

· 论 著 ·

# Wnt 信号传导通路在阿尔茨海默病防治中的作用

霍江涛, 张小乔, 严洁, 潘庆敏, 陈敏

湖北医药学院附属医院老年病房, 湖北十堰 442000

**摘要:** **目的** 探讨 Wnt 信号传导通路在阿尔茨海默病(AD)防治中的作用,为临床治疗提供参考。**方法** 选取 C57BL/6 雄性小鼠 80 只,均为 4 个月龄,随机均分为正常对照组、假手术组、模型组和丹皮酚组,每组 20 只。正常对照组小鼠不进行处理;模型组、丹皮酚组的小鼠均通过骨窗向脑海马部位缓慢地注入纤维型 A $\beta$ 1-42 溶液 10  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ ,丹皮酚组再用丹皮酚注射液腹腔注射 0.14  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,持续 21 d;假手术组仅按照同法注入等量的生理盐水进行假手术。21 d 后,观察对比小鼠脑组织 P53 蛋白和 Caspase-3 的表达(免疫组化法)情况。同时比较各组剩余小鼠 3 个月、6 个月、1 年的生存情况。**结果** 模型组和丹皮酚组 P53 蛋白和 Caspase-3 表达明显高于正常对照组和假手术组,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ );丹皮酚组 P53 和 Caspase-3 表达低于模型组,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ )。对照组和假手术组小鼠的存活率明显高于模型组和丹皮酚组,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ );丹皮酚组 3 个月、6 个月和 1 年的存活率分别为 70.0%、50.0% 和 30.0%,明显高于模型组小鼠的存活率(40.0%、10.0% 和 0),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** P53 和 Caspase-3 均参与并影响 Wnt 信号传导通路的转导,由于 A $\beta$  大量积聚在神经细胞内导致 Wnt 信号传导通路的抑制或反常活化,阻断了细胞信号向胞内的转导,导致 AD。应用相应的药物(如丹皮酚)可以有效的改善 Wnt 信号传导通路的异常情况,这为临床治疗 AD 提供了新思路。

**关键词:** Wnt 信号传导通路; 阿尔茨海默病; P53 蛋白; Caspase-3

**中图分类号:** R 749.1<sup>+</sup>6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2015)06-0709-04

## Role of Wnt signal transduction pathway in prevention and treatment of Alzheimer's disease

HUO Jiang-tao, ZHANG Xiao-qiao, YAN Jie, PAN Qing-min, CHEN Min

Elderly Ward, Affiliated Hospital of Hubei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the role of Wnt signal transduction pathway in prevention and treatment of Alzheimer's disease (AD) in order to provide theory evidence for clinical treatment of AD. **Methods** Eighty male C57BL/6 mice of 4 months old were randomly divided into four groups ( $n = 20$  each): control group, sham operation group, model group and paeonol group. The mice in control group were not processed, In model group and paeonol group, the fiber type A beta 1-42 solution (10  $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ ) was slowly injected into the brain hippocampus region through bone window, and then the paeonol injection [0.14  $\text{mg}/(\text{kg}/\text{d})$ ] was given by intraperitoneal injection for 21 days in paeonol group. An equal amount of saline was injected only in accordance with the same method in sham operation group. The expressions of P53 protein and Caspase-3 (immunohistochemical method) in cerebral cortex and hippocampus region were observed and compared after 21 days, and the survival rates at 3-, 6-month and 1-year of remainder mice in different groups were compared. **Results** The expressions of P53 protein and Caspase-3 in model group and paeonol group were significantly higher than those in control group (all  $P < 0.05$ ). The expressions of P53 protein and Caspase-3 in paeonol group were significantly lower than those in model group (all  $P < 0.05$ ). The survival rates in control group and sham operation group were significantly higher than those in model group and paeonol group (all  $P < 0.05$ ). The survival rates at 3-, 6-month and 1-year in paeonol group (70.0%, 50.0%, 30.0%) were significantly higher than those in model group (40.0%, 10.0%, 0,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** P53 and Caspase-3 participate in and influence the transduction of Wnt signal transduction pathway. The accumulation of a large number of A beta can cause the inhibition or anomalous activity of Wnt signal transduction pathway and block cell signal transduction toward the inside of cells, therefore lead to AD. The application of relevant drugs such as paeonol can effectively improve the abnormality of Wnt signal transduction pathway, and this provides a new idea for the clinical

treatment of AD.

**Key words:** Wnt signal transduction pathway; Alzheimer's disease; P53 protein; Caspase-3

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 多见于 60 岁以上的老人, 该病属于神经系统退行性疾病, 老年性痴呆是在 65 岁以前发病的患者, 老年性痴呆即指 65 岁以上发病者<sup>[1]</sup>。AD 的病因尚不明确, 家族史可能是 AD 的危险因素之一, 还可能与一些免疫系统疾病等有关<sup>[2]</sup>。AD 的病理学改变主要是神经炎性斑块的形成, 而 A $\beta$  是神经炎性斑块的主要成分<sup>[3]</sup>。神经细胞内 A $\beta$  大量积聚, A $\beta$  就会与 Wnt 配体直接结合, 也可以与细胞膜的 Fz 受体相结合, 导致 Wnt 信号传导通路的抑制, 有时会表现出较活化, 反常的活化及信号的抑制使得细胞信号的传导方向发生改变, 向胞内转导的细胞信号被阻断。Wnt 信号通路的关键分子是 A $\beta$ , 如果活化后, 可以起到防治 AD 的作用, 这种方法是利用了通路中特异的信号分子, 激活下游的效应物来发挥作用。Wnt 信号通路与 p53/p21 通路相关, 有研究发现,  $\beta$ -catenin 过表达可以增加 p53 的转录活性, 且老年小鼠血清组比年轻小鼠血清组的 p53 增多, 在 si- $\beta$ -catenin 等处理后, p53 的表达下降, 说明 Wnt 通路与 p53/P21 发现通路存在交联, 即 Wnt 信号可能通过观察 p53 来分析细胞老化等。Wnt 信号通路可以激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路中  $\beta$ -catenin 的表达, 抑制 Caspase-3 的活性或功能。本研究就 Wnt 信号传导通路在 AD 防治中的作用进行探讨。

## 1 资料与方法

**1.1 动物模型的建立** 选取 80 只 4 个月龄的 C57BL/6 雄性小鼠, 质量为 24 ~ 28 g, 批号: 130923, 均购自江西省实验动物研究中心。用鼠笼喂养, 适应性喂养 1 周, 让其自由摄食与饮水。1 周后把小鼠随机均分为正常对照组、假手术组、模型组、丹皮酚组, 每组 20 只。模型组、丹皮酚组的小鼠先用 1% 戊巴比妥钠 (20 mg/kg, 腹腔注射) 进行麻醉, 在脑立体定位仪上将小鼠固定, 确定大脑前囟所在的位置, 然后切开皮肤。参考小鼠图谱确定海马所在的体表投影位置, 钻开一骨窗, 用固定在立体定位仪上的微量注射器进针约 1.5 mm, 缓慢地注入纤维型 A $\beta$ 1-42 溶液 10  $\mu$ g/5  $\mu$ l, 最好停针 5 min<sup>[4]</sup>。注射完毕后缓慢撤针, 要及时对小鼠进行术后处理, 包括缝合皮肤、预防感染 (按时撒适量青霉素粉末, 然后每天肌肉注射青霉素 1 000 U/只, 连续 3 d)。20 只正常小鼠作为正常对照组不予处理。假手术组仅按照同法注入等量

的生理盐水进行假手术。丹皮酚组用丹皮酚注射液 (丹皮酚注射液, 批号: 20130401, 规格 5 mg/ml, 宁波制药有限公司生产) 0.14 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> 腹腔注射, 持续 21 d。正常对照组、假手术组与模型组腹腔内注射同容积的生理盐水并平行给予常规饮食及正常活动。纤维型 A $\beta$ 1-42 的制备<sup>[5]</sup>: 取 1.0 g A $\beta$ 1-42 冻干粉 (美国 Sigma 公司) 溶于 500  $\mu$ l 注射用生理盐水中, 在摄氏 37  $^{\circ}$ C 的恒温箱中进行孵育, 为了使其成为聚集状态的纤维型 A $\beta$ 1-42, 要持续 7 d 用微型磁力搅拌子充分搅拌, 置于冰箱中供造模时使用。

## 1.2 方法

**1.2.1 脑组织的制备** 经过 21 d 后, 分别取正常对照组、假手术组、模型组和丹皮酚组 4 组的小鼠各 10 只, 均按照如下操作进行手术: 用 10% 水合氯醛 (0.135 mg/kg) 深度麻醉, 使心脏暴露出来灌注 PBS 通过左心室, 观察小鼠的肝脏颜色变浅后, 灌注新鲜配制的 4% 多聚甲醛。取脑组织置于 4% 多聚甲醛溶液中, 在 4  $^{\circ}$ C 的冰箱中固定过夜后用 PBS 反复浸洗, 并将组织置于含 0.102% NaN<sub>3</sub> 的保存液内用冰箱长期保存。实验时以 PBS 冲洗组织, 将脑组织梯度酒精脱水, 制成厚约 5  $\mu$ m 的冠状切片。

## 1.2.2 免疫组化检测脑组中 P53 和 Caspase-3 表达

冠状切片入 PBS 缓冲液中, 在抗原修复液水浴箱内存放 20 min 后取出, 自然冷却<sup>[6]</sup>。用 PBS 缓冲液清洗 2 次, 为了消除内源性过氧化物酶, 要再入 3% 过氧化氢。为了减少组织非特异性反应, 切片孵育在 2% 小牛血清中约 1 h。实验中所用抗体 Caspase-3 购于美国 Lab Vision 公司 (Caspase-3, 产品编号: RB-1307, 1B102); P53 购于 Cell Signaling 公司 (产品编号: 9381, 1B800)。切片分别孵育, 在 1.0% 小牛血清与 0.11% Triton 和上述一抗中在冰箱过夜, 过夜后经缓冲液洗涤 2 次, 加二抗 (1:200) 溶液, 室温孵育 50 min。再用缓冲液洗涤 2 次, 加混合液 (经生物素与卵白素结合试剂盒配置), 再孵育约 45 min。底物呈色反应采用 DAB 试剂盒。对比观察 P53 蛋白和 Caspase-3 在各组的表达情况。

**1.2.3 小鼠存活情况观察** 按照上述喂养 21 d 后, 将上述实验选取后剩余的 4 组小鼠各 10 只, 仍按照原来的方式均给予常规饮食及正常活动。观察记录每组小鼠 3 个月、6 个月及 1 年时的生存数, 对比观察小鼠的存活情况。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计处

理。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组小鼠脑组织 P53 和 Caspase-3 的表达比较

P53 蛋白和 Caspase-3 在丹皮酚组和模型组小鼠脑组织均有表达,在正常对照组极少数细胞呈弱阳性反应。对照组与假手术组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );模型组和丹皮酚组 P53 和 Caspase-3 的阳性表达明显高于正常对照组和假手术组,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ );丹皮酚组 P53 和 Caspase-3 阳性表达明显低于模型组( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 1。

2.2 各组小鼠生存情况比较 3 个月、6 个月、1 年时分别对每组小鼠的存活率进行计算,发现模型组小鼠 1 年后全部死亡,存活率明显低于正常对照组和假手术组,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.05$ );丹皮酚组 3 个月、6 个月和 1 年的存活率分别为 70.0%、50.0% 和 30.0%,明显高于模型组的 40.0%、10.0% 和 0,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 各组小鼠脑组织中 P53、Caspase-3 的表达情况  
( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	P53	Caspase-3
正常对照组	10	0.05 ± 0.02	0.01 ± 0.01
假手术组	10	0.06 ± 0.03	0.01 ± 0.06
模型组	10	3.43 ± 0.01 <sup>ab</sup>	1.32 ± 0.04 <sup>ab</sup>
丹皮酚组	10	1.28 ± 0.05 <sup>abc</sup>	0.81 ± 0.05 <sup>abc</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与假手术组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

表 2 各组小鼠生存情况比较 例(%)

组别	例数	3 个月	6 个月	1 年
正常对照组	10	10(100.0)	9(90.0)	9(90.0)
假手术组	10	9(90.0)	8(80.0)	8(80.0)
模型组	10	4(40.0) <sup>ab</sup>	1(10.0) <sup>ab</sup>	0 <sup>ab</sup>
丹皮酚组	10	7(70.0) <sup>abc</sup>	5(50.0) <sup>abc</sup>	3(30.0) <sup>abc</sup>

注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与假手术组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

Wnt 信号通路在神经系统中可以发挥重要的作用,因为神经系统在发生及发育时需要各种信号分子及调节机制密切协调和配合。Wnt 是一种分泌性蛋白,Wnt 的受体为 Frizzled 或低密度脂蛋白相关蛋白(LRP),其中 Frizzled 蛋白是一族跨膜蛋白,其氨基端配体结合区富含半胱氨酸<sup>[7]</sup>。当 Wnt 与 Wnt 受体相结合时,就可以激活下游的信号通路。这些下游的信

号通路主要可以分为经典通路、非经典通路和 Wnt/Ca<sup>2+</sup> 通路<sup>[8]</sup>。经典 Wnt 信号通路又称为 Wnt/B-连环蛋白(B-catenin)通路,主要通过 B-catenin 在核中累积,启动 Wnt 靶基因来调控细胞的增殖和分化,其主要组分包括:Wnt 信号因子、卷曲蛋白(Fz)、胞质中的散乱蛋白、低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 和 6、大肠腺瘤息肉病基因、转录因子家族的 T 细胞因子/淋巴细胞增强因子等;非经典 Wnt 信号通路(平面细胞的极性通路),激活下游的 JNK 激酶后,参与细胞支架重排等生理过程,Wnt5a 或 Frizzled-5 是 Wnt 非经典通路的配体或受体,当 Frizzled-5 受体与其 Wnt5a 配体结合后就会激活下游的通路,当通路被激活以后,所形成的 Wnt-Frizzled 复合物接下来就会激活蛋白 dishevelle(DVL);Wnt/Ca<sup>2+</sup> 通路是通过钙调蛋白依赖的激酶等,激活 Fz 受体释放 Ca<sup>2+</sup>,激活蛋白激酶 C,活化 T 细胞核因子的过程来调控细胞的增殖。其中,通过启动相关靶基因的表达,调控细胞增殖的为 Wnt/B-catenin 信号通路和 Wnt/Ca<sup>2+</sup> 通路,而 Wnt/PCP 通路则主要调控细胞支架的重排。

P53 基因及 Caspase-3 均参与 Wnt 信号的传导,其表达越低,Wnt 信号通路传导越好。P53 基因是一个重要的抑癌基因,其编码的 P53 蛋白是细胞周期阻滞和细胞凋亡的关键介质,P53 基因可以监视基因的完整性<sup>[9]</sup>。P53 基因有野生型 P53 基因与突变型 P53 基因,野生型 P53 在一定条件下可以激活 p21WAF1/CIP1 等下游基因。本实验中模型组及丹皮酚组均有 P53 蛋白的阳性表达,而正常对照组与假手术组均极少见 P53 蛋白的表达,表明 P53 参与了 Wnt 信号通路,为 AD 的防治提供了依据。以往动物实验研究显示,Caspase-3 活化与多种类型损伤后神经元的凋亡有关<sup>[10]</sup>。Caspase-3 主要是通过从线粒体释放的凋亡诱导因子激活 Caspase-3 和从线粒体释放出来的细胞色素 C 与凋亡蛋白酶激活因子-1 与 Caspase-9 形成复合体,从而激活 Caspase-9 这两条途。Caspase-9 作为起始半胱天冬酶激活下游的 Caspase-3,引发半胱天冬酶的级联放大反应。本实验中模型组与丹皮酚组均有 Caspase-3 蛋白高表达,而正常对照组表达极少,显示 Caspase-3 参与了 Wnt 信号传导通路在 AD 防治的过程,Caspase-3 蛋白的高表达导致神经功能缺损的病情严重。本研究发现,Wnt 信号通路的异常会导致 AD 的发生。所以,激活 Wnt 信号通路的关键分子 A $\beta$ ,进而激活 Wnt 信号通路,不仅可以保护海马神经元,还可以促进神经干细胞的分化,为 AD 的治疗提供新的思路。

(下转第 716 页)

- 国临床研究, 2014, 27(2): 172-173.
- [2] 丁明建, 王闻哲, 王孝举. MicroRNA 在肺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国临床药理学杂志, 2013, 29(12): 965-968.
- [3] 郭淑芹, 朱春英, 张云良. SIRT1 与肿瘤[J]. 国际肿瘤学杂志, 2011, 38(8): 569-572.
- [4] 沈月兰, 蒋义国. microRNA 与癌症发生相关性研究的现状[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(1): 68-71.
- [5] Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(4): 1351-1358.
- [6] Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia [J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1(12): 882-891.
- [7] 李构, 张辰宇. 血清 microRNA 在癌症诊断中的进展[J]. 东北林业大学学报, 2012, 40(6): 127-128, 148.
- [8] 周凡, 庄诗美. microRNA 与肿瘤[J]. 生命科学, 2008, 20(2): 207-212.
- [9] 何佩娜, 窦拉加, 盛捡云. microRNA-21 在乳腺浸润性导管癌患者血清中的表达及临床意义[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(6): 97-100.
- [10] 叶韦玮, 陈永新, 金凌震, 等. 微小 RNA-21 在乙型肝炎肝硬化致肝癌病程中的表达及机制研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(2): 257-259.
- [11] 姜彬, 唐颢. MicroRNA-21 对 p53 基因的转录后调控作用[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(22): 5653-5655.
- [12] 赵祥宇, 舒鹏程, 张靖, 等. 小鼠脑皮质神经干细胞体外培养及 miRNAs 影响其分化能力[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(6): 630-635.
- [13] 梁敏, 史志周, 白洁. miR-373 与肿瘤相关研究进展[J]. 生命科学, 2013, 25(7): 685-689.
- [14] 刘磊, 刘臣海, 黄强, 等. 胆管癌组织中 microRNA-21 的表达与上皮间质转化的关系及对预后评估的价值[J]. 中华消化外科杂志, 2013, 12(3): 228-232.
- [15] 杨健, 张秀伟, 文昱婷, 等. miR-155 在非小细胞肺癌患者血清中的表达及其临床意义[J]. 实用老年医学, 2012, 26(6): 459-461.
- [16] 王鑫鑫, 彭正, 李杨, 等. SIRT1 在胃癌组织、细胞中的表达及意义[J]. 山东医药, 2014, 54(12): 1-4, 7.
- [17] 王鑫鑫, 吴梦, 周思欣, 等. SIRT1 与代谢及肿瘤的关系[J]. 山东医药, 2013, 53(8): 90-93.
- [18] 徐俊, 黄秀兰. SIRT1-FoxO-自噬通路研究进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(7): 901-904.

收稿日期: 2015-01-20 修回日期: 2015-02-26 编辑: 王国品

(上接第 711 页)

## 参考文献

- [1] 王薇, 张海廷, 王淑辉, 等. 阿尔茨海默病与 Wnt 信号通路及神经干细胞的关系[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(19): 3566-3572.
- [2] 杨宝琴, 干雪琴, 张建英, 等. 老年阿尔茨海默病患者生活方式中危险因素的病例对照研究[J]. 解放军护理杂志, 2014, 31(10): 41-43.
- [3] 黄福德.  $\beta$  淀粉样肽在阿尔兹海默病中作用的逐步认识[J]. 生命科学, 2014, 26(1): 9-14.
- [4] 闫颖, 李森, 赵志炜, 等.  $\beta$  淀粉样肽结合乙醇脱氢酶及胆碱乙酰转移酶在糖尿病小鼠海马内表达的时程变化[J]. 首都医科大学学报, 2013, 34(1): 53-57.
- [5] 杨帆, 李东风, 徐书雯. AB1-42 寡聚体与纤维体的制备及鉴定[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(9): 2076-2078.
- [6] Xu K, Heo J. Precipitation of PbS quantum dots in glasses by thermal diffusion of  $Ag^+$  ions from silver pastes [J]. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2014, 387(3): 76-78.
- [7] 刘响响, 周晖, 谢庆生, 等. 放疗诱导宫颈癌细胞中经典 Wnt 通路的表达情况及顺铂耐药性研究[J]. 现代妇产科进展, 2014, 23(11): 856-859.
- [8] 任翔, 吴剑, 李嘉航, 等. Wnt/ $\beta$ -catenin 通路在成骨细胞中的作用[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(25): 4991-4993.
- [9] 魏永永, 侯静, 唐文如, 等. p53 与 Ras 协同及其在肿瘤发生中的作用[J]. 遗传, 2012, 34(12): 1513-1521.
- [10] 闫凤霞, 高维娟, 钱涛, 等. 黄芪注射液对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 caspase-3 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(7): 898-903.

收稿日期: 2015-02-06 修回日期: 2015-02-27 编辑: 王国品