

# 三七总皂苷对快速老化痴呆模型小鼠 SAMP8 炎症因子及小胶质细胞的影响

黄金兰<sup>1</sup>, 陆璐<sup>2</sup>, 黄丹<sup>2</sup>, 冯颖琴<sup>2</sup>, 崔雯<sup>2</sup>, 张雯艳<sup>2</sup>, 钟振国<sup>1\*</sup>

(1. 广西医科大学, 南宁 530021; 2. 广西中医药大学, 南宁 530001)

**[摘要]** 目的: 研究三七总皂苷(PNS)对快速老化痴呆模型小鼠(SAMP8)炎症因子及小胶质细胞的影响。方法: 采用 SAMP8 小鼠, 将其随机分为模型组、PNS 高剂量组(200 mg·kg<sup>-1</sup>)、PNS 低剂量组(100 mg·kg<sup>-1</sup>)和石杉碱甲组(0.3 mg·kg<sup>-1</sup>), 8 只/组, 模型组 ig 给予给药组相同容积的双蒸水。每天 ig 1 次, 连续给药 2 个月。用 ELISA 双抗体夹心法测定 PNS 对各组 SAMP8 小鼠血清中的细胞因子白介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )及补体(C1q)表达的影响; HE 染色光镜观察小胶质细胞的形态变化。结果: PNS 高剂量组的 IL-1 $\beta$ (23.14  $\pm$  12.58) ng·L<sup>-1</sup> 水平低于模型组(47.44 ng·L<sup>-1</sup>) ( $P < 0.05$ ); IL-6 PNS 高、低剂量组(243.3  $\pm$  133.9), (269.0  $\pm$  75.1) ng·L<sup>-1</sup> 低于模型组(582.5  $\pm$  144.6) ng·L<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ ); 模型组小鼠血清中补体 C1q(280.4  $\pm$  49.75) mg·L<sup>-1</sup> 含量均高于阳性组 C1q(144.71  $\pm$  21.78) mg·L<sup>-1</sup> 和 PNS 高剂量组 C1q(187.7  $\pm$  65.56) mg·L<sup>-1</sup>; 模型组小鼠海马区的小胶质细胞被激活, 吞噬神经细胞; 用药组海马区小胶质细胞没有被激活, 为静息状态。血清中 TNF- $\alpha$  各组间无显著差异。结论: PNS 对 SAMP8 小鼠的免疫炎症反应有一定的抑制作用。

**[关键词]** 三七总皂苷; 炎症因子; 小胶质细胞; SAMP8

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0171-04

**[doi]** 10.11653/syfj2013080171

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130206.0854.001.html>

**[网络出版时间]** 2013-02-06 8:54

**[收稿日期]** 20120905(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30960489, 81160512); 广西中医药大学中药药效研究重点实验室开放课题(09-007-06-07)

**[第一作者]** 黄金兰, 在读博士, 研究实习员, 从事药理学研究, Tel: 15977755060, E-mail: hjl0221104@163.com

**[通讯作者]** \* 钟振国, 医学博士, 教授, 从事教学与中药新药的研究与开发, Tel: 0771-3132106, 13317712838, E-mail: zhongzg@gxtcmu.edu.cn

- [5] Soderberg S, Zimmet P, Tuomilehto J, et al. High incidence of type 2 diabetes and increasing conversion rates from impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance to diabetes in Mauritius [J]. J Intern Med, 2004, 256: 37.
- [6] 杨慧霞. 健康与疾病的发育起源学说引发的思考 [J]. 中华围产医学杂志, 2008, 11(3): 157.
- [7] 李世刚, 茅彩萍, 徐智策. 健康与疾病的发育起源研究进展 [J]. 中华围产医学杂志, 2010, 13(6): 463.
- [8] 蒋文跃, 韩巍, 李志新. 成人疾病胎源说的证据及机制 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2007, 39(1): 96.
- [9] 曾婵娟, 杨慧霞. 健康和疾病的发育起源研究现状 [J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38(1): 3.
- [10] 谭峰, 樊巧玲, 王明艳, 等. 左归丸对 SD 大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 145.
- [11] 冯前进, 冯玛莉, 王玉良, 等. 补肾方剂左归丸(汤)对小鼠早期胚胎发育的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(11): 673.
- [12] 许凯霞, 王永辉, 杨向竹, 等. 补肾方剂对子代小鼠非特异性免疫功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 161.
- [13] Benomar Y, Naour N, Aubourg A, et al. Insulin and leptin induce Glut 4 plasma membrane translocation and glucose uptake in a human neuronal cell line by a PI3-kinase dependent [J]. Endocrinology, 2006, 147(5): 2550.

[责任编辑] 聂淑琴

## Effect of *Panax notoginseng* Saponins on Inflammatory Factors and Microglia Cell of SAMP8 Mice

HUANG Jin-lan<sup>1</sup>, LU Lu<sup>2</sup>, HUANG Dan<sup>2</sup>, FENG Ying-qin<sup>2</sup>,  
CUI Wen<sup>2</sup>, ZHANG Wen-yan<sup>2</sup>, ZHONG Zhen-guo<sup>1\*</sup>

(1. Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

**[ Abstract ] Objective:** To study the effect of *Panax notoginseng* saponins (PNS) on the inflammatory factors and microglia cell of senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. **Method:** SAMP8 mice were randomly divided into four groups: PNS high-dosage group, PNS low-dosage group, huperzine A group and model control group. The high-dosage group and low-dosage group were treated with 200, 100 mg·kg<sup>-1</sup> PNS respectively per day and the huperzine A group was treated with 0.3 mg·kg<sup>-1</sup> huperzine A by intragastric administration, per day for 8 consecutive weeks. The serum cytokines of SAMP8 like interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), complement 1q (C1q) were measured by ELISA. The morphological changes of microglia cells were observed by light microscopy with HE staining. **Result:** The level of IL-1 $\beta$  in the high-dose group was lower than that in the model group ( $P < 0.05$ ), and compared to the model group, the content of IL-6 in PNS high, low-dose groups showed significantly different ( $P < 0.05$ ). The level of C1q in the blank group was higher than that in the high-dose group and positive group. HE staining showed that microglia in the hippocampus of the model group was over-activation, and swallowed nerve cells, while the microglia in the treatment groups was not activated. **Conclusion:** PNS can reduce the inflammatory response in SAMP8 mice.

**[ Key words ]** PNS; inflammatory factors; microglia cell; SAMP8

随着近年对阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 复杂发病机制的研究, 脑内免疫炎症反应可能是其重要病理特征之一, 从而提出了 AD 的免疫炎症机制<sup>[1]</sup>。现代药理研究表明, 三七对心血管系统、血液系统、免疫系统、神经系统等均有不同程度的作用, 而我们的前期研究结果也证明了三七的主要有效成分三七总皂苷 (panax notoginseng saponins, PNS) 对治疗老年性痴呆有作用<sup>[2-7]</sup>, 但 PNS 是否会通过影响与老年性痴呆患者大脑内免疫炎症反应而减少 AD 的病理损害仍然是不清楚的。因此, 我们将以快速老化痴呆模型小鼠 (SAMP8) 为模型, 检测 SAMP8 血清中细胞因子白介素 (IL)-1 $\beta$ , IL-6 的水平, 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 及补体 1q (C1q) 水平的表达, 观察小胶质细胞的形态变化, 阐明 PNS 对老年性痴呆免疫功能的影响, 为开发 PNS 治疗老年性痴呆提供更多的科学依据。

### 1 材料

**1.1 药物与试剂** PNS (云南云科药业有限公司生产, 批号 100110), 石杉碱甲 (huperzine A, 河南太龙药业股份有限公司, 批号 091102), 小鼠 IL-1 $\beta$

ELISA Kit (武汉博士德公司生产, 批号 EK0394), 小鼠 IL-6 ELISA Kit (武汉博士德公司生产, 批号 EK0411); 小鼠 TNF- $\alpha$ , ELISA Kit (武汉博士德公司生产, 批号 EK0527); 小鼠 C1q, ELISA Kit (RD 公司生产, 批号 AU00023)。

**1.2 动物** 健康快速老化痴呆模型小白鼠 SAMP8 (以下简称 SAMP8 小鼠) 32 只, 体重 20 ~ 30 g, 由天津中医药大学提供 (合格证号 W-J 津实动质 M 准字第 006 号)。

**1.3 仪器** Sunrise 型酶标仪 (BioCell, 奥地利安图斯公司), TDL-5 型低速台式离心机 (上海安亭仪器厂), CK40 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), HM340 型石蜡切片机 (Microm, 德国)。

### 2 方法

**2.1 分组及给药** SAMP8 小鼠随机分为 4 组: 模型组、PNS 高、低剂量组和阳性组 (石杉碱甲), 8 只/组, 动物适应性喂养 2 周后给药。PNS 高剂量组按 200 mg·kg<sup>-1</sup> 给药, PNS 低剂量按 100 mg·kg<sup>-1</sup> 给药, 阳性对照药石杉碱甲按 0.3 mg·kg<sup>-1</sup> 给药, 对照组给与给药组相同容积的双蒸馏水灌胃。每天 ig 1

次,连续给药 8 周。

**2.2 SAMP8 小鼠血清 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  和 C1q 水平测定** SAMP8 小鼠行为记忆改变测试结束后,采用眼球采血法,采血 2 mL 注入 EP 管中,所有血标本静置 1 h 后进行 2 000 r·min<sup>-1</sup>, 10 min, 4 °C 离心分离血清,分装,置于 -20 °C 冰箱保存备用。采用 ELISA 双抗体夹心法测定血清 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  和 C1q 的含量,测定方法严格参照说明书进行。

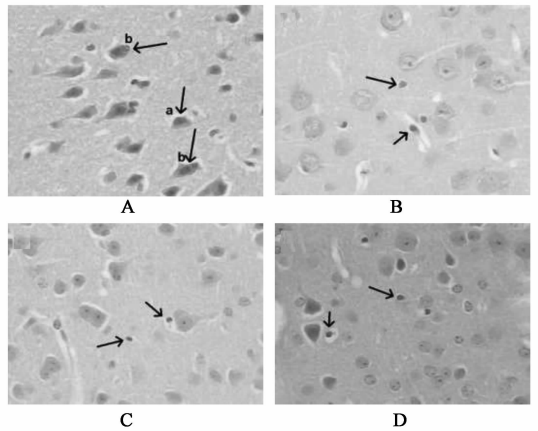
**2.3 组织化学 HE 染色观察小胶质细胞的形态学变化** 采血结束后,迅速剖开胸腔暴露心脏,剪开右心耳,夹持心尖,自心尖左侧剪开左心室,将大隐静脉穿刺针经左心室插入升主动脉,灌注预冻的生理盐水,待血色变淡后,继以 4% 多聚甲醛(4 °C)灌注固定,开颅取脑,分离小鼠-侧海马组织,浸泡于 4% 多聚甲醛。组织再经乙醇脱水,二甲苯透明,包埋,烘干,苏木精染色,封片观察。

**2.4 统计方法** 结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 11.5 统计软件,比较采用 *t* 检验及方差分析(两两比较用 SNK 法)。*P* < 0.05 为有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 对 SAMP8 小鼠血清中白介素 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  及补体 C1q 水平的影响** 模型组 SAMP8 小鼠血清中的 IL-1 $\beta$  的含量略高于其他 3 组,其中高剂量组与模型组相比差异有显著差异(*P* < 0.05)。模型组 SAMP8 小鼠血清中 IL-6 含量比高剂量组和低剂量组高(*P* < 0.05)。PNS 高剂量组和阳性组血清中 C1q 含量显著低于模型组(*P* < 0.05)。见表 1。各组血清中 TNF- $\alpha$  均在 0.7  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  水平,均无显著差异。

**3.2 对 SAMP8 小鼠脑内海马区小胶质细胞形态学影响** 对每张组织切片的海马部位各观察 2 个视野,同一视场面积,同一背景光强度下进行拍照。



A. 模型组; B. PNS 200 mg·kg<sup>-1</sup>组;  
C. PNS 100 mg·kg<sup>-1</sup>组; D. 石杉碱甲 0.3 mg·kg<sup>-1</sup>组

图 1 PNS 对 SAMP8 小鼠脑内海马区小胶质细胞活性的影响(HE 染色, ×40 m)

由图 1-A 可见,模型组的小胶质细胞胞体增大,染色深而不匀,胞体呈圆形无突起,为激活型小胶质细胞(箭头 a 所示细胞),其中一部分进一步被激活成为吞噬型小胶质细胞聚集并吞噬变性神经细胞如阿米巴样,被激活的吞噬型小胶质细胞开始吞噬浸润神经细胞,几乎与神经细胞融为一体(箭头 b 所示细胞),部分神经细胞胞体不全,已被破坏。由于激活的小胶质细胞释放的趋向因子,周围神经细胞及星形胶质细胞汇聚。

由图 1-B、1-C 可见,高剂量组与低剂量组海马区有散在未激活小胶质细胞(箭头所示细胞),染色浅而均匀,突触细长,呈分枝状,周围神经细胞正常,周围有散在星型胶质细胞,但高剂量组星型胶质细胞较多。

阳性组(图 1-D)海马区有散在未激活的分枝状小胶质细胞(箭头所示细胞),周围有较多的星型胶质细胞,神经细胞正常。

表 1 SAMP8 小鼠血清中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  及补体 C1q 的含量( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	给药剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$ /ng·L <sup>-1</sup>	IL-6/ng·L <sup>-1</sup>	C1q/mg·L <sup>-1</sup>
模型	-	47.44 ± 12.78	582.5 ± 144.6	280.40 ± 49.75
PNS	100	34.42 ± 8.18	269.0 ± 75.7 <sup>1)</sup>	285.98 ± 15.80
	200	23.14 ± 12.58 <sup>1)</sup>	243.3 ± 133.9 <sup>1)</sup>	187.70 ± 65.56 <sup>1)</sup>
石杉碱甲	0.3	37.17 ± 10.30	837.3 ± 349.4	144.71 ± 21.78 <sup>1)</sup>

注:与模型组相比<sup>1)</sup>*P* < 0.05。

**4 讨论**

2002 年“炎症假说”提出:淀粉样蛋白在中枢系统沉积,导致小胶质细胞活化,触发炎症级联反应,

使得潜在的细胞毒性释放,最终导致神经系统的退行性改变<sup>[7]</sup>。

AD 患者的脑内存在炎症反应,但是没有急性

炎症特有的红、肿、热、痛的症状,但对 AD 患者的尸检发现脑内有高表达的细胞因子、补体以及激活的小胶质细胞和星形胶质细胞<sup>[8]</sup>。这些细胞激活后可释放多种细胞因子、趋化因子、补体及其激活物,如白细胞介素 1 $\alpha$ 、白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子和补体等,导致非特异性炎症细胞浸润,产生慢性炎症,使神经系统受损<sup>[9]</sup>。

PNS 能从多水平抑制炎症介质和细胞因子,减轻由此促发的瀑布级联效应。研究证明,其有扩张血管,改善微循环。保护组织抗氧化能力,影响自由基生成等药理作用<sup>[10]</sup>。此外,PNS 还可通过减少炎症细胞游走与浸润,降低血脑屏障的通透性,减少促炎细胞因子 IL-6 产生,上调抗炎细胞因子 IL-10<sup>[11]</sup>。

在本实验中,HE 染色后发现,模型组小鼠海马区的小胶质细胞过度激活,吞噬神经细胞,且在细胞因子研究实验中,模型组血清中的 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 和 C1q 水平含量均高度表达,这与炎症学说中小胶质细胞过度活化释放大炎症因子造成恶性循环是一致的。用药组(包括阳性组、高剂量组和低剂量组),小鼠海马区小胶质细胞没有过度激活,提示 PNS 对 SAMP8 小鼠的免疫炎症反应有一定的抑制作用。

#### [参考文献]

[1] Cui H S, Hayasaka S, Zhang X Y, et al. Effect of berberine on interleukin 8 and monocyte chemotactic protein 1 expression in a human retinal pigment epithelial cell line[J]. Ophthalmic Res, 2006, 38(3): 149.

[2] 卢忠朋,王乃平,钟振国. 三七总皂甙对 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 诱导的 NG108-15 细胞损伤的保护作用[J]. 中国中医药学刊, 2004(5):872.

[3] 钟振国, 卢忠朋, 王乃平. 三七总皂甙对由 A $\beta$ <sub>25-35</sub> 片段诱导 NG108-15 细胞老年性痴呆模型的影响[J]. 中华临床医药杂志, 2004, 23(5): 1.

[4] Zhong Zhenguo, Qu Zeqiang, Bao Yunping, et al. Effects of Panax notoginseng saponins in a rat model of Alzheimer's disease[J]. Neural Regen Res, 2008, 3(1): 37.

[5] Lu Zhong peng, Wang Naiping, Zhong Zhenguo. Protection of Panax Notoginsengsaponins against NG108-15 cells in senile dementia model induced by amyloid beta-peptide 25-35[J]. Chin J Clin Rehabil, 2004, 34(8): 7876.

[6] Zhong Zhenguo, Wu Dengpan, Lü Liang, et al. Effect of Panax notoginseng saponins on the expression of beta-amyloid protein in the cortex of the parietal lobe and hippocampus, and spatial learning and memory in a mouse model of senile dementia[J]. Neural Regen Res, 2008, 3(12): 1297.

[7] 黄金兰,李霏,吴登攀,等. 三七总皂苷对快速老化 SAMP8 小鼠大脑  $\alpha$ -分泌酶 mRNA 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(14): 2127.

[8] Cagnin A, Brooks D J, Kennedy A M, et al. *In-vivo* measurement of activated microglia in dementia[J]. Lancet, 2001, 358(9280): 461.

[9] Town T, Nikolic V, Tan J, et al. The microglial "activation" continuum from innate to adaptive response[J]. Neuroinflammation, 2005, 24(2): 1472.

[10] 江小萍,李海全,潘少霞,等. 三七总皂苷对缺氧再给氧血管内皮细胞 NF- $\kappa$ B 及 ICAM-1 表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(9): 1086.

[11] 徐枝芳,唐璐,陈志刚,等. 早期使用三七总皂苷对大鼠脑出血炎症的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9): 77.

[责任编辑 聂淑琴]

## 《中国中药杂志》2013 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管,中国药学会主办,中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月,是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平,主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路,内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊,128 页,2013 年定价每期 30 元,全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11-2272/R,国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公,如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 [www.ejcm.com.cn](http://www.ejcm.com.cn) 或 [www.中国中药杂志.com](http://www.中国中药杂志.com)。

联系电话:稿件查询 010-64045830 转 602;主任电话 010-64058556;资源与栽培栏编辑:010-64048925;制剂栏编辑:010-64040392;化学栏编辑:010-64040113;药理栏编辑:010-84022522;临床栏编辑:010-64059766;电子杂志制作发行及网上维护:010-64030625。