

天麻粉预防痴呆小鼠模型发病及其对抗氧化作用的影响

高玉梅, 王晓玲, 邓于新, 任家谋, 沈祥春, 官志忠, 齐晓岚*

(贵州医科大学 地方病与少数民族疾病教育部重点实验室, 贵州省医学分子生物学
重点实验室, 药学院, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:** 研究长期灌胃天麻粉是否可以改善 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病(AD)模型小鼠学习记忆能力以及延缓 AD 进程,这些作用是否与调控 Kelch 样环氧氯丙胺相关蛋白 1 (Keap1)-核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)/血红素加氧酶-1 (HO-1) 抗氧化应激通路有关,进一步探讨天麻粉的神经保护作用机制以及对 AD 预防和治疗的作用。**方法:** APP/PS1 双转基因小鼠模型,将实验小鼠分为 5 组,正常组,正常给药组,模型组,天麻粉预防组,天麻粉治疗组。正常给药组,天麻粉预防组在小鼠 8 周龄时每日灌胃同等剂量的天麻粉(1.5 g·kg⁻¹);正常组、模型组同时给予等量的生理盐水,直至 24 周龄时行 Morris 水迷宫检测小鼠学习和记忆能力,天麻粉治疗组待小鼠 22 周龄时,连续 2 周每天灌胃同等剂量天麻粉(1.5 g·kg⁻¹),灌胃至 24 周龄时行 Morris 水迷宫检测小鼠穿越平台次数、逃避潜伏期及平台停留时间;提取小鼠海马组织 RNA,实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)检测 Nrf2,HO-1,Keap1 的 mRNA 水平;蛋白免疫印迹法 (Western blot)检测小鼠海马组织中 Nrf2,HO-1,Keap1 蛋白的表达水平。**结果:** 与正常组比较,水迷宫检测结果显示,模型组小鼠的学习记忆能力显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,天麻粉预防组、天麻粉治疗组小鼠学习记忆能力显著提高($P < 0.01$);与正常组比较,模型组小鼠海马组织中 Nrf2,HO-1 的 mRNA 及蛋白水平均有不同程度的降低($P < 0.05, P < 0.01$),与模型组比较,天麻粉预防组小鼠海马组织中 Nrf2,HO-1 的 mRNA 及蛋白水平均有不同程度的增高($P < 0.05, P < 0.01$),天麻粉治疗组 Nrf2,HO-1 mRNA 水平显著增高($P < 0.01$),Nrf2,HO-1 蛋白表达水平变化差异无统计学意义,各组间 Keap1 的 mRNA 及蛋白水平变化无统计学差异。**结论:** Morris 水迷宫及其他结果显示天麻粉能够改善 APP/PS1 小鼠的学习和记忆能力,且其可能通过调控 Keap1-Nrf2/HO-1 通路,增强下游抗氧化基因的表达发挥抗氧化功能,进而改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆能力。

[关键词] 天麻; APP/PS1 双转基因小鼠; 阿尔茨海默病; Kelch 样环氧氯丙胺相关蛋白 1 (Keap1) -核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) / 血红素加氧酶-1 (HO-1) 通路

[中图分类号] R22;R24;R289;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)03-0052-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200337

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191018.0935.001.html>

[网络出版时间] 2019-10-18 10:00

Effect of Gastrodiae Rhizoma Powder on Prevention of Dementia and Oxidation Resistance in Mice

GAO Yu-mei, WANG Xiao-ling, DENG Yu-xin, RENG Jia-mou, SHEN Xiang-chun,
GUAN Zhi-zhong, QI Xiao-lan*

(Key Laboratory of Endemic and Ethnic Disease, Ministry of Education, Guizhou Province Key Laboratory of Medicine Molecular Biology, Pharmacy School, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To study whether long-term administration of Gastrodiae Rhizoma powder can improve the learning and memory ability of APP^{swe}/PS1^{dE9} double transgenic (APP/PS1) Alzheimer's disease

[收稿日期] 20190627(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860207);贵州省科技计划项目[黔科合基础(2019)1437号];2018年贵州省研究生教育创新计划项目[黔教合 YJSCXJH(2018)041];教育部“长江学者和创新团队发展计划资助”项目(LRT13058)

[第一作者] 高玉梅,在读硕士,从事阿尔茨海默病研究,E-mail:1627986831@qq.com

[通信作者] *齐晓岚,博士,教授,博士生导师,从事阿尔茨海默病研究,E-mail:xiaolan76@163.com

(AD) model mice and delay the progress of AD whether these effects are related to the regulation of antioxidant stress pathway in Kelch-like epoxylopropylamine-related protein 1 (Keap1) -nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) /heme oxygenase (HO) -1, and further explore the neuroprotective mechanism of Gastrodiae Rhizoma powder and its role in the prevention and treatment of AD. **Method:** APP/PS1 double transgenic mice model, the mice consisted of five groups: normal, normal administration group, model group, Gastrodiae Rhizoma powder prevention group, Gastrodiae Rhizoma powder treatment group. The mice in the normal administration group and the Gastrodiae Rhizoma powder prevention group were given the same dose of Gastrodiae Rhizoma powder ($1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) daily at the age of 8 weeks. The normal group and model group were given the same amount of normal saline at the same time, until 24 weeks old, Morris water maze was used to test the learning and memory ability of mice, and the treatment group was treated with Gastrodiae Rhizoma powder at 22 weeks old. The mice were given the same dose of Gastrodiae Rhizoma powder ($1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) every day for 2 weeks. The number of crossing platform, escape latency and platform residence time of mice were detected by Morris water maze from 24 weeks old to 24 weeks old. RNA, Real-time PCR was extracted from mouse hippocampus to detect the mRNA level of Nrf2, HO-1, Keap1, and Western blot was used to detect the expression of Nrf2, HO-1, Keap1 protein in mouse hippocampus. **Result:** Compared with normal group, the water maze test showed that the learning and memory ability of model group was lower than that of the model group ($P < 0.01$), and the learning and memory ability of Gastrodiae Rhizoma powder prevention group and Gastrodiae Rhizoma powder treatment group was significantly higher than that of model group ($P < 0.01$). Compared with normal group, the levels of Nrf2, HO-1 and protein in the hippocampus in model group decreased in varying degrees ($P < 0.05$). Compared with model group, Gastrodiae Rhizoma powder prevented Nrf2, in the hippocampus of mice in model group. The level of HO-1 in mRNA and protein increased in different degrees ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Levels of Nrf2, HO-1 mRNA in Gastrodiae Rhizoma powder treatment group was significantly higher than that in Gastrodiae Rhizoma powder group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of Nrf2, HO-1 protein. There was no significant difference in mRNA and protein levels of Keap1 among different groups. **Conclusion:** Morris water maze test and other results showed that Gastrodiae Rhizoma powder could improve the learning and memory ability of APP/PS1 mice, and it may enhance the expression of downstream antioxidant genes by regulating Keap1-Nrf2/HO-1 pathway. And then improve the learning and memory ability of APP/PS1 mice.

[**Key words**] Gastrodiae Rhizoma; APP/PS1 double transgenic mice; Alzheimer's disease; Kelch-like epoxylopropylamine-related protein 1 (Keap1) -nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) /heme oxygenase (HO-1) pathway

阿尔茨海默病(AD)是一种最常见的痴呆类型,主要表现为年龄相关性的进行性认知功能障碍,包括学习记忆能力丧失。随着全世界人口老龄化日趋严重,对社会和家庭的影响愈加明显。对于AD发病机制,目前广泛接受的包括以下几种:淀粉样蛋白级联假说, Tau蛋白异常磷酸化假说、胆碱能假说等^[1-2]。最近的研究表明,氧化应激是AD发生中一个非常重要的病理特征,在AD的病理早期即出现氧化应激水平的增高^[3]。是发生于老年斑形成之前的上游病理事件^[4]。在AD的可能发病机制中,氧化应激的作用可能是一个新的研究靶点^[5]。核转录因子E2相关因子2(Nrf2)/抗氧化反应原件(ARE)/血红素加氧酶-1(HO-1)通路在机体抗氧化

应激中有着不可小觑的作用,AD的抗氧化研究方面主要可考虑提高Nrf2/ARE/HO-1通路的激活及下游相关基因的表达。天麻为兰科植物天麻的干燥块茎,2015年版《中国药典》记载,天麻中含有天麻素、香草醛、香荚兰醇、维生素A类等多种微量元素^[6]。当代的药理学研究发现天麻素具有抗氧化、抗炎、抗凋亡等多种生物学活性^[7]。也有相关研究报告,天麻提取物可以改善血管性痴呆大鼠学习记忆能力^[8],在AD中有一定的抗氧化作用^[9-10],但其作用机制并未清晰。在此项研究中,通过在AD未出现病理特征前长期给予天麻以及出现病理特征后再给予天麻粉,依此检测痴呆小鼠模型学习记忆能力的变化、抗氧化应激变化情况并进一步检测Kelch

样环氧氯丙胺相关蛋白 1 (Keap1)-Nrf2/HO-1 通路上下游蛋白表达变化,明确天麻粉及 Keap1-Nrf2/HO-1 通路在 AD 模型小鼠中的关系。因此,本研究旨在探究天麻粉在 APP/PS1 小鼠中的抗氧化作用机制以及长期给药是否可以从预防的角度来缓解 AD 进程,为 AD 的防治提供参考依据。

1 材料

1.1 动物 30 只 8 周龄雄性野生型小鼠,45 只 8 周龄 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病雄性模型小鼠,均购自上海南方模式生物科技股份有限公司,合格证号 SCXK(沪)2017-0010,实验动物均按照国家实验动物饲养和使用指南,饲养于贵州医科大学动物实验中心 SPF 级环境,使用独立通风柜饲养,动物房温度(22 ± 2) °C,湿度 40% ~ 60%。所有动物实验操作均获得贵州医科大学实验动物伦理委员会许可。

1.2 药物与试剂 天麻粉由贵州医科大学药学院赠送,由贵州医科大学沈祥春教授鉴定为正品;兔抗鼠 Nrf2 多克隆抗体,兔抗鼠 HO-1 多克隆抗体;兔抗鼠 Keap1 多克隆抗体(美国 GeneTex 公司,批号分别为 GTX103322, GTX101147, GTX54329);鼠抗鼠 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(上海 Absin 公司,批号 abs830031);抗兔二抗,抗鼠二抗(美国 CST 公司,批号分别为 7074, 7076);BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 TL276913);RNA 提取试剂盒(RNA-Quick Purification Kit)及 RNA 逆转录试剂盒(Fast All-in-One RT Kit)(上海奕杉生物公司科技有限公司,批号分别为 RN002plus, RT001); β -actin, Nrf2, HO-1 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,引物序列见表 1, 2。

表 1 APP/PS1 双转基因小鼠模型鉴定引物序列

Table 1 APP/PS1 double transgenic mouse model identification primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度 /bp	退火温度 /°C
APP	上游 GACTGACCACTCGACCAGGTCTG 下游 CTTGTAAGTTGGTCATATCCG	400	55
PS1	上游 AATAGAGAACGGAGCA 下游 GCCATGAGGGCACTAATCAT	600	55

1.3 仪器 Morris 水迷宫及水迷宫配套分析软件(中国医学科学院药物研究所);Illumina Eco 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)仪(美国 Illumina 公司);TANON 4200 型全自动化学发光成像系统(上

表 2 PCR 引物序列

Table 2 PCR primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度 /bp	退火温度 /°C
Nrf2	上游 ACCAAGGGGCACCATATAAAAG 下游 CTTGCGCCGAGTTGCACTCA	114	57
HO-1	上游 AGGTACACATCCAAGCCGAGA 下游 CATCACCAGCTTAAAGCCTTCT	86	57
Keap1	上游 CGGGGACGCAGTGATGTATG 下游 TGTGTAGCTGAAGGTTCCGGTTA	85	61
β -actin	上游 GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG 下游 ATGCCACAGGATTCCATACC	174	57

海天能科技有限公司);BG-power600 型转膜仪及电泳仪(北京白晶生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 将 30 只雄性野生型小鼠随机分为 2 组,即正常(野生型小鼠空白)组;正常给药(野生型小鼠天麻粉处理)组,每组 15 只。将 45 只 APP/PS1 双转基因小鼠随机分为 3 组,即模型(APP/PS1 双转基因小鼠空白)组;天麻粉预防(APP/PS1 双转基因小鼠天麻粉处理)组;天麻粉治疗(APP/PS1 双转基因小鼠正常饲养至 22 周龄时给予天麻粉处理)组,每组 15 只。各组小鼠适应性饲养后,正常给药组、天麻粉预防组在饲养至 8 周龄时开始灌胃同等剂量的天麻粉(1.5 g · kg⁻¹)^[11],正常组、模型组每日灌胃等量的生理盐水,统一灌胃至 24 周龄。天麻粉治疗组则当 APP/PS1 双转基因小鼠饲养至 22 周龄时,开始灌胃同等剂量的天麻粉(1.5 g · kg⁻¹)至 24 周龄。后行 Morris 水迷宫检测各组小鼠学习和记忆能力,然后腹腔注射 4% 水合氯醛(20 mL · kg⁻¹)进行麻醉,开胸暴露小鼠心脏,用 1 mL 注射器经左心室抽取小鼠血液,再用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗血管床约 4 min,剪开颅骨,小心取出脑组织在冰上分离得到海马组织, -80 °C 冰箱保存备用。

2.2 APP/PS1 双转基因小鼠繁殖及鉴定 待小鼠发育成熟后,采用 1 只 APP/PS1 双转基因雌性小鼠与 3 只同背景野生型雌性小鼠合笼的方式进行繁殖,剪取 2 周龄小鼠鼠尾提取 DNA 扩增进行基因型鉴定,鉴定 PCR 反应条件为预变性 94 °C 300 s,循环 1 次;变性 94 °C 30 s,40 个循环;退火 55 °C 30 s,延伸 72 °C 60 s,终延伸 72 °C 300 s,40 个循环。

2.3 Morris 水迷宫检测小鼠学习记忆能力 各组小鼠饲养至 24 周龄时,采用 Morris 水迷宫进行行为

学测试,测试持续 5 d。记录 Morris 测试过程中小鼠的逃避潜伏期及穿越平台次数。实验主要包括两方面,一是定位航行实验,将小鼠依次从各象限中点面向池壁放入水中,使其自由寻找平台,记录其运动轨迹和时间,设定寻找时间为 60 s,如超时未找到平台则将其引导至平台停留 10 s,记录其逃避潜伏期为 60 s,定位航行实验持续进行 4 d;二是空间探索实验,在测试的第 5 天撤除平台,在平台所在象限对侧象限中点使小鼠面向池壁入水,记录并分析小鼠的逃避潜伏期以及在 60 s 内穿越平台所在位置的次数和在目标象限停留时间及路程。

2.4 Real-time PCR 检测海马组织中 Nrf2, HO-1, Keap1 mRNA 表达水平 按 RNA 提取试剂盒步骤提取组织总 RNA,将 mRNA 经逆转录合成 cDNA 存于 -80 °C 备用。采用 Real-time PCR 仪以逆转录的产物为模板进行 Nrf2, HO-1 mRNA 水平检测定量。反应条件为预变性 95 °C 600 s,循环 1 次;变性 95 °C 15 s,40 个循环;退火 605 °C 60 s,延伸 72 °C 60 s,40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 的表达水平。

2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测海马中 Nrf2, HO-1, Keap1 蛋白的表达水平 取各组小鼠海马组织加入适量裂解液,用手动组织匀浆器匀浆,匀浆液 $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4 °C 离心 20 min,上清液即为总蛋白。各抗体稀释倍数: Nrf2 (1 : 1 000), HO-1 (1 : 1 000), Keap1 (1 : 1 000), β -actin (1 : 4 000), 二抗 (1 : 1 000)。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定各组蛋白含量,以此来计算 Western blot 蛋白上样量,

检测海马组织中 Nrf2, HO-1, Keap1 的表达水平及其内参的蛋白表达情况。用 Image J 软件分析各条带灰度值。

2.6 统计学分析 实验数据采用 SPSS 20.0 进行数据统计,实验结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 APP/PS1 双转基因小鼠模型鉴定结果 对 2 周龄小鼠剪取鼠尾进行基因型鉴定, APP 基因条带大小为 400 bp, PS1 基因条带大小为 600 bp, 1, 3, 4, 5, 7 泳道同时出现两条带视为 APP/PS1 双转基因小鼠, 2, 6 泳道没有出现相应条带则为阴性小鼠。见图 1。

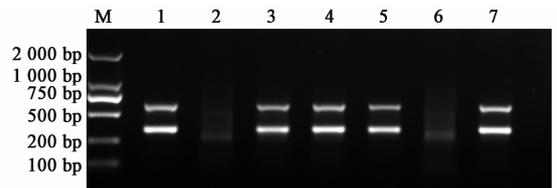


图 1 APP/PS1 双转基因小鼠模型基因型鉴定电泳

Fig. 1 Electrophoresis of genotyping in APP/PS1 double transgenic mice

3.2 对小鼠学习记忆的影响 与正常组比较,模型组小鼠逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.05, P < 0.01$), 平台所在象限停留时间和穿越目标平台次数显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较,天麻粉预防组、天麻粉治疗组小鼠逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05, P < 0.01$), 平台所在象限停留时间和穿越目标平台次数均有不同程度增加 ($P < 0.01$)。见表 3, 4。

表 3 天麻粉对小鼠连续 5 d 水迷宫实验逃避潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Gastrodiae Rhizoma powder (Gas) on escape latency of Morris water maze test (5 days) in training in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常	-	32.67 ± 20.79	23.63 ± 18.19	13.05 ± 12.46	9.12 ± 7.36	9.80 ± 7.29
正常给药	1.5	25.30 ± 18.37	18.08 ± 16.84	10.65 ± 9.59	10.74 ± 10.57	8.68 ± 7.79
模型	-	43.46 ± 14.51 ¹⁾	35.04 ± 18.04 ²⁾	21.19 ± 12.80 ²⁾	16.53 ± 9.46 ²⁾	19.3 ± 12.69 ²⁾
天麻粉预防	1.5	34.59 ± 16.38	22.18 ± 17.35 ^{4,5)}	13.15 ± 10.58 ⁴⁾	11.64 ± 8.36 ⁴⁾	10.20 ± 8.54 ⁴⁾
天麻粉治疗	1.5	37.02 ± 20.34 ³⁾	32.49 ± 20.83	15.73 ± 16.59	14.97 ± 13.17	10.19 ± 6.74 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与天麻粉预防组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 4 ~ 6 同)。

3.3 对小鼠海马组织中 Nrf2, HO-1, Keap1 mRNA 表达水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马组织中 Nrf2, HO-1 mRNA 表达水平降低 ($P < 0.01$), Keap1

mRNA 差异无统计学意义;与模型组比较,天麻粉预防组、天麻粉治疗组海马组织中 Nrf2, HO-1 mRNA 表达水平显著增高 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 4 天麻粉对小鼠第 5 天水迷宫实验的平台所在象限停留时间及穿越平台次数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Gas on residence time of platform and number of crossing platforms of water maze test in 5th day of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	平台所在象限 停留时间/s	穿越平台次数 /次
正常	-	22.53 ± 1.52	5.00 ± 0.76
正常给药	1.5	20.16 ± 3.51	5.36 ± 1.13
模型	-	10.78 ± 0.89 ²⁾	1.63 ± 0.75 ²⁾
天麻粉预防	1.5	19.33 ± 2.90 ⁴⁾	4.40 ± 0.95 ¹⁾
天麻粉治疗	1.5	21.30 ± 5.01 ⁴⁾	4.40 ± 0.84 ¹⁾

表 5 天麻粉对小鼠海马组织内 Nrf2, HO-1, Keap1 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effect of Gas on expression of Nrf2, HO-1 and Keap1 mRNA in hippocampus of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Nrf2	HO-1	Keap1
正常	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
正常给药	1.5	0.98 ± 0.07	1.24 ± 0.25	0.93 ± 0.28
模型	-	0.60 ± 0.06 ²⁾	0.69 ± 0.10 ²⁾	1.01 ± 0.26
天麻粉预防	1.5	1.30 ± 0.09 ⁴⁾	1.05 ± 0.13 ⁴⁾	0.98 ± 0.23
天麻粉治疗	1.5	1.14 ± 0.14 ⁴⁾	1.11 ± 0.22 ⁴⁾	1.00 ± 0.09

注: 正常组 Nrf2, HO-1, Keap1 mRNA 相对表达为 1。

3.4 对海马组织中 Nrf2, HO-1, Keap1 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠海马组织中 Nrf2, HO-1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), Keap1 蛋白表达水平变化差异无统计学意义; 与模型组比较, 天麻粉预防组小鼠海马组织中 Nrf2, HO-1 蛋白表达水平均有不同程度增高 ($P < 0.05$), 天麻粉治疗组小鼠海马组织中 Nrf2, HO-1 蛋白表达水平差异无统计学意义, 天麻粉预防组和天麻粉治疗组小鼠海马组织中 Keap1 蛋白表达水平变化差异无统计学意义; 与天麻粉治疗组比较, 天麻粉预防组小鼠海马组织中 Nrf2, HO-1 蛋白均有不同程度增加 ($P < 0.05$)。见图 2, 表 6。

4 讨论

AD 是目前世界上最为常见的痴呆类型^[12]。AD 国际调查指出, 全世界 AD 患者已经超过 5 000 万^[13], 并仍在持续增长。伴随着全世界人口老龄化的加剧, 预计至 2050 年, AD 患者将超过 1.3 亿^[14]。近年来的研究发现氧化应激损伤是 AD 的重要早期病理变化, 在 AD 的发病过程中发挥着重要的作用。Aβ 聚集对氧化应激的介导在 AD 的发生和进展中

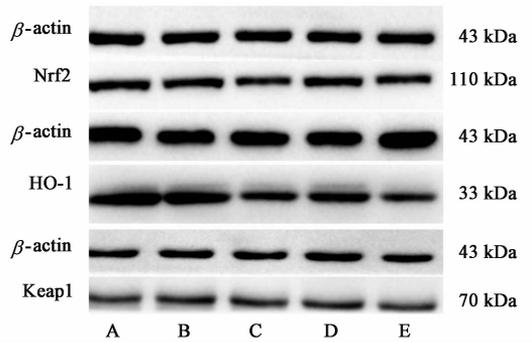


图 2 小鼠海马组织内 Nrf2, HO-1 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Nrf2 and HO-1 protein expression in hippocampus of mice

表 6 天麻粉对小鼠海马组织内 Nrf2, HO-1, Keap1 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effect of Gas on expression of Nrf2, HO-1 and Keap1 proteins in hippocampus of mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Nrf2 /β-actin	HO-1 /β-actin	Keap1 /β-actin
正常	-	140.3 ± 36.3	83.3 ± 10.5	100.3 ± 11.7
正常给药	1.5	120.3 ± 24.6	83.3 ± 15.6	108.0 ± 15.3
模型	-	75.3 ± 14.6 ¹⁾	61.9 ± 10.0 ¹⁾	116.7 ± 7.6
天麻粉预防	1.5	136.2 ± 21.4 ³⁾	81.0 ± 4.2 ³⁾	108.2 ± 7.6
天麻粉治疗	1.5	77.3 ± 22.3	63.2 ± 10.3	89.0 ± 19.8

的重要作用也得到了证实^[15]。脑组织的高代谢状态, 以及其较弱的抗氧化能力, 加上高龄患者体内的抗氧化剂如还原性谷胱甘肽, 过氧化氢酶等含量降低, 最终导致脑内氧化应激水平增高, 加重脑组织的损伤^[16]。Nrf2 已被证明是 AD 病理变化中的一种保护因子, 并且在老年 AD 动物模型和 AD 患者脑中 Nrf2 表达降低。在 Aβ 沉积时, APP/PS1 转基因小鼠脑中 Nrf2 蛋白表达降低^[17]。Nrf2 作为一种调节氧化应激相关基因的主转录因子, 其启动子中含有抗氧化反应元件。Nrf2 的结构和功能改变在大多数神经退行性疾病中发现, 包括 AD, 帕金森病 (PD) 和肌萎缩侧索硬化。这些神经退行性疾病是由各种危险因素发展而来的, 如累积的氧化应激、遗传和环境因素。Nrf2 通过上调抗氧化防御途径激活, 抑制炎症和维持蛋白质稳态来保护机体免于氧化应激损伤。Nrf2 已成为 AD 的新治疗靶点, 实际上, 最近的研究表明 Nrf2 激活剂在 AD 动物模型和表达 AD 病理的培养的人细胞中具有治疗效果^[18]。现代药理学研究发现天麻素具有抗氧化、抗炎、抗凋亡等多种生物活性, 可调节体内多种生理过程^[19-20]。研究表明, 天麻具有很好的神经保护作用

并能改善学习记忆能力,对 AD 患者具有较好的治疗作用^[21]。

本课题研究中采取不同给药方案,长期及短期给予天麻粉来探究天麻粉在 APP/PS1 双转基因小鼠中的抗氧化作用的效果。Morris 研究结果显示天麻粉能够改善 APP/PS1 双转基因小鼠的学习记忆能力,且正常给药组与正常组比较,正常给药组小鼠的逃避潜伏期和穿越平台次数均有提高,但差异无统计学意义;天麻粉预防组小鼠在对抗 AD 抗氧化的效果优于天麻粉治疗组,且与模型组比较,天麻粉预防组小鼠的 Nrf2, HO-1 在 mRNA 水平及蛋白表达水平均有不同程度的提高,天麻粉治疗组与模型组比较 Nrf2, HO-1 mRNA 水平有增高现象,但在蛋白水平差异没有统计学意义。与天麻粉治疗组比较,天麻粉预防组小鼠海马组织中 Nrf2, HO-1 在 mRNA 水平均有增高,但在蛋白水平天麻粉预防组蛋白有相应增高,天麻粉治疗组变化无统计学意义,各组中 Keap1 mRNA 及蛋白水平变化差异无统计学意义,这些提示天麻粉在 AD 发挥抗氧化作用需要一定的作用时间和累积作用,Keap1 mRNA 及蛋白水平无变化,笔者猜测天麻粉在提高小鼠抗氧化能力中并不直接通过提高整条抗氧化应激通路来增强抗氧化能力,而是通过改变 Keap1 的结构来实现的^[22]。在 APP/PS1 双转基因小鼠模型中,随着小鼠周龄增加, A β 的积聚加重, Nrf2 表达水平均降低。其他研究表明,随着 A β 的聚集, Nrf2 调节的抗氧化相关基因的表达也存在异常^[23],这些正好与前面所述一致,天麻粉可能通过改变 Keap1 的结构来激活 Nrf2 通路,促进 Nrf2 的细胞核转位,增强下游抗氧化基因的表达,提高机体的抗氧化能力,最终改善 APP/PS1 双转基因小鼠认知功能;另外,关于传统中药天麻粉也有文献研究发现其具有抗氧化、抗炎作用^[24],故笔者推测天麻粉在改善小鼠记忆方面可能与提高抗氧化应激 Keap1-Nrf2/HO-1 通路上相关蛋白表达有一定关联,且中医药的作用特点是长期、反复,猜测天麻粉对 AD 的作用中,可能预防的作用要比后期治疗作用表现的更有意义。

[参考文献]

[1] Association A. 2014 Alzheimer's disease facts and figures[J]. Alzheimer Dementia, 2010, 10(4): e47-e92.
[2] Guzior N, Wiecekowska A, Panek D, et al. Recent development of multifunctional agents as potential drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease[J].

Curr Med Chem, 2015, 22(3): 373-404.
[3] 张立敏,安红梅. 中药复方抗氧化治疗阿尔茨海默病[J]. 世界中医药, 2017, 12(3): 708-711.
[4] Swomley A M, Butterfield D A. Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics[J]. Arch Toxicol, 2015, 89(10): 1669-1680.
[5] WANG X, WANG W, LI L, et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(8): 1240-1247.
[6] 李青,赵冰清. 天麻微量元素测定研究[J]. 湖南中医杂志, 1998, doi: 10.16808/j.cnki.issn1003-7705. 1998. 04. 072.
[7] DU F, WANG X, SHANG B, et al. Gastrodin ameliorates spinal cord injury via antioxidant and anti-inflammatory effects[J]. Acta Biochimica Polonica, 2016, 63(3): 589-593.
[8] 段小花,李秀芳,周宁娜,等. 天麻提取物对血管性痴呆大鼠学习记忆及海马氧化损伤的作用[J]. 中成药, 2011, 33(7): 1138-1141.
[9] 黄丽亚,罗洪斌,余洁,等. 天麻对痴呆大鼠脑组织蛋白和过氧化脂质影响[J]. 中国公共卫生, 2007(10): 1189-1190.
[10] 冯超,姜霁芳,唐美霞,等. 天麻素对 A β_{1-42} 致痴呆大鼠模型的保护作用及机制探究[J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(1): 89-96.
[11] 肖俊,张金娟,熊英,等. 德江天麻对东莨菪碱诱导的记忆障碍模型小鼠学习记忆能力的影响[J]. 贵阳医学院学报, 2015, 40(11): 1194-1196.
[12] 郝徐艺,罗思,程淑意,等. 当归芍药散对 AD 细胞模型铜离子介导的 A β 聚集的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 45-51.
[13] Kikis E A. Nature versus nurture: does proteostasis imbalance underlie the genetic, environmental, and age-related risk factors for Alzheimer's disease? [J]. Healthcare, 2017, 5(3): 46.
[14] 王玉敏,王洪权. 血红素加氧酶 1 在阿尔茨海默病中的神经保护作用研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(14): 2499-2501.
[15] SHEN C, CHEN Y, LIU H, et al. Hydrogen peroxide promotes Abeta production through JNK-dependent activation of gamma-secretase[J]. J Biol Chem, 2008, 283(25): 17721-17730.
[16] Sargent L, Brown R. Assessing the current state of cognitive frailty: measurement properties[J]. J Nutr Health Aging, 2017, 21(2): 152-160.
[17] Kanninen K, Heikkinen R, Malm T, et al. Intrahippocampal injection of a lentiviral vector

expressing Nrf2 improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. P Natl A Sci India B, 2009,106(38):16505-16510.

[18] Bahn G, Jo D G. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease through modulation of NRF2 [J]. Neuro Mol Med, 2019, doi:10. 1007/s12017-018-08523-5.

[19] 文欢,张大燕,王伟,等. 天麻素对糖氧剥夺再复供皮层神经细胞 NF-κB 炎症级联信号通路表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(21):104-111.

[20] DU F, WANG X, SHANG B, et al. Gastrodin ameliorates spinal cord injury via antioxidant and anti-inflammatory effects [J]. Acta Biochimica Polonica, 2016, 63(3):589-593.

[21] 陈颖,常琪,刘新民. 天麻对中枢神经系统作用的研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(6):960-962.

[22] Fiona K, Oyinkan S A, Ivanov D K, et al. Direct Keap1-Nrf2 disruption as a potential therapeutic target for Alzheimer's disease[J]. PLoS Genetics, 2017, 13(3):e1006593.

[23] Kanninen K, Malm T M, Jyrkkanen H K, et al. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 protects against beta amyloid[J]. Mol Cell Neurosci, 2008, 39(3):302-313.

[24] 方威,胡国章,刘乃杰. 阿尔茨海默病与氧化应激的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(20):5205-5207.

[责任编辑 孙丛丛]

《中国实验方剂学杂志》第五届编委会名单

(按拼音字母排序)

- 顾问: 陈凯先 姜廷良 李连达 王永炎 张伯礼
- 主编: 吴以岭
- 副主编:
- 陈士林 高秀梅 果德安 黄璐琦 刘良 刘建勋 吕爱平 乔延江 田书彦 王键 王阶
王喜军 肖小河 萧伟 张卫东 朱晓新
- 秘书长: 刘 颀 全 燕
- 常务编委:
- 边宝林 巢志茂 陈彦 戴敏 段金廌 龚千锋 郭姣 郭兰萍 荆志伟 雷燕 林娜
刘安 刘保廷 刘春生 刘铜华 苗明三 倪健 倪艳 彭成 彭代银 任钧国 沈祥春
孙晓波 唐于平 唐旭东 屠鹏飞 王一涛 王长虹 王丹巧 王峥涛 王智民 肖永庆 谢恬
杨洪军 杨明 杨文明 叶祖光 赵海蓉 赵艳玲
- 编委:
- 边宝林 才谦 蔡宇 曹晖 曹军 巢志茂 陈道峰 陈军 陈士林 陈彦 陈燕军
崔晓兰 戴敏 邓家刚 董玉 窦金辉 窦永起 杜力军 杜守颖 段金廌 范颖 奉建芳
付建华 高慧 高慧敏 高秀梅 龚慕辛 龚千锋 果德安 郭姣 郭兰萍 郭庆梅 郭新峰
韩立炜 何小鹏 贺福元 侯小涛 胡义扬 黄璐琦 黄勇 季莉莉 姜森 蒋宁 金若敏
荆鲁 荆志伟 康文艺 孔祥英 寇俊萍 雷燕 李川 李范珠 李慧 李建荣 李军
李文龙 李喜香 李孝栋 李玉洁 李彧 李震宇 梁爱华 梁日欣 梁泽华 林成仁 林慧彬
林丽美 林娜 林瑞超 刘安 刘保廷 刘斌 刘春生 刘洪斌 刘建勋 刘良 刘平
刘屏 刘强 刘善新 刘淑芝 刘树民 刘铜华 刘汶 刘晔 刘晔 刘晔 刘晔 刘晔
陆洋 罗晓健 吕爱平 吕诚 马百平 孟宪生 苗明三 倪健 倪艳 聂克 彭成
彭代银 朴香兰 乔延江 丘琴 邱模炎 饶毅 任钧国 尚立芝 沈祥春 沈欣 石森林
宋春生 宋洪涛 宋业强 隋峰 隋在云 孙冬梅 孙明杰 孙蓉 孙晓波 唐旭东 唐于平
田书彦 田树革 田元祥 全燕 屠鹏飞 汪晴 王丹巧 王凤云 王伽伯 王弘 王键
王阶 王蕾 王如峰 王瑞 王世东 王淑美 王树荣 王停 王伟明 王喜军 王旭
王一涛 王跃生 王长虹 王振中 王峥涛 王智民 魏金凤 吴玢 吴红彦 吴嘉瑞 吴以岭
肖洪彬 肖小河 肖永庆 萧伟 谢鸣 谢恬 宿树兰 徐瞰海 许海玉 闫智勇 杨滨
杨戈 杨洪军 杨岚 杨明 杨伟鹏 杨文明 姚魁武 叶祖光 殷军 袁亮 袁媛
张爱华 张村 张兰珍 张丽 张树峰 张卫东 张艳 张艳军 张玉杰 张振凌 赵保胜
赵海蓉 赵军宁 赵艳玲 赵宗江 郑瑞茂 郑晓珂 钟贇生 钟鸣 朱晶晶 朱晓新
斯拉甫·艾白