

# 石杉碱甲对阿尔茨海默病转基因小鼠脑内 $\beta$ -淀粉样蛋白表达的影响

张海波<sup>1\*</sup>, 孙 阳<sup>2</sup>

<sup>1</sup>沈阳医学院附属中心医院神经外二科, 沈阳 110024; <sup>2</sup>沈阳急救中心, 沈阳 110000

**摘要:** 本文主要观察石杉碱甲对阿尔茨海默病转基因小鼠脑内  $\beta$ -淀粉样蛋白表达的影响。应用免疫荧光技术检测  $A\beta$  在 C57BL/6 野生型小鼠、APP/PS1 转基因小鼠及石杉碱甲治疗组小鼠脑内的表达情况, 同时应用 Western blot 和 Real-Time PCR 的方法检测  $A\beta$  形成所需的  $\beta$ -、 $\gamma$ -分泌酶亚基 Bace1 及 PS1 在脑内的表达。结果发现石杉碱甲治疗后的 AD 模型小鼠脑内  $A\beta$  表达及含量与 AD 组相比明显减少, Bace1 及 PS1 的表达都有明显的减少。以上结果说明石杉碱甲可通过降低 APP/PS1 转基因小鼠脑内 Bace1、PS1 的表达进而降低  $\gamma$ -分泌酶的活性, 从而使 AD 小鼠脑内的  $A\beta$  蛋白表达水平下降, 提示石杉碱甲在 AD 的临床治疗方面具有重要的理论意义。

**关键词:** 石杉碱甲; APP/PS1 转基因小鼠;  $A\beta$ ; Bace1; PS1

中图分类号: R741.02

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.2.019

## Effect of Huperzine A on the Expression of Amyloid $\beta$ -Protein in Transgenic Mice Brain of Alzheimer's Disease

ZHANG Hai-bo<sup>1\*</sup>, SUN Yang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The second Department of Neurosurgery, the Affiliated Central Hospital of Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China; <sup>2</sup>Shenyang First Aid Center, Shenyang 110000, China

**Abstract:** In this study, the effect of huperzine A on the expression of amyloid  $\beta$ -protein ( $A\beta$ ) in the brain of transgenic mice was investigated. The levels of  $A\beta$  in wild type, APP/PS1 transgenic mice group and the treatment mice group were tested immunofluorescence. The expression of Bace1 and PS1 which are essential for  $\beta$ -/ $\gamma$ -secretase activity was detected by Western blot and Real-Time PCR assays. It was found that the activity and content of  $A\beta$  in the huperzine A administration mice brain were decreased compared to that of the AD model mice, and the mRNA and protein expression levels of Bace1 and PS1 were suppressed in the brain of huperzine A treatment mice group. These results prompted that huperzine A can decrease  $A\beta$  in AD mice brain through suppressing the activity of  $\beta$ -/ $\gamma$ -secretase in APP/PS1 transgenic mice brain. These results suggested that huperzine A had important theoretical significance in the clinical treatment of AD.

**Key words:** huperzine A; APP/PS1 transgenic mice;  $A\beta$ ; Bace1; PS1

阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 是一种主要发生在老年人群的以进行性痴呆为临床特征的神经退行性疾病<sup>[1]</sup>, 伴随着全球人口老龄化的进程, AD 发病率呈逐年上升趋势, AD 病程长且进展缓慢, 到了晚期, 患者生活不能自理, 给患者家庭和社会均带来沉重的负担。因此, 深入研究 AD 发病机制与防治策略具有重要的理论价值和实际意义。

AD 病理特征为老年斑沉积和神经原纤维缠结

(NFTs) 的形成<sup>[1]</sup>。AD 病人脑内的老年斑处聚集着大量的  $A\beta$  淀粉样蛋白,  $A\beta$  是一种可溶性产物, 这种产物主要是由  $\beta$  淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 通过某些酶逐级降解 APP 而释放出来的<sup>[2]</sup>。APP 是一种广泛存在的跨膜蛋白, 主要影响神经元及其树突的生长, 其代谢异常是 AD 的一个重要的病理过程, APP 的水解过程主要受到三种酶的调控, 即  $\alpha$  (ADAM10)、 $\beta$  (BACE1)、 $\gamma$  (PS1/2、NCT、PEN2、APH-1)-分泌酶, 而  $A\beta$  主要是由  $\beta$  和  $\gamma$  分泌酶先后剪接形成的; APP 酶解除了上述途径外, 还存有非  $A\beta$  途径酶解, 即分泌酶在  $\alpha$  位点剪切

APP 产生对神经元具有保护作用的可溶性蛋白 sAPP $\alpha$ ,  $\alpha$  位点落于 APP 和  $A\beta$  之间, 从而可以阻断  $A\beta$  的形成。可见,  $\beta$ 、 $\gamma$ -分泌酶和  $\alpha$ -分泌酶分泌酶竞争同一底物, 因此可以从抑制  $\beta$ 、 $\gamma$ -分泌酶分泌酶活性和提高  $\alpha$ -分泌酶的活性等方面来减少  $A\beta$  的生成<sup>[3]</sup>。近年来, 有研究报道, 石杉碱甲 (Huperzine-A) 作为一种临床用药, 可明显改善 AD 患者的认知和记忆能力<sup>[4]</sup>。石杉碱甲可促进 APP 剪切片段 sAPP $\alpha$  的释放<sup>[5]</sup>, 同时, 石杉碱甲可保护由  $A\beta$  和谷氨酸盐所诱导的神经毒性, 调节神经生长因子<sup>[6]</sup>。本实验给予 APP/PS1 转基因小鼠石杉碱甲鼻饲处理 2 个月后, 通过 Western blot 和 Real-Time PCR 的方法检测各组小鼠脑内  $\beta$ 、 $\gamma$ -分泌酶亚基的变化, 并采用免疫荧光实验方法观察各组小鼠脑内  $A\beta$  蛋白的沉积及含量变化, 以探讨石杉碱甲通过降低  $\beta$ 、 $\gamma$ -分泌酶的活性进而减少脑内老年斑的形成, 最终起到保护神经元的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药品

石杉碱甲 (Tau Biotrech, Shanghai, China);  $\beta$ -actin,  $\beta$ -Amyloid Antibody, Bace1, PS1, Alexa Fluor 555-labeled goat anti-rabbit IgG、HRP-labeled goat anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology), Inc. (Danvers, MA, USA); 免疫组化试剂盒 (福州迈鑫生物技术有限公司), RNA total kit I, Reverse Transcription system, GoTaqqRCR Master mix (Promega)。

#### 1.1.2 实验仪器

低温离心机 (Allegra X-30R, Beckman, 美国), 酶标仪 (iMark, Bio-Rad, 美国), BIO-RAD 凝胶图像分析系统 (Gel Doc 2000, BIO-RAD, 美国), 电泳仪 (Mini-Protein II, BIO-RAD, 美国), 冰冻切片机 (McIlwain Tissue Chopper, Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd, 英国)。

#### 1.1.3 实验动物与分组

6 月龄 APP/PS1 转基因小鼠和 C57BL/6 野生型小鼠均购于美国 Jackson Lab (Stock Number 004462), 实验动物分笼饲养, 体重约 25 ~ 30 g, 自由饮食, 12 h 昼夜交替饲养, 饲养室温度保持在 22 ~ 25  $^{\circ}\text{C}$ 。APP/PS1 转基因小鼠分为模型组和给药组, 每组 10 只; 同月龄同背景 C57BL/6 野生型小鼠 10 只, 设为正常对照组, 具体分组及给药方法如下: 对

照组: 6 月龄 C57BL/6 野生型小鼠 10 只, 每日一次给予鼻饲凝胶<sup>[7]</sup>, 模型组: 6 月龄的 APP/PS1 转基因小鼠 10 只, 每日一次给予鼻饲凝胶; 石杉碱甲治疗组: 6 月龄的 APP/PS1 转基因小鼠 10 只, 每日一次给予含有石杉碱甲的鼻饲凝胶 (500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 含石杉碱甲的凝胶浓度是 10  $\text{mg}/\text{mL}$ , 连续给药 2 个月。因为石杉碱甲是一种可逆性的胆碱酯酶抑制剂, 胆碱酯酶分布于所有胆碱能神经末梢, 而现有的制剂在口服以及注射方面都会对外周胆碱能系统产生毒性作用, 而解剖学研究发现可通过鼻腔凝胶的方式使其直接进入脑内发挥作用, 并且停留鼻腔时间长, 可明显提高药效。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 小鼠脑组织取材

三组小鼠断头处死后, 迅速取出大脑放于冰上, 从大脑中间矢状缝切开, 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  $^{\circ}\text{C}$  保存备用, 用于 Western blot 和 Real-Time PCR 分子生物学指标检测。

#### 1.2.2 Western blot 检测

各组小鼠海马和皮层组织分别称重, 小剪刀剪碎样品 (冰上操作), 按 1:5 比例加入蛋白裂解液, 超声粉碎后, 4  $^{\circ}\text{C}$  裂解过夜, 4  $^{\circ}\text{C}$  10000 rpm 低温离心 30 min, 取上清, BCA 蛋白浓度测定, 每管 8  $\mu\text{g}$  蛋白分装, -80  $^{\circ}\text{C}$  冻存。

10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品, 4  $^{\circ}\text{C}$  转膜过夜, 5% 脱脂奶粉封闭, Bace1 和 PS1 抗体 (1:3300) 4  $^{\circ}\text{C}$  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,  $\beta$ -actin 抗体 (1:12 000) 孵育, 二抗孵育, 发光, 胶片曝光显影。以  $\beta$ -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 Real-Time PCR 检测

用 Promega 试剂盒提取小鼠脑组织总 RNA 并反转录获得 cDNA, 按照试剂盒说明将 cDNA 扩增, 所用的引物序列为: mouse-BACE-1 (NM\_011792) F-CCGGCGGGAGTGGTATTATGAAGT, R-GATGGTGATGCGGAAGGACTGATT; mouse-PS1 (NM\_008943) F-AGGCCAAGAGTCGTATGGCGC, R-TGTTCCGGCAGTGCCACAT, mouse-GAPDH (NM\_008084) F-AAC TTTGGCATTGTGGAAGG, R-ACACATTGGGGGTAGG AACA。

### 1.2.4 免疫荧光染色和共聚焦激光扫描显微术

切片正常羊血清室温预孵育 1h, A $\beta$  抗体 (1:100) 孵育, 4  $^{\circ}$ C 过夜。切片经 0.01M 的磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 充分漂洗后, 用羊抗兔 IgG (1:200) 室温孵育 2 h, 漂洗后防淬灭封片剂封片。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。

### 1.2.5 统计分析

本实验所有数据均采用 Spss11.0 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。

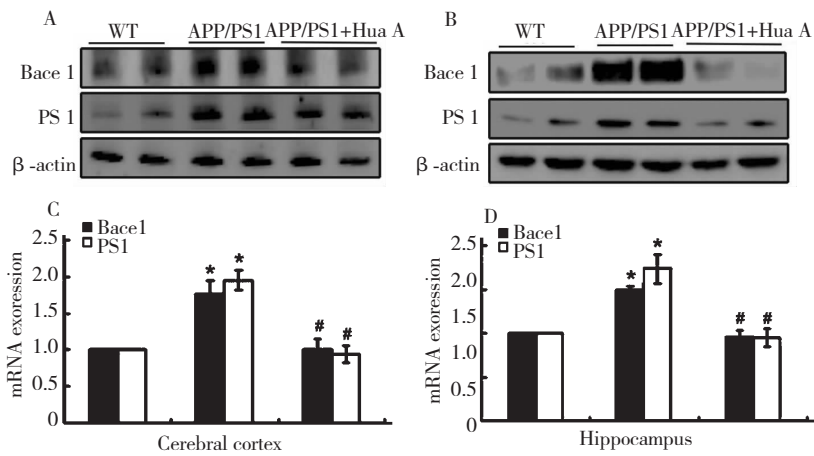


图1 石杉碱甲对 APP/PS1 转基因小鼠脑内皮层和海马 Bace1 及 PS1 的蛋白和 mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effect of Hup A on the mRNA and protein expression levels of Bace1 and PS1 in cerebral cortex and hippocampus of APP/PS1 Tg mice

注:A:Western blot 检测各组小鼠脑内皮层中 Bace1、PS1 的蛋白表达变化;B:Western blot 检测各组小鼠脑内海马中 Bace1、PS1 的蛋白表达变化;C:Real-Time PCR 检测各组小鼠脑内皮层中 Bace1、PS1 的 mRNA 变化;D:Real-Time PCR 检测各组小鼠脑内海马中 Bace1、PS1 的 mRNA 变化。与对照组相比, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组相比, #  $P < 0.05$ 。

Note:A:The protein expression levels of Bace1 and PS1 in cerebral cortex of brain detected by western blot;B:The protein expression levels of Bace1 and PS1 in hippocampus of brain detected by western blot;C:The mRNA expression levels of Bace1 and PS1 in cerebral cortex of brain detected by Real-Time PCR;D:The mRNA expression levels of Bace1 and PS1 in cerebral cortex of brain detected by Real-Time PCR;Compared with control, \*  $P < 0.05$ ; compared with model, #  $P < 0.05$ 。

## 2.2 免疫组织荧光染色结果

应用免疫荧光染色和共聚焦激光扫描显微术观察皮层和海马 DG 区 A $\beta$  蛋白的沉积水平, 结果显示, APP/PS1 转基因小鼠脑内皮层和海马 DG 区出现大量 A $\beta$  阳性神经元胞体及阳性斑块, 经过石杉碱甲治疗后, APP/PS1 转基因小鼠脑内 A $\beta$  有所减少 (图 2A ~ D)。

## 3 讨论与结论

AD 的发病机制及发病原因至今仍是谜。但

## 2 实验结果

### 2.1 Western blot 和 Real-Time PCR 结果

本实验检测了三组小鼠脑内皮层和海马中  $\beta$ -分泌酶 Bace1、 $\gamma$ -分泌酶 PS1 的蛋白质和 mRNA 表达水平, 统计学分析显示: APP/PS1 转基因与野生型小鼠相比, 其皮层和海马内 Bace1、PS1 的蛋白和 mRNA 水平明显升高, 而经过 Huperzine A 治疗后, APP/PS1 转基因组小鼠脑内皮层和海马内 Bace1、PS1 的蛋白和 mRNA 表达水平较模型组明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 1A-D。

是  $\beta$ -淀粉样蛋白沉积和 Tau 蛋白过度磷酸化仍是其主要的病理特征<sup>[1]</sup>。有证据显示 APP 水解酶  $\beta$ -分泌酶亚基 Bace1 是 A $\beta$  形成的主要步骤之一, 而在尸检 AD 患者脑内 Bace1 表达有明显增加<sup>[8]</sup>。 $\gamma$ -分泌酶复合物 (PS/NCT/Pen2/Aph1) 也是 A $\beta$  形成的关键, 其中复合物中 PS 的抑制是 A $\beta$  形成的主要限速原因<sup>[9]</sup>。综上所述, 抑制 Bace1 和 PS1 的表达可能会抑制 AD 患者脑内 A $\beta$  的形成, 进而减少其聚集, 最终减缓 AD 的病情发展。

石杉碱甲是一种乙酰胆碱酯酶抑制剂, 并且已

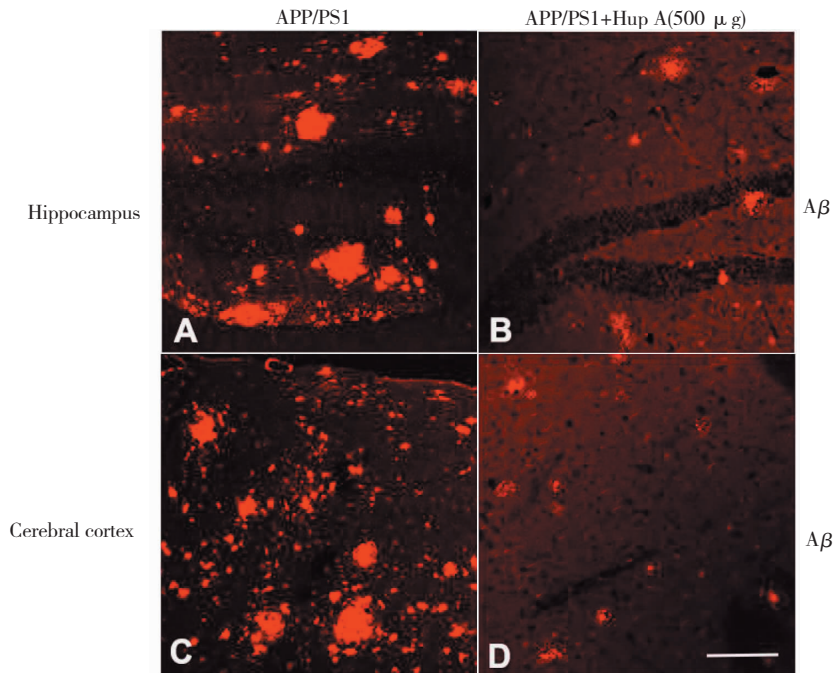


图2 小鼠皮层和海马 DG 区  $A\beta$  蛋白的沉积水平

Fig. 2 The  $A\beta$  in cerebral cortex and hippocampus DG region of mice

注: A, C: APP/PS1 小鼠; B, D: Hup A 处理组

Note: A, C: APP/PS1 Tg mice; B, D: AD + Hup A mice

是 AD 的临床用药,对改善记忆和认知能力有明显的效果<sup>[4]</sup>。Peng 等<sup>[10]</sup>通过实验发现石杉碱甲可通过促进 $\alpha$ -分泌酶剪切的过程,进而减少  $A\beta$  的聚集; Wang<sup>[7]</sup>也证实石杉碱甲可通过增加 ADAM10 的表达进而激活 $\alpha$ -分泌酶,抑制 $\gamma$ -分泌酶的剪切过程,减少  $A\beta$  的形成。本实验通过 $\beta/\gamma$ -分泌酶相关亚基的检测,发现石杉碱甲处理之后的 APP/PS1 转基因小鼠组  $A\beta$  与 APP/PS1 转基因小鼠组相比聚集减少,这一结果提示石杉碱甲可以延缓 AD 病情的发展,并且通过 Western blot 和 Real-Time PCR 等实验方法检测,我们发现 APP/PS1 转基因小鼠组的皮层和海马中 Bace1 和 PS1 的表达都有明显增加,石杉碱甲治疗组这些 $\beta/\gamma$ -分泌酶亚基被抑制,说明石杉碱甲可能通过抑制 APP/PS1 转基因小鼠脑内 $\beta/\gamma$ -分泌酶亚基的表达,从而减少  $A\beta$  的聚集,最终起到保护大脑神经元的作用,因而推断石杉碱甲在 AD 的临床治疗方面具有重要的理论意义。

#### 参考文献

- Shoghi-Jadid K, Small GW, Agdeppa ED, et al. Localization of neurofibrillary tangles and beta-amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2002, 10: 24-35.

- Selkoe DJ. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu Rev Neurosci*, 1994, 17: 489-517.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, et al. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96: 3922-3927.
- Xing SH, Zhu CX, Zhang R, et al. Huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease and vascular dementia: a meta-analysis. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014; 363985.
- Yue P, Tao T, Zhao Y, et al. Huperzine A in rat plasma and CSF following intranasal administration. *Int J Pharm*, 2007, 337: 127-132.
- Tang LL, Wang R, Tang XC. Huperzine A protects SHSY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress damage via nerve growth factor production. *Eur J Pharmacol*, 2005; 519: 9-15.
- Wang CY, Zheng W, Wang T, et al. Huperzine A activates Wnt/beta-catenin signaling and enhances the nonamyloidogenic pathway in an Alzheimer transgenic mouse model. *Neuropsychopharmacology*, 2011, 36: 1073-1089.
- Yang LB, Lindholm K, Yan R, et al. Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med*, 2003, 9: 3-4.

(下转第 254 页)