

细叶远志皂苷对 AD 大鼠肝组织 LRP1 水平的影响

胡燕¹, 蒋辉², 房宇³, 倪杰³

1. 南京市仙林鼓楼医院急诊内科, 江苏 南京 210046; 2. 江苏省中医院神经内科, 江苏 南京 210029;
3. 南京鼓楼医院急诊内科, 江苏 南京 210009

摘要: **目的** 探讨细叶远志皂苷(Tenuifolin)对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠肝组织低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP1)水平的影响。**方法** SD大鼠60只随机分为正常组、模型组及细叶远志皂苷低剂量组、中剂量组、高剂量组各12只。除正常组外,采用脑立体定位技术将 β -淀粉样蛋白($A\beta$)₁₋₄₀注入大鼠右侧海马CA1区制备AD模型,并予不同剂量细叶远志皂苷(低、中、高剂量组细叶远志皂苷使用剂量分别为16、32、64 mg/kg)灌胃治疗4周。术后对各组大鼠采用Morris水迷宫行为学测试检测大鼠学习记忆能力,之后处死大鼠,每组取6只分别进行Real-time PCR和Western blot检测肝组织LRP1 mRNA、蛋白的表达变化。**结果** (1)Morris水迷宫:模型组大鼠学习记忆能力较正常组明显降低($P < 0.01$),经细叶远志皂苷灌胃治疗后,各剂量组逃逸潜伏期较模型组不同程度缩短、游泳路程缩小、穿越虚拟平台次数增加,中、高剂量组与模型组比较差异有统计学意义(P 均 < 0.01)。(2)Real time PCR和Western blot:模型组肝组织LRP1 mRNA和蛋白的相对表达量均明显低于正常对照组(P 均 < 0.01),给予细叶远志皂苷治疗后,各剂量组LRP1 mRNA和蛋白相对表达量随着给药剂量的递增而递升;两两比较,除低剂量组外,中、高剂量组分别高于模型组(P 均 < 0.01)。**结论** 细叶远志皂苷可能通过提高肝组织内LRP1的含量,从而改善 $A\beta$ ₁₋₄₀诱导的AD大鼠的学习记忆能力。

关键词: 细叶远志皂苷; 低密度脂蛋白受体相关蛋白; 阿尔茨海默病; β -淀粉样蛋白₁₋₄₀; 大鼠

中图分类号: R 749.1⁺6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)04-0471-04

Effect of tenuifolin on LRP1 level in hepatic tissues of AD rats

HU Yan*, JIANG Hui, FANG Yu, NI Jie

*Department of Emergency Internal Medicine, Xianlin Hospital of Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing, Jiangsu 210046, China

Corresponding author: NI Jie, E-mail: 421457626@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effects of tenuifolin on low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) level in liver tissues of Alzheimer's disease (AD) model rats. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into normal group, model group and tenuifolin low-, middle-, high-dose groups ($n = 12$ each). The β -amyloid protein ($A\beta$)₁₋₄₀ was injected into rat right hippocampus CA1 region by brain stereotactic technique to establish AD model in each group except for normal group. In tenuifolin low-, middle-, high-dose groups, gavage administration of tenuifolin of 16, 32, 64 mg/kg were respectively given for four weeks. After this, Morris water maze behavioral test was used to detect the learning and memory ability of rats. Then, rats were killed. Taking 6 rats in each group, the expressions of LRP1 mRNA and LRP1 protein in liver tissues were respectively detected by real time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot methods. **Results** Morris water maze test showed that (1) learning and memory ability in model group was significantly lower than that in normal group ($P < 0.01$); (2) compared with model group, the escape latency periods were shortened in different degrees; the swimming distances were reduced; the number of passing through virtual platforms increased after treatment with gavage administration of tenuifolin in each tenuifolin dose group, and there were significant differences in them between middle-, high-dose groups and model group (all $P < 0.01$). Real-time PCR and Western blot methods showed that (1) the relative expression quantities of LRP1 mRNA and LRP1 protein in liver tissues of model group were all significantly lower than those in normal group (all $P < 0.01$); (2) after treatment with tenuifolin, the relative expression quantities of LRP1 mRNA and LRP1 protein progressively increased with the increase of tenuifolin dosage in each tenuifolin dose group (all $P < 0.01$), and their expression levels in middle-dose group and high-dose group were respectively higher than

those in model group for pairwise comparison except for low-dose group (all $P < 0.01$). **Conclusion** Tenuifolin can improve learning and memory ability of $A\beta_{1-40}$ induced AD rats possible through increasing the content of LRP1 in liver tissues.

Key words: Tenuifolin; Low-density lipoprotein receptor-related protein-1; Alzheimer's disease; β -amyloid protein $_{1-40}$; Rat

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种中枢神经系统慢性渐进性的神经退行性疾病, 临床主要表现为进行性学习、认知和记忆能力的丧失, 主要病理特征为神经元胞外老年斑沉积, 胞内神经原纤维缠结和大量的神经元凋亡或变性等。目前已有的研究提示, 老年斑中的主要成分 β 淀粉样蛋白 (amyloid beta-protein, $A\beta$) 是诱发 AD 患者大脑神经细胞凋亡的主要危险因素^[1-3]。血浆中 $A\beta$ 最主要的代谢器官是肝脏, 低密度脂蛋白受体相关蛋白 (low-density lipoprotein receptor-related protein-1, LRP1) 是体内 $A\beta$ 等多种蛋白的受体, 且与其配体共存于 AD 的病理特征老年斑中, 在体内介导多种复合物的清除, 调节着体内 $A\beta$ 的平衡。肝细胞可以通过其表面表达的 LRP1 捕获血浆中游离的 $A\beta$, 使 $A\beta$ 最终在肝细胞内被降解。动物研究表明, 在灵长类动物松鼠猴中, 肝脏清除该受体的能力随年龄增高而下降。

中药远志一直是临床治疗痴呆的常用药^[4-5], 而细叶远志皂苷 (Tenuifolin, TF) 为远志的主要活性成分, 本课题组前期研究表明, TF 能通过提高脑内 LRP1 的含量从而改善 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 AD 大鼠的学习记忆能力。那么, TF 是否可以通过改变肝脏 LRP1 的含量, 从而促进 $A\beta$ 的转运和清除? 本研究通过用 $A\beta_{1-40}$ 诱导建立 AD 大鼠模型, 在 TF 处理后, 观察大鼠在水迷宫测试中的学习记忆能力, 用实时聚合酶链反应 (Real-time PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测大鼠肝组织 LRP1 mRNA、蛋白的表达变化, 对 TF 用于治疗 AD 的机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 动物分组 由南通大学实验动物中心提供的健康成年 SD 大鼠 60 只 (220 ~ 250 g), 雌雄不拘, 动物许可证号为 SCXK (苏) 2008-0010。随机分成正常组、模型组及 TF 低剂量组、中剂量组、高剂量组 (TF 使用剂量分别为 16、32、64 mg/kg), 每组 12 只。每组中用于 Real-time PCR 和 Western blot 检测各 6 只。

1.2 AD 大鼠模型的制作及 TF 治疗 正式造模前通过 Morris 水迷宫试验剔除不符合要求的大鼠, 共训练 3 d。大鼠麻醉后 (复合麻醉剂 0.2 ml/100 g, 腹腔注射) 固定于脑立体定位仪上 (江湾 I 型 C) → 颅

顶部剪毛 → 碘酒和酒精依次消毒 → 切开皮肤, 分离颅骨外骨膜, 显露前囟 → 参照《大鼠脑立体定位图谱》^[6] 记录前囟坐标 (A、L、V 依次代表矢状轴、冠状轴、垂直轴) → 以 A、L、V 坐标后移 3 mm, 右移 2 mm 处牙科钻钻穿颅骨 → 自脑表面用 1 μ l 微量进样器垂直进针 2.9 mm → 5 min 内将 1 μ l $A\beta_{1-40}$ 缓慢注入右侧海马 CA1 区 → $A\beta_{1-40}$ 充分浸入脑组织, 留针 5 min (正常组注入等体积的生理盐水) → 观察有无颅内出血 → 骨蜡封闭骨缝, 缝合皮肤 → 肌内注射青霉素预防感染。分笼饲养 3 d 后开始对低剂量组、中剂量组、高剂量组灌胃给予上海瑞齐生物提供的 TF (批号 20110925) (TF 使用剂量分别为 16、32、64 mg/kg), 正常组和模型组给予等量的生理盐水, 每日 1 次, 连续灌胃 4 周。

1.3 Morris 水迷宫行为学测试 大鼠学习记忆能力的测试参照 Morris 水迷宫法^[7]。大鼠连续灌胃 (TF 或等量生理盐水) 4 周后进行水迷宫实验: (1) 学习能力的检测采用定位航行测试; (2) 记忆能力的检测采用空间搜索测试: 记录 120 s 内大鼠通过虚拟平台的次数。

1.4 引物的设计与合成 由上海英骏公司合成大鼠 GAPDH (内参照基因) 和 LRP1 的 mRNA 引物序列, 具体序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	正向引物	反向引物
GAPDH	5'-CCTTCATTGACCTCAACTACATG-3'	5'-CTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'
LRP1	5'-GGCTCTGTGGCTCAAAGGTA-3'	5'-CCTAAAAGTGGGAGCTGGGG-3'

1.5 Real-time PCR 检测 行为学测试完毕后, 各组取 6 只大鼠, 颈椎脱臼 → 冰上分离肝脏组织备用 → Trizol 法提取各组大鼠总 RNA (Sangon 公司) → 试剂盒法合成第 1 链 cDNA (Fermentas 公司) → -20 °C 分装保存。LRP1 和 GAPDH 的 PCR 扩增 (MJ Research 公司), 50 μ l 反应体系: cDNA 2 μ l + P1 (上游引物, 10 μ mol/L) 2 μ l + P2 (下游引物, 10 μ mol/L) 2 μ l + 10 × buffer 5 μ l + MgCl₂ (25 mmol/L) 5 μ l + dNTP Mix (2 mmol/L) 5 μ l + Tag 酶 (2 U/ μ l) 1 μ l + ddH₂O 28 μ l; 反应条件: 预变性 94 °C 3 min → 94 °C 40 s → 51 °C 30 s → 72 °C 40 s 30 个循环 → 72 °C 10 min。最后进行各组 LRP1 和 GAPDH 的荧光定量检测, 25 μ l

反应体系: SYBR Green I qPCR Master Mix 12.5 μ l (Fermen-tas) + P1 (上游引物, 10 μ mol/L) 1 μ l + P2 (下游引物, 10 μ mol/L) 1 μ l + 标准品模板 1 μ l + 双蒸水补足体系。计算各组 LRP1 基因的相对表达量。

1.6 蛋白提取和 Western blot 检测 行为学测试完毕后, 各组取 6 只大鼠, 颈椎脱臼后常规取材、制成匀浆、离心后行 BCA 法测蛋白总量。再经过制胶、上样、电泳、转膜、洗膜等过程后加入 TBS 稀释的兔抗 LRP1 抗体 (1:5 000, Abcam)、鼠抗 β -actin 抗体 (1:1 000, Sigma), 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗膜后加入山羊抗兔 IgG-HRP (1:1 000, Pierce)、山羊抗鼠 IgG-HRP (1:1 000, Pierce) 室温孵育 2 h, 洗膜后在避光条件下使用 ECL 试剂盒进行化学发光凝胶图像系统拍照。

1.7 图像处理 and 统计学分析 根据 Pfaffl^[8] 报道的方法对 LRP1 和 GAPDH 基因的 CT 值进行分析。Western blot 结果使用 GS800 凝胶成像仪扫描, 并通过 ImageMasterTM 2D Platinum 对条带的光密度进行量化处理。应用 SPSS 16.0 统计学软件处理数据, 计量

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学测试结果 与正常组相比, 模型组大鼠逃逸潜伏期延长, 游泳路程显著增加, 穿越虚拟平台的次数明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。给予 TF 灌胃治疗后, 与模型组比较各剂量组逃逸潜伏期均不同程度缩短, 游泳路程减少, 穿越虚拟平台次数增加; 大鼠的潜伏时间和穿越平台次数在中剂量、高剂量组与模型、低剂量组间分别存在统计学差异 ($P < 0.05, P < 0.01$), 而在中、高剂量组间差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。见图 1~3。

2.2 Real-time PCR 结果 与正常组相比, 模型组 LRP1 mRNA 明显下降 ($P < 0.01$)。给予 TF 治疗后, LRP1 mRNA 相对表达量在中剂量和高剂量组分别高于模型组、低剂量组 (P 均 < 0.01); 而中、高剂量组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4。

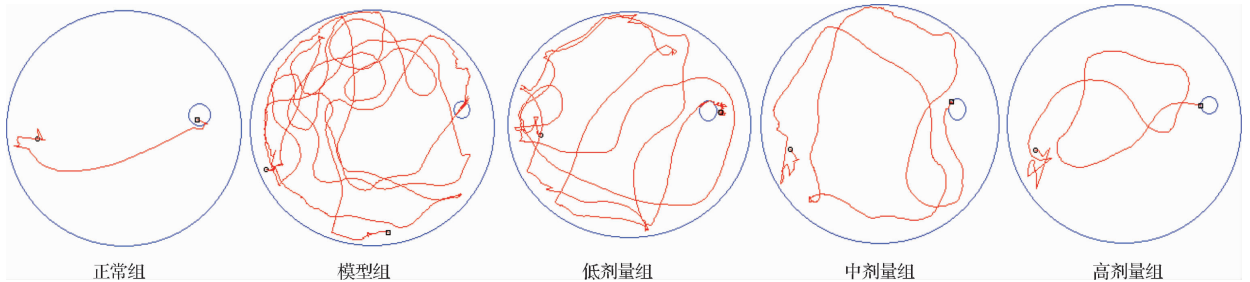
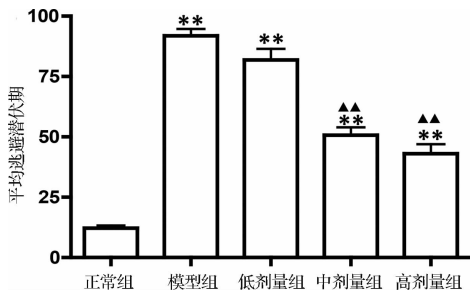
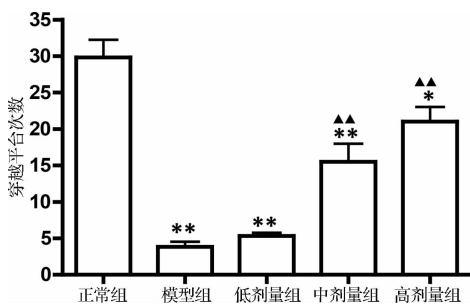


图 1 TF 治疗与未治疗 4 周后各组大鼠水迷宫测试路径



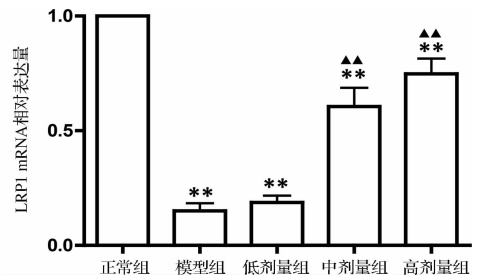
注: 和正常组相比, $**P < 0.01$; 和模型组相比, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。

图 2 TF 治疗与未治疗 4 周后各组大鼠的平均逃避潜伏期



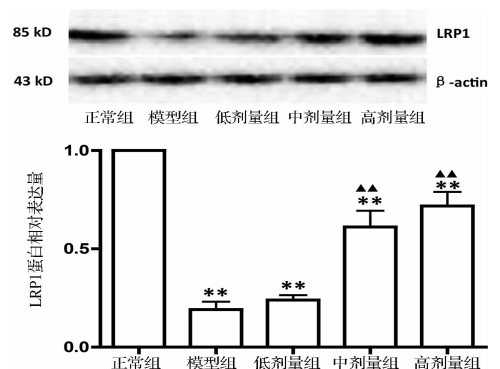
注: 和正常组相比, $*P < 0.05, **P < 0.01$; 和模型组相比, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。

图 3 TF 治疗与未治疗 4 周后各组大鼠的平均穿越平台次数



注: 和正常组相比, $**P < 0.01$; 和模型组相比, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。

图 4 TF 治疗与未治疗各组 LRP1 mRNA 相对表达量



注: 和正常组相比, $**P < 0.01$; 和模型组相比, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。

图 5 TF 治疗与未治疗各组 LRP1 蛋白相对表达量

2.3 Western blot 结果 模型组 LRP1 蛋白相对表达量明显低于正常对照组 ($P < 0.01$)。给予 TF 治疗后各剂量组 LRP1 蛋白相对表达量随着给药剂量的递增而递升,两两比较,中剂量和高剂量组分别高于模型组、低剂量组 (P 均 < 0.01);而中、高剂量组间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 5。

3 讨论

目前认为,AD 患者海马区 and 大脑皮质出现大量的神经细胞凋亡与神经元外老年斑沉积密切相关,而老年斑的主要成分即为 $A\beta$ 。 $A\beta$ 不仅可以直接对神经元产生毒性,还能加强神经细胞对神经毒素、兴奋性氨基酸和自由基等有害因素的易感性,进而造成线粒体功能障碍,DNA 断裂,胞内 Ca^{2+} 超载和膜脂质过氧化,最终造成神经细胞凋亡^[9]。因此,在脑内定位注射 $A\beta_{1-40}$,是目前学术界统一认可的 AD 动物模型^[10-12]。综合以上分析,在本实验中我们在大鼠右侧海马 CA1 区注入 $A\beta_{1-40}$,制备 AD 大鼠模型。模型鼠经 Morris 水迷宫检测记忆能力明显衰退(逃逸潜伏期延长,游泳路程显著增加,穿越虚拟平台的次数降低),符合继续开展实验的要求。

据中药典故《神农本草经》和《中国药典》记载,远志自古便用于治疗情志类疾病,可以明显改善记忆,具有抗氧化、抗痴呆、抗衰老等多种功效。本实验中 AD 大鼠在给予 TF 灌胃治疗后,其记忆能力明显改善,Morris 水迷宫行为学结果显示各剂量组逃逸潜伏期均不同程度缩短,游泳路程缩小,穿越虚拟平台次数增加,中剂量和高剂量组大鼠的平均潜伏时间和穿越平台次数与模型组存在明显差异,再次证明了 TF 在 AD 治疗方面的功效。

LRP1 是 $A\beta$ 清除途径的关键受体,它广泛表达于许多类型的细胞,为 LRP 家族的一员,肝细胞可以通过其表面表达的 LRP1 捕获血浆中游离的 $A\beta$,使 $A\beta$ 最终在肝细胞内被降解^[13-14],而 $A\beta$ 清除障碍正是 AD 最为重要的发病机制。本实验分别提取 AD 模型鼠及各治疗组大鼠肝脏的 mRNA 和蛋白进行 LRP1 的检测,发现模型组鼠 LRP1 的相对表达量确实低于正常大鼠,而治疗组大鼠肝脏的 LRP1 mRNA 和蛋白相对表达量明显升高,且随着给药剂量的增加逐步升高。以上水迷宫实验和分子生物学实验结果均说明:经 TF 治疗后,不仅大鼠肝组织内 LRP1 表达量升高,而且明显改善了 AD 大鼠的学习记忆能力。我们推测:TF 可能通过提高肝组织 LRP1 的含量,从而改善 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 AD 大鼠的学习记忆能力。

本实验中发现,低剂量组 AD 大鼠的水迷宫测试

及 LRP1 mRNA 和蛋白相对表达量结果与模型组相比,均有所改善,但却无统计学差异,推测可能与血药浓度低有关;而两两比较发现:中、高剂量组与低剂量组间均存在统计学差异,但中、高剂量组间的差异无统计学意义。

参考文献

- [1] Tu S, Okamoto S, Lipton SA, et al. Oligomeric $A\beta$ -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurodegener*, 2014, 9:48.
- [2] Nazem A, Sankowski R, Bacher M, et al. Rodent models of neuroinflammation for Alzheimer's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12:74.
- [3] Carret-Rebillat AS, Pace C, Gourmaud S, et al. Neuroinflammation and $A\beta$ accumulation linked to systemic inflammation are decreased by genetic PKR down-regulation [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:8489.
- [4] 郑明昱. 石菖蒲远志散治疗太阴人阿尔茨海默型痴呆 [J]. *中国民族医药杂志*, 2010, 16(2):16-17.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版:一部 [S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:146.
- [6] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1991:47-50.
- [7] Ehninger D, Kempermann G. Paradoxical effects of learning the Morris water maze on adult hippocampal neurogenesis in mice may be explained by a combination of stress and physical activity [J]. *Genes Brain Behav*, 2006, 5(1):29-39.
- [8] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9):e45.
- [9] 杨贤志, 陈勤, 陈庆林, 等. 远志皂苷对 β 淀粉样蛋白片段 1-40 诱导 PC12 细胞凋亡的抑制作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(3):379-383.
- [10] Sigurdsson EM, Lorens SA, Hejna MJ, et al. Local and distant histopathological effects of unilateral amyloid-beta₂₅₋₃₅ injections into the amygdala of young F344 rats [J]. *Neurobiol Aging*, 1996, 17(6):893-901.
- [11] Delobette S, Privat A, Maurice T. In vitro aggregation facilitates beta-amyloid peptide-₂₅₋₃₅-induced amnesia in the rat [J]. *Eur J Pharmacol*, 1997, 319(1):1-4.
- [12] Giovannelli L, Casamenti F, Scali C, et al. Differential effects of amyloid peptides beta-₁₋₄₀ and beta-₂₅₋₃₅ injections into the rat nucleus basalis [J]. *Neuroscience*, 1995, 66(4):781-792.
- [13] Elali A, Rivest S. The role of ABCB1 and ABCA1 in beta-amyloid clearance at the neurovascular unit in Alzheimer's disease [J]. *Front Physiol*, 2013, 4:45.
- [14] Tamaki C, Ohtsuki S, Terasaki T. Insulin facilitates the hepatic clearance of plasma amyloid beta-peptide₁₋₄₀ by intracellular translocation of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) to the plasma membrane in hepatocytes [J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 72(4):850-855.

收稿日期:2016-11-08 修回日期:2016-11-30 编辑:石嘉莹