

阿魏酸对阿尔茨海默病转基因小鼠脑内氧化应激和凋亡相关蛋白的影响

王 玥, 王 旭, 于 嵩, 王 淳*

辽宁中医药大学, 沈阳 110847

摘要: 本文主要研究阿魏酸对 APP/PS1 转基因小鼠脑内氧化应激和凋亡相关蛋白的影响。应用 Western blot 和 Real-Time PCR 方法检测野生型小鼠、APP/PS1 转基因小鼠及不同浓度阿魏酸处理组小鼠脑内凋亡相关蛋白的表达情况, 并测定各组小鼠脑内 SOD 活力和 MDA 含量。阿魏酸处理后的 AD 模型小鼠 SOD 与 AD 组相比活性增加, MDA 含量减少, 其中中浓度阿魏酸处理组的效果最为明显; APP/PS1 转基因小鼠脑内所检测的凋亡相关蛋白 p-JNK、p-C-Jun、Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 表达较野生型小鼠明显升高, 阿魏酸处理后这些磷酸化蛋白的表达显著减少, 并且中浓度阿魏酸处理组的效果最为明显。以上结果表明阿魏酸通过其强大的抗氧化作用降低 AD 小鼠脑内的氧化应激效应, 并且可以降低 AD 小鼠脑内凋亡相关蛋白的表达, 提示阿魏酸在 AD 的临床治疗方面具有重要的理论意义。

关键词: 阿魏酸; APP/PS1 转基因小鼠; 凋亡; 氧化应激

中图分类号: R749.16

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.007

Effects of Ferulic Acid on Oxidative Stress and Apoptosis Related Proteins in Alzheimer's Disease Transgenic Mice

WANG Yue, WANG Xu, YU Song, WANG Chun*

Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China

Abstract: In this study, the effects of ferulic acid on oxidative stress and apoptosis related proteins in the APP/PS1 transgenic mice brain were investigated. Western blot and Real-Time PCR methods were used to detect the expression of apoptosis related proteins in brains of the WT mice, APP/PS1 transgenic mice and different concentrations of ferulic acid treatment mice, and SOD activity and MDA content were detected in mice brain of each group. The activity of SOD increased compared to the AD model mice, and the content of MDA reduced after ferulic acid treatment, the concentration of ferulic acid in treatment group was the most obvious; The expression of p-JNK, p-C-Jun, Caspase-3, Bax and Bcl-2 was increased compared to those of the WT mice, the hyperphosphorylation proteins were significantly reduced after ferulic acid treatment, the concentration of ferulic acid in treatment group was the most obvious. These results indicated that ferulic acid can decrease oxidative stress effect in AD mice brain through its powerful antioxidant activity, and decline the level of apoptosis related proteins in AD mice brain. These results prompted that ferulic acid had important theoretical significance in the clinical treatment of AD.

Key words: ferulic acid; APP/PS1 transgenic mice; apoptosis; oxidative stress

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种好发于老年人的慢性进行性神经退行性疾病, 该疾病是以记忆力障碍、认知障碍和语言障碍为临床表现, 同时伴有精神行为异常、人格障碍等临床症状。在一些发达国家, AD 是继心脏病、癌症、中风

后的第四位死因, 而在我国, 近些年随着人口老龄化程度的加快, AD 病死率随着年龄增加而逐步增高, 因此, 日趋增高的 AD 发病率对其治疗提出了重大挑战。

AD 分为家族性和散发性^[1]。其确切病因仍然不是很清楚, 值得肯定的是, AD 的特征之一是突触退行性变和胆碱能神经元死亡。细胞凋亡是不同于坏死的一种细胞死亡形式, 涉及到氧化应激, 线粒体功能异常和 caspase 激活等机制。而在 AD 患者的

大脑中伴随着老年斑的沉积形成,并且发现有 DNA 损伤, caspase 活性增强和凋亡相关基因如 Bax 和 bcl-2 表达变化^[2-4];也有研究显示, $A\beta$ 可以诱导的线粒体膜电位崩解, 活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生, Bcl-2/Bax 比值下降和最终的 caspase-3 活化, 引起细胞凋亡。氧化应激是指机体内氧自由基的产生和清除失去平衡, 导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)在体内堆积而引起的应激反应。研究证实, 自由基引起的氧化损伤是神经退行性疾病的共同通路^[5]。研究表明 AD 患者以及 AD 模型小鼠脑组织中活性氧、丙二醛等氧化应激标志物明显增多, 大量的自由基能够损伤生物大分子使蛋白质、DNA 和脂质过氧化, 致使神经细胞凋亡和缺失, 导致学习和记忆障碍, 进而导致或加重 AD, 这些研究报道说明细胞凋亡和氧化应激在 AD 发生及发展过程中有重要作用。

阿魏酸是四物汤中的有效成分之一, 是植物界普遍存在的一种酚类植物成分, 化学名称为 4-羟基-3-甲氧基肉桂酸, 常见于水果、蔬菜和很多中草药(如当归、川芎等)。阿魏酸极少以游离态存在, 大多与低聚糖、多胺、脂类等形成结合态。目前研究表明, 阿魏酸可能在抗炎、抗细胞凋亡、保肝、抗高脂血症、抗动脉粥样硬化、降血压、神经保护、抗骨质疏松症等一系列方面具有很重要的作用。阿魏酸的这一系列的治疗作用大都是基于其强大的抗氧化活性, 能淬灭机体多余的自由基、调节各种酶类的产生和代谢, 对人体健康有着正向调节作用。然而, 阿魏酸能否通过抗氧化应激和抗凋亡等机制保护胆碱能神经元尚未见报道。本实验应用常用的 AD 模型小鼠(APP/PS1 转基因小鼠), 该小鼠能够产生 $A\beta$ 沉积, 大约在 6 月龄时可出现老年斑, 经不同浓度的阿魏酸灌胃处理后, 应用 Real-Time PCR、Western blot 及检测 SOD 活性及 MDA 含量等方法探讨阿魏酸对转基因小鼠脑内神经元的凋亡和氧化应激的影响, 为临床上应用阿魏酸治疗 AD 提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 药 品

阿魏酸(中国药品生物制品检定所); 兔抗 phospho-SAPK/JNK (Cell Signaling), 兔抗 SAPK/JNK (Cell Signaling), 兔抗 phospho-c-Jun (Cell Signaling), 兔抗 c-Jun (Cell Signaling), 兔抗 Caspase-3

(Cell Signaling), 兔抗 Bcl-2、BAX (Cell Signaling), 兔抗 beta acting (Cell Signaling), Inc. (Danvers, MA, USA); 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所), 丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。PVDF 膜, 蛋白 marker(NEB)。

1.1.2 实 验 仪 器

低温离心机, 酶标仪, BIO-RAD 凝胶图像分析系统, 电泳仪, 水平摇床, 超声粉碎机, 涡旋混合器等。

1.1.3 实 验 动 物 与 分 组

6 月龄 APP/PS1 转基因小鼠和 C57BL/6 野生型小鼠购于美国 Jackson Lab (Stock Number 004462), 体重约 15 ~ 20 g, 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 °C。实验动物分为模型组和给药组, 每组 10 只; 同月龄同背景 C57BL/6 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: 3 月龄的 C57BL/6 小鼠 10 只, 隔日上午 10 时生理盐水灌胃, 连续 7 d; 模型组: 6 月龄的 APP/PS1 转基因小鼠 10 只, 隔日上午 10 时生理盐水灌胃, 连续 7 d; 阿魏酸给药组: 6 月龄的 APP/PS1 转基因小鼠, 按低剂量(20 mg/kg)进行隔日上午 10 时给予阿魏酸灌胃给药(10 只), 按中剂量(40 mg/kg)进行隔日上午 10 时给予阿魏酸灌胃给药(10 只), 按高剂量(100 mg/kg)进行隔日上午 10 时给予阿魏酸灌胃给药(10 只), 连续 7 d; 阳性药组: 6 月龄的 APP/PS1 转基因小鼠 10 只, 按 100 mg/kg 进行隔日上午 10 时给予茜草双酯灌胃给药, 连续 7 d。

1.2 方 法

1.2.1 小 鼠 脑 组 织 取 材

6 组小鼠灌胃处理后断头处死, 迅速取出大脑放在冰上, 从中间矢状缝切开, -80 °C 保存备用, 一半用于 Western blot 指标检测, 另一半用于 Real-Time PCR 等分子生物学指标检测。

1.2.2 Western blot 检测

各组小鼠脑组织分别称重, 冰上用小剪刀剪碎样品, 按 1:5 比例加入蛋白裂解液, 超声粉碎, 4 °C 裂解过夜, 4 °C 15000 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 °C 冻存待用。

12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白样品, 4 °C 转膜过夜, 5% 脱脂奶粉封闭, p-JNK、JNK、p-C-Jun、C-Jun、Caspase-3、Bcl2、Bax 等抗体(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(1:15000)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 Real-Time PCR 检测

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 rpm,5min。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 rpm,1 min。加 buffer II 500 μ L,离心 1000 rpm,1 min。加 dd H₂O 40 μ L,离心 12000 rpm,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 Bcl2,Bax 的表达水平。

1.2.4 大蒜素抗氧化活性检测

测定小鼠脑组织重量,按重量体积比加 4 ℃ 生理盐水制成 10% 的组织匀浆,离心(2500 rpm,10 min),取上清液,置 4 ℃ 备用。测定 SOD 活力和 MDA 含量。①脑组织 SOD 活性测定:采用经胺法测定,通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基,后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下,呈现紫红色,用可见光分光光度计测其吸收度。当被测样品中含 SOD 时,则对 O₂ 有专一性的抑制作用,使形成的亚硝酸盐减少,比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值。550 nm 处比色,通过公式计算可求出被测样品中的 SOD 活力。测定方法严格按照试剂盒说明书操作。计算公式:组织匀浆中 SOD 活力(U/mgprot) = (对照管吸光度-测定管吸光度)/对照管吸光度/50% × 反应液总体积/取样量(mL)/组织中蛋白含量(mgprot/mL)。

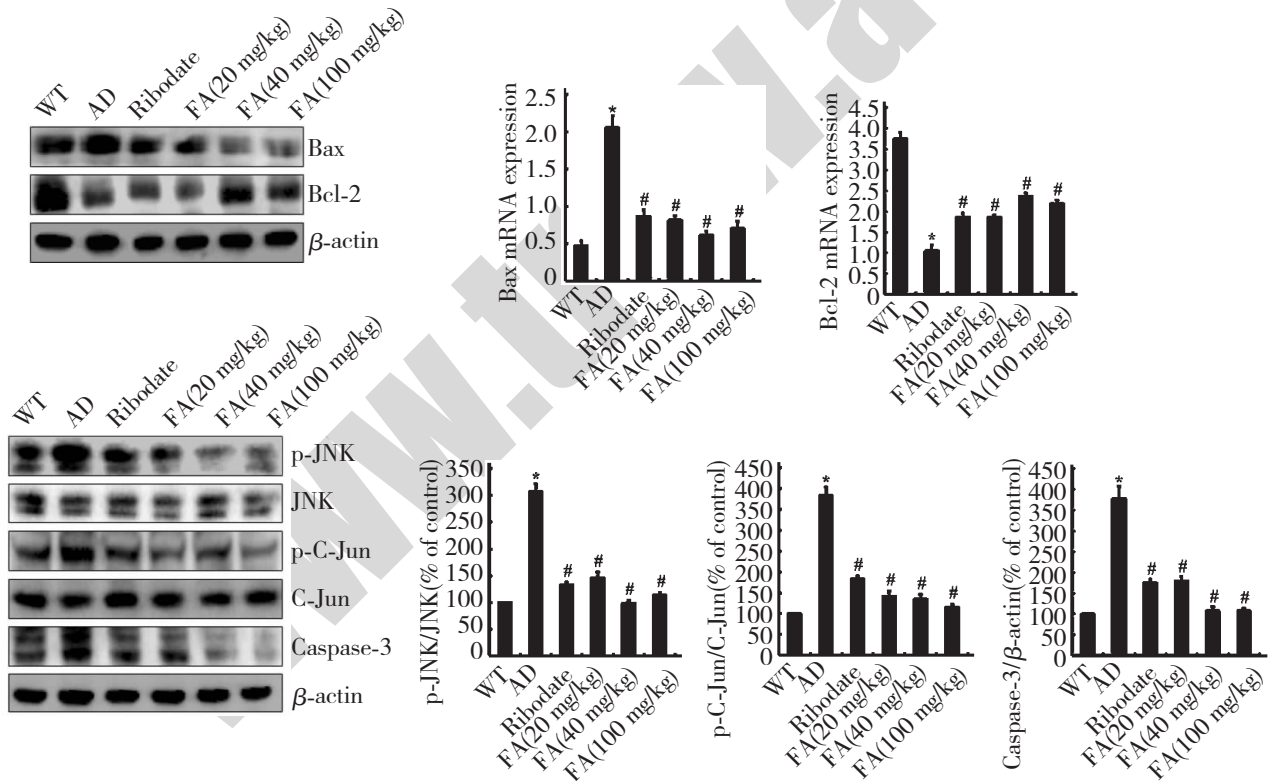


图 1 阿魏酸对 APP/PS1 转基因小鼠脑内凋亡相关蛋白的影响

Fig. 1 Effect of ferulic acid on apoptosis related protein in APP/PS1 transgenic mice

注:A、Western blot 检测各组小鼠脑内 Bax 及 Bcl-2 的表达;B、Real-Time PCR 检测各组小鼠脑内 Bax 及 Bcl-2 的表达;C、Western blot 检测各组小鼠脑内 p-JNK、p-C-Jun、Caspase-3 的表达;D、p-JNK/JNK 表达变化,p-C-Jun/C-Jun 表达变化,Caspase-3/ β -actin 表达变化变化,与对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$ 。

Note:A:The detection of Bax and Bcl-2 expression in brain of mice by Western blot;B:The detection of Bax and Bcl-2 expression in brain of mice by Real-Time PCR;C:The detection of p-JNK,p-C-Jun,Caspase-3 expression in brain of mice by Western blot;D:The expression changes of P-JNK/JNK;The expression changes of p-C-Jun/C-Jun;The expression changes of Caspase-3/ β -actin,compared with the control group,* $P < 0.05$;Compared with model group,# $P < 0.05$.

②脑组织 MDA 含量测定:过氧化脂质降解产物中的 MDA 可与硫代巴比妥酸(TBA)结合,形成红色产物,在 532 nm 处比色测定各管吸光度,通过公式计算可求出被测样品中的 MDA 含量。测定方法严格按照试剂盒说明书操作式:组织中 MDA 含量 (nmol/mgprot) = (测定管吸光度-测定空白管吸光度)/(标准管吸光度-标准空白管吸光度)标准品浓度(10 nmol/mL)/蛋白含量(mgprot/mL),nmol/mgprot 为纳摩尔/毫克蛋白。

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 ± 标准差表示 (X ± SD),P < 0.05 认为有显著性差异。

2 实验结果

2.1 阿魏酸对 APP/PS1 转基因小鼠脑内凋亡相关蛋白的影响

本实验检测了各组小鼠脑内凋亡相关蛋白 (Bax、Bcl-2、p-JNK、p-C-Jun、Caspase) (图 1), West-

ern blot 结果显示,在 APP/PS1 小鼠脑内,凋亡相关蛋白 Bax、p-JNK、p-C-Jun、Caspase-3 的表达水平较野生型小鼠明显升高,Bcl-2 表达较野生型小鼠降低,说明在 AD 模型小鼠的脑内确实存在大量的细胞凋亡;给予低、中、高浓度的阿魏酸灌胃处理后发现,Bax、p-JNK、p-C-Jun、Caspase-3 的表达水平较 APP/PS1 小鼠降低,并且 Bcl-2 表达有所升高,结果表明阿魏酸能够改善 AD 模型小鼠脑内的细胞凋亡,结果具有显著性差异 (P < 0.05, 图 1A、C、D), Real-Time PCR 结果同 Western blot (P < 0.05, 图 1B)。

2.2 阿魏酸对 APP/PS1 转基因小鼠脑内氧化应激的影响

研究结果显示,APP/PS1 转基因小鼠脑内 SOD 的活性明显降低,MDA 的含量明显增高,差异有统计学差异 (P < 0.05);当给予 APP/PS1 转基因小鼠阿魏酸灌胃处理后,给药组小鼠脑内 SOD 活性较 AD 组显著升高 (P < 0.05),不同浓度的阿魏酸给药组小鼠脑内 MDA 含量与 AD 组比较略降低 (P < 0.05) (表 1)。

表 1 阿魏酸对 AD 模型小鼠脑组织 SOD 活性及 MDA 含量的影响 (X ± S)

Table 1 Effects of ferulic acid on SOD activity and MDA content in brain tissue of AD mice (X ± S)

组别 Group	动物例数 Animal cases	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/mgprot)
WT	10	8.21 ± 0.26	35.36 ± 5.70
AD	10	2.14 ± 0.33 *	84.04 ± 2.17 *
Rubidate	10	5.13 ± 0.37 #	47.12 ± 4.34 #
FA(20 mg/kg)	10	6.11 ± 0.10 #	42.16 ± 0.21 #
FA(40 mg/kg)	10	7.29 ± 0.71 #	39.56 ± 0.13 #
FA(100 mg/kg)	10	7.08 ± 0.48 #	44.38 ± 0.52 #

注:与对照组相比,*P < 0.05;与模型组相比,#P < 0.05。

Note:Compared with the control group,*P < 0.05;Compared with model group,#P < 0.05.

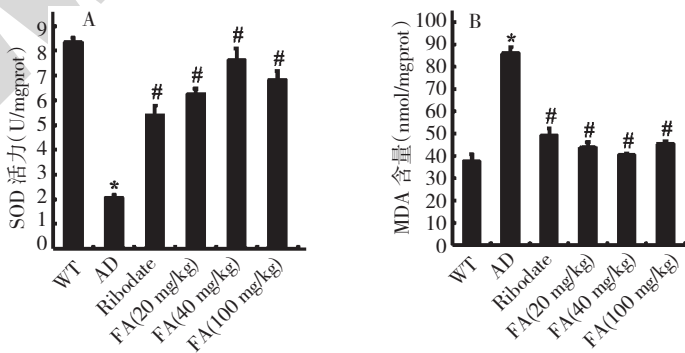


图 2 阿魏酸对 AD 模型小鼠脑组织 SOD 活性和 MDA 含量的影响

Fig.2 Effects of ferulic acid on SOD activity and MDA content in brain tissue of AD mice

注:A、各组小鼠脑内 SOD 活性的比较;B、各组小鼠脑内 MDA 含量变化,与对照组相比,*P < 0.05;与模型组相比,#P < 0.05

Note:A:The comparison of SOD activity in brain of mice;B:The changes of MDA content in brain of mice,compared with the control group,*P < 0.05;Compared with model group,#P < 0.05

3 讨论与结论

AD 的主要病理特征是脑内淀粉样蛋白沉积形成老年斑 (senile plaque, SP) 和神经元内出现神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)。AD 的发病机制及发病原因至今仍是谜, 目前认为有多种学说与 AD 的发病有关, 如氧化应激学说、 β -淀粉样蛋白 (amyloid- β , A β) 毒性学说、Tau 蛋白假说等。近些年有证据显示氧化应激参与了 AD 的发病, 但其确切机制还不是很清楚, 氧化应激与自由基损伤学说认为, 细胞外 A β 可以诱导蛋白质、核酸以及脂质的过氧化, 产生大量自由基, 提示 A β 可直接诱导氧化应激, 而氧化应激又会促进可溶性 A β 转换为不溶性 A β , 促进老年斑的沉积^[6]。此外, 有直接的细胞生物学证据报道, NFTs 中存在大量脂质过氧化的产物 4-HNE, 而 4-HNE 修饰后的 Tau 蛋白更倾向于形成神经纤维缠结^[7], 这一途径也可以引起神经元的凋亡。更重要的是, A β 和 tau 在 AD 神经元中往往相互缠结^[8], 可以推断氧化应激效应可能也通过调控 A β 沉积和 tau 的磷酸化来影响 AD 的病程。

文献报道, 阿魏酸有很显著的抗氧化^[9], 抗自由基及抗炎^[10] 等重要的生理学作用, Yan 等^[11] 研究表明长期应用阿魏酸能对抗 A β 1-40 引起的小鼠学习记忆障碍。本实验通过氧化应激相关物质的检测, 发现阿魏酸处理之后的 AD 模型小鼠 SOD 与 AD 组相比活性增加, MDA 含量减少, 这一结果提示阿魏酸可以降低 AD 小鼠脑内的氧化应激, 并且通过 western blotting 和 Real-Time PCR 等实验方法检测发现, 在 APP/PS1 转基因小鼠脑内所检测的磷酸化凋亡相关蛋白明显升高, 阿魏酸处理组这些过度磷酸化的凋亡相关蛋白明显降低, 并以中浓度处理组的效果最为明显, 说明阿魏酸可能通过抑制 AD 小鼠脑内氧化应激, 从而降低凋亡相关蛋白的磷酸化, 从而起到对 AD 转基因小鼠大脑神经元的保护作用, 因此推断阿魏酸在 AD 的临床治疗方面具有重要的理论意义。

参考文献

- 1 Sheng SL. Alzheimer's disease and related diseases. Science and Technology Literature Publishing House, 2006, 21: 43.
- 2 Liu JP. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J*, 1999, 13: 2091-2104.
- 3 Su JH, Anderson AJ, Cummings BJ, et al. Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer disease. *Neuroreport*, 1994, 5: 2529-2533.
- 4 Masliah E, Mallory M, Alford M, et al. Caspase dependent DNA fragmentation might be associated with excitotoxicity in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998, 57: 1041-1052.
- 5 Yves C. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71: 621-629.
- 6 Guadagna S, Esiri MM, Williams RJ, et al. Tau phosphorylation in human brain; relationship to behavioral disturbance in dementia. *Neurobiol Aging*, 2014, 21: 125-126.
- 7 Liu Q, Smith MA, Avila J, et al. Alzheimer-specific epitopes of tau represent lipid peroxidation-induced conformations. *Free Radic Biol Med*, 2014, 38: 746-754.
- 8 Spires-Jones TL, Hyman BT. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*, 2014, 82: 756-771.
- 9 Sultana R, Ravagna A, Mohrmmad Abdul H, et al. Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity; relationship to antioxidant activity. *J Neurochem*, 2005; 92: 749-758.
- 10 Fernandez MA, Saenz MT, Garcia MD. Anti-inflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. *J Pharm Pharmacol*, 1998, 50: 1183-1186.
- 11 Yan JJ, Cho JY, Kim HS, et al. Protection against beta-amyloid peptide toxicity *in vivo* with long-term administration of ferulic acid. *Br J Pharm*, 2001, 133: 89-96.