

· 论 著 ·

# 人参皂甙对阿尔茨海默病治疗机制的实验研究

王龙安 马瑜红 李玮

**【摘要】 目的** 研究人参皂甙对阿尔茨海默病(AD)相关  $\beta$  淀粉样蛋白(A $\beta$ )诱导 THP-1 细胞表达诱导性一氧化氮合酶(iNOS)和一氧化氮的影响。**方法** 用免疫印迹法测定 THP-1 细胞 iNOS 表达,用 Griess 法测定细胞上清中一氧化氮的浓度。**结果** 模型组 iNOS 的表达明显高于对照组,与模型组比较,人参皂甙可明显减少 THP-1 细胞 iNOS 的表达和一氧化氮的产生。**结论** 人参皂甙可以抑制 THP-1 细胞 iNOS 的表达,进一步影响一氧化氮的产生而用于 AD 的治疗。

**【关键词】** 阿尔茨海默病; 人参皂甙; 一氧化氮合酶; 一氧化氮

**【中图分类号】** R 749.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-6315(2008)07-0680-03

**Experimental study on therapeutic effects of Ginsenoside on Alzheimer's disease.** WANG Long-an, MA Yu-hong, LI Wei. Department of Emergency, Henan Provincial People's Hospital (Zhengzhou 450003, China)

**【Abstract】 Objective** To study the effects of ginsenoside on expression of inducible nitric oxide synthase and concentration of NO in THP-1 induced by amyloid beta (A $\beta$ ) in Alzheimer's disease. **Methods** The concentration of nitric oxide was determined by Griess Reagent in supernatant of THP-1. The content of iNOS was measured by western blotting. **Results** The expression of iNOS of model group was significantly higher than those of control group. Compared with model group, the ginseng could reduce expression of iNOS and concentration of NO significantly in THP-1. **Conclusion** Ginsenoside can significantly inhibit the expression of iNOS, and reduce secretions of NO, so it may provide a novel therapy for AD.

**【Key words】** Alzheimer's disease; Ginsenoside; Inducible nitric oxide synthase; Nitric oxide

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是最常见的进行性认知功能减退的疾病,其患病率和致残率高。AD 的发病机制与  $\beta$ -淀粉样肽前体蛋白(APP)的分解代谢异常形成的  $\beta$ -淀粉样肽(A $\beta$ )有关<sup>[1-2]</sup>。脑内的 A $\beta$  可激活小胶质细胞产生一氧化氮(NO)和氧自由基,加重脑内的一氧化氮和氧自由基水平。人参皂甙是从人参茎和叶中提取的有效成分,有神经免疫调节作用<sup>[3]</sup>。人参皂甙还具有清除超氧阴离子自由基的作用,可抑制自发的 Fe-半胱氨酸诱导的肺脂质过氧化和脂质体的氧化<sup>[4]</sup>。考虑用人参皂甙抑制 A $\beta$  诱导的小胶质细胞或巨噬细胞产生一氧化氮,可成为治疗 AD 的一种新药。我们使用 THP-1 细胞系(单核细胞系)作为小胶质细胞模型,通过研究人参皂甙对 A $\beta$  诱导 THP-1 细胞表达诱导性一氧化氮合酶(iNOS)和一氧化氮的调节,探讨其治疗机制。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂及仪器** 人参皂甙由本室自行提取,配成溶液 2mg/ml,使用时稀释。酶标仪(法国巴士德公司),iNOS 抗体和辣根过氧化物酶连接羊抗兔抗体(二抗)购自中山公司。RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司。一氧化氮检测试剂盒购自北京三泰公司。

**1.2 细胞的制备** 细胞用含 10% 的胎牛血清(FBS),100 U/ml 青、链霉素,1 mmol/L 丙酮酸钠,0.05 mmol/L  $\beta$  巯基乙醇和 2 mmol/L 谷氨酰胺的 1640(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)培养基,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内进行培养,每 3 天更换 1 次培养基,细胞维持在  $(2 \sim 9) \times 10^5$ /ml。

**1.3 A $\beta$  刺激 THP-1 细胞** 将培养 2~3 d 的 THP-1 细胞离心,弃上清;然后用无血清的 DMEM/F12 培养基孵育 2 h,离心,弃上清;将细胞浓度调整到  $5 \times 10^6$ /ml,加入人参皂甙,终浓度分别为 50  $\mu$ g/ml、100  $\mu$ g/ml、150  $\mu$ g/ml,孵育 30 min,800 r/min 离心 6 min;弃上清,将细胞用含有 125 nmol/L A $\beta$  的无血清的 DMEM/F12 培养基孵育 48 h 后,离心;将上清保存在 -80 °C 冰箱,用于测定一氧化氮的浓度。另有一组孵育 24 h 后离心,弃上清,将细胞用冰水 PBS 洗涤 2 次,用 RIPA 缓冲裂解液(1  $\times$  PBS, 1% Nonidet P-40, 0.5% 去氧胆酸钠, 0.1% SDS, 1 mmol/L 偏钒酸钠, 10  $\mu$ l/ml 鸡尾酒蛋白酶抑制剂)将细胞裂解保存在 -20 °C 冰箱。对照组用无血清的 DMEM/F12 培养基孵育 2 h 后,将细胞浓度调整到  $5 \times 10^6$ /ml 孵育 30 min,800 r/min 离心 6 min,弃上清,将细胞用无血清的 DMEM/F12 培养基孵育 48 h 后,收集上清和经行细胞裂解。模型组用无血清的 DMEM/F12 培养基孵育 2 h 后,将细胞浓度调整到  $5 \times 10^6$ /ml 孵育 30

min, 800 r/min 离心 6 min, 弃上清, 将细胞用含有 125 nmol/L  $A\beta$  的无血清的 DMEM/F12 培养基孵育 48 h 后, 收集上清和经行细胞裂解。人参皂甙处理方如前所述。

**1.4 蛋白免疫印迹法** 用福林酚法测定总蛋白的浓度, 加入 4 倍上样缓冲液, 在 100 °C 水浴锅中变性 5 min。在 10% SDS-PAGE 胶电泳, 将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 用抗 iNOS 抗体与硝酸纤维素膜过夜孵育, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 15 min, 加 HRP 连接的羊抗兔 (二抗) 在 37 °C 孵育 1 h, 用 TBST 洗涤 3 次; 在暗室将荧光剂 A 液、B 液等量混合, 立即加到膜上; 1 ml/膜, 滚匀液体, 反应 1 min, 然后吸去多余荧光剂, 将膜固定到曝光盒中, 盖紧盒盖, 曝光 0.5 ~ 5 min; 先在显影液中显影, 后在定影液中定影; 比照曝光板上的膜记录下 marker, 各条带的位置。

**1.5 亚硝酸盐的测定** 亚硝酸盐是一氧化氮的主要代谢产物。测定亚硝酸盐的量可以反映组织细胞一氧化氮的含量。将保存在 -80 °C 冰箱的细胞上清在室温融化, 加入 96 孔板中, 每孔 50  $\mu$ l; 同时用标准品按 0、1、2、5、10、20、40、60、100  $\mu$ mol/L 浓度稀释作标准曲线。每孔中分别加入 Griess 试剂 I 和 II 各 50  $\mu$ l, 在酶标仪上 540 nm 测定吸光度, 作标准曲线计算浓度。

**1.6 统计学方法** 用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 人参皂甙对 iNOS 表达的影响**  $A\beta$  与 THP-1 细胞共孵育 24 h, 引起 iNOS 表达增加。模型组 iNOS 条带比正常对照组明显增粗, 灰度变深。人参皂甙可以抑制  $A\beta$  诱导 iNOS 表达的增加, 随人参皂甙浓度的增大, 抑制作用明显, 条带逐渐变细, 灰度变浅。

**2.2 人参皂甙对一氧化氮表达的影响** 对照组、模型组的一氧化氮浓度分别为  $(1.61 \pm 0.13) \mu\text{mol/ml}$ 、 $(3.13 \pm 0.10) \mu\text{mol/ml}$  ( $P < 0.01$ ), 50  $\mu\text{g/ml}$ 、100  $\mu\text{g/ml}$ 、150  $\mu\text{g/ml}$  的人参皂甙对应的一氧化氮浓度分别为:  $(2.61 \pm 0.15) \mu\text{mol/ml}$ 、 $(2.47 \pm 0.18) \mu\text{mol/ml}$  ( $P < 0.05$ )、 $(2.10 \pm 0.14) \mu\text{mol/ml}$  ( $P < 0.01$ )。表明随着人参皂甙剂量的增大, 对一氧化氮抑制作用愈明显。

**2.3 Griess 法测定一氧化氮结果** 与对照组比较, 模型组的一氧化氮表达明显增多 ( $P < 0.01$ ), 人参皂甙 3 个剂量组的一氧化氮浓度均有下降, 100  $\mu\text{g/ml}$  剂量组一氧化氮浓度的下降较模型组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 100  $\mu\text{g/ml}$  剂量组一氧化氮浓度的下降较模型组差异亦有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。随人参皂甙剂量的增加, 一氧化氮的表达逐渐下降, 人参皂甙对  $A\beta$  诱导一氧化氮表达有抑制作用。

## 3 讨论

AD 的发病机制有基因学说及神经递质代谢障碍、氧化应激、神经细胞凋亡、脑内自身免疫反应、细胞骨架改变、微量元素影响等。新近研究显示 AD 患者血浆均值  $A\beta_{1-42}$  是 236 ng/ml, 而对照组为 38 ng/ml, 部分患者的血浆浓度高于 658 ng/ml<sup>[5]</sup>。AD 更常见的是散发性的, 散发性 AD 脑内沉积最多的是  $A\beta_{1-40}$ 。我们利用病理生理学浓度的  $A\beta_{1-40}$  诱导 THP-1 细胞发现细胞上清一氧化氮的含量明显增高, THP-1 细胞 iNOS 的表达也明显增高, iNOS 的表达增高与一氧化氮表达增高趋势一致, 说明病理生理浓度的  $A\beta_{1-40}$  可引起 iNOS 的表达增加, 从而引起一氧化氮的产生增多, 引起氧化应激, 造成细胞损伤。我们使用人参皂甙可抑制 THP-1 细胞 iNOS 和一氧化氮的表达, 并且有明显的剂量关系, 随着剂量的加大, iNOS 和一氧化氮的表达降低。

Smith 等<sup>[6]</sup>报道 AD 患者脑内 iNOS 和一氧化氮的表达明显增高, 可导致神经元受损。Ranjit 等研究用病理生理学浓度 125 nmol/L 的  $A\beta_{1-40}$  可以诱导 THP-1 细胞激活, 分泌 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  和 IL-8 等细胞因子, 在 2 h 细胞因子分泌达到高峰。IL-1 可以促进 ApoE、 $\alpha$ 1-抗凝乳蛋白酶和补体蛋白的表达增加。IL-1 还可以刺激一氧化氮产生和增加胞内  $\text{Ca}^{2+}$  离子水平<sup>[7]</sup>。TNF- $\alpha$  可通过激活小胶质细胞或 THP-1 细胞的酪氨酸蛋白激酶, 引起转录调控因子 NF- $\kappa$ B 的表达, NF- $\kappa$ B 可促进 iNOS 的表达, 引起一氧化氮的产生增多<sup>[8]</sup>。我们在早期测定一氧化氮浓度, 发现一氧化氮浓度与正常组没有差异, 在 48 h 差异较明显。考虑一氧化氮的产生增多为细胞因子浓度升高后诱导 THP-1 细胞分泌所致。人参皂甙抑制 iNOS 的表达, 从而引起一氧化氮的产生减少, 可能是由于其抑制细胞因子的产生所致。

我们的实验结果显示, 人参皂甙明显减少 THP-1 细胞 iNOS 的表达和一氧化氮的产生, 从而减少氧化应激, 减轻对细胞的损害, 保护神经元。因此我们认为人参皂甙可以作为一种调节免疫和抗氧化应激药物应用于 AD 的治疗。

### 参考文献:

- [1] 陈为民, 刘秀琴, 洪燕玲. 阿尔茨海默病患者治疗前后  $\beta$ -淀粉样蛋白和胰岛素含量变化[J]. 中国基层医药, 2005, 12(11): 1481-1482.
- [2] 肖淑萍, 吉中国. 银杏叶提取物对经铝化物诱导的阿尔海默病模型大鼠的影响[J]. 中国基层医药, 2006, 13(3): 405-408.
- [3] 余上才, 增旭东, 顾菊英, 等. 人参皂甙对大鼠单核细胞因子增殖性变化的影响[J]. 中国中医药科技, 2001, 28(1): 28-29.
- [4] 黄泰康. 常用中药成分与药理手册[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1994: 72-79.
- [5] Kuo YM, Emmerling MR, Lampert HC, et al. High levels of circulating  $A\beta_{1-42}$  are sequestered by plasma proteins in Alzheimer's disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 25(3): 257-278.

- [6] Smith MA, Richey Harris PL, Sayre LM, et al. Widespread peroxynitrite-mediated damage in Alzheimer's disease[J]. J Neurosci, 1997, 17(8):2653-2657.
- [7] Yue Li, Ling Liu, Steven W, et al. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38 mapk pathway[J]. J Neurosci, 2003, 23(5):1605-1611.
- [8] Combs CK, Karlo JC, Kao SC, et al.  $\beta$ -amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF $\alpha$ -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis[J]. J Neurosci, 2001, 21(4):1179-1188.

[收稿:2008-01-10]

(本文编辑 李霞)

## · 短篇论著 ·

## 立止血治疗消化性溃疡出血 220 例疗效观察

孙成山 于涛 张晓帆 韩凤琴 张爱武

【关键词】立止血; 氨甲苯酸; 消化性溃疡出血

在上消化道出血的病因中, 溃疡病出血居首位<sup>[1]</sup>。2000 年以来, 我们应用立止血治疗消化性溃疡引起的上消化道出血取得了非常满意的疗效, 并与氨甲苯酸、安络血进行了对比观察, 现报告如下。

## 1 临床资料

1.1 一般资料 上消化道出血经胃镜明确诊断为消化性溃疡合并出血的患者 220 例, 其中男 130 例, 女 90 例; 年龄 15 ~ 78 岁, 中位年龄 48.5 岁。十二指肠溃疡出血 130 例, 胃溃疡出血 35 例, 复合性溃疡出血 28 例, 吻合口溃疡出血 27 例。随机分成两组即治疗组 120 例, 对照组 100 例。两组患者在性别、年龄、症状、血糖、肝功能、超声或 CT 等常规检查有可比性。

1.2 治疗方法 治疗组给予立止血 1 kU 静脉注射、肌肉注射每日各 1 次; 对照组给予氨甲苯酸 200 mg, 每 8 小时 1 次静注, 安络血 10 mg 每日两次肌注。两组均给予奥美拉唑 40 mg 每 12 小时 1 次静脉滴注, 并给予补液, 必要时输血等基本相同的治疗。

1.3 疗效判定 根据上消化道出血是否停止和出血停止时间判定疗效<sup>[2]</sup>: ①显效: 用药后 24 h 内出血停止, 包括血压稳定, 心率下降, 肠鸣音恢复正常, 血红蛋白稳定, 临床无出血倾向; ②有效: 用药后 24 ~ 48 h 内出血停止; ③无效: 用药后 48 h 出血仍不停止。

1.4 临床疗效 治疗组: 显效 110 例(91.7%), 有效 10 例(8.3%), 无效 0 例; 对照组: 显效 60 例(60.0%), 有效 22 例(22.0%), 无效 8 例(8.0%); 两组有效率经  $\chi^2$  检验, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

1.5 不良反应 治疗组均无明显头晕、头痛、腹痛、腹泻及恶心呕吐等不良反应发生; 对照组 5 例出现轻度头痛、头晕、恶心等反应, 经对症治疗后缓解。

## 2 讨论

上消化道出血是指 Treitz 韧带以上的消化道, 包括食管、胃、十二指肠、胰管和胆道的出血<sup>[3]</sup>。消化性溃疡是上消化道出血最常见的病因, 约占上消化道出血的 10% ~ 25%<sup>[4]</sup>。溃疡并发出血标志着病变具有高度活动性, 溃疡边缘或基底血管被侵蚀; 出血量与速度取决于被侵蚀血管的种类与内径、

血管的舒缩状态以及凝血机制<sup>[5]</sup>。

立止血是从巴西矛头蛇(*Bothrops atrox*, 大具窝蝮蛇)的毒液中分离精制的一种巴曲酶制成的制剂。它是一种单链糖蛋白, 由 17 种氨基酸组成, 总氨基酸数为 231 个, 具有类凝血酶及类凝血激酶样作用。其凝血酶样作用能促进出血部位(血管破裂部位)的血小板凝集, 释放一系列凝血因子, 其中包括血小板因子 3(PF3), 能促进纤维蛋白原降解生成纤维蛋白 I 单体, 进而交联聚合成难溶性纤维蛋白, 促进在出血部位的血栓形成和止血。其类凝血激酶样作用是由于释放的 PF3 引起, 凝血酶原被激活后可加速凝血酶生成, 因而促进凝血过程。立止血经静脉注射、肌肉注射、皮下或腹腔给药均能吸收。静脉注射后 5 ~ 10 min 起效, 止血效应持续 24 h。肌肉注射或皮下注射 20 min 起效, 持续 48 h<sup>[6]</sup>。氨甲苯酸属抗纤维蛋白溶解药, 能抑制纤维蛋白溶酶的激活因子(包括组织激活因子、尿激酶等), 使纤维蛋白酶原不能转变为纤维蛋白溶酶, 从而抑制纤维蛋白的溶解, 产生止血作用<sup>[7]</sup>。总之, 立止血具有显著而迅速的止血作用, 又可多途径给药, 无副作用, 在抢救上消化道出血中值得推广使用。

## 参考文献:

- [1] 李兆申. 重视急性非静脉曲张性上消化道出血的规范化诊治[J]. 中华消化内科杂志, 2005, 1(44):3-4.
- [2] 中华内科杂志编委会. 急性非静脉曲张性上消化道出血诊治指南(草案)[J]. 中华内科杂志, 2005, 1(44):73-76.
- [3] 王善玲, 毓珊. 上消化道出血的现代治疗[J]. 中国厂矿医学, 2004, 12(17):501-503.
- [4] 师水生. 非静脉曲张性上消化道出血的药物治疗[J]. 中国临床医生, 2004, 4(32):14-15.
- [5] 汪鸿志. 上消化道出血的诊断与治疗[M]//刘建, 刘新光. 消化病新视野. 北京: 中国人事出版社, 2006:18-29.
- [6] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003:522-523.
- [7] 芮耀斌. 实用药物手册[M]. 北京: 人民军医出版社, 2004:380-381.

[收稿:2008-02-08]

(本文编辑 苗丽娟)