

# 黑逍遥散对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 AD 大鼠模型脑组织和血清 SOD, GSH-Px 及 MDA 的影响

李海龙<sup>1,2</sup>, 王虎平<sup>1</sup>, 刘建鸿<sup>1</sup>, 顾静<sup>1</sup>, 车敏<sup>1</sup>, 兰美华<sup>3</sup>, 吴红彦<sup>1,2\*</sup>

(1. 甘肃中医学院, 兰州 730000;

2. 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室、甘肃省中药新产品创制工程实验室, 兰州 730000;

3. 阳江市中医院, 广东 阳江 529500)

**[摘要]** **目的:**观察黑逍遥散对  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $A\beta_{25-35}$ ) 诱导阿尔茨海默病 (AD) 模型大鼠脑组织和血清超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 及丙二醛 (MDA) 的影响, 探讨黑逍遥散防治 AD 的作用及其机制。**方法:**雄性 SPF 级 SD 大鼠 110 只, 先按随机数字表挑选 16 只大鼠作为假手术组, 其余大鼠手术 7 d 后进行水迷宫测试, 将测试合格的大鼠再按照随机数字表法分为 5 组: 模型组、阳性对照组、黑逍遥散高、中、低剂量组, 每组 14 只。假手术组 14 只。采用  $A\beta_{25-35}$  海马区注射诱发大鼠脑内神经元损伤, 复制大鼠 AD 模型; 造模后 7 d, 黑逍遥散各组大鼠分别按低、中、高剂量 (4.2, 8.5, 17.0 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) ig 给药, 阳性对照组给予石杉碱甲片溶液 0.02 mg·kg<sup>-1</sup>·d ig, 模型组、假手术组 ig 给予等容量双蒸水, 每日上午 1 次, 连续治疗 28 d。末次给药后处死大鼠并采集血清和脑标本, 比色法测大鼠血清和脑匀浆 SOD, MDA, GSH-Px 活性;**结果:**与假手术组比较, 模型组大鼠血清和脑组织匀浆中的 SOD, GSH-Px 显著降低, MDA 含量显著增高; 与模型组比较, 黑逍遥散能显著升高  $A\beta_{25-35}$  诱导 AD 模型大鼠血清和脑组织中 SOD 与 GSH-Px 活性、降低 MDA 含量 ( $P < 0.05$ )。**结论:**黑逍遥散通过抗氧化作用起到保护 AD 模型大鼠的作用。

**[关键词]** 黑逍遥散; 阿尔茨海默病;  $A\beta_{25-35}$  淀粉肽

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0186-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013210186

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130823.1024.006.html>

**[网络出版时间]** 2013-08-23 10:24

## Effects of Hei Xiaoyao San on SOD, GSH-Px and MDA of Brain Tissue and Serum in Alzheimer's Disease Rat Model Induced by $A\beta_{25-35}$ Fragments

LI Hai-long<sup>1,2</sup>, WANG Hu-ping<sup>1</sup>, LIU Jian-hong<sup>1</sup>, GU Jing<sup>1</sup>, CHE Min<sup>1</sup>, LAN Mei-hua<sup>3</sup>, WU Hong-yan<sup>1,2\*</sup>

(1. Basic Medical School of Gansu College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Lanzhou 730000, China;

2. New Products of TCM Engineering Laboratory of Gansu Province, Lanzhou

730000, China; 3. TCM Hospital of Yangjiang City, Yangjiang 529500, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the influence of Hei Xiaoyao San on superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) of brain tissue and serum in Alzheimer's disease rat model induced by  $\beta$ -amyloid protein ( $A\beta_{25-35}$ ) fragments so as to discuss the role and mechanisms involved in Hei Xiaoyao San in the prevention and treatment of Alzheimer's disease (AD). **Method:** The SD rats ( $n = 94$ ) were randomly divided into sham surgery rats ( $n = 16$ ) group and model group ( $n = 94$ ), and all rats of model group received water maze tests for 7 days. These eligible rats were randomly divided 5 groups, model group,

**[收稿日期]** 20130324(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81060284)

**[第一作者]** 李海龙, 硕士, 副教授, 从事心脑血管和抗肿瘤中药药理研究, E-mail: gslz860931@163.com

**[通讯作者]** \* 吴红彦, 教授, 从事方剂药理与新药开发, E-mail: wu.hy@163.com

positive control group, Hei Xiaoyao San high, medium and low dose groups, 14 rats in each group.  $A\beta_{25-35}$  fragments was injected into the hippocampus to damage brain neuron to make the rat's AD model. 7 days later, all rats of Hei Xiaoyao San group were orally administered Hei Xiaoyao San at low, medium and high doses (4.2, 8.50, 17.0  $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ ), the positive control group was orally given huperzine A solution 0.02  $mg \cdot kg^{-1} \cdot d$ , model group and sham group received an equal volume double distilled water daily for 28 d. After the last administration, the rats were sacrificed and serum and brain samples collected, and the serum and brain homogenate stration of SOD, MDA, GSH-Px were examined by means of chemistry chromatometry. **Result:** Compared with the sham group, serum and brain tissue homogenate SOD, GSH-Px of model group decreased significantly, MDA content increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, Hei Xiaoyao San obviously increased the activities of SOD and GSH-Px and reduced the content of MDA ( $P < 0.05$ ) in serum and brain tissue. **Conclusion:** Hei Xiaoyao San can protect rat's AD model from damage, and the mechanisms of which may be related to anti-free radicals.

[ **Key words** ] Hei Xiaoyao San; Alzheimer's disease;  $A\beta_{25-35}$  fragments

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种常见的以进行性认知功能障碍和行为损害为特征的神经系退行性病变。目前的治疗主要是根据其不同病理生理学说给予对应性干预,然而,迄今为止现代医学尚无防治 AD 的特异方法和药物。祖国医学也较早开展了对 AD 防治的研究,从病因病机、治则治法、有效方药以及中药有效成分(生物碱类、黄酮类和多糖类等)方面取得了一定的进展,但目前还缺乏突破性贡献。本研究在前期表明逍遥散具有显著改善 AD 模型小鼠学习记忆能力,增强小鼠认知、判断能力,以及调节脑内相关神经递质的作用<sup>[1-2]</sup>,黑逍遥散是在作为疏肝代表方的逍遥散的基础上加地黄一味,为逍遥散演化类方,黑逍遥散以逍遥散疏肝解郁,健脾养血之功的前提下,再加熟地黄滋阴养血,益肾补精,填精益髓之力更强。本实验则以黑逍遥散干预  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $A\beta_{25-35}$ ) 诱导的 AD 大鼠模型,选用生化法检测脑组织和血清超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 及丙二醛 (MDA) 的含量,从抗氧化损伤的角度,探讨黑逍遥散防治 AD 的作用机制,为本病的辨证论治提供新的思路与有效治疗药物。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性 SPF 级 SD 大鼠 110 只 ( $200 \pm 20$ ) g, 鼠龄 4 ~ 5 月,由甘肃中医学院科研实验动物中心提供,符合 SPF 级实验动物标准,实验动物使用许可证号 SYXK(甘)2011-0001,使用实验动物质量合格证编号 SCXK(甘)2011-0001-0001058。

**1.2 药物** 黑逍遥散各组成生药,由兰州复兴厚药材有限公司提供,各药用量按 2010 年版《中国药典》比例,熟地黄:柴胡:当归:白芍:茯苓:白术:生

姜:甘草:薄荷 7.5:5:5:5:5:5:5:4:1。采用传统水煎法,加中药 10 倍量的冷水浸泡 3 h,然后加热煮沸 1 h,加入薄荷再煎 5 min,滤出煎液,药渣中再加 6 倍量水煮沸 1 h,滤出煎液,合并两次煎液,过 80 目筛滤过,滤液水浴蒸发浓缩,分别制成生药质量浓度为 2.0, 1.0, 0.5  $g \cdot mL^{-1}$  的黑逍遥散水煎液。

石杉碱甲片(哈伯因):河南太龙药业股份有限公司生产,生产批号 110402),用双蒸水配制成 2  $mg \cdot L^{-1}$  水溶液,4  $^{\circ}C$  冰箱中备用。 $A\beta_{25-35}$ ,上海强耀生物科技有限公司提供,批号 20110609,  $A\beta_{25-35}$  10  $\mu g$  溶于无菌生理盐水 1  $\mu L$ ,使用前 37  $^{\circ}C$  下孵育 1 周,使其呈凝聚态备用)。

**1.3 试剂** SOD 试剂盒(批号 20111120), GSH-Px 试剂盒(批号 20111118), MDA 试剂盒(批号 20111116);考马斯亮蓝蛋白试剂盒(批号 20111116);均购于南京建成生物有限公司。

## 2 方法

**2.1 模型复制** 各模型大鼠经腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 ( $45 mg \cdot kg^{-1}$ ) 麻醉,参考包新民《大鼠脑立体定向图谱》定位方法,大鼠固定于立体定位仪上,确定海马区注射点:前囟后 3 mm,中线向左右各旁开 2.2 mm,硬脑膜下 2.8 mm。用牙科钻在颅骨上钻孔(直径约 1 mm),用微量进样器在两侧各缓慢注射  $A\beta_{25-35}$  溶液 1  $\mu L$ ,5 min 内注射完,留针 5 min,牙科泥封住颅骨孔,术区滴庆大霉素,缝合皮肤并消毒,假手术组注入等量生理盐水,其余同模型组。单笼饲养至大鼠完全清醒。

**2.2 动物分组** 大鼠称重,先按随机数字表挑选 16 只大鼠作为假手术组,其余大鼠手术 7 d 后进行水迷宫测试,根据测试结果,以假手术组平均逃避潜

伏期为标准,从手术造模大鼠中筛选出大于此值的学习记忆障碍大鼠,剔除不合格大鼠 17 只。大鼠称重,再按照随机数字表法将大鼠分为 5 组:模型组、阳性对照组、黑逍遥散高、中、低剂量组,每组 14 只。假手术组也为 14 只。因为麻醉、手术操作不当等原因,大鼠死亡 9 只。

**2.3 动物给药** 黑逍遥散各组大鼠分别按低、中、高剂量(4.2, 8.50, 17.0 g·kg<sup>-1</sup>)灌胃给药,阳性对照组给予石杉碱甲片溶液 0.02 mg·kg<sup>-1</sup>灌胃,模型组、假手术组给予等容量双蒸水,每日上午 1 次,连续灌胃治疗 28 d。中剂量组动物给药剂量按照人的临床给药剂量的相应倍数折算。

**2.4 标本制备和指标检测** 治疗 28 d 后采集标本。血清:将大鼠按 30 mg·kg<sup>-1</sup>剂量 ip 3% 戊巴比妥钠溶液进行麻醉,股(静)动脉取血,静置 2 h 后,4 ℃, 3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液置 Eppendorf 管中,4 ℃冰箱保存,待测。脑组织匀浆:取血后断头处死大鼠,并立即在冰台上开颅,快速取出大脑,除去脑干和小脑。取右侧脑组织,称重。将脑组织用冰冷的生理盐水漂洗后,用滤纸拭干,用精密天平准确称重。用脑组织质量 9 倍的 0.9% 生理盐水和脑组织一起放入电动匀浆机研碎(在冰水中进行),配成 10% 的组织匀浆液 4 ℃, 3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液,置 4 ℃冰箱保存。按照试剂

盒说明书进行 SOD,MDA 和 GSH-Px 的测定。

**2.5 统计学处理** 计量数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 17.0 软件处理数据,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 AD 大鼠血清 SOD,GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠血清中的 SOD、GSH-Px 显著降低,MDA 含量显著增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,各治疗组大鼠血清 SOD,GSH-Px 显著增高,MDA 含量显著降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );黑逍遥散各剂量组 SOD 活性剂量依赖性升高,相关系数  $r = 0.99$ ,MDA 含量剂量依赖性降低,相关系数  $r = -0.99$ 。见表 1。

**3.2 对 AD 大鼠脑组织匀浆中 SOD,GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织匀浆中的 SOD,GSH-Px 显著降低,MDA 含量显著增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,各治疗组大鼠脑组织匀浆 SOD,GSH-Px 显著增高,MDA 含量显著降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );黑逍遥散各剂量组 SOD 活性剂量依赖性升高,相关系数  $r = 0.95$ ,MDA 含量剂量依赖性降低,相关系数  $r = -0.99$ ,见表 2。

表 1 黑逍遥散对 AD 模型大鼠血清 SOD,GSH-Px 活性,MDA 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 14$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	MDA/nmol·mL <sup>-1</sup>	GSH-Px/U·mL <sup>-1</sup>
假手术	-	158.88 ± 5.30	5.03 ± 0.37	277.75 ± 8.46
模型	-	114.54 ± 10.04 <sup>1)</sup>	8.77 ± 0.41 <sup>1)</sup>	120.42 ± 7.63 <sup>1)</sup>
石杉碱甲	2.0 × 10 <sup>-5</sup>	139.40 ± 8.89 <sup>2)</sup>	7.16 ± 0.35 <sup>2)</sup>	199.89 ± 8.36 <sup>2)</sup>
黑逍遥散	4.25	124.08 ± 9.60 <sup>2)</sup>	7.68 ± 0.29 <sup>2)</sup>	182.89 ± 8.55 <sup>2)</sup>
	8.50	134.69 ± 12.19 <sup>2)</sup>	7.21 ± 0.33 <sup>2)</sup>	190.75 ± 8.47 <sup>2)</sup>
	17.0	147.66 ± 7.98 <sup>2)</sup>	6.13 ± 0.26 <sup>2)</sup>	226.5 ± 12.81 <sup>2)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 黑逍遥散对 AD 模型大鼠脑组织匀浆 SOD,GSH-Px 活性,MDA 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 14$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SOD/U·mg <sup>-1</sup>	MDA/nmol·mg <sup>-1</sup>	GSH-Px/U·mg <sup>-1</sup>
假手术	-	289.31 ± 15.67	6.36 ± 1.16	257.73 ± 7.93
模型	-	198.53 ± 21.32 <sup>1)</sup>	8.99 ± 0.99 <sup>1)</sup>	198.36 ± 7.08 <sup>1)</sup>
石杉碱甲	2.0 × 10 <sup>-5</sup>	250.03 ± 9.37 <sup>2)</sup>	7.53 ± 0.99 <sup>2)</sup>	230.71 ± 7.56 <sup>2)</sup>
黑逍遥散	4.25	223.13 ± 10.51 <sup>2)</sup>	8.25 ± 0.54 <sup>2)</sup>	219.78 ± 7.98 <sup>2)</sup>
	8.50	248.16 ± 9.84 <sup>2)</sup>	7.6 ± 0.74 <sup>2)</sup>	230.75 ± 8.39 <sup>2)</sup>
	17.0	279.73 ± 6.15 <sup>2)</sup>	6.82 ± 0.66 <sup>2)</sup>	245.5 ± 11.76 <sup>2)</sup>

## 4 讨论

AD 患者以及 AD 模型小鼠脑组织中活性氧、丙二醛等氧化应激标志物明显增多,提示氧化应激参与了 AD 发病过程。氧化应激可造成生物活性分子如蛋白质、脂质、糖类、核酸等氧化修饰<sup>[3]</sup>,使之丧失原有结构和功能;脑组织为拮抗氧化应激会代偿性加速  $A\beta$  斑块沉积<sup>[4]</sup>,沉积的  $A\beta$  继续作为活性氧供体加剧氧化应激,此外  $A\beta$  自身亦可介导膜脂质、脂蛋白、脂酸等过氧化、损伤 DNA、灭活转运酶类等进而使海马等神经细胞退化、变性而致痴呆。因而,抗氧化剂在 AD 治疗中的具有广阔的临床应用前景<sup>[5]</sup>。

本实验结果表明,与假手术组相比较,模型组大鼠血清和脑匀浆中的 SOD, GSH-Px 活性显著降低,MDA 含量显著增高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,各治疗组大鼠血清和脑匀浆中的 SOD, GSH-Px 活性显著增强,MDA 含量显著降低,差异有统计意义 ( $P < 0.05$ );由此可见黑逍遥散防治 AD 可能与提高机体 SOD、GSH-Px 活性及调节脑组织 MDA 含量等抗自由基氧化作用有关。本实验与黑逍遥散前期的研究结果一致。现代药理学研究也表明:黑逍遥散组方中熟地黄、当归中所含的有效成分藜本内酯、阿魏酸、白芍总苷、茯苓多糖均具有一定的抗衰老作用<sup>[6-12]</sup>。胡增峣<sup>[13]</sup>等总结中药复方治疗老年痴呆的用药规律,发现目前抗老年痴呆使用频率最高的 10 味药材包含熟地黄和茯苓。总之,本方中所含中药具有抗衰老的药效物质基础。

中医认识 AD,多认为其发生病位在脑,与心、肾最为密切,属本虚标实。即心肾不足,气血精亏,脑失所养;气滞血瘀,痰浊蒙窍。因而治疗多从益气补血滋补心肾,活血祛瘀,化痰解毒等立法进行研究。而作者通过中医文献回顾分析,结合现代医学研究成果,认为肝郁是导致瘀血、痰浊等标实的主因,提出了从肝、脾论治的新假说。因肝主疏泄条达,气能行血,气能行水,肝郁则气滞,气滞则血瘀,水停而成痰浊。黑逍遥散是在作为疏肝代表方的逍遥散的基础上加地黄一味,为逍遥散演化类方,黑逍遥散以逍遥散疏肝解郁,健脾养血之功的前提下,更加熟地黄滋阴养血,益肾补精,填精益髓之力更强。印证了以肝、脾论治理论的可行性。同时也进一步表明,在疏肝活血、健脾除湿(祛痰)的基础上增强

补血填精对治疗 AD 疗效更加明显,这也与传统中医理论相符。

## [参考文献]

- [1] 吴红彦,王虎平.以肝、脾论治 AD 及逍遥散对老年痴呆模型小鼠学习记忆能力、中枢胆碱能神经元活性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(5):168.
- [2] 吴红彦,王虎平.逍遥散及其拆方对老年性痴呆模型小鼠学习记忆能力及抗氧化能力的影响[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(10):102.
- [3] Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now [J]. J Neurochem, 2006, 97(6):1634.
- [4] Lee H G, Casadesus G, Zhu X, et al. Challenging the amyloid cascade hypothesis: senile plaques and amyloid-beta as protective adaptations to Alzheimer disease [J]. Ann NY Acad Sci, 2004, 1019:1.
- [5] 李玲玲,刘蓉,叶兰,等.抗氧化剂在阿尔茨海默病治疗中的地位和临床应用前景[J].国际神经病学神经外科学杂志,2009,36(6):521.
- [6] 安红梅,史云峰,胡兵,等.熟地黄对 D-半乳糖衰老模型大鼠脑衰老的作用研究[J].中药药理与临床,2008,24(3):59.
- [7] 金蓓蓓,陈勤,陈庆林.阿魏酸对拟痴呆小鼠学习记忆和海马胶质纤维酸性蛋白表达的影响[J].激光生物学报,2011,20(98):484.
- [8] 张梦雪,余彦,杜俊蓉.藜本内酯预处理对  $A\beta_{25-35}$  诱导人脑神经瘤母细胞 SH-SY5Y 细胞毒性的保护作用[J].四川大学学报:医学版,2012,43(1):34.
- [9] Kuang X, Du J R, Chen Y S, et al. Protective effect of Z-ligustilide against amyloid beta-induced neurotoxicity is associated with decreased pro-inflammatory markers in rat brains [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2009, 92(4):635.
- [10] 徐露,董志,陈洪.当归多糖对 D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆的影响[J].激光杂志,2008;29(2):92.
- [11] 邓兆智,钟秋生.白芍总苷的药理与临床研究考释[J].实用中医内科杂志,2004,18(3):181.
- [12] 侯安继,陈腾云,彭施萍,等.茯苓多糖抗衰老作用研究[J].中药药理与临床,2004,20(3):10.
- [13] 胡增峣,黄晏,刘港,等.中药复方治疗老年痴呆的用药规律分析[J].中药药理与临床,2012,28(16):252.

[责任编辑 聂淑琴]