

肉苁蓉苯乙醇苷对 APP/PS1 双转基因模型小鼠海马区 β 淀粉样蛋白表达的影响

居博伟¹, 杨建华², 胡君萍^{3*}

¹新疆医科大学第五附属医院, 乌鲁木齐 830000;

²新疆医科大学第一附属医院, 乌鲁木齐 830054; ³新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011

摘要:为研究肉苁蓉苯乙醇苷对阿尔茨海默病模型小鼠海马 β 淀粉样蛋白表达的影响。实验选用 6 月龄 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠 60 只, 随机分为模型组、多奈哌齐组 (0.65 mg/kg)、肉苁蓉苯乙醇总苷剂量组 (250, 125, 62.5 mg/kg)、肉苁蓉毛蕊花糖苷组 (125 mg/kg), 正常组为同窝非转基因小鼠 10 只, 分别给予药物和蒸馏水灌胃 3 个月, 于 9 月龄时通过 Morris 水迷宫法检测行为学改变, 采用 HE 染色法观察小鼠脑部海马病变, 采用免疫组化法和 Western-blot 法考察海马 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 蛋白表达。实验结果发现肉苁蓉苯乙醇苷明显改善小鼠学习与记忆能力和脑部海马神经元的损伤, 减少 $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{1-40}$ 阳性细胞数, 并下调蛋白表达。肉苁蓉苯乙醇苷通过下调小鼠海马区 $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{1-40}$ 蛋白表达, 从而影响 $A\beta$ 级联反应以保护神经元, 发挥拮抗 AD 作用。本研究明确了苯乙醇苷是肉苁蓉发挥抗 AD 活性的主要药效物质基础, 为后续将其开发为抗 AD 新药提供了理论支撑。

关键词:肉苁蓉; 苯乙醇苷; 阿尔茨海默病; APP/PS1 双转基因小鼠; β 淀粉样蛋白

中图分类号: R285; R966

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)7-1155-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.7.006

Effects of Cistanche deserticola phenylethanoside on the expression of β -amyloid protein in hippocampus of APP/PS1 transgenic mice

JU-Bo-wei¹, YANG Jian-hua², HU Jun-ping^{3*}

¹The Fifth affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China;

²The first affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;

³School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract: To study the effect of Cistanche deserticola phenylethanoside on the expression of β -amyloid protein in hippocampus of mice with Alzheimer disease, 60 6-month-old APP/PS1 double-transgenic AD mice were randomly divided into model groups, donepezil group (0.65 mg/kg), the high, middle, low dosages of total glycosides of Cistanche deserticola (250, 125, 62.5 mg/kg) and acteoside (125 mg/kg) were given drugs and distilled water for 3 months. At the age of 9 months, the Morris water maze and passive avoidance tests were used to determine the learning and memory impairments, the hippocampal lesions of mice were observed by HE staining, and the expressions of $A\beta_{1-42}$ and $A\beta_{1-40}$ proteins in hippocampus of mice were detected by immunohistochemical method and Western-blot method. Cistanche deserticola phenylethanoside can significantly improve the learning and memory ability and the damage of hippocampal neurons in APP/PS1 double transgenic mice. Compared with the model group, the number of $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-40}$ positive cells in the hippocampus CA1 of the Cistanche deserticola group and the control group was significantly decreased, and the results of Western-blot showed that the expression of $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-40}$ protein in hippocampus of Cistanche deserticola in each dose group and the intervention group was significantly lower than that in model group. Cistanche deserticola glycoside can protect neurons and antagonize AD by down-regulating the expression of $A\beta_{1-42}$, $A\beta_{1-40}$ protein in hippocampus brain of mice. In this study, phenylethanoside was identified as the main effective sub-

收稿日期: 2018-11-13 接受日期: 2019-04-25

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金 (81560629)

* 通信作者 Tel: 86-013899853561; E-mail: hjp-yft@163.com

stance for *Cistanche deserticola* to exert its anti-AD activity, which provides theoretical support for its further development as a new drug against AD.

Key words: *Cistanche deserticola*; phenylethanoid; Alzheimer disease; APP/PS1 double transgenic mice; β -amyloid protein

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种以进行性记忆减退、认知功能障碍为主要临床特征的中枢神经系统退行性疾病^[1-3]。目前较为公认的 β 淀粉样蛋白 ($A\beta$) 级联反应假说认为, 生理状态下的正常代谢产物 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 单体本无神经毒性, 但当其遇到 APP 外源介质影响导致异常沉积后, 积聚的 $A\beta_{1-42}$ 形成可溶性 $A\beta$ 寡聚体 (ADDLs), 阻止单体产生保护活性而引起神经元变性、突触丢失和轴突损伤, 最终引发脑内神经元凋亡致痴呆, 因此考察其关键靶标 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 蛋白在脑内表达情况对于肉苁蓉苯乙醇苷防治的 AD 研究具有重要的意义^[4-7]。同时, 研究 AD 动物模型脑内特征性病变部位海马各分区的组织病理学检测可从宏观上真实反映药物对其脑内病变部位的改善情况^[8-10]。

我国传统中医药认为补肾益精类中药肉苁蓉具有抗老防衰、改善记忆的功效^[11-14]。大量前期研究已证实, 肉苁蓉苯乙醇总苷及苯乙醇苷代表性单体-毛蕊花糖苷在传统方法构建的 AD 在体或离体模型中均表现出明显的拮抗 AD 作用, 具有一定的防治神经退行性疾病的潜能^[15-20]。但未见肉苁蓉苯乙醇苷应用 APP/PS1 双转基因模型从 β 淀粉样蛋白角度开展防治 AD 作用研究。

综上所述, 本研究基于 AD 发病机制研究中经典假说— $A\beta$ 级联反应假说, 借助理想、可靠的 AD 动物模型 APP/PS1 双转基因小鼠作为体内研究平台, 采用 Morris 水迷宫、HE 染色法、Western-blot、免疫组化等先进技术手段, 从动物行为学、组织病理学角度、分子生物学层面考察肉苁蓉苯乙醇苷对 APP/PS1 双转基因小鼠脑部海马区 β 淀粉样蛋白表达的影响, 以期寻找 AD 防治新靶点, 为肉苁蓉苯乙醇苷防治 AD 具体作用机制的研究提供参考依据。

1 试药与仪器

1.1 试药

肉苁蓉苯乙醇总苷 (课题组自制, 苯乙醇总苷含量达 87.6%) ; 毛蕊花糖苷 (批号 111530-200505, 中检所); 二氧化钛 (批号 20161025, 上海染料研究所有限公司); HE 染色试剂盒 (批号 20160902, 凯基生物公司); 中性树胶 (批号 20161208, 上海懿详公司); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (批号 1043721, 北

京索莱宝公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 20150323, 南京凯基生物公司); $A\beta_{1-40}$ (批号 20161012, 美国 CST 公司); $A\beta_{1-42}$ (批号 20161014, 美国 CST 公司); β -actin (批号 20161012, 美国 CST 公司); 碱磷酶标记兔抗山羊 IgG (H+L) (批号 20162308, 北京中杉金桥公司); 4 × 蛋白上样缓冲液含 β -巯基乙醇 (批号 2010662, 北京索莱宝公司); 10 × TBST (批号 20160611, 北京索莱宝公司); PVDF 膜 (批号 03010040001, 瑞士罗氏公司); SDS (批号 20160930, 北京索莱宝公司); Tris (批号 WX-BB4339V, 美国 VETEC 公司); 甘氨酸 (批号 GB10466, 北京索莱宝公司); 脱脂奶粉 (批号 WB20361, 美国 BD 公司); BCIP/NBT Kit (美国 invitrogen 公司); 二抗 (批号 15922207, 北京中杉金桥公司); 吐温 20 (批号 WXRC6526N, 美国 VETEC 公司)。

1.2 动物

6 月龄 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠 60 只及同窝阴性小鼠 10 只, 雌雄对半, 体质量 20 ± 10 g, 中国江苏南京模式动物研究所, 许可证号 [SCXK (苏) 2015-0001], 实验过程中动物自由摄食和饮水。

1.3 仪器

MT-100 Morris 水迷宫 (成都泰盟科技有限公司); 凝胶成像仪 (美国 BIO-RAD 公司); RM2016 病理切片仪 (德国 Leica 公司); SIM-F124 型制冰机 (日本 SANYO 公司); 凝胶电泳及转膜设备 (美国 BIO-RAD 公司); 全波长酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司); CO₂ 恒温培养箱 (美国 Thermo 公司); 4°C 和 -20°C 冰箱 (青岛海尔公司); 67120 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); TP-114 电子天平 (北京 Sartorius 公司); 低温冷冻高速离心机 (美国 Thermo Scientific 公司); DVKW-D-2 数显电热恒温水浴锅 (北京市永光明医疗仪器厂); 超声波细胞破碎仪 (宁波新芝公司); WD-9405A 型脱色摇床 (北京六一仪器厂); 可调式恒压恒流电源 (美国 BIO-RAD 公司); DM4000 荧光倒置显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药

依据 SPSS18.0 统计软件产生的随机数字, 将

AD 模型小鼠随机分为模型组、多奈哌齐组(每日灌胃剂量为 0.65 mg/kg)、肉苁蓉苯乙醇总苷(PhGs)高、中、低剂量组(每日灌胃剂量分别为 250、125、62.5 mg/kg)、肉苁蓉毛蕊花糖苷干预组(125 mg/kg),每组 10 只。于 6 月龄时开始对小鼠按组别实施灌胃治疗,连续 3 个月,每日灌胃 1 次。正常组为同窝非转基因小鼠,模型组和正常组给予等体积蒸馏水灌胃。

2.2 Morris 水迷宫实验

采用经典的 Morris 水迷宫测试小鼠空间学习及记忆能力。第 1、2 天训练小鼠熟悉平台位置,练习寻找平台,第 3~5 天进行正式测试,观察各组小鼠训练后寻找平台的情况,第 6 天撤去平台,观察小鼠的游泳轨迹。实验过程中,摄像头会同步记录小鼠寻找平台花费时间(即逃避潜伏期)及游泳轨迹的距离。若小鼠在设定的时间范围内未找到平台(一般设定为 60 s 或 120 s,本实验采用 60 s),则将该小鼠的逃避潜伏期记为设定值,且由工作人员将其置于平台上停留数秒(本实验采用 10 s),助其加深平台记忆。实验结束后,记录小鼠从入水开始直至找到平台的游泳时间。在实验的最后一天,撤去平台,设定时间内需要记录的内容主要有小鼠穿越平台次数、目标象限的停留时间等,分析每个实验动物的搜索策略。

2.3 脑组织取材及石蜡包埋

给药结束后称重小鼠,使用 10% 水合氯醛麻醉小鼠。将麻醉后的小鼠仰放在操作台上固定四肢。4% 多聚甲醛内灌注固定后处死动物,剔除小脑等多余的脑组织,沿大脑半球末端,除去整个小脑和大脑中部冠状面前半部分。4% 多聚甲醛中固定 24 h,超纯水清洗 10 分钟后依次放入 30% 乙醇(1 h)→40% 乙醇(1 h)→50% 乙醇(1 h)→75% 乙醇(1 h)→90% 乙醇(1 h)→95% 乙醇(1 h)→无水乙醇 I(1 h)→无水乙醇 II(1 h)→二甲苯 I(15 min)→二甲苯 II(15 min)。浸入石蜡 2 h,组织包埋后在小鼠脑部海马 CA1 区连续冠状切片。于 60 °C 烤箱内干燥 48 h 后常温保存。

2.4 HE 染色

将每组选取的切片于 60 °C 烤箱内烤片 40 min,然后依次将其放入二甲苯 I(5 min)→二甲苯 II(10 min)→无水乙醇(5 s)→95% 乙醇 I(5 s)→95% 乙醇 II(5 s)→80% 乙醇(5 s)→蒸馏水冲洗多次,使用 HE 染色试剂盒染色后中性树胶封片。

2.5 免疫组织化学染色

将制备完成的切片按照脱蜡、抗原修复、阻断内源性过氧化氢酶、血清封闭、一抗孵育、二抗孵育、DAB 显色、脱水、封片的标准步骤进行免疫组化染色。每组选取适宜 6 张切片,电镜下观察神经元细胞形态、着色,使用 Image J 软件计数海马阳性细胞数。

2.6 Western blot 分析蛋白表达情况

吸取组织上清液按照 BCA 蛋白定量法测定从脑组织海马中提取的蛋白含量。与 4 × 蛋白上样缓冲液按照 4:1 的比例混匀,95 °C 加热 10 min,自然冷却后于 -20 °C 冰箱内保存。制备 SDS-PAGE 凝胶,加入电泳液后依次加入正常组、药物干预组等各组蛋白,两侧胶孔加入蛋白 Marker。冰浴盒中电泳至分离胶底部终止电泳。转膜液平衡后依据胶大小剪取 PVDF 膜、滤纸。在转膜夹中按照黑色纤维垫→3 层滤纸→凝胶→PVDF 膜→3 层滤纸→黑色纤维垫组装,清除气泡后 80 V 恒压转膜。转膜完成后脱脂牛奶封闭 2 h。稀释抗体加入对应膜中孵育过夜。二抗孵育 2 h 后加入 BCIP/NBT 显色液直至显色。BIO-RAD 凝胶成像仪采图。用 Image J 软件定量分析目的蛋白条带,以 IOD 表示蛋白条带的相对强弱。结果以目的蛋白与对照蛋白 β -actin 的积分光密度值的比值表示。结果以(目标蛋白 ID/内参 ID) × 100% 表示。

2.7 数据统计学分析

采用 SPSS18.0 进行数据的统计分析,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)检验分析,数据间的多重比较采用 LSD-t 检验(least significant difference, LSD),以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 Morris 水迷宫检测结果

随着训练时间的不断增加,各组小鼠到达平台的时间(逃避潜伏期)明显缩短。第 1、2 天为训练时间,第 3 天模型组与正常对照组小鼠相比逃避潜伏期显著延长($P < 0.01$);第 4 天、第 5 天模型组小鼠逃避潜伏期与正常对照组小鼠相比明显延长($P < 0.05$);第 3 天多奈哌齐组小鼠逃避潜伏期与模型组相比显著缩短($P < 0.05$);与模型组相比,肉苁蓉苯乙醇总苷各剂量组、毛蕊花糖苷组随着剂量的增加,小鼠逃避潜伏期明显缩短,具有显著差异($P < 0.05$)(见表 1)。

表1 肉苁蓉苯乙醇苷对 APP/PS1 双转基因小鼠逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 1 Effects of phenylethanoid glycosides on the escape latency of APP/PS1 double transgenic mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	时间 Time(s)				
	第1天 The first day	第2天 The second day	第3天 The third day	第4天 The fourth day	第5天 The fifth day
正常组 Control	60 ± 0.0	59 ± 1.2	31 ± 12.0	13 ± 3.8	11 ± 4.6
模型组 Model	60 ± 0.0	55 ± 8.9	51 ± 13.3 [#]	51 ± 14.9 ^{##}	50 ± 15.9 ^{##}
多奈哌齐组 donepezil	57 ± 1.7	58 ± 3.1	36 ± 9.6 [*]	42 ± 17.9	47 ± 11.7
肉苁蓉苯乙醇苷高剂量组 PhGs-H	45 ± 20.2	38 ± 19.2	36 ± 16.7	23 ± 16.7 [*]	18 ± 8.8 ^{**}
肉苁蓉苯乙醇苷中剂量组 PhGs-M	53 ± 6.9	45 ± 13.6	40 ± 27.6	30 ± 26.5 [*]	26 ± 28.8 [*]
肉苁蓉苯乙醇苷低剂量组 PhGs-L	60 ± 0.0	59 ± 2.5	46 ± 20.0	34 ± 24.7	21 ± 9.8 [*]
毛蕊花糖苷组 Acteoside	55 ± 7.5	42 ± 15.2	36 ± 11.4	29 ± 19.5 [*]	24 ± 18.3 [*]

注:与正常组比较,^{##} $P < 0.01$,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, ^{##} $P < 0.01$, [#] $P < 0.05$; compare with model, ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$.

水迷宫实验第6天撤去平台进行空间探索实验,记录60s内各组小鼠穿越平台位置的次数。由结果可得,模型组小鼠在设定时间内穿越平台次数与正常组小鼠相比显著减少($P < 0.01$);与模型组相比,肉苁蓉苯乙醇苷各剂量组及毛蕊花糖苷组穿越平台次数明显增加($P < 0.05$),具有显著性差异(见表2)。上述研究结果均暗示肉苁蓉苯乙醇苷可以显著改善 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠的学习记忆能力,并且具有一定的剂量依赖性。

表2 肉苁蓉苯乙醇苷对 APP/PS1 双转基因小鼠穿越平台次数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Effects of phenylethanoid glycosides across the platform number of APP/PS1 double transgenic mice($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别 Group	穿越平台次数 Number of times past the platform
正常组 Control	3.20 ± 0.45
模型组 Model	1.75 ± 0.50 ^{##}
多奈哌齐组 donepezil	3.25 ± 0.89 ^{**}
肉苁蓉苯乙醇苷高剂量组 PhGs-H	4.44 ± 1.01 ^{**}
肉苁蓉苯乙醇苷中剂量组 PhGs-M	3.56 ± 0.53 ^{**}
肉苁蓉苯乙醇苷低剂量组 PhGs-L	2.75 ± 0.71 [*]
毛蕊花糖苷组 Acteoside	3.26 ± 0.88 ^{**}

注:与正常组相比,^{##} $P < 0.01$,[#] $P < 0.05$;与模型组相比,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, ^{##} $P < 0.01$, [#] $P < 0.05$; compare with model, ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$.

3.2 病理组织染色观察结果

结果可知,正常组海马 CA1 区神经元细胞排列整齐紧密,分布较为均匀,层次清晰,椎体细胞核较

大且性状近似圆形。而模型组小鼠海马 CA1 区由于受到损伤,导致神经元细胞和形态发生明显改变,排列疏松混乱,无明显层次,细胞之间的连接松散,部分细胞核出现固缩、凋亡,使染色偏深。肉苁蓉苯乙醇苷不同剂量干预组、多奈哌齐组和毛蕊花糖苷干预组海马 CA1 区细胞均有不同程度的改善,固缩、深染的神经元细胞较模型组明显减少,但仍可看到较大的细胞间隙(见图1)。

3.3 免疫组化实验结果

肉苁蓉苯乙醇苷治疗后,取9月龄的 APP/PS1 双转基因小鼠脑部组织切片,对其海马 CA1 区进行 $A\beta_{1-40}$ 免疫组化染色,结果显示:视野内可见阳性细胞多呈圆形,大部分是胞膜着棕黄色,与正常组比较,模型组小鼠海马 CA1 区 $A\beta_{1-40}$ 阳性细胞数明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,肉苁蓉苯乙醇苷高、中剂量组和毛蕊花糖苷组阳性细胞数显著减少($P < 0.01$),多奈哌齐组和肉苁蓉苯乙醇苷低剂量组 $A\beta_{1-40}$ 阳性细胞数明显减少($P < 0.05$),具有显著性差异(见表3,图2)。

经肉苁蓉苯乙醇苷干预后,取9月龄的 APP/PS1 双转基因小鼠脑组织切片,对其海马 CA1 区进行 $A\beta_{1-42}$ 免疫组化染色,结果显示:与模型组比较,肉苁蓉苯乙醇苷各剂量组和毛蕊花糖苷组阳性细胞数显著减少,具有显著性差异($P < 0.01$)(见表4,图3)。

3.4 Western-blot 检测结果

Western-blot 法检测小鼠海马 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 蛋白的表达,结果表明,模型组小鼠海马 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 的蛋白表达较正常组明显上调,有显著性差异($P <$

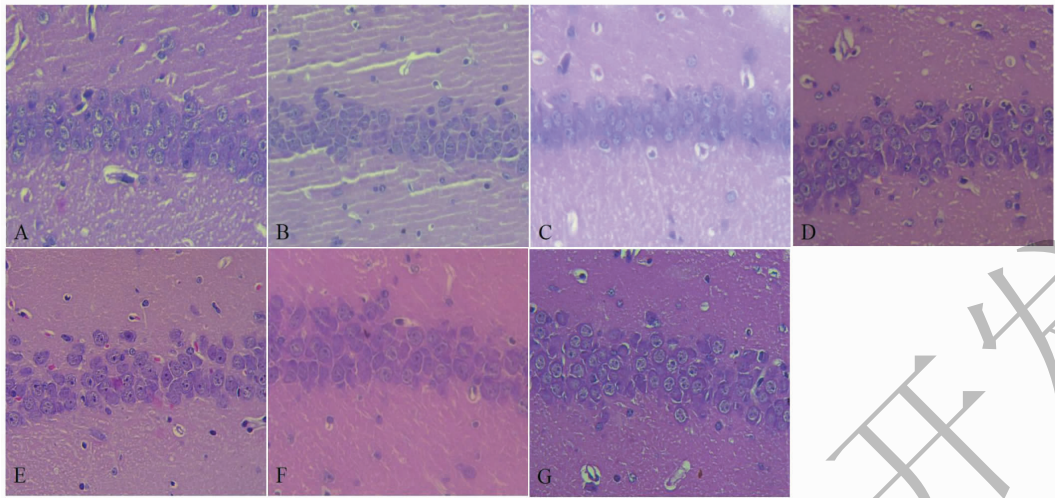


图1 各组小鼠海马 CA1 区病理组织切片染色 (HE 染色, $\times 200$)

Fig. 1 Histopathological section staining of hippocampal CA1 region of mice in different groups (HE staining, $\times 200$)

注: A 为正常组, B 为模型组, C 为多奈哌齐组, D 为肉苁蓉苯乙醇苷总苷高剂量组, E 为肉苁蓉苯乙醇苷中剂量组, F 为肉苁蓉苯乙醇苷低剂量组, G 为毛蕊花糖苷组。

Note: A is Control, B is Model, C is donepezil, D is PhGs-H, E is PhGs-M, F is PhGs-L, G is Acteoside.

表3 海马 CA1 区 $A\beta_{1-40}$ 阳性神经细胞数目 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 The number of $A\beta_{1-40}$ positive neurons in CA1 region of hippocampus ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	阳性细胞数 The number of positive neurons
正常组 Control	-	25.3 \pm 0.6
模型组 Model	-	57.3 \pm 3.5 [#]
多奈哌齐组 donepezil	0.65	30.7 \pm 0.6 [*]
肉苁蓉苯乙醇苷总苷高剂量组 PhGs-H	250	35.3 \pm 0.6 ^{**}
肉苁蓉苯乙醇苷中剂量组 PhGs-M	125	33.7 \pm 0.6 ^{**}
肉苁蓉苯乙醇苷低剂量组 PhGs-L	62.5	42.7 \pm 1.2 [*]
毛蕊花糖苷组 Acteoside	125	35.3 \pm 1.5 ^{**}

注: 与正常组相比, [#] $P < 0.01$, [#] $P < 0.05$; 与模型组相比, ^{*} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, [#] $P < 0.01$, [#] $P < 0.05$; compare with model, ^{*} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$.

0.05)。肉苁蓉苯乙醇苷各剂量干预组和毛蕊花糖苷干预组小鼠海马 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$ 蛋白表达较模型组小鼠均显著下调 ($P < 0.01$), 具有显著性差异 ($P < 0.01$), 见图 4。

4 结论

AD 主要发生在中枢神经系统, 由多因素诱导产生, 到目前为止其发病机制尚不明了, 但研究核心仍然围绕 $A\beta$ 展开。作为脑内 APP 分泌的主要多肽, $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 的异常沉积并不能直接引起神经元的变性, 从病源的角度来讲, $A\beta_{1-42}$ 产生的可溶性寡聚体 ADDLs 才是导致脑内神经元变性的真正诱因。但对这两种蛋白表达的考察也可以实时反映 AD 脑内病变程度, 间接显示可溶性寡聚体 ADDLs 的表达情况, 进而从源头动态监测脑内神经元损伤

状况, 为疾病防治提供参考。也鉴于此, $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 已成为 AD 发病机制研究中的关键靶标。

海马作为脑内评价学习记忆能力优劣的主要作用部位, 其神经元的损伤是 AD 产生认知功能障碍的主导诱因, 而海马 CA1 区是 AD 病理损伤的主要部位之一, 本部分实验采用 HE 染色法, 结果发现正常组海马 CA1 区神经元细胞排列整齐紧密, 分布较为均匀, 层次清晰。而模型组小鼠海马 CA1 区因损伤出现神经元细胞凋亡等退行性改变, 经肉苁蓉苯乙醇苷不同剂量组干预后, 其海马 CA1 区细胞形态均有不同程度的改善, 提示肉苁蓉苯乙醇苷可能具有保护神经元、抑制其凋亡的作用, 但由于 HE 染色对于细胞凋亡和神经元丢失并无特异性, 后期仍需要针对凋亡特异分子标志物进行相关检测。

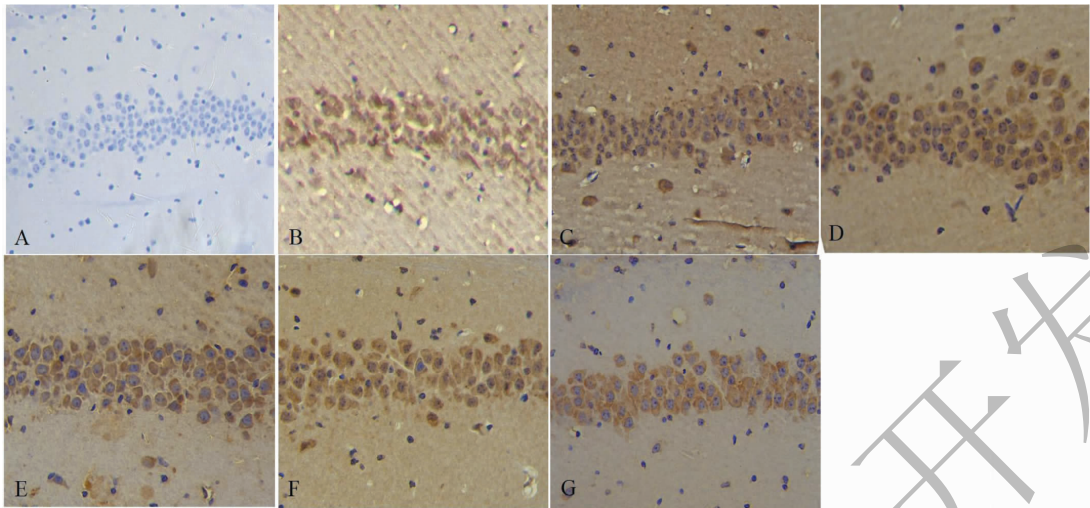


图2 各组小鼠海马CA1区 $A\beta_{1-40}$ 染色(免疫组化, $\times 200$)

Fig. 2 The expressions of $A\beta_{1-40}$ in hippocampus CA1 of mice in different groups (immunohistochemical method, $\times 200$)

注: A 为正常组, B 为模型组, C 为多奈哌齐组, D 为肉苁蓉苯乙醇总苷高剂量组,

E 为肉苁蓉苯乙醇总苷中剂量组, F 为肉苁蓉苯乙醇总苷低剂量组, G 为毛蕊花糖苷组。

Note: A is Control, B is Model, C is donepezil, D is PhGs-H, E is PhGs-M, F is PhGs-L, G is Acteoside.

表4 海马CA1区 $A\beta_{1-42}$ 阳性神经细胞数目($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 The number of $A\beta_{1-42}$ positive neurons in CA1 region of hippocampus ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose (mg/kg)	阳性细胞数 The number of positive neurons
正常组 Control	-	21.5 \pm 1.3
模型组 Model	-	50.8 \pm 1.0 ^{##}
多奈哌齐组 donepezil	0.65	34.8 \pm 1.3 [*]
肉苁蓉苯乙醇总苷高剂量组 PhGs-H	250	30.5 \pm 1.3 ^{**}
肉苁蓉苯乙醇总苷中剂量组 PhGs-M	125	31.5 \pm 1.3 ^{**}
肉苁蓉苯乙醇总苷低剂量组 PhGs-L	62.5	39.5 \pm 1.7 [*]
毛蕊花糖苷组 Acteoside	125	34.0 \pm 1.4 ^{**}

注: 与正常组相比, ^{##} $P < 0.01$, [#] $P < 0.05$; 与模型组相比, ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ 。

Note: Compare with control, ^{##} $P < 0.01$, [#] $P < 0.05$; compare with model, ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ 。

HE染色法是组织病理学考察的经典方法,对待测组织的前处理直接关系到染色结果。实验中作者发现,由于转基因小鼠海马位于端脑颞叶的内侧深部,体积较小,组织分离难度较大,稍有不慎就会对其造成机械损伤,从而无法有效观察其病理改变。同时,因转基因小鼠价格昂贵,且实验给药周期较长,样本一旦损失可能影响研究的整体进度。因此,当小鼠完成心脏灌注后,全脑取出使用多聚甲醛固定,手术刀片除去嗅球部分,其余脑组织全部进行脱水、包埋步骤,切片厚度控制在3~5 μm ,在保证海马体完整的前提下优化了操作流程,提高了研究效率。

在Western-blot检测中作者发现,由于 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 蛋白分子量较小,使表达条带不易印迹,因而需要对其SDS-PAGE凝胶浓度、电泳时间和转膜时间进行筛选。分离胶浓度过小会导致电泳泳道迁移,蛋白激活不完全;电泳时间过长会导致条带偏移出凝胶层;相应的转膜时间过久则会使蛋白印迹模糊,从而影响一抗孵育和二抗结合。鉴于此,本研究经预实验摸索,最终选择15%分离胶,电泳和转膜2小时对 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 进行蛋白印迹,考察其表达情况。

目前在对蛋白调控所采用的技术手段中,Western-blot法主要进行定量,考察相关蛋白具体表达量。而免疫组化法则从定性角度出发,一方面更直

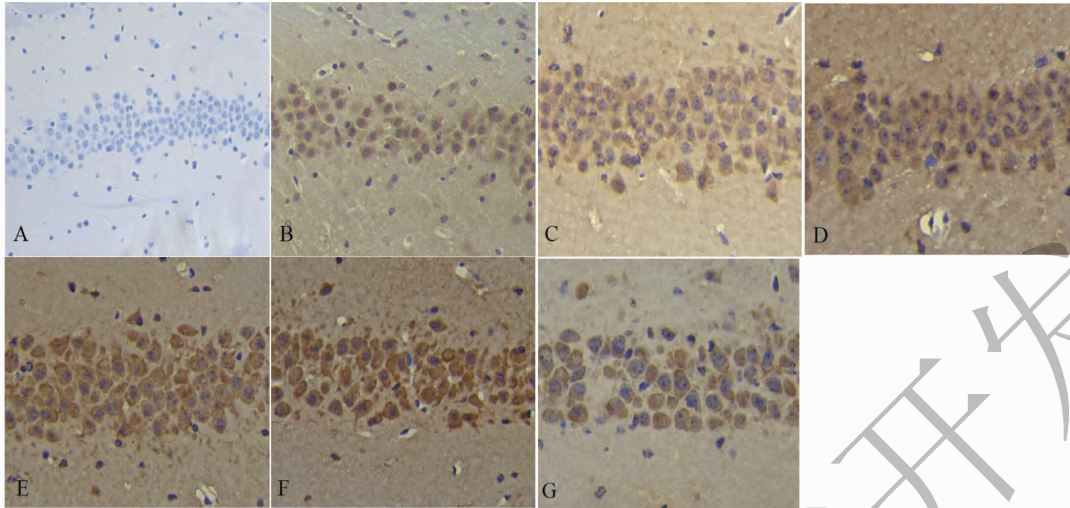


图3 各组小鼠海马 CA1 区 $A\beta_{1-42}$ 染色(免疫组化, $\times 200$)

Fig. 3 The expressions of $A\beta_{1-42}$ in hippocampus CA1 of mice in different groups (immunohistochemical method, $\times 200$)

注: A 为正常组, B 为模型组, C 为多奈哌齐组, D 为肉苁蓉苯乙醇总苷高剂量组,

E 为肉苁蓉苯乙醇总苷中剂量组, F 为肉苁蓉苯乙醇总苷低剂量组, G 为毛蕊花糖苷组。

Note: A is Control, B is Model, C is donepezil, D is PhGs-H, E is PhGs-M, F is PhGs-L, G is Acteoside.

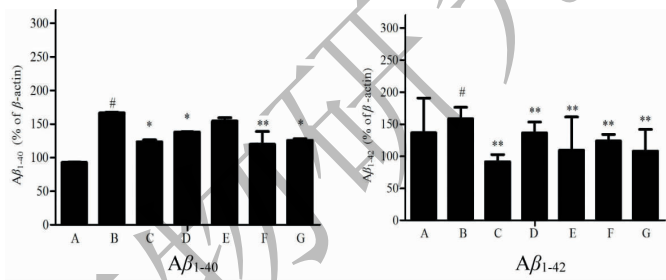


图4 各组小鼠 $A\beta$ 蛋白表达结果

Fig. 4 Results of $A\beta$ proteins expression in different group of mice

注: A 为正常组, B 为模型组, C 为多奈哌齐组, D 为肉苁蓉苯乙醇总苷高剂量组,

E 为肉苁蓉苯乙醇总苷中剂量组, F 为肉苁蓉苯乙醇总苷低剂量组, G 为毛蕊花糖苷组。

Note: A is Control, B is Model, C is donepezil, D is PhGs-H, E is PhGs-M, F is PhGs-L, G is Acteoside.

观的展现蛋白与抗体特异性结合程度,另一方面佐证定量结果。因免疫组化法是通过抗体与组织病理切片上的抗原位点结合来检测蛋白表达情况,所以组织病理切片的制作显得尤为重要。切片不易过厚,切片完成后应注意保存,避免组织切面受到外界损伤;处理前应进行充分的脱蜡,时间不宜少于2小时;选择条件温和、附带损伤较小的柠檬酸缓冲液对抗原进行修复,去除过氧化氢酶,充分暴露抗原位点,使一抗与位点完全契合。以上两种方法作为分子生物学常用检测手段,相辅相成,为蛋白的调控研究提供了技术保障。

本研究借助 HE 等方法对脑内海马病变情况、

$A\beta$ 相关蛋白表达进行了考察,结果显示,经肉苁蓉苯乙醇苷干预后,AD 模型小鼠脑内海马 CA1 区细胞形态均有不同程度的改善, $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 的表达量明显下调,此外通过研究还发现毛蕊花糖苷干预组保护神经元作用优于苯乙醇总苷组,提示毛蕊花糖苷作为肉苁蓉苯乙醇苷代表性单体,相较于肉苁蓉苯乙醇总苷,其改善 AD 模型鼠脑区病理改变进而发挥拮抗 AD 作用潜能巨大,具体作用机制有待后续进一步研究。本研究完善肉苁蓉从 $A\beta$ 角度拮抗 AD 作用机制的研究资料的同时,为后期进一步阐明肉苁蓉有效组分或活性单体抗 AD 作用机制奠定研究基础。

参考文献

- 1 Mark EJ, M Da, Lori AE, et al. Alzheimer disease [J]. *Mayo Clin Proc*, 2016, 91: 117-118.
- 2 Morley JE, Farr SA, Nguyen AD. Alzheimer disease [J]. *Clin Geriatr Med*, 2018, 34: 591-601.
- 3 Ian F. Alzheimer disease: Epigenetics links ageing with Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14: 254.
- 4 Saeed E, Leila A, Mehdi M. Serum concentration of beta amyloid peptide and the activity of angiotensin converting enzyme in Alzheimer's disease patients; search for a potential biomarker [J]. *J Int Med Res*, 2016, 4: 421-427.
- 5 Younkin SG. The role of A β 42 in Alzheimer's disease [J]. *J Physiol Paris*, 1998, 92: 289-292.
- 6 Folch J, Eitchet M, Petrov D, et al. Review of the advances in treatment for Alzheimer disease; strategies for combating β -amyloid protein [J]. *Neurologia*, 2018, 33(1): 47-58.
- 7 Charlotte R. Alzheimer disease; blood amyloid- β successfully signals AD [J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 14: 195.
- 8 Yu JT, Zhang C. Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease; from brain to periphery [J]. *Neurotox Res*, 2016, 29: 197-200.
- 9 Kwakowsky A, Calvo-Flores GB, Pandya M, et al. GABA α receptor subunit expression changes in the human Alzheimer's disease hippocampus, subiculum, entorhinal cortex and superior temporal gyrus [J]. *J Neurochem*, 2018, 145: 374-392.
- 10 Seong GJ, Yong JK, Kyoung AK, et al. Visualization of altered hippocampal connectivity in an animal model of Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55: 7886-7899.
- 11 Chen J, Zhou SN, Zhang YM, et al. Glycosides of cistanche improve learning and memory in the rat model of vascular dementia [J]. *Eur Rev Med Pharmacol*, 2015, 19: 1234-1240.
- 12 Xian WB, Qian H, Geng ZC, et al. Comparative study of HPLC fingerprints of *Cistanche deserticola* harvested in different seasons [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 86-90.
- 13 Jia JX, Yan XS, Cai ZP, et al. The effects of phenylethanoid glycosides, derived from *Herba cistanche*, on cognitive deficits and antioxidant activities in male SAMP8 mice [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2017, 80: 1180-1186.
- 14 Jia JX, Yan XS, Song W, et al. The protective mechanism underlying phenylethanoid glycosides (PHG) actions on synaptic plasticity in rat Alzheimer's disease model induced by beta amyloid 1-42 [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2018, 81: 1098-1107.
- 15 Li N, Bai HY, Lou JY. Protective effect of *Cistanche deserticola* preparation on brain of patients with Alzheimer's disease [J]. *China Health Stan Manag* (中国卫生标准管理), 2015, 6: 115-116.
- 16 Zhang YM, Chen J, Wu W, et al. Effects of GCs on behavior and expression of tau protein P-tau protein and A β amyloid protein in hippocampus of VD Rats [J]. *J Stroke and Neuropat* (中风与神经疾病杂志), 2015, 32: 494-496.
- 17 Peng XM, Gao L, Huo SX. The mechanism of memory enhancement of acteoside (verbascoside) in the senescent mouse model induced by a combination of D-gal and AlCl $_3$ [J]. *Phytother Res*, 2015, 29: 1137-1144.
- 18 Wu CR, Lin HC, Su MH. Reversal by aqueous extracts of *Cistanche tubulosa* from behavioral deficits in Alzheimer's disease-like rat model; relevance for amyloid deposition and central neurotransmitter function [J]. *BMC Complem Altern M*, 2014, 14: 202-203.
- 19 Din H, Chen H, Jiang Y, et al. Effect of pyramidin on neurotransmitters in hippocampus and cortex of rats with Alzheimer's disease [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2014, 30: 1564-1569.
- 20 Liu YJ, Liu XL, Liu XM, et al. Effect of pyramidin on excitatory amino acids in brain of Alzheimer's disease rats [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2015, 26: 1830-1832.