

# $\beta$ -细辛醚 + 远志皂苷对 APP/PS1 双转基因小鼠 SOD、GSH-PX、CAT、MDA 和 HO-1 表达的影响

董海影, 张昊, 帅智峰, 荣华, 王俊苹, 李春旭\*

齐齐哈尔医学院病理学院, 齐齐哈尔 161006

**摘要:** 该论文主要是通过观察  $\beta$ -细辛醚 + 远志皂苷对 APP/PS1 双转基因小鼠超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-PX)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 和血红素加氧酶-1 (Heme oxygenase-1, HO-1) 表达的影响, 探讨  $\beta$ -细辛醚协同远志皂苷对 APP/PS1 双转基因小鼠氧化应激损伤的保护作用和治疗 AD 的作用机制。将 3 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠分为模型组, 盐酸多奈哌齐组 (0.33 mg/kg · d),  $\beta$ -细辛醚 + 远志皂苷低、中和高剂量组 (18.5、37 和 74 mg/kg · d), 选同月龄 C57BL/6 小鼠为空白对照组, 采用 Morris 水迷宫法和新物体识别试验检测小鼠的学习记忆能力, 采用分光光度法检测 SOD、GSH-PX 和 CAT 活性, 以及 MDA 含量。采用 Western blot 检测 CAT 和 HO-1 蛋白表达, 实时定量 RT-PCR 检测 CAT 和 HO-1 mRNA 表达。结果表明  $\beta$ -细辛醚协同远志皂苷可明显改善 APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆功能障碍, 增强其学习和记忆功能。 $\beta$ -细辛醚协同远志皂苷还能升高 SOD、CAT 和 GSH-PX 的活性, 降低 MDA 含量, 诱导 CAT 和 HO-1 的 mRNA 与蛋白表达。该论文研究结果表明,  $\beta$ -细辛醚 + 远志皂苷可通过上调 SOD、CAT、GSH-PX 和 HO-1, 降低 MDA, 对 APP/PS1 双转基因小鼠氧化应激损伤发挥保护作用, 进而拮抗 AD。

**关键词:**  $\beta$ -细辛醚; 远志皂苷; SOD; GSH-PX; CAT; MDA; HO-1

中图分类号: R96

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.9.017

## Effects of $\beta$ -Asarone and Tenuigenin on Activities of SOD, GSH, CAT, MDA and HO-1 in APP/PS1 Double Transgenic Mice

DONG Hai-ying, ZHANG Hao, SHUAI Zhi-feng, RONG Hua, WANG Jun-ping, LI Chun-xu\*

Pathology Diagnosis Center Qiqihar Medical University, Qiqihaer 161006, China

**Abstract:** To observe the effect of  $\beta$ -asarone and tenuigenin on the regulation of SOD, GSH-PX, CAT, MDA and HO-1 in APP/PS1 double transgenic mice, to explore the protection mechanism of  $\beta$ -asarone and tenuigenin for oxidative stress injury of double transgenic mice and treatment of AD. Three-month-old of APP/PS1 double transgenic mice were divided into model group, Donepezil hydrochloride group (0.33 mg/kg · d), high dose of  $\beta$ -asarone and tenuigenin group, medium dose of  $\beta$ -asarone and tenuigenin group and low dose of  $\beta$ -asarone and tenuigenin group (18.5, 37 and 74 mg/kg · d). C57BL/6 mice of the same age were used as control. Morris water maze test and object recognition task were used to measure the spatial learning and memory ability. Spectrophotometer was used to detect the activities of SOD, CAT, GSH-PX and the content of MDA in mice. Western Blot and RT-PCR were adopted to observe the levels of mRNA and protein expression of CAT and HO-1 in each group of mice. The results showed that  $\beta$ -asarone and tenuigenin treatment significantly ameliorated the cognitive deficits of APP/PS1 double transgenic mice.  $\beta$ -Asarone and tenuigenin increased the activity of SOD, CAT and GSH-PX, decreased the production of MDA, enhanced the mRNA and protein expression of CAT and HO-1. Hence,  $\beta$ -asarone and tenuigenin can inhibit the oxidative stress of brain tissue, and bring positive therapeutic effect of AD by regulating the activity of SOD, GSH-PX, CAT, MDA and HO-1.

**Key words:**  $\beta$ -asarone; tenuigenin; SOD; GSH-PX; CAT; MDA; HO-1

收稿日期: 2017-02-13 接受日期: 2017-03-10

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81403131)

\* 通信作者 Tel: 86-018645219198; E-mail: 1027994222@qq.com

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以进行性记忆力丧失为特征的神经系统退行性疾病。最新流行病学统计资料显示<sup>[1]</sup>, AD 在 65 岁的

老年人群当中发病率约 10%，而在 85 岁以上的老年人群当中发病率可高达 47%。中国已经进入了老龄化社会，AD 发病率出现了逐年增高的趋势，给社会和家庭增加了沉重的负担。AD 的存在已不仅是一个急需攻关的重大医疗卫生问题，而且是一个亟待解决的严重社会问题。目前经由美国 FDA 批准，临床上广泛使用的，治疗 AD 的药物仅有几个，但几乎均为胆碱酯酶抑制剂，其远期疗效并不理想，也使临床治疗存在诸多困难<sup>[2]</sup>。因此，研究我国具有知识产权的抗 AD 创新药物和新方法是当前一项十分紧迫的研究任务。

我国中医药工作者通过对中药复方数据库进行统计分析发现：石菖蒲是治疗 AD 中药中使用频率最高、加权关联度最大单位中药，用药频率为 42%，而远志在治疗 AD 中使用频率位居第 3 位，用药频率为 29%，石菖蒲-远志药是治疗 AD 方剂的基本结构，用药频率为 34%<sup>[3]</sup>。

本实验在上述研究基础上，观察石菖蒲的有效成分  $\beta$ -细辛醚 ( $\beta$ -asarone) 与远志的有效成分远志皂苷 (Tenuigenin, TEN) 协同作用于 APP/PS1 双转基因小鼠，分析  $\beta$ -细辛醚 + 远志皂苷对 AD 小鼠脑皮层与海马 SOD、GSH-PX、CAT、HO-1 和 MDA 含量与活性的影响，从而进一步探讨  $\beta$ -细辛醚协同远志皂苷对氧化应激损伤的保护作用和治疗 AD 的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物与试剂

$\beta$ -细辛醚由天津一方科技有限公司提供 (CAS: 00011017-T9K)；远志皂苷由南京景竹生物科技有限公司提供 (CAS: JZ20160327A)，经 HPLC 测定，纯度均  $\geq 98\%$ ；SOD、MDA、CAT 和 GSH-PX 均由南京建成生物工程研究提供 (CAS: 20150422、20150423、20150423 和 20150417)；PCR 检测试剂盒由 TaKaRa 公司提供 (CAS: BK3801)；CAT 和 HO-1 的一抗均由 Cell Signaling Technology 提供 (CAS: 9315S、27C10)。

### 1.2 实验动物

APP/PS1 双转基因小鼠 (南京生物医药研究院, 编号 D000268)，3 月龄，50 只，雄性；C57BL/6J 小鼠 [长春市亿斯实验动物技术有限责任公司, SCXK (吉) 2011-0004]，3 月龄，10 只，雄性，均饲养于齐齐哈尔医学院实验动物中心 SPF 级饲养室。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 分组与给药

将 3 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠分为模型组，盐酸多奈哌齐组 (0.33 mg/kg · d)，药物低、中和和高剂量组 (18.5、37 和 74 mg/kg · d，均由  $\beta$ -细辛醚和远志皂苷按照 1:1 配制而成，参照《圣济总录》中远志汤的配伍)，选同月龄 C57BL/6 小鼠为空白对照组，空白对照组和模型组给予等体积的生理盐水灌胃，均每天一次，连续灌胃 90 d。

#### 1.3.2 Morris 水迷宫检测 (Morris water maze, MWM)

给药结束后进行 Morris 水迷宫行为测试。水迷宫为一直径 150 cm，高 60 cm 的不锈钢圆形水池，水池侧壁上配备一长杆，上悬挂红外摄像头。水迷宫内设置一座底面为 6 cm × 10 cm，高为 40 cm 的有机玻璃平台。以水迷宫中心点为原点，在迷宫的侧壁上标明东、南、西、北四个象限的入水点。标明入水点后，将平台放在迷宫西南象限正中距池壁 22 cm 处，迷宫内注入水，水温控制在 (22 ± 1) °C，加入奶粉后，迷宫中上位水线高于安全平台 1 cm，训练期环境保持安静与参照物不变。

训练期间：任选东、南、西、北四个象限的入水点，将小鼠面向迷宫壁放入池中，训练间隔为 60 s。定位航行试验：为期 5 d，选择迷宫侧壁的东象限为入水点，每天 4 次，摄像头记录小鼠的游泳轨迹图与逃避潜伏期，即小鼠找到水下平台的时间，设定逃避潜伏期的时限为 2 min。空间探索试验：定位航行试验结束后将水下平台撤除，在同一入水点将小鼠面向池壁放入水中，让小鼠在无平台情况下寻找记忆中的平台，记录在 2min 内跨过原平台位置的次数。

#### 1.3.3 新物体识别实验

检测箱为 60 cm × 40 cm × 80 cm 的，由黑色聚酯塑料材质构成的封闭箱，箱左右内侧壁镶嵌 LED 灯条，顶部悬挂摄像头观察动物的活动情况及探索过程。实验检测过程分为适应期、熟悉期和测试期 3 个阶段。适应期：为期 3 d，每天将小鼠依次放入检测箱内，熟悉环境 10 min；熟悉期：第 4 d，将两个完全相同的正方体红色积木块放入检测箱内对称的位置处，两个积木距离箱侧壁与箱后壁的距离均为 10 cm，将小鼠放入熟悉 5 min；测试期：间隔 30 min 后，将一个红色积木替换为大小相近的绿色圆柱形积木，将小鼠放入检测箱内，记录 5 min 内小鼠对新颖物体即绿色圆柱形积木 (T novel, TN) 和红色正方体即熟悉物体 (T familiar, TF) 的探索时间，以

小鼠鼻尖距被识别物体的距离不超过 2 cm 或用鼻子接触到被识别物体为探究行为。应用认知指数 (Recognition Index, RI) 来评价动物的学习记忆能力,计算公式为  $RI = TN / (TN + TF) \times 100\%$ 。

### 1.3.4 SOD、CAT 和 GSH-PX 活力检测以及 MDA 含量测定

Morris 水迷宫与新物体识别实验结束后,小鼠禁食 12 h。于第 2 d,快速断头取脑,借助组织钳沿着枕骨大孔,向左右分开颅骨,取出大脑,在冰盘上分离皮层与海马,匀浆,离心,获取上清液,用酶标法检测 SOD,硫代巴比妥酸法检测 MDA,分光光度法检测 CAT,比色法检测 GSH-PX。

### 1.3.5 PCR 检测各组海马神经元 CAT 和 HO-1 的 mRNA 表达

各组小鼠取脑,依 TRIzol 法提取皮层与海马的 RNA,然后进行 RNA 纯度、浓度和完整性的检测,经由 Prime Script™ RT reagent Kit 反转录试剂盒进行逆转录反应。PCR 反应引物的序列设计如下:

CAT Forward:5'-ATT GCC GTC CGA TTC TCC-3';

Reverse:5'-CCA GTT ACC ATC TTC AGT GTA G-3'.

HO-1 Forward:5'-TGT CCC AGG ATT TGT CCG AG-3'

Reverse:5'-ACT GGG TTC TGC TTG TTT CGC T-3'

GAPDH Forward:5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GC-3'

Reverse:5'-CCA CAG GAT TCC ATA CCC AA-3'

选择 GAPDH 为内参基因,于 PCR 仪器中将所设计的引物加入 cDNA 分别扩增 CAT、HO-1 和 GAPDH 基因,温度依次设置:94、94、58、72 和 72 °C;时间依次设置:120、30、30、30 和 120 s。将所得扩增产物进行电泳分离,应用凝胶成像系统和图像

表 1  $\beta$ -细辛醚+TEN 对 APP/PS1 双转基因小鼠空间学习记忆能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of  $\beta$ -asarone and tenuigenin on spatial learning and memory ability in APP/PS1 double transgenic mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg · d)	RTQ (s)	跨越隐匿 平台的次数 The frequency of crossing target platform	入水朝向角度 Water entry angle (°)	逃避潜伏期(第 5d) Escape latency (s)
空白对照 Control		33.16 ± 5.77	5.82 ± 1.19	40.50 ± 26.39	8.17 ± 11.49
模型 Model		14.61 ± 4.85 *	1.20 ± 0.69 *	67.52 ± 34.96 *	66.56 ± 20.07 *

分析软件扫描和测定目的条带的光密度值 (optical density, OD), CAT 和 HO-1 以与 GAPDH 的 OD 值的比值作为其表达强度。

### 1.3.6 Western blot 检测 CAT 和 HO-1 蛋白水平的表达

冰盘上分离皮层与海马,剪碎置于 EP 管中,加入 WIP 组织裂解液,研磨裂解 30 min,离心取上清,测定蛋白含量。检查和组装玻璃板,灌注分离胶液,制备胶板,取蛋白样品与上样缓冲液混合煮沸变性,电泳分离,转至 PVDF 膜,加入 5% 脱脂牛奶封闭,加入一抗孵育过夜,HRP 标记二抗孵育,显影成像。扫描膜后应用 ImageJ2x 分析软件分析条带灰度,通过半定量比较分析 CAT 和 HO-1 蛋白的表达水平。

### 1.4 统计方法

该论文数据采用统计软件 SPSS16.0 进行统计分析,数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, Morris 水迷宫数据采用重复测量的方差分析,其他检测方法所得数据采用单因素方差分析或非参数检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 实验结果

### 2.1 $\beta$ -细辛醚+TEN 对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力的影响

#### 2.1.1 Morris 水迷宫实验检测结果

第 5 d 定位航行实验检测发现,与空白对照组相比,模型组小鼠在第三象限停留时间 (residence time in the third quadrant, RTQ) 与跨越隐匿平台的次数明显减少 ( $P < 0.05$ ),而模型组小鼠逃逸潜伏期延长 ( $P < 0.05$ ),入水朝向角度明显增加 ( $P < 0.05$ );与模型组相比,盐酸多奈哌齐组和药物各剂量组 ( $\beta$ -细辛醚+TEN) 的 RTQ 与跨越隐匿平台的次数明显增加 ( $P < 0.05$ ),逃逸潜伏期均明显缩短 ( $P < 0.05$ ),入水朝向角度明显减小 ( $P < 0.05$ ),结果见图 1 和表 1。

续表 1 (Continued Tab. 1)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg · d)	RTQ (s)	跨越隐匿 平台的次数 The frequency of crossing target platform	入水朝向角度 Water entry angle (°)	逃避潜伏期(第 5d) Escape latency (s)
盐酸多奈哌齐 Donepezil Hydrochloride	0.33	29.08 ± 8.30 <sup>#</sup>	4.93 ± 1.38 <sup>#</sup>	45.25 ± 27.45 <sup>#</sup>	25.22 ± 2.34 <sup>#</sup>
药物低剂量组 Medicine-L	18.5	23.53 ± 7.44	3.48 ± 0.89 <sup>#</sup>	47.73 ± 20.16 <sup>#</sup>	32.56 ± 10.04 <sup>#</sup>
药物中剂量组 Medicine-M	37	27.65 ± 6.01 <sup>#</sup>	4.62 ± 0.93 <sup>#</sup>	44.20 ± 17.33 <sup>#</sup>	22.14 ± 8.30 <sup>#</sup>
药物高剂量组 Medicine-H	74	30.85 ± 7.93 <sup>#</sup>	5.16 ± 1.52 <sup>#</sup>	42.09 ± 15.75 <sup>#</sup>	14.07 ± 6.10 <sup>#</sup>

注:与空白对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup>  $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ ; Compared with model, <sup>#</sup>  $P < 0.05$ .

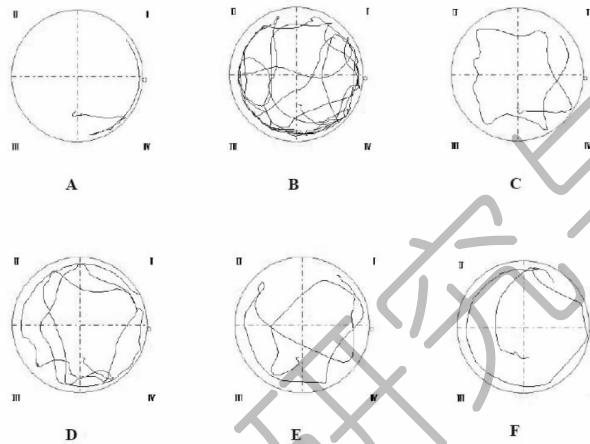


图 1 各组小鼠定位航线实验轨迹图

Fig. 1 An illustration of typical behavioral traces in probe trial

注: A: 空白对照; B: 模型; C: 盐酸多奈哌齐; D: 药物低剂量; E: 药物中剂量; F: 药物高剂量

Note: A: Control, B: Model, C: Donepezil Hydrochloride, D: Medicine-L, E: Medicine-M, F: Medicine-H

### 2.1.2 新物体识别实验检测结果

与空白对照组相比,模型组小鼠 RI 降低 (\*  $P < 0.05$ ); 与模型组相比,盐酸多奈哌齐、 $\beta$ -细辛醚 + TEN 可明显升高 APP/PS1 双转基因小鼠的 RI (<sup>#</sup>  $P < 0.05$ )。

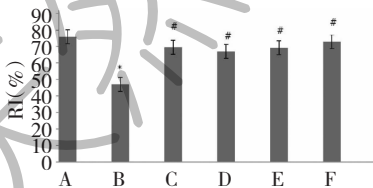


图 2  $\beta$ -细辛醚 + TEN 对 APP / PS1 小鼠认知指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 2 The effect of  $\beta$ -asarone and tenuigenin treatment on the performance of APP/PS1 double transgenic mice in novel object recognition test ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

注: A: 空白对照; B: 模型; C: 盐酸多奈哌齐; D: 药物低剂量; E: 药物中剂量; F: 药物高剂量

Note: A: Control, B: Model, C: Donepezil Hydrochloride, D: Medicine-L, E: Medicine-M, F: Medicine-H

### 2.2 $\beta$ -细辛醚 + TEN 对各组小鼠脑组织 SOD、CAT、GSH-PX 活力和 MDA 含量的影响

与空白对照组比较,模型组 SOD、CAT、GSH-PX 活性明显降低,MDA 含量明显增高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较,盐酸多奈哌齐和药物各剂量组( $\beta$ -细辛醚 + TEN)均能明显升高 SOD、CAT、GSH-PX 活性 ( $P < 0.05$ ),同时均能明显降低 MDA 含量 ( $P < 0.05$ ),且大体上呈现剂量依赖效应(结果见表 2)。

### 2.3 $\beta$ -细辛醚 + TEN 对各组小鼠脑组织 CAT 和 HO-1 的 mRNA 表达影响

与空白对照组比较,模型组小鼠的 CAT 和 HO-1 mRNA 表达均明显降低 ( $P < 0.05$ ),而与模型组相比,盐酸多奈哌齐和药物各剂量组( $\beta$ -细辛醚 + TEN)均能明显升高 CAT 和 HO-1 mRNA 的表达 ( $P < 0.05$ ),且大体上呈现剂量依赖效应(结果见表 3)。

表 2 各组小鼠 SOD、CAT、GSH-PX 活力和 MDA 含量的比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 2 Comparison of SOD, CAT, GSH-PX and MDA in tissues among the groups( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	GSH-PX (U/mg)	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)	CAT (U/mg)
空白对照 Control	609.69 $\pm$ 45.59	7.75 $\pm$ 1.36	33.59 $\pm$ 3.08	30.89 $\pm$ 2.81
模型 Model	314.61 $\pm$ 54.31 <sup>*</sup>	15.17 $\pm$ 4.77 <sup>*</sup>	17.30 $\pm$ 2.15 <sup>*</sup>	13.12 $\pm$ 1.08 <sup>*</sup>
盐酸多奈哌齐 Donepezil Hydrochloride	411.26 $\pm$ 30.17 <sup>#</sup>	10.12 $\pm$ 2.66	23.19 $\pm$ 4.48 <sup>#</sup>	21.78 $\pm$ 3.75 <sup>#</sup>
药物低剂量 Medicine-L	528.72 $\pm$ 30.45 <sup>#</sup>	8.00 $\pm$ 1.94 <sup>#</sup>	29.47 $\pm$ 3.22 <sup>#</sup>	25.17 $\pm$ 2.49 <sup>#</sup>
药物中剂量 Medicine-M	579.82 $\pm$ 38.75 <sup>#</sup>	7.47 $\pm$ 0.99 <sup>#</sup>	30.77 $\pm$ 2.93 <sup>#</sup>	28.03 $\pm$ 3.29 <sup>#</sup>
药物高剂量 Medicine-H	411.26 $\pm$ 30.17 <sup>#</sup>	10.12 $\pm$ 2.66	23.19 $\pm$ 4.48 <sup>#</sup>	21.78 $\pm$ 3.75 <sup>#</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

Note:Compared with control,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; Compared with model,<sup>#</sup> $P < 0.05$ .

表 3 各组小鼠 CAT 和 HO-1 mRNA 表达的比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 3 Comparison of mRNA expression on CAT and HO-1 in tissues among the groups( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg · d)	CAT	HO-1
空白对照 Control		1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.03
模型 Model		0.56 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>	0.49 $\pm$ 0.13 <sup>*</sup>
盐酸多奈哌齐 Donepezil Hydrochloride	0.33	0.95 $\pm$ 0.14 <sup>#</sup>	0.89 $\pm$ 0.27 <sup>#</sup>
药物低剂量 Medicine-L	18.5	0.71 $\pm$ 0.23	0.74 $\pm$ 0.19
药物中剂量 Medicine-M	37	0.88 $\pm$ 0.10 <sup>#</sup>	0.86 $\pm$ 0.28 <sup>#</sup>
药物高剂量 Medicine-H	74	0.97 $\pm$ 0.20 <sup>#</sup>	0.96 $\pm$ 0.30 <sup>#</sup>

注:与空白对照组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

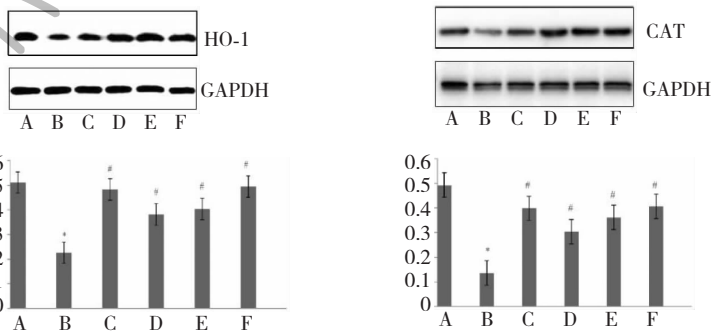
Note:Compared with control,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; Compared with model,<sup>#</sup> $P < 0.05$ .

## 2.4 $\beta$ -细辛醚 + TEN 对各组小鼠 CAT 和 HO-1 蛋白表达的影响

与空白对照组比较,模型组 CAT 和 HO-1 蛋白表达均明显降低(<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ),而与模型组相比,盐酸多奈哌齐、药物各剂量组( $\beta$ -细辛醚 + TEN)均能明显升高 CAT 和 HO-1 的蛋白表达(<sup>#</sup> $P < 0.05$ ),且大体上呈现剂量依赖效应(结果见图 3)。

## 3 讨论与结论

AD 是一种以进行性认知功能减退为特征的中枢神经系统退行性疾病。国内外医疗工作者对 AD 的研究已逾百年,提出了诸多假说,研发了多种药物,但迄今为止,发表机制尚不十分清楚,疗效显著的药物尚不十分明晰<sup>[4]</sup>。而  $A\beta$  级联学说、免疫炎

图 3 各组小鼠 CAT 和 HO-1 蛋白表达的比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Fig. 3 Comparison of protein expression on CAT and HO-1 in tissues among the groups( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

注:A:空白对照;B:模型;C:盐酸多奈哌齐;D:药物低剂量;E:药物中剂量;F:药物高剂量

Note:A:Control,B:Model,C:Donepezil Hydrochloride,D:Medicine-L,E:Medicine-M,F:Medicine-H

症学说和氧化应激学说的提出,为攻克 AD 探索出了一条新途径<sup>[5]</sup>。氧化应激发生于 AD 疾病进展的早期,早于老年斑和神经元纤维缠结的出现<sup>[6]</sup>。

对抗活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)的抗氧化防御体系包括酶系统,如 SOD、GSH-PX 和 CAT,这些酶代表着机体的第一道抗氧化防御体系<sup>[7]</sup>。其中 SOD 是体内天然存在的氧自由基清除剂,其活性的高低可以作为机体清除氧自由基能力的指标,而 GSH-PX 是机体内重要的抗氧化剂,能够清除自由基,发挥抗氧化作用,而 MDA 是体内的脂质代谢产物,是脂质过氧化的主要降解产物,其含量的高低可以作为机体细胞受自由基攻击程度的指标,而 HO-1 等 II 相解毒酶的增强诱导表达对氧化应激损伤的细胞具有明确的防御和保护作用<sup>[8]</sup>。越来越多的实验室研究结果和临床实践发现,氧化应激损伤在 AD 的发病机理和进展中起着至关重要的作用,而针对抗氧化应激损伤的神经保护治疗是一个很有前景的 AD 治疗策略<sup>[9,10]</sup>。虽实验研究结果与流行病学的大数据表明,抗氧化治疗能保护神经元,拮抗 AD 样症状,可是临床上将抗氧化剂维生素等用于治疗 AD 的疗效却不能差强人意,表明如果要在抗氧化这一方向上攻克 AD,需要寻找更加有效地抗氧化途径与策略,即需要激活内源性神经元的抗氧化防御系统,如上调 HO-1 表达等。

中医学认为“痰浊阻滞脑髓”是发病机制复杂 AD 形成过程中的关键环节。如元代医学家危达斋在其所著的《世医得效方》中就曾指出“痰迷心包,健忘失事”。如清代医家陈敬之先生在《石室秘录》中提出“痰积于胸中……使神明不清,而成呆病矣”。《政和圣济总录》就这一症候收录了民间验方——由远志和石菖蒲配伍而成的远志汤<sup>[11]</sup>。《神农本草经》将具有祛痰开窍功效的远志和开窍豁痰效能的石菖蒲归为醒神益智的神药。远志和石菖蒲的主要药理活性成分分别为远志皂苷和 $\beta$ -细辛醚。

本实验主要采用 Morris 水迷宫和新物体识别实验检测各组小鼠的学习和记忆能力。APP/PS1 双转基因小鼠表现出反应迟钝类似 AD 患者的行为学症状,RTQ 与跨越隐匿跨越隐匿平台的次数明显减少,逃逸潜伏期延长,入水朝向角度明显增加;认知指数降低。而远志皂苷和 $\beta$ -细辛醚能增加 APP/PS1 小鼠的 RTQ 与跨越隐匿平台的次数,缩短逃逸潜伏期,减小入水朝向角度;提升认知指数,能明显改善 APP/PS1 小鼠的学习和空间记忆能力。说明

经过远志皂苷与 $\beta$ -细辛醚的协同治疗,APP/PS1 双转基因小鼠的 AD 样症状得到明显改善。

该论文主要以 AD 转基因动物模型 APP/PS1 小鼠为依托,观察 $\beta$ -细辛醚 + TEN 对抗氧化防御体系主要是 SOD、GSH-PX、CAT、MDA 和 HO-1 的影响,进而探讨复方远志汤治疗 AD 的作用机制。实验结果显示, $\beta$ -细辛醚 + TEN 在显著抑制 APP/PS1 双转基因小鼠 SOD、CAT 和 GSH-PX 活性的降低,与 MDA 含量的升高的同时,还能升高 APP/PS1 双转基因小鼠 CAT 和 HO-1 的 mRNA 和蛋白表达,可见 $\beta$ -细辛醚 + TEN 能干预体内的氧化应激反应,通过调节体内抗氧化防御体系来发挥抗 AD 作用。

该论文的研究将为远志汤防治 AD 的临床应用提供实验依据和理论支持,同时为提出防治 AD 的新策略和寻找具有新作用靶点的中药复方提供新思路。

#### 参考文献

- 1 López N, Tormo C, De Blas I, et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment with high sensitivity and specificity. *J Alzheimers Dis*, 2013, 33:823-829.
- 2 Chan KY, Wang W, Wu JJ, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis. *Lancet*, 2013, 381: 2016-2023.
- 3 Zhou L(周鲁), Zhang WH(张卫华), Zeng LH(曾令航), et al. Study on the law of compound prescription of Alzheimer's disease. *Liaoning J Tradit Chin Med* (辽宁中医杂志), 2005, 32:243-244.
- 4 Evans JL, Goldfine ID. A new road for treating the vascular complications of diabetes; So Let's Step on the gas. *Diabetes*, 2016, 65:346-348.
- 5 Huang XS, Chen HP, Yu HH, et al. Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for hypoxic preconditioning-mediated delayed cardioprotection. *Mol Cell Biochem*, 2014, 385(1-2):33-41.
- 6 Guo K(郭可), Miao H(缪红), Wang SS(王树松), et al. *Scutellaria barbata* flavonoids inhibits NFT aggregation and regulatory mechanism in rats induced by composited A $\beta$ . *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2016, 32:2147-2156.
- 7 Lee MS, Lee B, Park KE, et al. Dieckol enhances the expression of antioxidant and detoxifying enzymes by the activation of Nrf2-MAPK signaling pathway in HepG2 cells. *Food Chem*, 2015, 174:538-546.

- 8 Ramesh A, Varghese SS, Doraiswamy JN, *et al.* Herbs as an antioxidant arsenal for periodontal diseases. *J Intercult Ethnopharmacol*, 2016, 5(1):92-96.
- 9 Zeng B, Li Y, Niu B, *et al.* Involvement of PI3K/Akt/FoxO3a and PKA/CREB signaling pathways in the protective effect of fluoxetine against corticosterone-induced cytotoxicity in PC12 cells. *J Mol Neurosci*, 2016, 59:567-578.
- 10 Zeng GF, Zong SH, Fu SW, *et al.* Protective effect of 6-gingerol on PC12 cells induced by amyloid  $\beta$ -protein by PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  signaling pathway. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:1862-1865.
- 11 Bahaer H (巴哈尔·哈德尔), Zhang K (张凯), Wang XL (王晓林), *et al.* Regulation of prescription and medicine from famous Chinese physicians treating Alzheimer's disease. *Chin J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2012, 27:2684-2687.

(上接第 1620 页)

- 16 Moumou M, *et al.* Synthesis and biological evaluation of 9 $\alpha$ - and 9 $\beta$ -hydroxyamino-parthenolides as novel anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24:4014-4018.
- 17 Zaki M, *et al.* Synthesis and anticancer evaluation of novel 9 $\alpha$ -substituted-13-(1,2,3-triazolo)-parthenolides. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57:2591-2594.
- 18 Hexum JK, *et al.* Parthenolide prodrug LC-1 slows growth of intracranial glioma. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25:2493-2495.
- 19 Penthala NR, *et al.* Heck products of parthenolide and melampomagnolide-B as anticancer modulators that modify cell cycle progression. *Eur J Med Chem*, 2014, 85:517-525.
- 20 Neukirch H, *et al.* Parthenolide and its photochemically synthesized 1 (10) Z isomer: chemical reactivity and structure-activity relationship studies in human leucocyte chemotaxis. *Bioorg Med Chem*, 2003, 11:1503-1510.
- 21 Dell'Agli M, *et al.* Inhibition of NF- $\kappa$ B and metalloproteinase-9 expression and secretion by parthenolide derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19:1858-1860.
- 22 Long J, *et al.* Total syntheses of parthenolide and its analogues with macrocyclic stereocontrol. *J Med Chem*, 2014, 57:7098-7112.
- 23 Yang ZJ, *et al.* Syntheses and Biological Evaluation of Costunolide, Parthenolide, and Their Fluorinated Analogues. *J Med Chem*, 2015, 58:7007-7020.
- 24 Kempema AM, *et al.* Synthesis and antileukemic activities of C1-C10-modified parthenolide analogues. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23:4737-4745.
- 25 Kolev JN, *et al.* Discovery of Potent Parthenolide-Based Antileukemic Agents Enabled by Late-Stage P450-Mediated C-H Functionalization. *ACS Chem Biol*, 2013, 9:164-173.
- 26 Tyagi V, *et al.* Chemoenzymatic synthesis and antileukemic activity of novel C9- and C14-functionalized parthenolide analogs. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24:3876-3886.
- 27 Long J, *et al.* Protection-group-free semisyntheses of parthenolide and its cyclopropyl analogue. *J Org Chem*, 2013, 78:10512-10518.
- 28 Long J, *et al.* Total syntheses and structure-activity relationship study of parthenolide analogues. *Tetrahedron Lett*, 2016, 57:874-877.