

本文引文格式:郭建雄,程厚之,张丽凤,等.五味子乙素对慢性铝中毒大鼠海马神经细胞凋亡相关基因的影响[J].右江民族医学院学报,2023,45(3):379-383.

【论著与临床报道】

五味子乙素对慢性铝中毒大鼠海马神经细胞凋亡相关基因的影响

郭建雄,程厚之,张丽凤,刘文静,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神经细胞凋亡相关基因的影响。方法 用 $AlCl_3$ 水溶液拌入饲料中连续喂养大鼠建立慢性铝中毒模型,将建模成功的大鼠按随机方法分为5组:铝中毒模型组、阳性对照组和Sch B低剂量组、Sch B中剂量组、Sch B高剂量组3个剂量实验组。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、Sch B中剂量组、Sch B高剂量组用Sch B分别按10mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg的剂量进行灌胃,另设空白对照组,每组5只。RT-PCR检测大鼠海马神经细胞Caspase-3、Bcl-2、Bax mRNA表达情况。结果 RT-PCR结果显示,与空白对照组相比,铝中毒模型组Caspase-3和Bax mRNA表达均明显增多,Bcl-2 mRNA表达明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与铝中毒模型组相比,Sch B低剂量组、Sch B中剂量组、Sch B高剂量组Caspase-3 mRNA相对表达量明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$);Sch B中剂量组、Sch B高剂量组的Bcl-2 mRNA表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);Sch B中剂量组、Sch B高剂量组的Bax mRNA表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 Sch B可以通过对Caspase-3、Bcl-2、Bax mRNA表达调控,影响海马神经细胞的凋亡。

关键词:五味子乙素;慢性铝中毒;海马;凋亡

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)03-0379-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.03.003

The impact of Schisandrin B on apoptosis-related genes in the hippocampal neurons of rats with chronic aluminum toxicity

Guo Jianxiong, Cheng Houzhi, Zhang Lifeng, Liu Wenjing, Huang Junjie

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

Abstract: **Objective** To investigate the impact of Schisandrin B (Sch B) on apoptosis-related genes in hippocampal neurons of rats with chronic aluminum toxicity. **Methods** A chronic aluminum toxicity model was established by continuously feeding rats with $AlCl_3$ aqueous solution mixed in their feed. The successfully modeled rats were randomly divided into five groups: the aluminum toxicity model group, positive control

基金项目:广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA281142);百色市科学研究与技术开发计划项目(百科20224140);右江民族医学院高层次人才科研课题(yy2020gcky036)

第一作者简介:郭健雄(1997-),男,在读硕士研究生,研究方向:神经系统病理生理,E-mail:1468971862@qq.com

共同第一作者简介: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:1721160417@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

group, and low, medium, and high-dose Sch B experimental groups. The positive control group received intragastric administration of piracetam at a dose of 40 mg/kg, while the Sch B low, medium, and high-dose groups received intragastric administration of Sch B at doses of 10 mg/kg, 20 mg/kg, and 40 mg/kg, respectively. A blank control group was also included, with five rats in each group. The expression of Caspase-3, Bcl-2, and Bax mRNA in hippocampal neurons of rats was measured using RT-PCR. **Results** RT-PCR results showed that compared with the blank control group, the expression of Caspase-3 and Bax mRNA was significantly increased in the aluminum toxicity model group, while the expression of Bcl-2 mRNA was significantly decreased, with statistically significant differences ($P < 0.01$). When compared to the aluminum toxicity model group, the Sch B low, medium, and high-dose groups showed significantly decreased relative expressions of Caspase-3 mRNA, with statistically significant differences ($P < 0.01$). The expression of Bcl-2 mRNA was increased in the Sch B medium and high-dose groups, with statistically significant differences ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of Bax mRNA was decreased in the Sch B medium and high-dose groups, with statistically significant differences ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Schisandrin B can affect the apoptosis of hippocampal neurons by regulating the expression of Caspase-3, Bcl-2, and Bax mRNA.

Key words: Schisandrin B; chronic aluminum toxicity; hippocampus; apoptosis

铝是生活中最常见的金属之一,其广泛存在于自然环境中,可以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。研究表明,铝是一种有效的神经性毒物,在生物体即使含量很低也具有神经毒性^[1],超过参考值含量的铝对身体有极大危害,其影响人的学习记忆功能,会引起海马神经元凋亡,能导致神经退行性问题^[2-3]。神经退行性问题通常与神经元凋亡有关系,长期接触铝是一个公共健康问题^[4]。已有研究表明,五味子乙素(Schisandrin B, Sch B)具有抗氧化以及抗凋亡、抗衰老等作用^[5-6]。本研究通过 Sch B 治疗慢性铝中毒大鼠,检测大鼠海马神经元凋亡相关基因 mRNA 相对表达量,探索 Sch B 对铝中毒大鼠海马神经细胞凋亡相关基因的影响,为慢性铝中毒导致神经退行性疾病的防治提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 30 只 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体重(180±20) g,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]。动物模型建立过程中,各组大鼠采取分笼饲养,室温(25±1)℃,湿度 50%~60%,饲料供给充足,自由饮水。对实验大鼠的所有处理严格按照右江民族医学院实验动物伦理委员会的操作规程进行实验。

1.2 主要试剂与药品 Sch B(生产批号:wkq19101401,维克奇生物科技有限公司);吡拉西坦(生产批号:190703,广东华南药业集团有限公司);MonScriptRTIIIAll-in-OneMix 逆转录试剂盒(生产批号:100649,武汉莫奈生物科技有限公司);MonadSYBRqPCRMix 荧光定量 PCR 试剂盒(生产批号:120625,武汉莫奈生物科技有限公司);罗氏 light-

cycle96 梯度荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司);Longgene 朗基逆转录 PCR 仪(杭州朗基科学仪器有限公司)。

1.3 动物分组与给药 按参考文献[7]方法配制 AlCl₃ 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 AlCl₃ 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。将建模成功的大鼠按随机方法分为 5 组:铝中毒模型组、阳性对照组和 Sch B 低剂量组、Sch B 中剂量组、Sch B 高剂量组,每组 5 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、Sch B 中剂量组、Sch B 高剂量组用五味子乙素分别按 10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg 的剂量进行灌胃,另设空白对照组,每组 5 只。

1.4 RT-PCR 检测大鼠海马神经细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的 mRNA 表达 采用 TRIzol 法提取组织总 RNA,根据逆转录试剂盒(MonScriptRTIIIAll-in-OneMix)逆转录获取目的 cDNA 后,再根据荧光定量 PCR 试剂盒(MonadSYBRqPCRMix),配置 10 μL 反应体系,加入 cDNA 和引物(引物及序列见表 1),实时荧光定量 PCR 扩增目的基因。反应结束后,得到 Ct 值和溶解曲线,以正常组为对照组,以 β-actin 为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 法进行分析。

1.5 统计学方法 用 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 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

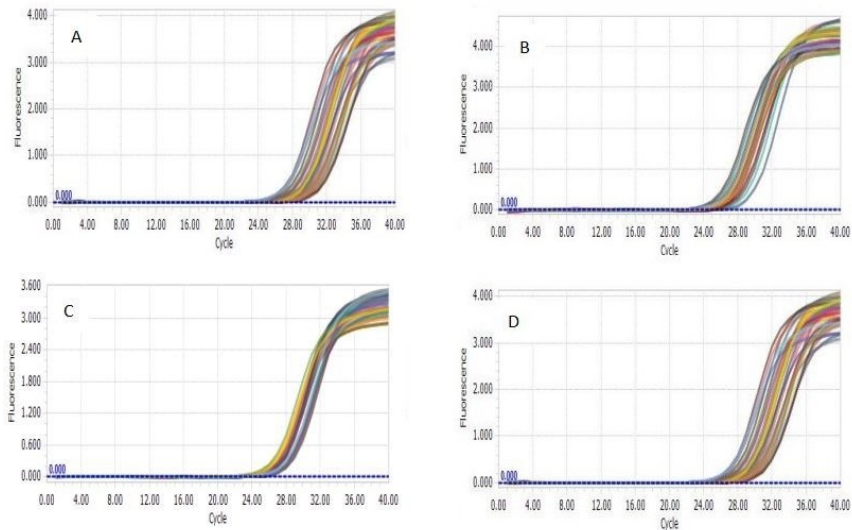
表 1 PCR 基因引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')
Caspase-3-F	TGGACAACAACGAAACCTC
Caspase-3-R	ACACAAGCCCATTTTCAGG
Bcl-2-F	GGGATGCCTTTGTGGAAC
Bcl-2-R	GTCTGCTGACCTCACTTG
Bax-F	GGACGCATCCACCAAGAAG
Bax-R	CTGCCACACGGAAGAAGAC
β -actin-F	ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC
β -actin-G	TACTCTGCTTGCTGATCCAC

2 结果

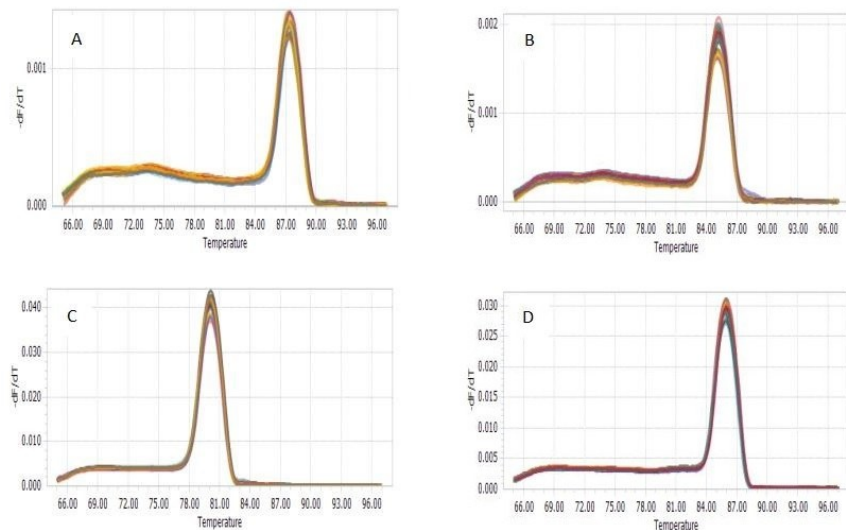
2.1 RT-PCR 检测大鼠海马神经细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3 的 mRNA 相对表达量 RT-PCR 结果显示,扩增曲线倾斜程度基本一致,目的基因和内参扩增效率基本一致,溶解曲线呈单一峰,无引物二聚体等非

特异性扩增,特异性较好(见图 1、图 2)。铝中毒模型组 Caspase-3 和 Bax mRNA 均较空白对照组明显增多,Bcl-2 mRNA 较空白对照组明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.01$),阳性对照组的较铝中毒模型组 Caspase-3 和 Bax mRNA 明显减少,Bcl-2 mRNA 明显增多,差异均有统计学意义($P < 0.01$);Sch B 低、中、高剂量组海马组织中的 Caspase-3 mRNA 相对表达量比铝中毒模型组明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$);Sch B 中、高剂量组海马组织中的 Bcl-2 mRNA 相对表达量比铝中毒模型组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);Sch B 中、高剂量组海马组织中的 Bax mRNA 相对表达量比铝中毒模型组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (见表 2、图 3)



注: A. Bax; B. Bcl-2; C. Caspase-3; D. β -actin。

图 1 Bax、Bcl-2、Caspase-3 β -actin 扩增曲线图



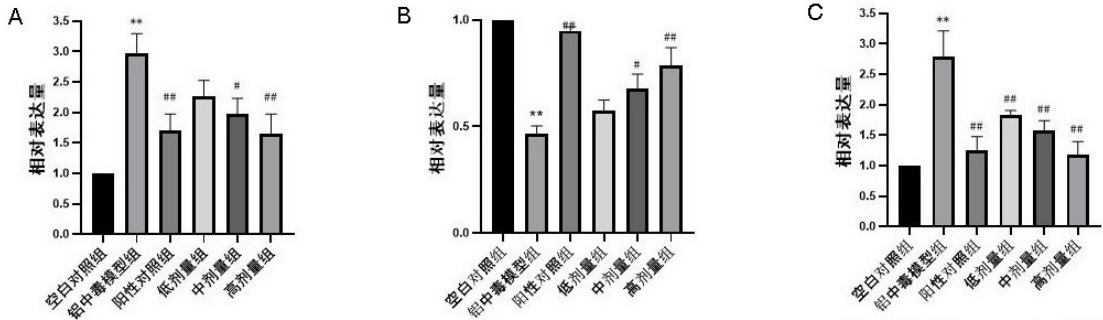
注: A. Bax; B. Bcl-2; C. Caspase-3; D. β -actin。

图 2 Bax、Bcl-2、Caspase-3 β -actin 溶解曲线图

表 2 各组大鼠海马组织 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax mRNA 表达水平比较

组别	<i>n</i>	剂量/(mg · kg ⁻¹)	Caspase-3 mRNA	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA
空白对照组	5	—	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
铝中毒模型组	5	—	2.78 ± 1.05 ^a	0.47 ± 0.09 ^a	2.98 ± 0.77 ^a
阳性对照组	5	40	1.25 ± 0.55 ^c	0.95 ± 0.47 ^c	1.70 ± 0.68 ^c
Sch B 低剂量组	5	10	1.83 ± 0.19 ^c	0.58 ± 0.12	2.27 ± 0.63
Sch B 中剂量组	5	20	1.18 ± 0.52 ^c	0.68 ± 0.16 ^b	1.97 ± 0.65 ^b
Sch B 高剂量组	5	40	1.56 ± 0.78 ^c	0.78 ± 0.20 ^c	1.64 ± 0.80 ^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: $P < 0.01$;与铝中毒模型组比较,b: $P < 0.05$,c: $P < 0.01$ 。



注:A. 各组大鼠海马 Bax mRNA 表达;B. 各组大鼠海马 Bcl-2 mRNA 表达;C. 各组大鼠海马 Caspase-3 mRNA 表达。
与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与铝中毒模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$ 。

图 3 各组大鼠海马组织 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax mRNA 表达水平比较

3 讨论

铝是一种人体内非特异性作用元素,是生活中常见的几种金属之一,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,摄入人体内的铝含量有增多的趋势。大规模的铝业生产导致铝暴露人群逐渐上升,长期过多的铝进入体内后会在肝、脑等组织中蓄积,过多的铝对人体具有一定的毒性,人体内蓄积的铝可导致铝中毒,并可造成脑内海马的结构损伤和功能障碍,从而引起学习记忆功能减退、认知功能障碍等症状^[8-9],从而导致机体学习和记忆能力的下降。

细胞凋亡被广泛认为是程序性细胞死亡,是细胞死亡的高度调节过程。细胞凋亡在生理和病理条件下都起着不可或缺和不可替代的作用。细胞凋亡不仅仅是消除细胞,以高度调节的方式,不再需要的或对生物体有害的细胞会自杀。细胞凋亡的一个显著特征是它主要通过一种称为半胱天冬酶的丝氨酸蛋白酶的作用来发挥其作用。死亡信号通过信号通路传递,最终导致负责执行细胞破坏的半胱天冬酶的激活外部和内部刺激,加上外在和内在细胞凋亡途径,都可以启动细胞凋亡^[10-11]。铝暴露引起的铁过载已被证明会导致脂质过氧化,DNA 损伤和活性氧诱导的细胞凋亡增加。铝通过调控 Caspase 家族表达,抑制凋亡 Bcl-2 蛋白表达和增加促凋亡 Bax 蛋白的表达来诱导细胞的凋亡^[12-14]。

Sch B 是一种从五味子中分离出来的活性成分,已被证明可以提供广泛的组织保护,防止实验动物的各种器官(包括大脑)的氧化损伤。Sch B 是天然的抗氧化剂,能够增加组织细胞内超氧化物歧化酶和谷胱甘肽的含量和活性,影响神经元的功能及突触的可塑性,Sch B 可以调节神经递质的释放,抑制炎症及氧化应激反应的产生,保护神经元,提高学习与记忆。Sch B 的作用机制在于有效增强机体的抗氧化能力,减轻氧化损伤程度,从而通过增强抗氧化活性来抑制细胞凋亡,对受损神经细胞起到保护作用,此外,Sch B 还可能通过降低大鼠脑组织 Bax 基因的表达,从而使得凋亡通路被干扰阻断,抑制神经细胞线粒体凋亡,并保护受损神经细胞,进而改善大鼠的记忆能力^[15-16]。

本实验中,通过建立慢性铝中毒大鼠模型,观察铝中毒大鼠海马神经细胞凋亡相关基因的表达。铝中毒模型组 Caspase-3、Bax mRNA 均较空白对照组明显增多,Bcl-2 mRNA 较空白对照组明显减少,提示铝中毒可以促进海马神经细胞凋亡增加。本实验发现,在给予 Sch B 治疗 30 d 后,Caspase-3、Bax mRNA 较铝中毒模型组明显降低,Bcl-2 mRNA 较铝中毒模型组明显升高,这表明 Sch B 可以通过调控 Caspase-3、Bcl-2、Bax mRNA 表达水平,进而影响海马神经细胞的凋亡。

参考文献:

- [1] NAMPOOTHIRI M, RAMALINGAYYA G V, KUTTY N G, et al. Insulin combined with glucose improves spatial learning and memory in aluminum chloride-induced dementia in rats[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2017, 36(2):159-169.
- [2] LUKASZ B, RYBAKOWSKA I M, KRAKOWIAK A, et al. The health effects of environmental and occupational exposure to aluminum[J]. *Med Pr*, 2020, 71(1):79-88.
- [3] BOLGER-MUNRO M, CHOI K, CHEUNG F, et al. The Wdr1-LIMK-cofilin axis controls b cell antigen receptor-induced actin remodeling and signaling at the immune synapse[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:649433.
- [4] 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.
- [5] CAI N N, GENG Q, JIANG Y, et al. Schisandrin A and B affect the proliferation and differentiation of neural stem cells[J]. *J Chem Neuroanat*, 2022, 119:102058.
- [6] HU X L, GUO C, HOU J Q, 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] RILEY J S, BOCK F J. Voices from beyond the grave: the impact of apoptosis on the microenvironment[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2022, 1869(11):119341.
- [11] KHODAVIRDIPOUR A, PIRI M, JABBARI S, et al. Apoptosis detection methods in diagnosis of cancer and their potential role in treatment: advantages and disadvantages; a review[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2021, 52(2):422-430.
- [12] DEY M, SINGH R K. Neurotoxic effects of aluminium exposure as a potential risk factor for Alzheimer's disease[J]. *Pharmacol Rep*, 2022, 74(3):439-450.
- [13] ZHANG Y N, GUO T M, DING Y, et al. Taurine and deferiprone against Al-linked apoptosis in rat hippocampus[J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2023, 76:127113.
- [14] RAHIMZADEH M R, RAHIMZADEH M R, KAZEMI S, et al. Aluminum poisoning with emphasis on its mechanism and treatment of intoxication[J]. *Emerg Med Int*, 2022, 2022:1480553.
- [15] 张译敏, 廖秀玲, 王雪妮, 等. 五味子乙素抗炎作用研究进展[J]. *中成药*, 2022, 44(10):3244-3248.
- [16] 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:2023-02-10;修回日期:2023-03-18

(上接第 372 页)

- [16] LI T, YANG X, XU H, et al. Early identification, accurate diagnosis, and treatment of silicosis[J]. *Can Respir J*, 2022, 2022:3769134.
- [17] CAO Z J, LIU Y, ZHANG Z, et al. Pirfenidone ameliorates silica-induced lung inflammation and fibrosis in mice by inhibiting the secretion of interleukin-17A[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(4):908-918.
- [18] ADAMCAKOVA J, MOKRA D. Herbal compounds in the treatment of pulmonary silicosis[J]. *Physiol Res*, 2021, 70(S3):S275-S287.
- [19] LIANG Y H, LIU G R, XIE L N, et al. *Dendrobium candidum* polysaccharide reduce atopic dermatitis symptoms and modulate gut microbiota in DNFB-induced AD-like mice[J]. *Front Physiol*, 2022, 13:976421.
- [20] 刘雪, 吴婷婷, 沈鸿涛, 等. 铁石石斛多糖对脑缺血一再灌损伤模型大鼠预后的影响[J]. *黑龙江医药科学*, 2019, 42(6):40-44, 48.
- [21] 石海珩, 张艳梅, 龚丽娜. 妊娠糖尿病产妇 Nrf2、HO-1 表达水平与巨大儿发生的相关性分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2023, 31(1):8-14.
- [22] FENG F, CHENG P, ZHANG H N, et al. The protective role of tanshinone IIA in silicosis rat model via TGF- β 1/smad signaling suppression, NOX4 inhibition and Nrf2/ARE signaling activation[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13:4275-4290.

收稿日期:2023-02-01;修回日期:2023-03-20