

隐丹参酮对 APP/PS1 双转基因模型小鼠学习记忆和抗氧化能力的影响

梅峥嵘¹, 张芳艳², 严鹏科¹, 司徒冰¹, 谭湘萍¹, 刘培庆^{3*} (1.广州医学院第三附属医院, 广州 510150; 2.重庆市药品检验所, 重庆 401121; 3.中山大学药学院, 广州 510080)

摘要: 目的 本实验利用 APP/PS1 双转基因模型小鼠, 观察隐丹参酮对小鼠行为学习及抗氧化能力的影响。方法 选用 APP/PS1 双转基因模型小鼠, 将其随机为 5 组, 另取同窝阴性小鼠作为正常对照组, 每组 10 只, 3 个月龄后开始给药。给药 4 个月后, 通过行为学实验测试小鼠学习记忆能力的变化; 采用分光光度法测定血清和脑组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)的含量。结果 Morris 水迷宫实验显示, APP/PS1 双转基因模型小鼠逃避潜伏期较正常组明显延长, 原象限停留时间明显缩短。隐丹参酮组小鼠逃避潜伏期较模型组明显缩短, 原象限停留时间明显延长。APP/PS1 双转基因模型小鼠血清和脑组织 GSH-Px、SOD 活力下降, MDA 含量明显增多; 隐丹参酮治疗组学习和记忆能力升高, 血清和脑组织 GSH-Px、SOD 活力升高, MDA 含量减少, 与阿尔茨海默病模型组比较有显著性差异。结论 APP/PS1 双转基因模型小鼠 7 个月后发展有明显学习记忆功能障碍伴有抗氧化能力的下降, 隐丹参酮对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆障碍具有明显改善作用并且可剂量依赖性的显著改善阿尔茨海默病模型小鼠的抗氧化能力。

关键词: 隐丹参酮; 阿尔茨海默病; 学习记忆; 氧化应激

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)11-1072-05

作者简介: 梅峥嵘, 女, 博士, 主管药师 Tel: (020)81292702
Tel: (020)87334613 E-mail: liuqq@mail.sysu.edu.cn

E-mail: zhengrong1978@yahoo.com.cn

*通信作者: 刘培庆, 男, 教授

Influence of Cryptotanshinone on Memory and Antioxidation Ability in APP/PS1 Double Transgenic Mice

MEI Zhengrong¹, ZHANG Fangyan², YAN Pengke¹, SITU Bing¹, TAN Xiangping¹, LIU Peiqing^{3*} (1.The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, China; 2.Chongqing Institute for Drug Control, Chongqing 401121, China; 3.School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of cryptotanshinone on memory and antioxidation ability in APP/PS1 double transgenic mice. **METHODS** Three-month-old APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into 5 groups. Besides, negative control mice were served as control group. There were 10 mice in each group and all of them were intragastrically administered for 4 months. Then the learning and memory ability of mice were detected by Morris water maze test. The activities of glutathione peroxidase(GSH-Px), superoxide dismutase(SOD) and the content of malondialdehyde(MDA) in serum and brain tissue were measured with spectrophotometer. **RESULTS** Compared with control group, APP/PS1 double transgenic mice significantly prolonged the latency of searching the hidden platform in directional swimming test, decreased the time spent in swimming in the target quadrant in probe test. Compared with APP/PS1 double transgenic mice, cryptotanshinone could dose-dependently shorten the latency of searching the hidden platform in directional swimming test, increased the time spent in swimming in the target quadrant in probe test. The activities of GSH-Px and SOD decreased and the MDA content increased in APP/PS1 double transgenic mice, while in cryptotanshinone treatment groups, the activities of GSH-Px and SOD heightened and MDA content decreased, and there was significant difference compared with Alzheimer's disease model group. **CONCLUSION** Seven-month-old APP/PS1 double transgenic mice became imitated learning and memory dysfunction and the antioxidation ability reduction; cryptotanshinone could dose-dependently ameliorate the impaired learning and memory function of Alzheimer's disease mice and improve antioxidation ability.

KEY WORDS: cryptotanshinone; Alzheimer's disease; learning and memory; oxidative stress

随着世界人口的老龄化,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发病率逐年上升。AD主要的病理特征包括神经细胞外以 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)沉积为核心形成的老年斑(senile plaque, SP),细胞内以磷酸化的Tau蛋白为核心形成的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)及神经细胞丢失等。

药动学研究发现隐丹参酮(cryptotanshinone, CTS)作为脂溶性小分子化合物血脑屏障透过率很高,这对其治疗神经系统疾病是相当有利的。它能够进入脑组织并通过清除脑氨和氧自由基达到治疗肝性脑病和亚临床肝性脑病以及改善老年痴呆患者症状,是理想的天然产物药物。同时,CTS表现出多种药理活性,包括抗炎、抗氧化、抗菌、抗凋亡及抗血小板聚集等^[1-3]。此外,本课题组前期研究发现CTS对谷氨酸诱导的神经毒性有保护作用^[4]。动物实验显示CTS能够改善东莨菪碱脑室注射形成的AD样大鼠学习记忆功能障碍^[5],提示CTS具有治疗AD的良好前景,也为AD的防治提供了新的靶点及防治措施。为了研究CTS对AD的作用机制,本实验利用APP/PS1双转基因模型小鼠,观察CTS对小鼠行为学习及抗氧化能力的影响,从而为探索AD新的防治途径提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

水迷宫自动记录仪(中国医学科学院);Elx-800型酶标仪(英国Bio-Tek公司);BioMate紫外可见光光度计(美国Thermo公司);机械匀浆器(德国IKA公司)。

1.2 动物

3月龄的APP/PS1双转基因小鼠60只,♀♂兼用;3月龄同窝阴性对照C57BL/6J小鼠10只,♀♂兼用,均由南京大学模式动物研究所提供,合格证号:0010648,生产许可证号:SCXK(苏)2005-0002。

1.3 药品和试剂

CTS由中山大学药物化学研究所提供(批号:20071011,含量:95%),临用前称取45 mg CTS单体原料药至10 mL 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)中,震荡混匀制成混悬液,配成浓度为45 mg·mL⁻¹的高剂量CTS,依次稀释得中剂量(15 mg·mL⁻¹)、低剂量(5 mg·mL⁻¹)。灌胃给药体积均为10 mL·kg⁻¹。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)检测试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品,批号依次为20080908,20081213,20081019。

2 实验方法

2.1 分组与给药

3月龄APP/PS1双转基因模型小鼠随机分为5组,同窝阴性小鼠作为对照组,每组各10只,取“1.3”项下不同浓度CTS溶液,每天灌胃1次,每次剂量为10 mL,连续4个月至行为学测定结束。各组给药方法及剂量为:同窝阴性对照组及转基因模型组(Tg组),均给予0.5% CMC-Na; CTS低剂量组(CTS-L组),给予CTS 5 mg·kg⁻¹; CTS中剂量组(CTS-M组),给予CTS 15 mg·kg⁻¹; CTS高剂量组(CTS-H组),给予CTS 45 mg·kg⁻¹; 哈伯因组(HupA组)(APP/PS1双转基因模型小鼠,10只),转基因小鼠给予哈伯因0.04 mg·kg⁻¹。

2.2 Morris水迷宫实验

2.2.1 定位航行实验 采用中国医学科学院生产的水迷宫装置进行测试。该装置主要有迷宫、摄像机记录系统和计算机系统,包括一不锈钢的圆形水池(直径120 cm,高50 cm)注入24 cm深清水,水温(22±1)℃。加入奶粉使水变得不透明。一个有机玻璃平台位于水面下1 cm,其位置在整个实验期间固定。池壁标明4个入水点,由此将水池等分4个象限。水迷宫实验环境要求安静,避免一切外界干扰,实验期间迷宫外有足够的参照物(门、窗、灯、实验者等),且始终保持不变以供小鼠定位。动物预先训练2 d,每天3次,每次间隔2 h,训练时将动物随机在不同的象限头朝池壁放入水池,次序每天不同,引导其按直线方向游向平台并在平台上站立20 s,之后开始正式实验。将小鼠面向池壁分别从4个入水点放入水中,自动录像系统记录小鼠找到平台所需时间,即逃避潜伏期(escape latency),若60 s内未找到平台,则由实验者将其引向平台,则其潜伏期为60 s。每天上、下午各测试2次,连续测试5 d。

2.2.2 空间探索实验 于定位航行结束后次日上午撤除平台,在原平台象限的对侧象限入水,记录60 s的游泳轨迹,测量60 s内小鼠在原平台象限停留时间并进行比较分析。数据搜集和处理由Morris软件完成。

2.3 小鼠避暗实验

被动回避条件反射箱的尺寸为40 cm×10 cm×14 cm,分明暗两室,两室间有一直径为3 cm的洞口,暗室底部安有铜栅,通以30~36 V交流电,

明室底部也安有铜栅但不通电,距明室上方悬一日光灯。实验时利用小鼠喜暗的习性,将小鼠头部背对洞口放入明室,适应3 min,通电流,小鼠进入暗室立即受到电击,其正确反应是逃离暗室到明室以躲避伤害性刺激,如此训练3次,24 h后记忆测试,记录小鼠5 min内第1次从明室进入暗室的潜伏期和5 min内小鼠受电击的次数。

2.4 血清和脑组织中GSH-Px, SOD活力和MDA含量的测定

各组小鼠脱颈处死,眼球取血,离心(3 000 r·min⁻¹, 10 min),分离血清置4℃备用;断头摘全脑以冰冷生理盐水清理血迹,用滤纸吸干,称质量,加入9倍冰冷无菌的生理盐水手动制成10%脑匀浆,离心(2 500 r·min⁻¹, 10 min),取上清液置4℃备用。GSH-Px, SOD活力和MDA含量测定应用紫外分光光度计严格按照试剂盒说明书操作。

2.5 数据处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0统计软件,以多组间方差分析及组间LSD-*t*检验作统计学处理, Morris水迷宫实验数据采用重复测量数据的方差分析, $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

3 结果

3.1 CTS对APP/PS1双转基因模型小鼠学习记忆能力的影响

用Morris水迷宫实验观察CTS是否能改善APP/PS1双转基因模型小鼠的学习和记忆,在小鼠用药4个月后,对小鼠做定位航行实验,纵观5 d的训练情况,各组小鼠逃避潜伏期逐渐缩短,空间学习成绩均有提高,表明各组小鼠都具有一定的空间学习记忆能力;但与对照组相比, Tg组小鼠在各时间段寻找平台潜伏期均明显延长,说明模型小鼠的学习过程延长、记忆能力减退。而CTS各组小鼠表现出剂量依赖性的缩短寻找平台潜伏期的时间,与Tg组比较有显著性差异,见图1A。训练5 d后即第6天去掉平台,观察各组小鼠的空间探索实验,与正常组相比, Tg组在原平台所在象限停留时间明显缩短;与Tg组相比, CTS组剂量依赖性的增加小鼠在原平台象限停留时间,见图1B。

小鼠避暗实验与正常对照组比较, Tg组小鼠的记忆巩固遭到明显损害,表现为避暗潜伏期明显缩短,错误次数显著增加,提示小鼠学习记忆障碍;与Tg组比较, CTS中、高剂量组和HupA

组均能显著延长避暗潜伏期,小剂量组避暗潜伏期虽有增加,但差异无统计学意义。同时可剂量依赖性地减少错误次数。结果见图2。该方法测得的结果与 Morris 水迷宫的结果基本一致。

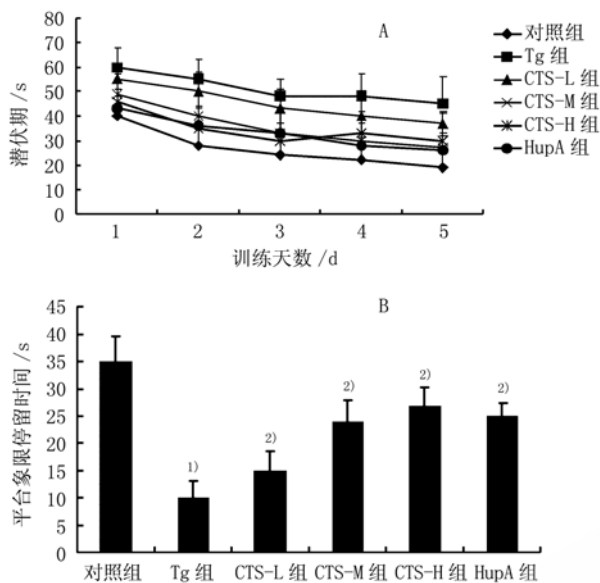


图1 CTS对转基因模型小鼠学习记忆能力的改善作用
注:与对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与Tg组比较,²⁾ $P<0.05$
Fig 1 The effect of CTS on the prevented the memory and learning ability of APP/PS1 mice.
Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with Tg group, ²⁾ $P<0.05$

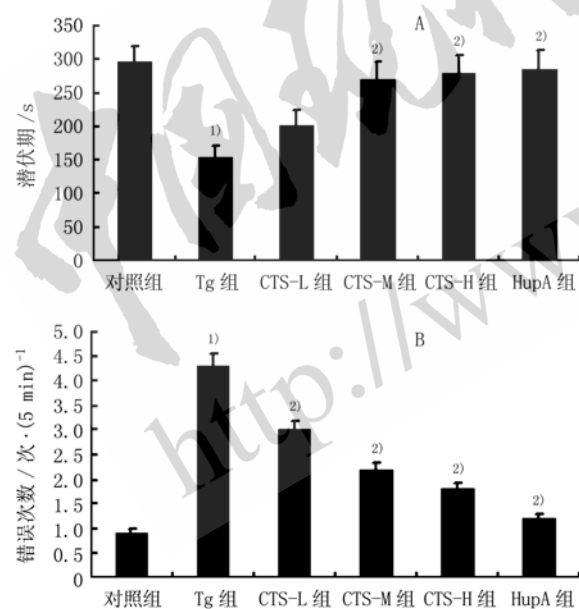


图2 CTS对转基因模型小鼠记忆巩固障碍的改善作用(避暗实验)
注:与对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与Tg组比较,²⁾ $P<0.05$
Fig 2 The effects of cryptotanshinone on the impairment of memory in Tg mice in step-through test
Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with Tg group, ²⁾ $P<0.05$

3.2 CTS对APP/PS1双转基因模型小鼠血清中GSH-Px、SOD活性和MDA含量的影响

比较CTS各剂量组小鼠血清GSH-Px和SOD活性均高于Tg组,其中各组的GSH-Px活力和CTS中、高剂量组的SOD活性与Tg组比较均有显著性差异($P<0.05$)。CTS各剂量组的MDA含量均较Tg组降低,其中CTS-H组与Tg组比较有显著性差异($P<0.05$)。见表1。

表1 CTS对转基因模型小鼠血清GSH-Px、SOD活性和MDA含量的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The effects of CTS on the activities of GSH-Px and SOD and the content of MDA in serum ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	GSH-Px/U·mL ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹
对照组	185.23±25.52 ¹⁾	105.84±8.53 ¹⁾	2.96±0.37 ¹⁾
Tg组	100.30±20.36	94.52±7.00	3.62±0.20
CTS-L组	116.03±16.78 ¹⁾	95.23±5.89	3.54±0.31
CTS-M组	139.20±13.69 ¹⁾	98.00±4.32 ¹⁾	3.45±0.24
CTS-H组	123.63±17.56 ¹⁾	101.69±7.46 ¹⁾	3.22±0.26 ¹⁾

注:与Tg组相比,¹⁾ $P<0.05$
Note: Compared with Tg group, ¹⁾ $P<0.05$

3.3 CTS对APP/PS1双转基因模型小鼠脑组织中GSH-Px、SOD活性和MDA含量的影响

比较CTS各剂量组小鼠脑组织GSH-Px和SOD活性均高于Tg组,其中CTS各组的SOD活力和CTS中、高剂量组的GSH-Px活性与Tg组比较均有显著性差异($P<0.05$)。CTS中、高剂量组的MDA含量均较Tg组显著降低($P<0.05$)。见表2。

表2 CTS对转基因模型小鼠脑组织GSH-Px、SOD活性和MDA含量的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The effects of cryptotanshinone on the activities of GSH-Px and SOD and the content of MDA in the brain of Tg mice ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	GSH-Px/U·mg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/nmol·mg ⁻¹
对照组	18.2±5.5 ¹⁾	85±18 ¹⁾	4.9±1.3 ¹⁾
Tg组	11.6±4.0	48±10	6.8±1.0
CTS-L组	12.4±3.9	62±13 ¹⁾	6.3±0.9
CTS-M组	15.0±2.9 ¹⁾	74±12 ¹⁾	5.5±1.1 ¹⁾
CTS-H组	17.3±5.1 ¹⁾	80±16 ¹⁾	5.6±0.8 ¹⁾

注:与Tg组相比,¹⁾ $P<0.05$
Note: Compared with Tg group, ¹⁾ $P<0.05$

4 讨论

Morris水迷宫是目前世界公认的较为客观的学习记忆功能评价方法。本实验应用Morris水迷宫法观察CTS对小鼠学习记忆功能的影响,结果

发现：AD 转基因小鼠寻找平台的潜伏期明显延长，与正常组相比差异有显著性，表明 AD 转基因小鼠确实存在学习记忆能力减退，此模型较好的模拟了 AD 的外在表现。而 CTS 可以使转基因小鼠逃避潜伏期缩短；原平台所在象限停留时间延长，能够明显改善 AD 模型小鼠空间学习记忆能力，并且呈剂量依赖性关系，此结果证明了 CTS 能够改善 AD 转基因小鼠的学习记忆能力。

在 AD 形成的过程中，氧化应激起着非常重要的作用。在脑内，自由基的产生和消除的速率维持着一种动态平衡，当 A β 堆积时，这种平衡被打破^[6]。过表达 APP 的转基因鼠脑实质中有 A β 沉积并伴随着氧化损伤^[7]，在 AD 患者脑中也存在氧化应激损伤^[8]。A β 引起的氧化应激反应可导致蛋白质、脂质、DNA、RNA 等过氧化^[9]。研究显示，氧化应激反应可对蛋白质结构造成羰基化、硝基化等多种形式的修饰。结构改变引起蛋白功能异常，酶活性降低，导致细胞正常生理功能受到干扰，如蛋白表达过量，基因调控紊乱，能量代谢失常，pH 变化，线粒体功能障碍等，甚至引起细胞凋亡。

大部分的实验研究暗示日常摄入抗氧化剂例如维生素 E 能降低 AD 的发病率^[10-11]，因此减少脑内自由基生成的药物有可能减慢 AD 的病变过程。Melo 等^[12]发现主要用来治疗 AD 的药物加兰他敏能通过抗氧化机制阻止细胞活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的释放来对抗 A β 引起的氧化损伤。CTS 作为中药丹参的重要脂溶性单体，能透过血脑屏障，改善小鼠的认知缺陷，对中风和脑缺血疾病的防治有效果。早期的研究就发现 CTS 对自由基有较好的清除作用^[13]。本实验分别给予 AD 模型小鼠不同剂量的 CTS，结果显示：不同剂量的 CTS 对 AD 模型小鼠学习能力和记忆功能都有一定的保护，同时能有效地清除体内脂质过氧化的代谢产物 MDA，增强 SOD 和 GSH-Px 的活性，提高了机体的抗氧化能力。因此，有理由推断 CTS 可以用来早期干预或预防 AD，改善 AD 患者认知、记忆等临床症状。其机制可能

与 CTS 清除超氧阴离子等自由基有关。

REFERENCES

- [1] KIM S Y, MOON T C, CHANG H W, et al. Effects of tanshinone I isolated from *Salvia miltiorrhiza* bunge on arachidonic acid metabolism and *in vivo* inflammatory responses [J]. *Phytother Res*, 2002, 16(7): 616-620.
- [2] PARK E J, ZHAO Y Z, KIM Y C, et al. PF2401-SF, standardized fraction of *Salvia miltiorrhiza* and its constituents, tanshinone I, tanshinone IIA, and cryptotanshinone, protect primary cultured rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis by inhibiting JNK phosphorylation [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(10): 1891-1898.
- [3] ZHOU L M, ZUO Z, CHOW M S. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use [J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45(12): 1345-1359.
- [4] ZHANG F, ZHENG W, PI R, et al. Cryptotanshinone protects primary rat cortical neurons from glutamate-induced neurotoxicity via the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway [J]. *Exp Brain Res*, 2009, 193(1): 109-118.
- [5] KIM D H, JEON S J, JUNG J W, et al. Tanshinone congeners improve memory impairments induced by scopolamine on passive avoidance tasks in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 574(2/3): 140-147.
- [6] LOO D T, COPANI A, PIKE C J, et al. Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(17): 7951-7955.
- [7] POEGGELER B, MIRAVALLE L, ZAGORSKI M G, et al. Melatonin reverses the profibrillogenic activity of apolipoprotein E4 on the Alzheimer amyloid A β peptide [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(49): 14995-15001.
- [8] ZAWIA N H, LAHIRI D K, CARDOZO-PELAEZ F. Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(9): 1241-1249.
- [9] BUTTERFIELD D A, DRAKE J, POCERNICH C, et al. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide [J]. *Trends Mol Med*, 2001, 7(12): 548-554.
- [10] MORRIS M C, EVANS D A, BIENIAS J L, et al. Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study [J]. *JAMA*, 2002, 287(24): 3230-3237.
- [11] PRATICÒ D. Evidence of oxidative stress in Alzheimer's disease brain and antioxidant therapy: lights and shadows [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2008, 1147: 70-78.
- [12] MELO J B, SOUSA C, GARCAO P, et al. Galantamine protects against oxidative stress induced by amyloid-beta peptide in cortical neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 2009, 29(3): 455-464.
- [13] XUE M, CUI Y, WANG H Q, et al. Scavenging effect of diterpenoid tanshinones and some natural products on hydroxyl free radicals [J]. *Chin J Vet Drug (中国兽药杂志)*, 1999, 33(2): 15-18.

收稿日期：2010-02-25