

玉郎伞多糖对快速老化小鼠额叶和 海马神经元 Caspase-3 表达及活性的影响

陈晓宇, 黄仁彬*

(广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021)

[摘要] 目的: 考察玉郎伞多糖(YLSP)对快速老化(SAMP8)小鼠额叶、海马神经细胞半胱天冬蛋白酶-3(Caspase-3)表达及活性的影响。方法: 选择6月龄SAMP8小鼠, 随机分为模型组, 石杉碱甲组($0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), YLSP低、高剂量组($45, 180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 选择6月龄正常老化小鼠(SAMR1)作为对照组, 以上各组每日上午ig给药1次, 连续40d, 于末次给药的次日应用免疫组织化学方法检测额叶和海马Caspase-3的表达变化及神经细胞凋亡情况, 测定Caspase-3活性。结果: SAMP8小鼠额叶和海马Caspase-3阳性细胞数分别为(46.00 ± 5.30), (51.36 ± 3.28)个, Caspase-3活性分别为 2380 ± 193 , 2473 ± 241 , 均较对照组显著升高(4.90 ± 0.60), (6.14 ± 0.53); (437 ± 76), (521 ± 79) ($P < 0.01$); 与模型组相比, 石杉碱甲组、YLSP低、高剂量组额叶和海马Caspase-3阳性细胞数(23.48 ± 3.46 , 27.86 ± 4.04 ; 24.54 ± 3.55 , 30.60 ± 2.62 ; 17.98 ± 2.97 , 23.90 ± 2.58)及Caspase-3活性(1323 ± 126 , 1456 ± 130 ; 1397 ± 133 , 1483 ± 147 ; 987 ± 79 , 1091 ± 95)明显低于模型组($P < 0.01$); 与石杉碱甲组、YLSP低剂量组比较, YLSP高剂量组的额叶和海马Caspase-3阳性细胞数及Caspase-3活性显著降低($P < 0.05$)。结论: 表明YLSP降低Caspase-3表达及活性, 减少SAMP8小鼠脑部神经细胞凋亡。

[关键词] 玉郎伞多糖; SAMP8; 半胱天冬蛋白酶; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0208-04

[doi] 10.11653/syfy2013130208

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130425.1458.002.html>

[网络出版时间] 2013-04-25 14:58

[收稿日期] 20130208(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960504)

[第一作者] 陈晓宇, 博士研究生, 从事抗老年性痴呆药物研究, Tel:0771-2186165, E-mail:1534746296@qq.com

[通讯作者] * 黄仁彬, 博士, 教授, 博士生导师, 从事抗老年性痴呆药物和抗糖尿病药物研究, Tel:0771-5358272, E-mail:huangrenbin518@163.com

且枸杞子本身就含有超氧化物歧化酶(SOD), 由此可提高晶状体的抗氧化能力, 达到抑制白内障发展的作用。方中其他药物如熟地黄、车前子等均经实验证实对Fenton反应所致的晶状体氧化损伤有不同程度的防护作用, 且效果较佳^[10]。综上所述, 本方无论是在现代药理研究方面还是在中医理论方面都充分的阐明了其防治老年性白内障的机制, 为其临床应用奠定了科学的理论基础及实验依据。

[参考文献]

- [1] 黄秀榕, 祁明信. 锌在控制实验性半乳糖白内障中的作用[J]. 中华眼科杂志, 1987, 5(4):293.
- [2] 李慈娟, 范小兵, 韩超, 等. 昂立明视胶囊抗白内障的动物试验[J]. 中成药, 2001, 23(3):199.
- [3] 张晓春, 燕振国. 我国白内障基础研究现状分析和展望[J]. 中国误诊学杂志, 2007, 7(23):5469.
- [4] 孙熠, 严宏. 中医药治疗年龄相关性白内障的研究进

展[J]. 国际眼科杂志, 2005, 5(5):987.

- [5] 芦斌, 高继美, 刘俊茹, 等. 白内障超声乳化人工晶状体植入术联合小梁切除效果观察[J]. 河北医药, 2007, 29(6):571.
- [6] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006:891.
- [7] 唐由之, 肖国士. 中医眼科全书[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996:5.
- [8] 俞洋, 冯振娥, 赵晓林, 等. 补清汤治疗未成熟期年龄相关性白内障35例临床观察[J]. 宁夏医科大学学报, 2011, 33(5):496.
- [9] 杨涛, 梁康, 张晶颖. 四种中药对大鼠半乳糖性白内障的影响[J]. 北京医科大学学报, 1991, 23(2):97.
- [10] 黄秀榕, 祁明信, 王勇, 等. 十一种归肝经明目中药对Fenton反应所致的晶状体氧化损伤防护作用的研究[J]. 中医医学刊, 2003, 21(10):1650.

[责任编辑] 聂淑琴

Effects of Yulangsans Polysaccharides on Caspase-3 Expression and Activity in the Frontal Lobe and Hippocampus of SAMP8 Mice

CHEN Xiao-yu, HUANG Ren-bin*

(Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** The effects of Yulangsans polysaccharides (YLSP) on Caspase-3 expression and activity of the frontal lobe and hippocampus in senescence accelerated-prone mouse 8 (SAMP8) mice brain were investigated. **Method:** The SAMP8 mice were adopted as the Alzheimer's disease model group, and SAMR1 as the control group. Both groups were randomized and given 0.5% CMC-Na solution. Huperzine ($0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was given to drug-positive group and two YLSP groups were given 45, 180 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ respectively, continuous administration for 40 days. In the frontal lobe and hippocampus, Caspase-3 expression and activity were detected respectively by immunohistochemical method and Caspase-3 activity assay kit. **Result:** In model group, Caspase-3 expression and activity were obviously higher than that in the control group ($P < 0.01$). In drug-positive and YLSP groups, Caspase-3 expression and activity were obviously lower than that in model group ($P < 0.01$). YLSP presented a dose-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion:** The abnormal Caspase-3 expression and activity can be reduced by YLSP, and it has the protective function towards neural cell apoptosis in SAMP8 mouse brain.

[Key words] Yulangsans polysaccharides; SAMP8; Caspase-3; apoptosis

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年痴呆症的主要病种,约占其发病率的70%。快速老化(senescence accelerated-prone mouse 8, SAMP8)小鼠是目前公认的研究AD的模型。玉郎伞又叫龙眼参,为蝶形花科植物疏叶崖豆 *Millettia pulchra* kurz vur, Laxior (Dunn) Z. Wei 的块根,主要分布于广西、广东等地,是广西壮族习用药材^[1]。前期实验显示玉郎伞多糖(Yulangsans polysaccharides, YLSP)有一定的抗老年性痴呆的作用^[2-4],但其机制尚有待进一步研究。AD是以进行性痴呆为主要临床特征,由多种因素引起,有多种病理表现的神经系统退行性疾病^[5]。近年来研究发现Caspase-3参与了痴呆发生神经元损伤的病理过程,在痴呆中起重要的作用^[6]。本试验采用较为通行的快速老化痴呆模型(SAMP8小鼠模型),观察YLSP对额叶、海马Caspase-3表达及活性的变化,进一步探讨老年性痴呆的发病机制以及YLSP对老年性痴呆神经保护作用的治疗机制。

1 材料

1.1 动物 SAMP8和SAMR1(senescence accelerated-resistant mouse 1,正常老化小鼠),雄性,体重24~28g,清洁级,由天津中医学院第一附属医

院提供(动物质量合格证号:W-J津实动质M准字第006号)。

1.2 药物及试剂 玉郎伞多糖(YLS经醇提后的药渣用热水提取,乙醇沉淀,Sevag试剂脱蛋白,采用DEAE-52柱层析分离纯化而得,纯度91.7%,批号20110509,由气相色谱和薄层色谱分析其组成表明由葡萄糖和阿拉伯糖组成,其中,葡萄糖占90.79%,阿拉伯糖占9.21%,相对分子质量范围150.13~180.16);石杉碱甲(浙江震元制药有限公司,含量96.3%,批号110203);兔抗鼠Caspase-3多克隆抗体(美国Santa Cruz公司)、Caspase-3 Activity Assay试剂盒(瑞士Roche公司);二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(福州迈新生物技术开发公司);其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 TS-2000A型脱色摇床(江苏其林贝尔仪器制造有限公司);TS-12U型生物组织自动脱水机(湖北孝感亚鹏有限公司);JB-L5型生物组织石蜡包埋机(武汉俊杰电子有限公司);Finesse ME型石蜡切片机(英国Thermo Shandon公司);Q550型病理图像分析仪(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药 根据实验方法指标,每个指

标选择 6 月龄 SAMP8 雄性鼠 20 只, 随机分为 SAMP8 模型组、石杉碱甲组、YLSP 低剂量组及高剂量组, 每组 5 只。另外选择 6 月龄 SAMR1 雄性鼠 5 只, 作为对照组。模型组、对照组: 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液, 30 mL·kg⁻¹; 石杉碱甲组: 石杉碱甲 0.02 mg·kg⁻¹; YLSP 低剂量组: 45 mg·kg⁻¹; YLSP 高剂量组: 180 mg·kg⁻¹。以上各组每日上午 10 时 ig 给药 1 次, 连续 40 d。

2.2 取材及切片制备 各组小鼠在最后 1 次给药后的第 2 天, 用 5% 水合氯醛 6 mL·kg⁻¹ ip 麻醉小鼠, 自左心室插管后剪开右心耳, 快速灌注生理盐水冲洗, 待流出的液体清亮后, 灌注 4% 多聚甲醛, 30 min 灌注完毕, 立即断头取脑组织, 置于上述同样固定液中固定 7 h, 修块后置 4% 多聚甲醛中 4℃ 过夜, 然后常规脱水、透明、浸蜡、包埋。连续切片, 切片厚度 5 μm, 备用。

2.3 Caspase-3 免疫组织化学染色 (SP 法) 参考相关实验技术进行免疫组化染色。二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 苏木素复染, 二甲苯透明, 封片, 用 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 代替 Caspase-3 抗血清做对照试验, 结果阴性。阳性结果为胞体内出现棕黄色颗粒, 以胞浆为主, 强阳性时细胞核也出现棕黄色颗粒。

2.4 Caspase-3 活性测定 按 Roche 公司 Caspase-3 Activity Assay 检测试剂盒说明进行操作。

2.5 图像分析 每张切片采用 Spot 图像分析处理系统对小鼠相同部位的额叶、海马区的锥体细胞层, 在 400 倍光镜下随机选择 5 个视野, 做免疫反应阳性细胞数计数, 以 5 个视野的平均值代表该切片的阳性神经元数。

2.6 统计学处理 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件包统计分析, 组间均数比较采用单因素方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 为差别有显著性意义。

3 结果

模型组、石杉碱甲组、YLSP 低、高剂量组的额叶和海马 Caspase-3 阳性细胞数及 Caspase-3 活性与对照组相比均显著增高 ($P < 0.01$)。石杉碱甲组、YLSP 低、高剂量组的额叶和海马 Caspase-3 阳性细胞数及 Caspase-3 活性与模型组相比均显著降低 ($P < 0.01$)。YLSP 高剂量组的额叶和海马 Caspase-3 阳性细胞数及 Caspase-3 活性较石杉碱甲组及 YLSP 低剂量组低 ($P < 0.05$)。见表 1~2 和图 1~2。

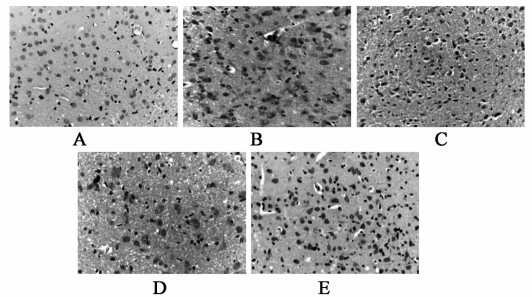
表 1 YLSP 对 SAMP8 小鼠额叶和海马 Caspase-3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$) 个/mm²

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	额叶	海马
对照	-	4.90 ± 0.60	6.14 ± 0.53
模型	-	46.00 ± 5.30 ¹⁾	51.36 ± 3.28 ¹⁾
石杉碱甲	0.02	23.48 ± 3.46 ^{1, 2)}	27.86 ± 4.04 ^{1, 2)}
YLSP	45	24.54 ± 3.55 ^{1, 2)}	30.60 ± 2.62 ^{1, 2)}
	180	17.98 ± 2.97 ^{1, 2, 3)}	23.90 ± 2.58 ^{1, 2, 3)}

注: 与对照组相比¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$; 与石杉碱甲组、YLSP45 mg·kg⁻¹ 组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 YLSP 对 SAMP8 小鼠额叶和海马 Caspase-3 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	额叶/荧光值	海马/荧光值
对照	-	437 ± 76	521 ± 79
模型	-	2 380 ± 193 ¹⁾	2 473 ± 241 ¹⁾
石杉碱甲	0.02	1 323 ± 126 ^{1, 2)}	1 456 ± 130 ^{1, 2)}
YLSP	45	1 397 ± 133 ^{1, 2)}	1 483 ± 147 ^{1, 2)}
	180	987 ± 79 ^{1, 2, 3)}	1 091 ± 95 ^{1, 2, 3)}



A. 对照组; B. 模型组; C. 石杉碱甲 0.02 mg·kg⁻¹ 组; D. YLSP 45 mg·kg⁻¹ 组; E. YLSP 180 mg·kg⁻¹ 组 (图 2 同)

图 1 YLSP 对额叶神经元 Caspase-3 表达的影响 (免疫组织化学染色, ×400)

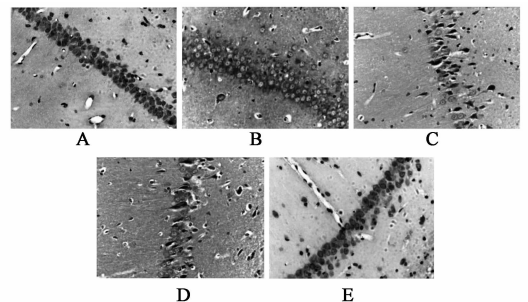


图 2 YLSP 对海马神经元 Caspase-3 表达的影响 (免疫组织化学染色, ×400)

4 讨论

老年痴呆症可分为 AD、血管性痴呆、二者并存的混合型痴呆以及其他原因引起的痴呆 (帕金森氏病, 颅内肿瘤, 脑外伤等)。AD 是老年痴呆症的主

要类型(50% ~ 70%),其病理特征主要以老年斑、神经细胞内的神经纤维缠结、淀粉样蛋白沉积以及神经细胞空泡变性和大量丧失为主^[7]。AD 发病机制十分复杂,目前发现很多因素可能在 AD 的发生和发展中发挥重要作用^[8],不管哪种因素,在对大脑影响的发生发展过程中,出现相应部位脑细胞凋亡常常是其共同的特征。尽管凋亡过程的详细机制尚不完全清楚,但是已经确定 Caspases 即半胱天冬蛋白酶在凋亡过程中是起着必不可少的作用,细胞凋亡的过程实际上是 Caspases 不可逆有限水解底物的级联放大反应过程^[9]。在 Caspase 级联反应中,Caspase-3 处于核心位置。Caspase-3 被其上游信号激活,活化的 Caspase-3 又进一步作用于其底物导致 Caspase 级联反应放大,最终使细胞凋亡^[10]。

SAM 是一种出生后全身多系统功能发生快速进行性老化的模型小鼠,其中 SAM-prone/8 (SAMP8)是快速老化亚系之一,其特征是随增龄迅速出现中枢学习记忆功能和免疫功能衰退,此外脑中主要出现明显的 β -淀粉样蛋白(β -AP)沉积、PAS 染色阳性颗粒状结构 PGS 和海绵样病变,与其同源对照组 SAMR1 相比,其行为学、形态学、神经生化、多种酶类以及蛋白质和基因表达均出现异常,它是比较理想的研究脑老化和痴呆的模型^[11-12]。本试验以 SAMP8 小鼠作为 AD 模型,应用免疫组织化学方法检测额叶和海马 Caspase-3 的表达变化及神经细胞凋亡情况,测定 Caspase-3 活性。结果显示 SAMP8 小鼠额叶和海马 Caspase-3 阳性细胞数及 Caspase-3 活性明显高于对照组($P < 0.01$);石杉碱甲组、YLSP 高低剂量组额叶和海马神经细胞 Caspase-3 阳性细胞数及 Caspase-3 活性明显低于模型组($P < 0.01$);YLSP 高剂量组的额叶和海马神经细胞 Caspase-3 阳性细胞数及 Caspase-3 活性较石杉碱甲组及 YLSP 低剂量组显著降低($P < 0.05$)。

综上所述,YLSP 可显著改善 SAMP8 小鼠额叶和海马神经细胞的形态,抑制 Caspase-3 蛋白表达及活性,减少细胞凋亡。其他实验结果也显示,YLSP 具有清除脑内自由基及提高抗氧化能力的作用^[13]。提示 YLSP 对 AD 的作用机制可能是多方面的,将其用于 AD 的治疗还有待于进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[S]. 南宁:广西科学技术出版社,1990:166.
- [2] 黄忠仕,黄仁彬,李江,等. 龙眼参多糖对不同模型拟痴呆小鼠的益智作用[J]. 右江民族医学院学报,2004,26(4):463.
- [3] 黄忠仕,林兴,李江,等. 龙眼参多糖对 D-半乳糖所致的痴呆小鼠脑组织 NO、SOD、MDA 的影响[J]. 中国老年学杂志,2005,25(2):176.
- [4] 黄忠仕,焦杨,张士军,等. 龙眼参多糖对 SAMP8 鼠脑组织痴呆相关基因表达的影响[J]. 中国药理学通报,2008,24(4):509.
- [5] Butterfield D A, Howard B, Yatin S, et al. Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease [J]. Life Sci, 1999, 65(18):1883.
- [6] Hatip-Al-Khatib I, Iwasaki K, Chung E H, et al. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase and caspase-3, but not caspase-1, prevents apoptosis and improves spatial memory of rats with twice-repeated cerebral ischemia[J]. Life Sci, 2004, 16(7):1967.
- [7] 王红梅,宋彩梅,刘新民,等. 六味地黄丸对肾虚型老年痴呆动物模型的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):112.
- [8] 庞来祥,张琳静,李娟,等. 健脑生智口服液对老年痴呆小鼠模型的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(9):184.
- [9] Rao R V, Hermel E, Castro-Obregon S, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation[J]. Biol Chem, 2001, 27(6):33869.
- [10] Fan T J, Han L H, Cong R S, et al. Caspase family proteases and apoptosis[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2005,37(11):719.
- [11] Zhang L, Li Q, Wolff L T, et al. Changes of brain activity in the aged SAMP mouse[J]. Biogerontology, 2007, 8(2):81.
- [12] 赵保胜,徐曦海. 老年性痴呆疾病模型的建立[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(6):274.
- [13] 蒋伟哲,孔晓龙,段小群,等. 玉郎伞对机体氧自由基清除作用的研究[J]. 中国药房,2001,12(8):453.

[责任编辑 聂淑琴]