

. 实验研究 .

姜黄素对 APP/PS1 双转基因小鼠认知功能、炎症反应及海马区突触素表达的影响

夏 星 徐治强 彭 翔

【摘要】目的 探讨姜黄素对 APP/PS1 双转基因小鼠认知功能、炎症反应及海马区突触素表达的影响。**方法** 60 只 6 月龄 APP/PS1 双转基因雄性小鼠随机分为 A 组、B 组和 C 组,各 20 只;A 组采用姜黄素 100mg/kg/d 加入小鼠饲料喂养,B 组采用姜黄素 300mg/kg/d 喂养,C 组采用姜黄素 600mg/kg/d 喂养;3 组均喂养 6 个月。治疗前、治疗 3、6 个月,采用 Morris 水迷宫实验评估小鼠认知功能,采用免疫吸附试验法检测尾静脉血清白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等炎症因子水平;治疗 6 个月,采用免疫组化染色法检测小鼠海马 CA1 区突触素表达情况。**结果** 姜黄素治疗 3、6 个月,3 组小鼠认知功能明显改善($P<0.05$),血清 IL-6、TNF-α 水平明显降低($P<0.05$)。与 A 组比较,B 组和 C 组治疗 3、6 个月认知功能明显改善($P<0.05$),血清 IL-6、TNF-α 水平均明显降低($P<0.05$),海马 CA1 区突触素表达水平明显升高($P<0.05$)。而 B 组与 C 组均无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 姜黄素有助于改善 APP/PS1 双转基因小鼠海马突触素表达,抑制小鼠炎症反应,改善小鼠认知功能。

【关键词】 姜黄素;APP/PS1 双转基因小鼠;炎症反应;突触素;认知功能

【文章编号】 1009-153X(2018)09-0609-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 742

Effect of curcumin on SYP expression in hippocampal CA1 area, inflammatory response and cognitive function in APP/PS1 double transgenic mice

XIA Xing, XU Zhi-qiang, PENG Xiang. Department of Neurosurgery, The Fourth Hospital of Wuhan, Wuhan 430000, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of curcumin on synatophysin (SYP) expression in hippocampals CA1 area, the inflammatory response and cognitive function in APP/PS1 double transgenic mice. **Methods** Sixty APP/PS1 double transgenic mice aged 6 months were randomly divided into three groups, i.e. group A in which 20 mice were fed with 100 mg/kg/d curcumin for six months, group B in which 20 mice were fed with 300 mg/kg/d curcumin for six months, and group C in which 20 mice were fed with 600 mg/kg/d curcumin. The cognitive function was determined by Morris water maze test and The levels of serum interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) were determined by enzyme linked immunosorbent assay before the treatment and 3 and 6 months after the treatment in all the mice. SYP expression in hippocampal CA1 area was detected by immuinohistochemical technique 6 months after the treatment in all the mice. **Results** The number of passing through the platform and time of staying in the target quadrant were significantly more 3 and 6 months after the treatment respectively than those before the treatment in all the groups ($P<0.05$). Three and six months after the treatment, the number of passing through the platform and time of staying in the target quadrant were significantly more in groups B and C respectively than those in group A ($P<0.05$). The levels of serum IL-6 and TNF-α were significantly lower 3 and 6 months after the treatment respectively than those before the treatment in all the groups ($P<0.05$). Three and six months after the treatment, the levels of serum IL-6 and TNF-α were significantly lower in groups C and B respectively than those in group A ($P<0.05$). The positive rates of SYP expression in the hippocanpal CA1 area were significantly higher in groups B and C respectively than that in group A 6 months after the treatment ($P<0.05$). **Conclusion** Curcumin can improve SYP expression in hippocampal CA1 area, the inflammatory response and cognitive function to a certain extent in dose-and time- dependent form in the APP/PS1 double transgenic mice.

【Key words】 Curcumin; APP/PS1 double transgenic mice; Inflammatory response; Synatophysin; Cognitive function

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 转基因动物模型 APP/PS1 双转基因小鼠的脑内微环境被破坏,神经干细胞增殖和成熟受阻,认知功能明显受损^[1,2]。因此,对 APP/PS1 双转基因小鼠进行治疗研究可能为 AD 治疗方法的选择提供依据。本研究探讨姜黄素对 APP/PS1 双转基因小鼠炎症反应、认知功能以及海马区突触素 (synaptophysin, SYP) 表达的影

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2018.09.011
基金项目:武汉市临床医学科研基金(WZ17Z07)
作者单位:430034,武汉市第四医院西院区神经外科(夏 星、徐治强、彭 翔)

响,为AD临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 APP^{swe}×PS1E9 (APP/PS1) 双转基因雄性小鼠 60 只,均购自南京大学模式动物研究中心,实验动物许可证号:scxk(苏)2010-0001。小鼠均为 6 月龄;体质量 23~31 g,平均体质量 (25.85±2.11)g。小鼠购买后稳定饲养 1 周,按体质量进行编号并根据随机数表随机分为 A 组、B 组和 C 组,每组 20 只。

1.2 喂养方法 A 组采用姜黄素 100 mg/kg/d 加入小鼠饲料喂养,B 组采用姜黄素 300 mg/kg/d 加入小鼠饲料喂养,C 组采用姜黄素 600 mg/kg/d 加入小鼠饲料喂养;3 组小鼠均独立喂养 6 个月。所有小鼠均无明显的不良反应或并发症发生,无死亡,均完成全部实验研究和数据收集。

1.3 Morris 水迷宫检测 用于分析小鼠治疗前、治疗后 3、6 个月认知功能状况。实验共进行 6 d,其中前 2 d 进行训练,入池位置在平台对面或相邻象限,小鼠入水后 60 s 未找到平台者引导至平台并停留 10 s,每天进行 2 次训练;后 4 d 进行测试,第 3~5 天不再对小鼠进行引导,第 6 天撤去平台后进行空间搜索实验,记录 60 s 内小鼠穿越平台次数以及目标象限(原平台象限)停留时间。

1.4 炎症反应指标检测 治疗前、治疗后 3、6 个月采用酶联免疫吸附法检测尾静脉血清白细胞介素(interleukin, IL)-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)-α 等炎症因子水平,具体检测操作根据试剂盒以及仪器说明书要求进行。

1.5 SYP 表达检测 治疗后 6 个月处死小鼠,选择海马 CA1 区部位石蜡包埋并制成 4 μm 厚连续切片,采用免疫组化染色检测比较小鼠海马 CA1 区 SYP 表达情况。在荧光显微镜下出现棕黄色颗粒的细胞核数量少于 25% 为阴性表达,26%~50% 为弱阳性表达,51%~75% 为阳性表达,大于 75% 为强阳性表达,弱阳性、阳性和强阳性表达均计入阳性表达。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 *q* 检验;计数资料采用 χ^2 检验;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组 Morris 水迷宫检测结果比较 姜黄素治疗 3、6 个月,3 组小鼠穿越平台次数和同期目标象限停留时间均明显增加(*P*<0.05)。与 A 组比较,B 组和 C 组

治疗 3、6 个月穿越平台次数和同期目标象限停留时间均明显增加(*P*<0.05)。B 组与 C 组无统计学差异(*P*>0.05)。见表 1。

2.2 3 组炎症反应指标结果比较 姜黄素治疗 3、6 个月,3 组小鼠血清 IL-6、TNF-α 水平均明显降低(*P*<0.05)。与 A 组比较,B 组和 C 组治疗 3、6 个月血清 IL-6、TNF-α 水平均明显降低(*P*<0.05)。B 组和 C 组无统计学差异(*P*>0.05)。见表 2。

2.3 3 组突触素表达水平比较 与 A 组(40.0%, 8/20)比较,B 组(75.0%, 15/20)和 C 组(80.0%, 16/20)SYP

表 1 3 组 Morris 水迷宫学习记忆功能检测结果比较

评估时间	组别	穿越平台次数 (次)	目标象限停留时间(s)
治疗前	A 组	1.46±0.78	10.44±2.11
	B 组	1.41±0.69	10.26±2.89
	C 组	1.38±0.75	10.35±2.62
治疗 3 个月	A 组	2.25±0.87 [#]	14.96±2.96 [#]
	B 组	4.46±1.06 ^{**}	18.93±3.12 ^{**}
	C 组	5.21±1.15 ^{**}	21.18±3.48 ^{**}
治疗 6 个月	A 组	2.86±1.04 [#]	15.78±3.05 [#]
	B 组	5.79±1.25 ^{**}	20.26±3.87 ^{**}
	C 组	6.23±1.38 ^{**}	23.12±4.26 ^{**}

注:与治疗前相应值比, # *P*<0.05;与 A 组相应值比, * *P*<0.05

表 2 3 组血清炎症反应指标检测结果比较

检测时间	组别	IL-6(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)
治疗前	A 组	49.88±6.25	62.16±8.26
	B 组	50.21±5.51	63.75±8.44
	C 组	49.75±6.37	63.39±8.15
治疗 3 个月	A 组	40.87±4.98 [#]	52.66±7.22 [#]
	B 组	33.21±5.43 ^{**}	40.73±6.31 ^{**}
	C 组	32.58±5.25 ^{**}	38.92±6.25 ^{**}
治疗 6 个月	A 组	39.11±6.68 [#]	44.58±6.75 [#]
	B 组	32.95±6.52 ^{**}	34.26±5.42 ^{**}
	C 组	30.43±5.78 ^{**}	31.45±5.11 ^{**}

注:与治疗前相应值比, # *P*<0.05;与 A 组相应值比较, * *P*<0.05;IL-6. 白细胞介素-6;TNF-α. 肿瘤坏死因子-α

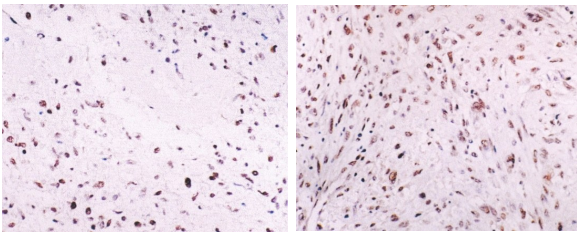


图 1 小鼠海马 CA1 区突触素 SP 法免疫组化染色(×100)
A. 阴性表达;B. 强阳性表达

阳性表达率明显升高($P<0.05$)。B 组和 C 组无统计学差异($P>0.05$)。见图 1。

3 讨论

近年来,随着人口老龄化加剧,AD 等老年相关疾病不断增加,已成为严重影响老年人群健康和生存质量的严重疾病^[3,4]。目前,AD 治疗以西药为主,然而西药具有较大的毒副作用以及长期治疗效果欠佳。姜黄素可通过抗 A β 聚集和促使已经聚集的 A β 解聚,从而预防 A β 42 寡体形成及其对神经细胞细胞的毒性,可改善动物模型的行为学缺陷^[5-7]。

本研究将姜黄素应用于 AD 转基因动物模型 APP/PS1 双转基因小鼠治疗中,结果显示,姜黄素可有效改善小鼠认知功能,且相对于剂量较小的姜黄素,较高剂量的姜黄素效果更佳,但当姜黄素剂量提高到每天 300 mg/kg 之后,其对行为学和认知功能改善效果逐渐趋于最大化,每天 300 mg/kg 和每天 600 mg/kg 姜黄素效果并无统计学差异,同时姜黄素干预 3 个月和 6 个月效果亦无统计学差异。因此,在姜黄素剂量达到每天 300 mg/kg 以及喂养 3 个月以后盲目提高姜黄素剂量和时间对其治疗效果无明显改善效果,然而由于每天 300 mg/kg 和每天 600 mg/kg 的剂量以及 3~6 月的时间差异较大,因此,明确姜黄素应用于 APP/PS1 双转基因小鼠治疗的最佳剂量及时间尚需进一步的更小差异分组研究证实。

星形胶质细胞介导的炎症反应在 AD 的发生发展中至关重要。对 AD 病人及小鼠模型研究发现星形胶质细胞活化,在 A β 斑块的周围这种现象更为明显^[8]。活化的星形胶质细胞有利于 A β 的清除与降解^[9],星形胶质细胞的过度活化也是加重 AD 病理变化的重要原因,A β 的长期集聚可以导致星形胶质过度活化,释放大量的致炎因子,加重脑内炎症反应^[10]。研究表明,姜黄素能减少星形胶质细胞活性,可能是由于姜黄素减少 IL-6 的释放,降低基质金属蛋白酶-9 的活性^[11]。本研究结果显示,APP/PS1 双转基因小鼠血清 IL-6、TNF- α 水平均明显增高,提示其炎症反应严重,而姜黄素治疗后,小鼠血清 IL-6、TNF- α 水平均明显降低,提示姜黄素可能通过控制炎症反应治疗 AD,且相对于剂量较小的姜黄素,较高剂量的姜黄素对其炎症反应控制效果更佳。

SYP 是一种与突触结构与功能密切相关的膜蛋白,是一种位于突触前囊泡内的糖蛋白,属突触终末特异性标记物,参与突触小泡膜与突触前膜的融合和神经递质的释放,而突触连接是神经元之间经信

息传递的关键结构,是学习记忆的神经生物学基础。突触丧失将会引起严重的认知和记忆功能障碍。有研究表明 AD 为突触衰竭性疾病,突触缺陷在 AD 发生发展中具有重要作用,而其动物模型可出现 SYP 表达水平的异常^[12]。Selkoe^[13]通过额、颞叶皮质活检发现,早期 AD 病人皮质的突触密度减小和神经元的突触数目减少。本研究结果显示,姜黄素明显增加小鼠海马 CA1 区 CYP 表达水平。

总之,姜黄素治疗 APP/PS1 双转基因小鼠上调海马区 SYP 表达、改善炎症反应及认知功能,并呈剂量依赖性,当黄素剂量提高到每天 300 mg/kg 和喂养 3 个月之后,增加剂量和时间,效果并无明显改善。

【参考文献】

[1] Xing S, Shen D, Chen C, *et al.* Effect of the herbal formulation Shen-Zhi-Ling on an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease by modulating the biliverdin reductase/heme oxygenase 1 system [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(3): 1961-1966.

[2] Hu L, Wang B, Zhang Y. Serotonin 5-HT₆ receptors affect cognition in a mouse model of Alzheimer's disease by regulating cilia function [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2017, 9(1): 76.

[3] Yin K, Jin J, Zhu X, Yu L, *et al.* CART modulates beta-amyloid metabolism-associated enzymes and attenuates memory deficits in APP/PS1 mice [J]. *Neurol Res*, 2017, 39(10): 885-894.

[4] 朴钟源,姚丽芬,宋琳,等.地黄饮子对 APP/PS1 小鼠行为学和 RAGE/p38 信号通路的影响[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2017, 26(7): 577-581.

[5] Yanagisawa D, Ibrahim NF, Taguchi H, *et al.* Curcumin derivative with the substitution at C-4 position, but not curcumin, is effective against amyloid pathology in APP/PS1 mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(1): 201-210.

[6] 王宇,贾树红,刘蕾,等.姜黄素对 APP^{swe}/PS1^{dE9} 转基因小鼠空间学习与海马 HSP70 蛋白表达的影响[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2015, 24(6): 481-484.

[7] 党惠子,魏鹏,陈晓培,等.姜黄素对阿尔茨海默病模型小鼠胰岛素受体底物-1 的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2015, 38(3): 167-171, 后插 2.

[8] Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2006, 368: 387-403.

[9] Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's

- disease [J]. Science, 2006, 314: 777-781.
- [10] Yao HH, Ding JH, Zhou F, *et al.* Enhancement of glutamate uptake mediates the neuroprotection exerted by activating group II or III metabotropic glutamate receptors on astrocytes [J]. J Neurochem, 2005, 92: 948-961.
- [11] Seyedzadeh MH, Safari Z, Zare A, *et al.* Study of curcumin immunomodulatory effects on reactive astrocyte cell function [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 22(1): 230-235.
- [12] 周妍妍,刘艳丽,董春雪,等. 五味子醇甲对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠脑组织突触素、 α -突触核蛋白表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(8): 1076-1078.
- [13] Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure [J]. Science, 2002, 298(5594): 789.
- (2018-03-23 收稿, 2018-08-28 修回)

