

· 论 著 ·

## 华中五味子酮对阿尔茨海默病样大鼠学习记忆功能及海马区核因子κB、诱导型一氧化氮合酶表达的影响

于方<sup>1</sup>, 拓西平<sup>1\*</sup>, 吕建勇<sup>1</sup>, 陈海生<sup>2</sup>

(1. 第二军医大学长海医院老年病科, 上海 200433; 2. 第二军医大学药学院药物化学教研室, 上海 200438)

**[摘要]** **目的:** 观察华中五味子酮(Schisandrone)对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)样大鼠学习记忆及海马区核因子κB(nuclear factor-κB)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)表达的影响, 探讨华中五味子酮对AD可能的防治作用。 **方法:** 30只雄性SD大鼠随机分为空白对照组、AD模型组和华中五味子酮干预组3组, 每组各10只。采用侧脑室立体定向注射β淀粉样蛋白(amyloid-beta protein, Aβ)<sub>25-35</sub>的方法, 建立AD的动物模型; 华中五味子酮干预组采用华中五味子酮灌胃进行药物干预, 空白对照组注射生理盐水。通过Morris水迷宫检测大鼠学习、记忆能力, 通过免疫组化法观察大鼠海马区NF-κB及iNOS蛋白的表达。 **结果:** 华中五味子酮干预组大鼠短期学习记忆能力较AD样大鼠有明显改善( $P < 0.05$ ), 海马区NF-κB及iNOS的表达较AD样大鼠明显减少( $P < 0.05$ ), 海马区NF-κB及iNOS的表达呈正相关关系(空白对照组、AD模型组、华中五味子酮干预组的相关系数分别为0.639、0.656、0.682,  $P$ 均 $< 0.05$ )。 **结论:** 华中五味子酮可能通过影响NF-κB信号转导通路而抑制Aβ诱导的氧化应激和炎症反应, 在AD发病中具有保护作用。

**[关键词]** 阿尔茨海默病; 核因子κB; 诱导型一氧化氮合酶; 华中五味子酮; 迷宫学习

**[中图分类号]** R 282.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)12-1351-05

### Schisandrone improves learning and memory abilities of Alzheimer-like rats and influences expression of NF-κB, iNOS in rat hippocampus

YU Fang<sup>1</sup>, TUO Xi-ping<sup>1\*</sup>, LÜ Jian-yong<sup>1</sup>, CHEN Hai-sheng<sup>2</sup> (1. Department of Geriatrics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacochimistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200438)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the influence of Schisandrone on the learning and memory abilities of rats with Alzheimer-like disease and on the expression of NF-κB, iNOS in rat hippocampus, so as to study the prevention effect of Schisandrone on Alzheimer disease (AD). **Methods:** Totally 30 male SD rats were evenly randomized into 3 groups: blank control group, AD model group and Schisandrone intervention group. The AD animal model was established by stereotactic injection of Aβ<sub>25-35</sub> into lateral cerebral ventricle of rats; the rats in Schisandrone intervention group were administrated with Schisandrone. The learning and memory abilities of animals were determined by Morris water maze; the expression of NF-κB, iNOS in the hippocampus was detected by immunohistochemistry. **Results:** The learning and memory abilities of rats in the Schisandrone intervention group were significantly improved compared with those in the AD model group ( $P < 0.05$ ). The expression of NF-κB and iNOS in the hippocampus was significantly decreased in the Schisandrone group than in the AD model group ( $P < 0.05$ ). The expression of NF-κB and iNOS in the hippocampus was positively correlated with each other. The correlation coefficients for the blank control, AD model and Schisandrone intervention groups were 0.639, 0.656 and 0.682, respectively (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Schisandrone can suppress the Aβ-induced oxidative stress and inflammatory reaction through influencing NF-κB signaling pathway, exerting its protective effect on AD.

**[KEY WORDS]** Alzheimer disease; nuclear factor-kappa B; inducible nitric oxide synthase; schisandrone; maze learning

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(12):1351-1355]

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发现至今已百年,但由于其病因不完全明确,迄今尚无有效的防治药物。就目前的进展来看,有关防治AD的药物研究主要还是延缓患者的死亡、部分阻止或延缓疾病的发作和改善患者的生活质量,并提倡个性化治疗<sup>[1]</sup>。传统中药不但成本低廉,且可作用于多靶点,毒副作用小,具有其独特的优势。因此,结

合AD的病因研究,在传统中药中寻找防治AD的有效药物成分是十分有意义的尝试。华中五味子酮(Schisandrone)是从华中五味子中提取分离得到的一种具有4-苯代四氢萘骨架的木脂素<sup>[2]</sup>。本研究采

**[作者简介]** 于方, 硕士, 主治医师。

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

用侧脑室立体定向注射  $\beta$  淀粉样蛋白 (amyloid-beta protein,  $A\beta$ )<sub>25-35</sub> 的方法建立 AD 大鼠模型,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 样大鼠学习记忆能力及海马区核因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 蛋白表达的影响,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 雄性 SD 大鼠 30 只,鼠龄 8~12 周,体质量 250~300 g,由第二军医大学实验动物中心提供,标准环境下饲养。 $A\beta$ <sub>25-35</sub> 由 Sigma 公司生产;NF- $\kappa$ B/P65 蛋白单克隆抗体、iNOS 单克隆抗体和生物素化抗兔 IgG 均购自武汉博士德公司;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。Morris 水迷宫由上海吉量公司生产;脑立体定向仪,江湾 I 号 C 型,第二军医大学生产。

1.2 动物分组和处理 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 日侧脑室内注射无菌生理盐水 5  $\mu$ l,再继续用玉米油灌胃 14 d;(2)AD 模型组,大鼠予玉米油灌胃 7 d,方法同上,第 8 日侧脑室内注射 5  $\mu$ l 配制的  $A\beta$  溶液(将  $A\beta$ <sub>25-35</sub> 溶于无菌生理盐水,浓度 10 mmol/L,置 37 $^{\circ}$ C 恒温箱内孵育 3 d 后备用)<sup>[3]</sup>,再继续用玉米油灌胃 14 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 2 mmol/L)灌胃 7 d,方法同上,第 8 日侧脑室内注射前述  $A\beta$  溶液 5  $\mu$ l,再继续用含华中五味子酮的玉米油灌胃 14 d。

1.3 Morris 水迷宫行为学测定 各组大鼠分别于术后第 10 日开始进行 Morris 水迷宫测试。测试程序为定位航行试验,历时 5 d,前 2 d 为训练适应期,每天上下午各 2 次,将受试大鼠按顺时针方向依次由 E、S、W、N 4 个入水点面向池壁放入水中,记录其寻找并爬上平台所需的时间(逃避潜伏期);后 3 d 记录,如果大鼠在 1 min 内找到平台,记录其实际逃避潜伏期;如果在 1 min 仍未找到平台,则将其引上平台并停留 20 s,逃避潜伏期记录为 1 min。

1.4 脑组织标本制备 侧脑室注射后第 15 日,将大鼠用 2% 戊巴比妥钠腹腔麻醉(40~50 mg/kg)后,快速开胸,经左心室主动脉插管,200 ml 冷生理盐水快速冲洗后,350 ml 含 4% 多聚甲醛 PBS 液灌注固定。除去颅盖,取出完整大脑组织,用上述固定

液固定 24 h 后,自视交叉向后取材 2~4 mm,常规脱水,石蜡包埋,做连续冠状切片,片厚 4  $\mu$ m。常规脱蜡,分别进行 H-E 染色及免疫组化染色。

1.5 免疫组化染色 切片常规脱蜡至水后,用 PBS 洗 5 min  $\times$  3 次。切片加 3%  $H_2O_2$  阻断内源性过氧化物酶,室温下孵育 20 min, PBS 洗 5 min  $\times$  3 次,加抗原修复液,微波 96 $^{\circ}$ C、20 min 修复抗原,取出后自然冷却至室温。PBS 洗 2 min  $\times$  3 次,加入一抗 NF- $\kappa$ B/P65 及 iNOS (1:200)。37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 洗 2 min  $\times$  3 次,加入生物素标记的二抗,室温下孵育 20 min。PBS 洗 5 min  $\times$  3 次。用链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液,室温下孵育 20 min。PBS 洗 5 min  $\times$  3 次。加新鲜配制的 DAB 溶液,呈色 3~5 min。自来水冲洗后用苏木精复染 3~5 min,盐酸乙醇分化,中性树胶封片,镜检。以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.6 结果判定 随机观察 5 个不同高倍视野 ( $\times$ 400),根据每个高倍视野阳性细胞占总细胞的比例判断结果。取 5 个视野的算术平均数并计算各组均数及标准差。

1.7 统计学处理 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 12.0 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。两变量之间的关系用直线相关分析。

## 2 结果

2.1 行为学判定 AD 模型组大鼠的逃避潜伏期从水迷宫试验记录的第 1 日开始较空白对照组就明显延长 ( $P < 0.05$  或  $< 0.01$ ),华中五味子酮干预组从试验记录的第 2 日开始与 AD 模型组比较逃避潜伏期明显缩短 ( $P < 0.05$ ),与空白对照组比较仍有延长(表 1)。

2.2 H-E 染色结果 镜下见空白对照组大鼠海马区神经元排列规则、紧密,形态完整。AD 模型组海马区神经元明显疏松,排列紊乱,层次模糊,有核小深染、成扁圆形的细胞增生,判断为胶质细胞。华中五味子酮干预组海马区神经元无明显缺失,亦可见少许胶质细胞增生现象。见图 1。

2.3 海马区 NF- $\kappa$ B 蛋白表达 NF- $\kappa$ B 在细胞核和胞质都有表达,呈深棕黄色,弥漫或颗粒状分布。AD 模型组神经元及胶质细胞均可见阳性表达,胞核表达主要见于胶质细胞(图 2B)。空白对照组(图 2A)及华中五味子酮干预组(图 2C)也可见阳性表达,而 AD 模型组表达水平明显增高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),见表 2。

2.4 海马区 iNOS 蛋白表达 iNOS 定位于细胞质

中,阳性染色为棕黄色或棕色(图 3),空白对照组及 AD 模型组( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),见表 2。华中五味子酮干预组中 iNOS 阳性细胞明显少于

表 1 各组大鼠水迷宫逃避潜伏期  
Tab 1 Escape latencies of water maze in rats of each group

( $n=10, \bar{x} \pm s, t/s$ )

Group	d1	d2	d3
Blank control	27.53 ± 14.96	13.17 ± 6.79	13.01 ± 6.83
AD model	42.19 ± 12.29*	31.28 ± 20.59**	23.91 ± 8.05**
Schisandrone intervention	33.22 ± 14.96	20.55 ± 14.77 $\Delta$	17.52 ± 7.73 $\Delta$

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs blank control;  $\Delta P < 0.05$  vs AD model

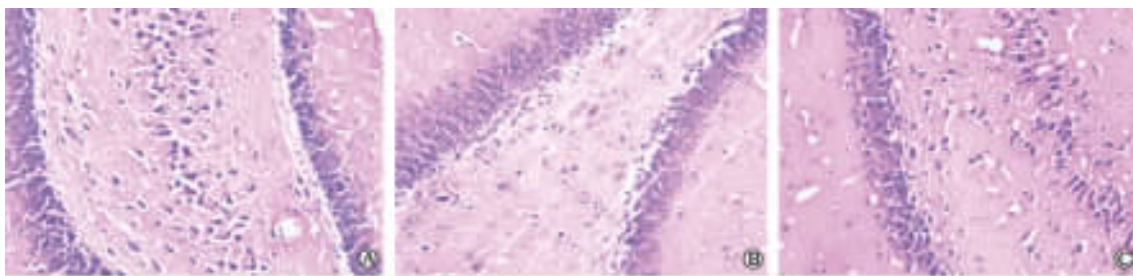


图 1 3 组大鼠海马区 H-E 染色结果  
Fig 1 H-E staining of rat hippocampus in 3 groups ( $\times 200$ )  
A: Blank control; B: AD model; C: Schisandrone intervention

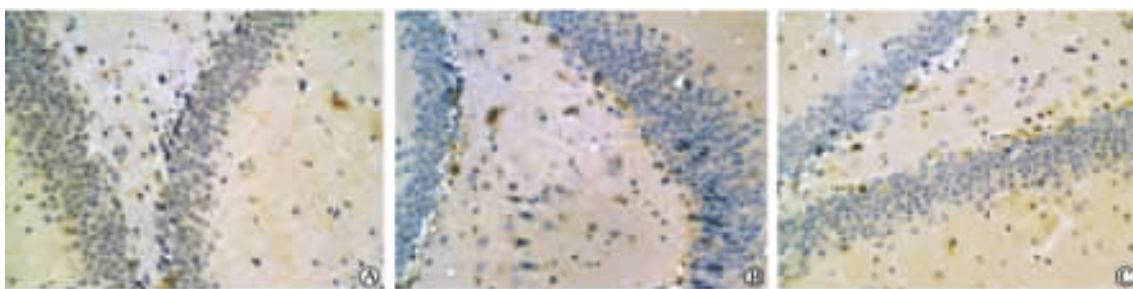


图 2 3 组大鼠海马区 NF- $\kappa$ B 免疫组化染色结果  
Fig 2 Immunohistochemical staining for NF- $\kappa$ B in rat hippocampus in 3 groups ( $\times 200$ )  
A: Blank control; B: AD model; C: Schisandrone intervention

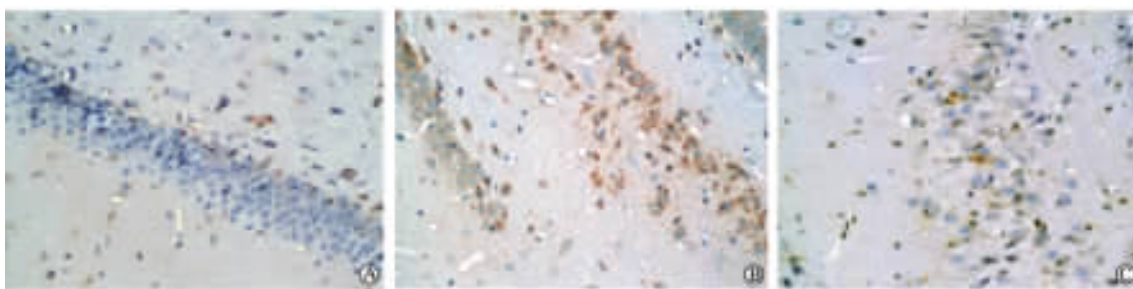


图 3 3 组大鼠海马区 iNOS 免疫组化染色结果  
Fig 3 Immunohistochemical staining for iNOS in rat hippocampus in 3 groups ( $\times 200$ )  
A: Blank control; B: AD model; C: Schisandrone intervention

表 2 NF-κB、iNOS 在大鼠海马组织的表达情况

Tab 2 Expression of NF-κB, iNOS in hippocampus of rats

(n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	NF-κB	iNOS
Blank control	23.36 ± 2.31	11.56 ± 4.69
AD model	29.40 ± 4.01**	34.42 ± 5.99**
Schisandrone intervention	25.66 ± 4.34 <sup>△</sup>	25.05 ± 2.19 <sup>△</sup>

\*\* P < 0.01 vs blank control; <sup>△</sup> P < 0.05 vs AD model

2.5 iNOS 表达量和 NF-κB 表达量的相关分析 大鼠脑组织海马区 NF-κB 阳性细胞密度与 iNOS 阳性细胞密度呈显著正相关关系(空白对照组、AD 模型组、华中五味子酮干预组的相关系数分别为 0.639、0.656、0.682, P < 0.05)。

### 3 讨论

AD 是一种进行性、退行性神经系统病变,脑内老年斑(SP)形成是其重要的病理构成之一,而 Aβ 是 SP 的核心部分并被认为是 AD 发病的关键<sup>[4]</sup>。Aβ 侧脑室定向注射是目前建立 AD 动物模型较常用的方法之一。本实验采用大鼠急性脑室内注射 Aβ<sub>25-35</sub>, 2 周内大鼠水迷宫试验学习记忆能力下降,出现类 AD 表现。H-E 染色见脑内海马区神经元明显疏松,排列紊乱,且出现胶质细胞增生,符合 AD 的病理改变。

iNOS 是炎症中的一种反应性酶类,其表达不仅是反应性胶质细胞增生的标志之一,也与神经元损伤有关。iNOS 能够持续大量地催化一氧化氮(NO)产生,而 NO 具有潜在神经毒性,是 AD 中氧化应激的有效来源,过量 NO 可通过多种途径损伤膜性结构、蛋白质及 DNA,导致神经元坏死<sup>[5-6]</sup>。用 Slot 印迹分析表明,iNOS 蛋白在 AD 的脑微血管内的表达显著高于其在对照脑的微血管表达<sup>[7]</sup>。本研究显示,侧脑室注射 Aβ<sub>25-35</sub> 后,皮质下、海马区神经元及胶质细胞 iNOS 的表达均明显增加。

有关 NO 释放的调控机制目前仍不清楚,研究发现可能与 NF-κB 活化有关。NF-κB 广泛存在于神经系统中,是参与神经元和胶质细胞功能的一种重要的转录因子。Combs 等<sup>[8]</sup>发现 Aβ 诱导酪氨酸激酶活化,并激活 NF-κB 依赖的信号途径,使小胶质细胞和单核细胞中肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)α 和白细胞介素(interleukin, IL)1β 等细胞因子表达增加,同时 iNOS 表达及过氧化硝酸

盐产物增加,最终导致神经元凋亡或死亡。业已证实,在 iNOS 启动子也存在 NF-κB 的结合位点<sup>[9]</sup>。

NF-κB 是由 P65、P50 组成的异源二聚体,静息状态时与 NF-κB 抑制单体(IκB)结合成非活性状态存在于胞质中,当机体受到外界刺激时,在蛋白激酶(IKK)的作用下,IκB 发生磷酸化,通过依赖于泛素/蛋白酶的途径降解,使 NF-κB 游离出来而激活,并移位入细胞核,与靶基因的 κB 序列结合启动基因转录<sup>[10]</sup>。本实验观察到,侧脑室注射 Aβ<sub>25-35</sub> 后,海马区 NF-κB 的表达明显增多,胞质、胞核均有表达,而胞核表达以胶质细胞为多。由于 NF-κB 被激活后由胞质进入核内,说明侧脑室注射 Aβ<sub>25-35</sub> 后可能胶质细胞更多被激活。在各实验组,胞质中 NF-κB 的阳性表达也以模型组显著增多,可能表明 NF-κB 被激活向核内转移过程中,IκB 起到调控 NF-κB 过度活化的作用,从而引起 NF-κB P65 胞质内滞留现象。也可能由于 NF-κB 被激活向核内转移会使胞质内 NF-κB P65 正反馈性增多。

有研究显示,五味子具有抗衰老作用。周忠光<sup>[11]</sup>研究表明,五味子浸出液能延缓小鼠大脑皮质毛细胞基膜增厚,降低毛细血管月增长率,改善大脑皮质内的血液供应,在小鼠寿命实验中,给药组较对照组寿命显著延长。许多五味子水提液药理活性的报道如五味子水煎剂对老龄鼠脑、肝超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性有明显增强作用并且对脑 SOD 活性增强作用较肝更明显<sup>[12]</sup>。华中五味子的有效药物成分主要为木脂素类,包括五味子酚、五味子酯、五味子醇等<sup>[12]</sup>,五味子酮在结构上与五味子酚相似,且有研究<sup>[13]</sup>显示华中五味子酮对维生素 C-NADPH 系统或 Fe<sup>2+</sup>-半胱氨酸系统诱发的脑微粒体脂质过氧化有抑制效应,对黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶系统产生的超氧阴离子具有清除作用,其抗氧化活性强于维生素 E,对处于活性氧应激状态下的细胞具有保护作用。最近有研究表明,从中药五味子中分离得到的一种具有二苯环辛二烯骨架的新的木脂素,其抗氧化活性与环外亚甲基形成有关<sup>[14]</sup>。我们前期研究发现五味子酮能够抑制 Aβ 诱导的神经元内[Ca]<sup>i</sup>的增加,维持细胞内钙稳态<sup>[15]</sup>,下调 AD 样大鼠海马区小胶质细胞中 IL-1β、iNOS 的转录水平,对 AD 样大鼠学习记忆能力的损害有一定程度的改善作用<sup>[3]</sup>,提示华中五味子酮能够抑制 Aβ 诱导的氧化应激和炎性反应,在 AD 发病中可

能具有保护作用,但其具体机制尚不清楚。而本实验发现,用华中五味子酮进行药物干预,能够降低 AD 样大鼠海马区 NF- $\kappa$ B 及 iNOS 蛋白表达水平,且 NF- $\kappa$ B 及 iNOS 的表达具有相关性,提示五味子酮不仅能够抑制大鼠海马区 iNOS 的 mRNA 水平表达,也抑制了其蛋白表达。同时,由于 NF- $\kappa$ B 及 iNOS 的表达具有相关性,五味子酮可能是通过对 NF- $\kappa$ B 转导途径的干预起作用的。

已经有研究<sup>[16]</sup>证明抑制 NF- $\kappa$ B 对于炎症疾病的治疗包括 AD 的发生、发展是有益的。而中药则可能在这一方面具有副作用小的优点。但五味子酮是通过抑制 I $\kappa$ B 的磷酸化从而增加了 I $\kappa$ B 的表达还是通过阻止 P65 或 P50 进入核内从而达到抑制 NF- $\kappa$ B 的作用有待进一步研究。

### [参考文献]

[1] Seow D, Gauthier S. Pharmacotherapy of Alzheimer disease [J]. Can J Psychiatry, 2007, 52: 620-629.

[2] Lian-Niang L, Hung X. Schisandrone, a new 4-aryltetralone lignan from *Schisandra sphenanthera* [J]. Planta Med, 1985, 51: 217-219.

[3] 贾丽艳,拓西平,朱嘉琪,等. 华中五味子酮对阿尔茨海默病样大鼠海马内 IL-1 $\beta$  及 iNOS 表达的影响[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26: 161-163.

[4] Chong Z Z, Li F, Maiese K. Stress in the brain: novel cellular mechanisms of injury linked to Alzheimer's disease [J]. Brain Res Brain Res Rev, 2005, 49: 1-21.

[5] Haas J, Storch-Hagenlocher B, Biessmann A, et al. Inducible nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase: co-induction in brain tissue of patients with Alzheimer's dementia and following stimulation with beta-amyloid 1-42 *in vitro* [J]. Neurosci Letters, 2002, 322: 121-125.

[6] Cárdenas A, Moro M A, Hurtado O, et al. Dual role of nitric

oxide in adult neurogenesis [J]. Brain Res Brain Res Rev, 2005, 50: 1-6.

[7] Grammas P. A damaged microcirculation contributes to neuronal cell death in Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2000, 21: 199-205.

[8] Combs C K, Patricia B, Karlo J C, et al. Regulation of  $\beta$ -amyloid stimulated proinflammatory responses by peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  [J]? Neurochem Internat, 2001, 39: 449-457.

[9] Harbrecht B G, Taylor B S, Xu Z, et al. cAMP inhibits inducible nitric oxide synthase expression and NF- $\kappa$ B-binding activity in cultured rat hepatocytes [J]? Surg Res, 2001, 99: 258-264.

[10] Lee S Y, Son D J, Lee Y K, et al. Inhibitory effect of sesaminol glucosides on lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B activation and target gene expression in cultured rat astrocytes [J]. Neurosci Res, 2006, 56: 204-212.

[11] 周忠光. 五味子对小鼠大脑皮质内毛细血管超微结构影响的研究——抗衰老试验 [J]. 中医药学报, 1992, 4: 47-49.

[12] 李晓光,高 勤. 五味子有效部位及其药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2005, 28: 156-159.

[13] 黄治森,何 燕,张均田. 五味子三种成分的抗氧化作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1990, 4: 275-277.

[14] Choi Y W, Takamatsu S, Khan S I, et al. Schisandrone, a dibenzocyclooctadiene lignan from *Schisandra chinensis*: structure-antioxidant activity relationships of dibenzocyclooctadiene lignans [J]. J Nat Prod, 2006, 69: 356-359.

[15] 朱嘉琪,拓西平,贾丽艳,等. 五味子酮对  $\beta$ -淀粉样蛋白诱导大鼠海马神经元内游离钙离子浓度变化的影响 [J]. 上海医学, 2005, 28: 790-792.

[16] Jain N K, Patil C S, Kulkarni S K, et al. Modulatory role of cyclooxygenase inhibitors in aging and scopolamine or lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction in mice [J]. Behav Brain Res, 2002, 133: 369-376.

[收稿日期] 2007-05-11 [修回日期] 2007-11-01  
[本文编辑] 曹 静

• 消 息 •

## 《实用药品正异名词典》(2007 年版)征订启事

为方便临床医生合理选用药物,以及便于医药科研、经营工作者学习与掌握有关药物知识,同时顺应国家食品药品监督管理局逐步加强对药品说明书的规范和管理形势,我们在工作实践中收集、筛选、整理了临床使用药物,编辑出版了《实用药品正异名词典》一书。收集了中、英文药名共计 47000 余条,包括中文名称、英文名称、异名、药理作用等内容。刊载内容广泛,查询方便快捷。定价 280 元。

单位名称:国家食品药品监督管理局信息中心期刊处  
开户名称:国家食品药品监督管理局信息中心  
开户银行:建设银行北京展览路支行账号(11001016700056002517)  
通讯地址:北京市西城区北礼士路甲 38 号,邮编:100810  
电 话:010-62214715、62214665、88330061,传真:010-62214866  
电子邮件:zgyxwz@163.com