

柚皮素改善阿尔茨海默病模型大鼠的认知能力及其机制研究

杨文青, 马 晶, 余华荣*

重庆医科大学 生理教研室 神经科学研究中心, 重庆 400016

摘要: **目的** 研究柚皮素对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠认知水平的影响及对其 β 淀粉样蛋白($A\beta$)和Tau抗体的调节作用,探讨其改善AD认知能力的可能机制。**方法** 于实验第1、3天向大鼠侧脑室内注射(icv)链脲佐菌素(STZ)建立AD模型,ig给予柚皮素、罗格列酮,模型组和对照组则ig等量生理盐水,第1次术后21 d用Morris水迷宫检测动物的学习和记忆水平;采用Western blotting检测胰岛素降解酶(insulin-degrading enzyme, IDE),糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、磷酸化糖原合成酶激酶-3 β (pGSK-3 β)、Tau、磷酸化Tau(pTau)的表达;采用免疫组化检测A β 40和A β 42在大脑的沉积。**结果** Morris水迷宫结果显示柚皮素和罗格列酮均可以恢复AD动物的认知能力($P < 0.05$);Western blotting结果显示柚皮素和罗格列酮能增加IDE的表达和降低GSK-3 β 的活性,减少Tau的磷酸化水平($P < 0.05$);免疫组化结果显示柚皮素和罗格列酮处理大鼠的大脑皮质A β 40和A β 42均减少。**结论** 柚皮素作为过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ (PPAR γ)激动剂可以发挥胰岛素增敏剂的作用,可能通过改善与胰岛素相关的IDE和GSK-3 β 的表达来缓解AD动物的认知能力、A β 的沉积和Tau的磷酸化。

关键词: 柚皮素; 阿尔茨海默病; 认知能力; β 淀粉样蛋白; Tau蛋白

中图分类号: R282.710.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)06-0715-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.06.016

Improvement of naringein on cognition of model rats with Alzheimer's diseases and its mechanism

YANG Wen-qing, MA Jing, YU Hua-rong

Neuroscience Research Center, Department of Physiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To investigate the effect of naringein on the cognition of rats with Alzheimer's diseases (AD), its regulation on amyloid β -protein ($A\beta$) and Tau antibody, and its potential mechanism of improving the cognition of rats with AD. **Methods** AD model of rats was established by intracerebroventricular (icv) Streptozotocin (STZ) on days 1 and 3, and then naringein and Rosiglitazone were ig administered. Rats in model and control groups were treated with the same volume of physiologic saline to induce dementia model. On day 21 after the first operation, spatial learning and memory of rats were tested in Morris water maze. The expression of insulin-degrading enzyme (IDE), glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), phospho-GSK-3 β (pGSK-3 β), Tau, and phospho-Tau (pTau) were measured by Western blotting. A β 42 and A β 40 levels in the brain of the AD rats were tested by immunohistochemistry. **Results** Cognition of AD rats administered with naringein and Rosiglitazone could be recovered by Morris water maze ($P < 0.05$). Western blotting results showed that both naringein and Rosiglitazone could improve the expression of IDE and decrease the activity of GSK-3 β , and reduce the phosphorylation level of Tau ($P < 0.05$). Immunohistochemistry demonstrated that the A β 42 and A β 40 in cerebral cortex of rats treated by naringein and Rosiglitazone were both decreased. **Conclusion** Naringein as a peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) excitomotor could act as insulin sensitizer, and could alleviate the cognition of AD rats, A β deposition, and phosphorylation of Tau through regulating the expression of insuline-related IDE and GSK-3 β .

Key words: naringein; Alzheimer's disease; cognition; amyloid β -protein; Tau protein

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年
人最常见的一种神经退行性疾病,以进行性认知
行为全面减退为临床特征。研究发现,在AD早期
阶段患者大脑出现葡萄糖和能量代谢减弱^[1],2型糖

收稿日期: 2012-05-23

作者简介: 杨文青(1976—)男,陕西周至人,主治医师,硕士研究生,研究方向为神经病学。Tel: 18615725099 E-mail: 1398170276@qq.com

*通信作者 余华荣 Tel: 15823864685 E-mail: 1370748729@qq.com

尿病和AD有密切联系^[2],因此有研究者提出AD是“3型糖尿病”,是一种中枢神经系统的内分泌疾病,最主要的异常是胰岛素通路信号转导障碍^[3]。大脑胰岛素受体主要分布在嗅球、大脑皮层、海马、脑扁桃体和下丘脑,主要功能包括控制机体的能量平衡、调控突触的可塑性、调节认知功能以及与年龄相关的神经退行性变^[4],而这与AD患者的认知和记忆功能障碍的临床病理相对应。大鼠侧脑室内注射(icv)小剂量链脲佐菌素(STZ)可导致其脑局部的糖利用和能量代谢障碍,引起学习记忆障碍和胆碱能神经元丢失,而胰岛的结构和胰岛素的基因表达未受影响^[5]。因此该动物模型可用于研究大脑糖代谢异常引起的AD的发病机制。

柚皮素(naringenin)是从芸香科植物葡萄柚*Citrus paradisi* Macfadyen以及橘、橙的干燥果实提取的黄酮类成分,具有抗菌、抗炎、抗癌、解痉和利胆等作用。近来实验发现柚皮素亦是过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ (PPAR γ)激动剂,对大脑缺血再灌注损伤以及A β 诱导的神经元损伤均有一定的保护作用^[6]。本实验采用icv STZ诱导AD大鼠模型,观察柚皮素改善AD大鼠认知能力的作用以及该作用是否是通过调节胰岛素信号通路相关分子的表达而产生的。

1 材料

1.1 药品与试剂

柚皮素,质量分数97%,批号139820100,比利时Acros公司;罗格列酮片,重庆太极制药有限公司,批号66090452;STZ,德国Sigma公司。pGSK-3 β 抗体,碧云天生物有限公司;糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)抗体、pTau抗体,美国Bioworld;A β 40、A β 42、Tau抗体,北京博奥森生物有限公司;胰岛素降解酶(IDE)抗体,武汉三鹰生物公司;免疫组化试剂盒、二抗,均购自北京中杉金桥生物公司;PVDF膜,Millipore公司。DBA辣根过氧化物酶显色试剂盒,碧云天生物有限公司。

1.2 动物

清洁级SD大鼠,体质量320~380 g,购自重庆医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(渝)2007-0001。

1.3 仪器

DW-2000脑立体定位仪,成都泰盟科技有限公司;ELX 800酶标仪、Gel Doc XR凝胶成像分析仪,美国Bio-Rad公司;蛋白垂直电泳仪、蛋白转

移系统,北京六一仪器厂。

2 方法

2.1 模型制备、分组及给药

将动物随机分为对照组、模型组、柚皮素组、罗格列酮组,共4组。大鼠用水合氯醛4 mg/kg麻醉后固定在颅脑立体定位仪上,局部常规消毒,沿头顶部矢状缝切开皮肤,分离骨膜,根据文献方法^[7]定位,在前囟后0.8 mm、矢状缝旁开1.5 mm处用锥颅器钻开颅骨,暴露硬脑膜,自定位点进针3.5 mm,模型组、柚皮素组和罗格列酮组缓慢注射STZ 3 mg/kg(用生理盐水溶解为25%溶液)约20 μ L,对照组给予等体积生理盐水,注射时间5~10 min,注入后留针5 min,以保证溶液充分弥散,缓慢退针。术后第3天再注射1次。第1次注射后大鼠给予葡萄糖水饲养,柚皮素组ig柚皮素50 mg/kg^[8]、罗格列酮组ig罗格列酮5 mg/kg(均溶于生理盐水)均1 mL;对照组和模型组则给予等量生理盐水,每天给药1次,连续给药3周。

2.2 大鼠一般情况观察

自手术后第1天开始,每天检测大鼠的体质量,观察大鼠的进食情况及死亡数,以考察STZ对大鼠的毒性。

2.3 大鼠Morris水迷宫实验

各组大鼠给药结束后进行Morris水迷宫实验。定位航行实验:将大鼠面向池壁放入水中,记录其在120 s内找到平台所用时间,即为逃避潜伏期,如大鼠不能在120 s内找到平台,将其牵到平台上停留30 s,再放回笼中,间隔30 min再进行下1次实验,以检测大鼠的学习能力。空间探索实验:撤走平台,将大鼠从任意一个入水点放入池中,记录其在120 s内找到原平台所在位置所需时间,以测试大鼠的记忆能力。实验连续进行5 d。

2.4 脑组织样本制备

Morris水迷宫实验结束后,每组各随机取3只动物,10%水合氯醛麻醉,剪开胸腔腔,暴露心脏和肝脏,剪开右心耳,从左心室用生理盐水灌注至肝脏无血色,再用4%多聚甲醛灌注约120 mL,迅速取出大脑,放入4%多聚甲醛固定约24 h,以进行免疫组化切片染色、检测。其余大鼠断颈取脑,放入液氮中备用。

2.5 免疫组化法检测大脑A β 40和A β 42变化

部分脑组织石蜡包埋,行冠状面切片,烘烤。将片架和玻片一同放入60 $^{\circ}$ C二甲苯中脱蜡2次,

每次 20 min, 后依次放入 100%、100%、100%、95% 乙醇各 3 min, PBS 洗 5 min, 用枸橼酸缓冲液充分暴露抗原, 再将标本浸于封闭血清 20 min, 滴加一抗 4 °C 过夜。次日 37 °C 复温 1 h 后再滴加二抗和三抗, 在 37 °C 均各温孵 20 min, DBA 显色, 苏木素染色, 5 组乙醇脱水各 1 min, 3 组二甲苯透明各 5 min, 封片。显微镜 (×400) 观察并照片。

2.6 Western blotting 法检测胰岛素信号通路中相关蛋白表达

部分脑组织放入玻璃匀浆器中碾碎, 加入含 1 mmol/L PMSF 的裂解液裂解, 30 min 后移入 EP 管中, 4 °C、11 000×g 离心 5 min, 取少量上清液进行 BCA 蛋白定量分析, 其余上清液按 4:1 加入 5×蛋白上样缓冲液, 100 °C 水中煮沸 5 min 后放入 -80 °C 冰箱, 备用。每组取适量样本行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 再将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 一抗 (IDE 1:125, Tau 1:25, pTau 1:500, GSK-3β 1:500, pGSK-3β 1:250) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 5 次, 每次 5 min, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 5 次, 每次 5 min, 通过 Bio-Rad ChemiDocXRS 化学发光成像系统进行曝光, 分析显影。

2.7 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 18.0 软件对各组数据进行正态检验以及方差齐性检验, 多组数据间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验分析。

3 结果

3.1 大鼠一般情况观察

各组大鼠 icv 给予 STZ 后, 体质量不同程度地下降, 其中模型组在造模 1 周后下降最明显。结果见图 1。给予 STZ 后, 共死亡 6 只大鼠, 每组剩余大鼠 6 只。

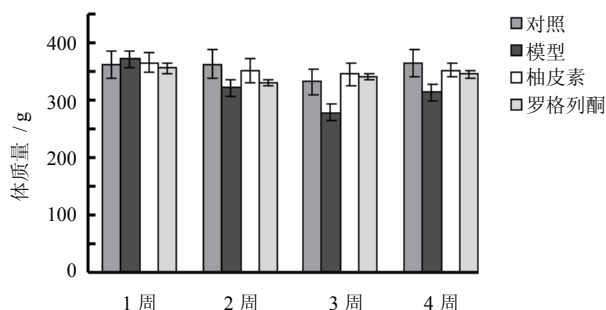


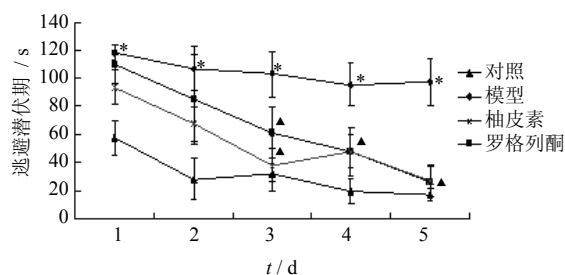
图 1 造模后大鼠体质量的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Body weight changes of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 对 AD 大鼠在 Morris 水迷宫实验中行为的影响

3.2.1 定位航行实验 各组大鼠的逃避潜伏期均呈逐渐缩短趋势。与对照组相比, 模型组大鼠的逃避潜伏期显著延长 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 柚皮素组和罗格列酮组大鼠的逃避潜伏期显著缩短 ($P < 0.05$), 且模型组大鼠找到平台后会立即跳入水中, 表明该组大鼠的学习能力降低, 盲目游泳。结果见图 2。

3.2.2 空间探索实验 模型组大鼠则沿池壁盲目游动, 找到原平台所在位置的时间明显延长; 而对照组、柚皮素组和罗格列酮组大鼠在平台所在的象限活动时间较长, 且有意识地在原平台位置寻找, 其中柚皮素组和罗格列酮组与模型组相比差异显著 ($P < 0.05$)。结果见图 3。

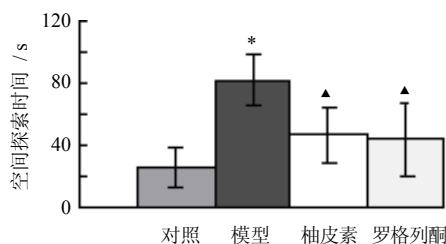


与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ vs model group

图 2 柚皮素对大鼠逃避潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of naringenin on escape latency time of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; ▲ $P < 0.05$ vs model group

图 3 柚皮素对大鼠空间探索实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Comparison of naringenin on spatial probe time of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.3 对 AD 大鼠大脑中 Aβ40 和 Aβ42 的影响

Aβ 的变化是 AD 典型的病理特征, 其异常沉积可以引起局部炎症反应, 甚至神经元死亡, Aβ40 和 Aβ42 是 Aβ 最主要的两种亚型。由图 4 可见, 与对照组相比, 模型组大鼠大脑皮质区中 Aβ40、Aβ42 均明显增加 (在海马区的沉积不明显); 与模型组相

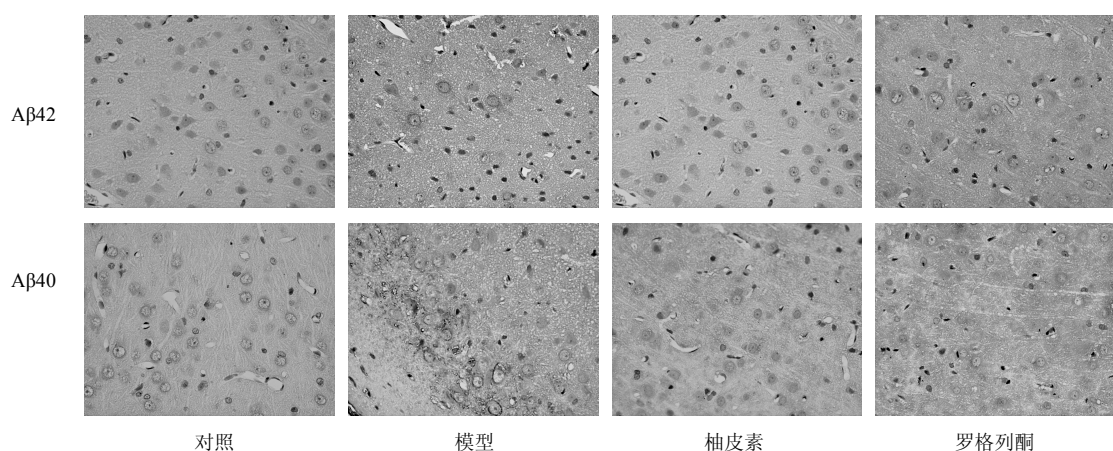


图4 柚皮素对AD大鼠大脑皮质区Aβ40和Aβ42的影响

Fig. 4 Effect of naringenin on Aβ40 and Aβ42 in cerebral cortex of AD rats

比,柚皮素组和罗格列酮组大鼠脑中Aβ40和Aβ42则明显减少。

3.4 对胰岛素信号通路中相关蛋白表达的影响

3.4.1 对IDE的影响 与对照组比较,模型组大鼠的IDE水平明显下降($P<0.05$)。与模型组相比,柚皮素组和罗格列酮组大鼠的IDE水平有所提高($P<0.05$)。结果见图5。

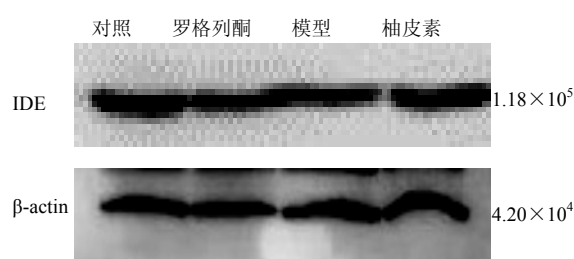


图5 柚皮素对AD大鼠脑组织中IDE表达的影响

Fig. 5 Effect of naringenin on IDE expression in brain tissue of AD rats

3.4.2 对GSK-3β活性的影响 与对照组相比,模型组大鼠脑组织中pGSK-3β的量明显减少,pGSK-3β/GSK-3β的值明显降低($P<0.05$),表明模型组大鼠GSK-3β的活性增强,促进了Tau蛋白的磷酸化。与模型组相比,柚皮素组的pGSK-3β/GSK-3β值显著增加($P<0.05$),表明柚皮素组GSK-3β的活性显著降低($P<0.05$);罗格列酮组pGSK-3β/GSK-3β值有增加趋势,但与模型组比较无统计学差异。结果见图6。

3.4.3 对Tau蛋白磷酸化水平的影响 除柚皮素组

大鼠脑组织中总Tau蛋白稍偏低外,其余3组总Tau蛋白的水平无显著差异。与对照组相比,模型组pTau、pTau/Tau的值明显升高($P<0.05$),提示模型组Tau的磷酸化水平升高;与模型组相比,柚皮素组和罗格列酮组pTau的水平和pTau/Tau的值均明显降低($P<0.05$)。结果见图6。

4 讨论

本实验研究了作为PPARγ激动剂的柚皮素对AD大鼠模型认知能力、大脑组织中Aβ的量和Tau的磷酸化水平等方面的影响。罗格列酮作为胰岛素增敏剂,也是PPARγ激动剂,已在临床广泛应用于治疗2型糖尿病,因此用其作为阳性对照。

大脑胰岛素的主要功能包括调控机体的能量平衡,突触的可塑性和认知功能以及与年龄相关的神经退行性变。本实验结果表明,柚皮素可以明显改善AD大鼠的学习记忆能力,其与罗格列酮均可通过改善胰岛素信号通路而促进胰岛素在中枢发挥作用,表明柚皮素亦可作为胰岛素增敏剂。

Aβ的异常积蓄导致其过分聚合,而过度聚合的Aβ分子对神经网络具有损害作用^[8]。胰岛素通过加速Aβ从高尔基体到细胞膜的转运来影响其代谢,还可以通过促进Aβ的分泌和竞争IDE抑制Aβ的降解,进而增加其在细胞外的水平。IDE能催化胰岛素降解和负性调控胰岛素信号,也能降解可溶性的Aβ,从而调节细胞外Aβ水平,即胰岛素和Aβ是IDE的竞争性底物。此外,胰岛素能反馈性调节IDE的水平:若中枢胰岛素水平下降,则下调IDE水平,从而使Aβ的降解减少;若中枢胰岛素水平

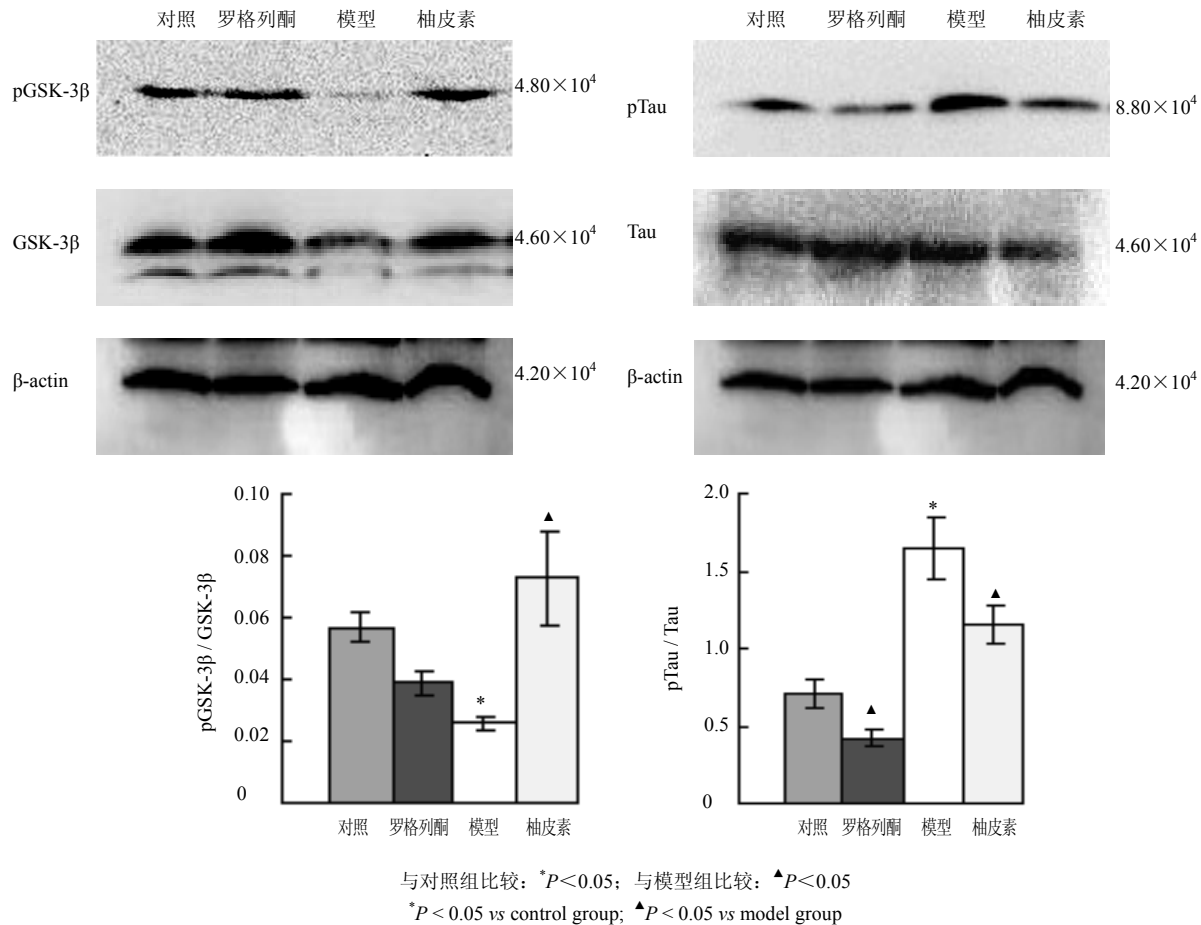


图 6 柚皮素对 AD 大鼠 GSK-3β 活性和 Tau 磷酸化水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Effect of naringenin on GSK-3β activity and phosphorylation level of Tau ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

增高, 则竞争性抑制 IDE 对 Aβ 的降解。因此, 通过检测 IDE 的水平可以反映中枢胰岛素的水平和 Aβ 降解的情况。同时胰岛素对 Aβ 代谢的影响也可以通过促分裂素原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径进行调节^[9]。因此, 胰岛素信号途径的异常影响 Aβ 的生理代谢过程。柚皮素作为胰岛素增敏剂可降低中枢胰岛素的水平, 从而有更多的 IDE 降解 Aβ, 减少 Aβ 的沉积。柚皮素和罗格列酮可调控 IDE 基因转录, 从而增加 IDE 的表达^[10]。但也有研究显示罗格列酮并未增加转基因 AD 动物模型的 IDE 表达^[11]。PPARγ 激动剂除了可以增加 Aβ 的降解外, 也可以通过降低淀粉样前体蛋白 β 位分解酶 1 (BACE1) 的表达来减少 Aβ 的形成^[12]。因此, 柚皮素可以通过影响 Aβ 的形成和降解两方面来调节 Aβ 的量。

Tau 是神经系统非常重要的一种微管相关蛋白, 在生理状况下, 主要存在神经元轴突内, 与微管结合并维持微管的稳定、轴突的生长和信息的传递。Tau 的过度磷酸化是 AD 的又一个典型的病理

特征, Tau 被蛋白激酶磷酸化的位点多达 20 个, 本实验选择了 ser262 位点作为衡量 Tau 磷酸化程度的指标。AD 患者大脑中异常磷酸化的 Tau 丧失了与微管结合的生物学活性, 并在神经元内异常聚集最终形成神经纤维缠结 (NFT), 进而影响神经元功能。本实验结果显示, 模型组和罗格列酮组大鼠脑组织中总 Tau 未见减少, 而柚皮素组脑组织中总 Tau 蛋白有所减少; 柚皮素组和罗格列酮组的 pTau/Tau 的值较模型组小, 表明两组的 Tau 的磷酸化程度低。GSK-3β 作为胰岛素信号通路中一种重要的激酶, 其活性受胰岛素信号调节, 也与 Tau 的磷酸化有密切联系。胰岛素信号通路的损伤抑制了磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K) 和蛋白激酶 B (PKB), 从而增加了 GSK-3β 的活性, 进而导致 Tau 蛋白的过度磷酸化^[13]。异常积累的 Aβ 干扰胰岛素信号并通过 PI3K/AKT 途径增加 GSK-3β 的活性, 促进 Tau 蛋白的过度磷酸化, 最终形成 NFT^[14]。本实验结果表明, 柚皮素和罗格列酮通过降低 GSK-3β 的活性及减少 Aβ 的

量来降低 Tau 磷酸化水平,减少 NFT 的形成,维持神经突触的完整性。

本实验结果表明,柚皮素和罗格列酮可以从多方面(如改善氧化应激水平)对 AD 模型大鼠产生影响,因此 PPAR γ 激动剂可以作为治疗 AD 的靶向药物。从实验结果看,柚皮素和罗格列酮均明显改善 AD 大鼠的认知水平,而从 pGSK-3 β /GSK-3 β 和 pTau/Tau 的结果看,两者作用存在一定的差异,可能是由于样本数较少造成的误差,也有可能是两者对 AD 有其他不同的作用机制。罗格列酮并不能通过血脑屏障,而柚皮素作为一种天然的化合物,能够通过血脑屏障且具有副作用少等优点,因此柚皮素可作为更佳的治疗 AD 的胰岛素增敏剂。但柚皮素治疗 AD 的可能途径和分子机制还有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] Mosconi L, Tsui W H, Rusinek H, *et al.* Quantitation, regional vulnerability, and kinetic modeling of brain glucose metabolism in mild Alzheimer's disease [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 34(9): 1467-1479.
- [2] Profenno L A, Porsteinsson A P, Faraone S V, *et al.* Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes, and related disorders [J]. *Biol Psychiatry*, 2010, 67(6): 505-512.
- [3] Steen E, Terry B M, Rivera E J, *et al.* Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease is this type 3 diabetes? [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2005, 7(1): 63-80.
- [4] Zhao W Q, Townsend M. Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(5): 482-496.
- [5] Lester-Coll N, Rivera E J, Soscia S J, *et al.* Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: Relevance to sporadic Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2006, 9(1): 13-33.
- [6] Christensen K B, Petersen R K, Kristiansen K, *et al.* Identification of bioactive compounds from flowers of Black Elder (*Sambucus nigra* L.) that activate the human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(Suppl 2): 129-132.
- [7] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定向 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991.
- [8] Kannappan S, Anuradha C V. Naringenin enhances insulin-stimulated tyrosine phosphorylation and improves the cellular actions of insulin in a dietary model of metabolic syndrome [J]. *Eur J Nutr*, 2010, 49(2): 101-109.
- [9] Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2011, 7(3): 137-152.
- [10] Du J, Zhang L, Liu S B, *et al.* PPAR γ transcriptionally regulates the expression of insulin-degrading enzyme in primary neurons [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 383(4): 485-490.
- [11] Escribano L, Simón A M, Gimeno E, *et al.* Rosiglitazone rescues memory impairment in Alzheimer's transgenic mice: mechanisms involving a reduced amyloid and Tau pathology [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2010, 35(7): 1593-1604.
- [12] 斯露, 张雄, 张红梅, 等. 姜黄素通过激活 PPAR γ 和抑制 BACE1 减少神经细胞内 β 淀粉样蛋白的产生 [J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(10): 1300-1304.
- [13] Schubert M, Brazil D P, Burks D J, *et al.* Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(18): 7084-7092.
- [14] De la Monte S M. Insulin resistance and Alzheimer's disease [J]. *BMB Rep*, 2009, 42(8): 475-481.