

[17] Rajapurohitam V, Izaddoustdar F, Martinez-Abundis E, *et al.* Leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy reveals both calcium-dependent and calcium-independent/RhoA-dependent calcineurin activation and NFAT nuclear translocation[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(21): 2283-2290.

[18] Cong M C, Iizuka K, Nixon G, *et al.* Role of guanine nucleotide-binding proteins-ras- family or trimetric proteins or both-in  $Ca^{2+}$  sensitization of smooth muscle[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3): 1340-1345.

[19] 杨先金, 张新金. RhoA/ROCK 信号通路与心脏重构关系的研究进展[J]. *心脑血管病防治*, 2016, 16(1): 43-45.

[20] Janssens S, Pokreisz P, Schoonjans L, *et al.* Cardiomyocyte-specific over expression of nitric oxide synthase3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2004, 94(9): 1256-1262.

[21] Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, *et al.* Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiac hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion [J]. *Circ J*, 2002, 66(9): 851-856.

[22] Mita S, Kobayashi N, Yoshida K, *et al.* Cardioprotective mechanisms of Rho-kinase inhibition associated with eNOS and oxidative stress-LOX-1 pathway in Dahl salt-sensitive hypertensive rats[J]. *Hypertens*, 2005, 23(1): 87-96.

## 七宝美髯口服液对小鼠脑组织 SOD 活力及羰基化蛋白含量的影响

孟 诗<sup>1</sup>, 魏江平<sup>1</sup>, 郑 航<sup>1</sup>, 吴 倩<sup>1</sup>, 付 昆<sup>1</sup>, 张占军<sup>2</sup>, 徐世军<sup>1</sup>

(1. 成都中医药大学, 四川省中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137;  
2. 北京师范大学认知神经科学与学习国家重点实验室, 北京 100875)

**摘要:** **目的** 观察七宝美髯口服液(制何首乌、当归、补骨脂等)对 SAMP8 小鼠学习记忆功能、海马组织病理形态及 SOD 活力、羰基化蛋白含有量的影响。**方法** 27 只 SAMP8 小鼠随机均分为模型对照组、盐酸多奈哌齐组及七宝美髯口服液组,另取 9 只 SAMR1 小鼠作为正常对照组,连续灌胃 60 d,在给药第 56 天进行避暗训练,5 d 后测定学习记忆能力;HE 染色观察病理形态;ELISA 法检测脑组织中 SOD 活力和羰基化蛋白含有量。**结果** 与模型对照组比较,七宝美髯口服液组小鼠的逃避潜伏期显著延长,错误次数明显降低 ( $P<0.01$ ),海马组织的病理形态显著改善,SOD 活力显著升高,羰基化蛋白含有量明显降低 ( $P<0.01$ )。**结论** 七宝美髯口服液能改善 SAMP8 小鼠的学习记忆功能,减轻海马组织的退行性病变程度。

**关键词:** 七宝美髯口服液;退行性病变;SOD;羰基化蛋白;SAMP8 小鼠

**中图分类号:** R285.5                      **文献标志码:** A                      **文章编号:** 1001-1528(2017)07-1347-04

**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2017.07.004

## Effects of Qibao Meiran Oral Liquid on SOD activity and carbonyl protein content in brain tissue of mice

MENG Shi<sup>1</sup>, WEI Jiang-ping<sup>1</sup>, ZHENG Hang<sup>1</sup>, WU Qian<sup>1</sup>, FU Kun<sup>1</sup>, ZHANG Zhan-jun<sup>2</sup>,  
XU Shi-jun<sup>1</sup>

(1. Sichuan Provincial State Key Laboratory Breeding Base for Systematic Research, Development and Utilization of Traditional Chinese Medicine Resources, Cheugdu University of Traditional Chinese Medicine, Cheugdu 611137, China; 2. National Key Laboratory of Cognitive Neuroscience and Learning, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To observe the effects of Qibao Meiran Oral Liquid (*Polygoni multiflori Radix Praeparata, Angelicae sinensis Radix, Psoraleae Fructus, etc.*) on learning and memory function, hippocampus tissue patholog-

收稿日期: 2016-11-17  
基金项目: 国家自然科学基金重点项目(81430100);四川省学术和技术带头人培养资金资助项目(2015058);中药药理四川省青年科技创新研究团队项目(2014TD0007)  
作者简介: 孟 诗(1992—),女,硕士生,从事中药神经精神药理学研究。Tel: (028) 61800231, E-mail: 13548011382@163.com  
\* 通信作者: 徐世军(1975—),男,博士,从事中药神经精神药理学研究。Tel: (028) 6180023, E-mail: docxu@126.com

ical morphology, SOD activity and carbonyl protein content in SAMP8 mice. **METHODS** Twenty-seven SAMP8 mice were randomly and equally divided into model control group, donepezil hydrochloride group and Qibao Meiran Oral Liquid group. Another nine SAMR1 mice were selected as normal control group. Mice were given successive intragastric administration for 60 days. On the 56th day, the passive avoidance test was adopted, and the learning and memory capacities were determined after 5 d; The pathological morphology was observed by HE staining; ELISA assay was used to detect the activity of SOD and the content of carbonyl protein in brain tissue. **RESULTS**

Compared with the model control group, the escape latency of mice in the Qibao Meiran Oral Liquid group was significantly prolonged, and the number of errors decreased significantly ( $P < 0.01$ ); the pathological morphology of hippocampus tissue was significantly improved; SOD activity increased significantly, and carbonyl protein content decreased significantly ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION** Qibao Meiran Oral Liquid can not only improve the learning and memory function of SAMP8 mice, but also reduce the degree of hippocampus tissue degenerative disease.

**KEY WORDS:** Qibao Meiran Oral Liquid; degenerative disease; SOD; carbonyl protein; SAMP8 mice

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是以记忆力受损、认知功能障碍和行动力下降为主要临床特征的渐进性神经系统退变疾病, 目前尚未研发出有效逆转 AD 病情的药物, 因此对 AD 早期阶段进行干预具有重要意义。衰老被公认为 AD 的首要易感因素, 研究发现, 氧化应激和羰基应激是衰老的重要特征, 同时也启动和加剧了神经系统退行性病变<sup>[1]</sup>。超氧化歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 作为重要的内源性氧化防御酶, 其活性的降低可导致自由基的累积而介导生物大分子的氧化损伤<sup>[2]</sup>。羰基化蛋白 (carbonyl protein, PC) 是氧化应激和羰基应激的共同异常代谢产物, 其涉及到了蛋白质折叠、能量代谢、信号转导及胆碱能神经元发展的多种关键性蛋白<sup>[3]</sup>, 故认为 SOD 活力的降低和蛋白质的羰基化修饰是 AD 的重要上游机制。七宝美髯口服液的既往研究主要集中在抗衰老方面, 研究表明其能降低脑组织的脂褐素<sup>[4]</sup>, 对抗缺血性脑组织的自由基损伤<sup>[5]</sup>, 并对老龄小鼠神经元超微结构的老化形态有重构和改善作用<sup>[6-7]</sup>, 可能成为潜在的抗 AD 候选药物。本实验采用 SAMP8 小鼠模拟 AD 模型, 观察七宝美髯口服液对 SOD 活力和羰基化蛋白含有量的影响, 探究其抗 AD 的作用机制。

## 1 材料

1.1 药物与试剂 七宝美髯口服液 (制何首乌、当归、补骨脂、枸杞子、菟丝子、茯苓、牛膝, 新乡佐今明制药股份有限公司, 批号 19140202); 盐酸多奈哌齐 (安理申, 卫材制药有限公司, 批号 100319A); 羰基化蛋白试剂盒 (批号 046310)、SOD 试剂盒 (批号 0461532), 均购自美国派克生物公司。

1.2 动物 SAMP8/SAMR1 小鼠, SPF 级, 全雄性, 体质量 ( $30 \pm 2$ ) g, 6 月龄, 购自北京大学医学部 (实验动物科学部), 动物合格证号为 SCXK (京) 2011-0012。小鼠在室温  $22 \sim 24$  °C、明暗周期 12 h/12 h 条件下饲养。

1.3 仪器 BA-200 自动避暗测试仪 (成都泰盟科技有限公司); 3001 自动酶标仪 (赛默飞世尔科技有限公司); BMJ-Ⅲ型包埋机 (常州郊区中威电子仪器厂); PHY-Ⅲ型病理组织漂烘仪 (常州市中威电子仪器有限公司)。

## 2 方法

2.1 分组及给药 适应性喂养 7 d 后, 小鼠避暗仪筛选行为学无明显差异的 SAMP8 小鼠 27 只, 按体质量随机分为 SAMP8 组、安理申组 ( $1.62$  mg/kg)、七宝美髯口服液组 ( $3$  mL/kg), 另取 9 只 SAMR1 小鼠作为空白对照组。小鼠灌胃给予相应药物, 1 次/d,  $10$  mL/kg, 连续 60 d。

2.2 小鼠学习记忆功能测定 给药第 56 天, 参照文献[8]方法进行小鼠避暗实验训练。训练后第 5 天进行学习记忆功能测定, 即将小鼠头部背对洞口放入避暗仪明室适应 3 min, 撤去隔板后在暗室通 36 V 的交流电, 记录小鼠放入明室到进入暗室第 1 次触电的时间 (潜伏期) 和 5 min 内小鼠进入暗室被电击次数 (错误次数)。

2.3 标本制备及指标检测 避暗测试结束后, 脱臼处死小鼠, 每组随机取 6 只于无菌冰浴条件下取脑, 左半脑用 4% 中性甲醛固定, 常规制片, HE 染色, 进行病理形态学观察; 右侧半脑按照试剂盒说明书, 检测 SOD 活力和羰基化蛋白含有量。

2.4 数据处理与分析 数据均以“均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )”表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行统计

分析, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,  $P < 0.01$  为差异有显著统计学意义。

3 结果

3.1 对 SAMP8 小鼠学习记忆功能的影响 由表 1 可知, 与 SAMR1 组比较, SAMP8 组小鼠避暗逃避潜伏期显著缩短, 错误次数明显增多, 有显著的统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 与 SAMP8 组比较, 七宝美髯口服液组小鼠的避暗逃避潜伏期显著延长, 错误次数明显降低, 有显著的统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

表 1 七宝美髯口服液对 SAMP8 小鼠学习记忆功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Tab. 1 Effects of Qibao Meiran Oral Liquid on learning and memory function of SAMP8 mice ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

| 组别       | 逃避潜伏期/s            | 错误次数/次          |
|----------|--------------------|-----------------|
| SAMR1 组  | 248.78 ± 76.23 **  | 0.22 ± 0.44 **  |
| SAMP8 组  | 63.50 ± 97.09 ###  | 2.38 ± 2.39 ### |
| 安理申组     | 259.78 ± 61.25 **  | 0.11 ± 0.33 **  |
| 七宝美髯口服液组 | 197.67 ± 119.39 ** | 0.11 ± 0.33 **  |

注: 与 SAMR1 组比较, ### $P < 0.01$ ; 与 SAMP8 组比较, \*\* $P < 0.01$

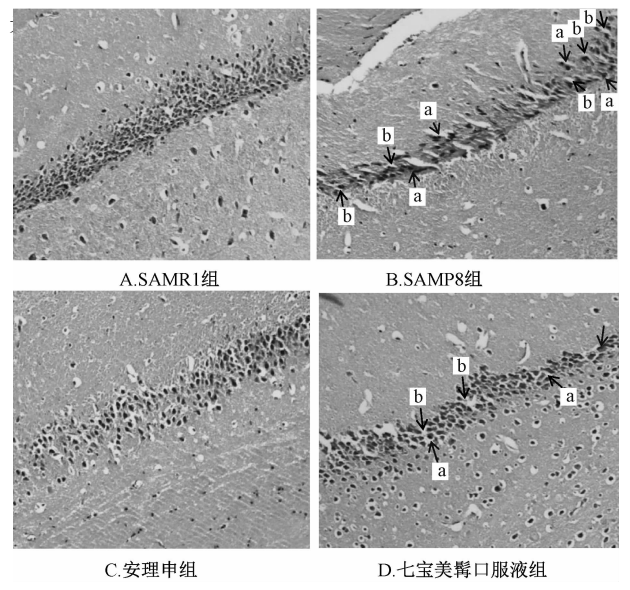
3.2 对 SAMP8 小鼠海马组织病理形态的影响

SAMR1 小鼠海马的锥体细胞密集, 排列整齐, 胞体大而圆, 胞浆和胞核染色均匀, 胞膜结构完整 (图 1A); SAMP8 小鼠海马锥体细胞稀疏, 排列紊乱, 胞体较小, 偶见空泡变性及坏死, 胞浆胞核染色不均匀, 胞核固缩深染, 可见细胞膜溶解 (图 1B); 与 SAMP8 小鼠比较, 七宝美髯口服液组小鼠海马组织的病变程度显著减轻 (图 1D)。

3.3 对 SAMP8 小鼠脑组织 SOD 活力和羰基化蛋白含量的影响 由表 2 可知, 与 SAMR1 组比较, SAMP8 小鼠脑组织 SOD 活性显著降低 ( $P < 0.05$ ), 羰基化蛋白含量显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 SAMP8 组比较, 七宝美髯口服液组小鼠脑组织的 SOD 活性显著升高 ( $P < 0.01$ ), 羰基化蛋白含量显著降低 ( $P < 0.01$ )。

4 讨论

AD 的病程进展与年龄呈明显的正相关, 学术界公认为以衰老为核心的病理改变在 AD 的病程恶化中发挥了重要作用。研究表明, 机体衰老时, 伴随着氧化防御系统和羰基防御系统的功能增龄性下降, 活性氧介导的生物大分子的氧化损伤产物及 4-羟基壬烯醛、丙烯醛、高级糖基化终产物 (AGEs) 等活性羰基化合物在脑组织内大量生成和蓄积, 诱发了神经细胞功能紊乱, 加剧了衰



注: 箭头 a 指细胞核固缩深染, 箭头 b 指锥体细胞空泡变性  
图 1 七宝美髯口服液对 SAMP8 小鼠海马组织病理形态的影响 (HE,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of Qibao Meiran Oral Liquid on the pathological morphology of hippocampus tissue in SAMP8 mice (HE,  $\times 200$ )

表 2 七宝美髯口服液对 SAMP8 小鼠脑组织 SOD 活力和羰基化蛋白含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Tab. 2 Effects of Qibao Meiran Oral Liquid on SOD activity and carbonyl protein content in the brain tissue of SAMP8 mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 组别       | 剂量         | SOD 活性/<br>(U·mg <sup>-1</sup> ) | 羰基化蛋白/<br>(nmol·mL <sup>-1</sup> ) |
|----------|------------|----------------------------------|------------------------------------|
| SAMR1 组  | -          | 155.08 ± 6.67 *                  | 3.25 ± 0.39 **                     |
| SAMP8 组  | -          | 124.53 ± 4.25 #                  | 15.72 ± 5.40 ###                   |
| 安理申组     | 1.62 mg/kg | 150.65 ± 15.21 *                 | 6.58 ± 3.06 **                     |
| 七宝美髯口服液组 | 3 mL/kg    | 160.42 ± 40.90 **                | 7.18 ± 3.64 **                     |

注: 与 SAMR1 组比较, # $P < 0.05$ , ### $P < 0.01$ ; 与 SAMP8 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

过程, 并启动了 AD 病情<sup>[9]</sup>。活性氧是氧化应激的始动因素, SOD 可清除 O<sup>2-</sup>·, 减少活性氧的生成, 与谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 以及过氧化氢酶 (CAT) 等组成内源性抗氧化酶系, 协同发挥清除自由基的作用, 目前 SOD 被广泛用于评价抗脑组织抗氧化能力的标准。羰基化蛋白是氧化应激与羰基应激的共同分子机制, 活性氧攻击蛋白质肽链或活性羰基物质, 通过羰-氨交联可形成羰基化蛋白, 高度羰基化修饰能导致蛋白质的功能减少, 甚至完全丧失, 并启动蛋白质形成高分子量的具有潜在毒性的聚合物<sup>[10]</sup>。羰基化蛋白具有不易被泛素-蛋白酶系统降解的特性, 其分子内和分子间易羰-

氨交联形成聚合物,是老年色素形成的核心机制,也是加速  $\beta$ -淀粉样蛋白沉积、老年斑和神经纤维缠结的形成的关键环节<sup>[11]</sup>。因此,SOD 活力的降低和蛋白质的羰基化修饰是 AD 的重要上游因子,为早期干预 AD 提供了重要的策略。

传统中医理论认为,AD 主要病机为肾精亏虚脑髓,血瘀痰阻而阻滞脑络。七宝美髯口服液延续了著名延缓衰老的方剂配伍组成,以补肾的何首乌为君药,臣以补肾益精的菟丝子、枸杞子,并以活血的牛膝、渗湿的茯苓等共为佐药,诸药合用共达治本去标之效。现代药理研究表明,处方所含的二苯乙烯苷<sup>[12]</sup>、补骨脂素<sup>[13]</sup>、阿魏酸<sup>[14]</sup>、枸杞多糖<sup>[15]</sup>等活性成分均具有抗衰老、抗氧化的作用。

SAMP8 小鼠的学习记忆功能呈增龄性加速衰退,中枢神经系统海马、皮层等部分也存在退行性病理改变,能较好地模拟与 AD 相关的衰老模型<sup>[16]</sup>。SAMP8 小鼠经七宝美髯口服液治疗干预后,与 SAMP8 组比较,其避暗逃避潜伏期显著延长,错误次数明显降低,同时海马组织的退行性病理改变亦显著改善,说明七宝美髯口服液具有改善 SAMP8 小鼠学习记忆功能和海马神经退变的作用;此外,七宝美髯口服液可以显著提高 SAMP8 小鼠脑组织 SOD 的活性,并对羰基化蛋白含量异常增高具有显著的拮抗作用。本研究结果初步提示,七宝美髯口服液具有一定的抗阿尔茨海默病作用,其机制与清除自由基、减少羰基化蛋白质含量有关。

参考文献:

[ 1 ] Radak Z, Zhao Z, Goto S, *et al.* Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA [J]. *Mol Aspects Med*, 2011, 32(4): 305-315.

[ 2 ] Sarsour E H, Kalen A L, Goswami P C. Manganese superoxide dismutase regulates a redox cycle within the cell cycle[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(10): 1618-1627.

[ 3 ] Shen L, Chen C, Yang A, *et al.* Redox proteomics identification of specifically carbonylated proteins in the hippocampi of triple transgenic Alzheimer's disease mice at its earliest pathological stage[J]. *J Proteomics*, 2015, 123: 101-113.

[ 4 ] 瞿延晖,张六通. 七宝美髯丹对衰老生物学影响的综合实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(3): 20-23.

[ 5 ] 支 娜,王桂敏. 七宝美髯丹对局灶性脑缺血大鼠自由基损伤的保护作用[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(13): 3064-3065.

[ 6 ] 瞿延晖,文昌湖,张六通,等. 七宝美髯丹对老龄鼠神经元超微结构和突触界面结构影响的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(4): 24-27.

[ 7 ] 瞿延晖,文昌湖,徐锡萍,等. 七宝美髯丹对老年小鼠扣带回超微结构影响的研究[J]. 中国中医药科技, 2002, 9(4): 228-230.

[ 8 ] 马 涛,徐世军,张允岭,等. 益肾化浊解毒法对 D-半乳糖致痴呆小鼠学习记忆及氧化应激的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(7): 895-897.

[ 9 ] Pole A, Dimri M, Dimri G P. Oxidative stress, cellular senescence and ageing[J]. *AIMS Mol Sci*, 2016, 3(3): 300-324.

[10] Singh M, Kapoor A, Bhatnagar A. Oxidative and reductive metabolism of lipid-peroxidation derived carbonyls[J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 234: 261-273.

[11] Fedorova M, Bollineni R C, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage; update of analytical strategies[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2014, 33(2): 79-97.

[12] 周 莹,刘广锋,冯 娟,等. 何首乌 3 种组分的提取及其清除 DPPH 自由基作用的研究[J]. 广东药学院学报, 2014(3): 301-304.

[13] Miolo G, Salvador A, Mazzoli A, *et al.* Photochemical and photobiological studies on furoquinazolines as new psoralen analogs [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2014, 138: 43-54.

[14] Picone P, Nuzzo D, Di Carlo M. Ferulic acid: a natural antioxidant against oxidative stress induced by oligomeric A-beta on sea urchin embryo[J]. *Biol Bull*, 2013, 224(1): 18-28.

[15] He N, Yang X, Jiao Y, *et al.* Characterisation of antioxidant and antiproliferative acidic polysaccharides from Chinese wolfberry fruits[J]. *Food Chem*, 2012, 133(3): 978-989.

[16] Zhu L, Yu J, Shi Q, *et al.* Strain-and age-related alteration of proteins in the brain of SAMP8 and SAMR1 mice[J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 23(4): 641-654.