

黄芩苷抑制 beta 淀粉样蛋白诱导的海马 COX-2 蛋白表达

李振华¹ 承欧梅¹ 蒋青松² 晏勇¹ 晏宁³ 马勤泰¹ 韩宇¹

摘要 目的 探讨中药单体黄芩苷对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)大鼠的脑保护作用及其可能的作用机制。方法 将 36 只健康雄性 Wistar 大鼠随机分成对照组、AD 组、黄芩苷组,每组 12 只。AD 组及黄芩苷组采用双侧海马内注射 beta 淀粉样蛋白(Aβ1-40),建立 AD 大鼠模型。对照组采用相同方法进行假手术,双侧海马内仅注射等量的 0.9% 氯化钠溶液。黄芩苷组术前、术后连续腹腔注射黄芩苷[40 mg/(kg·d)],每天 1 次,连续 7 天。AD 组和对照组也经相同时间相同步骤给予相同体积的缓冲液腹腔注射。采用免疫印迹法测定海马环氧合酶-2(COX-2)的表达,T 迷宫实验观察大鼠的空间学习记忆能力,HE 染色观察神经元组织学改变。结果 T 迷宫实验结果显示:AD 组[(28.33 ± 7.50)%]和黄芩苷组[(38.33 ± 7.50)%]大鼠自发交替选择率减小,与对照组[(61.67 ± 7.50)%]比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),两组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。HE 染色结果显示:与黄芩苷组比较,AD 组皮层、海马神经元变性坏死改变更明显。免疫印迹法分析显示:AD 组 COX-2 表达明显增高,黄芩苷组 COX-2 表达明显降低($P < 0.05$)。结论 黄芩苷能减轻 beta 淀粉样蛋白所致的脑损伤,可能与抑制 COX-2 的表达有关。

关键词 黄芩苷;阿尔茨海默病;beta 淀粉样蛋白;环氧合酶-2

Baicalin Suppresses Beta-amyloid Protein Induced Hippocampal Cyclooxygenase-2 Expression Li Zhen-hua, CHENG Ou-mei, JIANG Qing-song, et al *Department of Neurology, First Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing (400016)*

ABSTRACT Objective To study the brain protection of baicalin on rats with Alzheimer's disease (AD) and its probable mechanism of action. Methods Thirty-six male healthy Wistar rats were randomly divided into the sham-operative group, the AD group, and the baicalin group, twelve in each. β -amyloid protein 1-40 was injected to the bilateral hippocampus of rats in the AD group and the baicalin group to establish the AD rat model. The sham operation was performed to rats of the sham-operative group in the same way. Equal volume of 0.9% sodium chloride solution was injected to the bilateral hippocampus of rats in the sham-operative group. Baicalin was intraperitoneally injected at the daily dose of 40 mg/kg to rats in the baicalin group before and after operation, once daily for 7 successive days. Equal volume of buffer solution was intraperitoneally injected to rats in the sham-operative group and the AD group in the same procedures at the same time points. The expression of hippocampal cyclooxygenase-2 (COX-2) was determined by Western blot. The spacial learning memory capacities was observed using T-morris test. Histological changes were observed using hematoxylin-eosin (HE) staining. Results Results of the T-morris test showed the spontaneous alternation selective ratio decreased in the AD group (28.33% ± 7.50%) and the baicalin group (38.33% ± 7.50%) (both $P < 0.05$) when compared with the sham-operative group (61.67% ± 7.50%). There was significant difference between the AD group and the baicalin group ($P < 0.05$). Results of HE staining showed degeneration and necrosis of cortical and hippocampal neurons in the AD group and the baicalin group. Changes in the AD group were more obvious. Results of Western blot showed the expression of hippocampal cyclooxygenase (COX-2) obviously increased in the AD group, while it obviously decreased in the baicalin group ($P < 0.05$). Conclusion Baicalin could alleviate beta-amyloid protein induced brain injury, which might be associated with its inhibition on the COX-2 expression.

KEYWORDS baicalin; Alzheimer's disease; beta-amyloid protein; cyclooxygenase-2

基金项目:重庆市卫生局中医药科研项目资助(No. 2005-B-13)

作者单位:1. 重庆医科大学附属第一医院神经内科(重庆 400016); 2. 重庆医科大学基础医学院药学院(重庆 400016); 3. 重庆医科大学附属第二医院神经内科(重庆 400010)

通讯作者:承欧梅, Tel: 023-89012903, E-mail: chengoumei@yahoo.com.cn

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最常见的痴呆类型之一, 其病因、发病机制不明, 目前认为 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid, A β) 在大脑皮质和海马内沉积是其特征性的病理改变。大量的研究提示 A β 引起的炎性反应可能是导致 AD 神经元损伤的重要原因^[1]。近年有关中药及其提取物防治 AD 的研究日益受到重视。一些抑制或阻断中枢神经系统免疫炎症反应的中药在 AD 的防治中具有重要作用。现代药理学研究发现, 中药有效单体黄芩苷 (baicalin) 具有抗氧化、抗炎、免疫调节和抗肿瘤作用^[2]。黄芩苷对多种脑损伤模型 (如局灶性缺血模型) 具有脑保护作用^[3], 但其机制仍不清楚。环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 是重要的炎症标志物, 可能直接参与了细胞的损伤过程。本实验拟研究黄芩苷对 AD 的脑保护作用, 以及其对 A β 诱导的海马神经元 COX-2 表达的影响。

材料与方 法

1 动物与分组 健康雄性 Wistar 大鼠 36 只, 体重 (300 ± 18) g, 由重庆医科大学实验动物中心提供。饲养条件为每天光照 14 h, 黑暗 10 h, 室温 (20 ± 2) °C, 水、标准饲料任意摄取。将 36 只大鼠按随机数字表法分为黄芩苷组、AD 组和对照组, 每组 12 只。黄芩苷组和 AD 组大鼠双侧海马注射 β 淀粉样蛋白 (A β 1-40), 对照组大鼠经相同操作步骤行假手术, 双侧海马内仅注射等量的 0.9% 氯化钠溶液。

2 试剂、药物与仪器 A β 1-40 (AnaSpec 公司)、黄芩苷 (西安飞达生物技术有限公司, 纯度为 98%)、兔抗鼠 COX-2 多克隆抗体 (美国 Cayman 化学公司)、 β -actin 一抗、二抗 (Santa Cruz 公司)、脑立体定向仪 (SN22 型, 日本)、ChemiDOC XRS System 化学发光仪 (Bio-rad, 美国)。

3 AD 模型制备 参考文献 [4, 5]。将 1 mg A β 1-40 溶于 100 μ L 无菌 0.9% 氯化钠溶液中, 制成 10 μ g/ μ L 悬浮液, 置于 37 °C 恒温箱中孵育 7 天, 使其变为聚集状态的 A β 1-40, 置于 4 °C 冰箱备用。10% 水合氯醛 400 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠后, 将大鼠固定于脑立体定向仪上。参照大鼠脑立体定位图谱, 切开分离头皮, 充分暴露颅骨, 以前囟为零点, 前后轴 (anteroposterior, AP) 3.15 mm, 中线两侧 (mediolateral, ML) 2.10 mm, 背腹轴 (dorsoventral, DV) 3.10 mm 作为穿刺点, 颅骨钻孔, 钻头直径 1 mm, 深度 1 mm 达硬膜外。每侧海马用 1 μ L 平头微量进样器抽取 0.5 μ L (5 μ g)

A β 悬浮液, 进针深度 3 mm, 达海马 CA1 区, 缓慢注射 5 min, 留针 15 min。

4 给药方法 配制 PBS 缓冲液 (0.2 mol/L NaH₂PO₄ 250 mL 和 0.2 mol/L NaCl 118 mL), 调 pH 值为 6.8。用缓冲液将黄芩苷配成 1.2% 浓度。黄芩苷组按 40 mg/(kg · d) 经腹腔注射, 首次给药后当天行造模手术, 术后每天腹腔内注射给药 1 次, 连续 7 天。AD 组和对照组也经相同时间相同步骤给药, 给予相同体积的缓冲液腹腔注射。

5 T 迷宫实验 参考文献 [6]。术后第 7 天采用 T 迷宫实验观察大鼠的空间学习能力, 每组选取大鼠 6 只, 在自制的横臂长为 46 cm, 纵臂为 40 cm, 道宽、高各为 10 cm 的 T 迷宫内进行测试。实验开始前, 先将大鼠放在纵臂内适应 1 min, 允许大鼠在 T 迷宫内自由活动, 然后将大鼠取出, 重新放入纵臂内, 当大鼠选择向任意一侧横臂活动时, 实验结束, 记录选择的方向, 重复 10 次。当大鼠选择的臂方向发生改变时, 如上次选择左臂, 下次选择右臂, 计自发交替选择次数为 1 次。如相邻两次均选择同侧横臂, 计自发交替选择次数为 0 次, 计算大鼠自发交替选择次数的百分比 (自发交替选择率)。

6 神经元病理检查 大鼠 T 迷宫实验结束后, 10% 水合氯醛再次麻醉大鼠, 先经心灌注 PBS 后, 再灌注 4% 多聚甲醛内固定, 断头完整取出脑组织, 浸泡在 4% 多聚甲醛外固定 48 h。经浸洗、乙醇梯度脱水、透明、浸蜡、包埋、切片 (8 μ m)、脱蜡、复水等步骤后, 取切片进行常规 HE 染色。

7 免疫印迹 (Western blot) 分析 术后第 3 天, 10% 水合氯醛麻醉动物后, 冰 PBS 经心脏灌注后, 断头取脑, 迅速在冰上分离出双侧海马组织, 放入液氮内速冻后, 置于 -80 °C 保存备用。解冻后用全细胞裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, 用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。上样蛋白量为 30 μ g, 10% 的 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白, 80 V 恒压 80 min 将凝胶上蛋白转移至聚偏氟乙烯膜, 50 g/L 牛奶封闭 2 h, 分别加入 COX-2 (1:500)、 β -actin (1:2 000) 一抗 4 °C 过夜, 洗涤后加相对应二抗 (1:2 000), 化学发光仪发光, X 射线胶片上成像。采用光密度值 (optical density, OD) 对 Western 印记显色区带的强度进行定量分析, COX-2 显色区的相对强度 = (COX-2: 相对应的 β -actin) / (对照组 COX-2: 相对应的 β -actin 后的均值)。

8 统计学方法 数据用 SIGMA Plot10 软件进行统计分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组空间学习记忆能力比较(表 1) 术后第 7 天,对照组大鼠表现出较强的空间学习记忆能力。AD 组和黄芩苷组大鼠反应较迟钝,自发交替选择率较对照组减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$),其中 AD 组下降明显,与黄芩苷组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2 各组海马神经元病理改变比较(图 1) 术后第 7 天,光镜下 HE 染色显示对照组大鼠皮层、海马神经元排列规则整齐,形态完整,呈圆形,胞膜、胞核清晰。AD 大鼠组皮层、海马可见大量的形态呈三角形、彗星状,核浓染、核固缩的变性细胞,以 CA1 区、皮层改变更明显,病变累及到 CA2、CA3、齿状核。黄芩苷组与 AD 组比较,海马神经元的损伤明显减轻,但仍可见核浓染、核固缩的细胞。

3 各组 COX-2 表达及相对 OD 强度比较(表 1,

图 2) 术后第 3 天,AD 组 OD 值明显增高,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);黄芩苷组 OD 值低于 AD 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示黄芩苷可抑制 $A\beta$ 诱导的 COX-2 的表达。

表 1 各组自发交替选择率、COX-2 相对 OD 强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	自发交替选择率(%)	相对 OD 值(倍)
对照	12	61.67 ± 7.50	1.00 ± 0.20
AD	12	28.33 ± 7.50*	2.73 ± 0.40*
黄芩苷	12	38.33 ± 7.50* [△]	1.67 ± 0.20 [△]

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 AD 组比较,[△] $P < 0.05$

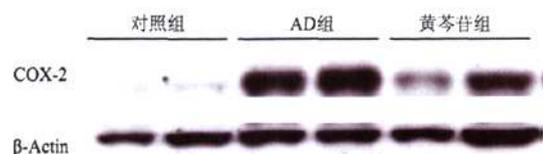
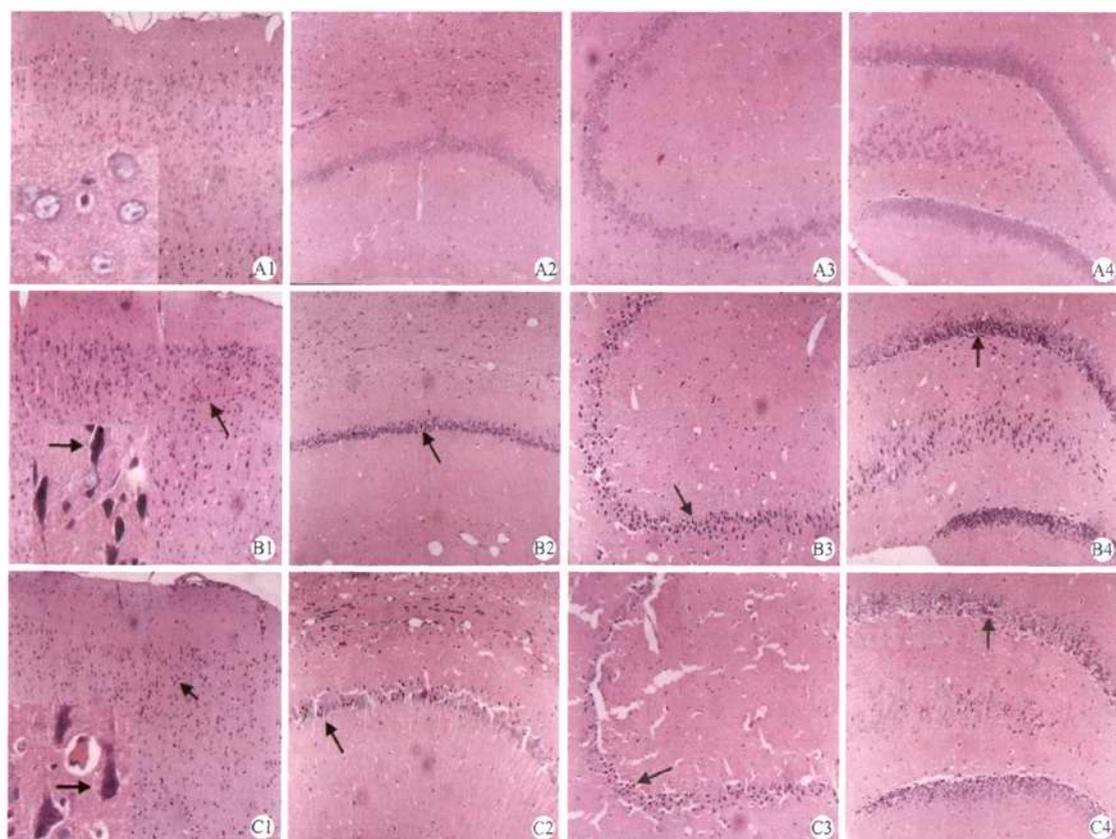


图 2 各组 COX-2 免疫印迹结果



注:A1—4、B1—4、C1—4 分别为对照组、AD 组、黄芩苷组的神经元病理改变,1 表示大脑皮层,2 表示海马 CA1 区,3 表示海马 CA2~3 区,4 表示海马齿状回;A1—C1 左下图小图表示放大的皮层神经元细胞($\times 400$),箭头表示变性坏死的细胞

图 1 各组神经元病理改变比较(HE 染色, $\times 100$)

讨 论

越来越多的证据显示,由于遗传性基因突变等原因使脑内产生 A β 沉积和神经原纤维缠结(NFT)等抗原性物质引起的过度炎症反应在 AD 病程中占有重要位置^[1]。AD 患者发病早期已显示出多种炎性标志物的升高。而 A β 是能直接诱导脑内炎性反应的刺激物^[7-9]。

COX 是花生四烯酸代谢的关键酶之一。COX-2 是炎性、缺血等损伤反应中导致神经元死亡的关键酶,是炎性反应的重要标志物。AD 患者大脑 COX-2 和其上游基因 PPAR γ 的蛋白表达水平上升,与 A β 的水平和老年斑密度呈正相关。临床试验显示非类固醇性抗炎药(NSAIDs)或 COX-2 抑制剂通过抑制 COX 可以减缓 AD 的病理演变过程,有延迟 AD 发病的作用。长期服用 NSAIDs 时 AD 发病相对危险系数明显降低^[10-15]。因此,通过抑制 COX-2 的表达,理论上能减轻 A β 的细胞毒性作用。

黄芩苷是从黄芩根中提取分离出来的一种黄酮类化合物,其化学名为 5,6,7 三羟黄酮。中药黄芩具有清热、解毒、抗炎等作用。新近报道黄芩苷对缺血性脑损伤等具有神经保护作用,但其作用机制不清楚^[3]。

本实验选用 A β 1-40 注入大鼠双侧海马,模拟 AD 的 A β 毒性反应,研究了中药单体黄芩苷对其的影响。结果发现海马内注入 A β 1-40 后 HE 染色显示皮层、海马形态正常的神经元数目减少,部分神经细胞出现形态异常、细胞核深染、核固缩等表现。同时 T 迷宫实验发现大鼠学习记忆能力明显下降,与海马神经元的大量减少一致。COX-2 在 A β 注入大鼠海马后大量表达,其高表达量亦与神经元的损伤程度一致,提示 COX-2 直接参与了 A β 所致的脑损伤的病理过程。黄芩苷组大鼠也出现了空间学习记忆力减退和皮层、海马神经元的变性,但程度较 AD 组轻,同时海马 COX-2 表达也下降。

本研究结果证实黄芩苷类中药有效单体对 A β 诱发的脑损伤有保护作用,其机制可能与抑制炎症介质 COX-2 的表达有关,为发现更安全有效治疗 AD 的新方法提供了更广阔的思路,也为更深入认识中药黄芩提供了实验依据。

参 考 文 献

[1] Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease[J]. N Engl J Med, 2010, 362(4): 329 - 344.
 [2] 迟戈夫,丁丽,常丽敏. 目前国内黄芩药理研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版), 2005, 20(2):207 - 209.

Chi GF, Ding L, Chang LM. The present domestic pharmacological advance on *Scutellaria Baicalensis*[J]. J Inner Mongolia Univ Natl, 2005, 20(2), 207 - 209.
 [3] Zhang Z, Wu R, Li P, et al. Baicalin administration is effective in positive regulation of twenty-four ischemia/reperfusion-related proteins identified by a proteomic study[J]. Neurochem Int, 2009, 54(8): 488 - 96.
 [4] 林煜,陈俊抛,刘凌娟,等. 海马注射 β -淀粉样蛋白对白细胞介素-1 β 及神经组织蛋白表达的影响[J]. 中华神经科杂志, 2000, 33(4): 213 - 215.
 Lin Y, Chen JP, Liu LJ, et al. Effect of hippocampal injection of β -amyloid on interleukin-1 β and nerve tissue protein expressions[J]. Chin J Neurol, 2000, 33(4): 213 - 215.
 [5] Giovannelli L, Casamenti F, Scall C, et al. Differential effects of amyloid peptides β -(1-40) and β -(25-35) injection into the rat nucleus basalis[J]. Neuroscience, 1995, 66(4): 781 - 792.
 [6] Cheng O, Ostrowski R. P, Liu W, et al. Activation of liver X receptor reduces global ischemic brain injury by reduction of nuclear factor- κ B[J]. Neuroscience, 2010, 166(4): 1101 - 1109.
 [7] Ciaramella A, Bizzi F, Salani F, et al. Increased pro-inflammatory response by dendritic cells from patients with Alzheimer's disease[J]. J Alzheimer's Dis, 2010, 19(2): 559 - 572.
 [8] Vehmas A, Kawas C, Stewart W, et al. Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2003, 24(2): 321 - 331.
 [9] Rainero I, Bo M, Ferrero M, et al. Association between the interleukin-1alpha gene and Alzheimer's disease: a Meta-analysis [J]. Neurobiol Aging, 2004, 25(10): 1293 - 1298.
 [10] Hoozemans JJ, Veerhuis R, Janssen I, et al. The role of cyclooxygenase 1 and 2 activity in prostaglandin E₂ secretion by cultured human adult microglia; implications for Alzheimer's disease[J]. Brain Res, 2002, 951(2):218 - 226.
 [11] Cakala M, Malik AR, Strosznajder JB. Inhibitor of cyclooxygenase-2 protects against amyloid beta peptide-evoked memory impairment in mice[J]. Pharmacol Rep, 2007, 59(2):164 - 172.
 [12] Kotilinek LA, Westerman MA, Wang Q, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition improves amyloid-beta-mediated suppression of memory and synaptic plasticity [J]. Brain, 2008, 131(3):651 - 664.
 [13] Liang X, Wang Q, Hand T, et al. Deletion of the prostaglandin E₂ EP2 receptor reduces oxidative damage and amyloid burden in a model of Alzheimer's disease[J]. J Neurosci, 2005, 25(44):10180 - 10187.
 [14] Ferencik M, Novak M, Rovinsky J, et al. Alzheimer's disease, inflammation and non-steroidal anti-inflammatory drugs[J]. Bratisl Lek Listy, 2001, 102(3):123 - 32.
 [15] Pasinetti GM. Cyclooxygenase as a target for the anti-amyloidogenic activities of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease[J]. Neurosignals, 2002, 11(5): 293 - 297.

(收稿:2010-07-25 修回:2011-01-02)