

黄精丸对阿尔茨海默病大鼠大脑的抗氧化作用及 $A\beta_{1-42}$, APP 蛋白表达的影响

杨晶莹¹, 肖移生^{2*}, 姜劼琳², 高萌², 侯吉华²
(1. 江西中医药大学, 南昌 330004;
2. 江西中医药大学 中医学院, 生命科学院, 南昌 330004)

[摘要] **目的:** 探讨黄精丸药方(Huangjingwan, HW)对阿尔茨海默病(AD)大鼠大脑的抗氧化作用及 β -淀粉样多肽 1-42 ($A\beta_{1-42}$), 淀粉样前体蛋白(APP)表达的影响。**方法:** SD 大鼠随机分成正常组, 假手术组, AD 模型组, HW 低、中、高剂量组(相当药丸剂量 1, 3, 9 g·kg⁻¹·d⁻¹组)。给大鼠腹腔注射 1.25% D-半乳糖液(120 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 连续 6 周)后, 再右侧脑室一次性注射 $A\beta_{1-42}$ 10 μ g, 制作大鼠 AD 模型; 造模 2 周后各药物组大鼠灌胃相应剂量试验药物, 假手术组及 AD 模型组大鼠灌胃给生理盐水 1 mL, 每天 1 次。灌胃持续 8 周。采用跳台实验评价各大鼠的学习记忆能力; 体质量 10% 的负荷游泳实验测试各大鼠的体能耐力变化; 比色法检测各大鼠大脑组织超氧化物歧化酶(SOD), 谷胱甘肽还原酶(GR), 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)抗氧化酶系活性, 谷胱甘肽(GSH)与丙二醛(MDA)含量变化; 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测各大鼠大脑组织白细胞介素-1 β (IL-1 β), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), $A\beta_{1-42}$ 与 APP 蛋白含量变化; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各大鼠大脑 APP 蛋白表达变化。**结果:** 与正常组比较, AD 模型组大鼠表现出明显的痴呆状态, 少动易呆卧, 学习反应时间延长, 学习记忆错误次数显著增多, 体能衰减明显, 大脑内抗氧化酶(SOD, GR, GSH-Px)活性及抗炎因子 GSH 水平显著降低, 炎症因子 MDA, IL-1 β , TNF- α 水平显著升高, $A\beta_{1-42}$ 蛋白含量显著升高, APP 蛋白含量显著下降($P < 0.01$)。与 AD 模型组比较, HW 低、中、高剂量均可改善 AD 大鼠的痴呆症状, 提高学习记忆成绩, 改善机体虚弱、提高体能, 升高大脑内 SOD, GR, GSH-Px 活性及抗炎因子 GSH 水平, 降低 MDA, IL-1 β , TNF- α 水平, 并能降低大脑内 $A\beta_{1-42}$ 及升高 APP 蛋白水平($P < 0.05$, $P < 0.01$); 且 1 ~ 9 g·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量范围内的 HW, 随剂量增加, 药效作用越明显。**结论:** HW 有防治 AD 的功能, 这一作用与 HW 可以增强脑内抗氧化系统功能、降低神经炎症反应、降低氧化应激引发的 $A\beta_{1-42}$ 沉积、维持 APP 蛋白表达水平等有关。

[关键词] 黄精丸; 阿尔茨海默病; 抗氧化; β -淀粉样多肽 1-42 ($A\beta_{1-42}$); 淀粉样前体蛋白(APP)蛋白
[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)06-0032-07
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200305
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191017.1626.009.html>
[网络出版时间] 2019-10-17 16:52

Effect of Huangjingwan on Antioxidant Functions and $A\beta_{1-42}$ and APP Protein Expressions in Brain of Alzheimer's Disease Rats

YANG Jing-ying¹, XIAO Yi-sheng^{2*}, JIANG Jie-lin², GAO Meng², HOU Ji-hua²
(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China;
2. College of TCM, Academy of Life Sciences, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Huangjingwan (HW) on antioxidant functions and β -amyloid 1-42 ($A\beta_{1-42}$) and amyloid precursor protein (APP) expressions in the brain of Alzheimer's disease (AD) rats. **Method:** SD rats were randomly divided into normal control group, sham model control group, AD model group, and low, medium, high-dose (equivalent raw drug dose 1, 3, 9 g·kg⁻¹·d⁻¹) HW groups. The AD models

[收稿日期] 20190717(025)
[基金项目] 江西省卫生健康委中医药科研计划课题(2018B014); 江西中医药大学双一流学科建设科研项目(2019SYLXK038)
[第一作者] 杨晶莹, 在读硕士, 从事中药神经保护研究, Tel:0791-87118907, E-mail: 1025621996@qq.com
[通信作者] * 肖移生, 硕士, 副教授, 从事中药神经保护研究, Tel:0791-7118907, E-mail: xys760928@sina.com

were established through intraperitoneal injection with 1.25% *D*-galactose (120 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 6 consecutive weeks) and then one-time right ventricular injection with Aβ₁₋₄₂ (10 μg). Two weeks after modeling, the rats in each HW group received corresponding drugs through intragastric administration, once a day, while the rats in sham model control group, AD model group were given normal saline 1 mL through intragastric administration, once a day. Gastric perfusion lasted for 8 weeks. At the end of the experiment, learning and memory abilities of the rats were assessed by Platform Jumping Test. The changes of physical endurance in rats were tested by 10% weight swimming under load. The activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GSH-Px) antioxidant enzymes and the contents of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in rat brain tissue were detected by colorimetry. The changes of interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α), Aβ₁₋₄₂ and APP protein in rat brain tissues were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot analysis was used to measure the expression of APP protein in rat brain. **Result:** Compared with the normal control group, rats in AD model group showed an obvious dementia state, that is more lying and less movement, longer learning response time, significant increase in the number of learning and memory errors, significant attenuation in physical fitness, significant decrease in the activities of antioxidant enzymes (SOD, GR, GSH-Px) and anti-inflammatory factors GSH in brain, significant rise in the levels of inflammatory factors MDA, IL-1β and TNF-α and the content of Aβ₁₋₄₂ protein, and significant reduction in the content of APP protein in brain (*P* < 0.01). Low, medium and high-dose HW could ameliorate dementia symptoms in AD rats, improve the achievement of learning and memory, antagonize body weakness and increase physical fitness, promote SOD, GR, GSH-Px activities and anti-inflammatory factor GSH level in the brain, reduce the levels of MDA, IL-1β and TNF-α in the brain, decrease the level of Aβ₁₋₄₂ and increase the level of APP protein in the brains of AD rats compared with the AD model group (*P* < 0.05, *P* < 0.01), besides, within the dose range of 1-9 g·kg⁻¹·d⁻¹, HW has a more obvious effect with the increase of dose. **Conclusion:** HW has the effects in preventing and treating AD, which is related to the HW's mechanisms in enhancing the function of antioxidant system in brain, reducing neuroinflammatory reaction and deposition of Aβ₁₋₄₂ induced by oxidative stress, and maintaining the expression level of APP protein.

[**Key words**] Huangjingwan; Alzheimer's disease; antioxidant; β-amyloid 1-42 (Aβ₁₋₄₂); amyloid precursor protein (APP) protein

阿尔茨海默病(AD)是一种发病率高、危害大的老年痴呆,临床表现为患者认知和记忆功能不断减退,日常生活能力进行性丧失,并有各种神经精神症状和行为障碍等,严重影响着老年人的健康^[1]。到目前,有关AD的病因及发病机制尚未完全明确^[2],但可以明确的是脑内抗氧化系统功能失调引发的神经炎症反应及氧化应激在AD病程中起着至关重要的作用^[3-4]。甚至AD患者在未出现特征性病理改变之前即可发生较明显的氧化损伤,脑内处于氧化应激状态、出现神经炎症反应^[5]。一旦脑内有神经炎症反应,会产生过量的丙二醛(MDA),白细胞介素1β(IL-1β),肿瘤坏死因子-α(TNF-α),过氧化物等炎症因子,结果又激活β-,γ-蛋白酶导致淀粉样前体蛋白(APP)被裂解形成β-淀粉样多肽(Aβ)毒性片段^[6],最常见的是产生β-淀粉样多肽1-42(Aβ₁₋₄₂)和/或β-淀粉样多肽1-40(Aβ₁₋₄₀),

Aβ₁₋₄₂比Aβ₁₋₄₀更易于寡聚化及形成不溶的原纤维,故Aβ₁₋₄₂比Aβ₁₋₄₀毒性更大^[7];又有研究表明,脑内过多的Aβ沉积会刺激胶质细胞系统分泌活性自由基及其他炎症因子,进一步加剧氧化应激、神经炎症反应,形成恶性病理循环^[4,8]。由此可知,炎症反应与Aβ间相互作用共同推动AD患者的病情进展。

黄精丸也叫九转黄精丸,为宋代元丰年间《太平惠民和剂局方》所创建,由黄精与当归按1:1黄酒浸泡再蜜制而成,具有补益气血、延年益寿、养生保健等功效,临床多用于美容养生、抗衰老等治疗^[9],这说明该丸剂具有脑神经保护作用。国内有几家药企一直坚持生产该中成药,以非处方药(OTC)方式广受老百姓服用,可见其社会价值与经济价值。但有关该丸相关的实验研究却鲜有报道,有关黄精丸抗痴呆、抗衰老等方面的脑神经保护研究还处于空白区,值得研究。

有研究采用大鼠大脑局灶性脑缺血再灌注损伤模型,发现黄精丸可以改善模型大鼠的脑部功能,升高脑组织超氧化物歧化酶(SOD)与谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平、降低MDA,IL-1 β ,TNF- α 含量,证实黄精丸有抗脑缺血再灌注损伤作用^[10],从实验角度说明该丸剂的脑神经保护功能。那么,黄精丸对老年痴呆有怎样的影响呢,本文就该课题作一探讨,为进一步开发其临床应用价值提供实验依据,有助于完善经典名方的现代研究资料。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性3月龄SD大鼠72只,体重(220 $\pm$ 20)g,由常州卡文斯实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(苏)2016-0010。动物实验方案经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(编号20180915116),全过程严格遵守医学伦理学、动物伦理学相关条例。

1.2 药物与试剂 黄精丸药方由酒黄精、当归2味中药按1:1组成。2味中药均购自江西中医药大学附属中医院中药房,并经江西中医药大学中药鉴定教研室邓可众教授鉴定为正品、符合国家中药临床应用标准。*D*-半乳糖(北京百灵威科技有限公司,批号LT90057); $\text{A}\beta_{1-42}$ 冻干粉(美国Sigma公司,批号120M8711V); $\text{A}\beta_{1-42}$ 与APP酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为1069821,1069820);SOD,谷胱甘肽还原酶(GR),GSH-Px,谷胱甘肽(GSH),MDA,IL-1 β ,TNF- α 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20170613,20180811,20170613,20180811,20170613,20180920,20180922);蛋白提取试剂盒、增强型定量试剂盒及SDS-PAGE凝胶试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号分别为2018090510,2018090510,2018081243);APP抗体(美国Abcam公司,批号Ab15272);内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为16AF0411,127760);其余试剂均为国产分析纯级试剂。

1.3 仪器 EX-TE-03型中药提取罐(上海顺仪实验设备公司),STRIKE 300型旋转蒸发仪(德国ChemTron公司),DTT-2型大鼠跳台仪(上海欣曼科教设备公司),MD-3000型大鼠脑立体定位注射仪(美国BAS公司),752型紫外分光光度计(上海元析仪器有限公司),MK3型多功能酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),EEP102型多功能电

泳仪(碧云天生物技术有限公司),BX-41型显微照相机(日本Olympus公司),Motic Image Advanced3.2图像数据分析软件(德国Motic公司)。

2 方法

2.1 试验药液制备 按本室成熟的中药提取方法进行^[11]。精确称取酒黄精、当归2味中药各100g,混合后用超微粉碎,加10倍质量的蒸馏水浸泡6h,沸水回流1h,滤过,收集提取液,向药渣内再加等量蒸馏水,并再次沸水回流30min,滤过,收集提取液;合并2次提取液,离心,收集上清药液,再进行旋转蒸发浓缩成200mL,为实验用的黄精丸浓缩提取液,每1mL含生药1g。

2.2 动物分组与模型建立 大鼠适应性喂养后,随机分成正常组,假手术组,AD模型组,黄精丸组方低、中、高剂量组(即灌胃黄精丸浓缩液,根据人体用药换算成相当生药剂量1,3,9g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹组),共6组,每组12只动物。参考苏琦等^[12]、黄锐等^[13]报道的*D*-半乳糖联合侧脑室注射 $\text{A}\beta$ 方法建立大鼠AD模型。AD模型组与各治疗组大鼠腹腔注射无菌生理盐水配制的1.25%*D*-半乳糖液(120mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹),连续处理6周;假手术组大鼠每日腹腔注射等量的生理盐水,连续6周;正常组大鼠不做注射处理。第6周末模型组与各治疗组大鼠再接受右侧脑室 $\text{A}\beta_{1-42}$ 一次性注射。提前将10mg的 $\text{A}\beta_{1-42}$ 溶于1mL生理盐水中,除菌,置于37℃水浴中孵育5d使其成凝聚状态。大鼠腹腔注射10%水合氯醛(3mL $\cdot$ kg⁻¹)麻醉,俯卧位固定于大鼠颅脑立体定位仪上;头部剃毛,消毒;矢状位切开颅顶皮肤约1.5cm,暴露颅骨和前囟;参照文献[14]进行右侧脑室注射点定位,坐标为前囟后1.3mm,脑正中中线右侧旁开2.0mm,深度4.0mm;在定位点用牙科钻头钻开颅骨;用微量注射器垂直进针注射 $\text{A}\beta_{1-42}$ 液1 μ L,注射速度约0.2 μ L $\cdot$ min⁻¹;注射完毕后留针5min以保证溶液充分扩散,然后缓慢(约0.5mm $\cdot$ min⁻¹)拔针;用骨蜡封闭钻孔,缝合皮肤,消毒;术后每天给大鼠肌注青霉素10万U抗感染,连续5d。假手术组大鼠同步操作,但海马注射无菌生理盐水1 μ L。以上步骤均要求无菌操作。正常组大鼠不做注射处理。造模进行中各药物组大鼠于2周后灌胃给相应剂量实验药物,假手术组及AD模型组大鼠灌胃给予生理盐水1mL,每天1次,持续灌胃8周。正常组大鼠饲料喂养,无其他处理。第10周后进行各指标检测。

2.3 行为学检测 跳台实验有练习和检测2个部

分,各重复 3 次。练习时大鼠入反射箱内适应 3 min,再通电,大鼠正确反应是跳上平台回避电击,错误反应是跳下平台受到电击,记录练习 5 min 内大鼠第 1 次跳上平台的反应时间及错误反应次数作为学习成绩。24 h 后检测各大鼠的记忆保持能力,即记录第 1 次跳下平台的潜伏期及 5 min 内错误反应次数。若 5 min 内大鼠未离开平台,则潜伏期按 300 s 计算。

2.4 体能耐力检测 以大鼠体质量 10% 的铅皮系于其尾部后,将其平缓放入 30 ℃ 水中,水深 50 cm,让大鼠游泳,重复检测 3 次。大鼠从入水即刻起至大鼠头部浸于水下 10 s 或大鼠头部浸于水下 3 次为疲劳时间。

2.5 大脑组织抗氧化酶系活性检测 脱颈处死大鼠,快速取出大脑,漂洗后制成 10% 脑组织匀浆,4 ℃ , 2 000 × *g* 离心 10 min (25 cm) 后取上清液于 -80 ℃ 冻存待检。按各试剂说明书操作分别检测各大鼠脑组织 SOD,GR,GSH-Px 的活性。SOD 测定采用黄嘌呤氧化酶比色法,GR 测定采用紫外比色法,GSH-Px 测定采用 2-硫-2-硝酸苯甲酸比色法。

2.6 大脑组织抗炎因子与炎症因子水平检测 按各试剂说明书操作分别检测各大鼠脑组织 GSH,MDA,IL-1 β ,TNF- α 水平。比色法测定 GSH 含量,硫代巴比妥酸(TBA)法检测 MDA 含量,用双抗体夹心 ELISA 法测定 IL-1 β 及 TNF- α 水平。

2.7 ELISA 法检测大脑 A β ₁₋₄₂,APP 的含量 按试剂说明书操作,ELISA 法分别检测各大鼠脑组织检测 A β ₁₋₄₂,APP 蛋白含量。

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测大脑 APP 蛋白表达 按蛋白提取试剂盒操作提取大脑组织总

蛋白(以 BCA 法定量蛋白浓度)。以 GAPDH 为上样内参对照,取组织总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转到 PVDF 膜,室温下 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,TBS 缓冲液漂洗,加入 APP 一抗(1:1 000) 4 ℃ 过夜,TBS 缓冲液漂洗,HRP 标记的二抗(1:500)室温孵育 1 h,显影、曝光,用图像分析系统分析 APP 表达差异。

2.9 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 25.0 统计软件分析处理数据。组间比较采用单因素方差分析检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状态观察 AD 模型组各大鼠明显表现出痴呆状态,一般状态差,饮食少,体毛干枯无光泽,对外界刺激反应慢,行动迟缓、少动且易呆卧。造模的第 7 周,AD 模型组有 2 只大鼠死亡,故本组纳入实验统计大鼠共 10 只,其他各组无大鼠死亡。各药物治疗组的大鼠一般状态好于模型组,对外界刺激反应更快、更敏捷,活动好,体毛光滑,且随黄精丸药液剂量增加,大鼠状态更佳。假手术组与正常组的大鼠状态均好,无明显区别。

3.2 对 AD 大鼠跳台实验的学习、记忆成绩的影响 与正常组比较,AD 模型组大鼠痴呆明显,学习反应时间要长,学习记忆错误次数显著增多,记忆潜伏时间显著缩短($P < 0.01$);与 AD 模型组比较,黄精丸各给药组的大鼠痴呆症状明显改善,学习记忆成绩有明显提高,学习记忆的反应与潜伏时间有显著增加($P < 0.01$),学习与记忆的错误次数明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),且剂量与药效关系明显。假手术组与正常组的学习记忆成绩比较差异无统计学意义。见表 1。

表 1 黄精丸对 AD 大鼠跳台实验的学习、记忆成绩和负荷游泳时间的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effect of Huangjingwan on learning and memory achievements of platform jumping test and load swimming fatigue time in AD rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	跳台学习成绩		跳台记忆成绩		游泳时间 / s
			反应时间/ s	错误数/次	潜伏时间/ s	错误数/次	
正常	-	12	24.05 $\pm$ 4.39	1.19 $\pm$ 0.88	255.72 $\pm$ 25.39	1.08 $\pm$ 0.76	243.50 $\pm$ 34.52
假手术	-	12	25.17 $\pm$ 5.46	1.33 $\pm$ 0.94	249.25 $\pm$ 23.45	1.06 $\pm$ 0.72	250.33 $\pm$ 47.42
AD 模型	-	10	184.43 $\pm$ 17.63 ¹⁾	19.57 $\pm$ 4.55 ¹⁾	41.27 $\pm$ 9.08 ¹⁾	18.03 $\pm$ 2.40 ¹⁾	49.93 $\pm$ 17.19 ¹⁾
黄精丸	1	12	124.58 $\pm$ 12.14 ³⁾	15.47 $\pm$ 2.72 ²⁾	85.50 $\pm$ 12.62 ³⁾	13.11 $\pm$ 1.88 ³⁾	85.83 $\pm$ 28.25 ³⁾
	3	12	107.31 $\pm$ 10.69 ³⁾	10.03 $\pm$ 1.64 ³⁾	140.56 $\pm$ 10.11 ³⁾	9.25 $\pm$ 1.67 ³⁾	103.36 $\pm$ 21.96 ³⁾
	9	12	76.69 $\pm$ 12.67 ³⁾	8.03 $\pm$ 2.39 ³⁾	174.47 $\pm$ 11.70 ³⁾	7.64 $\pm$ 1.89 ³⁾	171.56 $\pm$ 25.55 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 AD 模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

3.3 对 AD 大鼠负荷游泳时间的影响 与正常组 比较,AD 模型组大鼠负荷游泳时间显著降低($P <$

0.01);与 AD 模型组比较,黄精丸各给药组的大鼠负荷游泳时间显著增加,且随剂量增加药效越明显($P<0.01$);假手术组与正常组的体能耐力成绩比较差异无统计学意义。见表 1。

3.4 对 AD 大鼠大脑组织抗氧化酶系活性的影响
与正常组比较,AD 模型组大鼠大脑组织的抗氧化酶(SOD,GR,GSH-Px)活性显著降低($P<0.01$);与 AD 模型组比较,黄精丸各给药组的大鼠大脑内抗氧化酶活性明显升高,且随剂量增加药效越明显($P<0.05,P<0.01$);假手术组与正常组的大脑抗氧化酶活性比较差异无统计学意义。见表 2。

3.5 对 AD 大鼠大脑抗炎因子与炎症因子水平的影响
与正常组比较,AD 模型组大鼠大脑抗炎因子 GSH 水平显著下降,炎症因子 MDA,IL-1 β ,TNF- α 水平显著升高($P<0.01$);与 AD 模型组比较,

表 3 黄精丸对 AD 大鼠大脑抗炎因子与炎症因子水平的影响($\bar{x}\pm s$)

Table3 Effect of Huangjingwan on levels of anti-inflammatory and inflammatory factors in brain of AD rats($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	n	GSH/ $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$	IL-1 β / $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$	TNF- α / $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$
正常组	—	12	94.6 $\pm$ 16.1	22.1 $\pm$ 4.3	10.7 $\pm$ 2.7	24.0 $\pm$ 4.2
假手术	—	12	97.1 $\pm$ 13.1	23.8 $\pm$ 5.1	10.8 $\pm$ 3.0	24.6 $\pm$ 4.4
AD 模型	—	10	28.0 $\pm$ 9.5 ¹⁾	138.3 $\pm$ 18.0 ¹⁾	76.9 $\pm$ 6.7 ¹⁾	94.9 $\pm$ 8.8 ¹⁾
黄精丸	1	12	33.3 $\pm$ 6.6 ²⁾	109.2 $\pm$ 15.4 ³⁾	70.8 $\pm$ 5.4 ²⁾	85.1 $\pm$ 5.2 ³⁾
	3	12	44.2 $\pm$ 7.3 ³⁾	89.2 $\pm$ 11.7 ³⁾	56.5 $\pm$ 7.9 ³⁾	74.1 $\pm$ 6.3 ³⁾
	9	12	55.8 $\pm$ 7.3 ³⁾	74.2 $\pm$ 12.4 ³⁾	47.3 $\pm$ 4.8 ³⁾	69.5 $\pm$ 5.4 ³⁾

3.6 对 AD 大鼠大脑 $A\beta_{1-42}$ 表达的影响
与正常组相比,AD 模型组大鼠大脑 $A\beta_{1-42}$ 含量显著升高($P<0.01$);与 AD 模型组比较,黄精丸各给药组大鼠大脑 $A\beta_{1-42}$ 含量明显下降,且随剂量增加药效越明显($P<0.01$);假手术组与正常组比较,大脑 $A\beta_{1-42}$ 差异无统计学意义。见表 4。

表 4 黄精丸对 AD 大鼠大脑 $A\beta_{1-42}$ 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of Huangjingwan on expression of $A\beta_{1-42}$ in brain of

AD rats($\bar{x}\pm s$) $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	n	$A\beta_{1-42}$	APP
正常	—	12	8.6 $\pm$ 1.9	428.7 $\pm$ 21.3
假手术	—	12	8.8 $\pm$ 2.2	434.3 $\pm$ 25.8
AD 模型	—	10	124.7 $\pm$ 9.2 ¹⁾	128.9 $\pm$ 13.3 ¹⁾
黄精丸	1	12	99.2 $\pm$ 8.6 ³⁾	183.2 $\pm$ 10.2 ³⁾
	3	12	83.8 $\pm$ 8.6 ³⁾	222.4 $\pm$ 13.8 ³⁾
	9	12	69.8 $\pm$ 7.0 ³⁾	286.5 $\pm$ 14.4 ³⁾

3.7 对 AD 大鼠大脑 APP 含量和蛋白表达的影响
与正常组比较,AD 模型组大脑 APP 含量蛋白显

表 2 黄精丸对 AD 大鼠大脑抗氧化酶活力的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of Huangjingwan on antioxidant enzymes activity in brain of AD rats($\bar{x}\pm s$) $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	n	SOD	GR	GSH-Px
正常	—	12	941.7 $\pm$ 94.8	105.0 $\pm$ 13.8	506.7 $\pm$ 52.8
假手术	—	12	939.2 $\pm$ 92.0	101.3 $\pm$ 16.0	510.8 $\pm$ 55.6
AD 模型	—	10	346.0 $\pm$ 65.9 ¹⁾	31.0 $\pm$ 7.3 ¹⁾	102.0 $\pm$ 21.7 ¹⁾
黄精丸	1	12	545.0 $\pm$ 74.1 ³⁾	36.7 $\pm$ 6.6 ²⁾	172.5 $\pm$ 19.9 ³⁾
	3	12	630.8 $\pm$ 60.2 ³⁾	55.8 $\pm$ 6.1 ³⁾	213.8 $\pm$ 22.0 ³⁾
	9	12	716.7 $\pm$ 69.6 ³⁾	66.3 $\pm$ 8.7 ³⁾	237.1 $\pm$ 17.4 ³⁾

黄精丸各给药组的大鼠大脑 GSH 含量明显升高,MDA,IL-1 β ,TNF- α 炎症因子的含量明显下降,且呈现剂量关系($P<0.05,P<0.01$);假手术组与正常组的大脑各抗炎因子与炎症因子水平比较差异无统计学意义。见表 3。

著下降($P<0.01$);与 AD 模型组比较,黄精丸各给药组的大鼠大脑内 APP 含量和蛋白表达水平明显升高,且随剂量增加药效越明显($P<0.01$);假手术组大脑内 APP 蛋白水平与正常组比较差异无统计学意义,见表 4。见表 5,图 1。

表 5 黄精丸对 AD 大鼠大脑 APP 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s,n=3$)

Table 5 Effect of Huangjingwan on expression of APP protein in brain of AD rats($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	APP/GAPDH
正常	—	1
假手术	—	0.984 $\pm$ 0.049
AD 模型	—	0.323 $\pm$ 0.057 ¹⁾
黄精丸	1	0.502 $\pm$ 0.048 ³⁾
	3	0.601 $\pm$ 0.068 ³⁾
	9	0.706 $\pm$ 0.075 ³⁾

4 讨论

中医理论对 AD 的病机认识明确,当机体肾气虚衰、肾精不足、脾失健运、气血亏损,以致脑神失

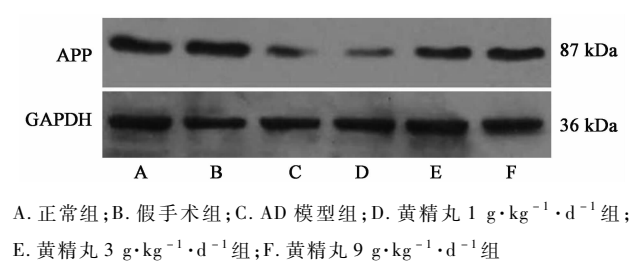


图 1 AD 大鼠大脑 APP 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of APP protein expression in brain of AD rats

养、髓海空虚、心神错乱而发痴呆,故治疗上多采取补肾填精、益气补血等方法^[15]。黄精丸据经典名方制作而成,组方配伍中黄精具有补气养阴、补肾益精、益肾健脾、润肺滋阴等功效,且其药性平和,补而不腻;当归补血养血,两药合用,精血互生,气血双补治痴呆^[9]。可见黄精丸运用于 AD 的防治符合中医理论。

AD 患者痴呆严重、记忆衰退明显,还有较明显的气虚体弱症状,体能远低于同龄人,动则气喘吁吁、头晕目眩、虚汗盗出、自感肌肤无力等状。本研究跳台实验结果证实黄精丸可以明显提高 AD 大鼠的学习记忆成绩,能有效改善痴呆症状;负荷游泳实验发现黄精丸可以提高 AD 大鼠的负荷运动成绩,且随剂量增加效果越明显,这表明黄精丸能改善机体虚弱、提高体能,效果明显。这两组实验论证了黄精丸抗 AD 的有效性。

大量的研究证实,脑组织氧化应激、神经炎症反应是 AD 的重要发病机制之一,贯穿 AD 整个病程^[16]。氧化应激表现为机体代谢过程中产生活性氧簇(ROS)超出抗氧化防御系统对各种自由基的清除能力,最终氧化系统与抗氧化系统失衡,导致组织细胞损伤、病变。脑组织内自由基会损伤神经细胞,造成神经炎症反应,使得 IL-1 β ,TNF- α 等炎症因子分泌增加;另一方面,大量的自由基、炎症因子又会诱发神经元毒性级联反应,促进 A β 蛋白沉积,尤其是 A β_{1-42} 的异常增多及沉积,形成极难溶解的淀粉样斑块,加剧神经炎症反应,促进了 AD 病程^[17-18]。因此,抗氧化、抗炎、清除脑内 A β 是治疗 AD 的重要策略。机体抗氧化防御系统中以 SOD,内源性硫醇抗氧化剂 GSH 及 GSH 合成与代谢调节相关酶 GSH-Px,GR 等最为重要,其活性水平可以反应机体抗氧化、抗炎的强弱^[19],也是 AD 疗效的重要指标体系。

本研究发现 AD 大鼠脑组织的 SOD,GR,GSH-Px 抗氧化酶活性及 GSH 抗氧化因子含量明显低于

正常对照大鼠,反应脂质过氧化程度的 MDA 及 IL-1 β ,TNF- α 炎症因子水平显著升高,A β_{1-42} 含量也明显升高。AD 大鼠经黄精丸治疗后,痴呆症状明显改善,脑组织的抗氧化酶活性及 GSH 含量明显升高、各炎症因子水平及 A β_{1-42} 含量显著下降。这表明黄精丸具有良好的抗氧化、抗神经炎症发挥抗 AD 作用。

临床上黄精丸常用于机体气虚体弱,精血不足,早衰白发等治疗,具有美容养生、抗衰老等功效。但有关黄精丸的实验研究鲜有报道,仅见国内魏宪纯学者团队研究,他们发现黄精丸能降低衰老小鼠皮肤及血清中脂褐质含量^[9],升高皮肤组织 SOD 活性^[20],提高老化小鼠对自由基防护能力,增加皮肤胶原纤维含量,使胶原纤维排列致密,对衰老皮肤损伤具有保护、减轻或修复作用^[21]。另外本课题组曾发现黄精丸可以改善脑缺血再灌注损伤大鼠的脑部功能,升高脑组织 SOD 与 GSH-Px 活性、降低 MDA,IL-1 β ,TNF- α 含量,显示出抗氧化、抗炎作用^[10]。本研究采用 AD 大鼠模型,得出相似的结果,进一步证实黄精丸的抗氧化、抗炎、抗 AD 的神经保护功能。

APP 是 A β 的前体蛋白,其与 AD 的发生发展也有着密切的联系。正常情况下 APP 被 α -蛋白酶水解形成可溶性肽片段,如果被 β -和 γ -蛋白酶顺序性分解下则产生病理性的 A β ^[6,22]。故有研究通过抑制 APP 蛋白表达来抑制 A β 生成做为治疗 AD 努力的方向之一^[23]。新近的研究表明,APP 是一种广泛分布于体细胞膜上的跨膜糖蛋白,类似细胞表面受体,它在哺乳动物大脑中具有重要的生理作用,尤其是维护突触膜稳定及功能、调控神经元存活、调控 γ -氨基丁酸(GABA)神经传递、神经损伤后修复等功能中发挥重要作用^[24];大脑 APP 蛋白水平越低,机体的记忆力就越差,神经越易受损,这与 APP 维持突触稳定、可塑性有关^[25]。由此可见,维持脑内 APP 蛋白正常表达与正常代谢十分重要。本研究采用 ELISA 检测大脑 APP 蛋白含量,发现 AD 大鼠大脑 APP 蛋白表达下降,明显低于正常对照大鼠的水平,黄精丸能升高 AD 大鼠脑内 APP 蛋白表达水平,再采用 Western blot 检测验证,其结果与 ELISA 结果相似,这表明黄精丸可以调控脑内 APP 蛋白的表达。吴燕春等^[26]采用快速老化 SAMP8 小鼠的 AD 研究,发现在 AD 小鼠大脑内 APP 表达是升高的。AD 动物模型中的 APP/PS1 双转基因小鼠大脑内 APP 表达也是增高的^[27]。本研究中 AD 小鼠大脑内 APP 蛋白水平是降低的,与这两类 AD 小鼠脑内

APP 表达水平相反,推测可能与 AD 模型有关。黄精丸能否下调 APP/PS1 双转基因小鼠大脑内升高的 APP,因受制动物成本的缘故,未能探讨。

本研究从实验角度验证黄精丸对 AD 具有抗氧化、抗炎、调控 APP 表达、抗 A β 聚集等功能,显示出良好的防治 AD 应用前景,但黄精丸对 AD 脑内 APP,A β 详细调控机制有待深入研究。

[参考文献]

[1] ALZHEIMERS ASSOCIATION. 2018 Alzheimer ´ s disease facts and figures [J]. Alzheimer ´ s Dement, 2018, 14(3) :367-429.

[2] 黄洋,孙英新,曾妙,等. 补阳还五汤及其组分治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019,25(19) :212-218.

[3] 闫妍,韩冉,高俊峰,等. 地黄引子改善 AD 大鼠脑组织线粒体生物合成与氧化损伤的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(21) :105-110.

[4] SINGH A, KUKRETI R, SASO L, et al. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases [J]. Molecules, 2019, 24(8) :E1583.

[5] PRASAD K N. Oxidative stress and pro-inflammatory cytokines may act as one of the signals for regulating microRNAs expression in Alzheimer´s disease[J]. Mech Ageing Dev, 2017,162:63-71.

[6] CHEN L, ZHANG C, HAN Y, et al. Gingko biloba Extract (EGb) inhibits oxidative stress in neuro 2A cells overexpressing APPsw[J]. Biomed Res Int, 2019, doi: 10.1155/2019/7034983.

[7] 刘晓杰,杨威,祁金顺. 氧化应激与阿尔茨海默病[J]. 生理学报,2019,64(1) :87-95.

[8] 王琳琳,胡镜清,张治国,等. 中药及复方减少阿尔茨海默病氧化损伤研究探析[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2019,21(1) :38-43.

[9] 魏宪纯,李明杰,张春蕾. 九转黄精丸对衰老小鼠皮肤及血清中脂褐质含量影响的研究[J]. 中医药信息,2009,26(6) :51-52.

[10] 周志军,肖移生. 黄精丸对大鼠大脑局灶性脑缺血损伤保护作用研究[J]. 井冈山大学学报:自然科学版, 2012,33(1) :88-90.

[11] 肖移生,高萌,侯吉华. 黄精地龙提取液对老年痴呆大鼠脑内烟碱型乙酰胆碱受体的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(14) :140-145.

[12] 苏琦,徐德恩. 电针治疗对 AD 大鼠学习记忆能力及细胞周期蛋白 P53、P21 表达的影响[J]. 重庆医学, 2013,42(21) :2444-2448.

[13] 黄锐,吴锋,赵健,等. 电针联合天麻素对阿尔茨海默病大鼠海马 CA1 区沉默信息调节因子 2 同源蛋白 1 和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活子 1 α 表达的影响[J]. 针刺研究,2018,43(3) :140-145.

[14] PAXINOS G, WATSON C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* [M]. 7th edition. San Diego: Academic Press,2014.

[15] 肖苗苗. 中医药治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. 中医学报,2012,27(5) :631-632.

[16] BARAI P, RAVAL N, ACHARYA S, et al. *Bergenia ciliata* ameliorates streptozotocin-induced spatial memory deficits through dual cholinesterase inhibition and attenuation of oxidative stress in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.115.

[17] CUI B, ZHANG S, WANG Y, et al. Farrerol attenuates β -amyloid-induced oxidative stress and inflammation through Nrf2/Keap1 pathway in a microglia cell line [J]. Biomed Pharmacother,2019,109:112-119.

[18] 李娟,姚遥,韩怀钦,等. 苦参碱对 LPS 诱导的阿尔茨海默病小鼠模型学习记忆功能和脑内神经炎症的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(24) :134-139.

[19] SAICICZ S, SIMOVICM O, KORACB, et al. Activity of antioxidant defense enzymes and glutathione content in some tissues of the Belgrade (b/b) laboratory rat[J]. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, 1997,117(2) :173-179.

[20] 张春蕾,李明杰,魏宪纯. 九转黄精丸对衰老小鼠皮肤组织 SOD 活力及脂褐质含量影响的研究[J]. 黑龙江医药科学,2008,31(6) :80.

[21] 魏宪纯,李明杰,张春蕾. 九转黄精丸对衰老小鼠皮肤组织形态学的影响[J]. 中国中医药科技,2010,17(3) :278.

[22] STEINER H, FUKUMORI A, TAGAMI S, et al. Making the final cut: pathogenic amyloid- β peptide generation by γ -secretase [J]. Cell Stress, 2018, 28, 2 (11) : 292-310.

[23] 陈阳阳,孔立红,孙国杰,等. “益肾调督”针灸法对 AD 大鼠血清 A β 及海马 APP 表达的影响[J]. 时珍国医国药,2016,27(9) :2289-2291.

[24] TANG B L. Amyloid precursor protein (APP) and GAB aergic neurotransmission[J]. Cells,2019, 8(6) :E550.

[25] RICE H C, MALMAZET D D, SCHREURS A, et al. Secreted amyloid- β precursor protein functions as a GABA $_B$ R1a ligand to modulate synaptic transmission [J]. Science, 2019, 363(6423) : eaao4827.

[26] 吴燕春,包传红,阎莉,等. 绞股蓝正丁醇提取物对快速老化小鼠 A β 蛋白的影响[J]. 中成药,2016,38(9) :1898-1902.

[27] JANKOWSKY J L, FADALE D J, ANDERSON J, et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide *in vivo*: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase[J]. Hum Mol Genet, 2004,13(2) :159-170.

[责任编辑 周冰冰]