

文章编号:1001-6880(2016)11-1793-04

大蒜素对阿尔茨海默病模型 小鼠脑内 TNF- α 表达的影响

张 浩^{1*}, 王 翊², 潘 海¹¹沈阳医学院附属中心医院第二神经外科, 沈阳 110024; ²辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847

摘要:本文应用免疫荧光、Western blot 及 Real-Time PCR 等实验方法检测大蒜素对阿尔茨海默病模型小鼠脑内 TNF- α 表达的影响。结果发现,与对照组小鼠相比,模型组小鼠脑内 TNF- α 的阳性表达增加,提示在 APP/PS1 转基因小鼠组织中存在神经免疫炎症反应,而大蒜素处理组 TNF- α 表达明显低于模型组小鼠。基于此结果,说明大蒜素可以降低阿尔茨海默病模型小鼠脑内 TNF- α 的表达,提示大蒜素在阿尔茨海默病的抗炎临床治疗方面具有重要的理论意义。

关键词:大蒜素;阿尔茨海默病;APP/PS1 转基因小鼠;肿瘤坏死因子- α

中图分类号:R941.02

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.019

Effect of Allicin on TNF- α Expression in Mice with Alzheimer's Disease

ZHANG Hao^{1*}, WANG Yue², PAN Hai¹

¹The Second Department of Neurosurgery, the Affiliated Central Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China; ²Department of Tissue Culture, Liaoning University of Tradition Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Abstract: In this study, the effect of allicin on the expression of TNF- α in the brain of transgenic mice was investigated by immunofluorescence, Western blot and Real-Time PCR assays. It was found that the expression of TNF- α in APP/PS1 transgenic mice increased compared with the wild-type mice. These results suggested that there were inflammation reaction in APP/PS1 transgenic mouse brain, but the expression of TNF- α in allicin treatment group was significantly lower than that in APP/PS1 transgenic mice. These results prompt that there were inflammation reaction in APP/PS1 transgenic mouse brain. TNF- α expression in allicin treatment group was lower than that in APP/PS1 transgenic mice.

Key words:allicin; Alzheimer's disease; APP/PS1 transgenic mice; TNF- α

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)又称老年痴呆,是在老年期发生的神经系统退行性疾病,临幊上以隐袭起病、进行性智能衰退、认知功能障碍、并伴有人格改变等为主要特征。到目前为止,其发病的确切原因仍然不清楚。众多研究表明,炎症反应是AD脑内主要的神经病理改变之一,提示脑内免疫炎症反应可能参与了AD发生发展的病理过程,是AD病理机制之一^[1-3]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是一种重要的细胞因子,以往研究显示,在AD大脑皮层中TNF- α 明显升高,并且在转基因小鼠脑内TNF- α 过表达能引起严重的炎症反应和神经元变性^[4],TNF- α 引起神经元损伤的机制可能是:TNF- α 直接产生神经毒性,也可诱导胶质细胞释放IL-1 β 、IL-6等其它细胞因子及

NO等毒性物质,间接损伤神经元。因此,TNF- α 被视为一种始动因子,驱动众多细胞因子产生,并相互作用引起级联反应,成为阿尔茨海默病的一种潜在的发病机制^[5]。

大蒜素(Diallyl trisulfide, DATS)又名大蒜新素,是大蒜的主要成分,化学名为二烯丙基三硫化物,其结构式为 $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CH}-\text{S}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH} = \text{CH}_2$, DATS具有较好的脂溶性,可通过血脑屏障,具有消炎、清除自由基、防癌等多种生物学功能,从而起到保护细胞的作用。有文献报道,大蒜素对动脉粥样硬化模型中TNF- α 介导的炎症反应具有一定的抑制作用,并且有抑制由TNF- α 诱导的平滑肌细胞迁移和增殖作用^[6]。本研究选取AD常用小鼠模型即APP/PS1转基因小鼠,经大蒜素处理后,采用免疫荧光技术、Western blot 和 Real-Time PCR 等实验方法分析大蒜素对APP/PS1转基因小鼠脑内小胶质细胞过

度激活产生的 TNF- α 表达的影响,确立将大蒜素作为 AD 等神经退行性疾病治疗的新策略提供充分的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 药品

大蒜素(江苏正大清江制药有限公司); β -actin、TNF- α 、Alexa Fluor 555-labeled goat anti-rabbit IgG、HRP-labeled goat anti-rabbit IgG 等抗体(Cell Signaling Technology);PVDF 膜、蛋白 marker (NEB 公司);ECL 发光试剂盒(Pierce 公司)。

1.1.2 实验仪器

低温离心机,紫外分光光度计,BIO-RAD 凝胶图像分析系统,水平摇床,恒温水浴箱,Bio-RAD 酶标仪。Leica 石蜡切片机,Olympus 显微镜,垂直电泳仪,超声粉碎机,高压锅,转印仪,小型台式离心机,涡旋混合器,冷冻切片机,电子显微镜等。

1.1.3 实验动物与分组

取 3 月龄健康雄性 APP/PS1 转基因小鼠 20 只、C57BL/6 野生型小鼠 10 只,实验动物分笼饲养,每笼 3~4 只,自由饮食,10/12 h 昼夜交替饲养,饲养室温度保持在 20~25 ℃。根据 SPSS 统计软件产生随机数字将 APP/PS1 转基因小鼠分为模型组和大蒜素干预组,每组 10 只;同月龄 C57BL/6 设为正常对照组。具体给药方法如下:对照组:3 月龄 C57BL/6 小鼠,隔日上午 10 时生理盐水灌胃,连续 3 个月;模型组:3 月龄 APP/PS1 转基因小鼠,隔日上午 10 时生理盐水灌胃,连续 3 个月;大蒜素给药组:3 月龄 APP/PS1 转基因小鼠,按 10 mg/kg 进行隔日上午 10 时大蒜素灌胃给药,连续 3 个月。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠脑组织取材

各组小鼠麻醉后断头,将大脑迅速取出并放于冰上,从中间矢状缝切开,一半放入 4% 多聚甲醛中固定,常规制备冰冻切片,用于免疫荧光染色;另一半放入 EP 管内,-80 ℃ 保存备用,用于 Western blot 等分子生物学指标检测。

1.2.2 Western blot 检测

各组小鼠海马组织分别称重,小剪刀剪碎样品(冰上操作),按 1:5 比例加入蛋白裂解液,超声粉碎,4 ℃ 裂解过夜,4 ℃ 12000 rpm 低温离心 30 min,取上清,BCA 蛋白浓度测定,每管 8 μ g 蛋白分装,-

80 ℃ 冻存待用。

10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品,4 ℃ 转膜过夜,5% 脱脂奶粉封闭,TNF- α 抗体(1:3300)(1:3300)4 ℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,ECL 发光(ECL 试剂盒,Pierce,CA),Kodak-XAR 胶片曝光、显影。洗膜重新封闭后, β -actin 抗体(1:12 000)孵育,二抗孵育,发光,胶片曝光显影。以 β -actin 作为上样量参照标准。胶片扫描后,用 Image-pro Plus 6.0 软件包分析。

1.2.3 免疫荧光染色和共聚焦激光扫描显微术

切片正常驴血清室温预孵育 1 h,TNF- α 抗体(1:100)孵育,4 ℃ 过夜。切片经 0.01 M 的磷酸盐缓冲液(pH 7.4)充分漂洗后,用驴抗兔 IgG(1:200)室温孵育 2 h,漂洗后甘油封片剂封片。共聚焦激光扫描显微镜下观察实验结果并拍照,图片经 Photoshop 8.0 软件处理并打印。

1.2.4 Real-Time PCR 分析

RNA 提取,取各组小鼠脑组织于 EP 管中,加 Trizol 500 μ L,超声粉碎,4 ℃ 裂解。加氯仿 250 μ L,涡旋混匀。离心 15000 转,5 min。取上清,加等体积的 70% 乙醇,离心 1000 rpm,1 min。加 buffer I 500 μ L,离心 1000 转 1 min。加 buffer II 500 μ L,离心 1000 转 1 min。加 dd H₂O 40 μ L,离心 13000 转 2 min。反转录 RT-PCR。提取各组小鼠皮层的总 RNA 后,以 GAPDH 为内参,采用 Real-Time PCR 方法分析 TNF- α 的表达水平。

1.2.5 统计分析

本实验所有数据均采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析处理,对数据进行 One-way ANOVA 分析,结果以均值 \pm 标准差表示($X \pm SD$), $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 实验结果

2.1 免疫荧光结果

应用免疫荧光双标和共聚焦激光扫描显微术观察小鼠大脑皮层 TNF- α 表达水平,结果显示,模型组小鼠脑内可见明显的 TNF- α 阳性表达,大蒜素灌胃干预后,阳性表达水平较模型组小鼠明显降低(图 1)。

2.2 Western blot 和 Real-Time PCR 结果

Western blot(图 2A)及 Real-Time PCR(图 2B)实验结果显示,APP/PS1 转基因小鼠脑内,TNF- α 在蛋白水平和 mRNA 水平表达均较对照组明显升高

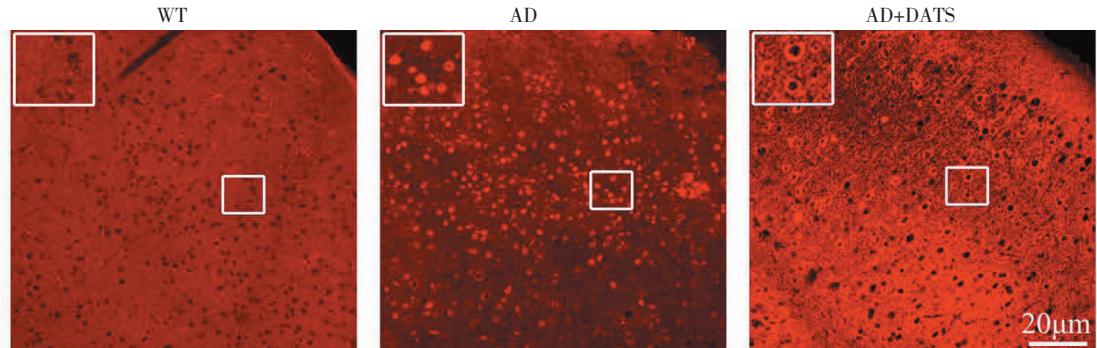


图 1 大蒜素对 APP/PS1 转基因小鼠脑内 TNF- α 的影响

Fig. 1 Effect of allicin on TNF- α expression in the cortex of APP/PS1 transgenic mice

($P < 0.01$),给予大蒜素灌胃处理后,TNF- α 表达水平较 APP/PS1 转基因组小鼠明显降低($P < 0.05$),

实验结果具有统计学意义。

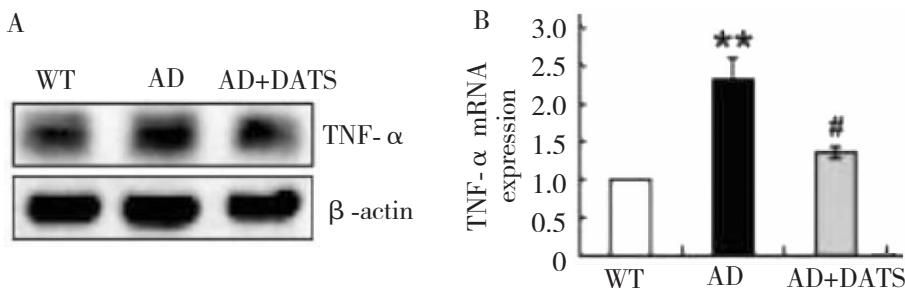


图 2 大蒜素对 APP/PS1 转基因小鼠脑内 TNF- α 表达的影响

Fig. 2 Effect of allicin on the TNF- α expression in APP/PS1 transgenic mice

注:A、Western blot 法检测三组小鼠脑内 TNF- α 蛋白水平的表达变化;B、Real-Time PCR 法检测大蒜素对 APP/PS1 转基因小鼠脑组织中 TNF- α 在 mRNA 水平的表达影响,* * $P < 0.01$,# $P < 0.05$

Note: A. Western Blot method was used to detect the expression of TNF- α in mice from three groups; B. The effect of allicin on the expression of TNF- α detected by Real-Time PCR in the APP/PS1 transgenic mouse brain, * * $P < 0.01$, # $P < 0.05$

3 讨论与结论

最新研究认为 AD 与炎症密切相关,损害的神经元和神经元纤维缠结都是炎症刺激物,刺激机体产生炎症因子,而炎症因子的存在又可能增加 AD 的发病风险,并成为 AD 的发病机制之一,转基因动物实验表明,非甾体类抗炎药物(如布洛芬等)能明显减少小鼠脑内 A β 沉积、炎性细胞数量,显著降低炎性因子水平^[7,8];大量流行病学调查也表明,长期服用非甾体类抗炎药(NSAIDs)能够降低 AD 发病的危险性并延迟发病^[2]。以上研究证据表明炎症反应参与了 AD 的病理过程,可能在 AD 发病机制中具有重要作用。因此,近些年炎症因子与 AD 发病风险之间的关系是 AD 研究的热点问题。目前认为至少有 10 种炎症因子与 AD 相关。TNF- α 是目

前研究较多的炎症因子,它们在 AD 患者脑组织局部分泌均增多。其中 TNF- α 由活化的小胶质细胞被刺激过度激活时产生,小胶质细胞被激活后形态发生明显变化,数量增多,胞质深染,体积增大,由静息状态时的分枝状细胞变成形态不规则的阿米巴样细胞^[9]。

近年来,大蒜素的生理和药理功效引起了人们的关注,临床显示大蒜素具有很好的抗炎及消炎、抗氧化、抗血凝、降血脂和防止动脉粥样硬化的功效,同时还有抗尿糖、保护肝功能、抗肿瘤和预防衰老等作用,同时大蒜素作为一种具有良好发展前景的天然抗氧化药物,对脑缺血再灌注大鼠海马神经元具有保护作用^[10],而氧化应激和海马神经元的损伤是阿尔茨海默病的主要发病机制,其机制可能与大蒜素抗炎作用有关^[11];也有研究表明,大蒜素改善 AD

模型小鼠学习能力和记忆功能^[12],进而延缓和预防AD的神经病理学改变。本实验通过形态学及分子生物学常用实验方法对大蒜素干预后的APP/PS1转基因小鼠脑内炎症因子TNF- α 的进行检测,发现大蒜素干预后,APP/PS1转基因小鼠脑内TNF- α 表达水平较APP/PS1转基因小鼠组明显减少,这一结果提示大蒜素可以降低AD模型小鼠脑内的炎症反应,最终起到对大脑神经元的保护作用。

参考文献

- 1 Hampel H, Shen Y, Walsh DM, et al. Biological markers of amyloid β -related mechanisms in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 2010, 223:334-346.
- 2 Hirohata M, Ono K, Naiki H. Non-steroidal anti-inflammatory drugs have anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils *in vitro*. *Neuropharmacology*, 2005, 49: 1088-1099.
- 3 Heneka MT, O'Banion MK, Terwel D. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 2010, 117:919-947.
- 4 Akassoglou K, Probert L, Kontogeorgos G. Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *J Immunol*, 1997, 158:438-445.
- 5 Meda L, Baron P, Scarlato G. Guglielmo Scarlato. Glial acti-vation in Alzheimer's disease; the role of Abeta and its associated proteins. *Neurobiology Aging*, 2001, 22:885-893.
- 6 Cai H, Ma JL, Jiang TT, et al. Alliin and Allicin inhibits inflammatory reaction induced by tumor necrosis factor alpha. *Chin J Arterioscler*, 2012, 20(12):16-20.
- 7 Townsend KP, Pratico D. Novel therapeutic opportunities for Alzheimer's disease; focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *FASEB J*, 2005, 19:1592-1601.
- 8 Miao JT, Zhang W, Yin R, et al. S14G-Humanin ameliorates Abeta25-35-induced behavioral deficits by reducing neuroinflammation responses and apoptosis in mice. *Neuropeptides*, 2008, 42:557-567.
- 9 Gao JH, Yan ZF, Zhang W. Microglia NOX2 is a potential target for the progressive degeneration of dopaminergic neurons driven by nerve immune inflammation. *Chin J Neurol*, 2011, 446:426-429.
- 10 Jia HZ, Shi ZX, Li G. Dynamic effect of allicin myocardial blood flow. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2001, 7:41-43.
- 11 Zheng YH, Chen CH. The study of the protective effect of allicin on acute cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *Chin Pharmacol Bull*, 2004, 20:821-823.
- 12 Psychari SN, Apostolou TS, Sinos L, et al. Relation of elevated C-reactive protein and interleukin-6 levels to left atrial size and duration of episodes in patients with atrial fibrillation. *Am J Cardiol*, 2005, 95:764-767.