

楮实子对 APP/PS1 双转基因小鼠海马神经发生的影响

张二飞¹, 殷 紫², 闫宇辉¹, 钱 俊¹, 韩永红²

(1. 江苏食品药品职业技术学院, 江苏 淮安 223003; 2. 江苏护理职业学院, 江苏 淮安 223003)

摘要: **目的** 探讨楮实子对 APP/PS1 双转基因小鼠海马神经发生的影响。**方法** 40 只 APP/PS1 双转基因小鼠随机分为模型组、阳性药组 (10 mg/kg 多奈哌齐) 及楮实子低、高剂量组 (1.8、3.6 g/kg), C57BL/6 小鼠作为对照组, 每组 10 只, 灌胃给药 6 周。然后, Morris 水迷宫实验检测小鼠学习记忆能力, TUNEL 法检测小鼠海马区神经细胞凋亡, 免疫荧光染色法检测小鼠海马区 NeuN/BrdU 阳性细胞表达, Western blot 法检测 GSK-3 β 、 β -catenin 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 楮实子高剂量组学习记忆能力显著改善 ($P<0.05$), 凋亡细胞数显著减少 ($P<0.01$), NeuN/BrdU 阳性细胞数显著增加 ($P<0.01$), GSK-3 β 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$), β -catenin 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$)。**结论** 楮实子能促进 APP/PS1 双转基因小鼠海马神经发生, 其机制可能与激活 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

关键词: 楮实子; 海马神经发生; APP/PS1 双转基因小鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)03-0539-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.03.011

Effects of *Broussonetiae Fructus* on hippocampal neurogenesis in double transgenic APP/PS1 mice

ZHANG Er-fei¹, YIN Zi², YAN Yu-hui¹, QIAN Jun¹, HAN Yong-hong²

(1. Jiangsu Food & Pharmaceutical Science College, Huaian 223003, China; 2. Jiangsu College of Nursing, Huaian 223003, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore the effects of *Broussonetiae Fructus* on hippocampal neurogenesis in double transgenic APP/PS1 mice. **METHODS** Forty double transgenic APP/PS1 mice were randomly divided into model group, positive drug group (10 mg/kg donepezil) and low-dose, high-dose *Broussonetiae Fructus* groups (1.8, 3.6 g/kg), and C57BL/6 mice were recruited into control group, 10 mice in each group, and intragastric administration went on for 6 weeks. Subsequently, Morris water maze test was used to detect mouse learning and memory activities, TUNEL assay and immunofluorescence staining method were applied to detecting nerve cell apoptosis and NeuN/BrdU positive cell expression in mouse hippocampal area, respectively, Western blot was adopted in the protein expression detection of GSK-3 β and β -catenin. **RESULTS** Compared with the model group, the high-dose *Broussonetiae Fructus* group demonstrated significantly improved learning and memory activities ($P<0.05$), markedly reduced apoptosis cell count ($P<0.01$), obviously increased NeuN/BrdU positive cell count ($P<0.01$), significantly decreased GSK-3 β protein expression ($P<0.05$), and markedly elevated β -catenin protein expression ($P<0.05$). **CONCLUSION** *Broussonetiae Fructus* can promote hippocampal neurogenesis in double transgenic APP/PS1 mice, whose mechanisms may be related to the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

KEY WORDS: *Broussonetiae Fructus*; hippocampal neurogenesis; double transgenic APP/PS1 mice

收稿日期: 2018-07-12

基金项目: 淮安市 2017 年科技局指导项目 (HABZ201714); 2018—2019 年度江苏食品药品职业技术学院面上引导基金项目 (JS-FP2018006-Z)

作者简介: 张二飞 (1986—), 硕士, 讲师, 研究方向为中药学。E-mail: zef19861986@163.com

* 通信作者: 韩永红 (1970—), 硕士, 副教授, 研究方向为中药学。E-mail: hanyonghong1970@163.com

阿尔茨海默病是一种神经退行性病变，为老年痴呆最常见的类型，临床表现为认知功能丧失、记忆功能障碍等^[1-3]，主要病理特征为 β -淀粉样蛋白过度沉积形成的细胞外老年斑、Tau蛋白过度磷酸化形成的神经元纤维缠结及神经元丢失^[4]，发病机制假说主要包括 β 淀粉样蛋白假说、Tau蛋白假说、炎症假说、氧化应激假说等^[5-7]。

楮实子功效补肾清肝、明目、利尿，用于肝肾不足、腰膝酸软、虚劳骨蒸、头晕目昏、目生翳膜、水肿胀满，具有一定神经保护作用，能提高大鼠慢性脑供血不足后认知功能障碍，其水煎剂能通过调控MAPK通路改善D-半乳糖所致PC12细胞凋亡^[8-12]，但尚无对阿尔茨海默病模型的神经保护作用及机制尚未见报道。因此，本实验探讨楮实子对APP/PS1双转基因小鼠海马神经发生的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF级8月龄C57BL/6雄性小鼠，购于辽宁长生生物有限公司，实验动物生产许可证号SCXK(辽)2013-0001；8月龄APP/PS1双转基因小鼠，购于北京中科泽晟生物技术有限公司，实验动物生产许可证号SCXK(京)2013-0002，体重质量(30±3)g，分笼饲养，自由摄食饮水，室温20~25℃，相对湿度40%~60%，每天光照12h，采用PCR法鉴定，选取阳性小鼠用于实验。

1.2 试药 楮实子购自安徽亳州药材市场，经江苏食品药品职业技术学院祝冬青副教授鉴定为正品。多奈哌齐(批号664081，美国Sigma公司)。TUNEL试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)；BrdU(美国Sigma公司)；小鼠抗BrdU、GSK-3 β ，兔抗NeuN、 β -catenin、 β -actin抗体(北京博奥森生物技术有限公司)；羊抗小鼠FITC、驴抗兔Cy3标记二抗(美国Jackson公司)；辣根过氧化物酶(HRP)、标记羊抗小鼠IgG、HRP标记驴抗兔IgG(北京鼎国生物技术有限公司)；全蛋白提取、BCA蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 CM1850冰冻切片机、DMLS2显微镜、DFC500照相系统(德国徕卡公司)；MS-1水迷宫仪(成都仪器厂)；水平核酸电泳仪、半干式蛋白转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 分组 将40只APP/PS1双转基因小鼠随机分为模型组、阳性药组(10 mg/kg多奈哌齐)及楮实子低、高剂量组(1.8、3.6 g/kg)，C57BL/6

小鼠作为对照组，每组10只。

2.2 给药 50 g楮实子用蒸馏水浸泡1 h后煎煮2次，每次2 h，合并药液，浓缩至100 mL，终质量浓度为0.5 g/mL(生药量)，小鼠灌胃给药，同时阳性药组小鼠灌胃给予10 mg/kg多奈哌齐，对照组小鼠灌胃给予同体积的蒸馏水，连续6周。

2.3 Morris水迷宫实验 经过6周给药后，采用Morris水迷宫实验检测小鼠学习记忆能力。检测仪器由1个圆桶(直径120 cm、高60 cm)、摄像及自动图像采集分析系统组成，桶内分成4个象限，逃生平台(直径10 cm)置于其中1个象限内，加水(水温25℃)至水面高于平台2 cm，观察小鼠寻找台面所需时间及穿越平台次数。

2.4 原位末端标记(TUNEL)法 小鼠给药后处死取脑，制备冰冻切片，根据TUNEL试剂盒说明书操作步骤检测海马区神经细胞凋亡。

2.5 免疫荧光染色 将5 μ m脑冰冻冠状切片于室温下晾干，固定、透化、封闭后兔抗NeuN、鼠抗BrdU抗体(1:150)4℃下孵育过夜，次日滴加羊抗小鼠Cy3标记、驴抗兔FITC标记二抗(1:200)室温孵育1 h，DAPI染核，盖玻片封片，置于荧光显微镜下观察NeuN/BrdU阳性细胞表达。

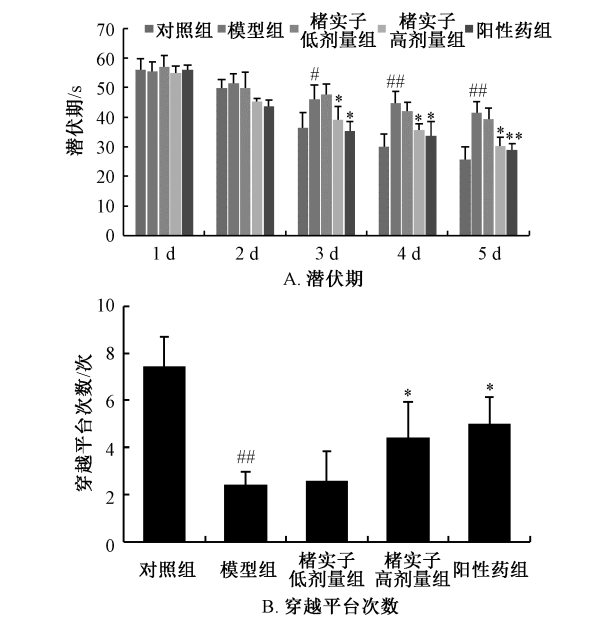
2.6 Western Blot法 小鼠麻醉后进行心脏灌流，取海马区脑组织，研磨，经蛋白提取、定量、电泳、转膜及显色后凝胶成像分析系统扫描，测定光密度，其中GSK-3 β 、 β -catenin、 β -actin抗体稀释浓度分别为1:800、1:600、1:1 000，HRP标记二抗稀释浓度为1:800。然后，以目的条带、内参蛋白条带光密度比值为指标进行分析。

2.7 统计学分析 SPSS 17.0软件进行处理，数据以($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

3 结果

3.1 楮实子对小鼠学习记忆能力的影响 图1A显示，与对照组比较，模型组小鼠潜伏期显著延长($P < 0.01$)；与模型组比较，楮实子高剂量组其潜伏期显著缩短($P < 0.05$)。图1B显示，与对照组比较，模型组小鼠穿越平台次数显著降低($P < 0.01$)；与模型组比较，楮实子高剂量组其次数显著增加($P < 0.05$)。

3.2 楮实子对小鼠海马区神经细胞凋亡的影响 图2显示，与对照组比较，模型组小鼠海马区凋亡细胞数显著增加($P < 0.01$)；与模型组比较，

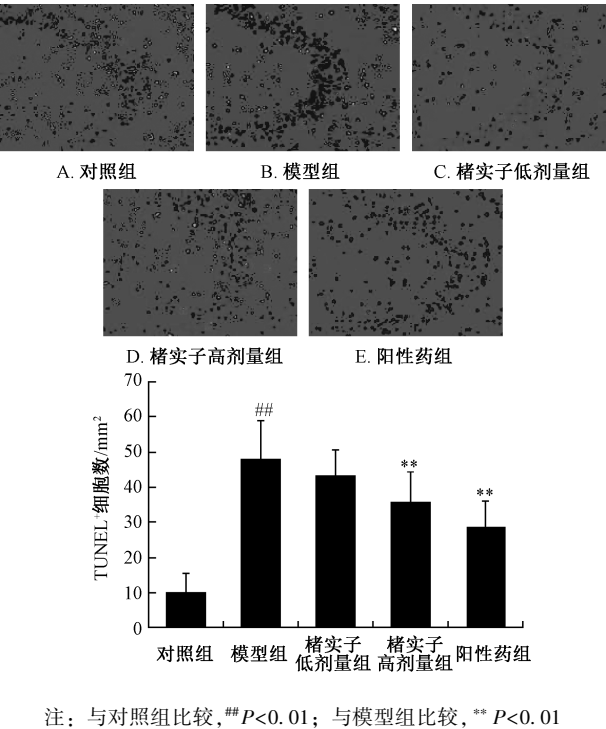


注：与对照组比较，[#] $P<0.05$ ，^{###} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P<0.05$ ，^{**} $P<0.01$

图 1 楮实子对小鼠学习与记忆能力的影响

Fig.1 Effects of *Broussonetiae Fructus* on mouse learning and memory activities

楮实子高剂量组其数量显著降低 ($P<0.01$)。



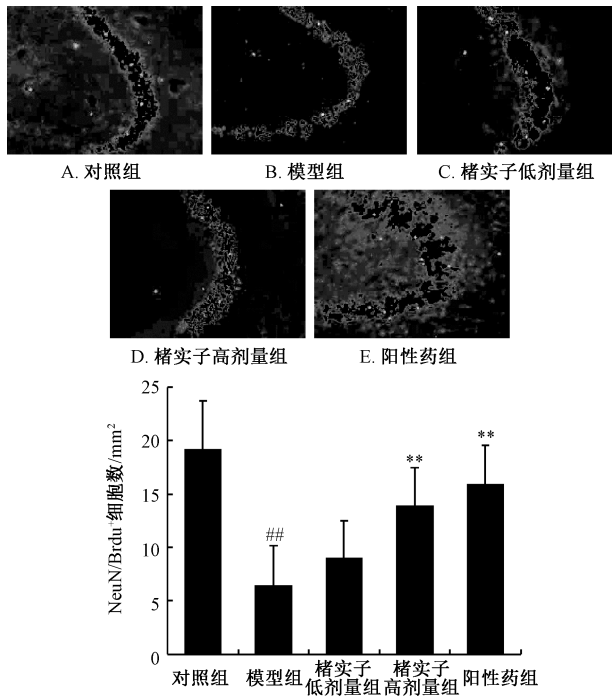
注：与对照组比较，^{###} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$

图 2 楮实子对小鼠海马区神经细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of *Broussonetiae Fructus* on nerve cell apoptosis in mouse hippocampal area

3.3 楮实子对小鼠海马区神经发生的影响 图 3 显示，与对照组比较，模型组小鼠海马新生神经元

数显著降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，楮实子高剂量组其数量显著增加 ($P<0.01$)。



注：与对照组比较，^{###} $P<0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P<0.01$

图 3 楮实子对小鼠海马区神经发生的影响

Fig.3 Effect of *Broussonetiae Fructus* on neurogenesis in mouse hippocampal area

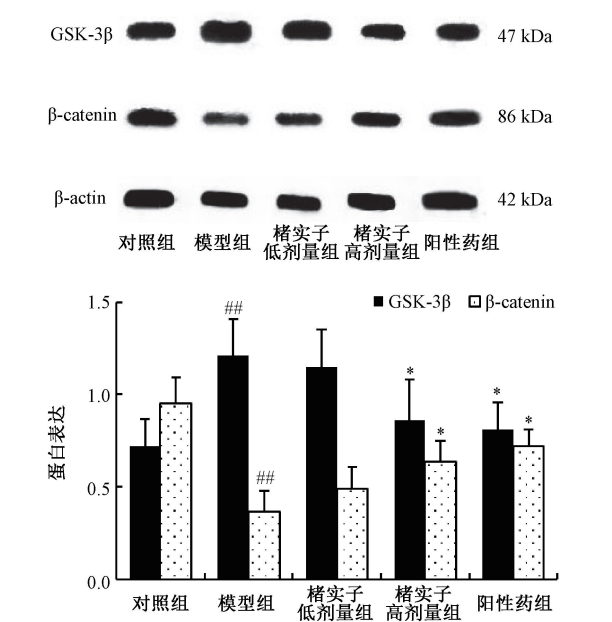
3.4 楮实子对 GSK-3 β 、 β -catenin 蛋白表达的影响 图 4 显示，与对照组比较，模型组 GSK-3 β 蛋白表达显著升高， β -catenin 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，楮实子高剂量组 GSK-3 β 蛋白表达显著降低， β -catenin 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$)。

4 讨论

阿尔茨海默病是一种中枢神经系统退行性疾病，临床表现为患者生活能力下降、记忆力减退，并出现神经行为异常、认知功能障碍，甚至生活不能自理，随着老龄化加剧，患病人数将保持快速增长，预计到 2030 年全世界患者将达到 6 500 万左右，将会对全社会造成严重负担^[13]。

神经干细胞在一定条件下可分化为神经元及胶质细胞，参与神经功能维持、修复等过程，称为神经发生^[14-15]。成年哺乳动物海马区仍然具有神经发生的能力，打破了中枢神经系统神经元不能再生的观点，也是阿尔茨海默病患者最易受损的区域之一，它主要负责学习记忆功能，故患者在早期均会出现学习记忆障碍^[16-17]。

APP/PS1 双转基因小鼠是公认的阿尔茨海默



注：与对照组比较，^{##}*P*<0.01；与模型组比较，^{*}*P*<0.05

图4 枳实子对 GSK-3β、β-catenin 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of *Broussonetiae Fructus* on GSK-3β, β-catenin protein expressions

病动物模型之一^[18]，可表达突变的人类早老素 (DeltaE9) 和人鼠淀粉样前体蛋白 (APP^{swe}) 融合体，人类早老素基因的第9个外显子突变缺失会导致早发性老年痴呆症^[19]。本实验发现，高剂量 (3.6 g/kg) 枳实子能显著改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力。研究表明，在阿尔茨海默病发生时，Aβ 大量沉积，导致海马神经元大量凋亡和丢失，从而引起海马神经发生障碍。利用 TUNEL 法和 NeuN/BrdU 免疫荧光染色检测小鼠海马 CA3 区神经细胞凋亡及神经元新生情况，发现模型组神经细胞凋亡数显著增多，新生神经元数显著降低 (*P*<0.01)，而给予高剂量 (3.6 g/kg) 枳实子后海马区神经细胞凋亡显著减少 (*P*<0.01)，新生神经元数也显著增加 (*P*<0.01)，表明它能促进 APP/PS1 小鼠海马神经发生。

Wnt/β-catenin 信号通路是影响神经干细胞增殖、分化和神经元凋亡最重要的通路之一，当通路激活时可引起 GSK-3β 表达下降，β-catenin 水平升高^[20]。研究表明，激活 Wnt/β-catenin 信号通路能促进神经干细胞增殖，刺激其分化为神经元，并能减少神经元的凋亡，在哺乳动物中枢神经系统神经元再生中起重要作用^[21-23]。本实验发现，模型组小鼠海马区 GSK-3β 蛋白表达显著升高，β-catenin 蛋白表达显著降低 (*P*<0.01)，而给予高剂量

(3.6 g/kg) 枳实子后 β-catenin 蛋白表达显著升高，GSK-3β 蛋白表达显著降低 (*P*<0.05)，表明它能减少神经元凋亡、促进神经发生，在一定程度上与激活可 Wnt/β-catenin 信号通路。

综上所述，枳实子可减少阿尔茨海默病小鼠海马神经细胞凋亡，促进神经发生，改善学习记忆能力，其机制可能与激活 Wnt/β-catenin 信号通路有关。

参考文献：

[1] 黄翠芹. 神经肽脑活素疗法可改善阿尔茨海默病 APP 转基因模型中神经干细胞移植物的存活状况[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(3): 515.

[2] Mao N, Liu Y, Chen K, *et al.* Combinations of multiple neuroimaging markers using logistic regression for auxiliary diagnosis of Alzheimer disease and mild cognitive impairment[J]. *Neurodegener Dis*, 2018, 18(2-3): 91-106.

[3] Chen C J, Bando K, Ashino H, *et al.* Biological evaluation of the radioiodinated imidazo [1, 2-a] pyridine derivative DRK092 for amyloid-β imaging in mouse model of Alzheimer' s disease[J]. *Neurosci Lett*, 2014, 581: 103-108.

[4] Mayeux R, Stern Y. Epidemiology of Alzheimer disease[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(8): a006239.

[5] Escribano L, Simon A M, Gimeno E, *et al.* Rosiglitazone rescues memory impairment in Alzheimer' s transgenic mice: mechanisms involving a reduced amyloid and tau pathology[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(7): 1593-1604.

[6] Karran E, Mercken M, De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer' s disease: an appraisal for the development of therapeutics[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(9): 698-712.

[7] Wang S L, Yu L J, Yang H, *et al.* Oridonin attenuates synaptic loss and cognitive deficits in an aβ₁₋₄₂-induced mouse model of Alzheimer' s disease [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (3): e0151397.

[8] 陈 康, 贺燕勤, 于顾然. 枳实子水煎剂对 H₂O₂ 介导 PC12 细胞凋亡的影响[J]. 四川中医, 2017, 35(2): 41-44.

[9] 陈晓玲, 倪新强, 李映红. 中医药治疗老年性痴呆的实验研究进展 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2016, 26 (18): 195-198.

[10] 熊 山, 叶祖光. 枳实子化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(5): 102-103.

[11] 杨金枝, 尹皎琳, 任汉阳, 等. 枳实子油对亚急性衰老模型小鼠脑组织抗氧化作用的实验研究[J]. 四川中医, 2008, 26(9): 16-17.

[12] Pang S Q, Wang G Q, Huang B K, *et al.* Studies on chemical constituents of fructus broussonetiae [J]. *J Chin Med Mat*, 2009, 32(8): 1229-1231.

[13] Claeysen S, Cochest M, Donneger R, *et al.* Alzheimer culprits: cellular crossroads and interplay [J]. *Cell Signal*, 2012, 24

(9): 1831-1840.

[14] 朱红梅, 张凤兰, 肖志成, 等. 淀粉样前体蛋白在神经发生中的作用与阿尔茨海默病关系的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(12): 74-79, 81.

[15] 张 丽, 赵丽红, 张 兰, 等. 山茱萸环烯醚萜苷促进成体大鼠海马神经干细胞增殖和分化的影响[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(5): 550-553, 564.

[16] Maruszak A, Pilarski A, Murphy T, *et al.* Hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease: is there a role for dietary modulation? [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 38(1): 11-38.

[17] Pluta R, Bogucka-Kocka A, Ułamek-Kozioł M, *et al.* Neurogenesis and neuroprotection in postischemic brain neurodegeneration with Alzheimer phenotype: is there a role for curcumin? [J]. *Folia Neuropathol*, 2015, 53(2): 89-99.

[18] Borchelt D R, Ratovitski T, van Lare J, *et al.* Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins [J]. *Neuron*, 1997, 19(4): 939-945.

[19] Holcomb L, Gordon M N, McGowan E, *et al.* Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes [J]. *Nat Med*, 1998, 4(1): 97-100.

[20] Ho C, Hsu Y C, Lei C C, *et al.* Curcumin rescues diabetic renal fibrosis by targeting superoxide-mediated Wnt signaling pathways[J]. *Am J Med Sci*, 2016, 351(3): 286-295.

[21] Hirota Y, Sawada M, Huang S H, *et al.* Roles of Wnt signaling in the neurogenic niche of the adult mouse ventricular-subventricular zone[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(1-2): 222-230.

[22] Nishiya N. Screening for chemical suppressors of the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2017, 137(2): 133-136.

[23] Chen X M, Zhou B H, Yan T T, *et al.* Peroxynitrite enhances self-renewal, proliferation and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells through activating HIF-1 α and Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117: 158-167.

佐太、 β -HgS、 HgCl_2 对 PC12 细胞活性和凋亡相关基因表达影响的比较

耿卢婧^{1,2,3}, 李 岑^{1,3}, 夏政华^{1,2,3}, 杜玉枝^{1,3}, 魏立新^{1,3*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 藏药研究重点实验室, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 青海省藏药药理学和安全性评价重点实验室, 青海 西宁 810008)

摘要: **目的** 比较佐太、 β -HgS、 HgCl_2 对 PC12 细胞活性和凋亡相关基因表达的影响。**方法** MTT 法测定 3 种药物对细胞活性的影响, 实时荧光定量 PCR 法检测 *Bax*、*Bak*、*Bcl2*、*Fas*、*FasL* 表达。**结果** 0.250 g/L 佐太作用 2 h 后细胞活性下降约 10%, 等量 β -HgS 使其下降 12% 左右, 而含汞量只有佐太 1/10 的 HgCl_2 却导致其下降约 70%; 佐太降低 *Bax*、*Bak*、*Bcl-2*、*FasL* 表达, β -HgS 降低 *Bax*、*Bak*、*Fas*、*FasL* 表达, HgCl_2 降低 *Bcl-2* 表达而增加 *Fas*、*FasL* 表达。**结论** 佐太、 β -HgS 对 PC12 细胞的毒性远小于 HgCl_2 , 两者可能对细胞中线粒体凋亡通路的激活有抑制作用, 而 HgCl_2 可能通过激活死亡受体通路诱导细胞凋亡。

关键词: 佐太; β -HgS; 氯化汞; PC12 细胞; 凋亡相关基因

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2019)03-0543-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.03.012

Effect comparison of Zuotai, β -HgS and HgCl_2 on PC12 cell activity and apoptosis-related gene expressions

收稿日期: 2018-02-27
基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81374063); 青海省重点实验室发展专项 (2017-ZJ-Y08); 青海省青年科学基金 (2016-ZJ-919Q); 中国科学院“西部之光”重点项目 (Y529021211); 中国科学院国际合作局对外合作重点项目资助 (153631KYSB20160004)
作者简介: 耿卢婧 (1987—), 女, 博士生, 从事民族药毒理学研究。Tel: (0971) 6143765, E-mail: glj01215@163.com
*** 通信作者:** 魏立新 (1967—), 男, 博士, 研究员, 从事民族药药理学与毒理学研究。Tel: (0971) 6143668, E-mail: lxwei@nwipb.cas.cn