

赤芍总苷对 D-半乳糖诱导衰老大鼠脑组织 TOLL 受体和 IL-33 的实验研究

张海燕¹ 刘忠锦² 陈志伟¹

摘要 目的 观察赤芍总苷(total paeony glucosides, TPGs)对 D-半乳糖(D-galactopyranos, D-gal)诱导衰老大鼠脑组织 TOLL 受体(Toll like receptors, TLR 4)mRNA 和白细胞介素-33(interleukin-33, IL-33)mRNA 的影响。**方法** 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组,即空白对照组,模型组,TPG 高、中、低剂量组,每组 10 只。空白对照组给予皮下注射等容量生理盐水,其余 40 只均皮下注射 10% D-gal 0.125 mL/g,每天 1 次,连续 8 周,诱导衰老大鼠模型。从制备模型的第 5 周开始,对 TPG 高、中、低剂量组大鼠腹腔注射 D-gal 同时,分别按 300、150 和 75 mg/kg 的剂量给予 TPG 灌胃,每天 1 次,连续 4 周。模型组和空白对照组给予灌胃等容量的生理盐水,每天 1 次。采用 Morris 水迷宫测定法检测学习记忆能力,RT-PCR 检测大鼠脑组织中 TLR4 mRNA 和 IL-33 mRNA 变化。**结果** 与空白对照组比较,模型组大鼠学习记忆能力下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠治疗后学习记忆能力明显增强,并且存在剂量依赖性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与空白对照组比较,模型组大鼠 TLR4 mRNA 和 IL-33 mRNA 含量明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠用药后 TLR4 mRNA 和 IL-33 mRNA 明显下降,并且存在剂量依赖性,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** TPG 通过调节 TLR4 mRNA 和 IL-33 mRNA 的变化,改善 D-gal 诱导衰老大鼠学习记忆能力。

关键词 赤芍总苷;衰老大鼠;TOLL 受体;白细胞介素-33

Effects of Total Paeony Glucosides on mRNA Expressions of Toll Receptors and Interleukin-33 in the Brain Tissue of D-galactose Induced Aging Rats: an Experimental Research ZHANG Hai-yan¹, LIU Zhong-jin², and CHEN Zhi-wei¹ 1 Department of Histology and Embryology, Qiqihar Medical College, Heilongjiang (161006), China; 2 First Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Heilongjiang (161006), China

ABSTRACT Objective To investigate effects of total paeony glucosides (TPGs) on the expressions of Toll receptors (TLR4) and interleukin-33 (IL-33) in the brain tissue of D-galactose-induced aging rats. **Methods** Fifty SD rats were randomly divided into 5 groups, i.e., the blank control group, the model group, the high dose TPG group, the middle dose TPG group, and the low dose TPG group, 10 in each group. Equal volume of normal saline was subcutaneously injected to rats in the blank control group, while 10% D-galactose was subcutaneously injected to rats in the rest groups at 0.125 mL/g, once a day for 8 successive weeks to induce the aging rat model. TPG was administered at 300 mg/kg, 150 mg/kg, and 75 mg/kg to rats in the high, middle, and low dose TPG groups while injecting D-galactose from the 5th week of model preparation, once daily for 4 successive weeks. Equal volume of normal saline was administered to rats in the blank control group and the model group, once daily. The capability for learning and memory was detected using Morris water. The mRNA expressions of TLR4 and IL-33 in the brain tissue were detected using ELISA. **Results** Compared with the blank control group, the capability for learning and memory decreased in the model group with statistical difference ($P < 0.05$). Compared with the model group, the capability for learning and memory was obviously improved in all the medicated groups in a dose-dependent manner, showing statistical difference ($P < 0.05$). Compared with the blank control

基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目(No. 12521652)

作者单位:1.齐齐哈尔医学院组织学与胚胎学教研室(黑龙江齐齐哈尔 161006);2.齐齐哈尔医学院第一附属医院(黑龙江齐齐哈尔 161006)

通讯作者:陈志伟, Tel: 0452-2663167, E-mail: czwzp@sina.com

group, mRNA expressions of TLR4 and IL - 33 in the brain tissue obviously increased after medication in the model group, showing statistical difference ($P < 0.05$). Compared with the model group, mRNA expressions of TLR4 and IL-33 in the brain tissue obviously decreased after medication in all the medicated groups in a dose-dependent manner, showing statistical difference ($P < 0.05$). Conclusion TPGs improved D-galactose induced aging rats' capability for learning and memory through regulating changes of TLR4 and IL-33 expressions.

KEYWORDS total paeony glycoside; aging rat; TOLL receptor; interleukin-33

赤芍总苷(total paeony glucosides, TPGs)为单萜化合物,由芍药苷、羟基芍药苷、芍药内酯苷、芍药新苷、芍药吉酮、苯甲酰芍药苷等组成^[1]。赤芍水提取物有抑制血小板聚集,明显改善微循环及加强心肌收缩力的功能。目前,国内对赤芍的研究主要是集中在活血方面,对其有效成分在神经行为学方面的药理研究报道少见^[2]。笔者前期进行了 TPG 免疫调节及细胞凋亡机制的研究^[3,4],在此基础上为进一步探讨 TPG 对脑组织中神经元凋亡的影响及衰老大鼠学习记忆的机制,笔者观察了 TPG 对 D-半乳糖(D-galactopyranos, D-gal)所致记忆障碍模型大鼠学习记忆能力的变化以及 TOLL 受体(Toll like receptors, TLR 4)和白细胞介素-33(interleukin-33, IL-33)变化的影响,现报道如下。

材料与方法

1 动物 SD 雄性大鼠 50 只,体重 180 ~ 200 g,黑龙江中医药大学实验动物中心提供,合格证号:2010005。

2 药品与试剂 TPG 由西安奥晶科技发展有限公司提供,批号:060417,纯度 >95%;TLR4、IL-33 RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,引物合成由北京三博生物技术公司提供。9600 型 PCR 扩增仪(美国 PE 公司),D-gal(国药集团化学试剂有限公司,生产批号:F20061025),戊巴比妥钠(上海化学试剂采购供应站分装厂,批号:10-01-22)等为市售品。自动水迷宫记录仪为中国医学科学院药物研究所产品。

3 动物分组和造模 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组,即空白对照组,模型组,TPG 高、中、低剂量组,每组 10 只。空白对照组给予皮下注射等容量生理盐水,其余 40 只均皮下注射 10% D-gal 0.125 mL/g,每天 1 次,连续 8 周,诱导衰老大鼠模型^[5]。从制备模型的第 5 周开始,对 TPG 高、中、低剂量组大鼠腹腔注射 D-gal 同时,分别按 300、150、75 mg/kg 的剂量给予 TPG 灌胃,每天 1 次,连续 4 周。模型组和空白对照组给予灌胃等容量的生理盐水,每天 1 次。

4 观察指标及检测方法

4.1 衰老大鼠学习记忆能力检测 实验结束前 2 天,使用水迷宫自动记录仪,进行空间分辨记忆训练,24 h 后进行测试。让大鼠自由游泳 2 min 以适应周围环境。每天训练 4 次,每次随机选择 1 个人水点,将大鼠面向池壁放入水中,观察并记录大鼠寻找并爬上平台的路线图及所需时间(潜伏期)。4 次训练大鼠分别从 4 个不同的人水点入水,如果大鼠在 120 s 内未找到平台,需将其引至平台。这时潜伏期记为 120 s,每次训练间隔 60 s,以 4 次的平均时间及路程作为训练成绩。记录到达率、错误次数、到达时间^[6]。

4.2 TLR4 mRNA 及 IL-33 mRNA 检测 治疗结束后第 2 天,每组随机选取 10 只大鼠用于取脑称重,按 1 g 脑组织加入 3 mL 磷酸缓冲液(甲液:取枸橼酸 21 g 加水使溶解成 1 000 mL,置冰箱内保存。乙液:取磷酸氢二钠 71.63 g,加水使溶解成 1 000 mL。取上述甲液 61.45 mL 与乙液 38.55 mL,混合,摇匀),将脑组织匀浆密封样品后置 -80 ℃ 低温保存,实验结束,取脑匀浆样品。按试剂盒说明书提取脑组织总 RNA,根据文献并用计算机软件设计。引物序列为:TLR4 上游引物:5'-GTCCATCGGTTGATCTTGGA-3',下游引物:5'-AGAATTGCCAGCCATTTTAA-3',扩增片段长度 521 bp。IL-33 上游引物 5'-CCCAAGCTTATGAGACCTAGAATGAAGTAT-3',下游引物物:5'-GCTCTAGATTAGATTTTCGAG AGCTTAAAC-3'。扩增片段长度 550 bp。以 β -actin 作为内参,上游引物:5'-ACCACAGCTGAGAGGAAATCG-3',下游引物:5'-AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG-3',扩增片段长度 300 bp^[7]。PCR 反应体系 25 μ L,反应条件为:94 ℃ 变性 5 min 后,按 93 ℃ 30 s,52 ℃ 40 s,72 ℃ 60 s,扩增 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。取各样本 PCR 产物 5 μ L 和溴酚蓝载样缓冲液 1 μ L,加入 1.5% 琼脂糖凝胶样品孔中,70 V 恒压电泳 20 min。所得结果用紫外光下对凝胶进行拍照,底片光密度扫描, β -actin mRNA:95 ℃ 30 s,58 ℃ 2 min,72 ℃ 2 min 延伸,35 个循环。PCR 产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶,加

入 10 μ L 扩增物,70 V,20 min 电泳分离,紫外光下对凝胶进行拍照,底片光密度扫描,计算 TLR4 mRNA、IL-33 mRNA 条带灰度值与 β -actin 条带灰度值的比值反映 TLR4 mRNA、IL-33 mRNA 表达水平。

5 统计学方法 所有数据采用 SPSS 17.0 统计学软件包进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用 χ^2 检验,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般情况 造模后模型组大鼠体重明显减少,反应迟钝,行动缓慢,毛发干枯发黄、缺乏光泽,双颊脱毛明显,尾部出现色素。对照组则无明显变化。

2 各组大鼠学习记忆能力比较(表 1) 与空白对照组比较,模型组大鼠学习记忆能力明显下降,到达率降低,错误次数明显延长,达岸时间明显延长,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组大鼠学习记忆能力明显增强,到达率明显升高,错误次数明显缩短,达岸时间明显缩短,并且存在剂量依赖性,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠学习记忆能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

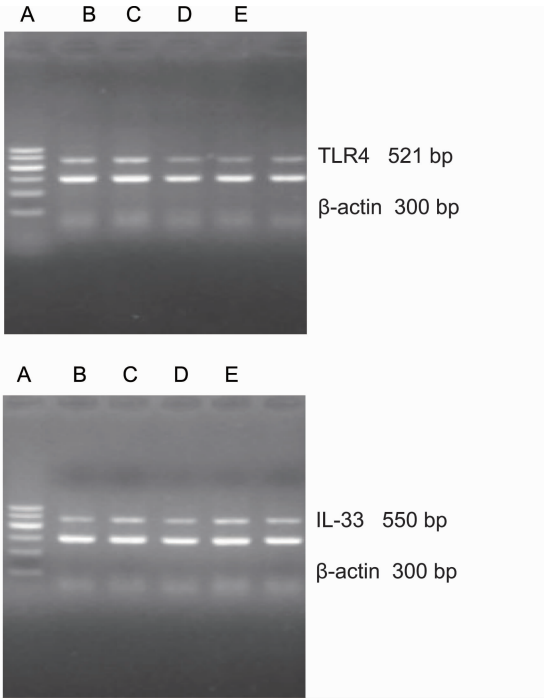
组别	n	到达率 (%)	错误次数 (次)	到达时间 (s)
空白对照	10	92.5	16.8 $\pm$ 3.5	91.4 $\pm$ 7.4
模型	10	46.4 *	34.8 $\pm$ 5.8 *	127.5 $\pm$ 15.4 *
TPG 低剂量	10	64.8 Δ	26.5 $\pm$ 4.7 Δ	119.4 $\pm$ 14.6 Δ
TPG 中剂量	10	81.5 $\Delta\Delta$	21.8 $\pm$ 5.6 $\Delta\Delta$	101.7 $\pm$ 12.9 $\Delta\Delta$
TPG 高剂量	10	90.4 $\Delta\Delta\Delta$	16.4 $\pm$ 4.7 $\Delta\Delta\Delta$	91.6 $\pm$ 7.7 $\Delta\Delta\Delta$

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$;与中剂量组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$;与高剂量组比较, $\Delta\Delta\Delta P < 0.05$;下表同

3 各组大鼠 TLR4 和 IL-33 mRNA 含量比较 (表 2,图 1) 与空白对照组比较,模型组 TLR4 mRNA 和 IL-33 mRNA 含量明显增多,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较,各给药组 TLR4 mRNA 和 IL-33 mRNA 明显下降,并且存在剂量依赖性,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠 TLR4 和 IL-33 mRNA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR4 mRNA	IL-33 mRNA
空白对照	10	0.354 6 $\pm$ 0.043 8	0.523 6 $\pm$ 0.037 6
模型	10	0.926 4 $\pm$ 0.025 4 *	0.976 5 $\pm$ 0.047 6 *
TPG 低剂量	10	0.725 4 $\pm$ 0.026 5 Δ	0.796 7 $\pm$ 0.023 6 Δ
TPG 中剂量	10	0.534 8 $\pm$ 0.035 6 $\Delta\Delta$	0.597 5 $\pm$ 0.055 6 $\Delta\Delta$
TPG 高剂量	10	0.335 6 $\pm$ 0.046 1 $\Delta\Delta\Delta$	0.382 4 $\pm$ 0.045 4 $\Delta\Delta\Delta$



注:A 为空白对照组;B 为模型组;C 为 TPG 低剂量组;D 为 TPG 中剂量组;E 为 TPG 高剂量组

图 1 各组大鼠 TLR4 和 IL-33 mRNA 含量比较

讨 论

TPG 具有解痉、抗炎、镇静、扩张冠脉血管、抗应激性溃疡、抑制血小板聚集等多方面功能。研究表明,赤芍对大鼠血浆黏度、全血黏度及红细胞电泳等血液流变学指标均有改善作用^[8]。D-gal 致衰老动物模型造模方法简便易行,价格低廉,效果稳定。D-gal能使机体细胞内半乳糖浓度增加,转成半乳糖醇不能被细胞分解而堆积在细胞内,导致渗透压受到影响,促使细胞功能障碍而引起衰老^[9]。TPG 可显著降低大鼠脑组织中单胺氧化酶水平,提高胆碱酯酶活性,抑制丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量的增加,促进脑组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)水平增加,改善衰老大鼠的学习记忆障碍^[10]。本研究也证实了这一点,TPG 各剂量组均显示提高大鼠达岸成功率,缩短达岸时间,使衰老大鼠已萎缩的脑组织及免疫器官得到恢复,改善大鼠的主动学习记忆能力及空间分辨能力。TPG 作用可能与改善血液流变学,促使脑血流量增加,缺氧时能量代谢得到改善,加强神经纤维传导功能等作用有关。

TLR 是近年来发现的一组 I 型跨膜模式识别受体,能够直接识别某些病原体及其产物,即病原体相关

分子模式(PAMP),引发一系列信号转导,促使炎症介质释放,提早启动固有免疫防御,并激活适应性免疫系统^[11,12]。IL-33 是 IL 家族中的新成员。无促炎刺激时,IL-33 只局限于细胞核。细胞坏死可以引起有功能的全序列 IL-33 的释放作为内源性信号,其分泌的机制目前尚不清楚^[13]。TLR4 发生受体多聚化,激活 TLR4 分子,促进下游信号分子的募集,引起酶学级联反应,促进炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-8 等的释放,导致细胞损害和神经元变性,从而引起中枢神经系统变性疾病。本研究结果显示,在衰老大鼠中 TLR4 mRNA 和 IL-33 mRNA 明显增多,大鼠炎症损伤明显加重,其脑组织中炎症因子升高,而通过用药后有明显调控作用,TLR4 mRNA 和 IL-33 mRNA 下降,TPG 调节 TLR4 信号转导通路和抑制炎症因子释放,从而改善大鼠的神经系统,提高其学习记忆能力,并且存在剂量依赖性^[14]。

综上所述,TPG 可以通过调节 TLR4 mRNA 和 IL-33 mRNA 的变化,加速自由基清除和抑制炎症因子释放,改善 D-gal 诱导衰老大鼠学习记忆能力。

参 考 文 献

- [1] 冀兰鑫,黄浩,李长志,等. 赤芍药理作用的研究进展[J]. 药物评价研究, 2010, 33(3): 233.
- [2] 邢秋娟,施祀,王拥军. D-半乳糖诱导衰老动物模型的机制及其在中医药方面的应用[J]. 上海中医药大学学报, 2010, 24(3): 93.
- [3] 许惠玉,汪广荫,陈志伟. 赤芍总甙对 Bcl-2、c-myc 基因表达影响及诱导细胞凋亡机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2005, 21(10): 778.
- [4] 许惠玉,陈志伟,牛建昭,等. 赤芍总苷诱导 K562 细胞凋亡及对线粒体膜电位和 Ca^{2+} 的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(16): 3123.
- [5] Hua X, Lei M, Zhang Y, et al. Long-term D-galac-

tose injection combined with ovariectomy serves as a new rodent model for Alzheimer's disease [J]. Life Sci, 2007, 80(20): 1 897 - 1 905.

- [6] 胡余明,胡怡秀,刘秀英,等. 苁蓉总苷对正常小鼠学习记忆功能的影响研究[J]. 中国预防医学杂志, 2007, 8(4): 370 - 37.
- [7] Liu F, Wang QJ, Lu WW, et al. Protective effects of total seasonings of paeonia on acute ischemic myocardium in canines[J]. Chin J Clin Rehabil, 2005, 9(31): 136.
- [8] Ma RQ, Chen JW, Pang JX, et al. Protective effects of total paeony glycoside against global cerebral ischemia-reperfusion injury in gerbils [J]. First Mil Med Univ, 2005, 25(4): 471.
- [9] Danton GH, Dietrich WD. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke[J]. Neuropathol Exp Neurol, 2003, 62(2): 127.
- [10] 王修银,成文利,邝少松,等. 赤芍总苷改善 D-半乳糖诱导衰老大鼠学习记忆能力及机制[J]. 广州医药, 2011, 42(6): 41.
- [11] Yan JY, Wu WK. Recent advances in molecular mechanisms of cerebral ischemic injury [J]. Chin J Pathophysiol, 2003, 19(3): 423.
- [12] 闫东来,寇丽,于泳浩. 异丙酚对脂多糖诱导大鼠腹腔巨噬细胞 Toll 样受体 -4 mRNA 表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2007, 27(2): 149.
- [13] Liu L, Li M, Wu Y, et al. Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 386(1): 181.
- [14] Cordey M, Pike C. Conventional protein kinase C isoforms mediate neuroprotection induced by phorbol ester and estrogen [J]. Neurochem, 2006, 96(1): 204.

(收稿:2012-08-13 修回:2013-01-25)