

# 黄芩提取物对阿尔茨海默病模型小鼠的抗氧化作用

刘晓明\*, 崔晓燕, 甄晓兰(河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)19-2651-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.19.18

**摘要** 目的:研究黄芩提取物(SBE)对阿尔茨海默病(AD)模型小鼠的抗氧化作用。方法:ip给予D-半乳糖(150 mg/kg)和亚硝酸钠(100 mg/kg),每天1次,连续60 d以复制小鼠AD模型。60只小鼠随机均分为正常对照(等容氯化钠注射液)组、模型(等容氯化钠注射液)组、雌二醇(0.4 mg/kg)组与SBE高、中、低剂量(500、250、125 mg/kg)组,除正常对照组外,其余各组复制模型同时ig给药,每天1次,连续60 d。测定小鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量,以及血清中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。结果:与正常对照组比较,模型组小鼠脑组织SOD、CAT活性减弱,MDA含量增加,血清中GSH-Px活性减弱,差异有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ );与模型组比较,SBE高、中剂量组小鼠脑组织SOD、CAT活性增强,MDA含量减少,血清中GSH-Px活性增强,差异有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。结论:SBE可增强AD模型小鼠抗氧化能力,其机制可能与改善脑组织与血清中相关抗氧化指标水平有关。

**关键词** 黄芩;超氧化物歧化酶;谷胱甘肽过氧化物酶;过氧化氢酶;丙二醛;小鼠

## Antioxidant Effects of Extracts from *Scutellaria baicalensis* on Model Mice with Alzheimer's Disease

LIU Xiao-ming, CUI Xiao-yan, ZHEN Xiao-lan(Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the antioxidant effects of *Scutellaria baicalensis* (SBE) on the model mice with Alzheimer's disease. METHODS: All mice were treated by D-gal (150 mg/kg) and NaNO<sub>2</sub> (100 mg/kg) for 60 d to reproduce the AD model mice, ip, once a day. Totally 60 mice were randomly divided into normal control group (isovolumetric sodium chloride injection), model group (isovolumetric sodium chloride injection), estradiol (0.4 mg/kg) group, and SBE high, medium and low doses (500, 250 and 125 mg/kg). The mice were intragastrically administrated while modeling except normal control group, once a day, for continuous 60 d. The superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) activities and malondialdehyde (MDA) content in brain tissue, and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in serum of mice were determined. RESULTS: Compared with normal control group, the SOD, CAT activities in brain tissue, and GSH-Px activity in serum of mice in model group were decreased, MDA content in brain tissue were increased, with significant difference ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ); compared with model group, the SOD, CAT activities in brain tissue and GSH-Px activity in serum of mice in SBE high and medium dose groups were increased, MDA content was decrease, with significant difference ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). CONCLUSIONS: SBE can enhance the antioxidant capacity in AD model mice by a mechanism that may be related to the improvement of related oxidation indicators' levels.

**KEYWORDS** *Scutellaria baicalensis*; SOD; GSH-Px; CAT; MDA; Mouse

- 科学版,2011,32(4):449.
- [4] 姚金成,刘颖,胡领,等.雷公藤甲素对Caspase诱导人肝细胞L-02凋亡机制的研究[J].中国药房,2012,23(43):4 036.
- [5] Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs[J]. *Cancer Metastasis Rev*,1992,11(2):121.
- [6] Yan F, Liu Y, Wang WB. Matrine inhibited the growth of rat osteosarcoma UMR-108 cells by inducing apoptosis in a mitochondrial-caspase-dependent pathway[J]. *Tumor Biol*,2013,34(4):2 135.
- [7] Jing XB, Li T, Yang QH, et al. Inhibitory mechanism on proliferation of hepatocellular carcinoma cell line by tetrandrine[J]. *World Chin J Digestol*,2003,11(8):1 223.
- [8] 许湘.汉防己甲素诱导人肝癌细胞株HepG2凋亡及对Bax、Caspase-3的影响[D].武汉:湖北中医学院,2006.
- [9] Wang G, Lemos JR, Iadecola C. Herbal alkaloid tetrandrine: from an ion channel blocker to inhibitor of tumor proliferation[J]. *Trends Pharmacol Sci*,2004,25(3):1 207.
- [10] Wu JM, Chen Y, Chen JC, et al. Tetrandrine induces apoptosis and growth suppression of colon cancer cells in mice [J]. *Cancer Lett*,2010,287(2):187.

\* 主管药师。研究方向:药物对中枢神经细胞的药理作用。  
E-mail:lxmbby2008@163.com

(收稿日期:2014-11-23 修回日期:2014-12-26)  
(编辑:张静)

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是发生于老年和老年前期、以进行性认知功能障碍和行为损害为特征的中枢神经系统退行性病变,是老年期痴呆的最常见类型。正常细胞在代谢过程中,自由基的产生和清除处于动态平衡;当内源性抗氧化机制改变或当细胞出现病理情况时,产生的过多的自由基得不到及时的清除,促氧化-抗氧化系统平衡将向促氧化方向变化,从而发生氧化应激反应<sup>[1]</sup>。过多的氧自由基能攻击并损害神经细胞膜,干扰细胞内膜系统正常功能,造成神经元的凋亡和变性,参与一些增龄性的退行性疾病如学习记忆能力减退和认知功能障碍,进而造成学习记忆能力降低。AD的病理特征主要有老年斑、神经纤维缠结、神经元死亡。自由基及其引发的脂质过氧化作用参与了这3种特征性病理损害<sup>[2]</sup>。因此,药物如果能够拮抗体内或脑内的自由基损害,以及抑制脂质过氧化作用,则应具备一定的预防和对抗AD的作用。寻找有效的脑氧化损伤保护剂对于防治这些疾病具有重要意义。近年来,黄酮类抗氧化活性受到人们的重视,有关黄酮类化合物对脑的保护作用的研究常见诸报道<sup>[3]</sup>。黄芩系唇形科植物 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,其提取物中含有大量黄酮类化合物,具有清热燥湿、泻火解毒、抑菌、抗炎、止血、安胎、镇静等功效。临床上,该药材已被广泛用于治疗慢性炎症及一些溃疡性疾病,对其进行的药理学研究也多集中于其所具有的清热解毒等作用,而对其益智作用的药理学研究却少见报道。本研究主要考察了黄芩提取物(SBE)对D-半乳糖(D-gal)和亚硝酸钠合并诱导的AD模型小鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量,以及血清中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性的影响,进一步证明了黄芩对AD模型小鼠氧化应激反应具有一定的保护作用。

## 1 材料

### 1.1 仪器

TU-1800型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);5412R型低温离心机、微量移液枪(德国Eppendorf公司);SK-1型快速混匀器(金坛富华仪器有限公司);TH-15型恒温水浴箱(德国Edmund Buhler公司);AG135型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

### 1.2 药品与试剂

SBE(河北省药品检验研究院中药室提取,黄芩提取率:88.9%);雌二醇(美国Sigma公司,批号:E8875);D-gal[生兴生物技术(南京)有限公司,批号:G0002-25,纯度:>98%];亚硝酸钠(郑州正昇化工产品有限公司,批号:014029,纯度:>98%);SOD、GSH-Px、CAT、MDA试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

### 1.3 动物

清洁级KM小鼠,♂兼用,体质量18~22 g。由河北省实验动物中心提供[实验动物生产合格证号:006161],自由摄食、饮水,适应3~4 d后用于实验。

## 2 方法

### 2.1 复制模型与分组、给药<sup>[4]</sup>

ip给予D-gal(150 mg/kg)和亚硝酸钠(100 mg/kg),每天1次,连续60 d以复制小鼠AD模型。60只KM小鼠随机均分为

6组,即正常对照(等容氯化钠注射液)组、模型(等容氯化钠注射液)组、雌二醇(阳性药物,0.4 mg/kg)组与SBE高、中、低剂量(500、250、125 mg/kg)组,除正常对照组外其余各组复制模型同时ig给药,每天1次,连续60 d。本研究选取的给药剂量是按照临床成人用量推算的小鼠实验给药用量,折合成雌二醇量为0.4 mg/kg;生药高剂量(约为成人用量的2倍)为0.52 g(生药)/kg,即SBE量为500 mg/kg;中剂量(约与成人用量相等)为0.26 g(生药)/kg,即SBE量为250 mg/kg;低剂量(约为成人用量的0.5倍)为0.13 g(生药)/kg,即SBE量为125 mg/kg。

### 2.2 各组小鼠脑组织SOD活性测定

末次给药4 h后,将小鼠断头处死,迅速取脑,并除去嗅球、小脑及脑干;将剩余部分先放入-20℃冻存2 h,再放入-80℃贮藏备用。进行生化测定时取出,加入9倍冰氯化钠注射液,常规匀浆、离心,制成100 g/L的脑组织匀浆,然后按试剂盒要求测定SOD活性。以每1 ml反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量为1个SOD活性单位(U)。

### 2.3 各组小鼠脑组织CAT活性测定

按“2.2”项下方法制备小鼠脑组织匀浆。采用双抗体夹心ABC-酶联免疫吸附(ELISA)法测定CAT活性。用抗人CAT单抗包被于酶标板上,加入生物素化的抗人CAT,形成免疫复合物连接在板上,加入底物工作液显蓝色,最后加终止液硫酸,在450 nm波长处测光密度(OD)。CAT活性与OD成正比,通过绘制标准曲线求出标本中CAT活性。

### 2.4 各组小鼠脑组织MDA含量测定

按“2.2”项下方法制备小鼠脑组织匀浆。将已知MDA浓度的标准品、未知浓度的样品加入微孔酶标板内进行检测。先将MDA和生物素标记的抗体同时温育,洗涤后,加入亲和素标记过的辣根过氧化物酶(HRP),再经过温育和洗涤,去除未结合的酶结合物,然后加入底物A、B,和酶结合物同时作用,产生颜色,在450 nm波长处测定各孔OD。

### 2.5 各组小鼠血清GSH-Px活性测定

末次给药4 h后,将小鼠断头处死的同时取血,常规制备血清,按照试剂盒说明进行GSH-Px活性测定。规定每0.1 ml血清在37℃条件下与试剂盒试剂反应5 min,扣除非酶促反应作用,使反应体系中GSH-Px浓度降低1 μmol/L为1个酶活力单位。

### 2.6 统计学方法

采用SPSS 19.0软件处理实验数据。各组数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组小鼠脑组织SOD、CAT活性与MDA含量测定结果

与正常对照组比较,模型组小鼠脑组织SOD、CAT活性减弱,MDA含量增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。与模型组比较,雌二醇组与SBE高、中剂量组小鼠脑组织SOD、CAT活性增强,MDA含量减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。各组小鼠脑组织SOD、CAT活性与MDA含量测定结果见表1。

### 3.2 各组小鼠血清GSH-Px活性测定结果

与正常对照组比较,模型组小鼠血清GSH-Px活性减弱,

表1 各组小鼠脑组织SOD、CAT活性与MDA含量测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 1 Determination results of SOD, CAT activities and MDA content in brain tissues of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量,mg/kg	SOD,U/mg	CAT,U/mg	MDA ,nmol/mg
正常对照组		1.63 ± 0.47	10.54 ± 2.35	47.79 ± 16.92
模型组		0.81 ± 0.34**	5.79 ± 1.42*	93.66 ± 25.32*
SBE低剂量组	125	0.83 ± 0.28	5.12 ± 1.56	89.13 ± 18.63
SBE中剂量组	250	1.16 ± 0.43 <sup>#</sup>	5.98 ± 2.15 <sup>#</sup>	76.72 ± 20.15 <sup>#</sup>
SBE高剂量组	500	1.43 ± 0.59 <sup>##</sup>	8.01 ± 2.23 <sup>##</sup>	64.47 ± 19.63 <sup>##</sup>
雌二醇组	0.4	1.41 ± 0.64 <sup>##</sup>	8.92 ± 2.94 <sup>##</sup>	62.78 ± 23.63 <sup>##</sup>

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$ , $^{##}P < 0.01$

Note: vs. normal control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ; vs. model group, $^{\#}P < 0.05$ , $^{##}P < 0.01$

差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与模型组比较,雌二醇组与SBE高、中剂量组小鼠血清GSH-Px活性增强,差异有统计学意义( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。各组小鼠血清GSH-Px活性测定结果见表2。

表2 各组小鼠血清GSH-Px活性测定结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 2 Determination results of GSH-PX activities in serum of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量,mg/kg	GSH-Px,U/ml
正常对照组		0.347 ± 0.093
模型组		0.168 ± 0.036*
SBE低剂量组	125	0.179 ± 0.042
SBE中剂量组	250	0.223 ± 0.058 <sup>#</sup>
SBE高剂量组	500	0.276 ± 0.083 <sup>##</sup>
雌二醇组	0.4	0.238 ± 0.074 <sup>#</sup>

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$ , $^{##}P < 0.01$

Note: vs. normal control group,\* $P < 0.01$ ; vs. model group, $^{\#}P < 0.05$ , $^{##}P < 0.01$

#### 4 讨论

越来越多的研究表明,氧化损伤与AD有非常密切的关系,自由基堆积是神经性退行性疾病发生和发展的重要危险因素。ip给予D-gal和亚硝酸钠可使青年小鼠在较短时间内出现自然衰老的特征,并可造成全身多个脏器的缺血缺氧及氧化应激现象<sup>[5]</sup>。D-gal受半乳糖合成酶的作用,产生了 $O_2^{\cdot-}$ 和 $H_2O_2$ 等活性氧,导致SOD活性下降、MDA含量增加,其中活性氧是D-gal拟老化作用的启动因子。脂质过氧化物(Lipid peroxidation, LOOH)的分解终产物MDA可与DNA、RNA及蛋白质和磷脂的有关物质结合,使膜成分发生改变,增加膜的通透性,促进兴奋性氨基酸的释放,引起胞内外离子浓度的改变,造成细胞的大量损伤;另一方面,MDA也可引起神经纤维交联、缠结,导致学习记忆能力减退,使衰老的进程加速<sup>[6-7]</sup>。这些在一定程度上模拟了AD的发病特点。因此,本研究采用D-gal联合亚硝酸钠来复制AD小鼠模型,用于SBE抗AD作用的研究。

在正常的情况下,机体的抗氧化酶系SOD、GSH-Px以及

CAT可以中和过多的氧自由基,维持机体处于健康状态。SOD的作用主要在于清除生物氧化代谢产生的,或由外界进入体内的一些药物或毒物代谢产生的及由辐射产生的 $O_2^{\cdot-}$ ,从而阻断由 $O_2^{\cdot-}$ 引发自由基引起的一级反应,减少活性氧的生成<sup>[8]</sup>。GSH-Px的作用在于阻断由LOOH引发自由基的二级反应,从而减少LOOH对生物体的损害,保护细胞膜系统免遭过氧化的损伤<sup>[9]</sup>。CAT的作用在于抑制神经元及体内 $H_2O_2$ 水平的增高和LOOH在体内细胞中的聚积,从而抑制氧化应激作用对神经元和体内细胞的损伤。

本研究结果表明,小鼠长期ip给予D-gal和亚硝酸钠,其脑组织中SOD、CAT与血清中GSH-Px活性减弱,而脑组织中MDA含量增加。这与自然衰老过程中出现的退行性改变极为相似,从而造成了AD模型。SOD、GSH-Px、CAT是体内清除自由基的关键酶,其活性的高低间接反映机体清除自由基的能力;MDA生成量的多少,可间接反映组织细胞氧化损伤的程度。SBE可剂量依赖性地增强AD模型小鼠脑组织中SOD、CAT与血清中GSH-Px的活性;同时,SBE也可剂量依赖性地减少AD模型小鼠脑组织中MDA的含量。上述结果表明,SBE可增强AD模型小鼠脑组织内的抗氧化能力,其机制可能与改善脑组织与血清中相关抗氧化指标水平有关,这将为黄芩开发奠定了理论和实验基础。

#### 参考文献

- [1] 凡复,陈建国,任宏伟.帕金森病和阿尔茨海默氏病的基因治疗研究进展[J].中国生物工程杂志,2013,33(4):129.
- [2] 张倩,李建涛,宋春霞.阿尔茨海默病治疗药物研究进展[J].中国老年学杂志,2015,35(8):2282.
- [3] 高中洪,黄开勋,卞曙光,等.黄芩黄酮对自由基引起的大鼠脑线粒体损伤的保护作用[J].中国药理学通报,2000,16(1):81.
- [4] 杨晓娟,张生林,陈芸,等.新型复合式老年痴呆动物模型的建立[J].中西医结合心脑血管病杂志,2006,4(4):318.
- [5] 楚晋,李林.D-半乳糖致脑老化动物模型及其机制[J].中国康复理论与实践,2003,9(9):521.
- [6] 金桂芳,梅寒芳,杨红.阿尔茨海默病的发病机制及药物治疗进展[J].广东药学院学报,2006,22(6):697.
- [7] 杨江涛,杨娟,杨江冰,等.刺梨多糖对衰老小鼠体内抗氧化能力的影响[J].营养学报,2008,30(4):407.
- [8] Ahlemeyer B, Krieglstein J. Pharmacological studies supporting the therapeutic use of Ginkgo biloba extract for Alzheimer's disease[J]. Pharmacopsychiatry, 2003, 36 (Suppl 1):S8.
- [9] Francesc XS, Javier GC, Marty R, et al. Changes in oxidative stress parameters and neurodegeneration markers in the brain of the senescence-accelerated mice SAMP-8[J]. Exp Gerontol, 2006, 41(4):360.

(收稿日期:2015-03-19 修回日期:2015-05-11)

(编辑:张静)