

# 欧前胡素对 $A\beta_{1-42}$ 致阿尔茨海默病模型小鼠海马组织氧化应激反应的影响

余盈, 于罡, 何蔚\*

赣南医学院药理学教研室 江西省脑血管药理重点实验室, 赣州 341000

**摘要:** 研究欧前胡素对  $A\beta_{1-42}$  致阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 模型小鼠海马组织氧化应激反应的影响及作用机制。脑室内注射  $A\beta_{1-42}$  制备小鼠 AD 模型, 欧前胡素 2.5 mg/kg 和 5.0 mg/kg 在手术后当天开始腹腔注射给药, 1 次/d, 连续给药 13 天。第 14 天, 分离小鼠海马组织, 测定氧化应激反应指标 ROS、MDA、SOD、T-AOC、GSH-Px、CAT、NO 和 iNOS, Western Blot 检测海马组织核蛋白中 Nrf-2 的蛋白表达。研究显示, 欧前胡素可降低海马组织中 ROS、MDA 和 NO 的含量和抑制 iNOS 的活性, 增加 SOD、GSH-Px、CAT 的活力和 T-AOC 的水平, 上调 Nrf2 的蛋白表达。研究结果提示, 欧前胡素可减轻  $A\beta_{1-42}$  致小鼠 AD 后海马组织氧化应激反应, 其机制同欧前胡素抑制活性氧自由基的产生和抑制脂质过氧化反应及增强机体的抗氧化能力有关。

**关键词:** 欧前胡素;  $A\beta_{1-42}$ ; 阿尔茨海默病; 海马; 氧化应激

中图分类号: R338.64; R965

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.8.023

## Effects of Imperatorin on Oxidative Stress Response in the Hippocampus of the Mouse Model of Alzheimer's Disease Induced by $A\beta_{1-42}$

YU Ying, YU Gang, HE Wei\*

Department of Pharmacology, Gannan Medical College, Key Laboratory of Cerebrovascular Pharmacology of Jiangxi Province, Ganzhou 341000, China

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the effects of imperatorin on oxidative stress response in the hippocampus in the mouse model of Alzheimer's disease (AD) induced by intracerebroventricular injection of  $A\beta_{1-42}$ . Imperatorin (2.5 and 5.0 mg/kg) was injected by intraperitoneally once a day for 13 consecutive days from the day of surgery. The levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (T-AOC), nitric oxide (NO) and the activities of inducible nitric oxide synthase (iNOS), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in the hippocampus were determined, and the expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) protein was detected by western blot. The results showed that imperatorin significantly reduced ROS, MDA, and NO contents and iNOS activities, increased levels of SOD, CAT, GSH-Px and T-AOC, and up-regulated the protein expression of Nrf2 as compared with AD model group. Our study suggests that imperatorin treatment can significantly attenuate oxidative stress injury in the  $A\beta_{1-42}$  induced AD mice, and the mechanisms may be associated with the inhibition of production of active oxygen radicals and lipid peroxides, and enhancement of the antioxidant capacity in the mice.

**Key words:** imperatorin;  $A\beta_{1-42}$ ; Alzheimer's disease; hippocampus; oxidative stress

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种中枢神经系统退行性疾病, 其主要的临床表现是进行性记忆障碍、认知缺陷和生活自理能力下降, 严重的患者还产生精神神经症状<sup>[1,2]</sup>。随着社会人口老

龄化程度的加剧, AD 的发病率逐年升高, 已成为严重威胁老年人健康的主要疾病之一, 因此, AD 的防治已成为一个社会倍受关注的问题<sup>[1,2]</sup>。

欧前胡素 (Imperatorin) 是伞形科中药蛇床子、白芷、羌活的有效成分之一, 是一种呋喃香豆素<sup>[3,4]</sup>。研究证实, 欧前胡素具有抗炎、舒张血管平滑肌、抗凝血、抑制血小板聚集、抗血栓形成、阻滞钙通道、抗惊厥和抗氧自由基损伤等作用<sup>[3,5-7]</sup>。本课

收稿日期: 2017-10-23 接受日期: 2018-03-13

基金项目: 江西省研究生创新专项 (YC2017-S419); 江西省卫生计生委中医药科技计划 (2015B045)

\* 通信作者 Tel: 86-797-8169818; E-mail: hewei86087@163.com

课题组前期研究显示,欧前胡素有神经保护作用,欧前胡素对脑缺血损伤有明显的保护作用,另外,欧前胡素有抗痴呆作用,对  $A\beta_{1-42}$  致 AD 痴呆模型小鼠的学习记忆障碍有明显的改善作用<sup>[8]</sup>,由于海马在学习记忆中起着重要作用,本课题拟进一步研究欧前胡素对  $A\beta_{1-42}$  诱导 AD 模型小鼠海马组织氧化应激反应的影响,观察欧前胡素对活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)、总抗氧化能力(Total antioxidant capacity, T-AOC)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)和一氧化氮(Nitric oxide, NO)及诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)的影响,同时观察欧前胡素对海马组织核蛋白中核因子 E2 相关因子 2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 表达的影响,揭示欧前胡素减轻  $A\beta_{1-42}$  诱导 AD 模型小鼠海马组织氧化应激反应及作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

BALB/c 小鼠,  $\delta$ , 体重 20 ~ 25 g, 实验小鼠均由赣南医学院实验动物中心提供, 生产许可证 SCXK(赣)2014-0001。动物实验过程中严格遵守中华人民共和国科学技术部《关于善待实验动物的指导性意见》(国科发财字〔2006〕398号文件)的相关规定,严格遵守美国 NIH 发布的实验动物的保护和指南(NIH 出版 No. 85-23, 1996 修订),并严格遵守用最少的动物数量完成实验并尽量减少实验动物的痛苦的原则。

### 1.2 药品和试剂

欧前胡素(纯度 >99.5%, 批号 110826-201214, 中国食品药品鉴定研究院), 实验前用二甲基亚砜(DMSO, 美国 Sigma 产品)溶解, 吐温-80(Tween 80, 美国 Sigma 产品)助溶后用生理盐水稀释至所需浓度, 溶媒对照液为含 12.5% DMSO + 2% Tween 80 的生理盐水;  $A\beta_{1-42}$ (美国 sigma 公司), ROS(DCFH-DA 荧光检测法), SOD(羟胺法), CAT(钼酸铵法), GSH-Px, NO(硝酸还原酶法)和 iNOS 检测试剂盒(南京建成有限公司产品), MDA(TBA 法)和 T-AOC(ABTS 法)检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司产品), 兔抗鼠 Nrf2 一抗抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司产品), 山羊抗兔  $\beta$ -Actin 二抗抗

体(美国 Cell Signaling Technology 公司产品), BCA 蛋白检测试剂盒(美国 Pierce 公司产品), ETC 化学发光液(美国 Pierce 公司产品), Marker 蛋白(美国 Pierce 公司产品), PVDF 膜(美国 Millipore 公司产品), 其它试剂为市售分析纯。

### 1.3 主要仪器

ChemiDoc™ XRS<sup>+</sup> 成像系统(美国 Bio-Rad 公司), 伯乐电泳系统(美国 Bio-Rad 公司), Thermo Varioskan Flash 全波长读数仪(美国 thermo 公司), TS-1000 型脱色摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司), 多用途旋转摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司), 脑立体定位仪和微推进器(STW-2 和 STW-3C, 成都仪器厂)。

### 1.4 小鼠 AD 模型的建立

脑室内注射  $A\beta_{1-42}$  可诱导小鼠学习记忆障碍, 参照文献<sup>[9,10]</sup>进行定位和脑室内注射, 将  $A\beta_{1-42}$  溶于灭菌注射用水中, 密封后置 37 °C 培养箱内孵育 72 h。将小鼠用 10% 水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 用 10  $\mu$ L 微量注射器在小鼠脑室内(Bregma 点后 0.5 mm, 中线旁开 1.0 mm, 深度 2.3 mm)缓慢注射 410 pmol (3.0  $\mu$ L) 凝聚态  $A\beta_{1-42}$ , 1 min 注完, 注射完后停留 3 min 再拔针。正常对照组小鼠脑室内注射等体积灭菌注射用水。

### 1.5 实验动物分组及给药

BALB/c 小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 分别为正常对照组、AD 模型组、AD 模型 + 欧前胡素 2.5 和 5.0 mg/kg 组, 每组 10 只小鼠。AD 模型 + 欧前胡素用药组动物在手术当天腹腔注射给药, 1 次/d, 连续给药 13 天, 正常对照组和 AD 模型组在相同时间点给予溶媒 10 mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>。第 14 天将动物麻醉后断头取脑, 分离出海马组织测定各项观察指标。

### 1.6 小鼠海马组织中氧化应激反应指标的测定

按照试剂盒说明书配置匀浆介质处理海马组织样本, 严格按照说明书的操作步骤检测小鼠海马组织中 ROS, MDA 和 NO 的含量及 iNOS 的活性, 检测 SOD, GSH-Px, CAT 的活力及 T-AOC。蛋白定量采用 BCA 法。

### 1.7 Western blot 检测 Nrf2 的蛋白表达

取小鼠海马组织, 利用核蛋白提取试剂盒提取核蛋白, BCA 法蛋白定量, 实验各组取等量蛋白质进行电泳, 再转膜至 PVDF 膜; 将转膜好的 PVDF 膜

放置于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液中,室温下反应 1 h;封闭后加一抗兔抗鼠 Nrf2 抗体(1:500)和  $\beta$ -actin(1:1 000),4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;再加用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗溶液(1:1 000),室温下反应 2 h,用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;化学发光法检测,扫描灰度值用 Image J 进行测定分析。

### 1.8 统计学分析

实验数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 14.0 统计软件用单因素方差分析, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

表 1 欧前胡素对  $A\beta_{1-42}$  致 AD 小鼠海马中 ROS,MDA,NO 的含量和 iNOS 活性的影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of imperatorin on the ROS,MDA,NO levels and iNOS activities in the hippocampus in  $A\beta_{1-42}$  induced AD mice( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	ROS	MDA	NO	iNOS
		DCF Fluorescence Intensity(mg · prot)	(nmol/mg · prot)	(nmol/mg · prot)	(U/mg · prot)
对照组 Control	-	233.91 $\pm$ 62.82	3.22 $\pm$ 0.70	3.78 $\pm$ 0.69	0.69 $\pm$ 0.20
AD 模型组 AD model	-	540.05 $\pm$ 93.06 <sup>##</sup>	6.08 $\pm$ 1.05 <sup>##</sup>	5.91 $\pm$ 1.32 <sup>##</sup>	1.19 $\pm$ 0.09 <sup>##</sup>
Imp 低剂量 Imperatorin-L	2.5	434.78 $\pm$ 68.98 <sup>*</sup>	4.58 $\pm$ 0.97 <sup>*</sup>	4.27 $\pm$ 1.06 <sup>*</sup>	1.02 $\pm$ 0.15 <sup>*</sup>
Imp 高剂量 Imperatorin-H	5.0	264.56 $\pm$ 88.10 <sup>**</sup>	3.67 $\pm$ 0.93 <sup>**</sup>	4.00 $\pm$ 0.77 <sup>**</sup>	0.85 $\pm$ 0.24 <sup>**</sup>

注:同对照组比较,<sup>##</sup>  $P < 0.01$ ;同 AD 模型组比较,<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ;<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ 。

Note:Compare with control,<sup>##</sup>  $P < 0.01$ ;Compare with AD model,<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ .

### 2.2 欧前胡素对小鼠海马组织中 SOD,CAT,GSH-P<sub>x</sub> 和 T-AOC 水平的影响

同正常对照组相比,AD 模型组小鼠的海马中 SOD,CAT,GSH-P<sub>x</sub> 和 T-AOC 水平明显降低( $P < 0.01$ );与 AD 模型组比较,欧前胡素 2.5 和 5.0 mg/

## 2 实验结果

### 2.1 欧前胡素对小鼠海马中 ROS,MDA,NO 的含量和 iNOS 活性的影响

与正常对照组相比,AD 模型组海马组织中 ROS,MDA 和 NO 的含量及 iNOS 的活性明显升高( $P < 0.01$ ),欧前胡素 2.5 和 5.0 mg/kg 给药组 ROS,MDA 和 NO 的含量及和 iNOS 的活性明显低于 AD 模型组( $P < 0.05, P < 0.01$ )(表 1),说明欧前胡素可抑制  $A\beta_{1-42}$  致小鼠 AD 后 ROS,MDA 和 NO 的产生,抑制 iNOS 的活性。

kg 给药组可明显升高小鼠海马中 CAT 和 GSH-P<sub>x</sub> 的水平( $P < 0.05, P < 0.01$ ),欧前胡素 5.0 mg/kg 给药组可明显升高小鼠海马中 SOD 和 T-AOC 的水平( $P < 0.05$ )(表 2)。

表 2 欧前胡素对  $A\beta_{1-42}$  致 AD 小鼠海马组织中 SOD,CAT,GSH-P<sub>x</sub> 和 T-AOC 水平的影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of imperatorin on the levels of SOD,CAT,GSH-P<sub>x</sub> and T-AOC in the hippocampus in  $A\beta_{1-42}$  induced AD mice( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	SOD	CAT	GSH-P <sub>x</sub>	T-AOC
		(U/mg · prot)	(U/mg · prot)	(U/mg · prot)	(mmol/g · prot)
对照组 Control	-	120.35 $\pm$ 18.94	13.42 $\pm$ 1.66	73.10 $\pm$ 9.72	0.71 $\pm$ 0.12
AD 模型组 AD Model	-	92.66 $\pm$ 14.52 <sup>##</sup>	6.34 $\pm$ 1.22 <sup>##</sup>	41.76 $\pm$ 9.59 <sup>##</sup>	0.54 $\pm$ 0.09 <sup>##</sup>
Imp 低剂量 Imperatorin-L	2.5	103.75 $\pm$ 14.05	8.28 $\pm$ 1.20 <sup>*</sup>	57.14 $\pm$ 11.72 <sup>*</sup>	0.61 $\pm$ 0.06
Imp 高剂量 Imperatorin-H	5.0	110.62 $\pm$ 15.76 <sup>*</sup>	10.41 $\pm$ 0.90 <sup>**</sup>	65.29 $\pm$ 8.76 <sup>**</sup>	0.67 $\pm$ 0.11 <sup>*</sup>

注:同对照组比较,<sup>##</sup>  $P < 0.01$ ;同 AD 模型组比较,<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ;<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ 。

Note:Compare with control,<sup>##</sup>  $P < 0.01$ ;Compare with AD model,<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ .

### 2.3 欧前胡素对大脑海马中 Nrf2 蛋白表达的影响

Western blot 方法检测结果显示,与正常对照组相比,AD 模型组小鼠海马组织核蛋白中的 Nrf2 蛋白表达明显下调( $P < 0.01$ );与 AD 模型组相比,欧前胡素给药组海马 Nrf2 蛋白表达明显上调( $P <$

0.01)(图 1)。

## 3 讨论

AD 是一种病理过程复杂的疾病,关于其发病机制学说主要有淀粉样肽级联学说、Tau 蛋白致病

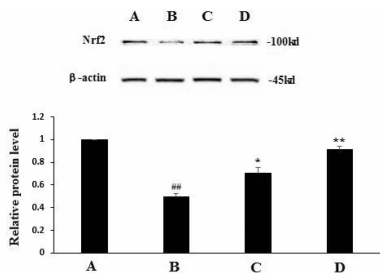


图1 欧前胡素对  $A\beta_{1-42}$  致 AD 小鼠大脑海马中 Nrf2 蛋白表达的影响 ( $n=4, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 1 Effects of imperatorin on the levels of Nrf2 in the hippocampus in  $A\beta_{1-42}$  induced AD mice ( $n=4, \bar{x} \pm s$ )

注:A:对照组,B:AD模型组,C:Imp低剂量组,D:Imp高剂量组;同对照组比较,##  $P < 0.01$ ;同AD模型组比较,\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

Note:A:Control,B:AD Model,C:Imperatorin-L,D:Imperatorin-H;Compare with normal control,##  $P < 0.01$ ; Compare with AD model,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$ 。

学说、氧化应激反应学说、炎症反应学说、细胞内钙超载和兴奋性氨基酸毒性及能量代谢障碍等学说<sup>[1,2]</sup>。给小鼠脑室内注射  $A\beta$  可引起氧化应激反应、炎症反应、细胞内钙超载、兴奋性氨基酸毒性、能量代谢障碍、神经细胞和突触丢失和细胞凋亡等变化,导致学习记忆障碍。目前, $A\beta$  和氧化应激及其触发的级联反应被认为与 AD 的发生和发展有着密切的关系<sup>[1,2]</sup>。

研究表明, $A\beta$  可诱导 ROS 大量产生和激活 iNOS 的活性促使 NO 的产生,另外,堆积的 ROS 作用于细胞膜,促使膜脂质过氧化反应从而引起氧化应激损伤<sup>[1]</sup>。Huang 等<sup>[7]</sup> 研究显示,欧前胡素可增强 CAT、SOD 和 GSH-Px 的活性,抑制 MDA 和 NO 的产生。本实验研究结果显示,欧前胡素可抑制  $A\beta$  诱导 AD 痴呆模型小鼠海马组织中 ROS 的大量堆积,抑制脂质过氧化物 MDA 的产生,抑制 iNOS 的活性和 NO 的产生,减轻  $A\beta$  诱导的氧化应激反应。

Nrf2 在调控机体的内源性抗氧化防御系统中起着重要作用。基础生理状态下,Nrf2 在胞浆内与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1,Keap1) 结合而处于失活状态。抑制 Keap1 的表达,促使 Keap1/Nrf2 解离,Nrf2 转位进入细胞核并同抗氧化反应元件 (Antioxidant responsive element,ARE) 结合,ARE 是一个启动下游编码抗氧化基因表达的增强子,机体几乎所有具有保护作用的抗氧化基因中均存在 ARE,ARE 激活后能增加 SOD、CAT、血红素加氧酶-1 (HO-1)、谷胱甘

肽 S-转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 和 NAD (P) H 醌氧化还原酶 1 (NAD (P) H quinone oxidoreductase-1, NQO1) 等的表达,从而发挥抗氧化应激损伤的作用。文献报道,Nrf2/ARE 信号通路是机体重要的内源性抗氧化应激通路,上调 Nrf2 的表达,促进 Nrf2 的核转录,激活 Nrf2/ARE 信号通路,可加强机体的抗氧化能力,抑制神经退行性疾病如 AD 的氧化应激损伤<sup>[11]</sup>。Prince 等<sup>[12]</sup> 研究显示,欧前胡素能激活 Nrf2/ARE 信号通路。我们的实验显示,AD 模型组海马组织核蛋白中 Nrf-2 的蛋白表达量明显下调,海马组织中 SOD、CAT 和 GSH-Px 及 T-AOC 明显降低,欧前胡素可上调核蛋白中 Nrf-2 的蛋白表达,提高海马组织中 SOD、CAT 和 GSH-Px 及 T-AOC 的水平,提示欧前胡素可能通过激活 Nrf2/ARE 信号通路,增强机体内源性抗氧化能力,减轻  $A\beta$  诱导的氧化应激损伤,发挥神经保护作用。

综上所述,本课题通过给小鼠脑室内注射  $A\beta$  诱导 AD 模型,研究欧前胡素对 AD 小鼠海马氧化应激的影响,揭示其作用的分子机制同下列因素有关:①欧前胡素通过抑制 ROS 堆积和脂质过氧化反应,抑制氧化应激反应;②欧前胡素通过激活 Nrf2/ARE 信号通路,增强机体抗氧化应激损伤的能力。本课题将进一步研究和阐明欧前胡素抗 AD 作用的机制,为欧前胡素临床用于防治 AD 提供理论依据。

#### 参考文献

- 1 Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362: 329-344.
- 2 Alzheimer's Association. 2014 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2014, 10(2): e47-92.
- 3 Liu MQ (刘玖琦), Li ZK (李振坤), Yang HJ (杨洪军), et al. Present status of studying vasoactive of partial monomer composition of umbelliferae [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2008, 14: 74-77.
- 4 Wei XH (尉小慧), Zhang SJ (张树军), Xia GX (夏广新), et al. Inhibition of coumarins in *Cnidium monnieri* Cusson and *Angelica dahurica* on PDE5 [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2006, 41: 100-102.
- 5 Oh HA, Kim HM, Jeong HJ. Distinct effects of imperatorin on allergic rhinitis: imperatorin inhibits caspase-1 activity in vivo and in vitro [J]. *J Pharma Exp Ther*, 2011, 339: 72-81.
- 6 He JY, Zhang W, He LC, Cao YX. Imperatorin induces vasodilation possibly via inhibiting voltage dependent calcium channel and receptor-mediated  $Ca^{2+}$  influx and release [J]. *Eur J Pharm*, 2007, 573: 170-175.