

## 二苯乙烯苷对 APP/PS1 双转基因小鼠海马区 病理形态学及脑 BACE1 表达的影响<sup>①</sup>

刘宁, 杨晓颖, 黄健, 黎昀, 赖术, 黄忠仕<sup>②</sup>

(右江民族医学院, 广西 百色 533000 E-mail: 396848307@qq.com)

**摘要:** **目的** 观察二苯乙烯苷(TSG)对 APP/PS1 双转基因小鼠海马区病理形态学变化和脑组织中  $\beta$ -淀粉样前体蛋白裂解酶-1(BACE1)表达的影响, 探讨其作用的可能机制, 为临床应用提供实验依据。 **方法** 50 只 3 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠, 随机分为 TSG 低剂量( $0.033 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )组、TSG 中剂量( $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )组、TSG 高剂量( $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )组、石杉碱甲(阳性对照)组及模型组, 正常对照组为 10 只同龄 C57L/6J 小鼠。各组给予 60 d 相应药物后, 苏木精-伊红(HE)染色法观察海马区病理形态学变化; 用 Western blotting 法检测小鼠脑组织 BACE1 蛋白表达水平。 **结果** 与模型组相比, 各治疗组小鼠海马区形态均有不同程度的改善; BACE1 表达水平均显著降低( $P < 0.01$ )。TSG 各剂量组 BACE1 的表达量与石杉碱甲组相比, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。 **结论** TSG 治疗阿尔茨海默病的机制可能与降低 BACE1 表达水平, 减少  $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )产生, 改善神经元损伤等有关。

**关键词:** 二苯乙烯苷; 阿尔茨海默病;  $\beta$ -淀粉样前体蛋白裂解酶 1

**中图分类号:** R749 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2016)06-0559-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.06.002

### Effects of TSG on hippocampus pathomorphology and expressions of BACE1 in brain tissues of APP/PS1 double transgenic mice

Liu Ning, Yang Xiaoying, Huang Jian, Li Yun, Lai Shu, Huang Zhongshi

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China

E-mail: 396848307@qq.com)

**Abstract:** **Objective** To observe the effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O- $\beta$ -D-glycoside (TSG) on the pathomorphological changes of hippocampus and on the expressions of  $\beta$ -amyloid precursor protein cleavage enzyme1 (BACE1) in APP/PS1 double transgenic mice, so as to study its possible mechanisms and to provide experimental evidences for treating AD by TSG. **Methods** Fifty three-month-old APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into a low-dose TSG ( $0.033 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) group, a mid-dose TSG ( $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) group, a high-dose TSG ( $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) group, a huperzine A (positive control) group and an APP/PS1 model group. The normal control group had 10 C57L/6J mice with the same age as APP/PS1 double transgenic mice. HE staining was used to observe the pathomorphological changes of hippocampus and the expressions of BACE1 protein in mice brain tissues were assayed by using Western blotting after all mice were given corresponding medicine for sixty days. **Results** By comparing with model group, the hippocampal configurations in every treated group were recovered at different degree, the expressions of BACE1 were markedly down-regulated ( $P < 0.01$ ). Compared with huperzine A group, the level of BACE1 expression had no significant difference ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The mechanism of TSG in treatment of AD might be related with

① 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260495)

② 通信作者, E-mail: hzs1004@163.com

down-regulating the expressions of BACE1, decreasing the genesis of  $\beta$ -amyloid protein and relieving the neurons damages.

**Key words:** 2,3,5,4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O- $\beta$ -D-glycoside; Alzheimer's disease;  $\beta$ -amyloid precursor protein cleavage enzyme 1

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性发展的神经退行性疾病,又名老年痴呆症,目前已成为威胁老年人健康的四大疾病之一<sup>[1]</sup>,使该病的治疗受到了广泛关注。二苯乙烯苷(2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷,2,3,5,4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O- $\beta$ -D-glycoside, TSG)具有保护神经、提高AD模型动物学习记忆能力、防治AD的作用<sup>[2]</sup>。APP/PS1双转基因小鼠是目前国际公认的AD动物模型,目前被广泛用于AD研究<sup>[3-4]</sup>。 $\beta$ -淀粉样前体蛋白裂解酶1( $\beta$ -amyloid precursor protein cleavage enzyme 1, BACE1)在AD发病中起着至关重要的作用<sup>[5]</sup>。本实验以TSG干预APP/PS1双转基因小鼠后观察其对双转基因小鼠海马区神经细胞形态学变化和脑组织中BACE1表达的影响,探讨其作用的可能机制,为临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

1.1 动物 APP/PS1双转基因小鼠和C5B7L/6J小鼠,均为雄性,体重26~30g,SPF级,购自北京华康康生物科技股份有限公司[许可证号:SCXK(京)2014-0004]。

1.2 药品和试剂 TSG购自成都克洛玛生物科技有限公司(批号:14112);石杉碱甲购自河南太龙药业(批号:H10940156);RIPA裂解液、聚丙烯酰胺凝胶配制试剂盒、BeyoECL Star、显影定影试剂盒、一抗二抗去除液(强碱性),均购自碧云天生物技术有限公司;Ladder(购自Thermo Scientific, #26616);Millipore的PVDF膜;BACE1抗体(Sigma, SAB2108415); $\beta$ -Actin抗体及HRP标记的二抗(购自Cell Signaling Technology)。

1.3 动物分组与给药 50只3月龄雄性APP/PS1双转基因小鼠,随机分为TSG低剂量组( $0.033\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )、TSG中剂量组( $0.1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )、TSG高剂量组( $0.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ )、石杉碱甲(阳性对照)组及模型组,每组10只。正常对照组为10只雄性3月龄C5B7L/6J小鼠。石杉碱甲( $0.15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ );模型组和正常对照组:生理盐水, $30\text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ;以上各组每日灌胃1次,连续给药60d。

1.4 标本采集 治疗结束后,冰上迅速取出小鼠脑组织,每组随机抽取4个脑组织放入10%甲醛中固定,

剩余的脑组织从液氮罐中转移到 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,用于后续的Western blotting测定。固定1周后的脑组织进行石蜡包埋,海马区冠状切片,厚度 $4\text{ }\mu\text{m}$ ,切片于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烤箱烘烤2h,常温保存备用。

1.5 苏木精-伊红(HE)染色 切片依次经二甲苯I、II脱蜡各5min; $100\%$ 、 $95\%$ 、 $70\%$ 酒精水化各5min;苏木精染色5min,水洗; $1\%$ 盐酸酒精分化15s,水洗返蓝;伊红染色1min,水洗;依次梯度酒精脱水、二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜下观察海马区形态。

1.6 Western blotting测定 从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出小鼠脑组织,冰上剪碎,按比例加入RIPA裂解液,匀浆至充分裂解;离心取上清液,BCA法测定总蛋白浓度;取 $15\text{ }\mu\text{g}$ 样品加入上样缓冲液煮沸变性后,进行 $10\%$ SDS-PAGE凝胶电泳,湿式电印迹法转至PVDF膜,双蒸水洗膜,Western封闭液封闭1h后加入BACE1抗体(Western一抗稀释液 $1:1\ 000$ 稀释) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜;TBST洗膜 $3\times 12\text{ min}$ /次,加入二抗(Western二抗稀释液 $1:1\ 000$ 稀释)室温摇床孵育 $1\sim 2\text{ h}$ ;TBST洗膜 $3\times 20\text{ min}$ /次,化学发光法显影定影。BACE1条带曝光后的膜用一、二抗去除液洗脱已结合的抗体,再进行封闭、孵育 $\beta$ -Actin( $1:1\ 000$ 稀释)和二抗、化学发光检测,定影。用ImageJ软件分析蛋白条带的光密度值。目的蛋白条带与 $\beta$ -Actin条带灰度值的比值表示其相对含量,再将各实验组的值除以正常对照组后得出的结果作为统计数据。

1.7 统计学方法 用SPSS 17.0软件分析数据,数据用( $\bar{x}\pm s$ )表示;计量资料符合正态分布及方差齐性,用单因素方差分析(one-way ANOVA),多组间均数的两两比较采用SNK检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 TSG对小鼠海马区病理形态学变化的影响 从苏木精-伊红(HE)染色结果见正常对照组小鼠的海马区神经细胞数量多,细胞形态完整,排列整齐;模型组小鼠海马区神经细胞排列紊乱,数量减少明显,并可见明显的空泡样变性及胞核固缩。与模型组相比,各治疗组小鼠海马区形态均有不同程度的改善。见图1。

2.2 TSG对小鼠脑组织BACE1表达的影响 与正常对照组比较,模型组小鼠脑组织BACE1的表达量

显著增多 ( $P < 0.01$ ); 与模型组相比, 石杉碱甲组及 TSG 低、中、高各剂量组 BACE1 的表达量均显著减少 ( $P < 0.01$ ); TSG 各剂量组 BACE1 的表达量和石杉碱甲组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1、图 2。

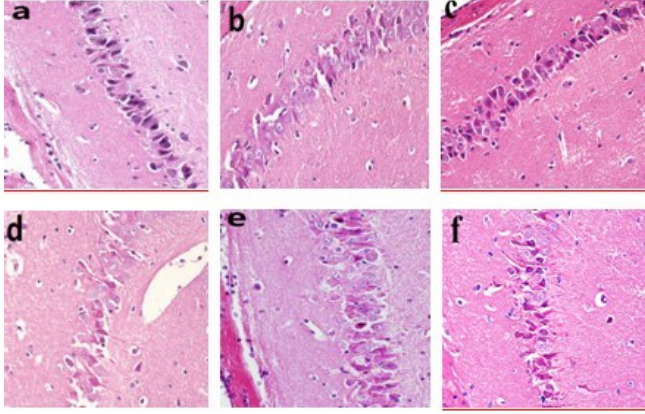


图 1 海马区 HE 染色结果 ( $\times 400$ )

注: a 为正常对照组; b 为模型组; c 为石杉碱甲组; d 为 TSG 低剂量组; e 为 TSG 中剂量组; f 为 TSG 高剂量组

表 1 TSG 对 APP/PS1 转基因小鼠脑组织 BACE1 表达的影响

组别	动物数 (n)	BACE1 蛋白 (相对比值)
正常对照组	6	1.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
模型组	6	1.64 ± 0.26
石杉碱甲组	6	1.08 ± 0.16 <sup>a</sup>
TSG 低剂量组	6	1.04 ± 0.10 <sup>a</sup>
TSG 中剂量组	6	1.03 ± 0.13 <sup>a</sup>
TSG 高剂量组	6	1.03 ± 0.11 <sup>a</sup>

注: 与模型组比较: a:  $P < 0.01$

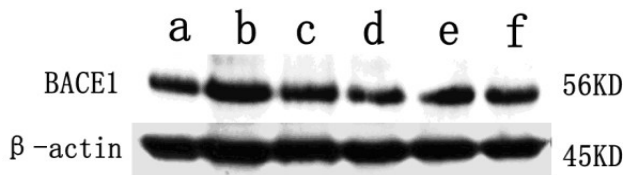


图 2 TSG 对 APP/PS1 转基因小鼠脑组织 BACE1 表达的影响

注: a 为正常对照组; b 为模型组; c 为石杉碱甲组; d 为 TSG 低剂量组; e 为 TSG 中剂量组; f 为 TSG 高剂量组

### 3 讨论

TSG 是何首乌的主要水溶性成分, 目前, 二苯乙烯苷 (泰思胶囊) 已进入治疗 AD 的临床试验阶段<sup>[6]</sup>。TSG 可以促进神经元树突的生长和保护海马神经元

的完整性, 清除和抑制老年斑的生成, 促进 AD 模型鼠脑神经元损伤的恢复<sup>[7]</sup>。APP/PS1 双转基因小鼠, 属于早期斑块模型, 脑内斑块形成较早, 2~3 个月时海马和大脑皮质发生胆碱能轴突肿胀, 5~6 个月时肿胀的轴突形成成簇的玫瑰花结<sup>[8]</sup>。本实验病理形态学结果显示, TSG 在一定程度上改善了 APP/PS1 转基因小鼠海马区神经元的损伤, 和前期实验结果一致。

脑内  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 斑块沉积是 AD 主要的病理特征<sup>[9]</sup>, 聚集的  $A\beta$  有神经毒性, 引发一系列病理反应, 最终导致神经元损伤、凋亡。 $A\beta$  是由  $\beta$  淀粉样前体蛋白 (APP) 相继被  $\beta$ -分泌酶、 $\gamma$ -分泌酶水解产生的<sup>[10]</sup>。APP 在体内分为两种代谢途径: 不产生  $A\beta$  的  $\alpha$  途径和产生  $A\beta$  的  $\beta$  途径 (淀粉样酶切途径),  $\beta$ -分泌酶起始了 APP 的淀粉样酶切途径, 是  $A\beta$  生成的限速酶<sup>[5]</sup>。目前已知的  $\beta$ -分泌酶有多种, 其中 BACE1 是  $A\beta$  产生的关键限速因子<sup>[11]</sup>。BACE1 属于胃蛋白酶家族 I 型膜结合天冬氨酸蛋白酶, 在人体的各类组织中都能表达, 但在脑内和胰腺中的表达量最高<sup>[12]</sup>, 且 BACE1 的启动子在神经元中的活性高于非神经细胞<sup>[13]</sup>。目前 BACE1 的高表达和活性增强已经成为诊断 AD 的一个重要生化指标<sup>[14]</sup>。当 BACE1 过度表达时, 细胞内的  $\beta$ -分泌酶活性增强,  $A\beta$  分泌增多, 促进老年斑的形成, 加速神经元的损伤。有研究表明, 在 AD 模型中, 降低 BACE1 蛋白的表达或敲除 BACE1 基因均可显著减少  $A\beta$  的沉积<sup>[15]</sup>。本实验 Western blotting 测定结果显示, 给药 2 个月后, TSG 各剂量组的疗效和阳性对照药 (石杉碱甲) 相当, 均显著降低了 APP/PS1 小鼠脑组织中 BACE1 表达水平, 这与本实验的病理形态学结果吻合, 说明 TSG 防治 AD 的作用机制, 可能与降低 BACE1 表达从而抑制 APP 的淀粉样酶切途径, 减少  $A\beta$  产生, 改善神经元损伤有关; 也可能是与在抑制 BACE1 蛋白表达的基础上继而改善神经元的损伤有关。

总之, 本实验为 TSG 的临床应用提供了实验依据, 但鉴于中药的治疗作用有多靶点、多环节等特点, TSG 防治 AD 的机制除了与降低 BACE1 水平、减少  $A\beta$  产生、改善神经元损伤有关外, 可能还存在其它机制, 有待于进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 龙志敏, 赵蕾, 高宝兵, 等. 丙戊酸钠对 APP/PS1 双重转基因 AD 模型小鼠脑内老年斑和神经元的影响[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2011, 37(8): 477-481.
- [2] 黄世琼, 张毅, 杨军宣. 何首乌主要成分二苯乙烯苷的研究进展[J]. 海峡药学, 2016, 28(6): 37-39.

- [3] Yao ZG, Zhang L, Liang L, et al. The effect of PN-1, a Traditional Chinese Prescription, on the Learning and Memory in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013; 518421.
- [4] Neumeister KL, Riepe MW. Bupropion and Citalopram in the APP23 Mouse Model of Alzheimer's Disease: A Study in a Dry-Land Maze [J]. Int J Alzheimers Dis, 2012, 2012; 673584.
- [5] 袁裕钧, 胡细枚, 宋婷, 等.  $\beta$ -分泌酶与阿尔茨海默病[J]. 神经疾病与精神卫生, 2016, 16(2): 217-220.
- [6] 李琳, 王晓良, 彭英. 抗阿尔茨海默病天然产物及其药理学研究进展[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(2): 149-155.
- [7] 杨晓颖, 刘宁, 黄岑汉, 等. 二苯乙烯苷对 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病小鼠脑内  $\beta$  淀粉样前体蛋白及分选蛋白相关受体 1 mRNA 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(3): 536-539.
- [8] Lee JE, Han PL. An update of animal models of Alzheimer disease with a reevaluation of plaque depositions [J]. Exp Neurol, 2013, 22(2): 84-95.
- [9] 戎志斌, 吴正治. 阿尔茨海默病的病因病理和治疗的研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2012, 34(5): 208-212.
- [10] Vagnoni A, Perkinton MS, Gray EH, et al. Calsyntenin-1 mediates axonal transport of the amyloid precursor protein and regulates A $\beta$  production [J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(13): 2845-2854.
- [11] Vassar R, Kandalepas PC. The  $\beta$ -secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. Alzheimers Res Ther, 2011, 3(3): 20.
- [12] 王健辉, 程肖蕊, 周文霞, 等.  $\beta$  分泌酶生物学特性的研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2014, 41(4): 400-406, 423.
- [13] Kandalepas PC, Vassar R. Identification and biology of  $\beta$ -secretase [J]. J Neurochem, 2012, 120 (Suppl) 1: 55-61.
- [14] Kandalepas PC, Vassar R. The normal and pathologic roles of the Alzheimer's  $\beta$ -secretase, BACE1 [J]. Curr Alzheimer Res, 2014, 11(5): 441-449.
- [15] Natunen T, Takalo M, Kemppainen S, et al. Relationship between ubiquitin-1 and BACE1 in human Alzheimer's disease and APdE9 transgenic mouse brain and cell-based models [J]. Neurobiol Dis, 2016, 85: 187-205.

收稿日期: 2016-10-21; 修回日期: 2016-11-21

## 《右江民族医学院学报》采编系统启用通告

为适应信息化时代期刊发展的需要, 缩短审稿流程, 加快稿件处理速度, 方便作者投稿和专家审稿, 本刊自 2015 年 10 月 1 日起至 2015 年 10 月 31 日期间试运行期刊采编系统, 2015 年 11 月 1 日起正式投入使用。

登录本刊网站 <http://yjmzyxy.cnjournals.com/> 即可进入采编系统平台进行投稿或审稿。该采编系统平台由作者在线投稿、专家在线审稿、主编在线办公和编辑在线办公四部分组成。作者进行在线投稿并可查询稿件的处理进度, 审稿专家从专家登录口进入审稿中心可进行稿件审阅。试运行期间作者可使用原学报投稿邮箱 [yyxb1979@126.com](mailto:yyxb1979@126.com), 自 2015 年 11 月 1 日起正式启用期刊采编系统后, 学报投稿邮箱停止使用投稿功能。敬请广大读者、投稿作者、审稿专家使用本系统, 并向编辑部反馈意见, 以不断对系统进行改进。如您在操作上遇到任何问题, 请与编辑部联系: 0776-2843414。感谢您对本刊的关注与支持! 欢迎踊跃投稿!



扫一扫