

· 论 著 ·

华中五味子酮对阿尔茨海默病样大鼠海马内 IL-1 β 及 iNOS 表达的影响

贾丽艳, 拓西平*, 朱嘉琦, 周俊

(第二军医大学长海医院老年病科, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 观察华中五味子酮(schisandrone)对阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)样大鼠海马内白细胞介素 1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)及诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)mRNA 水平的影响, 探讨华中五味子酮对 AD 可能的防治作用。**方法:** 30 只雄性 SD 大鼠, 8~12 周龄, 体质量 250~300 g, 随机分为 3 组: 空白对照组、AD 模型组和华中五味子酮干预组($n=10$)。采用侧脑室立体定向注射 β -淀粉样蛋白(amyloid-beta protein) $A\beta_{25-35}$ (溶于无菌生理盐水, 浓度 10 mmol/L) 的方法, 建立 AD 的动物模型, 并用华中五味子酮(溶于玉米油, 浓度 1 mmol/L)灌胃进行药物干预, 通过半定量 RT-PCR 的方法观察华中五味子酮对 AD 样大鼠海马区 IL-1 β 及 iNOS mRNA 水平的影响。**结果:** 用华中五味子酮干预, AD 样大鼠海马内 IL-1 β 及 iNOS mRNA 水平(0.3337 ± 0.1223 和 0.2666 ± 0.0885)较 AD 样大鼠(0.9693 ± 0.1539 和 0.6660 ± 0.1211)有显著降低($P < 0.001$)。**结论:** 华中五味子酮能够抑制 $A\beta$ 诱导的氧化应激和炎症反应, 在 AD 发病中可能具有保护作用。

[关键词] 阿尔茨海默病; β -淀粉样蛋白; 白细胞介素 1 β ; 诱导型一氧化氮合酶; 华中五味子酮

[中图分类号] R 592 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)02-0161-03

Influence of schisandrone on levels of IL-1 β and iNOS mRNA in hippocampus of rats with Alzheimer-like disease

JIA Li-yan, TUO Xi-ping*, ZHU Jia-qi, ZHOU Jun (Department of Geriatrics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the influence of schisandrone on the levels of IL-1 β and iNOS mRNA in the hippocampus of rats with Alzheimer-like disease (AD) and to investigate the probable prevention and therapy effect of schisandrone on AD. **Methods:** Totally 30 male SD rats, 8-12 weeks old, weighing 250-300 g, were randomly divided into 3 groups: blank control group, AD model group and schisandrone intervention group ($n=10$). The animal model of AD was established by 10 mmol/L amyloid-beta protein ($A\beta_{25-35}$) 5 μ l stereotactic injection into lateral cerebral ventricle of rats and the rats of schisandrone intervention group were administrated with corn oil with 1 mmol/L schisandrone. And then the levels of IL-1 β and iNOS mRNA in the hippocampus were detected by RT-PCR. **Results:** The levels of IL-1 β and iNOS mRNA in the hippocampus of rats with Alzheimer-like disease (0.3337 ± 0.1223 , 0.2666 ± 0.0885) decreased obviously after administration of schisandrone (0.9693 ± 0.1539 , 0.6660 ± 0.1211) ($P < 0.001$). **Conclusion:** Schisandrone can suppress the oxidative stress and inflammatory reaction induced by $A\beta$, suggesting that it may have protective effect on AD.

[KEY WORDS] Alzheimer disease; amyloid-beta protein; interleukin-1 beta; inducible nitric oxide synthase; schisandrone

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(2): 161-163]

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种以记忆减退、认知障碍、人格改变为临床特征的老年中枢神经系统退行性疾病。随着全球人口老龄化, AD 的防治已经成为一个突出的、亟待解决的医疗和社会问题。

本研究采用侧脑室立体定向注射 β -淀粉样蛋白 (amyloid-beta protein) $A\beta_{25-35}$ 的方法建立 AD 大鼠模型^[1], 并用华中五味子酮灌胃进行药物干预, 观察华中五味子酮对 AD 样大鼠海马内白细胞介素 1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β) 及诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) mRNA 水

平的影响, 以探讨华中五味子酮对 AD 可能的防治作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 雄性 SD 大鼠 30 只, 8~12 周龄, 体质量 250~300 g, 由第二军医大学实验动物中心提

[基金项目] 上海联合利华研究与发展基金(200104)。

[作者简介] 贾丽艳(1979-), 女(汉族), 硕士生。

E-mail: lyjia7964@yahoo.com

* Corresponding author. E-mail: xptuo@hotmail.com

供。标准环境下饲养:温度(23±0.5)℃,湿度(50±0.5)%,自然光线,自由进食进水。

1.1.2 试剂 Aβ₂₅₋₃₅ (Sigma 公司),总 RNA 抽提试剂 TRIzol(Gibco 公司),One Step RNA PCR Kit (TaKaRa 公司),琼脂糖(Promega 公司),华中五味子酮(纯度>98%)由第二军医大学药学院天然药物化学教研室陈海生教授提供,其余试剂均为市售分析纯。

1.2 实验分组 将 SD 大鼠随机分为 3 组:(1)空白对照组:大鼠予玉米油灌胃 7 d,方法为用灌胃针将 2 ml 玉米油灌入大鼠胃内,1 次/d,第 8 天侧脑室内注射无菌生理盐水 5 μl,再继续用玉米油灌胃 7 d;(2)AD 模型组:大鼠予玉米油灌胃 7 d,方法同上,第 8 天侧脑室内注射 5 μl 配制的 Aβ 溶液(将 Aβ₂₅₋₃₅ 溶于无菌生理盐水,浓度 10 mmol/L,置 37℃ 恒温箱内孵育 3 d 后备用),再继续用玉米油灌胃 7 d;(3)华中五味子酮干预组:大鼠予含华中五味子酮的玉米油(将华中五味子酮溶于玉米油,浓度 1 mmol/L)灌胃 7 d,方法同上,第 8 天侧脑室内注射前述 Aβ 溶液 5 μl,再继续用含华中五味子酮的玉米油灌胃 7 d。

1.3 制作动物模型 在上述第 8 天侧脑室注射前,先将大鼠用 2%戊巴比妥钠腹腔麻醉(40~50 mg/kg 体质量)后,固定于脑立体定向仪(日本成茂公司 SM-2 型脑立体定向仪)上,剪去头顶部毛发,碘酊消毒后切开皮肤,参照 Paxinos 的《大鼠脑立体定位图》选择右侧侧脑室为注射靶区,于前囟向后 1.0 mm,中线旁开 1.7 mm 处,用牙科钻钻开颅骨,暴露硬脑膜,设定程序控制微量注射器以 15 μm/s 的速度自脑表面垂直进针 3.8 mm,将 10 mmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 溶液 5 μl 缓慢注入,留针 2 min 后缓慢撤针,缝合切口。空白对照组则注入等体积无菌生理盐水。

1.4 IL-1β 及 iNOS mRNA 的半定量测定 引物由上海生工生物有限公司合成(引物序列见表 1)。将大鼠断头取脑,分离右侧海马,取 100 mg 海马组织,用 TRIzol 试剂按照说明书抽提组织总 RNA。以引物为介导、总 RNA 为模板使 mRNA 逆转录生成 cDNA,再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增反应(梯度 PCR 仪为德国 Biometra 公司 TGradient Thermocycler)。反应体系(总体积 50 μl):10×一步法 RT-PCR 缓冲液 5 μl, MgCl₂ (25 mmol/L) 10

μl, dNTP(10 mmol/L) 5 μl, RNA 酶抑制物(40 U/μl) 1 μl, AMV 逆转录酶(5 U/μl) 1 μl, Taq 酶(5 U/μl) 1 μl, 上游引物(20 μmol/L) 1 μl, 下游引物(20 μmol/L) 1 μl, 组织总 RNA 抽提液 1 μl, 去除 RNA 酶的水 24 μl。反应条件:逆转录 50℃ 30 min, 灭活逆转录酶 94℃ 2 min; 进入循环:变性 94℃ 30 s, 退火 55℃ 30 s, 延伸 72℃ 1 min, 共 40 个循环。将得到的扩增产物用 2%琼脂糖(含 0.5 μg/ml 溴乙啶)凝胶电泳,并置于自动凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司 Fluor-STM MultiImager)中,用随机软件分析各条带的光密度值,得到 IL-1β 或 iNOS mRNA 的相对表达量(内参照为 β-actin)。

表 1 人工合成引物序列
Tab 1 Oligonucleotide primers used

Gene	Primer sequence	Product size(bp)
IL-1β		
Sense	5'-CTC CAT GAG CTT TGT ACA AGG-3'	245
Antisense	5'-TGC TGA TGT ACC AGT TGG GG-3'	
iNOS		
Sense	5'-CCA AGA ACG TGT TCA CCA TG-3'	317
Antisense	5'-GAT GTC CAG GAA GTA GGT GAG G-3'	
β-actin		
Sense	5'-TTG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG-3'	764
Antisense	5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AG-3'	

1.5 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 软件进行单因素方差分析,样本均数间多重比较用 LSD-*t* 检验。

2 结果

AD 模型组大鼠海马内 IL-1β 及 iNOS mRNA 水平较空白对照组明显升高($P < 0.001$),华中五味子酮干预组大鼠海马内 IL-1β 及 iNOS mRNA 水平较 AD 模型组显著降低($P < 0.001$),见表 2,图 1。

表 2 大鼠海马 IL-1β 及 iNOS 的 mRNA 水平
Tab 2 Levels of IL-1β and iNOS mRNA in the hippocampus of rats

Group	(n=10, $\bar{x} \pm s$)	
	IL-1β	iNOS
Blank control	0.254 3 ± 0.099 9	0.114 9 ± 0.072 2
AD model	0.969 3 ± 0.153 9**	0.666 0 ± 0.121 1**
Schisandrone intervention	0.333 7 ± 0.122 3	0.266 6 ± 0.088 5

** $P < 0.001$ vs blank control group or schisandrone intervention group

3 讨论

Aβ 异常沉积形成的老年斑是 AD 典型的病理