

# 异黑颗粒对 APP/PS1 双转基因模型小鼠学习记忆和抗氧化能力的影响

哈木拉提·吾甫尔<sup>1</sup>, 党明<sup>1</sup>, 热娜古丽·艾则孜<sup>1</sup>, 帕丽丹·吾术尔<sup>2</sup>, 阿不都卡德尔·库尔班<sup>1</sup>, 努尔买买提·艾买提<sup>1</sup>

1. 新疆医科大学维吾尔医学院, 乌鲁木齐 830011
2. 新疆医科大学附属中医医院心身科, 乌鲁木齐 830000

**摘要** 为了观察异黑颗粒对小鼠行为学习及抗氧化能力的影响, 选用 APP/PS1 双转基因模型小鼠, 将其随机分成 5 组, 另取同窝阴性小鼠作为正常对照组, 每组 8 只, 3 个月龄后开始给药。给药 6 个月后, 通过行为学实验测试小鼠学习记忆能力的变化, 采用分光光度法测定脑组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性。Morris 水迷宫实验结果表明, APP/PS1 双转基因模型小鼠逃避潜伏期较正常组明显延长, 在原象限停留时间明显缩短; 异黑颗粒组小鼠逃避潜伏期较模型组明显缩短, 在原象限停留时间明显延长。APP/PS1 双转基因模型小鼠脑组织 GSH-Px、SOD 活力下降; 异黑颗粒治疗组学习和记忆能力升高, 脑组织 GSH-Px、SOD 活力升高, 与阿尔茨海默病模型组比较有显著性差异。研究表明, APP/PS1 双转基因模型小鼠 9 个月后发现有明显学习记忆功能障碍伴有抗氧化能力下降, 异黑颗粒对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆障碍具有明显改善作用并且可剂量依赖性的提高阿尔茨海默病模型小鼠的抗氧化能力。

**关键词** 异黑颗粒; 阿尔茨海默病; 学习记忆; 氧化应激

**中图分类号** R29

**文献标志码** A

**doi** 10.3981/j.issn.1000-7857.2013.14.003

## Impact of Savda Granule on the Ability of Memory and Antioxidation for APP/PS1 Double Transgenic Mice

UPUR Halmurat<sup>1</sup>, DANG Ming<sup>1</sup>, AIZEZI Renaguli<sup>1</sup>, WUSHOUER Palidan<sup>2</sup>, KURBAN Abdukadir<sup>1</sup>, AMAT Nurmuhmat<sup>1</sup>

1. Traditional Uighur Medicine Institute, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. Department of Psychosomatic, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

**Abstract** In order to study the effect of savda granule on memory and antioxidation ability for APP/PS1 double transgenic mice, a number of three-month-old APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into five groups. Meanwhile, the mice with negative control were served as a control group. There were eight mice in each group and all of them were intragastrically administered for six months. Then the learning and memory ability of mice were detected by Morris water maze test. The activities of glutathione peroxidase-(GSH-Px) and superoxide in the brain tissue were measured with spectrophotometer. Comparing with the control group, APP/PS1 double transgenic mice significantly prolong the latency for searching the hidden platform in the directional swimming test, and decrease the time spent on swimming in the target quadrant with the probe test. Comparing with APP/PS1 double transgenic mice, savda granule is able to dose-dependently shorten the latency for searching the hidden platform in the directional swimming test, and increase the time spent on

收稿日期: 2013-01-10; 修回日期: 2013-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(81260565); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-11-1073); 乌鲁木齐市科技局重点实验室建设项目

作者简介: 哈木拉提·吾甫尔, 教授, 研究方向为新疆重大疾病的维吾尔医干预, 电子信箱: halmurat@263.net; 党明(并列第一作者), 硕士研究生, 研究方向为维医药防治认知功能障碍和老年性痴呆, 电子信箱: 35498356@qq.com; 努尔买买提·艾买提(通信作者), 教授, 研究方向为维医药防治认知功能障碍和老年性痴呆, 电子信箱: nur818@hotmail.com

swimming in the target quadrant with the probe test. The activities of GSH-Px and SOD decrease in APP/PS1 double transgenic mice, while in the groups with savda granule treatment, the activities of GSH-Px and SOD raise, and there is significant difference comparing with Alzheimer's Disease (AD) model group. Nine-month-old APP/PS1 double transgenic mice present imitated learning and memory dysfunction with the reduction of antioxidation ability; savda granule is able to ameliorate the impaired memory function for the mice with AD and improve their antioxidation ability.

**Keywords** savda granule; Alzheimer's Disease; learning and memory; antioxidation

## 0 引言

阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 是一种以进行性认知功能障碍为特征的神经系统退行性疾病<sup>[1]</sup>。目前全世界约有 2600 万的 AD 患者,随着世界人口进入老龄化,预测到 2050 年将增加到 9000 万人<sup>[2]</sup>。由于缺乏早期预防、诊断和治疗的有效措施,AD 对人类健康的威胁日趋严重,已被列为死亡病因的第 4 位<sup>[3]</sup>。新疆是全球四大长寿区之一,在调查中发现,维吾尔族百岁老人的数量和相对比例均在全国名列前茅,这些百岁老人以迟发或不发衰老相关性疾病为特征,这些疾病也包括 AD。

维医古籍中 AD 属于“善忘”、“遗忘”等范畴。在维医古代医学文献中对“善忘”、“遗忘”等疾病的病因病机、症状体征及防治等均有大量的描述和记载。维医认为,年迈者易被“异常黑胆质”困扰,异常黑胆质与 AD 的发生、发展关系最为密切,是 AD 等老年病的病理基础和重要特征,能准确全面地反映 AD 的本质。维医病理学认为异常黑胆质通过以下几种病理机制导致“善忘”、“遗忘”等疾病:(1) 异常黑胆质形成之后其干寒属性增强,使机体气质异常、支配器官功能和机体自然力减弱;(2) 异常黑胆质体液分量较重,质地较稠,易在脑组织产生沉着,影响脑组织的营养力、摄主力、生长力等生理功能;(3) 异常黑胆质体液使正常黑胆质体液失去固有的思维、感觉和记忆等功能,异常黑胆质从不同途径和/或不同程度上影响脑组织和细胞的正常生理功能。据此,维吾尔医学认为异常黑胆质是 AD 的发病基础,并提出将“异黑颗粒”作为维吾尔医学防治 AD 的基本方法。

超氧自由基导致氧化损害是 AD 病理变化的重要机制<sup>[4]</sup>。因此,有学者提出了 AD 病因的自由基学说<sup>[5]</sup>。超氧化物歧化酶(SOD)是超氧自由基的清除剂,能有效地拮抗自由基的损害。抗氧化是研究 AD 防治方法的重要途径<sup>[6]</sup>。研究显示,异黑颗粒对  $H_2O_2$ 、 $O_2^{\cdot-}$ 、 $OH^{\cdot}$  等自由基具有良好的清除作用<sup>[7]</sup>。本文通过探讨异黑颗粒对 AD 小鼠学习记忆能力和抗氧化能力的作用,初步阐明异黑颗粒对阿尔茨海默病 APP/SP1 转基因模型小鼠学习记忆能力和抗氧化能力的影响。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

MT-200 Morris 水迷宫视频跟踪分析系统,成都泰盟科技有限公司;Elx-800 型酶标仪,英国 Bio-Tek 公司;BioMate 紫外可见光光度计,美国 Thermo 公司;机械匀浆

器,德国 IKA 公司。

### 1.2 动物

3 月龄的 APP/PS1 双转基因模型小鼠 40 只,雄性;3 月龄同窝阴性对照 C57BL/6J 小鼠 8 只,雌性。均由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证号为 SCXK (京)2009-0004。

### 1.3 药品和试剂

异黑颗粒由新疆维吾尔自治区维吾尔医医院提供,根据文献[8]的方法制备。盐酸多奈哌齐来自卫材(中国)药业有限公司(批号为 110807A),使用时粉碎,用双蒸水溶解。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品,批号依次为 20120916,20120913。

## 2 实验方法

### 2.1 分组与给药

将 APP/PS1 转基因小鼠随机分为模型组、异黑颗粒高剂量组(简称异黑高)(10.12g/(kg·d)、生药量 34.32g/kg)、中剂量组(简称异黑中)(5.06g/(kg·d)、生药量 17.16g/kg)、低剂量组(简称异黑低)(2.53g/(kg·d)、生药量 8.58g/kg)和多奈哌齐组(0.92mg/(kg·d)),每组 8 只;同月龄同背景 C57BL/6J 小鼠 8 只作为正常对照组。对照组和模型组给以蒸馏水灌胃,每日 1 次。各组小鼠灌胃至 9 月龄时进行行为学实验。

### 2.2 Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫实验采用中国医学科学院生产的水迷宫装置。该装置主要包括迷宫、摄像机记录系统、计算机系统和一不锈钢圆形水池(直径 100cm,高 50cm)。水池中注入 24cm 深的清水,水温(25±1)℃,加入奶粉使水变得不透明。水下 1cm 设置一个有机玻璃平台,其位置在整个实验期间固定。池壁标明 4 个人水点,由此将水池等分为 4 个象限。水迷宫实验环境要求安静,避免一切外界干扰,实验期间迷宫外有足够参照物(门、窗、灯、实验者等),且始终保持不变以供小鼠定位。动物预先训练 2d,每天 3 次,每次间隔 2h,训练时将动物随机在不同象限头朝池壁放入水池,次序每天不同,引导其按直线方向游向平台并在平台上站立 20s,之后开始正式实验。

测试程序如下。(1) 定位航行实验。实验连续进行 5d,于每天晚上进行。每天小鼠被连续测试 4 次,每次均从不同的象限将小鼠放入水中,放入时小鼠面向池壁。从小鼠入水开始,记录动物寻找并爬上平台所需时间即逃避潜伏期和游泳

距离,小鼠找到并爬上平台后,让其在平台上休息 20s,然后进行下一次测试。若小鼠在 60s 内未能找到平台,则其逃避潜伏期被记为 60s,并引导其游向平台,让其在平台上休息 20s,即每次测试间隔为 20s。(2) 空间探索实验。于定位航行实验结束后次日上午撤除平台,小鼠在原平台象限的对侧象限入水,记录 60s 的游泳轨迹,测量 60s 内小鼠经过有效区次数以及原平台象限停留时间并比较分析。数据搜集和处理由 Morris 软件完成。

### 2.3 脑组织中 GSH-Px, SOD 活性的测定

各组小鼠脱颈处死,眼球取血,离心(3000r/min, 10min),分离血清 4℃保存备用;断头摘全脑以冰冷生理盐水清理血迹,用滤纸吸干,称质量,加入 9 倍冰冷无菌的生理盐水手动制成 10%脑匀浆,离心(2500r/min, 10min),上清液置 4℃保存备用。GSH-Px, SOD 活性测定采用紫外分光光度计进行,严格按照试剂盒说明书操作。

### 2.4 数据处理

数据以均数  $\bar{X} \pm SD$  表示,采用 SPSS 17.0 统计,以多组间方差分析及组间 LSD-*t* 检验作统计学处理。Morris 水迷宫实验数据采用重复测量数据的方差分析,  $P < 0.05$  为具有显著性差异。

## 3 结果与分析

### 3.1 各组 APP 转基因小鼠空间学习记忆能力的变化

#### 3.1.1 定位航行实验

在历时 5d 的实验中,正常组小鼠的逃避潜伏期和游泳距离无明显改变,高、中、低剂量组小鼠的逃避潜伏期和游泳距离都呈下降趋势。从第 3 天开始,模型组小鼠的逃避潜伏期和游泳距离与正常组和各给药组相比明显延长 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),其中第 5 天模型组小鼠的逃避潜伏期和游泳距离与正常组和各给药组的相比有显著差异 ( $P < 0.01$ )。结果见表 1 和表 2。

表 1 各组小鼠逃避潜伏期的比较(单位:s)

Table 1 Comparison between escape latencies for the mice in different groups (unit: s)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常组	37.12±22.13**	30.85±22.44**	29.14±18.25**	33.02±20.66*	32.51±22.35**
模型组	58.90±4.00	56.97±22.03	56.62±13.09	48.01±18.58	50.50±16.28
多奈哌齐	52.10±16.58	44.81±20.93*	34.16±16.77**	32.95±22.46*	31.12±18.41**
异黑高	53.15±15.34	50.28±20.34	42.62±21.91*	42.60±22.43	32.97±19.82**
异黑中	52.98±14.69	50.52±17.08	43.44±21.34*	34.61±22.26	32.40±20.81**
异黑低	56.10±13.11	49.90±18.54	35.28±23.20**	39.75±22.06	26.52±20.89**

注:与模型组比较,\*为  $P < 0.05$ ,\*\*为  $P < 0.01$ 。下同。

Notes: Compared with model group, \*represents  $P < 0.05$ , \*\*represents  $P < 0.01$ . The same as below.

表 2 各组小鼠游泳距离的比较(单位:cm)

Table 2 Comparison between swimming distances for the mice in different groups (unit: cm)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常组	670.59±525.91**	548.09±503.50**	571.31±376.12**	479.22±298.61*	558.15±403.32**
模型组	1257.38±309.42	1067.70±529.09	1207.11±368.53	789.65±371.94	1038.28±385.12
多奈哌齐	1092.76±389.63	976.13±524.69	744.28±420.99**	492.31±408.44*	445.89±247.49**
异黑高	845.16±427.72**	1028.59±514.38	954.80±542.56	810.08±480.27	616.95±411.19**
异黑中	897.94±341.30**	983.12±419.16	965.23±530.17	654.74±472.83	630.55±453.16**
异黑低	1014.71±361.19	1045.33±468.47	724.93±536.91**	723.73±485.80	504.16±452.75**

#### 3.1.2 空间探索实验

测试后第 6 天去掉平台,进行各组小鼠的空间探索实验。

与模型组相比,异黑颗粒低剂量组小鼠经过有效区次数增加 ( $P < 0.05$ )。各给药组小鼠在第 4 象限(原平台所在象限)停留时间呈增加趋势,其中多奈哌齐组停留时间增加最长,异黑低组相对停留时间增加最短。结果见表 3。

### 3.2 异黑颗粒对转基因模型小鼠脑组织 GSH-Px, SOD 活性的影响

异黑颗粒对 APP/PS1 双转基因模型小鼠脑组织中 GSH-Px, SOD 活性的影响结果表明,异黑颗粒各剂量组小鼠脑组织 GSH-Px 和 SOD 活性均高于模型组,其中异黑颗粒高、低剂量组的 SOD 活力和异黑颗粒高、中剂量组的 GSH-Px 活性与模型组相比均有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。结果见表 4。

表 3 各组小鼠空间探索实验结果

Table 3 Experimental results of space exploration for the mice in each group

组别	经过有效区次数	原平台所在象限停留时间/s
正常组	2.00±1.22	15.60±4.91
模型组	0.50±0.58	10.34±5.16
多奈哌齐	1.00±1.55	18.37±4.81
异黑高	1.33±1.37	16.93±7.11
异黑中	2.00±1.00	16.74±6.19
异黑低	2.17±1.33*	13.87±1.46

注:与模型组比较,\*为  $P<0.05$ 。

Notes: Compared with model group, \* represents  $P<0.05$ .

表 4 异黑颗粒对转基因模型小鼠脑组织 GSH-Px, SOD 活性的影响 ( $n=8$ )Table 4 Effects of savda granule on the activities of GSH-Px and SOD in the brain of transgenic mice ( $n=8$ )

组别	SOD 活性/( $U \cdot mg^{-1}$ )	GSH-Px 活性/( $U \cdot mg^{-1}$ )
正常组	55.06±3.66	12.11±0.79
模型组	46.95±2.8*	9.77±0.85*
多奈哌齐	49.19±7.31	13.33±4.62
异黑高	57.59±5.04 <sup>△</sup>	13.79±2.44 <sup>△</sup>
异黑中	52.79±8.21	11.55±0.45 <sup>△</sup>
异黑低	51.60±1.12 <sup>△</sup>	9.92±0.56

注:与正常对照组比较,\*为  $P<0.01$ ;与模型组比较, $\Delta$ 为  $P<0.01$ 。

Notes: Compared with normal control group, \* represents  $P<0.01$ ;

Compared with model group,  $\Delta$  represents  $P<0.01$ .

#### 4 讨论

维医根据疾病发生发展的不同阶段,将疾病分为气质失调期、形状改变期、结构损伤期等。气质失调期是疾病发生的初期,若能及时进行治疗,则可防止其发展、恶化。气质失调可分为非体液性气质失调和体液性气质失调。体液性气质失调可进一步分为胆液质性异常气质失调、异常血液质性气质失调、异常黏液质性气质失调和异常黑胆质性气质失调。针对体液性气质失调维医常使用相应的异常胆液质成熟剂、异常血液质调节剂、异常黏液质成熟剂、异黑颗粒进行治疗。维医病理学认为,AD 早期的轻度认知功能障碍期属于异常黑胆质性气质失调期,临床只要以异常黑胆质方药——异黑颗粒防治 AD,就能取得较好疗效。而 AD 发展到形状改变期后,病症往往比较顽固,出现智能减退、健忘、语言颠倒、失语、神情呆滞等严重症状,而这阶段治疗效果也较差。因此,AD 的异常黑胆质证阶段是防治该病的关键,采用异黑颗粒进行治疗,可以有效抑制或阻止疾病进一步恶化;若不及时进行治疗,发展到形状改变期,则疾病顽固难治。异黑颗粒是防治痴呆症等复杂性疾病的首选药物,临床应用多年,疗效显著。维医认为定期、适量服用异黑颗粒可预防 AD 的发生发展。

本研究中正常组小鼠的逃避潜伏期和游泳距离无明显

改变,高、中、低剂量组小鼠的逃避潜伏期和游泳距离都呈下降趋势。从第 3 天开始,模型组小鼠的逃避潜伏期和游泳距离与正常组和各给药组的相比明显延长( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),其中第 5 天模型组小鼠的逃避潜伏期和游泳距离与正常组和各给药组的相比有显著差异( $P<0.01$ )。测试后第 6 天去掉平台,观察各组小鼠的空间探索实验结果,与模型组相比,异黑颗粒低剂量组小鼠经过有效区次数增加( $P<0.05$ ),各给药组小鼠在第 4 象限(原平台所在象限)停留时间有增加趋势。这表明,异黑颗粒能够明显改善 AD 小鼠的空间学习记忆能力。GSH-Px、SOD 活性是 AD 的一个特征性变化。文中 APP/PS1 双转基因模型小鼠脑组织 GSH-Px、SOD 活力下降;异黑颗粒治疗组学习和记忆能力升高,脑组织 GSH-Px、SOD 活力升高,与阿尔茨海默病模型组比较有显著性差异( $P<0.05$ )。这表明异黑颗粒能够增强 SOD 和 GSH-Px 的活性,提高机体的抗氧化能力。

#### 5 结论

通过探讨异黑颗粒对 AD 小鼠学习记忆能力和抗氧化能力的作用,研究异黑颗粒对阿尔茨海默病 APP/SP1 转基因模型小鼠学习记忆能力和抗氧化能力的影响。结果表明,异黑颗粒对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆障碍具有明显改善作用,并且可剂量依赖性的提高阿尔茨海默病模型小鼠的抗氧化能力。异黑颗粒可否用来早期干预或预防 AD,还需进一步研究。

#### 参考文献 (References)

- [1] Palmer A M. Pharmacotherapy for Alzheimer's disease: progress and prospects[J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2002, 23(4): 26-33.
- [2] Hebert L E, Beckett L A, Scherr P A. Annual incidence of Alzheimer disease in the united states projected to the years 2000 through 2050[J]. Alzheimer Disease and Associated Disorders, 2001, 15(1): 69-73.
- [3] Yaari R, Corey-Bloom J. Alzheimer's disease [J]. Seminars in Neurology, 2007, 27(1): 32-41.
- [4] Giasson B I, Ischiropoulos H, Lee V M, et al. The relationship between oxidative nitrate stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2002, 32(12): 1264-1275.
- [5] Markesbery W R. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1997, 23(1): 134-137.
- [6] Behl C. Alzheimer's disease and oxidative stress: Implications for novel therapeutic approaches[J]. Progress in Neurobiology, 1999, 57(3): 301-323.
- [7] 哈木拉提·吾甫尔, 阿不都热依木·玉素甫. 维吾尔医成熟剂和清除剂抗活性氧的作用研究[J]. 中国民族医药杂志, 2000, 6(3): 30-32. Halmurat Upur, Abudurim Yusufu. China National Journal of Medicine, 2000, 6(3): 30-32.
- [8] 哈木拉提·吾甫尔. 能够使异常黑胆质型体液成熟和清除的药物及其制备方法: 中国, 02130082.8[P]. 2003-04-16. Halmura Upur. The drug and its preparation method of enables the abnormal savda body fluids mature and clear: China, 02130082.8[P]. 2003-04-16.

(责任编辑 吴晓丽, 安莹)