

鼠尾草酸对 $A\beta$ 损伤海马神经元的保护作用研究胡炜彦^{1,2}, 于浩飞¹, 张荣平^{1*}¹昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室; ²昆明医科大学分子医学临床研究院暨云南省干细胞与再生医学重点实验室, 昆明 650500

摘要: 采用 $A\beta$ 诱导建立海马神经元损伤模型, CCK-8 检测神经元的活性, RT-PCR 检测神经元凋亡相关基因 Caspase-3 mRNA 的表达, 探讨了鼠尾草酸对 $A\beta$ 所致海马神经元损伤的保护作用及其机制。结果显示, 浓度在 5 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 鼠尾草酸预处理能显著下调 $A\beta$ 损伤导致的 Caspase-3 mRNA 表达的升高, 增强神经元活力。表明鼠尾草酸预处理可以保护 $A\beta$ 所致小鼠海马神经元的损伤, 其机制可能与鼠尾草酸调控神经元凋亡相关基因 caspase-3 mRNA 的表达有关。

关键词: 鼠尾草酸; 神经元; Caspase-3; 细胞活力

中图分类号: R96

文献标识码: A

Protective Effect of Carnosic Acid on β -Amyloid Protein Induced Hippocampal Neuron InjuryHU Wei-yan^{1,2}, YU Hao-fei¹, ZHANG Rong-ping^{1*}¹School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University; ²Institute of Molecular and Clinical Medicine & The Key Laboratory of Stem Cell and Regenerative Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

Abstract: The hippocampal neuron injury model established with β -amyloid protein ($A\beta$) was used to study the protective effects of carnosic acid on the toxic damage of hippocampal neuron. The viability of neuron was determined with CCK-8 assay, and mRNA levels of Caspase-3 were measured by RT-PCR in each experimental groups to analysis the influences of carnosic acid on the injured neuron. The results showed that the ability of carnosic acid protecting neuron from injury was enhanced obviously at 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$, and the expression of Caspase-3 mRNA were decreased while the livability of neuron was increased. These results indicated that carnosic acid can protect $A\beta$ induced hippocampal neuron injury, which was possibly through Caspase-3 signaling pathway.

Key words: carnosic acid; hippocampal neuron; Caspase-3; cell viability

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 是以细胞外间隙 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, $A\beta$) 沉积所形成的老年斑 (senile plaque, SP)、细胞内异常磷酸化的 tau 蛋白聚集所形成的神经纤维缠结 (Neurofibrillary tangle, NFT) 和神经元突触连接丢失为主要病理特征的中枢神经系统退行性疾病, 患者表现为记忆力进行性减退, 并伴有不同程度的认知、语言和人格障碍, 生活无法自理, 给家庭和社会造成了巨大的经济负担, 随着我国人口逐年老龄化, 其发病率也在不断上升, 该病已成为当前迫在眉睫必须解决的社会问题^[1]。但目前 AD 仍缺乏有效的防治

药物。

迷迭香 (*Rosmarinus officinalis* L.), 为唇形科迷迭香属多年生常绿小灌木, 原产于地中海沿岸地区, 以法国、西班牙、意大利、摩洛哥、南斯拉夫等国为主要栽培地区, 近年来已在云南、贵州等地大面积栽培^[2]。有研究表明, 迷迭香提取物具有免疫调节、抗炎、抗癌等多种活性, 被广泛应用于食品、化妆品工业中^[3-5]。有研究认为迷迭香提取物具有延缓衰老的作用, 能够提高果蝇体内抗氧化酶活性, 抑制脂质过氧化, 延长果蝇的寿命^[6]。鼠尾草酸是从迷迭香中提取的具有抗氧化活性的一种高效天然抗氧化剂, 有研究发现, 鼠尾草酸能够保护氧化和光照引起的视网膜退化, 在培养的 PC12 细胞和神经元中, 鼠尾草酸具有神经营养活性^[7-9]。但关于鼠尾草酸在

收稿日期: 2013-01-22 接受日期: 2013-09-05

基金项目: 云南省高校重点实验室基金项目 (2011YXZD07)

* 通讯作者 E-mail: zhrp@163.com

神经元保护方面报道较少,因此,本研究拟利用不同剂量的鼠尾草酸预处理,研究鼠尾草酸对 $A\beta$ 损伤海马神经元的保护作用。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

孕 18 d C57 小鼠,购于昆明医科大学实验动物学部,合格证号:SCXK(滇)-2011004。

1.2 试剂与仪器

Neurobasal medium、DMEM、Tyrpsine、DPBS、HB-SS、P/S、FBS、B27、CCK-8 等均购自 Invitrogen。鼠尾草酸(云南瑞生生物科技有限公司容辉提供),使用前 DMSO 溶解配制成 10 mmol/L 的溶液,避光保存。 $A\beta$ (购自 Sigma 公司)。

RNA 提取试剂盒、PCR 试剂盒,购自宝生物工程(大连)有限公司;GAPDH 及 Caspase-3 基因引物均由 Invitrogen 公司(上海)合成。GAPDH, F: TGACGTGCCGCTGGAGAAA, R: AGTG-TAGCCCAAGATGCCCTTCAG; Caspase-3, F: ACCGAT-GTCGATGCAGCTAA, R: GGTGCGGTAGAGTAAGCATA。

2 实验方法

2.1 小鼠海马神经元的分离和培养

取孕龄为 18 d 的 C57 小鼠,脱臼处死后无菌操作取出胎鼠的海马,剪碎,0.125% Tyrpsine 37 °C 消化 15 min,用含 10% FBS 的 DMEM 终止消化后,75 μ m 筛网滤过,滤液 1000 rpm 离心 5 min,弃上清。加 Neurobasal medium 混悬,1000 rpm 离心 5 min,弃上清。加 Neurobasal medium 混悬,测细胞浓度,调整细胞浓度为 2×10^5 个/mL,接种于用 poly-l-lesine (0.01% solution)包被过的 96 孔板和 6 孔板中(96 孔板,120 μ L/孔;6 孔板,2 mL/孔)。培养 72 h 后加入终浓度为 2.5 mg/L 阿糖胞苷纯化神经元。于第 7 d 用于实验。

2.2 神经元总 RNA 提取

原代培养的海马神经元于培养第 7 d,加入设定浓度的鼠尾草酸预处理 30 min,加入终浓度 0.5

μ mol/L 的 $A\beta$ 损伤神经元,加入相同体积 DMSO 作试剂空白对照组。24 h 后,加入 Trizol 裂解液,按 RNA 提取试剂盒说明书操作,提取总 RNA。

2.3 RT-PCR 反应

RT-PCR 操作按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行。反应体系及扩增条件如下:逆转录体系包括标本总 RNA 500 ng, Primer script Buffer 5 μ L, RT enzyme 1.25 μ L, Oligo (dT) 1.25 μ L, Radom 6 mers 5 μ L, Rnasefree dH₂O 补齐至 25 μ L。37 °C 反应 15 min, 85 °C 反应 5 sec, cDNA 置 4 °C 保存。

PCR 反应体系包括 PCR Buffer 5 μ L, 上游引物 0.20 μ L, 下游引物 0.20 μ L, cDNA 产物 1 μ L 加 ROX Reference Dye 0.20 μ L, Rnasefree ddH₂O 2.8 μ L 至总体系为 10 μ L。95 °C 30 sec, 95 °C 20 sec, 55 °C 20 sec, 72 °C 30 sec, 72 °C 10 sec, 40 个循环。

2.4 神经元细胞活力测定

原代培养的海马神经元于培养第 7 d,加入设定浓度的鼠尾草酸预处理 30 min,加入终浓度 0.5 μ mol/L 的 $A\beta$ 损伤神经元。24 h 后,每孔加入 20 μ L CCK-8 溶液,设定加入相应量细胞培养液、药物和 CCK-8 溶液但没有加入细胞的孔作为空白对照。在细胞培养箱内继续孵育 1 h 后,在 450 nm 测定各孔吸光度。

2.5 统计分析

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验数据使用 SPSS 11.0 统计软件包,采用单因素 ANOVA(方差分析)方法进行显著性检验。

3 实验结果

3.1 鼠尾草酸对 $A\beta$ 损伤海马神经元凋亡相关基因 Caspase-3 mRNA 表达的影响

RT-PCR 检测结果表明,0.5 μ mol/L 的 $A\beta$ 作用于神经元 24 h 后,海马神经元 Caspase-3 mRNA 的表达显著性升高;与模型组相比,鼠尾草酸预处理(5、10 μ mol/L)组, Caspase-3 mRNA 表达明显下降,结果提示鼠尾草酸能够逆转 $A\beta$ 引起的海马神经元 Caspase-3 mRNA 表达的升高,见表 1 和图 1。

表 1 鼠尾草酸对 Caspase-3 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of carnosic acid on the expression of Caspase-3 mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别 Group	药物 Medication	Caspase-3 mRNA
空白对照组 Blank group	DMSO	0.99 \pm 0.11

模型组 ($A\beta$ 组) Model ($A\beta$ group) $A\beta$ (0.5 $\mu\text{mol/L}$) $1.86 \pm 0.14^{a**}$

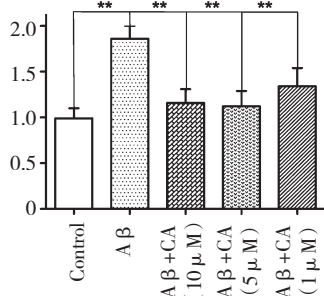
鼠尾草酸高剂量组 High dose carnosic acid group

 $A\beta$ + 鼠尾草酸 10 $\mu\text{mol/L}$ ($A\beta$ + carnosic acid 10 $\mu\text{mol/L}$) $1.16 \pm 0.15^{b**}$

鼠尾草酸中剂量组 Middle dose carnosic acid group

 $A\beta$ + 鼠尾草酸 5 $\mu\text{mol/L}$ ($A\beta$ + carnosic acid 5 $\mu\text{mol/L}$) $1.12 \pm 0.17^{b**}$

鼠尾草酸低剂量组 Low dose carnosic acid group

 $A\beta$ + 鼠尾草酸 1 $\mu\text{mol/L}$ ($A\beta$ + carnosic acid 1 $\mu\text{mol/L}$) $1.34 \pm 0.20^{b**}$ 注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$,^{a**} $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^{b**} $P < 0.01$ 。Note: Compare with blank group,^a $P < 0.05$,^{a**} $P < 0.01$; Compare with model group,^b $P < 0.05$,^{b**} $P < 0.01$.图1 鼠尾草酸对 Caspase-3 mRNA 表达的影响 ($n = 5$)Fig. 1 Effect of carnosic acid on the expression of Caspase-3 mRNA ($n = 5$)

3.2 鼠尾草酸对 $A\beta$ 损伤海马神经元细胞活力的影响

CCK-8 检测结果表明,0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 $A\beta$ 作用于神经元 24 h 后,可显著降低小鼠海马神经元的细

表2 鼠尾草酸对海马神经元细胞活力的影响 ($x \pm s, n = 4$)Table 2 Effects of carnosic acid on hippocampal neuron cell viability ($x \pm s, n = 4$)

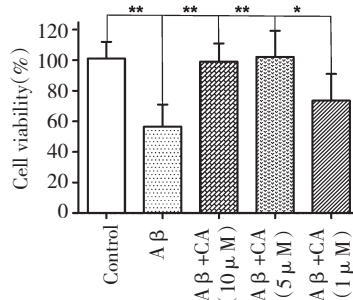
组别 Group	药物 Medication	细胞活力 Cell viability (%)
试剂空白对照组 Blank group	DMSO	101.0 ± 11.0
模型组 ($A\beta$ 组) Model group	$A\beta$ (0.5 $\mu\text{mol/L}$)	$56.6 \pm 14.1^{a**}$
鼠尾草酸高剂量组 High dose carnosic acid group	$A\beta$ + 鼠尾草酸 10 $\mu\text{mol/L}$ ($A\beta$ + carnosic acid 10 $\mu\text{mol/L}$)	$99.0 \pm 11.9^{b**}$
鼠尾草酸中剂量组 Middle dose carnosic acid group	$A\beta$ + 鼠尾草酸 5 $\mu\text{mol/L}$ ($A\beta$ + carnosic acid 5 $\mu\text{mol/L}$)	$102.2 \pm 17.1^{b**}$
鼠尾草酸低剂量组 Low dose carnosic acid group	$A\beta$ + 鼠尾草酸 1 $\mu\text{mol/L}$ ($A\beta$ + carnosic acid 1 $\mu\text{mol/L}$)	$73.5 \pm 17.6^{b*}$

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$,^{a**} $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^{b**} $P < 0.01$ 。Note: Compare with blank group,^a $P < 0.05$,^{a**} $P < 0.01$; Compare with model group,^b $P < 0.05$,^{b**} $P < 0.01$.

4 讨论

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 又称老年性痴呆,是一种老年性中枢神经系统退行性疾病。AD 的病因病理及治疗仍是一个世界性难题。国内外的研究者已从不同角度提出了 AD 发病机制学说,如基因突变假说、胆碱能功能下降假说、炎症假说、Tau 磷酸化假说、淀粉样蛋白假说、氧化应激及兴奋性毒性假说、凋亡假说等。其中,氧化应激 (oxidative stress) 和凋亡在衰老中的作用越来越受到人们的重视。细胞内活性氧和抗氧化剂之间保持

胞活力;与模型组相比,鼠尾草酸预处理 (5、10 $\mu\text{mol/L}$) 组,小鼠海马神经元细胞活力明显增强,结果提示鼠尾草酸能够逆转 $A\beta$ 引起的海马神经元细胞活力的降低,见表 2 和图 2。

图2 鼠尾草酸对细胞活力的影响 ($n = 4$)Fig. 2 Effects of carnosic acid on hippocampal neuron cell viability ($n = 4$)

着动态平衡,当活性氧化能力超出内源性抗氧化剂的清除能力时,细胞即进入氧化应激 (oxidative stress) 状态。导致细胞老化、死亡等氧化损伤。越来越多的研究证明,氧化应激直接参与了 AD 等多种神经退行性疾病的病理过程。AD 患者在未出现特征性病理改变之前即可发生明显的氧化损伤^[10-12]。

细胞活性的高低可以反映细胞的代谢与增殖。Cell Counting Kit-8 简称 CCK-8 试剂盒,是一种基于 WST-8 的广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速高灵敏度检测试剂盒。WST-8 是一种类似于 MTT 的

化合物,在电子耦合试剂存在的情况下,可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的 formazan。细胞增殖越多越快,则颜色越深;细胞毒性越大,则颜色越浅。对于同样的细胞,颜色的深浅和细胞数目呈线性关系。

A β 是 β -APP 的病理性裂解产物,具有明显的神经毒素作用。脑内 A β 的聚集、沉积所引发的淀粉样蛋白级联反应是 AD 病理过程中的重要步骤,是“NFT”形成、神经元变性及缺失的起始因素,A β 主要通过产生活性氧使神经细胞对各种伤害性刺激的反应增强或放大,以及促神经细胞凋亡等方式发挥其神经毒作用。A β 的毒性作用刺激和活化凋亡通路中的上游 caspase,经酶级联放大反应激活 caspase-3,加速 APP 的水解、A β 的生成和聚集,促进神经细胞凋亡^[13]。Caspase-3 的裂解活化直接导致细胞的死亡,故在细胞凋亡的研究中较常见。

本次实验研究发现:中、高剂量的鼠尾草酸均能够显著降低 A β 引起的海马神经元 Caspase-3 mRNA 表达的升高,逆转 A β 引起的海马神经元细胞活力的降低。因此认为,鼠尾草酸对 A β 引起的小鼠海马神经元损伤的保护作用可能是通过逆转 Caspase-3 mRNA 的表达起作用的。

参考文献

- 1 Alzheimer's Association. 2011 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Dement*,2011,7:208-244.
- 2 Ouyang N(欧阳宁),Zhang ZJ(张正居),Wang WY(王卫亚),*et al.* The Acclimatization of *Rosemarinus officinalis* and analysis of the essential oil. *Chin Bull Botan*,1990,7(3):42-44.
- 3 Liu SD(刘士德),Yu YW(余玉雯),Zhang JH(张建华),*et al.* Studies on application of *Rosemarinus officinalis* L. antioxidant extract. *Food Sci*,2003,24(2):95-99.

- 4 Du JQ(杜纪权),Xu H(徐宏),Cao Y(曹庸),*et al.* Antioxidantive effect of rosemary extracts on corn oil. *Mod Food Sci Technol*,2011,27:400-403.
- 5 Xie YJ(谢阳姣),Shi XY(时显芸),He ZP(何志鹏). Research progress of *Rosmarinus officinalis* L. *J Anhui Agric Sci*,2010,38:2951-2952.
- 6 Zhang ZS(张泽生),Wen SP(温生萍),Wang H(王浩),*et al.* Study on antisenescence potential of *Rosmarinus officinalis* extract. *Food Res Dev*,2012,33:149-152.
- 7 Cheng WX(程伟贤),Chen HY(陈鸿雁),Zhang YP(张义平),*et al.* Studies on the chemical constituents of *Rosmarinus officinalis* L. *Chin Tradit Herb Drugs*,2005,36:1622-1624.
- 8 Rezaie T,McKercher SR,Kosaka K,*et al.* Protective effect of carnosic acid, a proelectrophilic compound, in models of oxidative stress and light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2012,53:7847-7854.
- 9 Maruoka H, Sasaya H, Sugihara K, *et al.* Low-molecular-weight compounds having neurotrophic activity in cultured PC12 cells and neurons. *Biochemistry*,2011,150:473-475.
- 10 Aliev G,Obrenovich ME,Reddy VP,*et al.* Antioxidant therapy in Alzheimer's disease: theory and practice. *Mini Rev Med Chem*,2008,8:1395-1406.
- 11 Shi Q,Gibson GE. Oxidative stress and transcriptional regulation in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*,2007,21:276-291.
- 12 Kim MJ, Lee J, Seong AR, *et al.* Neuroprotective effects of *Eriobotrya japonica* against β -amyloid-induced oxidative stress and memory impairment. *Food Chem Toxicol*,2011,49:780-784.
- 13 Dumanchin-Njock C, Alves DCC, Mercken L, *et al.* The caspase-derived C-terminal fragment of beta APP induces caspase-independent toxicity and triggers selective increase of Abeta42 in mammalian cells. *J Neuro Chem*,2001,78:1153-1161.