

12种中药单体对 APP^{swe} / PS^{ΔE9} 转基因痴呆模型小鼠学习记忆作用的比较

袁树民, 王冬梅, 高凯, 董伟, 曹兴水, 秦川, 张连峰

(中国医学科学院北京协和医学院实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 利用 APP^{swe} / PS^{ΔE9} 转基因阿尔茨海默病小鼠模型探索治疗痴呆有效的中药单体。方法 根据目前的研究资料, 选定12种中药单体, 加入鼠粮中对 APP^{swe} / PS^{ΔE9} 双转基因小鼠在5月龄开始进行治疗, 以安理申作为阳性药对照, 4周后进行水迷宫实验, 并与安慰剂组小鼠进行比较。结果 在水迷宫实验中, 与安慰剂组相比, 吴茱萸碱能够显著缩短寻找平台的潜伏期, 显著增加穿过原平台区的次数。结论 吴茱萸碱能够显著改善 APP^{swe} / PS^{ΔE9} 痴呆模型小鼠的学习记忆能力。

【关键词】 阿尔茨海默病; 中药单体; 吴茱萸碱; 水迷宫

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)04-0031-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.04.008

Comparison of 12 Kinds of Herbal Monomers on the Learning and Memory effect on APP^{swe} / PS1^{ΔE9} Transgenic Mice

YUAN Shu-min, WANG Dong-mei, GAO Kai, DONG Wei, CAO Xing-shui,
QIN Chuan, ZHANG Lian-feng

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To analyze the therapeutic effects of 12 herbal monomers on APP^{swe} / PS1^{ΔE9} transgenic mice, and to explore promising candidates for treatment of Alzheimer disease. **Methods** APP^{swe} / PS1^{ΔE9} transgenic mice at age of 5 months were randomized into 14 groups. One group was vehicle group (placibo) and one group was Aricept group as positive control. The other 12 groups were used for treatment with the 12 herbal monomers, respectively. The littermates of no-negative mice were used as normal control. Morris water-maze test was performed at 4 weeks after treatment to assess the nervous function. **Results** The evodiamine-treated mice showed significantly decurtated latency and increased number of crossings of the removed-platform area in Morris water maze test, compared with that of the vehicle group. **Conclusions** Evodiamine treatment can improve the learning and memory ability in APP^{swe} / PS1^{ΔE9} double-transgenic mice.

【Key words】 Alzheimer disease; Herbal monomers; Evodiamine; Morris water; Transgenic mice

老年性痴呆 (Alzheimer disease, AD) 是一种慢性、进行性的神经退行性疾病, 主要表现为认知功

能障碍。其病理特征为相对特异性的老年斑、神经纤维缠结并伴有神经元的损伤^[1, 2]。由于 AD 的发

[基金项目] 卫生部项目, 实验动物和人类疾病动物模型资源扩展 (200802036) 和十一五新药专项支持 (2009ZX09501-026)。

[作者简介] 袁树民 (1973 -), 男, 博士, 主要研究方向: 神经退行性疾病病理生理学。

[通讯作者] 张连峰, zhanglf@cnilas.org; 秦川, chuanqin@vip.sina.com

病机制复杂,目前还没能完全阐明其发病机制,也没有一种方法可以完全逆转神经系统的退行性变进程,目前的治疗方法主要是针对 AD 的发病机制,治疗的最重要的目的是改善患者认知功能损伤,提高患者生活质量,主要的治疗措施包括:胆碱酯酶抑制剂治疗、基因载入治疗、抗氧化剂治疗、他汀类药物、非甾体抗炎药治疗、激素替代疗法、阻断兴奋性中毒、疫苗治疗、免疫治疗。这些治疗措施,能够短暂提高记忆力,但由于自身的局限性而很难在临床长期应用,当然,最有前景的基因治疗,还需要进一步的探索研究^[3]。因此开发新的治疗药物成为当前研究的热点之一。中药有效成分是已被世界广泛认同的医药宝库,随着中药在治疗老年痴呆方面研究进展,近年来,国内外学者在中药单体治疗老年痴呆症,及其作用机制方面进行了大量的基础研究,有些单体如银杏叶提取物(EGb)、二苯乙烯苷、山茱萸有效单体成分 5-羟甲基糠醛、知母皂甙元已在临床上取得了明显的成效,更多的还处于实验研究阶段,包括金丝桃甙、大黄素、蛇床子素、黄皮酰胺^[4]。随着中药治疗老年痴呆症的实验研究进展,揭示了部分中药复方及单体成分的作用机理,为临床应用中药治疗老年痴呆症提供了科学的依据。我们依据当前的研究资料,挑选了 12 种低毒中药单体,选择标准是:对中枢神经系统具有改善作用,提高机体免疫力、改善微循环,抗氧化,抗炎且毒性小,来源广泛。用 APP^{swe}/PS^{ΔE9} 转基因小鼠模型通过水迷宫实验进行筛选对阿尔茨海默病有效的药物。

1 材料和方法

1.1 材料和设备

APP^{swe}/ps^{ΔE9} 双转基因小鼠和同窝野生型小鼠本实验室繁育[SCXK(京)2005-0013],共计 300 只,雌雄各半;水迷宫设备为:荷兰 Noldus 公司 Ethovision XT 监测分析软件, Morris 水迷宫系统。中药单体由青大研究所生产,阳性对照药安理申片由卫材(中国)药业有限公司生产,批号:H20070181(表 1)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及给药方式:小鼠分为野生小鼠组(WT)、转基因小鼠安慰剂组(vehicle)和安理申治疗组(Aricept),12 组转基因小鼠中药单体治疗组,每组 20 只。各组小鼠年龄、性别、体重相匹配,对照组给予常规鼠粮,治疗组在粮食中加入相应剂量的药物,按每只 20 g 小鼠每天摄取 3 g 鼠粮计算,持续给药 4 周。

1.2.2 Morris 水迷宫实验测试小鼠学习记忆能力:治疗 4 周结束后,各组小鼠进行水迷宫实验,圆形水池直径为 100 cm,平台在水下 0.5 cm,水温保持在 22℃~24℃,水中加入牛奶粉,使其不透明,在水池的上方小鼠能看到的的地方张贴醒目的几何图形,作为小鼠寻找平台的线索。水迷宫按东南西北分为 1、2、3、4 区域,平台即第 5 区域,位于第 4 区域内。水迷宫实验过程分为连续 5 天的隐藏平台获得实验和第 5 天的空间探索实验两部分。隐藏平台获得实验时,每天训练小鼠 2 次,每次使同一只小鼠在不同区域下水,而不同的小鼠在相同的位置下水,每次

表 1 中药单体及阳性对照药
Tab. 1 Herbal monomers and the drug for control

组别 Group	中药单体名称 Herbal monomers	纯度 Purity	实验剂量 Dosage (mg/kg/d)
抗氧化、抗炎 Anti-oxidation and anti-inflammation	白藜芦醇 Resveratrol	95%	150
	茶多酚 Tea polyphenols	90%	100
	虎杖甙 Polydatin	75%	100
	吴茱萸碱 Evodiamine	80%	100
改善微循环,提高免疫力 Improving microcirculation and immunity	丹参素 Salvianic acid	85~90%	100
	丹参酮 IIA Tanshinone II	85~90%	100
	黄芪皂甙 Astragaloside	85~90%	100
	磷酸川芎嗪片 Chuanxiongzine	-	50
对中枢神经系统有直接作用 Direct effect on CNS	葛根素 Puerarin	95%	100
	延胡索乙素 Tetrahydropalmatine	95%	100
	一叶萩碱 Cirinine	95%	80
	槲皮素 Quercetin	75%	100
对照药 Control drug	安理申 Aricept	-	2

游泳时间最长为 60 s,找到平台,并在上面停留 3 s 以上者,视为找到平台,60 s 内没有找到平台的要将其引导到平台上,停留 15 s,小鼠没有找到平台按 60 s 计算潜伏期。每次训练间隔 1 h 左右。第 5 天,隐藏平台实验结束 1 h 后立即进行空间探索实验,把放在第五区的平台拿掉,让小鼠在第二区域入水,记录小鼠 60 s 内在原平台区出现的次数。隐藏平台获得实验检测小鼠学习获得能力,空间探索实验检测小鼠空间记忆能力^[5-7]。

1.2.3 统计学方法:

利用 SPSS 16.0 进行统计分析,水迷宫实验小鼠寻找平台的潜伏期,采用重复测量数据的方差分析,空间探索实验中在平台区出现的频次用单因素方差分析,数据采用均数 ± 标准差表示, $P < 0.05$ 被认为有显著差异。

2 结果

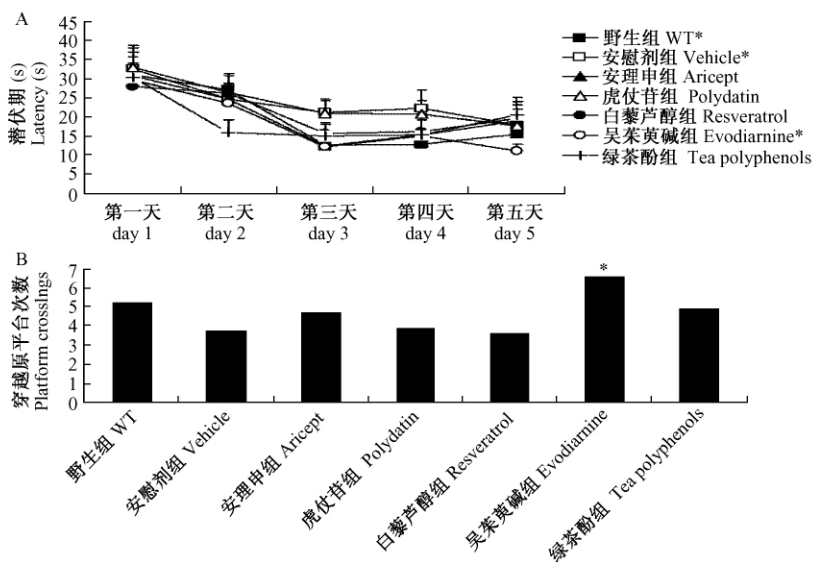
水迷宫实验结果显示,与安慰剂组相比,吴茱萸碱能够显著缩短潜伏期,并显著增加穿越原平台区的次数 ($P < 0.05$ 图 1A 图 1B)。抗炎、抗氧化组的绿茶酚、白藜芦醇,改善微循环,提高免疫力组的丹参酮 IIA、丹参素、黄芪皂甙、磷酸川芎嗪片与安慰剂组相比也能够缩短潜伏期,但统计上差异没有显著性 ($P > 0.05$ 图 1A 图 2A)。与安慰剂组相比,

绿茶酚、磷酸川芎嗪、一叶萩碱、槲皮素能够增加穿越原平台区的次数,但统计上差异没有显著性 ($P > 0.05$ 图 1B,图 2B,图 3B)。

3 讨论

根据现有的研究资料,本研究选择了 12 种中药单体,利用目前公认的痴呆小鼠模型 $APP^{swc}/PS^{\Delta E9}$ 双转基因小鼠模型,通过 Morris 水迷宫实验对所选的 12 种中药单体进行评价。Morris 水迷宫实验是一种强迫实验动物游泳,学习寻找隐藏在水中平台的一种实验,主要用于测试实验动物对空间位置感和方向感的学习记忆能力,是学习记忆研究的首选经典实验。

本研究发现吴茱萸碱能够显著缩短水迷宫实验中小鼠寻找平台的潜伏期,并能够显著增加穿过原平台区的次数,说明吴茱萸碱可以提高 $APP^{swc}/PS^{\Delta E9}$ 小鼠的学习记忆损伤,吴茱萸碱来源于芸香科植物吴茱萸的干燥将近成熟果实。目前研究表明其具有以下作用:吴茱萸碱主要通过诱导肿瘤细胞凋亡、阻遏细胞周期和抑制肿瘤组织侵袭和转移抑制肿瘤^[8,9];使痛觉神经钝化而发挥其止痛作用^[10];吴茱萸碱为非刺激性香草酸受体激动剂,与辣椒素的抗肥胖作用相似,它同时诱导热量的产生和消散,防止内脏周围脂肪的积聚和体重增加起到减肥

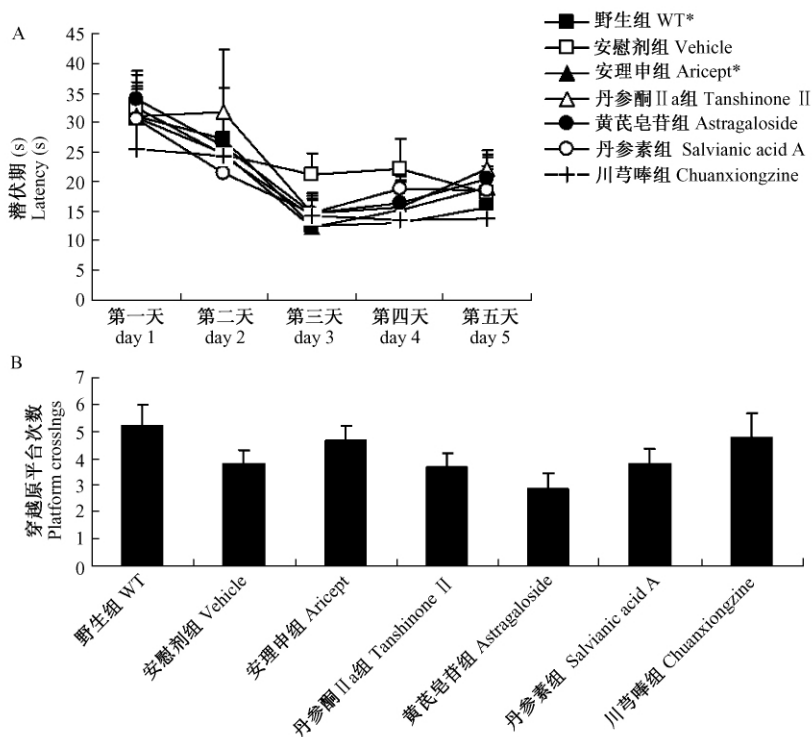


A 隐藏平台实验潜伏期分析;B 空间探索实验穿越原平台区次数分析。* $P < 0.05$

图 1 通过水迷宫实验检测抗氧化、抗炎类中药单体对 $APP^{swc}/PS^{\Delta E9}$ 转基因小鼠的作用

Note: A: Determination of escape latency in hidden platform acquisition training; B: Analysis of the numbers of crossing of the removed-platform area in the probe trial testing. * $P < 0.05$

Fig. 1 Analysis of the anti-oxidative and anti-inflammatory effects of herbal monomers on the AD mice assessed by Morris water maze test



A 隐藏平台实验潜伏期分析; B 空间探索实验穿越原平台区次数分析。* $P < 0.05$

图 2 通过水迷宫实验检测改善微循环、提高免疫力类中药单体对 APP^{swc}/PS^{ΔE9} 转基因小鼠的作用

Note: A: Determination of escape latency in hidden platform acquisition training; B: Analysis of numbers of crossing of the removed-platform area in the probe trial testing. * $P < 0.05$

Fig. 2 The effects of herbal monomers on improving microcirculation and immune function in AD mice models assessed by Morris water maze test

的作用^[11];在 RAW264.7 细胞中,吴茱萸碱可以抑制低氧诱导的环氧化酶 2 (COX-2) 和诱导型一氧化氮合酶的表达。同时可以抑制前列腺素 E2 的释放,从而抑制低氧诱导的炎症反应。进一步的研究发现吴茱萸碱可以通过抑制 HIF-1 α 而抑制 COX-2 mRNA^[12]。Han-Chieh Ko 等^[13]研究表明,吴茱萸碱可以抑制 LPS 诱导的神经小胶质细胞的炎症反应,它可抑制诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达,从而降低降低一氧化氮的产生。

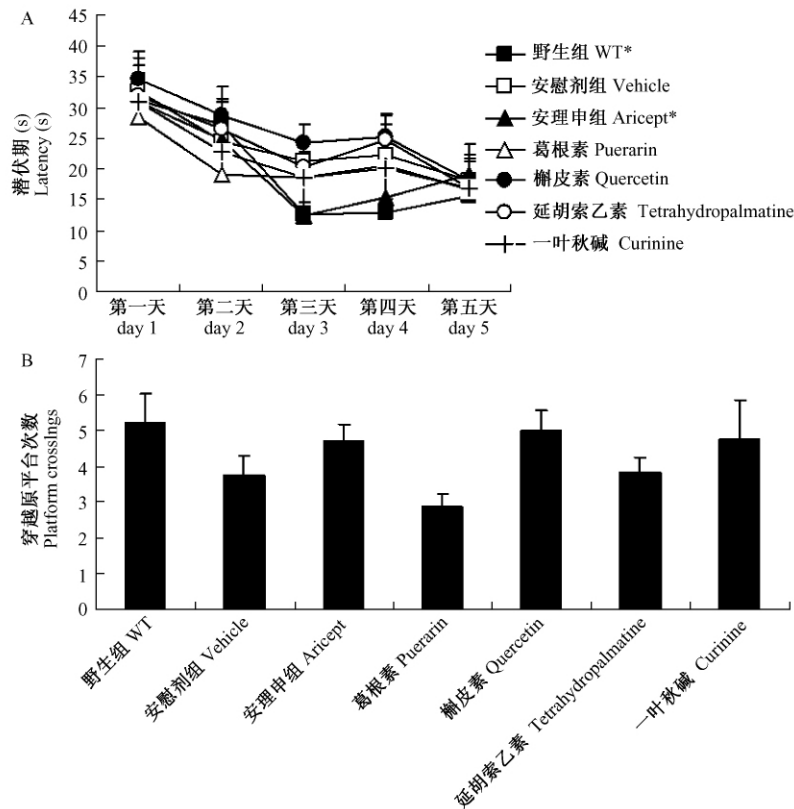
本研究也发现绿茶酚、磷酸川芎嗪片、丹参酮 II A、丹参素、一叶萩碱、黄芪皂甙、槲皮素均具有改善 APP^{swc}/PS^{ΔE9} 双转基因小鼠模型学习记忆损伤,但统计学上没有显著差异。

绿茶酚存在于多种食物、药用植物中,最主要是在茶叶中,它可以通过血脑屏障,具有抗氧化、抗炎、清除自由基,改善认知等多方面的神经保护作用。Lu 等利用 D-半乳糖和 β 25-35 分别注射到 C57BL/6 小鼠腹腔,成功制成学习记忆损伤模型,研究茶多酚对其的作用,通过行为学检测,发现茶

多酚可以明显改善模型小鼠的学习记忆损伤^[14]。

川芎嗪主要来源于植物川芎的根茎,具有抗血小板聚集、扩张小动脉、改善微循环和脑血流的作用,近期研究显示川芎嗪对海马神经元的 Ca^{2+} 通道有阻滞作用,可以明显保护海马神经元。而海马神经元与记忆密切相关。Zhang 等^[15]利用 C57BL/6J 小鼠颈背部皮下注射 D-半乳糖所造成的损伤模型,研究川芎嗪对学习记忆的影响,在成功造模后给予川芎嗪治疗,并采用水迷宫检测,结果证明,川芎嗪能够显著改善模型鼠的学习记忆能力。赵琳等^[16]利用 AlCl₃ 灌胃和 D2gal、NaNO₂ 联合腹腔注射造模两种方法模拟 AD 动物模型,研究川芎嗪对学习记忆的影响,结果显示川芎嗪对两种方法诱导的 AD 模型鼠的学习记忆障碍均具有改善作用,并认为这种作用是川芎嗪提高了机体的抗氧化水平而实现的。

丹参素和丹参酮 II A 主要来源于唇形科植物丹参和甘西鼠尾草的根。丹参素具有抗脑缺血损伤作用,丹参素可明显缩小脑梗死面积,改善神经功



A 隐藏平台实验潜伏期分析; B 空间探索实验穿越原平台区次数分析。* P < 0.05

图 3 通过水迷宫实验检测作用于中枢神经系统类中药单体对 APP^{swc}/PS^{ΔE9} 转基因小鼠的作用

Note: A: Determination of escape latency in hidden platform acquisition training; B: Analysis of numbers of crossing of the removed-platform area in the probe trial testing. * P < 0.05

Fig. 3 The effects of herbal monomers on improving central nervous system function in AD mice models assessed by Morris water maze test

能缺损,并减少脑水含量。另外丹参素还具有抑制血小板的聚集改善各脏器微循环的作用。对于丹参酮 IIA 对中枢神经系统的作用目前研究的很少,其主要用于治疗心脏病。其具有改善微循环的作用^[17]。

一叶秋碱来源于植物一叶萩的嫩枝叶及根。能兴奋脊髓,增强反射及肌肉紧张度。体内代谢较快,无蓄积。动物实验表明,小量能增强心肌收缩,并有抑制胆碱酯酶作用。

黄芪皂甙可以调节机体免疫功能,增强巨噬细胞和自然杀伤细胞的杀伤性,并可直接调节对肌体有重要免疫功能的 T 细胞和 B 细胞的分化增生。黄芪皂甙对多种自由基有良好的清除作用。

本研究结果显示虎杖苷、白藜芦醇、葛根素、延胡索乙素对 APP^{swc}/PS^{ΔE9} 双转基因小鼠模型学习记忆能力没有影响。

虎杖苷主要来源于蓼科植物虎杖干燥根茎和

根,虎杖甙是其中一种天然活性成分,其能够抗氧化,阻止微循环中白细胞粘连,降血脂、抗脂质过氧化,抗病原微生物,镇咳、平喘抗菌、抗病毒保肝等作用。由于其所具有的抗氧化,降低血脂,因此对中枢神经系统有保护作用^[18]。

白藜芦醇广泛存在于种子植物中,尤其在新鲜的葡萄皮中含量最高。具有延缓衰老、调节血脂、保护心脑血管、抗肿瘤活性、抗菌抗病毒、抗肝炎,还具有抗氧化自由基以及雌激素样作用。白藜芦醇作为治疗 AD 的药物,最主要的原因是,白藜芦醇在中枢神经系统中具有非常强的抗氧化作用,可以清除氧自由基;另外白藜芦醇可以促进 Aβ 降解,减少其聚积;白藜芦醇可以抑制花生四烯酸所诱导的神经细胞的凋亡^[19, 20]。

葛根素来源于植物野葛干燥的根,徐晓虹等^[21, 22]研究发现,葛根素长期治疗可通过影响海马谷氨酸能和 γ 氨基丁酸能系统改善雌激素剥夺引

起的记忆损伤,该作用可能与葛根素的植物雌激素样活性有关,葛根素可使卵巢摘除小鼠海马组织的谷氨酸和 γ 氨基丁酸水平恢复正常。

延胡索乙素主要来自罂粟科植物延胡索块茎,目前对它的研究发现,其对中枢神经系统的影响具有镇痛作用,用于催眠、镇静与安定作用,抑制大鼠脑伏核神经元的自发放电频率。

综上所述,我们所选择的中药有效成分对于中枢神经系统作用的机制包括:改善血流动力学,改善微循环,抗氧化及自由基清除功能,以及调节免疫,调节炎症细胞的活化。大多数中药单体在不同程度上可以改善脑组织功能,但对于模型小鼠行为学影响不明显,而吴茱萸碱明显改善模型小鼠学习记忆能力损伤,因此有待于进一步的研究,以期作为治疗老年痴呆的候选药物。

参考文献:

- [1] Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2004, 430:631 - 639.
- [2] Dickson DW. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies [J]. *Neurobiol Aging*, 1997, 18:S21 - 26.
- [3] Shah RS, Lee HG, Xiongwei Z, et al. Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2008, 62:199 - 207.
- [4] 卫泽武, 郝笛, 张梅玲. 中药治疗老年痴呆症的实验研究近况 [J]. *中医药信息*, 2005, 22 (5):14 - 16.
- [5] Shiryayev N, Jouroukhin Y, Giladi E, et al. NAP protects memory, increases soluble tau and reduces tau hyperphosphorylation in a tauopathy model [J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 34:381 - 388.
- [6] Cox MM, Tucker AM, Tang J, et al. Neurobehavioral abnormalities in the dysbindin-1 mutant, sandy, on a C57BL/6J genetic background [J]. *Genes Brain Behav*, 2009, 8: 390 - 397.
- [7] Imbimbo BP, Hutter-Paier B, Villetti G, et al. CHF5074, a novel gamma-secretase modulator, attenuates brain beta-amyloid pathology and learning deficit in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 156:982 - 993.
- [8] Zhang Y, Wu LJ, Tashiro S, et al. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(1):83.
- [9] Ogasawara M, Suzuki H. Inhibition by evodiamine of hepatocyte growth factor-induced invasion and migration of tumor cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(4):578.
- [10] 徐诺. 吴茱萸碱和吴茱萸次碱的抗伤害感受作用与抗炎作用 [J]. *国外医学·中医中药分册*, 1999, 21(3):42.
- [11] Kobayashi Y, Nakano Y, Kizaki M, et al. Capsaicin-like anti-obese activities of evodiamine from fruits of *Evodia rutaecarpa*, a vanilloid receptor agonist [J]. *Planta Med*, 2001, 67 (7):628.
- [12] Choi YH, Shin EM, Kim YS. Anti-inflammatory principles from the fruits of *Evodia rutaecarpa* and their cellular action mechanisms [J]. *Arch Pharm Res*, 2006, 29(4):293 - 297.
- [13] Ko HC, Wang YH, Liou KT. Anti-inflammatory effects and mechanisms of the ethanol extract of *Evodia rutaecarpa* and its bioactive components on neutrophils and microglial cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 555:211 - 217.
- [14] Lu JH, Guo J, Yang WH. Effects of green tea polyphenol on the behaviour of Alzheimer's disease-like mice induced by D-galactose and A β 25-35 [J]. *Zhong Yao Cai*, 2006, 29(4):352 - 354.
- [15] Zhang C, Wang SZ, Zuo PP, et al. Protective effect of tetramethylpyrazine on learning and memory function in D-galactose-lesioned mice [J]. *Chin Med Sci J*, 2004, 19: 180 - 184.
- [16] 赵琳, 魏敏杰. 川芎嗪对阿尔采末病模型小鼠学习记忆能力的影响及其机制初探 [J]. *中国药理学通报*, 2008, 24 (8): 1088 - 1092.
- [17] 王文俊, 姚智. 丹参素对单核巨噬细胞功能影响的体外实验 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1995, (8):390.
- [18] 王方岩. 虎杖甙抗肺缺血/再灌注损伤作用及其机制初探 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2008, 1:14.
- [19] Azcoitia I, Moreno A, Carrero P, et al. Neuroprotective effects of soy phytoestrogens in the rat brain [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2006, 22:63 - 69.
- [20] de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49:405 - 430.
- [21] 徐晓虹, 张洁净, 姜科声. 葛根素对雌激素剥夺小鼠学习记忆行为的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2005, (9):16 - 18.
- [22] 徐晓虹, 章子贵. 葛根素对 D 半乳糖致衰老小鼠记忆行为和海马突触结构的影响 [J]. *药理学报*, 2002, 37(1):1 - 4.

修回日期)2010-10-11