

神经妥乐平对阿尔茨海默病大鼠自噬的影响

赵仲艳¹, 刘 涛¹, 赵二义¹, 黄仕雄¹, 徐志育²

摘要 目的 探索神经妥乐平(NTP)对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠 Notch 信号通路及海马神经元自噬的影响。方法

将 45 只 SD 大鼠随机均分为对照组、模型组和 NTP 组。模型组和 NTP 组采用腹腔注射 D-半乳糖(100 mg/kg)联合海马区注射 β 淀粉样蛋白($A\beta_{1-42}$) (5 μ l) 建立 AD 大鼠模型, NTP 组腹腔注射 NTP(1.2 Nu/kg) 进行干预 2 周。采用 Morris 水迷宫检测各组大鼠的学习记忆能力;HE 染色观察大鼠的海马组织病理变化;采用 TUNEL 法检测海马组织神经元的凋亡;电镜观察海马组织神经元的自噬;Western blot 检测 Notch 信号通路、Caspase-3、Bcl-2、Bax、Beclin1 和 LC3-II/LC3-I 的表达。结果 与对照组比较,模型组和 NTP 组大鼠学习记忆能力明显下降($P < 0.05$),海马组织细胞的凋亡率明显升高($P < 0.05$),Bcl-2、Beclin-1、Notch1、NICD 和 Hes5 蛋白的表达明显下调,Caspase-3、Bax 表达明显上调($P < 0.05$);与模型组比较,NTP 组大鼠学习记忆能力明显升高($P < 0.05$),海马组织 Bcl-2、Beclin-1、LC3-II/LC3-I、Notch1、NICD 和 Hes5 的表达均明显上调($P < 0.05$),Caspase-3、Bax 蛋白的表达明显下调($P < 0.05$);HE

染色显示,NTP 组大鼠海马组织病理变化明显减轻。结论 NTP 可能通过调节 Notch 信号通路,诱导海马神经元自噬,提高 AD 大鼠学习记忆能力,保护脑组织损伤。

关键词 神经妥乐平;阿尔茨海默病;Notch 信号通路;自噬
中图分类号 R 341;R 749.16;R 745.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0362-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.008

阿尔茨海默病(alzheimer disease, AD)是一种进行性发展的神经系统退行性疾病,其发病机制尚不清楚。临床治疗主要以控制精神症状、改善患者认知功能为主^[1]。建立相应的动物模型来研究其发病机制,寻找更有效的药物对于 AD 的治疗具有重要意义。神经妥乐平(neurotropin, NTP)是牛痘疫苗接种家兔后,从其炎症皮肤中提取的一种小分子活性物质^[2]。NTP 可以调节机体的免疫系统、神经系统等,具有神经修复、抗感染、镇痛等作用,临床常用于腰痛症、肩周炎、变形性关节炎等的治疗^[3]。近年来,研究^[4]显示,NTP 可以调节机体的信号通路,保护神经元损伤。因此,该研究建立 AD 体外模型,旨在分析 NTP 对 AD 大鼠的作用及其具体作用机制,为新药物的开发提供新的思路。

2019-12-10 接收

基金项目:海南省科协青年科技英才创新计划项目(编号:QCXM201703)

作者单位:海南省人民医院¹ 神经内科、² 重症医学科,海口 570311

作者简介:赵仲艳,女,硕士,主治医师,责任作者,E-mail: zzyzhongyanzhao@163.com

isolated and cultured *in vitro* and identified by flow cytometry. Different concentrations of CGRP were administered, and CCK-8 method was used to detect the effect of CGRP on the proliferation of hPDLSCs. mRNA and protein expression of alkaline phosphatase (ALP), core binding factor 2 (RUNX2), osteocalcin (OCN) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by RT-PCR and Western blot. ALP staining and alizarin red staining and semi-quantitative analysis were performed on the 7th and 21st day of osteogenic induction. **Results** The cells isolated from human periodontal ligament tissue were identified to be consistent with the characteristics of mesenchymal stem cells. Compared with the 0 mol/L group, CGRP in the 10^{-8} mol/L group and 10^{-9} mol/L group promoted the proliferation of hPDLSCs ($P < 0.05$), and simultaneously increased the expression of ALP, RUNX2, OCN, VEGF gene and protein ($P < 0.05$). ALP and alizarin red staining and semi-quantitative analysis showed that CGRP in the 10^{-8} mol/L group and 10^{-9} mol/L group promoted the expression of ALP and formation of calcium nodules in osteogenic differentiation of hPDLSCs compared with the 0 mol/L group. **Conclusion** Specific concentrations of CGRP promote osteogenic differentiation and angiogenic ability of hPDLSCs *in vitro*.

Key words calcitonin gene-related peptide; human periodontal ligament stem cells; osteogenic differentiation; angiogenesis; dual regulation

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与试剂 SPF级SD雄性大鼠45只,体质量220~250 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号SCXK(京)2017-0022,饲养于本院动物中心实验室,保持室温恒定为25℃,模拟昼夜,自由摄食与饮水。HT-7700透射电镜购自日本日立公司;NTP购自日本Nippon Zoki Pharmaceutical,注册证号S20140085; β 淀粉样蛋白($A\beta_{1-42}$)购自美国Sigma公司;TUNEL检测试剂盒购自上海秉新生物科技有限公司;Notch1、NICD、Hes5、Caspase-3、Bcl-2、Bax、Beclin1、LC3-II、LC3-I单克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司; β -actin和辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔IgG购自DAKO公司。

1.2 动物造模及给药 大鼠预饲养1周后,随机均分为对照组、模型组和NTP组。模型组和NTP组每日上午腹腔注射D-半乳糖(100 mg/kg)^[5] 6周后,模型组和NTP组麻醉后,海马区缓慢注入5 μ l β 淀粉样蛋白($A\beta_{1-42}$),对照组注射等体积生理盐水。若造模后大鼠出现反应迟钝、动作迟缓等,则为造模成功^[6]。造模后,NTP组腹腔注射1 ml NTP溶液(1.2 Nu/kg);模型组和对照组腹腔注射等体积生理盐水,连续治疗2周。于治疗后处死大鼠,迅速断头取脑,无菌取大鼠海马组织。

1.3 各组大鼠行为学测试及脑组织病理学检查 造模前,将大鼠放入温水中自由游泳5 min,熟悉水迷宫^[6]。于术后第10天至术后第14天采用Morris水迷宫测试各组大鼠的行为学。定位航行实验:将大鼠从一个象限轻放入水,若120 s内大鼠能找到平台,记录其时间为逃避潜伏期,若120 s后仍未找到,则逃避潜伏期为120 s,连续试验4 d。空间探索实验:实验第5天将平台拿走,将大鼠从一个象限轻放入水,记录120 s内大鼠在原平台象限停留的时间及占总路程的百分比。

1.4 各组大鼠脑组织病理学检查 取大鼠海马组织,采用4%多聚甲醛固定,进行常规切片制作,进行HE染色,在光镜下观察组织的病理变化,每张切片随机取5个视野拍照。

1.5 各组海马组织CA1区神经元凋亡的观察 取大鼠海马组织,采用4%多聚甲醛固定,进行常规切片,采用TUNEL法进行染色,严格按照试剂盒说明操作,于荧光显微镜下观察细胞凋亡情况,根据阳性细胞数与总细胞数,计算出细胞凋亡率。采用

Western blot测定组织中Caspase-3、Bax和Bcl-2的表达量。

1.6 各组海马组织CA1区神经元自噬的观察 取大鼠海马组织,采用2.5%戊二醛和2%多聚甲醛的磷酸缓冲液的混合固定液固定,梯度酒精脱水、浸泡、包埋,醋酸铀-枸橼酸铅双染色,电镜下观察。采用Western blot测定组织中Beclin1、LC3-II和LC3-I的表达量。

1.7 Western blot检测海马组织Notch信号通路的表达 取海马区脑组织,匀浆,使用细胞裂解液严格按照蛋白裂解步骤提取总蛋白,采用BCA法进行蛋白定量,取50 ng总蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳,电转膜至PVDF膜,室温密封2 h,采用洗膜缓冲液洗膜并加一抗(稀释比例均为1:1 000)4℃孵育过夜,洗膜加二抗(稀释比例均为1:5 000)室温孵育2 h。再用ECL化学发光显示,选用 β -actin作为内参,凝胶图像处理系统分析对比条带强弱。

1.8 统计学处理 采用SPSS 17.0软件对所得数据进行分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对计量资料首先进行正态性检验,如果各组均满足正态性且两组间方差齐,采用单因素方差分析比较组间差异性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NTP对AD大鼠学习记忆能力的影响 Morris水迷宫试验结果显示:与对照组比较,模型组和NTP组大鼠逃避潜伏期在第2、3和4天明显增加($P < 0.05$),第5天在原象限停留的时间比和路程比明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,NTP组大鼠逃避潜伏期在第2、3和4天明显降低($P < 0.05$),第5天在原象限停留的时间比和路程比明显升高($P < 0.05$)。见图1。

2.2 NTP对AD大鼠海马CA1组织病理变化的影响 HE染色结果显示,对照组大鼠海马组织细胞结构完整,神经元细胞形态正常;模型组大鼠海马组织大量细胞出现核固缩呈三角形,胞质嗜伊红,正常细胞数减少;NTP组大鼠海马组织细胞形态趋于正常,仅见少量核固缩的细胞。见图2。

2.3 NTP对AD大鼠海马CA1组织凋亡的影响 TUNEL结果显示,与对照组比较,模型组和NTP组海马组织细胞的凋亡率明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,NTP组海马组织细胞的凋亡率明显降低($P < 0.05$)。Western blot实验显示,与对照组比较,模型组和NTP组海马组织Caspase-3、Bax蛋白

的表达明显上调($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白的表达明显下调($P < 0.05$); 与模型组比较, NTP 组海马组织

Caspase-3、Bax 蛋白的表达明显下调($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白的表达明显上调($P < 0.05$)。见图 3。

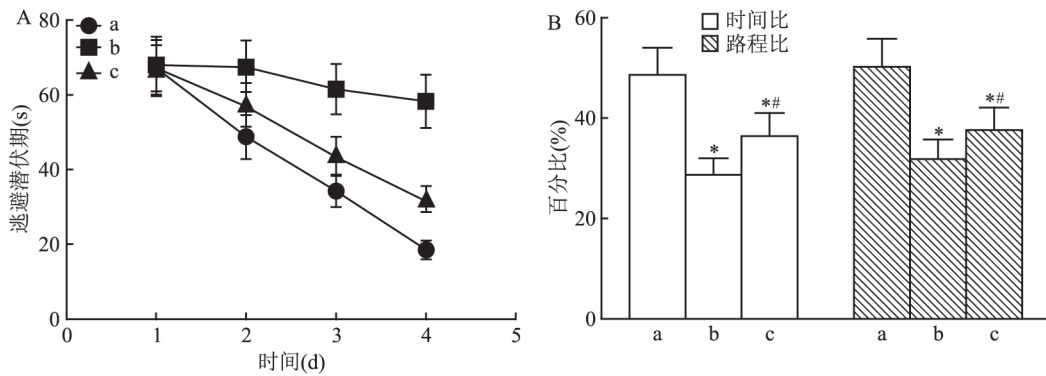


图1 NTP 对 AD 大鼠学习记忆能力的影响

A: Morris 水迷宫定位航行实验统计结果; B: 水迷宫空间探索实验统计结果; a: 对照组; b: 模型组; c: NTP 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

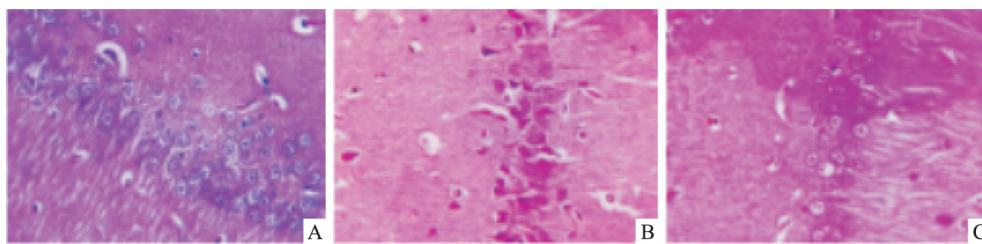


图2 NTP 对 AD 大鼠海马组织形态学影响 HE × 400

A: 对照组; B: 模型组; C: NTP 组

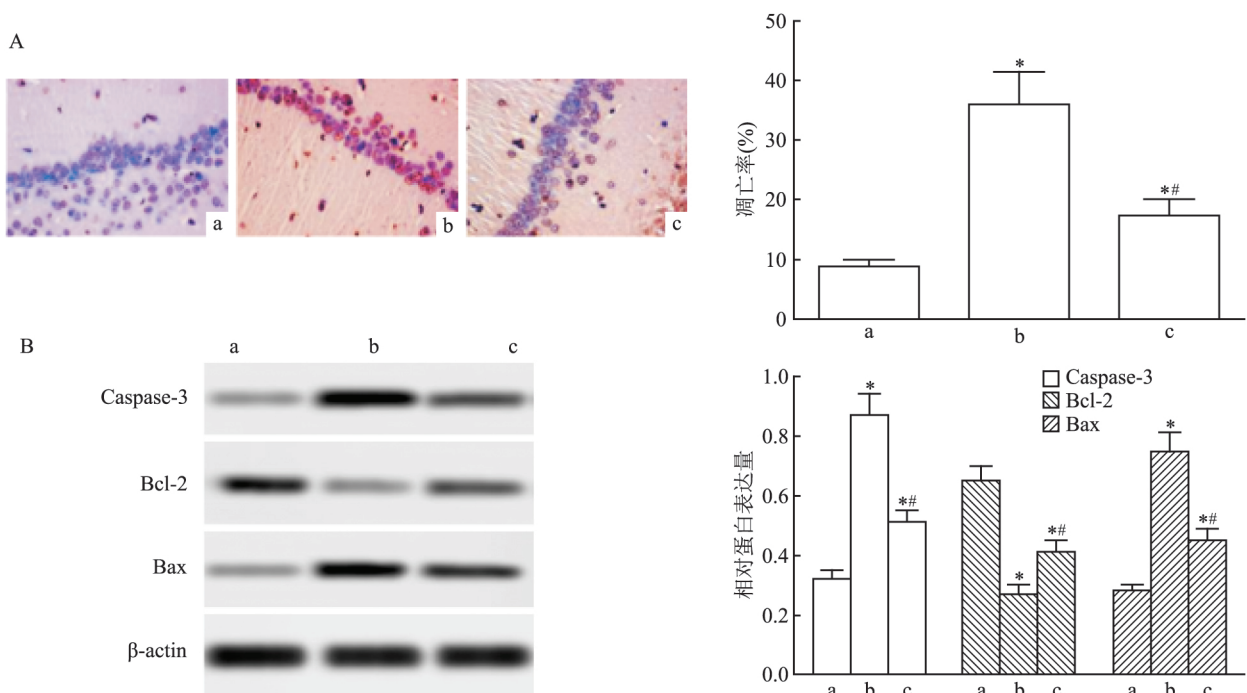


图3 NTP 对 AD 大鼠海马组织凋亡的影响

A: TUNEL 染色检测 AD 大鼠海马组织的凋亡 × 400; B: Western blot 检测蛋白的表达; a: 对照组; b: 模型组; c: NTP 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

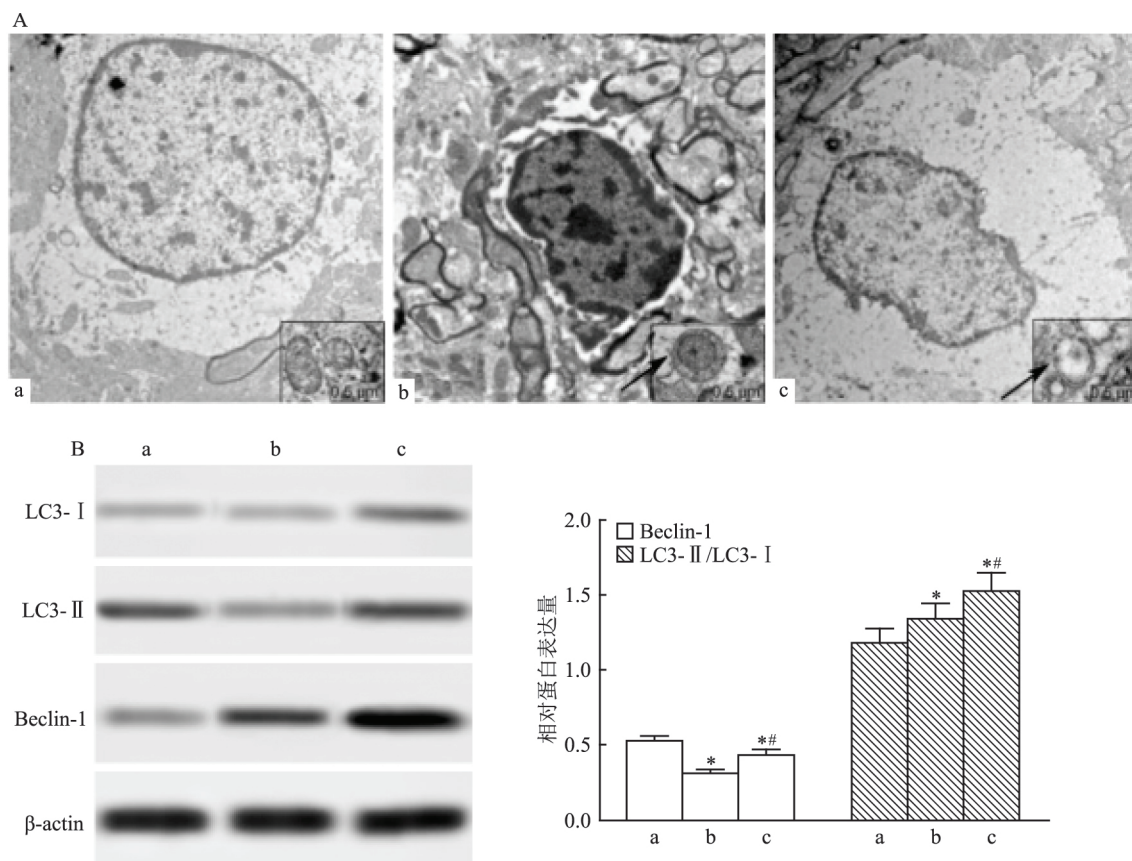


图4 NTP对AD大鼠海马CA1组织自噬的影响

A:电镜检测AD大鼠海马组织的自噬,箭头所指为凋亡小体 $\times 20\,000$;B:Western blot检测蛋白的表达;a:对照组;b:模型组;c:NTP组;与对照组比较:* $P < 0.05$;与模型组比较:# $P < 0.05$

2.4 NTP对AD大鼠海马CA1组织自噬的影响

电镜显示,对照组大鼠海马组织细胞结果完整,偶见个别的自噬体;模型组大鼠海马组织的自噬体数量明显增多;NTP组大鼠海马组织的自噬体数量明显减少。Western blot实验显示,与对照组比较,模型组海马组织Beclin-1蛋白的表达明显下调,LC3-II/LC3-I比例明显上调($P < 0.05$);与模型组比较,NTP组海马组织Beclin-1和LC3-II/LC3-I比例均明显上调($P < 0.05$)。见图4。

2.5 NTP对AD大鼠海马组织Notch信号通路表达的影响

与对照组比较,模型组和NTP组大鼠Notch1、NICD和Hes5蛋白的表达明显下调($P < 0.05$);与模型组比较,NTP组大鼠Notch1、NICD和Hes5蛋白的表达明显上调($P < 0.05$)。见图5。

3 讨论

AD是一种神经系统退行性疾病,腹腔注射D-半乳糖注射造模是一种最为简便有效的方式,海马

区注射 $A\beta$ 多肽是模拟AD病理损害的一种重要的方法^[7]。因此,本研究采用腹腔注射D-半乳糖联合海马区注射 $A\beta_{1-42}$ 建立大鼠AD模型。NTP干预可以显著缩短AD大鼠在Morris水迷宫试验中延长的逃避潜伏期。Morris水迷宫是常用的评估动物学习记忆能力的实验,包括陈述性记忆和空间参考记忆两个方面,提示NTP干预可以显著改善AD大鼠降低的学习记忆能力。本研究中,NTP干预可以明显改善AD大鼠海马组织的病理损伤。李波等^[8]的研究显示,NTP可以调节中枢神经系统,对于脑缺血、脑水肿、神经痛等具有良好的临床疗效,提示NTP可能通过调节机体的信号通路,改善AD大鼠的学习记忆障碍,减轻脑组织损伤。

本研究中,AD大鼠海马组织的溶酶体和自噬体数量明显增加,经NTP干预后溶酶体和自噬体数量明显减少。临床研究^[9]显示,AD患者存在异常增强的自噬作用,可以参与 $A\beta$ 的产生、转运和清除,参与AD的发生发展,本研究结果与之基本一

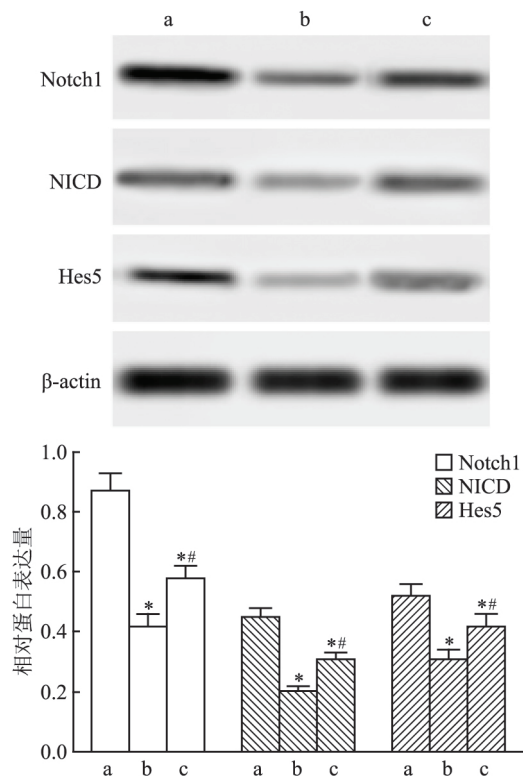


图5 各组大鼠海马组织 Notch 信号通路的表达

a:对照组;b:模型组;c:NTP组;与对照组比较:* $P < 0.05$;与模型组比较:# $P < 0.05$

致提示 NTP 可能通过调节自噬减轻 AD 的病理损伤。本研究中,NTP 干预可以下调 AD 大鼠海马组织中降低的 Beclin1 水平,上调 LC3-II/LC3-I 的比例。LC3 是一种典型的自噬体标志物,在自噬状态下,LC3-I 会转变为一种膜结合形式即 LC3-II,临床常用 LC3-II/LC3-I 比值来衡量自噬活性;Beclin1 是一个参与自噬和调控自噬的关键基因,与自噬吞噬小泡的形成初期有关^[10]。Pomilio et al^[11] 的研究显示,早期诱导自噬可以加快病理蛋白的清除,减轻 A β 的神经毒性,本研究结果与之基本一致,提示 NTP 可能通过诱导自噬,加快 A β 的清除,减轻 AD 大鼠的病理损伤。本研究中,NTP 干预可以明显下调凋亡蛋白 Caspase-3 和 Bax 的表达,上调 Bcl-2 的表达,降低 AD 大鼠升高的细胞凋亡率。Zhang et al^[12] 的研究显示,Beclin-1 是可以与 Bcl-2 等抗凋亡蛋白结合,抑制其抗凋亡作用,本研究结果与之基本一致,提示 NTP 可能通过调节机体的自噬作用,抑制神经元细胞凋亡,保护脑组织损伤。

Notch 信号通路是一种高度保守的信号通路,广泛的存在于脊椎动物和非脊椎动物中,可以参与多种中枢神经系统疾病的发生发展,包括 AD、脑缺

血损伤等。本研究中,AD 大鼠海马组织中 Notch1、NICD 和 Hes5 蛋白的表达显著下调,经 NTP 干预后,表达明显上调。Notch 1 是一种单次跨膜受体,与相邻配体结合可以活化 γ -分泌酶,促进 NICD 的释放并与核内的转录因子结合,增强下游靶基因 Hes 的表达,Hes5 是 Notch1 信号通路的关键靶基因,可以参与调控多个细胞的发育、增殖、凋亡等^[13]。Kong et al^[14] 的研究显示,AD 患者的海马组织中 Notch1 的表达水平显著高于正常组,其机制可能与 β 淀粉样前体蛋白、早老素等有关,本研究结果与之有所差异,可能是由于本研究采用 A β_{1-42} 建立大鼠 AD 模型,抑制 Notch1 的表达,引起神经退行性变化。张丽等^[15] 的研究显示,A β 可以抑制 Notch1 的表达,抑制神经干细胞的增殖分化,本研究结果与之基本一致,提示 NTP 干预可能通过激活 Notch 信号通路,促进神经干细胞分化,提高 AD 大鼠的学习记忆能力。

参考文献

- [1] Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, et al. A unique microglia type associated with restricting development of alzheimer's disease [J]. Cell, 2017, 169(7):1276-90.
- [2] Zheng Y, Fang W, Fan S, et al. Neurotrophin inhibits neuroinflammation via suppressing NF- κ B and MAPKs signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated BV2 cells [J]. J Pharmacol Sci, 2018, 136(4):242-8.
- [3] Nasu T, Murase S, Takeda-Uchimura Y, et al. Intramuscularly injected neurotrophin reduced muscular mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats [J]. Behav Pharmacol, 2018, 29(2 and 3-Spec Issue):261-9.
- [4] Ishikawa T, Yasuda S, Minoda S, et al. Neurotrophin[®] ameliorates chronic pain via induction of brain-derived neurotrophic factor [J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 35(2):231-41.
- [5] 周 鸿,霍利琴,张静泽,等.舒脑欣滴丸对 D-半乳糖致阿尔茨海默病早期模型大鼠的神经保护作用及机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(17):3074-8.
- [6] 王 凯,李 强,孙伟明,等.不同浓度 A β_{25-35} 蛋白模拟阿尔茨海默病模型学习记忆的差异 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(3):14-9.
- [7] 李 冬,田 寅,宫 宇,等.阿尔茨海默病大鼠模型建立及葛根素对大鼠空间学习记忆的影响 [J]. 重庆医学, 2016, 45(16):2180-1 2185.
- [8] 李 波,郭 星,孙 超,等.神经妥乐平药理作用及临床应用现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(8):1005-8.
- [9] Qin Y, Liu Y, Hao W, et al. Stimulation of TLR4 attenuates alzheimer's disease-related symptoms and pathology in tau-transgenic mice [J]. J Immunol, 2016, 197(8):3281-92.
- [10] Zhang Z H, Wu Q Y, Chen C, et al. Selenomethionine attenuates the amyloid- β level by both inhibiting amyloid- β production and

- modulating autophagy in Neuron-2a/A β PPswe Cells[J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 59(2):591–602.
- [11] Pomilio C, Pavia P, Gorojod R M, et al. Glial alterations from early to late stages in a model of Alzheimer's disease: Evidence of autophagy involvement in A β internalization[J]. *Hippocampus*, 2016, 26(2):194–210.
- [12] Zhang S, Gui X H, Huang L P, et al. Neuroprotective effects of β -asarone against 6-hydroxy dopamine-induced parkinsonism via JNK/Bcl-2/Beclin-1 pathway[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(1):83–94.
- [13] Schwanbeck R. The role of epigenetic mechanisms in notch signaling during development[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(5):969–81.
- [14] Kong Y, Wu J, Zhang D, et al. The role of miR-124 in drosophila alzheimer's disease model by targeting delta in notch signaling pathway[J]. *Curr Mol Med*, 2015, 15(10):980–9.
- [15] 张丽, 汪园园, 周静波, 等. 地黄饮子干预阿尔茨海默病患者者的疗效观察及作用机制探讨[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(11):4948–52.

Effects of neurotrophin on autophagy in Alzheimer's disease model rats

Zhao Zhongyan, Liu Tao, Zhao Eryi, et al

(Dept of Neurology, Hainan General Hospital, Haikou 570311)

Abstract Objective To explore the effects of neurotrophin (NTP) on Notch signaling pathway and hippocampus neurons autophagy in Alzheimer's disease (AD) model rats. **Methods** 45 SD rats were randomly divided into control group, model group and NTP group equally. Model group and NTP group were intraperitoneally injected with D-galactose (100 mg/kg) and hippocampus injected with A β_{1-42} (5 μ l) to establish AD rat models. NTP group was intraperitoneally injected with NTP (1.2 Nu/kg) for 2 weeks intervention. The learning and memory ability of rats in each group was detected by Morris water maze. The pathological changes of hippocampus tissues were observed by HE staining. The apoptosis of hippocampus neurons was detected by TUNEL method. The autophagy of hippocampus neurons was observed by electron microscope. Western blot was performed to detect Notch signaling pathway and the expressions of Caspase-3, Bcl-2, Bax, Beclin1 and LC3-II/LC3-I. **Results** Compared with the control group, the learning and memory ability of the model group and NTP group significantly decreased ($P < 0.05$), while apoptosis rate of hippocampus tissue cells significantly increased ($P < 0.05$). The expressions of Bcl-2, Beclin-1, Notch1, NICD and Hes5 proteins were significantly down-regulated, while the expressions of Caspase-3 and Bax were significantly up-regulated ($P < 0.05$). Compared with the model group, learning and memory ability of the NTP group significantly increased ($P < 0.05$), the expressions of Bcl-2, Beclin-1, LC3-II/LC3-I, Notch1, NICD and Hes5 in hippocampus tissues were significantly up-regulated ($P < 0.05$), while the expressions of Caspase-3 and Bax protein were significantly down-regulated ($P < 0.05$). HE staining showed that pathological changes in hippocampus tissues of rats in the NTP group were significantly reduced. **Conclusion** NTP can induce hippocampus neurons autophagy, improve learning and memory ability of AD rats and protect brain tissue damage by regulating Notch signaling pathway.

Key words neurotrophin; Alzheimer's disease; Notch signaling pathway; autophagy