

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学习记忆及突触相关蛋白表达影响的研究[J].右江民族医学院学报,2021,43(6):714-718.

【论著与临床报道】

五味子乙素对铝中毒大鼠学习记忆及突触 相关蛋白表达影响的研究

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(Schisandrin B, Sch B)对慢性铝中毒大鼠海马和大脑皮层中突触相关蛋白表达及学习记忆功能的影响,并探讨其分子机制。**方法** 用 $AlCl_3$ 连续喂养大鼠 3 个月建立慢性铝中毒动物模型,动物随机分为 5 个组,即模型组、阳性对照组、五味子乙素低剂量组、中剂量组、高剂量组,阳性对照组用吡拉西坦按 40 mg/kg 剂量灌胃给药,五味子乙素低剂量组、中剂量组、高剂量组,分别用五味子乙素按 10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg 剂量进行灌胃,各组每天灌胃 1 次,连续灌胃 30 d;另设空白对照组,每组各 10 只。用 Morris 水迷宫定位航行实验记录大鼠找到平台的游泳路径轨迹,免疫组化和 Western Blot 分别检测突触素(SYN)、突触后致密蛋白 95(PSD-95)在海马组织和大脑皮层中的表达水平。**结果** 模型组大鼠运动轨迹趋向性较差,偏离平台;与模型组比较,五味子乙素各剂量组大鼠运动轨迹更多趋向于目标平台。免疫组化结果显示,铝中毒模型组海马和大脑皮层中 SYN、PSD-95 表达水平均较空白组明显降低($P < 0.01$);而高剂量组 SYN、PSD-95 在海马和大脑皮层中表达水平比模型组的明显增多($P < 0.01$)。Western Blot 结果显示,铝中毒模型组海马组织和大脑皮层中 SYN、PSD-95 蛋白相对表达量均比空白对照组的明显降低($P < 0.01$);Sch B 高剂量组 PSD-95、SYN 蛋白相对表达量比模型组均明显升高($P < 0.05$)。**结论** Sch B 能改善慢性铝中毒大鼠学习记忆能力,可能与通过上调海马组织和大脑皮层中 SYN 和 PSD-95 蛋白表达有关。

关键词:五味子乙素;慢性铝中毒;学习记忆能力;突触相关蛋白;大脑皮层;海马

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2021)06-0714-05
doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.06.003

Effects of Schisandrin B on the learning and memory and the expression of synapse-related proteins in 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 investigate the effects of Schisandrin B (Sch B) on synapse-related protein expression in hippocampus and cerebral cortex as well as the learning and memory function of rats with chronic aluminum intoxication, and to discuss the molecular mechanism. **Methods** Rats were fed with $AlCl_3$ continuously for 3 months to establish the animal model of chronic aluminum intoxication. The rats were randomly di-

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

vided into 5 groups: the model group, the positive control group, the low-, medium- and high-dose Sch B groups. Rats in the positive control group were given piracetam at 40 mg/kg by intragastric administration. Rats in the low-dose, medium-dose and high-dose groups were given Sch B by intragastric administration at 10 mg/kg, 20 mg/kg and 40 mg/kg, respectively. Each group was given medicine intragastrically once a day for 30 days. The blank control group was also established and there were 10 rats in each group. The navigation experiment of Morris water maze was carried out to record the swimming path trajectory of the rats finding the platform. The expression of synaptophysin (SYN) and postsynaptic dense protein 95 (PSD-95) in hippocampus and cerebral cortex were detected by immunohistochemistry and Western Blot, respectively. **Results** The movement trajectory of rats in the model group tended to be poor and deviated from the platform. Compared with that of the model group, the trajectory of rats in each Sch B group was toward the target platform more closely. Immunohistochemistry results showed that the expressions of SYN and PSD-95 in hippocampus and cerebral cortex of the aluminum intoxication model group were significantly lower than those of the control group ($P < 0.01$), and the expressions of SYN and PSD-95 in hippocampus and cerebral cortex of the high-dose group were significantly higher than those of the model group ($P < 0.01$). The results of Western Blot showed that the relative expressions of SYN and PSD-95 protein in the hippocampus and cerebral cortex of the aluminum intoxication model group were significantly lower than those of the blank control group ($P < 0.01$), and the relative expressions of PSD-95 and SYN protein in the high-dose Sch B group were significantly higher than those of the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Sch B can improve the learning and memory ability of rats with chronic aluminum intoxication, which may be related to the up-regulation of the expressions of SYN and PSD-95 protein in hippocampus and cerebral cortex.

Key words: Schisandrin B; chronic aluminum intoxication; learning and memory; protein associated to synapse; cerebral cortex; hippocampus

铝元素是常见的慢性蓄积性神经毒物,其广泛存在于自然环境中,通过多种途径侵入人体并损伤人体器官,其中最严重的是神经系统,并且铝中毒与多种退行性疾病的发生和发展有关。长期与铝接触,可引起机体学习记忆减退、认知功能状态出现异常等症状。与突触可塑性密切相关的主要蛋白有突触素(synaptophysin, SYN)、突触后致密蛋白-95 (postsynaptic density protein-95, PSD-95),它们表达异常可导致认知功能障碍及学习与记忆的减退^[1-2]。研究表明五味子乙素(Schisandrin B, Sch B)具备保护大脑,改善记忆的功效^[3],但其作用机制尚未完全清楚。本研究旨通过用 Sch B 干预慢性铝中毒大鼠后,探索 Sch B 对铝中毒海马组织和大脑皮层中突触相关蛋白的表达及认知功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 购买于长沙天勤生物技术有限公司 60 只成年清洁级 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 180~200 g,许可证号:SCXK(湘)2019-0014。研究经右江民族医学院实验动物伦理委员会批准(IACUC2020061101)后在学校实验动物中心[SYXK(桂)2017-0004]实施。

1.2 主要试剂与药品 Sch B 购买于维克奇生物科

技公司(批号:wkq20060411);吡拉西坦购买于广东华南药业集团有限公司(批号:国药准字 H44020779);PSD-95 和 Synaptophysin 抗体购买于 Proteintech 中国公司;三氯化铝($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司(批号:L1706080)。

1.3 实验方法

1.3.1 慢性铝中毒模型建立和动物分组 按参考文献^[4-5]造模方法,配制 AlCl_3 浓度为 16 g/L 的水溶液,根据大鼠每天体重及食取饲料量,用 AlCl_3 水溶液每天按 120 mg/kg 剂量拌入饲料中喂养大鼠,每天确保染铝饲料喂完后再进行普通饲料喂养,保证铝的摄入,连续染铝饲料喂养 3 个月,建立慢性铝中毒动物模型。将建模成功的大鼠随机分为 5 个组,即铝中毒模型组($n=10$ 只)、阳性对照组($n=10$ 只)、Sch B 低剂量组($n=10$ 只)、Sch B 中剂量组($n=10$ 只)、Sch B 高剂量组($n=10$ 只)。阳性对照组用吡拉西坦按 40 mg/kg 剂量灌胃给药, Sch B 低剂量组、中剂量组、高剂量组用 Sch B 分别按 10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg 的剂量进行灌胃,吡拉西坦和 Sch B 均每天给药 1 次,连续给药 30 d;另 10 只大鼠作为空白对照组。

1.3.2 Morris 水迷宫记录描绘动物找到平台的游泳路径轨迹^[5] 对大鼠进行定位航行实验,在各象限内

将大鼠面向池壁放入水中,大鼠找到平台后继续进行下一个象限训练,共训练4d,电脑采集、记录描绘大鼠找到平台的游泳路径轨迹。

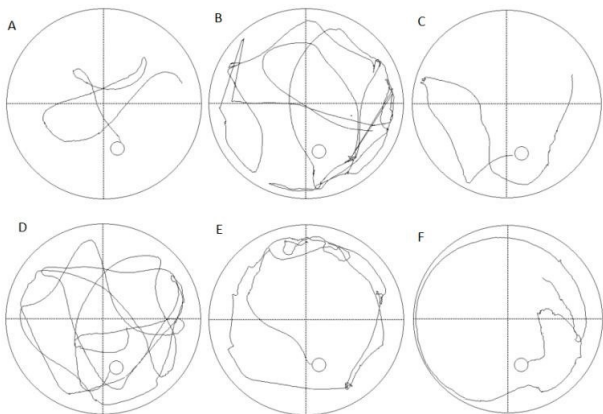
1.3.3 免疫组化检测海马组织及大脑皮层中 SYN、PSD-95 表达 分别取海马组织 and 大脑皮层,经过固定、脱水及孵育一抗、生物素标记二抗,DAB显色后在显微镜下观察 SYN 和 PSD-95 阳性细胞表达。采用 Image J 软件对阳性细胞进行图像分析,测定其表达的平均光密度值(OD值)。

1.3.4 Western Blot 检测 SYN、PSD-95 在海马组织及大脑皮层的表达水平 分别提取海马组织、大脑皮层中的蛋白,用 10% SDS-PAGE 分离蛋白质,转膜,分别加一抗、二抗,ECL 发光溶液进行曝光成像,采用 Image J 软件对蛋白带进行分析,计算 SYN、PSD-95 蛋白相对表达量。

1.4 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,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's T2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

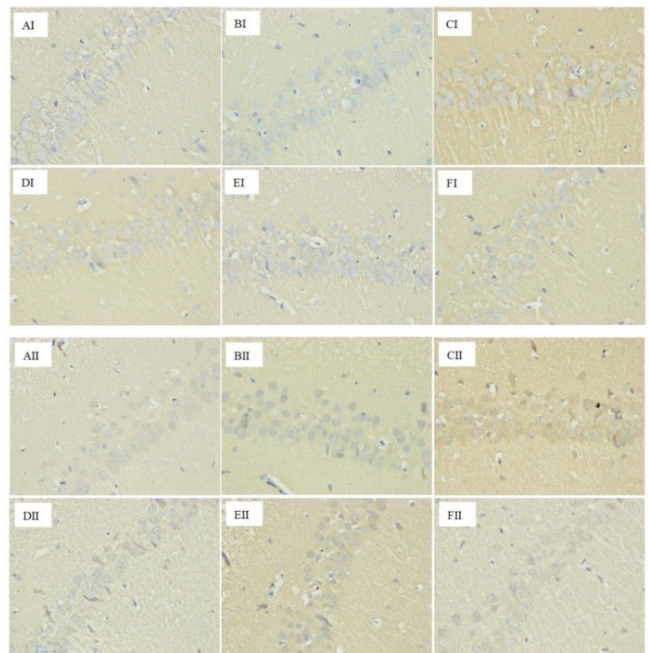
2.1 Morris 水迷宫定位航行实验记录大鼠找到平台的游泳路径轨迹 从各组大鼠定位航行实验游泳路径轨迹图看出,铝中毒模型组大鼠运动轨迹趋向性较差,在目标象限运动轨迹也明显减少,偏离平台,找到平台的时间明显增长。与铝中毒模型组比较,各 Sch B 实验组运动轨迹更多趋向于目标平台,在目标象限运动轨迹明显增多,找到平台的时间明显缩短(见图 1)。



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。

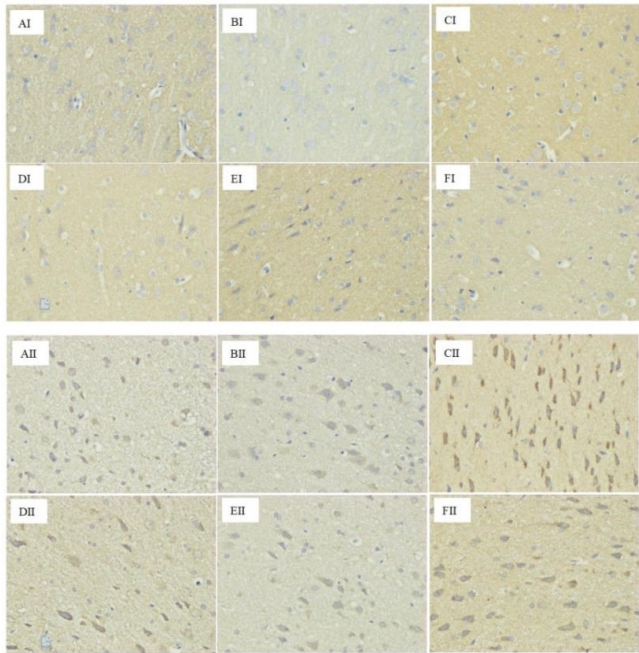
图 1 Morris 水迷宫记录大鼠找到平台的游泳路径轨迹

2.2 大鼠海马组织和大脑皮层 SYN、PSD-95 蛋白结果 大鼠海马 CA1 和大脑皮层区可见 SYN、PSD-95 呈棕黄色的阳性细胞;与空白对照组相比,铝中毒模型组 SYN、PSD-95 阳性细胞表达较少;Sch B 低、中、高剂量实验组阳性细胞表达比模型组的相对较多(见图 2、图 3)。空白对照组、铝中毒模型组、阳性对照组和 Sch B 低、中、高剂量实验组海马组织中 SYN 表达水平(光密度值,OD 值)分别为 15.33 ± 1.40 , 9.56 ± 1.28 , 13.26 ± 1.71 和 10.42 ± 1.30 , 11.94 ± 1.96 , 13.16 ± 1.09 ; PSD-95 表达水平(OD 值)分别为 17.21 ± 1.20 , 9.39 ± 2.58 , 15.89 ± 1.33 和 9.72 ± 1.76 , 14.35 ± 1.93 , 15.10 ± 2.41 。大脑皮层中 SYN 表达水平(OD 值)分别为 16.79 ± 2.01 , 10.19 ± 0.96 , 16.12 ± 1.70 和 10.76 ± 1.41 , 13.95 ± 2.56 , 15.89 ± 1.56 ; PSD-95 表达水平(OD 值)分别为 21.02 ± 0.97 , 14.26 ± 0.70 , 17.84 ± 0.44 和 15.23 ± 0.74 , 15.76 ± 2.44 , 18.36 ± 0.87 。铝中毒模型组的上述指标均较空白对照组明显降低,阳性对照组的上述指标均较铝中毒模型组明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$);Sch B 中剂量、高剂量实验组海马组织和大脑皮层中的 SYN 表达水平比铝中毒模型组明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);Sch B 高剂量组海马组织和大脑皮层中的 PSD-95 表达水平比铝中毒模型组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。



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;I 为 SYN,II 为 PSD-95。

图 2 大鼠海马 CA1 区 SYN 和 PSD-95 的表达情况($\times 400$)



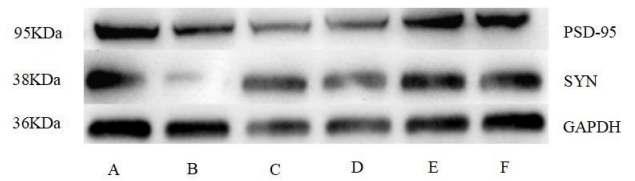
A: 空白对照组, B: 铝中毒模型组, C: 阳性对照组, D: Sch B 低剂量组, E: Sch B 中剂量组, F: Sch B 高剂量组; I 为 SYN, II 为 PSD-95。

图 3 大鼠大脑皮层 SYN 和 PSD-95 的表达情况($\times 400$)

2.3 Western Blot 检测 SYN、PSD-95 在海马组织及大脑皮层的表达水平 空白对照组、铝中毒模型组、阳性对照组和 Sch B 低、中、高剂量实验组海马组织中的 SYN 蛋白相对表达量分别为 1.22 ± 0.23 , 0.12 ± 0.03 , 1.29 ± 0.34 和 0.55 ± 0.20 , 0.63 ± 0.20 , 0.97 ± 0.19 ; PSD-95 蛋白相对表达量分别为 1.03 ± 0.24 , 0.57 ± 0.06 , 0.94 ± 0.21 和 0.63 ± 0.08 , 0.69 ± 0.10 , 0.95 ± 0.14 ; 大脑皮层中的 SYN 蛋白相对表达量分别为 1.25 ± 0.18 , 0.68 ± 0.11 , 1.16 ± 0.07 和 0.76 ± 0.06 , 0.99 ± 0.12 , 1.08 ± 0.13 ; PSD-95 蛋白相对表达量分别为 0.94 ± 0.35 , 0.39 ± 0.12 , 0.79 ± 0.14 和 0.40 ± 0.07 , 0.58 ± 0.11 , 0.65 ± 0.22 。铝中毒模型组的上述指标均较空白对照组明显减少, 阳性对照组的上述指标均较铝中毒模型组明显增多, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); Sch B 中、高剂量组海马组织和大脑皮层中的 SYN 蛋白相对表达量比铝中毒模型组明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); Sch B 高剂量组海马组织和大脑皮层中的 PSD-95 蛋白相对表达量比铝中毒模型组明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 4、图 5。

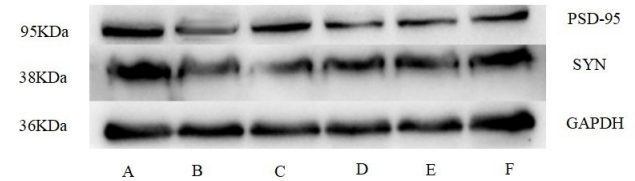
3 讨论

铝是一种人体非必需元素, 长期过多的铝进入体内后会在肝、脑等组织中蓄积, 对机体有毒性作用, 可引起学习记忆功能减退、认知功能障碍等症状^[6-7]。



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 4 各组海马组织中 SYN 和 PSD-95 蛋白的表达情况



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 5 各组大脑皮层中 SYN 和 PSD-95 蛋白的表达情况

Sch B 是从五味子中提取的含量最高的木脂素, 其具有许多生物活性, 包括抗氧化、抗炎症和神经保护作用, 改善学习记忆的能力, 五味子提取物对认知功能有积极影响^[8-10]。本研究 Morris 水迷宫定位航行训练结果显示, 铝中毒模型组大鼠的潜伏期比空白对照组明显增长, 说明慢性铝中毒可导致大鼠学习记忆能力下降, 与文献报道的研究结果一致^[11]。给予 Sch B 干预治疗后, Sch B 中、高剂量组大鼠潜伏期缩短, 尤以 Sch B 高剂量组潜伏期缩短明显, 这表明 Sch B 可以改善铝中毒所引起的学习和记忆障碍, 提高学习和记忆能力。

PSD-95 和 SYN 是与突触可塑性密切相关的重要蛋白, 它们能影响突触的结构和功能, SYN 是突触的可塑性的基础^[12-13], PSD-95 参与长时程突触传递增强, 其表达水平与突触可塑性紧密相关^[14-15]。故本研究检测海马组织和大脑皮层中 SYN、PSD-95 的表达情况来观察铝中毒学习记忆障碍是否与突触相关蛋白有联系。本研究结果发现, 慢性铝中毒大鼠海马组织和大脑皮层中的 SYN、PSD-95 蛋白表达较空白对照组明显减少, 给予 Sch B 干预 1 个月后, Sch B 中、高剂量实验组中的 SYN、PSD-95 蛋白表达逐渐增多, 尤其以 Sch B 高剂量实验组蛋白表达增多明显。提示 Sch B 可能通过调节与突触结构及功能相关的蛋白质表达水平, 提高突触可塑相关蛋白 SYN、PSD-95 在海马组织和大脑皮层中表达水平, 进而调节突触的可塑性, 最终提高铝中毒大鼠学习记忆能力。

综上所述, 慢性铝中毒引起学习记忆障碍与 PSD-

95、SYN 蛋白在海马组织及大脑皮层中表达下降有关, Sch B 能提高铝中毒大鼠的学习和记忆能力, 这与海马组织和大脑皮层中的 PSD-95、SYN 蛋白表达增多有关。

参考文献:

- [1] Coley AA, Gao WJ. PSD-95 deficiency disrupts PFC-associated function and behavior during neurodevelopment [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):9486.
- [2] Zhu X, Wang P, Liu H, et al. Changes and Significance of SYP and GAP-43 Expression in the Hippocampus of CIH Rats [J]. *Int J Med Sci*, 2019, 16(3):394-402.
- [3] 白文字, 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.
- [4] 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, 31(2):113-115.
- [5] 莫颂轶, 张丽凤, 黄彦峰, 等. 慢性铝中毒小鼠学习记忆与大脑皮层 ACh、 β -EP、SOD 及 MDA 关系的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(7):63-67.
- [6] Zhang L, Jin C, Lu X, et al. Aluminium chloride impairs long-term memory and Downregulates cAMP- PKA-CREB signalling in rats [J]. *Toxicology*, 2014, 323: 95-108.
- [7] 刘佳喜, 张立丰. 铝的毒性作用研究进展 [J]. *现代预防医学*, 2021, 48(5):806-809, 871.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 吴靖, 常丽英, 肖娟, 等. 五味子乙素调控小神经胶质 BV-2 细胞氧化应激损伤机制研究 [J]. *中国现代应用药学*, 2018, 35(10):1507-1510.
- [11] 张立丰, 白春玉, 张迪, 等. 亚慢性铝暴露对 Wistar 大鼠学习记忆及海马 CA1 区 c-Fos 表达的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30(5):553-557.
- [12] 梁娜, 王白云, 廖梦君, 等. 七氟醚对老龄大鼠认知功能及海马 CA3 区突触素的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(16):1762-1764.
- [13] 王晓燕, 侯爱生, 宋玉祥, 等. 小鼠学习记忆能力及海马区突触功能相关蛋白 BDNF、PSD95、GluA1 的增龄性变化 [J]. *解放军医学院学报*, 2020, 41(8):808-812, 837.
- [14] 张丽凤, 张玲童, 易思, 等. 五味子乙素对慢性酒精中毒大鼠海马组织 PSD-95 蛋白表达的影响 [J]. *右江民族医学院学报*, 2020, 42(2):142-146.
- [15] 林江涛, 丁悦敏, 张雄. PSD-95 与老化相关学习记忆能力下降关系研究进展 [J]. *生物学杂志*, 2019, 36(2):83-85, 89.

收稿日期:2021-10-08;修回日期:2021-10-20