

二苯乙烯苷对 SAMP8 小鼠 APP mRNA 和 PS1 mRNA 表达的影响

刘玲¹, 朱晓莹², 黎昀², 赖术², 黄忠仕^{2*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530000; 2. 右江民族医学院, 广西百色 533000)

[摘要] 目的: 探讨灌胃给二苯乙烯苷(TSG)后 SAMP8 小鼠 β 淀粉样蛋白前体(APP) mRNA 和早老蛋白-1(PS1) mRNA 表达的变化。方法: 6 月龄快速老化模型小鼠 SAMP8 50 只, 随机均分为 SAMP8 空白组, 阳性药石杉碱甲对照组, 高、中、低剂量 TSG 组(0.3, 0.1, 0.033 g·kg⁻¹·d⁻¹) 共 6 组; 6 月龄正常老化小鼠 SAMR1 鼠 10 只作为正常对照组。各组分别灌胃相应药物 60 d 后, 应用实时定量 PCR 法检测海马组织 APP 和早老蛋白-1(PS1) mRNA 的表达。结果: 与 SAMP8 空白组比较, TSG 组 APP mRNA 2^{- $\Delta\Delta CT$} 值明显降低, PS1 mRNA 2^{- $\Delta\Delta CT$} 值也明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 表明 TSG 组 APP mRNA 和 PS1 mRNA 表达下调。结论: 二苯乙烯苷对痴呆小鼠 SAMP8 有显著地抗痴呆作用, 其作用机制可能与调控 APP, PS1 表达有关。

[关键词] 二苯乙烯苷; 老年性痴呆; β 淀粉样蛋白前体; 早老蛋白-1; 实时荧光定量 PCR

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0240-04

Effects of TSG on Expression of APP mRNA and PS1 mRNA in SAMP8 Mice

LIU Ling¹, ZHU Xiao-ying², LI Yun², LAI Shu², HUANG Zhong-shi^{2*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China;

2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O- β -D-glycoside (TSG) on expression of β -amyloid precursor protein (APP) mRNA and presenilin-1 (PS1) mRNA in senescence accelerated mouse (SAMP8). **Method:** Fifty six-month-old SAMP8 mice were randomized into 5 groups: SAMP8 untreated control group, huperzine A control group, low-, mid-and high-dose groups of TSG (0.033, 0.1, 0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹), with 10 mice in each group. Another ten 6-month-old SAMR1 mice were assigned to normal control group. After medication for 60 days, expression of APP and presenilin-1 (PS1) mRNA in hippocampus was assayed by real-time quantitative reverse transcription-PCR. **Result:** The expression of APP and PS1 mRNA in all dose of TSG groups was down-regulated. Compared with SAMP8 untreated control group, there was significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion:** TSG can inhibit the expression of APP mRNA in SAMP8 hippocampus, so as to play the role of anti-senile dementia.

[Key words] 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O- β -D-glycoside; Alzheimer's disease; APP; PS1; real-time quantitative reverse transcription-PCR

老年性痴呆是指发生在老年期的各种痴呆综合

征, 包括阿尔茨海默病(又称早老性痴呆, AD)、血管性痴呆(VD)、混合性痴呆及其他痴呆, 前两种为主要类型, 占有痴呆的 90% 以上, 在临床上均表现为因认知功能减退所致的记忆力下降^[1]。随着世界人口的老齡化, 老年性痴呆已成为继肿瘤、心脏病、脑中風之后引起老年人死亡的第四大疾病^[2], 寻求有效的老年性痴呆治疗药物, 已成为当今医药

[收稿日期] 20120608(010)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(桂科自 0991281); 广西高等学校优秀人才资助计划项目(桂教人才 0829)

[通讯作者] * 黄忠仕, 医学博士, 教授, 从事抗痴呆药物研究, Tel: 0776-2851959, E-mail: hzs1004@163.com

工作者的一项艰巨任务。二苯乙烯苷(2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷, TSG)是何首乌中特有的生物活性成分,现代中药药理研究发现其具有较强的抗氧化、抗衰老、调节细胞凋亡等作用^[3-4],能显著降低 SAMP8 鼠脑组织谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)含量,纠正 SAMP8 鼠脑区氨基酸类递质代谢的紊乱状态,使兴奋性和抑制性氨基酸神经递质最终趋向平衡^[5]。本研究采用实时荧光定量法检测小鼠海马组织 β 淀粉样蛋白前体(APP)和早老蛋白-1(PS1) mRNA 表达的变化,探讨 TSG 对其的影响。

1 材料

1.1 动物 SAMP8 (Senescence accelerated mouse/8, 快速老化小白鼠)和 SAMR1 (Senescence accelerated-resistant mouse/1, 正常老化小白鼠),雄性,体重 24~28 g,清洁级,由天津中医药大学第一附属医院提供(动物质量合格证号 W2-J 津实动质 M 准字第 006 号)。

1.2 药物及试剂 TSG(桂林三宝药业有限公司),石杉碱甲(浙江震元制药有限公司,批号 110203),FS Universal SYBR Green Master (Roche 公司生产),RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas 公司生产),RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒(天根公司生产),DNA ladder(Dong shenBiotech 公司生产),琼脂糖(Gene Tech 公司生产)。

1.3 仪器 StepOne™ Plus 实时荧光 PCR 系统(美国 Applied Biosystems 公司),5810R 高速低温离心机(德国 Eppendorf Centrifuge 公司),PTC-220 多通道 PCR 仪(美国 MJ 公司),Gel doc2000 凝胶成像分析系统,Power/Pac300 电泳仪(均为美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组与喂养 6 月龄 SAMP8 雄性鼠 50 只,随机分为 SAMP8 对照组、石杉碱甲阳性药对照组、TSG 高、中、低剂量组,每组 10 只。另外,选择 6 月龄 SAMR1 雄性鼠 10 只,作为正常对照组。各组均按 20 mL·kg⁻¹ 给药。SAMP8 对照组、SAMR1 对照组 ig 生理盐水 20 mL·kg⁻¹;阳性药组石杉碱甲 0.02 mg·kg⁻¹;TSG 低、中、高剂量组(TSG 0.033, 0.1, 0.3 g·kg⁻¹)。以上各组每日 ig 给药 1 次,连续 60 d。

2.2 检测指标及方法 灌胃给药第 60 天后,处死小鼠,取其海马,迅速置于 -70 °C 冰箱保存。匀浆后按 TRIzol 试剂说明提取海马总 RNA。紫外分光

光度分析及琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的含量、纯度及完整性。利用 cDNA 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。PCR 反应引物由上海生工公司设计合成,序列如表 1。

表 1 PCR 反应引物

基因	引物序列	产物长度 /bp
APP	5'-ACCGAGAGAACAACCAGCAC-3'	177
	5'-ACATCCGCCGTA AAAAGAATG-3'	
PS1	5'-TTTGCTGGCTGTTTTATGTCC-3'	196
	5'-TCTCTCCGCTCTTTGTGTGT-3'	
GAPDH	5'-GCTGAAGCTCGGTGAACG-3'	233
	5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3'	

APP mRNA 扩增反应条件如下:预变性 95 °C 10 min;变性 95 °C 20 s,退火 60 °C 30 s,40 个循环。PS1 mRNA 扩增反应条件如下:预变性 95 °C 10 min;变性 95 °C 20 s,退火 59 °C 30 s,40 个循环。反应结束后,使用 StepOne™ Software v2.2.1 软件(Applied Biosystems 公司)分析 PCR 过程各检测样本的 Ct (Threshold cycle) 值,Ct 值随模板浓度增大而减少。由溶解曲线判断 PRC 反应的特异性。

2.3 统计学处理 应用 SPSS Statistics 17.0 软件进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 实时定量 PCR 产物 APP 和 PS1 经 2% 琼脂糖电泳,紫外线下扫描分析,产物在 150~200 bp (见图 1)。按照本实验引物条件,扩增的 APP 产物为 177 bp 左右,扩增的 PS1 产物为 196 bp 左右,所以实验结果显示符合设计的片断长度要求。产物溶解温度 APP 为 83.82 °C,PS1 为 83.52 °C。且溶解曲线仅 1 个峰,说明为单一片段扩增,无非特异性扩增和引物二聚体产物。

3.2 对 SAMP8 痴呆模型小鼠海马组织 APPmRNA 表达的影响 分别扩增 APP, PS1, GAPDH, 每样本作 2 复孔,得到两组阈循环值(Ct)平均值。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 APP 相对 mRNA 表达水平, $\Delta CT_{intervention} = CT_{interventionAPP} - CT_{interventionGAPDH}$, $\Delta CT_{blank} = CT_{blankAPP} - CT_{blankGAPDH}$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{intervention} - \Delta CT_{blank}$, APP mRNA 表达差别倍数以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。见表 2 图 2。同理,PS1 相对 mRNA 表达水平也通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算, $\Delta CT_{intervention} = CT_{interventionPS1} - CT_{interventionGAPDH}$, $\Delta CT_{blank} = CT_{blankPS1} -$

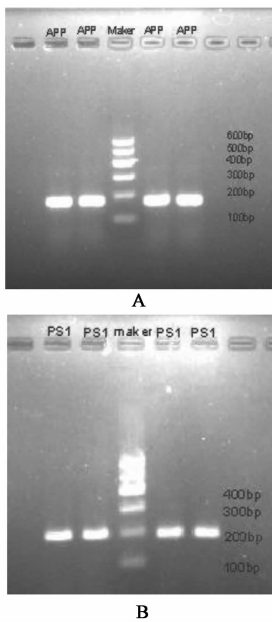


图 1 2% 凝胶电泳图分析 APP (A) 与 PS1 (B) PCR 扩增产物

$CT_{blank}GAPDH$, $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{intervention} - CT_{blank}$ 。见表 3, 图 3。

结果表明:TSG 高剂量、中剂量、低剂量各组以及阳性药石杉碱甲组 APP mRNA 相对定量表达显著低于 SAMP8 空白对照组 ($P < 0.01, P < 0.05$), 说明 TSG 组与阳性药石杉碱甲组 APP mRNA 表达下调。与阳性药石杉碱甲组比较, TSG 高剂量组 APP mRNA 相对定量表达显著减少 ($P < 0.05$), 说明 TSG 高剂量组下调 APP mRNA 表达作用优于石杉

碱甲组。与 SAMP8 空白对照组比较, TSG 高、中、低剂量组 PS1 mRNA 相对定量表达显著减少 ($P < 0.01, P < 0.05$), 表明给药 TSG 后 PS1 mRNA 表达下调。

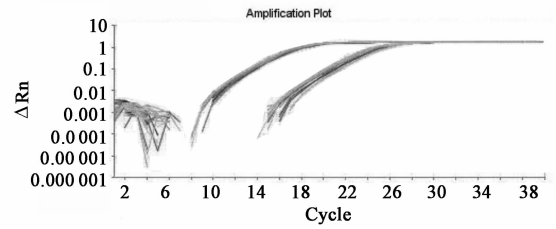


图 2 各剂量组 APP mRNA 的扩增曲线
(图中左侧为 GAPDH, 右侧为 APP)

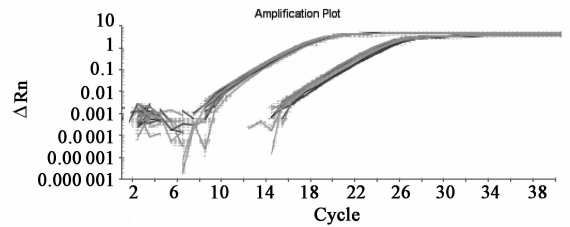


图 3 各剂量组 PS1 mRNA 的扩增曲线
(图中左侧为 GAPDH, 右侧为 PS1)

4 讨论

老年性痴呆, 即阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一多发在老年, 常见的一种慢性、进行性神经系统退行性疾病^[6], 以老年斑 (SP)、神经元纤维缠结 (NFT) 和神经元丢失为主要病理改变^[7-8]。其中 $A\beta$ 的产生、积聚增加是引起神经元退

表 2 各组小鼠海马组织 APP mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	APP C_t 值	GAPDH C_t 值	$2^{-\Delta\Delta CT}$
SAMP8	-	21.65 ± 0.13	15.52 ± 0.16	1
SAMR1	-	23.05 ± 0.09	15.41 ± 0.17	0.33 ± 0.04 ^{2,4)}
石杉碱甲	2×10^{-5}	21.98 ± 0.10	15.07 ± 0.08	0.56 ± 0.040 ¹⁾
TSG	0.3	21.97 ± 0.12	14.87 ± 0.11	0.49 ± 0.08 ^{2,3)}
	0.1	21.82 ± 0.11	15.08 ± 0.20	0.64 ± 0.05 ²⁾
	0.033	21.67 ± 0.15	15.23 ± 0.18	0.77 ± 0.03 ¹⁾

注: 与 SAMP8 组相比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与石杉碱甲组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

表 3 各组小鼠海马组织 PS1 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	PS1 C_t 值	GAPDH C_t 值	$2^{-\Delta\Delta CT}$
SAMP8	-	22.34 ± 0.18	15.68 ± 0.16	1
SAMR1	-	23.48 ± 0.11	15.40 ± 0.10	0.38 ± 0.06 ^{2,4)}
石杉碱甲	2×10^{-5}	22.13 ± 0.15	15.10 ± 0.08	0.78 ± 0.040 ¹⁾
TSG	0.3	22.52 ± 0.12	15.08 ± 0.17	0.52 ± 0.07 ^{1,3)}
	0.1	22.34 ± 0.20	15.40 ± 0.19	0.77 ± 0.10 ¹⁾
	0.033	22.77 ± 0.15	15.95 ± 0.18	0.84 ± 0.09 ¹⁾

化和死亡的主要机制,它是老年斑的核心成分,也是老年性痴呆发生的主要原因。 β 淀粉样蛋白沉积数量的多寡与疾病的严重程度呈正相关^[9]。

在众多与 AD 相关的基因中,APP 基因和 PS1,与 AD 最密切相关,研究显示,至少有 3 种蛋白水解酶, α 分泌酶、 β 分泌酶、 γ 分泌酶,参与了 APP 蛋白的代谢^[10]; APP 基因的点突变出现新的酶切位点,易为 β 、 γ 分泌酶酶解,产生含 39-43 个氨基酸残基的 $A\beta$,诱导神经元凋亡。PS1 作为 γ 分泌酶剪切 APP,是 $A\beta$ 形成过程中不可缺少的一环^[11]。

二苯乙烯苷具有抗衰老、神经保护、降血脂及抗动脉粥样硬化等作用。其作用机制是多靶点、多环节、多途径的。其中对脑保护作用的机制可能通过钙通道拮抗的作用、抗氧化的作用、胆碱酯酶抑制剂的作用、调节细胞凋亡和延缓衰老等途径而起作用^[12]。已有实验证明二苯乙烯苷具有较强的抗羟自由基和氧自由基作用,保护胆碱能神经、延缓神经细胞凋亡等作用。改善东莨菪碱、乙醇、D-半乳糖致痴呆动物模型的学习记忆能力,能提高 D-半乳糖致痴呆小鼠血清和脑组织 SOD, GSH-Px 活性和减低 MDA 含量,能保护 $A\beta$ 代谢产物对增殖和分化状态的神经肿瘤细胞 NG108-15 的神经毒性损伤作用^[13]。近年来大月龄 SAMP8 小鼠的研究表明,在 SAMP8 海马及大脑组织内有 β 淀粉样蛋白 ($A\beta$) 前体的过表达,近来还有报道在 SAMP8 小鼠脑组织中磷酸化的 tau 蛋白表达上调, SAMP8 小鼠已成为研究老年性痴呆的理想动物模型^[14]。

本研究通过 Real-time PCR 方法检测, TSG 作用于 SAMP8 小鼠后其海马组织中 APP 和 PS1 mRNA 表达的变化。结果显示:与阳性药石杉碱甲组比较, TSG 高剂量组 APP mRNA 相对定量表达显著减少 ($P < 0.05$),与 SAMP8 空白对照组比较, TSG 高、中、低各组 APP 和 PS1 mRNA 相对定量表达下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。说明 SAMP8 鼠脑组织 APP 和 PS1 基因的表达有明显的抑制。由于 PS1 可能具备与 APP 受体蛋白水解相关的 γ 分泌酶活性, PS1 与 APP 的相互作用过程可能就是它发挥 γ 分泌酶活性的过程。本实验灌胃给药何首乌提取物二苯乙烯苷使 APP, PS1 基因的表达下调,但其作用机制

需要进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 任汝仙. 老年性痴呆的药物治疗进展[J]. 中国药业, 2010, 19(12): 87.
- [2] 易健, 刘柏炎. 超微六味地黄汤对老年痴呆大鼠认知功能和脑组织碱性成纤维生长因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 139.
- [3] 贾新, 陈建宗. 二苯乙烯苷神经保护作用及其机制的研究进展[J]. 国际中医中药杂志, 2007, 29(6): 347.
- [4] 王春英. 何首乌中有效成分二苯乙烯苷的研究进展[J]. 河北医科大学学报, 2008, 29(1): 157.
- [5] 黄忠仕, 黎响, 黄健, 等. 二苯乙烯苷对 SAMP8 鼠脑组织氨基酸类神经递质的影响[J]. 右江民族医学院学报, 2010, 32(4): 469.
- [6] 张玥, 罗俊, 黄能会, 等. 灵芝三萜类化合物对 AD 大鼠学习记忆能力和 Ach 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 172.
- [7] Rosenberg R N. The molecular and basis of AD: the end of the beginning[J]. Neurology, 2000, 54: 2045.
- [8] Mattias Haglund, Raj Kalaria, Janet Y, et al. Differential deposition of amyloid β peptides in cerebral amyloid angiopathy associated with Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. Acta, 2006, 111: 430.
- [9] 何秀丽, 孟菲, 周妍妍, 等. 地黄饮子含药脑脊液对受损 PC12 细胞 β -淀粉样前体蛋白 mRNA 表达的干预[J]. 中医药信息, 2011, 28(4): 26.
- [10] 唐珂, 景乃禾. 老年痴呆症研究新进展一与 $A\beta$ 蛋白形成相关的两个蛋白水解酶的发现[J]. 生命的化学, 2001, 21(3): 195.
- [11] 梅品超, 楼蓉, 朱宁, 等. 早老蛋白功能研究进展[J]. 国外医学: 分子生物学分册, 2001, 23(4): 199.
- [12] 王巍, 王丹巧. 何首乌脑保护作用机理研究的进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(10): 955.
- [13] 黄忠仕, 谢海源, 张树球, 等. 含二苯乙烯苷大鼠血清对 NG108-15 痴呆模型细胞的影响[J]. 中国药房, 2009, 20(25): 1939.
- [14] 戴大鹏, 宋晓宁, 郑君德, 等. 快速老化小鼠 SAMP8 海马组织中基因表达谱的研究[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(6): 23.

[责任编辑 聂淑琴]