

本文引文格式:贾芸菁,李晨羽,甘珏方,等.石菖蒲对铝致认知功能障碍大鼠学习记忆能力和凋亡基因的影响[J].右江民族医学院学报,2023,45(5):736-740.

【论著与临床报道】

石菖蒲对铝致认知功能障碍大鼠学习记忆能力和凋亡基因的影响

贾芸菁,李晨羽,甘珏方,廉春容,李莎莎,刘亚林,刘金培,王旭,凌雁武

(右江民族医学院基础医学院,广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨石菖蒲(*Acorus gramineus* Soland)对铝(Al)致认知功能障碍大鼠学习记忆能力和神经细胞凋亡的抑制情况。方法 用氯化铝溶液按照100 mg/kg连续灌胃3个月,建立铝致认知障碍大鼠模型,然后采用石菖蒲灌胃治疗认知。水迷宫行为学实验评估大鼠的学习记忆能力。蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测大鼠海马区的凋亡因子B细胞淋巴瘤/2家族蛋白(Bcl-2)、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Cleaved-Caspase-3)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)的蛋白表达水平。实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)检测 *Bcl-2*、*Caspase-3*、*Bax* 的 mRNA 表达水平。**结果** 水迷宫实验结果显示,与模型组相比,药物干预组的大鼠空间探索潜伏期缩短,穿越平台次数显著增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western Blot 和 RT-qPCR 的结果显示,与模型组相比,Bcl-2 的表达显著增加,而 Bax 和 Caspase-3 的表达显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 石菖蒲提高铝致认知功能障碍大鼠的学习记忆能力,降低海马区神经细胞的凋亡。

关键词:铝;认知功能障碍;石菖蒲

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)05-0736-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.05.007

Effects of *Acorus gramineus* Soland on learning and memory ability and apoptosis genes in rats with cognitive dysfunction induced by aluminum

Jia Yunjing, Li Chenyu, Gan Juefang, Lian Chunrong, Li Shasha,
Liu Yalin, Liu Jinpei, Wang Xu, Ling Yanwu

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

Abstract: Objective To investigate the effects of *Acorus gramineus* Soland on learning and memory ability and the inhibition the apoptosis of nerve cell in rats with cognitive dysfunction induced by aluminum (Al).

Methods Continuous intragastrically Al chloride solution of 100 mg/kg for 3 months to established a rat model of cognitive impairment induced by Al, and cognitive impairment was treated by intragastrically *Acorus gramineus* Soland. The learning and memory ability of rats was evaluated by water maze behavior experiment. The protein expression levels of apoptosis factor B cell lymphoma leukemia-2 (Bcl-2), activated cysteinyl aspartate proteolytic enzyme 3 (Cleaved-Caspase-3), and Bcl-2 associated X protein (Bax) in the hippocampus of rats were detected by Western Blot. Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the mRNA expression levels of *Bcl-2*, *Caspase-3* and *Bax*. **Results** The results of water maze experiment showed that the latency of spatial exploration of rats was shortened in the drug intervention group compared with the model group, and the frequency of crossing the platform significantly increased, with statistically significant ($P < 0.05$). The results of Western Blot and RT-qPCR showed that the expression of Bcl-2 was significantly increased and the Bax and Caspase-3 was significantly decreased compared with the model group, with statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** *Acorus gramineus* Soland can improve the learning and memory ability of rats with cognitive dysfunction induced by Al and reduce the apop-

第一作者简介:贾芸菁(1999-),女,在读硕士研究生,研究方向:神经生物学,E-mail:jiayunjing0508@163.com

通讯作者简介:凌雁武(1975-),男,硕士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:神经生物学,E-mail:11027407@qq.com

tosis of nerve cells in the hippocampus.

Key words: Aluminium; cognitive dysfunction; *Acorus gramineus* Soland

铝是一种常见的金属元素,铝的神经毒性特性已经得到很好的证实^[1-2]。石菖蒲是一种临床上常用于治疗阿尔兹海默症中草药,具有抗痴呆、抗癫痫、抗炎、抗血栓、抗肿瘤、抗抑郁及提高神经元活性、减少神经元损伤和保护心肌细胞、呼吸系统等广泛的作用^[3]。本研究旨通过用石菖蒲干预治疗铝致认知功能障碍的大鼠,检测石菖蒲对大鼠学习记忆能力和海马区神经细胞相关凋亡基因表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 本次实验从湖南省长沙天勤生物技术有限公司[许可证号:SCXK(湘)2022-0011]购买 60 只 Wistar 大鼠,雌雄各半,SPF 级,体重 160~220 g,周龄 6~8 周。

1.2 仪器与设备 三氯化铝(广东光华化学厂有限公司);石菖蒲颗粒(华润三九医药股份有限公司);吡拉西坦(东北制药集团);Bcl-2 抗体(杭州华安生物技术有限公司);Caspase-3 抗体、Bax 抗体(艾比玛特医药科技有限公司);Bcl-2、Bax 引物(上海生工生物工程股份有限公司);Caspase-3 引物(南宁捷尼斯生物科技有限公司);多功能微孔板检测仪(帝肯 Spark 多功能酶标仪);实时荧光定量 PCR 仪(罗氏 Light Cycler 96);电泳仪(WIX-EP600);高温低速研磨仪(武汉塞维尔 KZ-III-F)。

1.3 动物分组与药物剂量 大鼠饲养条件需要满足,分笼喂养,温度(25±1)℃,湿度 50%~60%,饲料充分,饮水自由的条件下,对大鼠所有操作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。适应性饲养 1 周后,根据随机数字表的方法,将 60 只大鼠随机分为对照组、模型组、石菖蒲低剂量组、石菖蒲高剂量组和阳性对照组 5 个组。造模方式参考相关文献^[4-7],空白对照组每天灌胃生理盐水,用生理盐水配置为 10 g/L 的氯化铝溶液,按照 100 mg/kg 给其他 4 个组灌胃来创建铝致大鼠认知障碍模型。模型组灌胃氯化铝溶液后不做任何处理;石菖蒲组分别以 5 g/kg、10 g/kg 的剂量灌胃;阳性对照组采用吡拉西坦按照 400 mg/kg 的剂量灌胃。造模时间为 3 个月。

1.4 水迷宫检测大鼠的学习记忆能力 造模期结束后,开始水迷宫行为学实验。水迷宫水池中加入没过平台约 3 cm 高度的水,水中加入墨水。正式实验开始前 1 d,将每只大鼠放入水迷宫中游泳 1 min,以适应水中环境。定位航行实验开始后,将大鼠沿每个象限的水池边放入水池中,同时另一位实验协助者操作系统开始摄像,大鼠游上平台后,系统自动结束。如果没

有上平台,1 min 后自动结束。前 5 d 重复操作,大鼠游上平台的时间即为潜伏期(s)。第 6 天将平台撤掉,开始空间探索实验,每只大鼠分别沿 4 个象限下水,游泳 1 min 后自动结束,记录大鼠穿越原平台位置的次数。

1.5 Western Blot 检测大鼠海马组织 Bcl-2、Caspase-3、Bax 蛋白表达 水迷宫实验结束后,使用 3%戊巴比妥钠对大鼠进行腹腔注射麻醉,然后立即断头,随即进行冰上操作提取大鼠海马组织,提取后的组织可放入-80℃冰箱冷冻长期保存。提取大鼠海马组织后,加入裂解液,用高速低温研磨仪研磨海马组织,提取蛋白。随后进行 BCA 浓度测定,制备蛋白样品,跑胶,转膜,蛋白封闭,孵育 Bcl-2、Caspase-3、Bax 抗体,孵育二抗,显影等步骤。显影条带采用 ImageJ 软件进行灰度值的分析。

1.6 RT-qPCR 检测大鼠海马组织 Bcl-2、Caspase-3、Bax mRNA 表达水平 提取大鼠新鲜海马组织后,使用总 RNA 提取试剂盒提取海马组织中的总 RNA。随后,使用 cDNA 试剂盒合成 cDNA,并以合成的 cDNA 为模板进行扩增反应。上样体系和引物序列见表 1、表 2。

表 1 上样体系

组分	体积/L
SYBR Green Master Mix	10
Forward Primer	0.5
Reverse Primer	0.5
cDNA	2
RNase-Free Water	7

表 2 引物序列

基因	引物序列
Bcl-2	正向引物:5'-GGAGGATTGTGGCCTTCTTT-3'
	反向引物:5'-GTCATCCACAGAGCGATGTT-3'
Bax	正向引物:5'-GGACGCATCCACCAAGAAG-3'
	反向引物:5'-CTGCCACACGGAAGAAGAC-3'
Caspase-3	正向引物:5'-ATGCTTACTCTACCGCACCCG-3'
	反向引物:5'-ACATGCCCTACCCCACTCC-3'
GAPDH	正向引物:5'-GACATGCCGCTGGAGAAAC-3'
	反向引物:5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'

1.7 统计学方法 对于统计学分析,使用 SPSS 26.0 软件。所有实验数据以($\bar{x} \pm s$)的形式表示。对于每组数据,使用 K-S 检验来检验其是否符合正态分布。如果数据符合正态性分布,使用 One-Way ANOVA 进

行多组间的比较。如果方差齐,使用 LSD 法进行比较;如果方差不齐,使用 Tamhane 检验。如果数据不符合正态分布,呈偏态分布,使用 Kruskal-Wallis 检验。将检验水准设置为 $P < 0.05$,表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 水迷宫实验结果 与空白对照组相比,模型组大鼠的 5 d 平均潜伏期较长,第 6 天空间探索实验的站台穿越次数减少,差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。与模型组相比,石菖蒲低剂量组、高剂量组以及阳性对照组的潜伏期明显缩短,第 6 天空间探索实验穿越站台次数明显增加。其中,石菖蒲高剂量组和阳性对照组与模型组之间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 Morris 平均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	12	28.89±8.63	3.94±1.83
模型组	12	46.47±10.78 ^a	1.33±1.01 ^e
石菖蒲低剂量组	12	41.12±10.95 ^b	1.73±0.87 ^f
石菖蒲高剂量组	12	35.38±9.03 ^c	2.46±0.92 ^g
阳性对照组	12	34.82±9.23 ^d	2.57±0.54 ^h

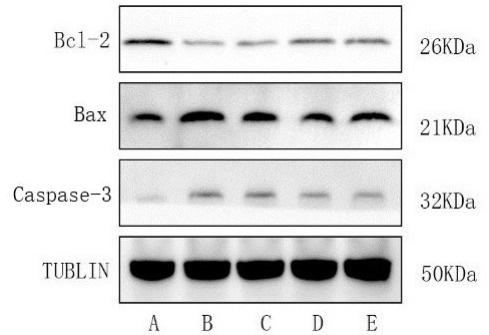
注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示。②a,e 与空白对照组比较,a: $P < 0.001$,e: $P < 0.001$;b,c,d,f,g,h 与模型组比较,b: $P = 0.178$,c: $P = 0.008$,d: $P = 0.005$,f: $P = 0.385$,g: $P = 0.018$,h: $P = 0.006$ 。

2.2 Western Blot 实验结果 与空白对照组相比,模型组 Bcl-2 表达的明显下调,以及 Bax 和 Caspase-3 表达的显著上调,差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。与模型组相比,石菖蒲低剂量组、高剂量组以及阳性对照组的 Bcl-2 表达明显上调,其中,石菖蒲高剂量组的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组相比,石菖蒲低剂量组、高剂量组以及阳性对照组 Bax 和 Caspase-3 的表达明显下调。其中,Bax 的表达差异在 3 个组中均具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$),而 Caspase-3 的表达在石菖蒲高剂量组和阳性对照组之间的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4、图 1。

表 4 各组大鼠海马组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白相对表达量的比较

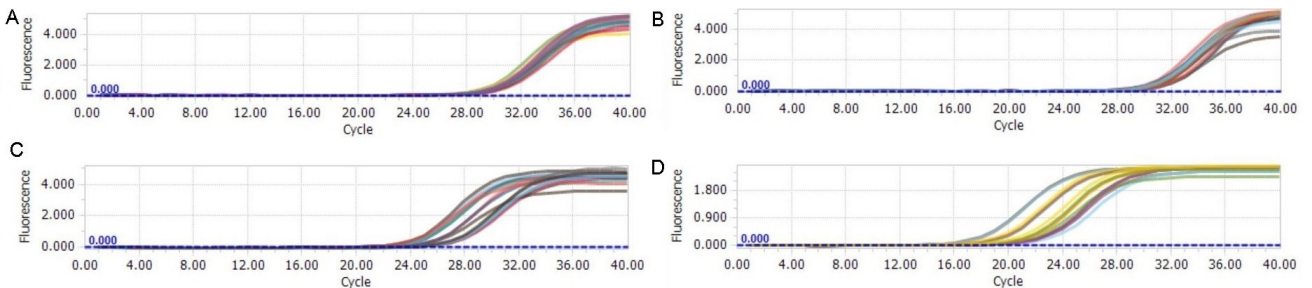
组别	Bcl-2	Bax	Caspase-3
空白对照组	0.90±0.25	0.43±0.10	0.19±0.75
模型组	0.43±0.19 ^a	1.04±0.11 ^b	0.89±0.22 ^c
石菖蒲低剂量组	0.47±0.14 ^d	0.78±0.10 ^e	0.67±0.20 ^f
石菖蒲高剂量组	0.69±0.18 ^g	0.53±0.11 ^h	0.57±0.19 ⁱ
阳性对照组	0.53±0.22 ^j	0.66±0.16 ^k	0.60±0.27 ^l

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: $P < 0.001$,b: $P < 0.001$,c: $P < 0.001$;与模型组相比,d: $P = 0.755$,e: $P = 0.035$,f: $P = 0.430$,g: $P = 0.022$,h: $P < 0.001$,i: $P = 0.003$,j: $P = 0.107$,k: $P = 0.023$,l: $P = 0.039$ 。

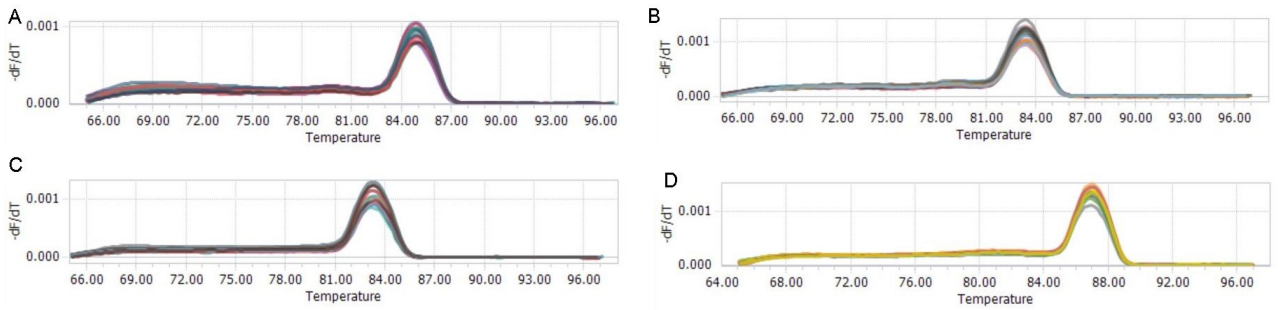
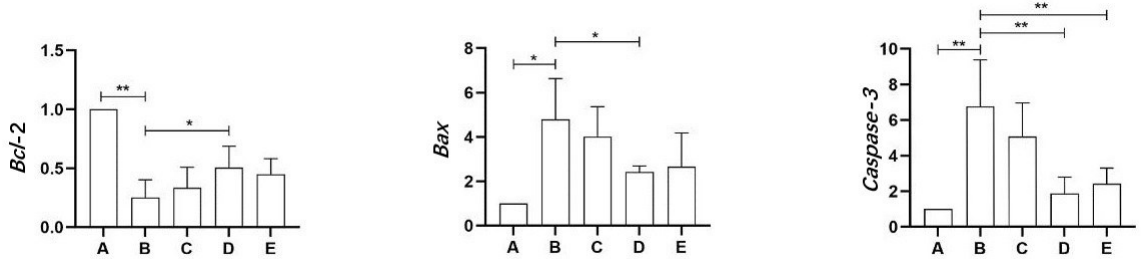


注:A. 空白对照组;B. 模型组;C. 石菖蒲低剂量组;D. 石菖蒲高剂量组;E. 阳性对照组。
图 1 各组大鼠 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平

2.3 RT-qPCR 实验结果 RT-qPCR 结果显示,每个样品孔扩增均达到平台期,且扩增效率基本一致,溶解曲线无杂峰,呈单一峰,未见非特异性扩增,特异性较好。见图 2、图 3。与空白对照组相比,模型组显示明显的 Bcl-2 表达下降,Bax、Caspase-3 表达上升,这些差异具有统计学意义 ($P < 0.001$);与模型组相比,石菖蒲低剂量组、高剂量组以及阳性对照组的 Bcl-2 表达明显上升,其中,石菖蒲高剂量组的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组相比,石菖蒲低剂量组、高剂量组以及阳性对照组的 Bax、Caspase-3 的表达明显下降,其中,石菖蒲高剂量组的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),图 4。



注:A. Bcl-2;B. Bax;C. Caspase-3;D. GAPDH。
图 2 Bcl-2、Bax、Caspase-3、GAPDH 扩增曲线图

注: A. *Bcl-2*; B. *Bax*; C. *Caspase-3*; D. *GAPDH*。图 3 *Bcl-2*、*Bax*、*Caspase-3*、*GAPDH* 溶解曲线图注: A. 空白对照组; B. 模型组; C. 石菖蒲低剂量组; D. 石菖蒲高剂量组; E. 阳性对照组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ 。图 4 各组大鼠 *Bcl-2*、*Bax*、*Caspase-3* mRNA 表达水平

3 讨论

阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种常见的老年性神经系统退行性疾病,其特点是记忆力减退、智力下降、行为异常、情绪波动等,最终导致患者失去自理能力。认知功能障碍 (mild cognitive dysfunction, MCD) 作为阿尔兹海默症、帕金森病 (Parkinson's disease, PD)、亨廷顿舞蹈病 (Huntington's disease, HD) 等神经退行性疾病的前驱期,了解干预认知功能障碍的药理学机制同样也刻不容缓。

铝作为一种累积的有毒金属,广泛用于日常生活^[8]。环境铝暴露可能对人类和动物的神经、免疫、骨骼和泌尿系统造成毒性^[9]。铝可引发与 AD 相关的病理过程,包括淀粉样蛋白 β ($A\beta$) 的寡聚化和积累、tau 蛋白过度磷酸化的聚集、脂质过氧化、钙离子交换受损以及细胞凋亡。研究表明,神经细胞凋亡是神经退行性疾病中神经细胞死亡的关键机制之一^[10]。有研究发现^[11],铝会通过多种途径导致细胞凋亡,如线粒体通路、死亡受体通路、内质网通路等。B 细胞淋巴瘤 2 家族蛋白 (*Bcl-2*) 在线粒体介导的细胞凋亡调控中扮演着关键的角色。哺乳动物细胞中至少存在 20 种 *Bcl-2* 相关蛋白,分为两个亚组:抗凋亡 (*Bcl-2*、*Bcl-XL*) 和促凋亡 (*Bax*、*Bak*) 蛋白。因此,拮抗家族成员之间的平衡在决定细胞存活或死亡中起着关键作用^[12]。在细胞凋亡过程中,*Caspase* 家族蛋白是典型的凋亡蛋白。在这个家族中,*Caspase-3* 是凋亡级联反应中最为关键的效应蛋白酶,它负责执行凋亡的最后阶段^[13]。

石菖蒲是中药中常用的一味药材,可以使大脑和

神经系统恢复活力,被广泛用于治疗许多疾病,如癫痫、精神疾病、慢性腹泻、痢疾、发烧、腹部肿瘤、肾脏和肝脏疾病以及风湿病。石菖蒲的主要成分包括挥发油、黄酮类化合物、多糖等,这些成分具有抗氧化、抗炎、抑制 $A\beta$ 的生成和聚集等多种药理作用。研究表明,石菖蒲中的多种活性成分可以通过多种途径发挥治疗 AD 的作用,如减轻神经元凋亡和炎症反应、抗氧化、促进乙酰胆碱的释放等^[14-16]。

在本研究中,通过模型组的水迷宫行为学实验结果可以判断,铝染毒可以使大鼠学习记忆能力下降和引发认知功能障碍,本次实验铝致大鼠认知功能障碍的动物实验模型建立成功。通过 Western Blot、RT-qPCR 的实验结果,观察到铝导致大鼠海马区神经细胞凋亡增加,这与之前的研究结果一致^[17]。通过分析用药组的实验结果,与模型组相比,石菖蒲低、高剂量组的大鼠水迷宫平均潜伏期缩短,穿越平台次数增加,学习记忆能力有所改善,并且海马区神经细胞凋亡程度有所降低。这表明,石菖蒲可以提高大鼠学习记忆能力,降低神经细胞的凋亡,对神经细胞起到保护作用。关于石菖蒲对神经细胞作用的具体机制,本文未做具体研究,根据之前的研究结果显示,石菖蒲通过上调双肾上腺皮质激素、巢蛋白、酪氨酸蛋白激酶和神经营养因子的表达来发挥作用^[18]。此外,石菖蒲还通过诱导 c-Jun 氨基末端激酶的磷酸化,下调 *Bcl-2*、*Bcl-w* 的表达,抑制 *Caspase-1* 的激活,从而减少海马神经元的凋亡^[19]。由于中药成分相对复杂,相对于西药有多靶点发挥作用的的优势,石菖蒲在治疗阿尔兹海默症过

程中存在多个靶点^[20],其具体分子机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] HUAT T J, CAMATS-PERNA J, NEWCOMBE E A, et al. Metal toxicity links to Alzheimer's disease and neuroinflammation[J]. *J Mol Biol*, 2019, 431(9): 1843-1868.
- [2] COULSON J M, HUGHES B W. Dose-response relationships in aluminium toxicity in humans[J]. *Clin Toxicol (Phila)*, 2022, 60(4): 415-428.
- [3] 朱梅菊, 毛泽华, 郭红英, 等. 石菖蒲及 α -细辛醚对疲劳运动大鼠学习记忆的影响及其机制[J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(4): 306-311.
- [4] 程厚之, 张丽凤, 梁祚仁, 等. 五味子乙素对慢性铝中毒大鼠海马突触超微结构的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(7): 648-651.
- [5] 张健. 亚慢性铝中毒影响大鼠海马铁稳态的机制[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020.
- [6] 董波, 黄巍, 冯茜, 等. 石菖蒲-冰片配伍对戊四氮点燃癫痫大鼠的影响[J]. *中药材*, 2022, 45(8): 1969-1974.
- [7] 田小海, 常亮, 王莘. 奥拉西坦联合石菖蒲对 AD 大鼠氧化应激能力及空间学习记忆功能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(14): 3581-3583.
- [8] NOVAES R D, MOURO VGS, GONÇALVES R V, et al. Aluminum: a potentially toxic metal with dose-dependent effects on cardiac bioaccumulation, mineral distribution, DNA oxidation and microstructural remodeling[J]. *Environ Pollut*, 2018, 242(Pt A): 814-826.
- [9] CAMPRA N A, MONTIRONI I D, REINOSO E B, et al. A natural oil increases specific anti-OVA IgG levels and induces a cellular immune response combined with aluminium hydroxide[J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 109(1): 223-232.
- [10] KANDIMALLA R, VALLAMKONDU J, CORGIAT E B, et al. Understanding aspects of aluminum exposure in Alzheimer's disease development [J]. *Brain Pathol*, 2016, 26(2): 139-154.
- [11] 郝无迪. 铝损伤血脑屏障激活细胞焦亡通路导致认知功能障碍的机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022.
- [12] JUSTIN THENMOZHI A, WILLIAM RAJA T R, MANIVASAGAM T, et al. Hesperidin ameliorates cognitive dysfunction, oxidative stress and apoptosis against aluminium chloride induced rat model of Alzheimer's disease[J]. *Nutr Neurosci*, 2017, 20(6): 360-368.
- [13] ZHANG H Y, WEI M, LU X Y, et al. Aluminum trichloride caused hippocampal neural cells death and subsequent depression-like behavior in rats via the activation of IL-1 β /JNK signaling pathway[J]. *Sci Total Environ*, 2020, 715: 136942.
- [14] 王光明, 李绍林, 蔡琳, 等. 石菖蒲挥发油微乳对脂多糖诱导大鼠原代神经胶质细胞炎性反应的抑制作用及其机制[J]. *江西中医药*, 2017, 48(10): 65-67, 74.
- [15] 王晓丽, 董妙先, 徐天娇, 等. β -细辛醚对缺糖缺氧再灌注损伤原代大鼠海马神经元的保护作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(5): 928-932.
- [16] 周小杰, 戴世杰, 陈红淑, 等. 石菖蒲挥发油对东莨菪碱致大鼠学习记忆障碍的影响及作用机制研究[J]. *甘肃中医学院学报*, 2015, 32(1): 1-6.
- [17] 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.
- [18] GAO N X, LIU H Q, LI S Q, et al. Volatile oil from *Acorus gramineus* ameliorates the injury neurons in the hippocampus of amyloid beta 1-42 injected mice [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2019, 302(12): 2261-2270.
- [19] GENG Y T, LI C C, LIU J C, et al. Beta-asarone improves cognitive function by suppressing neuronal apoptosis in the beta-amyloid hippocampus injection rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(5): 836-843.
- [20] 韩沉沉, 方洪, 谷丽华, 等. 基于网络药理学石菖蒲挥发油干预中枢神经系统疾病共性物质基础和作用机制探讨[J]. *上海中医药大学学报*, 2022, 36(3): 52-60, 88.

收稿日期: 2023-05-16; 修回日期: 2023-07-10