

琐琐葡萄黄酮对 APP/PS - 1 小鼠海马神经细胞凋亡的影响

古力夏提·艾力 肖 辉 再娜甫古丽·买买提 张 鹏 袁 芳

摘要 目的 探讨琐琐葡萄总黄酮(flavones from vitis vinifera L., VTF)对 APP/PS - 1 双转基因阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)小鼠海马神经细胞凋亡的影响。方法 选用 6 月龄雄性 APP/PS - 1 双转基因 AD 小鼠 75 只,随机分为模型组,阳性对照组(多奈哌齐组,0.7mg/kg),VTF 低、中、高剂量组(70、210、420mg/kg),另取 15 只同龄雄性 C57BL/6 小鼠作为空白对照组,模型组和空白对照组给予等量 0.5% CMC - Na 灌胃。酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测小鼠血清中 $A\beta_{1-42}$ 含量;免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)观察小鼠海马 CA1 区 caspase - 3 蛋白表达情况;原位末端标记(TdT - mediated dUTP - biotin nick end labeling assay, TUNEL)法检测小鼠海马神经细胞凋亡情况。结果 ELISA 检测结果显示,与模型组比较,阳性对照组和 VTF 各剂量组小鼠血清中 $A\beta_{1-42}$ 含量显著升高($P < 0.05$)。IHC 实验结果显示,模型组小鼠海马 CA1 区 caspase - 3 蛋白表达与空白对照组比较,阳性细胞着色深($P < 0.05$),VTF 各剂量组小鼠较模型组海马 caspase - 3 蛋白阳性表达均有所减少($P < 0.05$)。TUNEL 法检测结果显示,与模型组比较,阳性对照组及 VTF 各剂量组小鼠海马神经元细胞大多较正常,其凋亡率与模型组比较显著下降($P < 0.05$)。结论 VTF 可以通过下调 caspase - 3 蛋白的表达从而减少 APP/PS - 1 双转基因 AD 小鼠海马神经元的凋亡,对 APP/PS - 1 双转基因 AD 小鼠具有较好的防治作用。

关键词 琐琐葡萄黄酮 阿尔茨海默病 APP/PS - 1 双转基因 AD 小鼠 凋亡

中图分类号 R749.16

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2023.04.011

Effect of Flavones from Vitis Vinifera L on Apoptosis of Hippocampal Neurons in APP/PS - 1 Mice. GULIXIATI · Aili, XIAO Hui, ZAIN-
AFUGULI · Maimaiti, et al. School of Public Health, Xinjiang Medical University, Xinjiang 830011, China

Abstract Objective To investigate the effect of flavones from vitis vinifera L. (VTF) on hippocampal neurons apoptosis in APP/PS - 1 double transgenic AD mice. **Methods** Seventy - five 6 - month - old male APP/PS - 1 double transgenic AD mice were randomly divided into model group, positive control group (donepezil group, 0.7mg/kg), VTF low - dose, medium - dose and high - dose groups (70, 210 and 420mg/kg), and 15 male C57BL/6 mice of the same age were taken as blank control group. The model group and blank control group were given the same amount of 0.5% CMC - Na by gavage. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of $A\beta_{1-42}$ in serum of mice; immunohistochemical (IHC) staining was used to observe the expression of caspase - 3 protein in hippocampal CA1 region of mice; TdT - mediated dUTP - biotin nick end labeling assay (TUNEL) method was used to detect the apoptosis of hippocampal neurons in mice. **Results** The results of ELISA showed that compared with the model group, the content of $A\beta_{1-42}$ in serum of mice in the positive control group and VTF dose groups was significantly increased ($P < 0.05$). The results of IHC experiment showed that the expression of caspase - 3 protein in hippocampal CA1 region in the model group was darker than that in the blank control group ($P < 0.05$), and the positive expression of caspase - 3 protein in hippocampal CA1 region of mice in the VTF dose groups was decreased compared with that in the model group ($P < 0.05$). TUNEL assay showed that compared with the model group, most hippocampal neurons in the positive control group and VTF dose groups were normal, and the apoptosis rate was significantly decreased compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** VTF can reduce the apoptosis of hippocampal neurons in APP/PS - 1 transgenic mice by down - regulating the expression of caspase - 3 protein, and has a good preventive and therapeutic effect on APP/PS - 1 double transgenic AD mice.

Key words VTF; Alzheimer disease; APP/PS - 1 double transgenic AD mice; Apoptosis

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81960764)

作者单位:830011 乌鲁木齐,新疆医科大学公共卫生学院(古力夏提·艾力、肖辉、张鹏),基础医学院(再娜甫古丽·买买提、袁芳)

通信作者:袁芳,电子信箱:yuanfang398@163.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是痴呆症最常见的一种形式,AD 占其 60% ~ 80%。AD 的病理特征包括突触变性、老年斑和神经原纤维缠结,最终导致神经元功能障碍和丢失。据流行病学调查,

全球每 3s 就会出现新发的 AD 患者,且中、低等收入国家新发病例增加趋势尤为显著,使其成为全球第 5 大死亡原因^[1]。Zhao 等^[2]对 2001 ~ 2017 年文献的 Meta 分析显示,随着我国老年人年龄增长,AD 患病率呈现上升趋势。基于此,研究和开发有效的预防和治疗 AD 的手段和药物已成为医药研究领域亟待解决的关键问题。

类黄酮是一类天然存在的多酚化合物,迄今为止,已发现自然界中有 6000 多种黄酮类化合物,其有抗炎、神经保护、抗衰老和抗胆碱酯酶的特性^[3,4]。研究表明,黄酮类化合物及其亚类对活跃的大脑部位表现出多重靶向能力,显示出对 $A\beta$ 介导的神经毒性的抑制作用^[5]。Huang 等^[6]研究表明,黄酮类化合物可能是通过改善抗氧化防御系统和减弱线粒体介导的神经细胞凋亡,对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的大鼠认知功能障碍具有潜在的保护作用。琐琐葡萄作为新疆维吾尔自治区独特的葡萄品种,其化学成分较复杂,黄酮类化合物是其主要生物活性成分之一。因此,本实验用 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠研究琐琐葡萄总黄酮(flavones from *Vitis vinifera* L, VTF)对 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠海马神经细胞凋亡的影响,以期为临床研究提供相关依据。

材料与方 法

1. 药品和主要试剂:盐酸多奈哌齐(上海源叶生物科技有限公司)、ELISA 试剂盒(上海江莱生物科技有限公司)、兔抗 caspase-3(北京博奥森生物技术有限公司)、兔二步法试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)、TUNEL 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

2. 主要仪器:酶标仪(美国宝特公司)、切片机(德国徕卡公司)、包埋机(常州中威电子仪器有限公司)、组织脱水机(武汉天之睿医疗科技有限公司)、摊片烤片机(上海机密仪器仪表有限公司)、NIKON 正置研究级显微镜(日本尼康公司)。

3. 动物分组及给药:6 月龄 SPF 级雄性 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠 75 只,同龄 SPF 级雄性 C57BL/6 对照组 15 只,购买自启动物生物科技(北京)有限公司,生产许可证号:SCXK(浙)2019-0004,使用许可证:SYXK(新)2018-0003,伦理学审批号:IACUC-20210507-07。适应性饲养 7 天,APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠 75 只随机分为模型组,阳性对照组(多奈哌齐组,0.7mg/kg),VTF 低、中、高剂量组(70、210、420mg/kg)。6 月龄同背景 SPF 级 C57BL/6 小鼠 15 只

作为空白对照组。空白对照组和模型组小鼠给予 0.5% CMC-Na(0.1ml/10g)灌胃;阳性对照组给予多奈哌齐溶液(0.7mg/kg)进行灌胃;VTF 高、中、低剂量组灌胃分别为 420、210、70mg/kg,连续给药 8 周。

4. 小鼠血清制备:随机在各组抽取 6 只小鼠,摘取眼球取血,颈椎脱臼处死。血样在 -4°C 下保存 30min,3000r/min 离心 15min,分离血清 -20°C 保存待测。

5. ELISA 法检测小鼠血清 $A\beta_{1-42}$ 含量:按照试剂盒步骤操作并检测(在加入终止液后 15min 内进行测定,将样本 A 值的测定结果乘以 2)。

6. 免疫组化:切片脱蜡至水,抗原修复;山羊血清封闭 20min;随后滴加一抗(1:200), 4°C 过夜;滴加二抗工作液;DAB 显色;苏木精复染;封片,显微镜下观察。

7. TUNEL 法检测小鼠细胞凋亡:切片脱蜡至水,蛋白酶 K 工作液, 37°C 作用 20min;PBS 冲洗 3 次,样本浸入阻断液(3% H_2O_2)中 10min;TdT 酶工作液, 37°C 湿盒避光反应 60min;Streptavidin-HRP 工作液, 37°C 湿盒避光反应 30min;DAB 显色;苏木精染色;封片,镜下观察。阳性细胞率(%)=(阳性细胞数/计数细胞总数) $\times 100\%$ 。

8. 统计学方法:应用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. VTF 对小鼠血清 $A\beta_{1-42}$ 含量的影响:与空白对照组比较,模型组小鼠血清中 $A\beta_{1-42}$ 含量显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组小鼠血清中 $A\beta_{1-42}$ 含量显著升高($P < 0.05$);随着 VTF 药物剂量的增加,各组 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠血清中 $A\beta_{1-42}$ 含量呈现降低趋势。并且与模型组比较,VTF 低、中、高剂量组小鼠血清中 $A\beta_{1-42}$ 含量差异均有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

表 1 各组小鼠 $A\beta_{1-42}$ 、caspase-3 阳性表达率和细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

组别	血清 $A\beta_{1-42}$	caspase-3	细胞凋亡率(%)
	(ng/ml)	阳性表达率(%)	
模型组	2.65 \pm 0.64 [#]	15.39 \pm 5.05 [#]	55.95 \pm 2.18 [#]
阳性对照组	4.51 \pm 0.56 [*]	6.18 \pm 1.92 [*]	17.50 \pm 2.23 [*]
VTF 低剂量组	4.58 \pm 0.52 [*]	7.96 \pm 1.02 [*]	22.77 \pm 2.78 [*]
VTF 中剂量组	4.38 \pm 0.53 [*]	9.86 \pm 3.07 [*]	32.13 \pm 1.48 [*]
VTF 高剂量组	3.72 \pm 0.53 [*]	10.52 \pm 2.01 [*]	36.76 \pm 2.85 [*]
空白对照组	5.02 \pm 0.22	5.37 \pm 0.87	11.17 \pm 1.36

与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与空白对照组比较,[#] $P < 0.05$

2. VTF 对小鼠海马组织 CA1 区 caspase - 3 蛋白表达的影响: APP/PS - 1 双转基因 AD 小鼠海马组织 caspase - 3 蛋白阳性细胞呈棕褐色 (图 1)。模型组小鼠海马 CA1 区 caspase - 3 蛋白棕褐色阳性产物与空白对照组比较, 着色深且染色阳性表达率增高 ($P < 0.05$), 提示 APP/PS - 1 双转基因 AD 小鼠海马

caspase - 3 蛋白表达量增加。与模型组比较, 多奈哌齐阳性对照组和 VTF 各剂量组小鼠海马 CA1 区 caspase - 3 蛋白染色减弱, 阳性表达率均显著降低 ($P < 0.05$, 表 1)。以上结果表明, VTF 各剂量组可以不同程度下调 APP/PS - 1 双转基因 AD 小鼠海马 CA1 区 caspase - 3 表达。

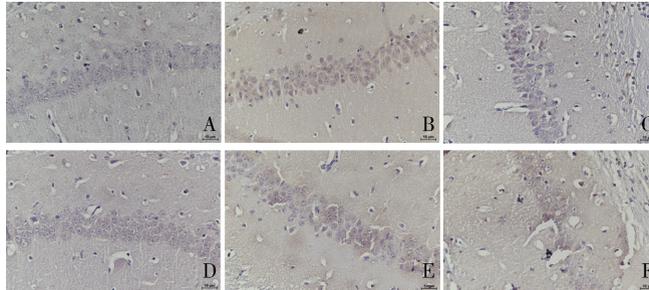


图 1 各组小鼠海马组织 CA1 区 caspase - 3 蛋白表达 (IHC, $\times 400$)

A. 空白对照组; B. 模型组; C. 阳性对照组; D. VTF 低剂量组; E. VTF 中剂量组; F. VTF 高剂量组

3. VTF 对 APP/PS - 1 双转基因 AD 小鼠海马组织细胞凋亡的影响: 各组小鼠海马 CA1 区均可以观察到 TUNEL 染色阳性细胞 (图 2, 箭头所指为阳性细胞)。其中, 空白对照组小鼠大脑海马 CA1 区极少有 TUNEL 染色阳性细胞, 而在模型组可见散在分布的成群的阳性染色细胞, 阳性细胞凋亡率较空白对照组显著升高 ($P < 0.05$, 表 1), 提示 APP/PS - 1 双转基因 AD 小鼠大脑海马 CA1 区存在大量凋亡细胞。盐

酸多奈哌齐阳性对照组小鼠海马区与空白对照组比较仍存有较多凋亡细胞, 但较模型组小鼠 TUNEL 染色细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$); VTF 各剂量组与模型组比较发现, 小鼠大脑海马 CA1 区 TUNEL 染色细胞凋亡率均显著降低 ($P < 0.05$), 其中以 VTF 低剂量组治疗效果最为明显。上述结果提示, VTF 可能可以通过减少 APP/PS - 1 双转基因 AD 小鼠神经元的凋亡从而起到神经保护的作用。

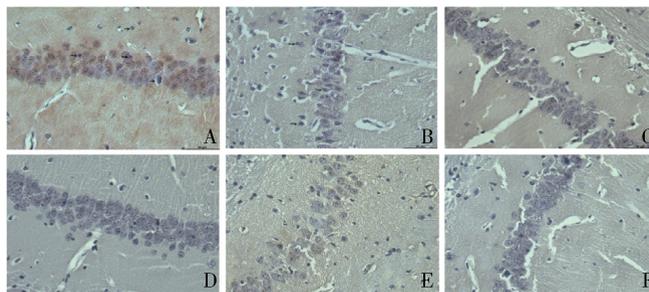


图 2 VTF 对小鼠海马 CA1 区神经元凋亡的影响 (TUNEL, $\times 400$)

A. 空白对照组; B. 模型组; C. 阳性对照组; D. VTF 低剂量组; E. VTF 中剂量组; F. VTF 高剂量组

讨 论

当 $A\beta$ 清除途径受损时, $A\beta$ 生成与清除均衡被破坏, 大量 $A\beta$ 聚集在脑内, 经参与介导线粒体凋亡通路、死亡受体通路、内质网凋亡通路等多种细胞信号转导途径诱导神经元凋亡^[7]。Wu 等^[8]研究表明, 黄酮类化合物淫羊藿苷可以通过减少 $A\beta_{1-42}$ 的沉积和抑制神经元凋亡来改善认知缺陷。郝凯敏^[9]研究发现, 随着 APP/PS - 1 双转基因 AD 小鼠月龄的逐渐增加, APP/PS - 1 小鼠血清中 $A\beta_{1-42}$ 水平呈现逐渐降

低的现象, 而在海马组织中呈相反趋势。黄攀等^[10]采用 ELISA 测定 AD 患者外周血清中 $A\beta_{1-42}$ 蛋白含量发现, 试验组患者外周血清中 $A\beta_{1-42}$ 浓度明显低于对照组。既往研究发现, VTF 能通过下调 APP/PS - 1 小鼠海马 APP 蛋白表达水平从而减少 $A\beta$ 产生, 改善神经元损伤。本实验通过 ELISA 检测 APP/PS - 1 小鼠血清中 $A\beta_{1-42}$ 浓度, 分析结果显示, 模型组小鼠血清中 $A\beta_{1-42}$ 含量为 $2.65 \pm 0.64 \text{ ng/ml}$, 与对照组 ($5.02 \pm 0.22 \text{ ng/ml}$) 比较血清 $A\beta_{1-42}$ 含量显著降低

($P < 0.05$)。阳性对照组和 VTF 各剂量组小鼠血清中 $A\beta_{1-42}$ 含量与模型组比较血清 $A\beta_{1-42}$ 显著升高 ($P < 0.05$)，与既往研究结果一致，其作用机制有待于进一步研究。

细胞凋亡近年来被认为是神经退行性疾病中神经元死亡的一种可能机制，并且已在大量其他病理状况中观察到^[11]。本实验采用 TUNEL 染色法检测各实验组 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠海马组织神经细胞凋亡情况，结果进行统计分析后发现，模型组可见散在分布的成群的阳性染色细胞，阳性细胞凋亡率较空白对照组显著升高，证实 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠大脑存在大量凋亡细胞。盐酸多奈哌齐阳性对照组和 VTF 各剂量组与模型组比较发现，各组小鼠海马 CA1 区 TUNEL 染色细胞凋亡率均显著降低 ($P < 0.05$)，在 VTF 各剂量组中，以 VTF 低剂量组治疗效果最为明显，但仍比空白对照组存在较多的凋亡细胞。说明 VTF 可以在一定程度上减轻 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠海马区神经元损伤，减少神经细胞凋亡，从而起到神经保护作用，以上结果与大多数黄酮类化合物能够减轻 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠海马区神经元凋亡研究结果一致^[12-15]。

半胱天冬酶 (caspase) 本质上是蛋白水解酶，是细胞凋亡的关键因素。此前，马丽娟^[16] 研究发现，VTF、VTP 可减少 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 AD 大鼠海马凋亡细胞数量，下调 caspase-3 蛋白表达，从而抑制凋亡。为进一步研究，笔者通过免疫组化法对 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠海马 CA1 区 caspase-3 蛋白表达情况进行检测，实验结果显示，模型组小鼠海马 CA1 区 caspase-3 蛋白表达较空白对照组明显增多，提示 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠海马 caspase-3 蛋白表达增加。与模型组比较，VTF 各剂量组小鼠海马 CA1 区 caspase-3 蛋白染色均有不同程度变浅，其中 VTF 低剂量组效果最为明显。caspase-3 是 caspase 家族中研究最广泛的成员之一，它是细胞凋亡的关键发起者之一。此外，TUNEL 染色是一种检测 DNA 片段化的方法，这是凋亡细胞死亡的特征。VTF 各剂量给药组 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠海马 CA1 区 caspase-3 表达和 TUNEL 阳性细胞数量均有不同程度减弱，说明 VTF 可能通过下调 caspase-3 蛋白的表达，对神经元细胞凋亡起到保护作用。

综上所述，VTF 对 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠大脑的神经元细胞有较好的保护作用，可以减少 caspase-3 蛋白在 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠脑

内的过表达，减少 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠海马神经元的凋亡，对 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠具有较好的防治作用。本研究旨在为深入探讨 VTF 对 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠神经保护作用的研究奠定基础，对于 VTF 活性成分改善神经元损伤的机制，需在后续实验中进行深入探讨。

参考文献

- 1 都梦帆, 胥冰, 郭东艳, 等. 基于 $a\beta$ 蛋白的阿尔兹海默症的中药治疗研究进展 [J]. 陕西中医药大学学报, 2022, 45 (2): 146-150
- 2 Zhao X, Li X. The prevalence of alzheimer's disease in the chinese han population: a Meta-analysis [J]. Neurological Research, 2020, 42(4): 291-298
- 3 Ninfali P, Antonelli A, Magnani M, et al. Antiviral properties of flavonoids and delivery strategies [J]. Nutrients, 2020, 12(9): 2534
- 4 Uddin M, Kabir M, Niaz K, et al. Molecular insight into the therapeutic promise of flavonoids against alzheimer's disease [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2020, 25(6): 1267
- 5 Hajjalyani M, Hosein Farzaei M, Echeverría J, et al. Hesperidin as a neuroprotective agent: a review of animal and clinical evidence [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2019, 24(3): 648
- 6 Huang S, Wang W, Zhang M, et al. The effect of ethyl acetate extract from persimmon leaves on alzheimer's disease and its underlying mechanism [J]. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 2016, 23(7): 694-704
- 7 李明成, 周君, 米彩云, 等. 阿尔茨海默病的 $a\beta$ 级联机制研究进展 [J]. 生命科学研究, 2022, 5: 406-412
- 8 Wu J, Qu J, Zhou Y, et al. Icaritin improves cognitive deficits by reducing the deposition of β -amyloid peptide and inhibition of neurons apoptosis in samp8 mice [J]. Neuroreport, 2020, 31(9): 663-671
- 9 郝凯敏. Ptk2b 对认知功能障碍小鼠血液和脑组织中 $a\beta$ 和 tau 蛋白磷酸化水平的影响 [D]. 太原: 山西医科大学, 2021
- 10 黄攀, 徐敏, 何晓英, 等. 阿尔茨海默病患者外周血 microrna-146a、 $a\beta_{(1-42)}$ 蛋白、tau 蛋白的表达及临床意义 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(7): 859-863
- 11 Khan S, Ahmad K, Alshammari E, et al. Implication of caspase-3 as a common therapeutic target for multineurodegenerative disorders and its inhibition using nonpeptidyl natural compounds [J]. BioMed Research International, 2015, 2015: 379817
- 12 Long JY, Chen JM, Liao YJ, et al. Naringin provides neuroprotection in ccl2-induced cognition impairment by attenuating neuronal apoptosis in the hippocampus [J]. Behavioral and Brain Functions: BBF, 2020, 16(1): 4
- 13 Sun QR, Jia N, Li X, et al. grape seed proanthocyanidins ameliorate neuronal oxidative damage by inhibiting gsk-3 β -dependent mitochondrial permeability transition pore opening in an experimental model of sporadic alzheimer's disease [J]. Aging, 2019, 11(12): 4107-4124
- 14 Afzal M, Redha A, ALHasan R. Anthocyanins potentially contribute to defense against alzheimer's disease [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2019, 24(23): 4255
- 15 Tian H, Zhao Hs, Mei XF, et al. resveratrol inhibits lps-induced apoptosis in vsc4. 1 motoneurons through enhancing sirt1-mediated autophagy [J]. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2021, 24(1): 38-43
- 16 马丽娟. 瑛瑛葡萄提取物对阿尔茨海默病防治作用的实验研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2017

(收稿日期: 2022-04-12)

(修回日期: 2022-05-11)