

本文引文格式:程厚之,张丽凤,梁祚仁,等.五味子乙素对铝中毒大鼠神经细胞凋亡及学习记忆能力的影响[J].右江民族医学院学报,2021,43(5):588-591.

【论著与临床报道】

五味子乙素对铝中毒大鼠神经细胞凋亡及学习记忆能力的影响

程厚之,张丽凤,梁祚仁,廖素婵,李艳丽,莫颂轶,黄彦峰,余双全,黄俊杰
(右江民族医学院基础医学院,广西 百色 533000)

摘要:目的 研究五味子乙素对慢性铝中毒大鼠神经细胞凋亡及学习记忆能力的影响。方法 用 $AlCl_3$ 连续喂养大鼠建立慢性铝中毒大鼠模型,用五味子乙素对铝中毒大鼠进行灌胃治疗 30 d 后, Morris 水迷宫检测大鼠的学习记忆能力,记录空间探索实验潜伏期和平台穿越次数,原位细胞凋亡检测法(TUNEL)检测大鼠大脑皮层和海马神经细胞凋亡。结果 五味子乙素高剂量组大鼠空间探索实验潜伏期比模型组的缩短,平台穿越次数比模型组的增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。铝中毒模型组大鼠大脑皮层和海马神经细胞凋亡率比空白对照组均明显增多($P < 0.01$);五味子乙素中、高剂量组大鼠大脑皮层和海马神经细胞凋亡率比模型组均明显减少($P < 0.01$)。结论 五味子乙素提高铝中毒大鼠学习记忆能力与降低大脑皮层和海马神经细胞凋亡率有关。

关键词:五味子乙素;慢性铝中毒;神经细胞凋亡;大脑皮层;海马;学习记忆

中图分类号:R33;R285.5 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2021)05-0588-04
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.05.003

Effect of Sch B on neuronal apoptosis and the learning and memory ability of rats with aluminum intoxication

Cheng Houzhi, Zhang Lifeng, Liang Zuoren, Liao Suchan, Li Yanli,
Mo Songyi, Huang Yanfeng, Yu Shuangquan, Huang Junjie

(School of Basic Medicine, Youjiang Medical University for
Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of Schisandrin B (Sch B) on neuronal apoptosis and the learning and memory ability of rats with chronic aluminum intoxication. **Methods** Rats were continuously fed with $AlCl_3$ to establish the rat models of chronic aluminum intoxication. After 30 days of intragastric treatment with Sch B, the rats were detected by Morris water maze for their learning and memory ability. The incubation period of spacial navigation testing and the times of crossing the testing platform were recorded. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL) was used to detect the neuronal apoptosis in the cerebral cortex and hippocampus of rats. **Results** The incubation period of spacial navigation testing in the high-dose Sch B group was shorter than that of the model group, while the number of times of platform crossing were more than that of the model group, indicating significant differences ($P < 0.05$). The model group had higher apoptosis rate of neurons in the cerebral cortex and hippocampus of rats than the blank control group ($P < 0.01$). The medium-dose Sch B group and the high-dose Sch B group both had significantly

基金项目:广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA281142);右江民族医学院高层次人才科研课题(yy2020gcky036)

第一作者简介:程厚之(1996-),男,在读硕士研究生,研究方向:神经系统病理生理,E-mail:17211604174@qq.com

通讯作者简介:黄俊杰(1970-),男,医学硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向:神经系统病理生理、学习与记忆的机制,E-mail:1559199466@qq.com

lower apoptosis rate of neurons in the cerebral cortex and hippocampus of rats than the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** The effect of Sch B on the learning and memory ability of rats with aluminum intoxication was related to the decrease in neuronal apoptosis rate of cerebral cortex and hippocampus.

Key words: Schisandrin B; chronic aluminum intoxication; neuronal apoptosis; cerebral cortex; hippocampus; learning and memory

在日常生活中铝可以通过水、食物等途径进入体内在肝、脑等组织中蓄积,蓄积在机体中的铝可通过多种途径来损害认知功能^[1-2]。随着日常生活中铝制品的广泛使用、食品中铝添加剂的应用以及长期职业接触铝等,高铝暴露给人体健康带来的危害呈增多的趋势,寻找有效药物预防和治疗铝中毒具有重要的意义。五味子乙素(Schisandrin B, Sch B)具有抗氧化、抗凋亡、抗衰老等作用^[3-4]。本研究旨通过用 Sch B 干预治疗慢性铝中毒大鼠,检测大鼠学习记忆水平和海马神经细胞凋亡率,探讨 Sch B 对慢性铝中毒大鼠神经细胞凋亡及学习记忆能力的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 60 只 Wistar 大鼠,体重 180~200 g,雌雄各半,购买于长沙天勤生物技术有限公司[动物许可证号:SCXK(湘)2019-0014]。

1.2 主要试剂与药品 细胞凋亡试剂盒(南京建成公司);三氯化铝(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);五味子乙素(维克奇生物科技有限公司);吡拉西坦(广东华南药业集团有限公司)。

1.3 动物分组与给药 按参考文献^[5]方法建立慢性铝中毒大鼠模型,用 $AlCl_3$ 浓度为 16 g/L 的水溶液每天按 120 mg/kg 剂量拌入饲料中喂养大鼠 3 个月。大鼠随机分为 6 个组,每组 10 只大鼠,即 Sch B 低剂量组、Sch B 中剂量组、Sch B 高剂量组及铝中毒模型组、阳性对照组和空白对照组。Sch B 低、中、高剂量组用 Sch B 进行灌胃,各组剂量分别为 10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg;阳性对照组用吡拉西坦进行灌胃,剂量为 400 mg/kg;各组每天灌胃 1 次,共 30 d。

1.4 Morris 水迷宫检测大鼠的学习记忆能力 定位航行实验结束 24 h 后,撤除定位航行训练实验时的水下平台,开始进行空间探索实验,以检测大鼠对平台空间位置的记忆能力。任选一个入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录大鼠在 60 s 内第一次跨越平台时间以及跨越平台次数,第一次跨越平台时间即是潜伏期。

1.5 原位细胞凋亡检测法(TUNEL)检测大脑皮层和海马神经细胞凋亡 10%水合氯醛腹腔麻醉后,分别迅速取大鼠大脑皮层和海马,4%多聚甲醛中继续固定 24 h。取各组已常规制备好的组织,经石蜡包埋、切片,二甲苯脱蜡及乙醇脱水,蛋白酶 K 消化、PBS 漂洗,TUNEL 反应按试剂盒常规操作,经破膜、室温平

衡、取 TUNEL 试剂盒内适量 TDT 酶、dUTP、buffer 按一定比例混合后覆盖组织、DAPI 复染细胞核、封片、镜检。在显微镜下观察,DAPI 染出来的细胞核在紫外线的激发下为蓝色,试剂盒为 FITC 荧光素标记,阳性凋亡细胞核为绿色,每张切片随机选取 5 个不重复视野观察计数,各组切片选取部位尽量一致。细胞凋亡率=(凋亡细胞/总细胞) $\times 100\%$ 。

1.6 统计学方法 SPSS 22.0 统计软件进行数据统计,实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,每组数据用 K-S 正态检验,呈正态分布,则用 One-Way ANOVA 进行多组间比较,若方差齐,采用 LSD 法进行配对多重比较,若方差不齐,采用 Tamhane 检验;呈偏态分布,则用 Kruskal-Wallis One-way ANOVA(K samples)检验。检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 Morris 水迷宫测试大鼠空间探索实验潜伏期和平台穿越次数 与空白组相比,模型组大鼠空间探索实验潜伏期明显变长,平台穿越次数减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,阳性对照组和 Sch B 中、高剂量组空间探索实验潜伏期均缩短,平台穿越次数增多,高剂量组差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 Morris 水迷宫空间探索实验潜伏期和平台穿越次数

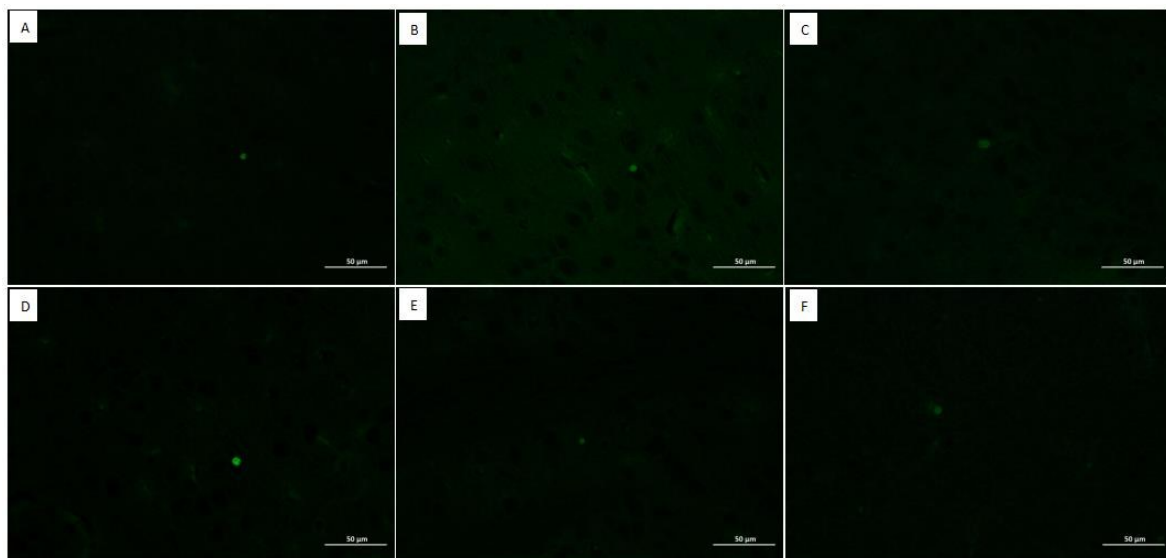
组别	n	潜伏期/s	平台穿越次数/次
空白对照组	10	25.80 \pm 14.50	3.80 \pm 2.78
铝中毒模型组	10	47.60 \pm 16.10 ^a	1.10 \pm 0.88 ^a
阳性对照组	10	27.30 \pm 13.06 ^b	3.00 \pm 1.70 ^b
Sch B 低剂量组	10	42.20 \pm 14.96	1.20 \pm 1.14
Sch B 中剂量组	10	36.00 \pm 18.03	1.90 \pm 1.37
Sch B 高剂量组	10	28.90 \pm 18.10 ^c	2.70 \pm 1.83 ^c

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;②与空白对照组比较,a: $P < 0.05$;与模型组比较,b: $P < 0.01$,c: $P < 0.05$ 。

2.2 TUNEL 检测神经细胞凋亡水平 显微镜下观察神经细胞凋亡结果,以细胞核出现荧光绿色染色为 TUNEL 阳性细胞。神经细胞凋亡率统计结果显示:空白对照组、中毒模型组、阳性对照组和 Sch B 低、中、高剂量组大脑皮层神经细胞凋亡率分别为(2.90 \pm 1.67)%、(8.03 \pm 2.34)%、(3.37 \pm 1.52)%和(5.20 \pm

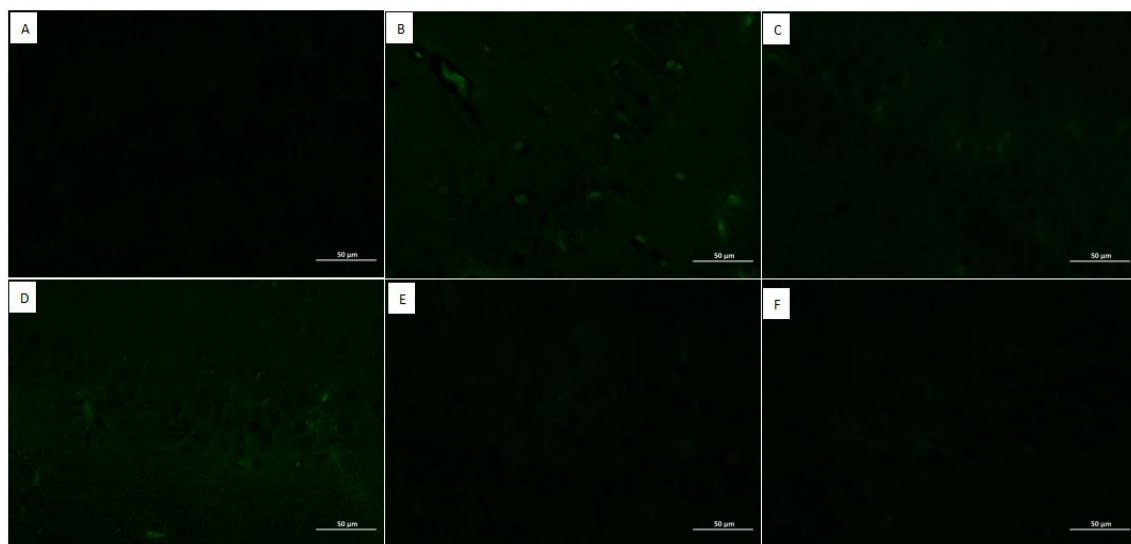
1.30)%、(3.94±1.33)%、(3.76±1.53)%;海马神经细胞凋亡率分别为(2.54±0.42)%、(18.01±3.19)%、(3.92±0.92)%和(10.52±2.18)%、(5.84±1.91)%、(4.23±1.84)%。其中铝中毒模型组大脑

皮层和海马神经细胞凋亡率均较空白对照组明显增多($P < 0.01$);Sch B 中、高剂量组大脑皮层和海马神经细胞凋亡率比铝中毒模型组明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1、图 2。



注:A:空白对照组;B:铝中毒模型组;C:阳性对照组;D:Sch B 低剂量组;
E:Sch B 中剂量组;F:Sch B 高剂量组。

图 1 TUNEL 法检测大鼠皮质神经细胞凋亡(TUNEL 荧光染色,× 400)



注:A:空白对照组;B:铝中毒模型组;C:阳性对照组;D:Sch B 低剂量组;
E:Sch B 中剂量组;F:Sch B 高剂量组。

图 2 TUNEL 法检测大鼠海马神经细胞凋亡(TUNEL 荧光染色,× 400)

3 讨论

随着日常生活中铝制品的广泛使用、食品中铝添加剂的应用以及长期职业接触铝等,长期铝暴露导致铝在体内蓄积并产生毒性,可导致人和动物学习和记

忆能力受损,但其发病机制尚未完全明确。铝引起学习记忆障碍的机制可能涉及多个方面,一是铝中毒时大脑皮层和海马神经细胞有不同程度的凋亡,神经细胞凋亡是铝损伤大脑细胞的重要方式,是导致大鼠学

习记忆能力障碍的重要因素之一。研究表明^[6-7],铝通过多途径影响诱导神经细胞凋亡,如铝通过线粒体膜对细胞凋亡的影响;铝通过脂质过氧化对细胞凋亡的影响;铝通过 Bcl-2 家族对细胞凋亡的影响;铝通过 Caspase 家族对细胞凋亡的影响等。二是铝可引起神经细胞死亡,产生神经毒性并最终导致机体学习及认知功能障碍。铝神经毒性作用与神经递质及有关酶的代谢有关,铝对兴奋性氨基酸递质毒性的诱导作用,使神经元发生退行性病变和脑细胞受损,铝可通过增加乙酰胆碱酯酶、抑制胆碱乙酰基转移酶活性,使脑内乙酰胆碱含量减少,一旦脑内铝过量,逐渐损害学习记忆功能^[8];铝神经毒性与 Wnt 信号通路、Notch 信号通路及丝裂原活化蛋白激酶途径等信号转导通路有关^[9]。Sch B 是中药五味子中有效成分,现代研究表明,五味子中含有丰富的木脂素,而 Sch B 正是五味子木脂素的主要活性成分之一,其具有抗衰老、抗氧化、抗凋亡、改善学习记忆等作用^[10-11]。

本实验中,通过建立慢性铝中毒大鼠模型,观察到铝中毒的大鼠学习和记忆能力下降,大脑皮层和海马中神经细胞凋亡增加,提示铝中毒导致学习和记忆能力的损害与神经细胞凋亡增加,这与以往的研究结果一致^[12]。本实验发现,在给予 Sch B 治疗 30 d 后,大鼠大脑皮层和海马神经细胞凋亡率明显减少,学习和记忆能力显著提高,这表明 Sch B 可以显著降低神经细胞凋亡,减轻铝中毒大鼠皮质、海马部位损伤,有效改善铝中毒大鼠的学习和记忆能力。其作用机制是 Sch B 能够有效增强机体的抗氧化能力,减轻氧化损伤程度,通过增强抗氧化剂活性抑制细胞凋亡,进而对受损神经细胞起到保护作用^[13-14];Sch B 还可能通过降低大鼠脑组织 P53 和 Bax 基因的表达,以及降低细胞质中 Cyto C 含量和 Caspase-9、Caspase-3 基因的表达,阻断细胞凋亡通路,从而发挥抑制神经细胞线粒体凋亡,保护受损神经细胞,改善大鼠的记忆能力^[15]。其具体的分子机制有待于进一步探讨和研究。

参考文献:

[1] Madhavan N, Nitesh K, Grandhi VR, et al. Effect of insulin on spatial memory in aluminum chloride-induced dementia in rats[J]. *NeuroReport*, 2017, 28 (9): 540-544.

[2] 乔乔,夏佳蕊,张立丰. 铝神经毒性机制研究进展[J]. *解剖学杂志*, 2019, 42(5): 505-508.

[3] Hu XL, Guo C, Hou JQ, et al. Stereoisomers of Schisandrin B Are Potent ATP Competitive GSK-3 β Inhibitors with Neuroprotective Effects against Alzheimer's Disease: Stereochemistry and Biological Activity [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(2): 996-1007.

[4] Cai NN, Wang ZZ, Zhu XC, et al. Schisandrin A and B enhance the dentate gyrus neurogenesis in mouse hippocampus[J]. *J Chem Neuroanat*, 2020, 105: 101751.

[5] 李秋营,杨艳旭,张太强,等. 实验性大鼠铝中毒模型建立[J]. *山西医药杂志*, 2002(2): 113-115.

[6] 刘佳喜,张立丰. 铝诱导神经细胞程序性死亡的研究进展[J]. *中华神经医学杂志*, 2020, 19(6): 627-631.

[7] Wang H, Shao B, Yu H, et al. Neuroprotective role of hyperforin on aluminum maltolate-induced oxidative damage and apoptosis in PC12 cells and SH-SY5Y cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2019(299): 15-26.

[8] 赵鑫荣,刘佳琪,洪帆,等. 铝神经毒性对学习记忆功能的影响[J]. *解剖学杂志*, 2018, 41(5): 590-592.

[9] 吴丽媛,尹丹枫,牛丕业. 信号转导通路受损与铝神经毒性研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(21): 3621-3623.

[10] 白文宇,王厚恩,王冰瑶,等. 五味子化学成分及其药理作用研究进展[J]. *中成药*, 2019, 41(9): 2177-2183.

[11] 陈灵,周汉明. 五味子乙素对心肌细胞的氧化应激损伤的保护作用及其机制[J]. *武汉大学学报(理学版)*, 2019, 65(4): 357-362.

[12] 樊瑾,段春梅,牛侨,等. 不同种类的铝化合物对神经母细胞瘤细胞毒性作用的研究[J]. *毒理学杂志*, 2017, 31(1): 6-9, 13.

[13] 杨擎,李娜,隋欣,等. 五味子乙素靶向调节 A β 及下游 NF- κ B/TNF- α 信号通路保护受损神经元的分子机制[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(5): 2064-2069.

[14] Wu Y, Li ZC, Yao LQ, et al. Schisandrin B alleviates acute oxidative stress via modulation of the Nrf2/Keap1-mediated antioxidant pathway [J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2019, 44(1): 1-6.

[15] 李佳芮,聂文博,张佳悦,等. 五味子乙素对阿尔茨海默病小鼠学习记忆能力及神经细胞凋亡的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(14): 3390-3394.

收稿日期:2021-08-22;修回日期:2021-09-30