淫羊藿苷伍用三七总皂苷对 Aβ-淀粉肽$_{25-35}$侧脑室注射所致大鼠行为异常及脑组织 AchE活性的影响

肖幸丰[1],郑明[1],瞿林海[1],张幸国[2],楼宜嘉[1*] (1.浙江大学药学院,浙江 杭州 310031; 2.浙江大学医学院附属第一医院,浙江 杭州 310003)

摘要:目的 研究淫羊藿苷(icariin, ICA)伍用三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)对 Aβ-淀粉肽$_{25-35}$(beta-amyloid peptide$_{25-35}$, β-AP$_{25-35}$)大鼠侧脑室注射空间学习和记忆障碍的影响。方法 取经跳台法和八臂迷宫法筛选的正常大鼠采用侧脑室注射 β-AP$_{25-35}$,制成阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)大鼠模型,应用跳台法和八臂电迷宫法判断给药前后大鼠的空间学习和记忆能力;采用化学比色法测定脑组织中乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE)活性。结果 与溶剂组大鼠相比,模型大鼠八臂电迷宫错误次数明显增加($P<0.05$),跳台学习和记忆错误次数明显增加($P<0.01$)。大鼠造模前后连续 ig ICA+PNS 5+40, 10+80mg/kg 21 d后,模型大鼠上述行为学指标得到明显改善($P<0.05$),脑组织 AchE活性降低($P<0.05$)。结论 ICA伍用 PNS(5+40, 10+80mg/kg)对 β-AP$_{25-35}$侧脑室注射所致大鼠空间学习和记忆障碍有显著的预防和治疗作用,该作用与降低脑组织中 AchE活性呈相关性。

关键词:淫羊藿苷;三七总皂苷;阿尔茨海默病模型;跳台法;八臂电迷宫法;乙酰胆碱酯酶

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2005)03-0178-04

Effects of icariin combined with the Panax notoginseng saponins on behavior and acetylcholinesterase activity induced by β-amyloid peptide 25-35 lateral ventricle injection in rats

XIAO Xing-feng[1], ZHENG Ming[1], QU Lin-hai[1], ZHANG Xing-guo[2], LOU Yi-jia[1*] (1. *College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou* 310031, *China*. 2. *Pharmacy Department, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou*, 310003, *China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the preventive and therapeutical effects of icariin (ICA) combined with the Panax notoginseng saponins (PNS) on spacial learning and memory dysfunction of Alzheimer's disease (AD) model in rats induced by β-amyloid peptide$_{25-35}$ (β-AP$_{25-35}$) lateral ventricle injection. **METHODS** After successfully trained by 8-arm radial electric maze and step-down passive avoidance test, the rats were administrated lateral ventricle injection with β-AP$_{25-35}$ followed by one week of drug pre-treatment. Spacial learning and memory ability were evaluated by 8-arm radial electric maze and step-down passive avoidance test after a period of

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30472112);浙江省中医药管理局点资助项目(No. 2003KF001);浙江省科技厅计划重点资助项目(No. 2004C33106)。

作者简介:肖幸丰,男,27岁,硕士研究生,研究方向:中药药理学。

* 通讯作者:楼宜嘉, Tel/Fax: 86-571-87217206, E-mail: yijialou@zju.edu.cn

http://www.chinjmap.com

drug therapy. The activity of acetylcholinesterase (AchE) in the brain was determined with visible spectrophotometry. **RESULTS** The learning and memory abilities of rats by lateral ventricle injection with β-AP_{23-35} significantly weakened compared with those in the saline group through 8-arm radial electric maze test ($P<0.05$) and step-down passive avoidance test ($P<0.01$). The combination (ICA + PNS 5 + 40, 10 + 80 mg/kg, ig) significantly protected and improved all the evaluated indexes of the model groups after three weeks ($P<0.05$), moreover, reduced the activity of AchE in the brain ($P<0.05$). **CONCLUSION** The combination can prevent and improve AD model rats established by lateral ventricle injection of β-AP_{25-35}, which is related with inhibition of the AchE activity in the brain.

KEY WORDS: icariin; Panax notoginseng saponins; Alzheimer's disease model; 8-arm radial electric maze; step-down passive avoidance test; acetylcholinesterase

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性认知障碍和记忆力损坏为主的中枢神经系统退行性疾病,目前认为其发病机制主要和β-淀粉样肽(beta-amyloid peptide, β-AP)脑内沉积引起神经元丢失及神经激素调节、氧化损伤和胆碱能不足等病理过程有关[1]。目前的AD治疗药物多集中在神经递质释放、受体功能改变等相对下游的靶点,或仅作用于AD形成过程的单一靶点,尚不能从根本上预防和治疗AD的发生。近年来以淫羊藿为主伍用其他药材改善AD患者临床症状以及动物AD模型行为的研究时有报道[2,3]。现已证明了淫羊藿苷(icariin, ICA)具有植物雌激素样作用和抗氧化作用,而这些生物活性作用与神经功能维持密切相关[4~7]。最新的研究表明,三七总皂苷(Panax notoginseng saponins, PNS)在改善胆碱功能、抗细胞调亡、调节性激素水平等方面有显著作用[8],这些药理作用对防治AD有积极意义。另有文献报道[9],在人参、丹参存在时,可促进ICA的吸收、分布并延迟其消除,呈现协同增效作用。笔者考虑三七和人参主要活性成分均为人参皂苷,与ICA伍用可能呈现相似的药动学特征。

本实验从循证医学的角度出发,结合ICA和PNS最新的研究成果,从早期、多靶点干预着手,探索ICA伍用PNS对Aβ-淀粉肽$_{23-35}$(beta-amyloid peptide$_{25-35}$, β-AP_{25-35})侧脑室注射造模AD大鼠的疗效,并阐明其部分可能的作用机制,以期为该组合物防治AD提供部分实验依据。

1 材料

1.1 药物

采用现代工艺分别从中药三七和淫羊藿中提取的ICA和PNS组合而成。PNS由浙江大学药学院药理与毒理研究室和浙江大学医学院附属第一医院药剂科中试提取纯化制备,含量为93.34%,批号:04101001;ICA从浙江康恩贝制药股份有限公司购得。ICA含量为50%,批号:030722。

1.2 试剂及器材

β-$AP_{25\sim35}$(Sigma产品),培磊能(甲磺酸二氢麦角碱,杭州赛诺菲圣德拉堡民生制药有限公司 批号:04070372),乙酰胆碱酯酶(AchE)试剂盒(南京建成生物工程研究所 批号:20041102),戊巴比妥钠(中国医药集团上海化学试剂分公司 批号:F20030816),0.9%氯化钠注射液(浙江平湖莎普爱思制药有限公司 批号:040711),脑立体定向仪(江湾IC型 上海奥尔科特生物科技有限公司),ZH-3000八臂电迷宫(安徽省正华生物仪器设备有限公司),YLS-3T型跳台记录仪(山东医学科学院设备站)

2 方法

2.1 AD动物模型制备

雄性SD大鼠76只,6周龄(浙江省医学科学院实验动物中心,二级,动物合格证号:SCXK(浙)2003-0001),手术时体重290~320g。大鼠用戊巴比妥钠(40mg/kg, ip)麻醉后,侧脑室注射β-$AP_{25\sim35}$造模,剂量5μg/只(2.5μg/μl),进针位置:AP 0.8mm, ML 1.5mm, DV 3.5mm。溶剂对照注射2μl无菌生理盐水[10]。

2.2 给药方法及剂量设置

参考同类实验[11]进行动物分组,按等比设置低、中、高剂量,对应ICA + PNS分别为:2.5 + 20, 5 + 40, 10 + 80 mg/kg(中剂量依据2005版中国药典临床人用生药推荐剂量经动物体表面积折算而来)。阳性药选用培磊能,剂量为0.4 mg/kg,用0.5% CMC-Na溶液制成混悬液,溶剂组和模型组采用蒸馏水。所有组均采用ig给药,给药容量1mL/100g体重。经过八臂电迷宫和跳台筛选,入选动物按成绩随机分成溶剂组,模型组,低、中、高剂量组及阳性组共6组,每组12只动物。造模手术前预给药1周,手术后连续给药2周。

2.3 学习记忆能力测试

2.3.1 八臂迷宫法 训练方法:测试前先让大鼠适应八臂迷宫全景数分钟。第一步让大鼠头对起始1号臂光源放置并设该臂为安全区,其他区通50v锯齿波型交流电适应3min。第二步切换安全区至3号臂,同时记时,记录大鼠错误选择次数(以四肢进入非安全区的臂为错误一次)。进入安全区后使之停留1min,巩固记忆。连续测试5d,每天1次,使记忆达到稳态。达标标准为错误次数2次以下(不包括2次)。每天训练时间固定在12:00~17:00。

测试方法:手术后第8天开始进行连续5d的八臂迷宫测试,测定时间同训练。前5d测试适应时间和巩固记忆时间分别调整为30s和1min,其余和训练方法保持一致。第5天测试完毕后1h目标安全区由3臂换至7臂进行第二次测试,适应时间亦为30s,同法记录错误选择次数。比较各组第1天和第5天换臂后错误选择次数的差异。

2.3.2 跳台法 将动物放入反应箱内适应环境3min,然后立即通电24V交流电。动物受到电击,其正常反应是跳回平台以躲避伤害性刺激。多数动物可能再次或多次跳至铜栅

上,受到电击后又迅速跳回平台,如此训练 5min,并记录每只大鼠受到电击的错误次数 24h后重做测验,此即记忆保持时间。每天测定时间固定在上午 9:00~12:00。将大鼠置于平台上,通电并计时,记录 5min内跳下平台错误次数。比较各组差异。

2.4 AchE测定

大鼠断头处死,冰台上快速取脑组织,称重,投入液氮 5min,转入 -80℃冰箱保存备用,将冻存的脑组织用预冷的生理盐水制成 10%脑组织匀浆并分装。测定前解冻脑组织匀浆,用 AchE试剂盒测定脑组织 AchE,并以牛血清白蛋白为标准品用考马斯亮蓝法测定脑组织匀浆蛋白含量。AchE活力以每 1mg蛋白的比活力表示。

3 统计学处理

所有结果均用 $\bar{x} \pm s$表示,采用单因素方差分析(one-way, ANOVA)比较各剂量组间差异。

4 结果

4.1 对大鼠行为学学习和记忆的影响

4.1.1 八臂电迷宫实验 β-$AP_{25\sim35}$大鼠侧脑室内注射能增加第 1天及第 5天改变安全区后的错误次数($P<0.01$)。阳性药培磊能降低第 1天、第 5天改变安全区后的错误次数($P<0.01$)。ICA伍用 PNS中、高剂量(5+40,10+80mg/kg)能显著减少同法造模 AD大鼠第 1天测试错误选择次数($P<0.01$)和第 5天换臂后的错误选择次数($P<0.05$)。见表 1。

表 1 淫羊藿苷伍用三七总皂苷对 Aβ-淀粉肽$_{25\sim35}$侧脑室注射大鼠空间学习及记忆能力改善作用(八臂电迷宫法)

Tab 1 Protective effects of icariin combined with the Panax notoginseng saponins on spacial learning and memory ability of AD rats induced by β-amyloid peptide$_{25-35}$ lateral ventricle injection. (8-arm Radial electric maze)

组别	剂量(mg/kg, ig)	n	错误次数	
			第 1天	第 5天换臂后
生理盐水组	-	11	0.18±0.18	0.63±0.08
模型组	-	11	0.46±0.20##	0.77±0.11##
ICA+PNS	2.5+20	10	0.28±0.21	0.71±0.10
	5+40	12	0.22±0.17**	0.66±0.11*
	10+80	11	0.19±0.18**	0.67±0.13*
培磊能	0.4	12	0.18±0.16**	0.63±0.10**

注:通过 lg(x+1)变换后方差分析:# $P<0.05$,## $P<0.01$ vs生理盐水组;* $P<0.05$,** $P<0.01$ vs模型组

Note: ANOVA via lg(x+1) transformation: # $P<0.05$,## $P<0.01$ vs saline group; * $P<0.05$,** $P<0.01$ vs model

4.1.2 跳台实验 β-$AP_{25\sim35}$大鼠侧脑室内注射能造成大鼠空间学习和记忆能力降低($P<0.01$)。阳性药培磊能能改善这种降低($P<0.05$, $P<0.01$)。ICA伍用 PNS中、高剂量亦能改善 β-$AP_{25\sim35}$造模的 AD大鼠学习成绩($P<0.05$)和记忆成绩($P<0.01$),见表 2。

4.2 AchE活力

阳性药培磊能能显著降低 β-$AP_{25\sim35}$侧脑室注射造模后大鼠脑组织 AchE活力($P<0.05$)。ICA伍用 PNS组合中、高剂量组能降低造模后大鼠脑组织中 AchE活力($P<0.05$),见表 3。

表 2 淫羊藿苷伍用三七总皂苷复方对 Aβ-淀粉肽$_{25\sim35}$侧脑室注射大鼠学习和记忆能力的改善作用(跳台法)

Tab 2 Protective effects of icariin combined with the Panax notoginseng saponins on learning and memory ability of AD rats induced by β-amyloid peptide$_{25-35}$ lateral ventricle injection. (Step-down passive avoidance test)

组别	剂量(mg/kg, ig)	n	学习错误次数	记忆错误次数
生理盐水组	-	11	1.4±0.5	0.5±0.5
模型组	-	11	2.5±0.8##	1.3±0.6##
ICA+PNS	2.5+20	10	1.8±0.8	0.9±0.6
	5+40	12	1.7±0.7*	0.5±0.5**
	10+80	11	1.6±0.7*	0.4±0.5**
培磊能	0.4	12	1.7±0.7*	0.5±0.5**

注:方差分析:# $P<0.05$,## $P<0.01$ vs生理盐水组;* $P<0.05$,** $P<0.01$ vs模型组

Note: ANOVA: # $P<0.05$,## $P<0.01$ vs saline group; * $P<0.05$,** $P<0.01$ vs model

表 3 淫羊藿苷伍用三七总皂苷复方对 Aβ-淀粉肽$_{25\sim35}$侧脑室注射大鼠脑组织 AchE活力的抑制作用

Tab 3 Inhibition of the activity of acetylcholinesterase in the brain of AD rats induced by β-amyloid peptide$_{25-35}$ lateral ventricle injection.

组别	剂量(mg/kg, ig)	n	AchE活力(U/mg pro)
生理盐水组	-	11	1.41±0.18
模型组	-	11	1.57±0.19
ICA+PNS	2.5+20	10	1.45±0.17
	5+40	12	1.40±0.14*
	10+80	11	1.36±0.15*
培磊能	0.4	12	1.34±0.14*

注:方差分析:* $P<0.05$,** $P<0.01$ vs模型组

Note: ANOVA: * $P<0.05$,** $P<0.01$ vs model

5 讨论

现代研究表明,β-AP是构成 AD病人脑特征性病变老年斑的核心成分,也是神经元缠结以及血管淀粉样病变的生化基础[12]。本研究采用大鼠侧脑室注射聚集态的 β-AP_{25-35}模拟体内 β-AP的沉积,以此作为 AD模型。行为学结果表明,该方法能造成大鼠空间学习和记忆障碍,是一种比较简单又可行的方法。

本研究采用 ICA伍用 PNS组合物对 β-AP_{25-35}大鼠侧脑室注射空间学习和记忆障碍有明显改善作用。跳台法测定表明,ICA伍用 PNS组合物可以减少造模大鼠被动回避的错误次数,八臂电迷宫实验也表明,ICA伍用 PNS组合物能减少第一天错误选择的次数,上述结果均提示 ICA伍用 PNS能改善 β-AP_{25-35}造模大鼠长期学习记忆能力。此外,通过改变目标区的方式,发现能降低错误选择的次数,提示该组合物尚能预防造模后大鼠学习能力的降低。

本研究采用 ICA伍用 PNS组合物尚能降低 β-AP_{25-35}造

http://www.chinjmap.com

模大鼠脑组织中 AchE活性。AchE抑制剂被认为是治疗 AD的经典用药,用于改善 AD病人脑内胆碱能不足。最新的研究表明,AchE和 β-AP有密切的相关性,β-AP能促进老年斑部位 AchE的过度表达,进一步研究显示,该作用是 β-AP毒性作用于细胞表达的结果[13]。因此,在 AD形成初期脑组织中 AchE活性反映了 β-AP在神经细胞上的沉积。本研究采用侧脑室注射方式,使进入侧脑室的 β-AP_{25-35}通过脑脊液循环分布至全脑,短期内呈现脑组织中的 AchE活性升高。现已明确[1],β-AP可通过兴奋性毒性、过氧化等机制损伤神经细胞,导致神经细胞突触传递过程中胆碱能递质分泌减少。本研究中 ICA伍用 PNS组合物能改善 β-AP侧脑室注射引起的大鼠学习和记忆能力下降,提示该作用部分是由于该组合物能降低造模 AD大鼠脑组织中的 AchE活性而改善胆碱功能。此外,由以上分析说明该组合物发挥促智作用还可能与影响 β-AP在神经细胞上沉积有关。

文献报道[4,8],ICA和 PNS均对雌激素水平有调节作用。而雌激素具有神经保护作用,通常 AD疾病伴随着雌激素水平的下降[7]。故推测调节雌激素水平可能是该组合物发挥神经保护作用途径之一。本研究所用 PNS经分析由人参皂苷 Rg_1, Rb_1, Re以及三七皂苷 R组成。文献报道人参皂苷 Rg_1, Re在一定剂量范围内能通过抗氧化作用对抗 β-AP诱导的神经元损伤[14]。ICA作为一种植物黄酮也具有显著的体外抗氧化作用[5],故推测该作用亦可能是该组合物发挥神经保护作用防治 AD的作用机制之一。

ICA和 PNS分别为补益中药淫羊藿和三七的活性成分,本研究采用现代方法对两者有效部位进行提取并科学配伍,从多角度预防和治疗 β-AP沉积引起的大鼠空间学习和记忆能力下降,是一种较新的治疗策略,为早期防治 AD药物研究提供了有益的思路。

致谢:本研究 PNS提取受到本研究室赵青威硕士生的帮助,含量测定由浙江大学药学院药物分析与代谢研究室完成,谨表示诚挚的谢意。

参考文献

[1] Jeffrey L. Alzheimer's disease[J]. N Engl J Med, 2004, 35: 56.

[2] 王建菊.益气聪明汤加味治疗阿尔茨海默病 68例疗效观察[J]. 新中医, 2003, 35(9): 68.

[3] 赵长安,周国平,李恩.补肾填精方对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆行为的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(19): 3911.

[4] Wang ZQ, Lou YJ. Proliferation-stimulating effects of icaritin and desmethylicaritin in MCF-7 cells[J]. Eur J Pharmacol, 2004, 3: 147.

[5] Wang YK, Huang ZQ. Protective effects of icariin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H2O2 in vitro[J]. Pharmacol Res, 2005, 52 (in press).

[6] Zandi PP, Anthony JC, Khachaturian AS, *et al*. Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: the Cache County Study[J]. Arch Neurol, 2004, 61: 82.

[7] Hogervorst E, Williams J, Budge M, *et al*. The nature of the effect of female gonadal hormone replacement therapy on cognitive function in post-menopausal women: a meta-analysis[J]. Neurosci, 2000, 101(3): 484.

[8] Cheng Y, Shen LH, Zhang JT. Anti-amnestic and anti-aging effects of ginsenoside Rg1 and Rb1 and its mechanism of action[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(2): 143.

[9] 邹节明,孟杰,颜正华,等.中药复方有效成分淫羊藿苷的药代动力学研究[J]. 中草药, 2002, 33(1): 55.

[10] 徐叔云,汴如濂,陈修.药理实验方法学[M]. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 846.

[11] 蒋小岗,顾振纶,谢梅林,等. 复方 909对 D半乳糖诱发痴呆模型大鼠学习记忆和血液流变学指标的影响[J]. 中国血液流变学杂志, 2004, 14(1): 54.

[12] Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease[J]. Free Radic Biol Med, 1997, 23(1): 134.

[13] Sberna G, Saez-Valero J, Li QX, *et al*. Acetylcholinesterase is inceased in the brains of transgenic mice expressing the C-terminal fragment (CTI00) of the beta-amyloid protein precursor of Alzheimer's disease[J]. J Neurochem, 1998, 71: 723.

[14] 张晓冬,李万亥.人参皂甙 Rg1, Re对 β淀粉样蛋白诱导原代培养海马及皮质神经元损伤的保护[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(10): 941.

收稿日期: 2004-11-15

中国知网 www.cnki.net