴加一抗(兔抗-GFAP),4 ℃ 过夜。第二天,PBS 清洗 5 次,2 min/每次,加二抗,pv-800,30 min,PBS 清洗 5 次,2 min/每次。DAB 显色 3~5 min,清水洗干净,逐级梯度酒精脱水(低浓度到高浓度),二甲苯透明,封片。

1.3.6 测定方法

GSH 含量采用分光光度法;MDA 含量采用 TBA 法测定;PC 含量采用紫外比色法测定;脑组织匀浆蛋白浓度采用考马斯亮蓝方法进行测定。所有检测试剂的配置和检测步骤,均按照南京建成生物工程研究所相对应的试剂盒说明书进行操作。

大鼠体重采用天平直接称重测定,脾脏、胸腺以及肝脏均以相对于体重的组织重量系数表示:组织指数=(组织重量 mg/体重 g) × 10

1.4 数据统计分析

采 SPSS19.0 统计软件进行数据的分析处理,实验数据均以 Mean ± SD 进行表示,并采单因素方差分析进行组与组之间的差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示具有统计学差异显著(用 * 或[#]表示), $P < 0.01$ 表示具有统计学差异极显著(用 ** 或^{##}表示),同时采用 SigmaPlot10.0 软件进行图像处理。

2 结果与分析

2.1 非瑟酮对 AD 痴呆大鼠行为学-被动回避的影响

表 1 非瑟酮对 AD 痴呆大鼠学习记忆行为的影响($n = 12$, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 The effect of fisetin on learning and memory in A_β₄₂-induced rat model of AD ($n = 12$, $\bar{x} \pm s$)

非瑟酮对 AD 大鼠穿梭箱被动回避反应的记忆保持能力的作用如表 1 所示,结果显示,在第 15 d 测试潜伏期(s)中,与对照组相比,模型组潜伏期明显缩短($P < 0.05$),错误次数显著性增加($P < 0.05$);与模型组相比,Huperzine-A 组潜伏期具有显著性增加($P < 0.05$),错误次数明显减少($P <$

0.05);此外,Fis-H、Fis-M 和 Fis-L 组与模型组相比,Fis-H、Fis-M 和 Fis-L 三组潜伏期均有所增加($P < 0.05$),错误次数均有所减少,其中 Fis-H、Fis-M 组错误次数的降低显著性差异($P < 0.05$)。

2.2 非瑟酮对 AD 痴呆模型大鼠脑组织中 GSH、MDA 及 PC 含量的影响

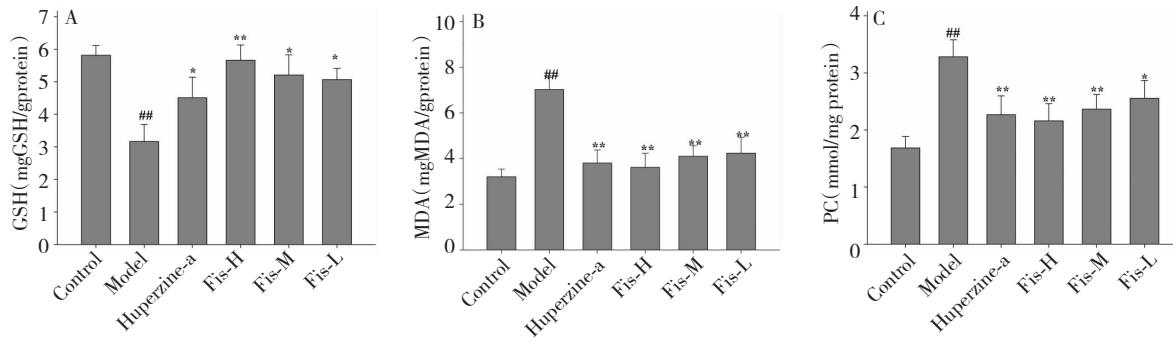


图 2 非瑟酮对 AD 痴呆模型大鼠脑组织中 GSH、MDA 及 PC 含量的影响

Fig. 2 The effect of fisetin on content level of GSH, MDA and PC in the brain of $\text{A}\beta_{42}$ -induced AD rat model

注:与对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

Note: Compared with control, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

不同处理组大鼠脑组织中 GSH、MDA 及 PC 含量比较结果见图 1,其中 A 图是脑组织 GSH 含量的组间比较,B 图是脑组织 MDA 含量的组间比较,C 图是脑组织 PC 含量的组间比较。结果显示 AD 模型大鼠脑组织中,与对照组相比,模型组 GSH 含量极显著性降低($P < 0.01$),MDA 和 PC 含量极显著性增加($P < 0.01$)。与模型组相比,Huperzine-A 组

GSH 含量显著性增加($P < 0.05$),MDA 和 PC 含量极显著性降低($P < 0.01$)。此外,Fis-H、Fis-M 和 Fis-L 样品组与模型组相比,GSH 含量均显著性增加,其中 Fis-H 组增加最显著($P < 0.01$);另外,三组的 MDA 和 PC 含量也都极显著性降低($P < 0.01$)。

2.3 非瑟酮对 AD 模型大鼠脾脏指数、胸腺指数以及肝脏指数的影响

表 2 非瑟酮对 AD 模型大鼠的免疫器官指数的影响($n = 12$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of fisetin on immune organ indexes in $\text{A}\beta_{1-42}$ -induced AD rat model ($n = 12$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	脾脏指数 Spleen index (mg/kg)	胸腺指数 Thymus index (mg/kg)	肝脏指数 Liver index (mg/kg)
对照组 Control	-	22.55 ± 1.32	13.10 ± 2.37	390.94 ± 3.82
模型组 Model	-	$18.77 \pm 1.86^{##}$	$10.28 \pm 1.60^{##}$	$378.27 \pm 6.96^{##}$
阳性组 Huperzine-A	0.2	$21.74 \pm 2.55^*$	$12.47 \pm 2.37^*$	$384.58 \pm 7.25^*$
非瑟酮高剂量组 Fisetin-H	100	$21.92 \pm 2.36^*$	$13.09 \pm 2.39^{**}$	$389.35 \pm 5.22^{**}$
非瑟酮中剂量组 Fisetin -M	50	$21.62 \pm 2.81^*$	$12.69 \pm 1.43^*$	383.67 ± 6.33
非瑟酮低剂量组 Fisetin -L	25	19.63 ± 3.66	10.43 ± 1.20	382.20 ± 5.69

注:与对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

Note: Compared with control, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

不同处理组大鼠脾脏指数、胸腺指数以及肝脏指数的比较结果见表 2。结果显示与对照组相比,模型组脾脏指数、胸腺指数以及肝脏指数均显著性降低($P < 0.01$);与模型组相比,Huperzine-A 组脾脏指数、胸腺指数以及肝脏指数均显著性升($P <$

0.05);此外,Fis-H、Fis-M 和 Fis-L 样品组与模型组相比,Fis-H 组脾脏指数、胸腺指数以及肝脏指数均显著性升高,且胸腺指数和肝脏指数均极有显著性差异($P < 0.01$);同时,Fis-M 组的脾脏指数和胸腺指数升高也有显著性差异($P < 0.05$);Fis-L 样品组

脾脏指数、胸腺指数以及肝脏指数均有所增加,但无显著性差异。

2.4 非瑟酮对 AD 模型大鼠 GFAP 表达水平的影响

不同处理组大鼠胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 表达水平结果见图 2,该图是对 GFAP 阳性细胞表达水平的一个量化。GFAP 是参与炎症反应的星形胶质细胞活化的标志标志物。图 2 结果显示,与对照组相比,模型组 GFAP 表达水平显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,Huperzine-A、Fis-H、Fis-M 及 Fis-L 样品组 GFAP 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$),其中 Fis-H 和 Fis-M 样品组表达量最少。

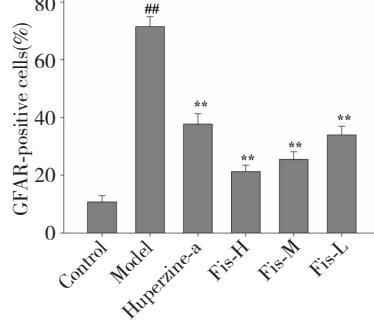


图 3 非瑟酮对 AD 模型大鼠海马 CA1 区 GFAP 表达水平的影响

Fig. 3 Effect of fisetin on the level of GFAP after A_β₄₂ treatment in the CA1 region of the hippocampus

注:与对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: Compared with control, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论与结论

AD 是一种进行性、不可逆转的慢性中枢性神经系统退行性疾病,也是老年痴呆中最常见的一种类型。目前 AD 的发病原因还不是十分清楚,致使目前还缺乏有效的防治措施,但是 A_β 的毒性级联式放大反应被认为是 AD 病理机制中的关键环节,而氧化应激和胶质炎症反应则是 A_β 病理机制中起关键性作用的因子。氧化应激过程中会产生大量的氧自由基,而大量自由基不能被及时清除,进一步就会诱导蛋白质、核酸以及脂质的过氧化,致使神经细胞凋亡,增加 A_β 的生成,进而导致或加重 AD 的产生^[18]。A_β 在脑内过量聚集,诱发星形胶质细胞和

小胶质细胞被激活,而活化的星形胶质细胞分泌的促炎性分子可使神经元内分泌酶的表达升高,增加 A_β 的产生,并激活小胶质细胞进一步产生促炎性因子,进一步加重 A_β 的产生^[19]。星形胶质细胞是中枢神经系统内数量最多、功能最复杂的一种胶质细胞,几乎占脑容量的 50% 以上,对神经元的存活、脑组织的修复起重要作用。但是过度增生的星形胶质细胞,会分泌轴突再生抑制性因子,参与胶质瘢痕形成,影响神经纤维的传导和突触的构建,尤以脑损伤的后期明显。最新研究发现:病理状态下,星形胶质细胞受 A_β 形等毒性物质的激活可产生细胞炎性因子、补体、氧自由基等,启动炎性反应,促进神经细胞的损伤和死亡,加重 AD 的进程^[20]。GFAP 是星形胶质细胞的特异性蛋白与骨架成分,为星形胶质细胞的特异性标志,可作为脑损伤后星形胶质细胞增生反应的标志^[21],所以通过对 GFAP 表达量的测定可从侧面反映出星形胶质细胞的活化程度。神经细胞的凋亡和缺失是导致 AD 患者学习和记忆障碍的主要因素,穿梭箱被动回避反应是一种典型的测定学习记忆能力的一种动物模型,通过动物进入暗室潜伏期的长短和错误次数的多少来观察模型动物的记忆力情况^[22]。另外,GSH 是机体内清除自由基的关键物质,它们可以保护机体不受自由基的损伤,对它们的检测可以反映机体抗氧化能力的强弱;而 MDA 和 PC 是自由基攻击机体产生的终产物,检测 MDA 和 PC 的含量可间接反映机体蛋白质和脂质的过氧化损伤程度。许多研究证实,抗炎、抗氧化剂对 AD 的治疗有显著疗效^[23]。而有研究表明非瑟酮能减少体内氧自由基生成和抑制蛋白质、核酸以及脂质的过氧化反应,并减少星形胶质细胞和小胶质细胞的活化^[13-16]。

在本研究中,采用双侧海马 CA1 区微注射 A_β₄₂ 构建 AD 痴呆动物模型来评估非瑟酮样品对 AD 痴呆动物模型的保护作用。结果如表 1~2 和图 2~3 所示,综合上述共性分析结果可知,与对照组比较,模型组被动回避测试潜伏期明显降低,错误次数明显增加,具有统计学显著性差异,说明双侧海马 CA1 区微注射 A_β₄₂ 构建的动物模型造成大鼠对被动回避记忆能力造成损害;另外,模型组脑组织中 GSH 含量显著性下降,且 MDA 和 PC 含量以及 GFAP 表达水平均明显升高。结合被动回避的行为学检测、氧化指标测定以及 GFAP 表达水平结果的分析,表明本研究 AD 痴呆动物模型构建是可行的。另外,

Huperzine-A 是市场上公认的临床治疗 AD 的药物,并与模型组相比, Huperzine-A 组潜伏期和 GSH 含量均显著升高, 错误次数、MDA 和 PC 含量以及 GFAP 表达水平也明显减少, 进一步说明此模型的建立是成功的。

在此 AD 痴呆动物模型基础上, 实验考察了不同剂量非瑟酮样品灌胃处理的大鼠对 AD 痴呆动物模型的保护作用。结果显示, 与模型组相比, Fis-H、Fis-M 和 Fis-L 组潜伏期均有所升高, 错误次数也明显减少, 其中 Fis-H 组的升高具有统计学差异显著性, 说明非瑟酮在一定程度上可以改善 AD 痴呆动物模型所致记忆能力的下降。另外与模型组相比, Fis-H、Fis-M 和 Fis-L 组脑组织中 GSH 含量均有所升高, MDA 和 PC 含量以及 GFAP 表达水平也均有下降, 尤其灌胃剂量为 100 mg/kg 时显示出更高的抗氧化和抗炎作用潜力。

另外, 脾和胸腺是机体重要的免疫器官, 胸腺、脾的器官指数可间接初步反映机体抗衰老和免疫力下降程度, 而免疫力的下降将会进一步加快炎症反正的产生。同时, 氧化应激产生的过多自由基作用于肝脏, 会导致肝脏细胞膜受损, 造成肝脏损伤^[24,25]。肝脏指数也可初步反应肝脏器官的影响变化。实验通过脾脏指数、胸腺指数以及肝脏指数指标初步评估非瑟酮样品对免疫器官和肝脏的影响变化。结果显示, 模型组脾脏指数、胸腺指数以及肝脏指数均显著性降低, 而 Fis-H、Fis-M 和 Fis-L 样品组脾脏指数、胸腺指数以及肝脏指数均显著性升高, 尤其是 Fis-H 组效果最明显。说明 AD 痴呆模型组动物机体的免疫力以及抗衰老能力下降, 而非瑟酮能显著增加 AD 痴呆动物模型的脾脏、胸腺和肝脏指数, 增强机体免疫功能和保护肝脏损伤的作用, 进一步延缓机体的衰老。

参考文献

- Querfurth HW, Laferla FM. Alzheimer's disease. NEJM, 2010, 362:329-344.
- Prince M, Wimo A, Guerchet M, et al. World Alzheimer Report 2015. The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. 2015.
- Carrero I, Gonzalo MR, Martin B, et al. Oligomers of β -amyloid protein ($A\beta$ 1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α , and a nuclear factor κ -B mechanism in the rat brain. *Exp Neurol*, 2012, 236:215-227.
- Serranopozo A, Frosch MP, Masliah E, et al. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3:604-611.
- Huang HC, Jiang ZF. Accumulated amyloid-beta peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2009, 16:15-27.
- Pamplona FA, Pandolfo P, Duarte FS, et al. Altered emotionality leads to increased pain tolerance in amyloid β ($A\beta$ 1-40) peptide-treated mice. *Behav Brain Res*, 2010, 212:96-102.
- Laferla FM, Oddo S. Alzheimer's disease: $A\beta$, tau and synaptic dysfunction: Trends in Molecular Medicine. *Trends Mol Med*, 2005, 11:170-176.
- Mattson MP. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillrogenic derivatives. *Physiol Rev*, 1997, 77:1081-132.
- Burdick D, Soreghan B, Kwon M, et al. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem*, 1992, 267:546-554.
- Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, et al. Inverse relation between *in vivo* amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Abeta42 in humans. *Ann Neurol*, 2006, 59:512-519.
- Arai Y, Watanabe S, Kimira M, et al. Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr*, 2000, 130:2243-2250.
- Wang JH (王继红). Study on extracting fisetin from *Toxicodendron sylvestre*. *Labor Sci* (实验室科学), 2012, 15:87-89.
- Lee JD, Huh JE, Jeon GS, et al. Flavonol-rich RVHxR from *Rhus verniciflua*, Stokes and its major compound fisetin inhibits inflammation-related cytokines and angiogenic factor in rheumatoid arthritic fibroblast-like synovial cells and *in vivo*, models. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9:268-276.
- Maher P, Akaishi T, Abe K. Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103:16568-16573.
- Currais A, Prior M, Dargusch R, et al. Modulation of p25 and inflammatory pathways by fisetin maintains cognitive function in Alzheimer's disease transgenic mice. *Aging Cell*, 2014, 13:379-390.
- Chiruta C, Schubert D, Dargusch R, et al. Chemical modification of the multitarget neuroprotective compound fisetin. *J Med Chem*, 2012, 55:378-389.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, 1998.

(下转第 2005 页)