二苯乙烯苷对 APP / PS1 双转基因小鼠 APP、PS1 基因表达的影响 杨晓颖 刘 宁1 黄岑汉1 刘燕平 黄忠仕1 ( 广西中医药大学，广西 南宁 530000)

〔摘 要〕 目的 探讨何首乌提取物二苯乙烯苷(TSG) 对 APP / PS1 双转基因小鼠脑组织中 β 淀粉样前体蛋白(APP) 和早老素-1 ( PS1) 基因的 表达变化。方法 3 月龄 APP / PS1 双转基因小鼠50 只，随机分为 APP / PS1 对照组、石杉碱甲组和 TSG 高、中、低(0. 3、0. 1、0. 033 g / kg ) 剂量组，另取 同龄 C5B7L /6J 小鼠 10 只为正常对照组。分别给予相应药物 60 d 后，应用 FQ-PCR 法检测脑组织中 APP、PS1 mRNA 的表达。结果 与 APP / PS1 对 照组比较，TSG 高、中、低各剂量组以及石杉碱甲组 APP、PS1mRNA 表达均明显下调(P＜0. 01 或 P＜0. 05) ; TSG 各剂量组与石杉碱甲组比较差异无统 计学意义(P＞0. 05) 。结论 二苯乙烯苷可对阿尔茨海默病起到一定防治保护作用，其机制可能与 APP、PS1 基因受到明显抑制有关。

〔关键词〕 二苯乙烯苷; 阿尔茨海默病; β 淀粉样前体蛋白; 早老素-1

〔中图分类号〕 R749 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9202(2016) 07-1573-03; doi: 10. 3969 /j. issn. 1005-9202. 2016. 07. 016

Effect of TSG on gene expression of APP and PS1 in APP /PS1 double transgenic mice YANG Xiao-Ying，LIU Ning，HUANG Cen-Han，et al.

Guangxi University of Traditional Chinese Medicine，Nanning 530000，Guangxi，China

【Abstract】 Objective To observe the effect of TSG which extraction from Polygonum multiflorum Thunb on gene expression of β- amyloid precursor protein(APP) and presenilin-1 (PS1) in APP / PS1 double transgenic mice brain tissues．Methods Fifty three-months-old APP / PS1 double transgenic mice were randomly divided into five different groups : APP / PS1 control，huperzine A，high-，mid-and low-dose of TSG(0．3，0．1，0．033 g / kg) groups，with 10 mice in each group．Another 10 same age C5B7L /6J mice were assigned into normal control group．After medication corresponding drugs for 60 days，expressions of APP and PS1 mRNA in brain tissue were assayed by fluorescent quan- titative-PCR. Results Compared with APP / PS1 control group，the expressions of APP and PS1 mRNA in all dose of TSG group and hu- perzine A group were down-regulated，the differences had statistical significances(P＜0．01 or P＜0．05) ; Compared with huperzine A group， all dose of TSG had no significant difference(P＞0．05) ．Conclusions TSG has certain preventive and therapeutic effect on Alzheimer＇s dis- ease，which may be related to the inhibition of the expressions of APP and PS1 mRNA.

【Key words】 2，3，5，4＇-tetrahydroxy-stilbene-2-O-β-D-glycoside(TSG) ; Alzheimer＇s disease ; β-amyloid precursor protein(APP) ; Pr- esenilin-1 (PS1)

阿尔茨海默病(AD) 是一种进行性的不可逆的神经退行性 疾病，现已成为严重威胁老年人健康的四大疾病之一〔1〕。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 中药何首乌的主要水溶性成分，具有抗衰老、神经保护、降血脂 及抗动脉硬化等作用〔2，3〕。本实验重在探讨 TSG 对 APP / PS1 双转基因小鼠脑保护作用的可能机制，为 TSG 的临床应用和新 药的研究开发提供实验依据。

1 材料与方法

1. 1 动物 APP / PS1 双转基 因 鼠和 C5B7L /6J，雄 性，体重 26 ～30 g，SPF 级，由北京华阜康生物科技股份有限公司提供 ( 动物质量许可证号 SCXK( 京) 2014-0004) 。

1. 2 药物及试剂 TSG( 成都克洛玛生物科技有限公司，批号

14112) ，石 杉 碱 甲 ( 河 南 太龙 药 业 股 份 有 限 公 司，批 号:

基金项目: 国家自然科学基金项目(81260495) ; 广西自然科学基金项目 (2013GXNSFAA019212)

1 右江民族医学院

通讯作者: 黄忠仕 ( 1970-) ，男，医学博士，教授，主要从事抗痴呆药物 研究。

第一作者: 杨晓颖( 1990-) ，女，在读硕士，主要从事中医诊法与辨证的 客观化规范化研究。

H10940156) ，总 RNA 提取试剂盒( TaKaRa MiniBEST Uniwersal RNA Extaraction Kzit，code No. 9767 ) ，逆转录试剂盒 ( TaKaRa PrimeScriptTM RT reagent Kit With gDNA Eraser Perfect Real Time，Code No，RR047A) ，实时荧光定量试剂盒(TaKaRa SYBR× R Premix Ex TaqTM Ⅱ TLi R Nase H Plus，Code，No，RR820A) ，均 购自大连宝生物有限公司。

1. 3 仪 器 超 低 温 冰 箱 ( 日 本 SANYO 公 司，型 号: MDF- u72v) ，制冰机( 日本 SANYO 公司，型号: SIM-F124) ，漩涡混合 器( 上海琪特分析仪器有限公司，型号: XW-80A) ，高速冷冻离 心机( 美国 Sigma 公司，型号: 1-14K) ，超微量分光光度计( 德国 IMPLEN 公司，型号: Nanophtoometer Pearl360 ) ，全 自动凝胶成 像系统(培清科技，型号: JS-680B) ，电泳仪( 北京六一仪器厂， 型号: DYY-6D) ，普通梯度 PCR 仪( 美国 BIO-RAO 公司，型号: PTC-200) ，Real Time PCR 仪( 美国 BIO-RAO 公司，型号: IQ5) 。

1. 4 动物分组与给药 3 月龄 APP / PS1 双转基因雄性小鼠 50 只，随机分为 APP / PS1 对照组、石杉碱 甲 ( 阳性药对照) 组和 TSG 高、中、低剂量 (0. 3、0. 1、0. 033 g / kg) 组，每组 10 只。另 外，选择 3 月龄 C5B7L /6J 雄性小 鼠 10 只，作为正常对照组。 APP / PS1 对照组、正常对照组: 予生理盐水 30 ml / kg，以上各组 每日灌胃给药 l 次，连续60 d。

1. 5 检测指标及方法 灌胃给药第 60 天后，处死小鼠，取脑

· 1574 · 中国老年学杂志 2016 年 4 月第 36 卷

装于冻存管中迅速置于－80℃ 冰箱保存。取小鼠脑组织含海马 区，液氮研磨后提取总 RNA，紫外分光光度分析及琼脂糖凝胶 电泳检测总 RNA 浓度、纯度、完整性。根据 cDNA 逆转录试剂 盒将 RNA 逆转录成 cDNA 。 引物由大连宝生物有限公司设计 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 | TTCTGGGCTGACAAACATCAAGAC GGTGATGACAATCACGGTTGCTA | 193 |
| PS1 | CGTGGCCACCATCAAATCAG ATGATGGCCGCATTCAGGA | 129 |
| GAPDH | AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC CAACAATCTCCACTTTGCCACTG | 90 |

冰上配置反应体系: SYBR× R Premix Ex TaqTM (2 ×) 10 μl， 上下游引物各 0. 8 μl，cDNA 模板 2 μl，加 dH2 O 至总反应体系

为 20 μl 。反应条件( 二步法扩增条件) : 第 1 步: 预变性，95℃ 30 s，1 个循环。第 2 步: 95℃ , 5 s，61℃ , 30 s，共 40 个循环。 55℃ , 30 s，共 81 个循环。 以 GAPDH 为内参通过 2-△△CT法表示 目的基因 mRNA 的相对表达水平。 △CTintervention = CTinterventionAPP - CTinterventionGAPDH ，△CTblank = CTblankAPP － CTblankGAPDH ，△△CT = △CTintervention-△CTblank 。APP mRNA 表达差别倍数以 2-△△CT 法表 示。PS1 mRNA 计算同前。PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳。

1. 6 统计学处理 采用 SPSS17. 0 软件，多组计量资料采用 ANOVA 检验，多样本均数的两两比较采用 SNK 检验。

2 结 果

2. 1 PCR 产物鉴定 根据本实验设计，引物 APP、PS1、GAPDH 扩增产物长度分别为 193、129、90 bp 。产物经 2% 的琼脂糖凝 胶电泳，紫外线下扫描分析，在相应片段处均出现清晰的条带 并与设计相符，未见其他扩增产物( 见图 1) 。溶解曲线呈单一 峰，说明产物特异性强，无非特异性扩增和引物二聚体产生。



A : APP / PS1 对照组; B : 正常对照组; C : 石杉碱甲组; D : TSG 高剂量组; E : TSG 中剂量组; F: TSG 低剂量组; M : marker

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

2. 2 对 APP / PS1 转基因小鼠脑组织 APP mRNA 表达的影响

APP / PS1 对照组与正常对照组比较有显著差异 (P＜0. 01 ) 。 TSG 高、中、低剂量各组和石杉碱甲组 APP、PS1 mRNA 相对表 达量均低于 APP / PS1 对照组 ( P＜0. 05，P＜0. 01 ) 。表 明给予 TSG 后可使 PS1 mRNA 下调。TSG 各剂量组与石杉碱甲组比较 无明显统计学意义。见表 1 。

表 1 TSG 对各组小鼠 APP、PS1 mRNA 表达的影响(x±s)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 组别 | n | APP | PS1 |
| APP / PS1 对照组 | 10 | 1. 379±0. 450 | 1. 000±0. 060 |
| 正常对照组 | 10 | 0. 887±0. 1552) | 0. 036±0. 1052) |
| 石杉碱甲组 | 10 | 1. 111±0. 1551) | 0. 056±0. 2681) |
| TSG 高剂量组 | 10 | 1. 081±0. 0721) | 0. 587±0. 1541) |
| TSG 中剂量组 | 10 | 1. 076±0. 2071) | 0. 615±0. 1991) |
| TSG 低剂量组 | 10 | 1. 135±0. 1021) | 0. 705±0. 1491) |

与 APP / PS1 对照组比较: 1) P＜0. 05，2) P＜0. 01

3 讨 论

在众 多与 AD 相关 的基 因 中，APP 是第一个被发现 的。 APP 基因位于第 21 号染色体，由 19 个外显子构成，AD 患者大 脑中大量沉积的 Aβ 就是由 APP 基因的第 16、17 号外显子所编

码〔4〕。Aβ 是构成老年斑的核心成分，由 APP 水解产生。APP 的异常代谢及 Aβ 的过度产生是 AD 发病的重要病理机制〔5〕。 APP 有两条代谢途径，在 APP 基因突变、炎症等病理情况下， Aβ 经 β-分泌酶和 γ-分泌酶剪切产生〔6〕。γ-分泌酶为一种天冬 氨酸水解酶，是两条途径都需要的重要水解酶， PS1 是 γ-分泌酶 的催化组分〔7～9〕。研究表明: 缺失 PS1 的细胞分泌 Aβ 的能力 会大大降低〔10〕。 因此 PS1 也成为研究 AD 的重要靶点之一。 AD 动物模型良多，相较其他动物模型 APP / PS1 转基因小鼠脑 内不仅出现 Aβ 沉积、形成 Aβ 斑块时间早，而且 Aβ 的量多，并 伴有神经细胞损伤和突触丢失以及与年龄有关的神经行为功 能障碍等，因而是重要的模型之一〔11〕。TSG 是传统中药何首乌 的有效水溶性成分。近期研究表明 TSG 具有重要的脑保护作 用〔12〕，且能抑制 APP、PS1 基因的产生，对 AD 有显著的防治作 用〔13〕。TSG 还具有抗氧化，抗炎，抗动脉粥样硬化等作用。

本次实验结果表明，TSG 可使 APP / PS1 转基因小鼠脑组织 中 APP 和 PS1 基因表达均受到明显抑制，说明 TSG 对 AD 具有 一定的治疗保护作用，但作用机制还有待深入研究。

4 参考文献

1 龙志敏，赵 蕾，高宝兵，等 . 丙戊酸钠对 APP / PS1 双重转基因 AD

熊 英等 艾灸预处理对急性力竭运动大鼠心肌损伤及蛋白激酶 C 的影响 第 7 期 · 1575 ·

模型小鼠脑内老年斑和神经元的影响〔J〕．中国神经精神疾病杂志， 2011 ; 37 (8) :477-81.

2 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) : 157-60.

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) : 347-8.

4 张 婧 . 早发性痴呆相关基因的研究〔J〕．实用医学杂志，2008 ; 24 (21) : 3781-3.

5 Zhang YW，Xu H. Molecular and cellular mechanisms for Alzheimer＇s dis- ease: understanding APP metabolism〔J〕．Curr Mol Med，2007 ; 7 (7) : 687-96.

6 Wolfe MS，Kopan R. Intramembrane proteolysis : theme and variations〔J〕. Science，2004 ; 305 (5) ; 1119-23.

7 Bart De. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer＇s disease〔J〕. EMBO Reports，2007 ; 8 (2) : 141-6 .

8 Pimplikar SW，Nixon RA，Robakis NK，et al．Amyloid-independent mech- anisms in Alzheimer＇s disease pathogenesis〔J〕．J Neurosci，2010 ; 30 : 14946-54.

9 Chuang JY，Lee CW，Shih YH，et al．Interactions between amyloid-β and hemoglobin: implications for amyloid plaque formation in Alzheimer＇s dis- ease〔J〕．PLoS One，2012 ;7 (3) : 33120.

10 Seshadri S，Fitzpatrick AL，Ikram MA，et al．Genome-wide analysis of ge- netic loci associated with Alzheimer disease〔J〕．JAMA，2010 ; 303 : 1832-40.

11 徐 杰，周文聪，张媛英 . 何首乌活性成分二苯乙烯苷的研究进展 〔J〕．泰山医学院学报，2008;29(1) : 23-6.

12 刘 玲，朱晓莹，赖 术，等 . 二苯乙烯苷对 SAMP8 小鼠 APP mR- NA 和 PS1mRNA 表达的影响〔J〕．中国实验方剂学杂志，2013 ; 19 ( 1) : 240-3.

13 Kemppainen S，Hamalainena E，Miettinen PO，et al．Behavioral and neu- ropathological consequences of transient global ischemia in APP/PS1 Alzheimer model〔J〕．Behav Brain Res，2014 ;275 ( 12) : 15-26.

〔2015-01-30 修回〕 ( 编辑 曲 莉)

艾灸预处理对急性力竭运动大鼠心肌损伤及蛋白激酶 C 的影响

熊 英 顾一煌 吴云川 ( 南京中医药大学中医学一级学科，江苏 南京 210046)

〔摘 要〕 目的 探讨艾灸预处理对急性力竭运动导致的心肌损伤的保护作用及蛋白激酶 C(PKC) 的影响。方法 健康雄性 SD 雄性大鼠 40 只，随机分为正常对照组( C 组) 、艾灸组( M 组) 、力竭组(E 组) 、艾灸力竭组( ME 组) 和艾灸力竭+PKC 抑制剂组( ME+CHE 组) 5 组。在一次性游泳 急性力竭模型的基础上，用艾灸预处理进行干预，并注射 PKC 抑制剂白屈菜红碱( CHE) ，采用透射电镜观察心肌细胞超微结构的变化，运用酶联免 疫吸附(ELISA) 法检测大鼠心肌 PKC 蛋白水平及其活化情况。结果 ①E 组心肌超微结构损伤改变明显，ME 组心肌超微结构损伤较 E 组轻，而 ME+CHE组心肌超微结构损伤程度与 E 组相似。②与 C 组比较，M 组和 ME 组 PKC 蛋白水平无明显变化，E 组和 ME+CHE 组 p-PKC 水平均有明显 升高(P＜0. 05) ; 与 E 组比较，ME 组 PKC 水平有明显下降(P＜0. 05) ，ME+CHE 组水平无明显变化; 与 ME 组比较，ME+CHE 组 PKC 水平有明显上升 (P＜0. 05) 。③与 C 组 p-PKC 水平比较，M 组无明显变化，E 组、ME 组和 ME+CHE 组水平均有明显升高(P＜0. 05) ; 与 E 组比较，ME 组 p-PKC 水平有 明显下降(P＜0. 05) ; 与 ME 组比较，ME+CHE 组 P-PKC 水平有明显上升(P＜0. 05) 。结论 急性力竭运动所致的心肌损伤与 PKC 的过度表达和活化 有关，艾灸预处理对急性力竭所致的心肌损伤有保护作用，阻止 PKC 的过度表达和活化可能是其起效的机制之一。

〔关键词〕 艾灸; 预处理; 心肌超微结构; 蛋白激酶 C(PKC)

〔中图分类号〕 R245 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9202(2016) 07-1575-03; doi: 10. 3969 /j. issn. 1005-9202. 2016. 07. 017

艾灸是祖国医学“治未病”的常用手段，早在古代即有艾灸 防治心血管疾病的大量记载，本实验也证实艾灸预处理对运动 性心肌损伤有一定的防治作用。蛋白激酶 C ( PKC) 是预处理 心肌保护效应中重要的中介物质之一〔1〕，但也有研究表明 PKC 过度活化可加重心肌缺血再灌注(I/R) 损伤的程度〔2〕。鉴于 以往的研究结果，本研究在大鼠急性力竭游泳运动模型的基础 上，运用艾灸预处理进行干预，并使用 PKC 抑制剂白屈菜红碱 ( CHE) ，观察艾灸预处理对急性力竭大鼠心肌损伤的保护作用 及心肌 PKC 表达及活化的影响。

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目(2014 年) ; 南京中医 药大学中医学一级学科开放课题资助(YS2012ZYX407) ; 江 苏省高校自然科学研究面上资助项目(11KJB360005)

第一作者: 熊 英( 1975-) ，女，博士，副教授，硕士生导师，主要从事针 灸推拿研究。

1 材料与方法

1. 1 实验动物 选用健康雄性 SD 大 鼠 37 只，体重 190

~

210 g 。大鼠常规分笼饲养，一组一笼，均以标准啮齿类动物饲 料饲养，自由饮食。室温保持在 20℃ ~ 22℃, 相对湿度 45% ~ 50% ，光照时间为 12 h/d 。大鼠参照随机数字表分为 5 组，包 括正常对照组 ( C 组，n = 7) 、艾灸组 ( M 组，n = 8) 、力竭组 ( E 组，n = 6) 、艾灸力竭组( ME 组，n = 8) 、艾灸力竭+CHE 组( ME+ CHE 组，n = 8) 。

1. 2 力竭模型的建立 力竭模型参照彭泽胄等〔3〕的文献报 道，先进行 2 d 适应性游泳(20 min/次) ，而后进行一次性力竭 游泳运动，游泳大鼠尾部负重为体重 3% ，直至力竭。力竭标 准: 连续沉入水中超过 10 s，捞出后置于平面不能完成翻正反 射。在相对较短时间内力竭的大鼠，将其捞出休息 5 min 后，再 继续进行游泳运动，使每次运动时间不少于 2 h 。游泳后，迅速 用干毛巾擦干水分，电吹风吹干后，放回笼中休息。