

仙茅苷对阿尔茨海默病大鼠的治疗作用机制

张欣^a, 齐凡星^a, 李静^b, 李志安^a, 康丽娟^a, 刘露^a, 孙静^a

摘要 目的:探究仙茅苷在阿尔茨海默病(AD)大鼠中的作用机制以及仙茅苷对大鼠认知功能及海马区神经元凋亡的影响。**方法:**在大鼠颈背部皮肤注射D-半乳糖与 β -淀粉样蛋白25-35($A\beta_{25-35}$)以构建AD模型,选择存活且造模成功的大鼠36只,随机分为模型组和治疗组各18只,治疗组灌胃给予仙茅苷,模型组灌胃给予等量的生理盐水,灌胃给药持续8周。另选择同期进行饲养的同龄大鼠18只为对照组,对照组和模型组采用相同的给药方案。给药结束后,采用Morris水迷宫测试3组大鼠的记忆与学习行为。提取3组大鼠脑组织的蛋白质与RNA,采用RT-PCR及Western blot检测B细胞淋巴瘤/因子2(Bcl-2)、Bcl-2相关蛋白(Bax)的mRNA及蛋白的表达情况。TUNEL法检测大鼠海马区神经元的凋亡。**结果:**与对照组相比,模型组的平均逃避潜伏期延长($P<0.05$),治疗组与对照组差异无统计学意义($P>0.05$);治疗组的平均逃避潜伏期低于模型组($P<0.05$)。与对照组相比,模型组的Bcl-2 mRNA和蛋白较低,Bax mRNA和蛋白较高($P<0.05$),治疗组与对照组差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,治疗组的Bcl-2 mRNA和蛋白高于模型组,Bax mRNA和蛋白低于模型组(均 $P<0.05$)。模型组和治疗组大鼠的海马区神经元凋亡数目高于对照组($P<0.05$),治疗组大鼠海马区神经元凋亡数目低于模型组($P<0.05$)。**结论:**仙茅苷能改善AD大鼠模型的空间学习与认知能力。

关键词 老年痴呆;神经元凋亡;Morris水迷宫;仙茅苷;Bcl-2

中图分类号 R741;R741.05;R742 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.2019.09.009

张欣, 齐凡星, 李静, 等. 仙茅苷对阿尔茨海默病大鼠的治疗作用机制[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14(9): 461-463.

作者单位

保定市第一中心医院 a. 神经内科 b. 彩超室

河北 保定 071000

基金项目

保定市科技支撑计划项目 (No. 17ZF074)

收稿日期

2018-11-01

通讯作者

齐凡星

patshia@163.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性的神经退行性疾病^[1],患者通常会表现出认知功能障碍,并伴行为障碍,在中老年群体有较高的发病率。随着社会老龄化的进一步加剧,AD痴呆的发病率逐年升高,给家属与社会带来相当大的负担。因此,如何对AD进行防治是当前研究的一个热点。关于AD的发病机制,目前有 β 淀粉样蛋白级联学说、钙稳态失调、中枢胆碱能损伤、胰岛素相关糖代谢异常、自由基和氧化应激作用、炎症和免疫功能异常等学说,其中 β 淀粉样蛋白级联学说得到大多数人的认可。仙茅是一种石蒜科的多年生草本植物,仙茅苷是其最主要的活性成分。仙茅苷具有清除自由基的作用。现阶段国内外还没有应用仙茅苷治疗AD的前例。本研究采用D-半乳糖与 β -粉样蛋白25-35($A\beta_{25-35}$)构建大鼠AD模型以研究仙茅苷对AD的治疗作用,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8周大清洁级雄性SD大鼠54只,体质量315~319 g,平均体质量(317.65±5.72) g。

1.1.2 主要试剂与仪器 D-半乳糖、 $A\beta_{25-35}$ (购于北京索莱宝科技有限公司),仙茅苷(购于上海户实医药科技有限公司),Morris水迷宫检测装置(购于北京众实迪创科技发展有限公司),TRNzol试剂、FastQuant cDNA第一链合成试剂盒、SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)试剂(购于北京天根生化

科技有限公司), B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体、Bcl-2 相关蛋白 (Bcl-2 associated x protein, Bax) 抗体、 β -actin 抗体(购于美国Abcam公司),脱脂奶粉(购于伊利公司),ECL显影液[购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司],细胞凋亡试剂盒(购于上海酶联生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 老年痴呆模型的构建 在大鼠颈背部皮肤注射D-半乳糖与 $A\beta_{25-35}$ 以构建AD模型:将D-半乳糖按50 mg/kg的剂量每天注射1次,连续注射6周。在第7周,将大鼠用水合氯醛麻醉后固定,暴露前囟,利用微量注射器将5 μ L聚集态 $A\beta_{25-35}$ 注射入侧脑室,注射过程持续约10 min,留针5 min。缝合头皮,涂抹庆大霉素药膏,然后注射5万U青霉素,每日1次,持续4 d^[2]。选择存活且造模成功的大鼠36只,随机分为模型组和治疗组各18只。治疗组通过灌胃给予仙茅苷(70 mg/kg),每日1次;模型组按相同方法灌胃等量生理盐水,灌胃给药持续8周。另选择同期饲养的同龄SD大鼠18只为对照组,对照组与模型组采用相同的给药方案。

1.2.2 Morris水迷宫检测大鼠行为学 给药8周后,3组大鼠均进行Morris水迷宫检测。整个装置放置在深约30 cm的水池中,水中事先掺入适量的牛奶使液体不透明,水温约25 $^{\circ}$ C。在装置的第二象限安放一个低于水面1 cm的14 cm×14 cm的深色平台。池壁的四面各有一个入水点,分别将大鼠由入水点放入池中,开始计时,当大鼠找到隐藏在水

面下的平台时停止计时,即逃避潜伏期。每只大鼠每天要经历两次实验,持续5周,以检测学习和空间记忆能力。在水迷宫实验的第6天,移去水下平台,随意在入水点放下大鼠,记录大鼠在第二象限内的游泳的距离与在整个装置内游泳的距离,以检测大鼠对空间记忆的保持能力^[3]。

1.2.3 海马区组织的处理 经过水迷宫检测后,用颈椎脱臼法处死3组大鼠,取出脑组织,在冰上分离出海马区,平均分成三部分,一部分用来提取海马区的RNA,一部分用于提取蛋白,另一部分用石蜡包埋。

1.2.4 RT-PCR检测Bcl-2、Bax的mRNA表达水平 用TRNzol法提取总RNA。将提取的总RNA反转成cDNA。检测所提取的RNA吸光度值 ≥ 1.8 ,方可进行下述步骤:进行实时荧光定量PCR,把SYBR Green置于冰上解冻,涡旋混匀;加入5 μ L SYBR Green、1.4 μ L cDNA、0.6 μ L 5 μ mol/L引物配置反应体系;放入实时荧光定量PCR仪器中,条件:95 $^{\circ}$ C 15 min,(95 $^{\circ}$ C 10 s、59 $^{\circ}$ C 20 s、72 $^{\circ}$ C 20 s)40循环,72 $^{\circ}$ C 5 min^[4]。

1.2.5 Western blot检测Bcl-2、Bax蛋白表达 将海马组织块加入RIPA裂解液后磨碎,冰上静置30 min后以4 $^{\circ}$ C、1 000 r/min的转速离心10 min,取上清。用酶标仪检测蛋白样品的浓度后,取适量蛋白,加入溴酚蓝与RIPA,煮沸7 min,将蛋白样品彻底变性,进行SDS-PAGE电泳。电泳结束后,将Bcl-2、Bax蛋白与内参 β -actin所在的条带切下并转移到PVDF膜上,用5%脱脂奶粉封闭90 min后,加入相应的一抗(1:2 000)孵育过夜。次日上午用1 \times TBST彻底洗涤后再加入兔抗羊二抗(1:5 000),室温反应1 h,然后1 \times TBST洗涤,用ECL显色液显色^[5]。

1.2.6 TUNEL染色法检测凋亡 神经元石蜡切片进行脱蜡复水后,采用TUNEL试剂盒检测凋亡神经元。在400倍视野下对不同切片的每个区域进行6个视野的凋亡细胞计数。

1.3 统计学处理

RT-PCR的Ct值由实时荧光定量PCR仪器自动反映,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析;Western blot的结果、TUNEL凋亡实验的切片采用Image-ProPlus6.0软件分析图像^[6]。采用SPSS 18.0软件分析数据,计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,t检验;计数资料以率(%)表示, χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3组大鼠平均逃避潜伏期比较

对照组、模型组、治疗组的平均逃避潜伏期分别为(22.31 \pm 6.98)s、(36.27 \pm 3.12)s、(21.28 \pm 7.65)s;与对照组相比,模型组的平均逃避潜伏期延长,差异有统计学意义($P<0.05$),治疗组与对照组差异无统计学意义($P>0.05$);治疗组的平均逃避潜伏期低于模型组($P<0.05$)。

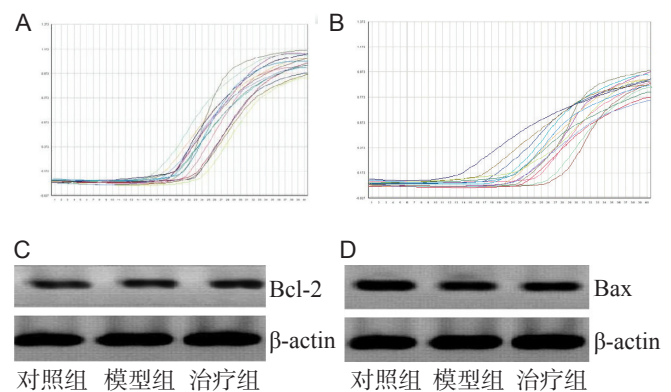
2.2 3组大鼠Bcl-2、Bax的mRNA、蛋白表达水平的对比

与对照组相比,模型组的Bcl-2 mRNA和蛋白较低,Bax mRNA和蛋白较高,差异有统计学意义($P<0.05$),治疗组与对照组差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,治疗组的Bcl-2 mRNA和蛋白高于模型组,Bax mRNA和蛋白低于模型

组,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),见表1、图1。

表1 3组大鼠Bcl-2、Bax的mRNA及蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	mRNA表达水平		蛋白表达水平	
		Bcl-2	Bax	Bcl-2	Bax
对照组	18	2.19 \pm 0.98	1.35 \pm 6.20	3.05 \pm 1.44	1.43 \pm 0.92
模型组	18	1.72 \pm 4.31	1.41 \pm 2.62	2.64 \pm 1.02	1.52 \pm 0.23
治疗组	18	2.14 \pm 1.24	1.33 \pm 3.26	3.06 \pm 0.24	1.43 \pm 0.67
t值		2.278	2.654	2.528	2.683
P值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05



注:A:Bcl-2的熔解曲线;B:Bax的熔解曲线;C:3组大鼠Bcl-2蛋白的Western blot检测;D:3组大鼠Bax蛋白表达水平的Western blot检测

图1 3组大鼠Bcl-2、Bax蛋白表达水平的对比

2.3 3组大鼠海马区神经元凋亡水平的对比

对照组、模型组、治疗组大鼠的海马区凋亡神经元分别为(5.42 \pm 0.41)、(36.81 \pm 3.72)、(20.43 \pm 2.33),模型组和治疗组大鼠的海马区神经元凋亡数目高于对照组($P<0.05$),治疗组大鼠海马区神经元凋亡数目低于模型组($P<0.05$)。

3 讨论

AD患者通常会表现出认知功能障碍,且伴行为障碍。目前没有针对AD的特效药物^[7]。AD的病理特征是神经元外积累大量 β 淀粉样蛋白,及神经元内的tau蛋白过度磷酸化,因此关于AD的发病机制中, β 淀粉样蛋白级联学说得到大多数人的认可。位于侧脑室的海马区负责人类的长期记忆与学习能力,能产生叙述性记忆(declarative memory)。一旦海马区的神经元出现异常,将会导致各种疾病,AD就是其中一种,海马区神经元因 β 淀粉样蛋白累积而出现异常凋亡是普遍接受的一种发病机制^[8]。

海马区神经元的凋亡受到各种程序化凋亡基因的调控,是一个十分复杂的病理生理过程,在整个凋亡过程中,Bcl-2与Bax这两个基因起重要作用^[9]。研究表明,Bcl-2是最先被确定能发挥抗凋亡作用的基因,Bax则是一种促凋亡蛋白^[10]。Bcl-2通过结合Bax蛋白可抑制细胞凋亡。细胞接收到凋亡信号的激活后,如果Bcl-2表达水平比Bax高,那么这个细胞将会存活,反之如果Bax表达占优势,神经元走向凋亡的结局^[11]。相关研究说明过表达Bcl-2的大鼠海马区神经元在体外培养,能抵抗 β 淀

粉样蛋白诱导的凋亡。仙茅是一种常用药,被收录进入中国药典^[12]。中医认为,仙茅能够发挥益精血、行血消肿、补肾助阳和强筋骨的功效。仙茅苷是主要的活性成分,具有清除自由基的作用。除发挥抗氧化作用以外,仙茅苷还能发挥植物雌激素样作用^[13]。用乙醇提取出的仙茅有效成分能显著促进去卵巢大鼠的子宫内膜增生,也能促使这种处理的雌鼠子宫湿重增加、子宫糖原含量上升、阴道细胞角质化百分率提高,表现出类雌激素的功能。有研究表明在老年痴呆的发病过程中,雌激素可对神经起到一定的保护作用。对AD的治疗中,选择雌激素替代疗法能使患者的认知功能与记忆力得到改善。一些植物来源的雌激素由于其受体激动剂选择性的特性,在改善老年痴呆患者认知功能的同时,具有较低的不良反^[14]。大豆、姜黄等植物中的雌激素在提高去卵巢大鼠的认知能力中发挥作用。根据这些结果,可以提出一个推测:Bcl-2的启动子区有多个雌激素结合位点,雌激素与Bcl-2启动子结合后促使Bcl-2表达上调;仙茅苷或许通过其雌激素样作用与其相应的受体结合,激活多条信号通路,引起抗凋亡基因的表达上调。Bcl-2的表达水平上调导致Bax表达被抑制,从而抑制海马区神经元的凋亡,引起Bax表达下调^[15]。本研究中,模型组的Bcl-2 mRNA和蛋白低于对照组,Bax mRNA和蛋白高于对照组(均 $P<0.05$),治疗组与对照组差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,治疗组的Bcl-2 mRNA和蛋白高于模型组,Bax mRNA和蛋白低于模型组(均 $P<0.05$)。

TUNEL法是检测细胞凋亡的常用方法,模型组和治疗组大鼠的海马区神经元凋亡数目高于对照组($P<0.05$),治疗组大鼠海马区神经元凋亡数目低于模型组($P<0.05$),说明仙茅苷能在一定程度上抑制海马区神经元的凋亡。

综上所述,仙茅苷能改善AD大鼠模型的空间学习与认知能力,为仙茅苷进一步在人体中应用提供理论基础。

参考文献

- [1] 范鹏涛,张龙梅,闵恒,等. 仙茅苷对血管性痴呆模型大鼠海马区Caspase-3、PARP-1和雌激素受体表达的作用[J]. 神经解剖学杂志, 2017, 33: 453-458.
- [2] 杨吉平,方欣,赖红. 阿尔茨海默病中β淀粉样蛋白的神经毒性机制[J]. 解剖科学进展, 2007, 13: 264-266.
- [3] Tang X, Qin Y, Wu J, et al. Shape and diffusion tensor imaging based integrative analysis of the hippocampus and the amygdala in Alzheimer's disease [J]. Magn Reson Imaging, 2016, 34: 1087-1099.
- [4] 周艾婧,邓娟,汤艳,等. 高尿酸对大鼠认知功能及海马神经元氧化应激和凋亡的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2016, 25: 422-426.
- [5] 王改凤. 补肾益智方对D-半乳糖联合β-淀粉样蛋白25-35致老年痴呆模型大鼠的作用及机制[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20: 7307-7313.
- [6] Avetisyan AV, Samokhin AN, Alexandrova IY, et al. Mitochondrial Dysfunction in Neocortex and Hippocampus of Olfactory Bulbectomized Mice, a Model of Alzheimer's Disease [J]. Biochemistry, 2016, 81: 615-623.
- [7] 单铁英,高立威,董洋,等. 黄芪提取物对老年痴呆大鼠海马区COX-2和iNOS表达的影响[J]. 现代预防医学, 2016, 43: 1859-1861.
- [8] 贺旭,葛金文,邓长青,等. 三七皂苷抑制大鼠全脑缺血后海马CA1区神经元凋亡及其机制研究[J]. 中草药, 2016, 47: 1337-1344.
- [9] Choi J, Park JW, Kim BJ, et al. Funisitis is more common in cervical insufficiency than in preterm labor and preterm premature rupture of membranes [J]. J Perinat Med, 2016, 44: 523-529.
- [10] 曲鹏,乔春萍,方秀斌. 凋亡相关基因与脑缺血再灌注损伤[J]. 解剖科学进展, 2006, 12: 52-56.
- [11] 高明龙,史少霞,张坤,等. 脑源性神经营养因子修饰羊膜间充质干细胞移植改善老年痴呆大鼠的学习记忆能力[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22: 1419-1424.
- [12] Guzmán-Vélez E, Warren DE, Feinstein JS, et al. Dissociable contributions of amygdala and hippocampus to emotion and memory in patients with Alzheimer's disease[J]. Hippocampus, 2016, 26: 727-738.
- [13] 邱子豪,胡学远,冯秀晶,等. 不同时间异氟醚麻醉对幼龄大鼠海马神经元凋亡及自噬的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49: 1054-1060.
- [14] 傅增辉,孙洪英,刘松,等. 仙茅苷对老年痴呆大鼠的认知功能及海马区神经元凋亡的影响[J]. 医学研究生学报, 2017, 30: 824-828.
- [15] Yang B, Xia Z, Zhong B, et al. Distinct Hippocampal Expression Profiles of Long Non-coding RNAs in an Alzheimer's Disease Model [J]. Mol Neurobiol, 2016, 54: 1-14.

(本文编辑:王晶)



欢迎投稿