

# 灯盏花素通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路对阿尔茨海默病大鼠模型 A $\beta$ 跨血脑屏障的转运清除机制研究

刘万根 李敏 于宏伟

**【摘要】 目的** 探讨灯盏花素(Breviscopine, BRE)对阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)大鼠模型淀粉样蛋白  $\beta$ (Amyloid  $\beta$ , A $\beta$ )跨血脑屏障(blood brain barrier, BBB)的转运清除的影响及其可能作用机制。**方法** 随机选择 15 只 Wistar 大鼠作为空白组,剩余大鼠于侧脑室内注射淀粉样蛋白  $\beta$ 25-35(A $\beta$ 25-35)以诱导 AD 大鼠模型;后随机分为模型组、BRE 低( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )、高( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )剂量组及多奈哌齐组( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ),每组各 15 只,连续灌服给药 21 d;Morris 水迷宫行为测试检测大鼠空间学习记忆能力;海马组织行尼氏、刚果红染色;酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测海马组织中 A $\beta$ 42、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$ (Interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)水平;Western blot 法检测海马 Wnt3a/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)通路因子及 A $\beta$  相关转运体蛋白表达水平。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠逃避潜伏期延长,穿台次数减少,海马 CA3 区存活神经元数减少,A $\beta$  斑块状严重沉积,A $\beta$ 42, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MDA 水平升高,SOD 水平、Wnt3a, $\beta$ -catenin、低密度脂蛋白受体相关蛋白 1(Low density lipoprotein receptor-associated protein 1, LRP-1)及 P 糖蛋白(P glycoprotein, P-gp)相对表达水平降低,磷酸化糖原合酶激酶 3 $\beta$ (Phosphorylated GSK3  $\beta$ , p-GSK3 $\beta$ )、轴抑制蛋白 2(Axis inhibition protein 2, Axin2)相对表达水平升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,BRE 低、高剂量组及多奈哌齐组大鼠逃避潜伏期缩短,穿台次数增加,海马 CA3 区存活神经元数增加,A $\beta$  斑块状沉积减轻,A $\beta$ 42, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MDA 水平降低,SOD 水平、Wnt3a, $\beta$ -catenin, LRP-1 及 P-gp 相对表达水平升高,p-GSK3 $\beta$ , Axin2 相对表达水平降低( $P < 0.05$ );低、高剂量 BRE 及多奈哌齐作用效果逐渐增强( $P < 0.05$ )。**结论** BRE 可促进 AD 大鼠模型 A $\beta$  跨 BBB 转运清除,其作用机制可能与激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路有关。

**【关键词】** 灯盏花素 阿尔茨海默病 淀粉样蛋白  $\beta$  Wnt/ $\beta$ -连环蛋白通路

**【中图分类号】** R742 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2022)05-0410-07

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2022.05.003

**Breviscopine promotes the transport of A $\beta$  across the blood-brain barrier via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in a rat model of Alzheimer's disease** Liu Wangen\*, Li Min, Yu Hongwei. \* Department of Neurology, Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061000

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of breviscapine (BRE) on Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) transport and clearance through the blood-brain barrier (BBB) in a rat model of Alzheimer's disease (AD), and to illustrate the molecular mechanism. **Methods** Fifteen Wistar rats were randomly selected as the blank group. The remaining rats were injected with A $\beta$ 25-35 into the lateral ventricle to induce AD rat model. The rats were randomly divided into the model group, BRE low dose ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), BRE high dose ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) group, and Donepezil group ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), with 15 rats in each group. Morris water maze test was used to detect the spatial learning and memory ability of the rats. The hippocampal sections were stained with Nissl's and Congo red. The levels of A $\beta$ 42, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) in the hippocampus were determined by ELISA. Western blot was used to detect the expression of Wnt3a/ $\beta$ -catenin pathway and A $\beta$ -associated transporter protein in

the hippocampus. **Results** Compared with the blank group, the rats in the model group had longer escape latency time, reduced number of stage penetration, reduced number of surviving neurons in the CA3 region of the hippocampus, more severe A $\beta$  plaque-like deposition, increased levels of A $\beta$ 42, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MDA, and decreased levels of SOD, Wnt3a,  $\beta$ -catenin, low density lipoprotein receptor-associated protein 1 (LRP-1), P glycoprotein (P-gp), phosphorylated glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (phosphorylated GSK3  $\beta$  (p-GSK3 $\beta$ ), and axis inhibition protein 2 (Axin 2) ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, rats in the low and high dose BRE and donepezil groups had shorter escape latency, increased number of stage penetration, increased number of surviving neurons in the hippocampal CA3 area, reduced A $\beta$  plaque-like deposition, decreased expression level of A $\beta$ 42, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MDA levels, SOD levels, Wnt3a,  $\beta$ -catenin, LRP-1, P-gp protein, p-GSK3 $\beta$  and Axin2 ( $P<0.05$ ). The effects of BRE and donepezil are dose-dependent ( $P<0.05$ ). **Conclusion** BRE could promote the trans-BBB transport and clearance of A $\beta$  in AD rats, and its mechanism may be related to the activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway.

**【Key words】** Breviscapine Alzheimer's disease A $\beta$  Wnt/ $\beta$ -catenin pathway

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一种进行性神经退行性疾病,是老年痴呆症的最常见形式,占病例的 60%~80%<sup>[1]</sup>,目前尚无特异有效的治疗方法<sup>[2]</sup>。AD 主要临床表现为进行性痴呆、记忆力和认知功能下降<sup>[3]</sup>,其标志性病理标准包括弥漫性沉积在细胞外老年斑的淀粉样蛋白  $\beta$ (Amyloid  $\beta$ , A $\beta$ )肽水平升高以及一种聚集在细胞内形成神经纤维缠结的微管组装蛋白 Tau 的过度磷酸化,触发神经元变性损伤甚至死亡<sup>[4]</sup>。A $\beta$  源自一种称为淀粉样前体蛋白(Myloid precursor protein, APP)的大蛋白质,其生成与跨血脑屏障(Blood brain barrier, BBB)转运清除速率不平衡将引发大脑 A $\beta$  沉积,进而促进 AD 进展<sup>[5]</sup>。有研究发现, Wnt/ $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)通路是 BBB 维持完整性及功能发挥的关键驱动因素,影响 A $\beta$  跨 BBB 的转运清除<sup>[6]</sup>,提示靶向 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路可能是 AD 治疗的有效途径。灯盏花素(Breviscapine, BRE)是一种黄酮类化合物,广泛用于心脑血管疾病,可改善脑组织损伤,发挥较强的神经保护作用<sup>[7]</sup>,但目前关于其用于 AD 治疗及相关机制的报道较少,故本实验拟通过构建 AD 大鼠模型,以探讨 BRE 对 AD 大鼠模型 A $\beta$  跨 BBB 转运清除的影响及其可能作用机制,以期 AD 药物治疗提供一定的参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

SPF 级 6 周龄雄性 Wistar 大鼠 75 只,体质量(200 $\pm$ 20)g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,许可证号 SCXK(鲁)2019-0003。实验前大鼠于 24

℃恒温、50%恒湿环境下适应性饲养 1 周,12 h 光暗交替,自由获得饮水、饲料。

#### 1.1.2 药品、主要试剂和仪器

BRE(国药准字:Z20013018, 20 mg)购自云南生物谷药业股份有限公司;盐酸多奈哌齐片(国药准字:H20030472, 5 mg)购自江苏豪森药业股份有限公司;A $\beta$ 25-35 购自北京友谊中联生物科技有限公司;刚果红染色液购自北京索莱宝科技有限公司;A $\beta$ 42、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$ (Interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)ELISA 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;兔抗 Wnt3a 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;兔抗糖原合酶激酶 3 $\beta$ (Glycogen synthase kinase  $\beta$ , GSK3 $\beta$ )、磷酸化 GSK3 $\beta$ (phosphorylated GSK3  $\beta$ , p-GSK3 $\beta$ )单克隆抗体购自上海碧云天生物技术有限公司;兔抗  $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)多克隆抗体购自北京百奥莱博科技有限公司;兔抗 P 糖蛋白(P glycoprotein, P-gp)单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;兔抗低密度脂蛋白受体相关蛋白 1(Low density lipoprotein receptor-associated protein 1, LRP-1)、轴抑制蛋白 2(Axis inhibition protein 2, Axin2)单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;多功能酶标仪购自美国赛默飞世尔科技有限公司;化学发光凝胶成像系统购自美国 ProteinSimple 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 模型构建、分组及给药

随机选取 15 只大鼠作为空白组,剩余 60 只用于 AD 模型构建<sup>[8]</sup>:大鼠经腹腔注射 2%戊巴比妥

钠( $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )麻醉,并固定于立体定向定位器上,颅顶备皮,切开皮肤暴露颅骨,于前囟后 $0.8\text{ mm}$ ,侧 $1.3\text{ mm}$ 处分别钻孔,微型注射器刺穿硬脑膜,将其插入硬脑膜下方 $4\text{ mm}$ 处,以 $1\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度于大鼠双侧脑室注入A $\beta$ 25-35( $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ),注射完毕后针留原位 $5\text{ min}$ ,空白组大鼠两侧脑室仅分别注射 $5\text{ }\mu\text{L}$ 生理盐水;AD模型大鼠随机分为模型组、BRE低、高剂量组及多奈哌齐组,每组各 $15$ 只,术后 $24\text{ h}$ 后给药,其中BRE低、高剂量组及多奈哌齐组灌服给药剂量分别为 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,连续给药 $21\text{ d}$ 。

### 1.2.2 Morris水迷宫行为测试

末次给药结束后利用Morris水迷宫实验测定大鼠空间学习记忆能力。定位巡航实验:将大鼠分别从东、南、西、北浸入水中,记录大鼠 $2\text{ min}$ 内找到平台的时间(逃逸潜伏期),若未找到,则记录逃逸潜伏期为 $120\text{ s}$ ,共进行 $4\text{ d}$ , $3\text{ 次/d}$ ;空间探索实验:于第 $5\text{ d}$ 撤去平台,选择相对较远入水点将大鼠浸入水中,记录大鼠 $2\text{ min}$ 内到达平台区域的时间及穿过平台的次数。

### 1.2.3 样品采集与处理

大鼠经腹腔注射 $2\%$ 戊巴比妥钠( $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )麻醉并脱颈处死,取出大脑,去除皮质组织,于大脑中线两侧取豆状结构的海马体,部分保存于 $4\%$ 多聚甲醛中以进行组织学染色;部分保存于液氮中以用于ELISA及Western blot试验。

### 1.2.4 尼氏染色

海马组织经 $4\%$ 多聚甲醛固定 $24\text{ h}$ 后常规石蜡包埋并制备 $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚度切片;切片经二甲苯、梯度乙醇及蒸馏水脱水,亚甲蓝染色 $15\text{ min}$ ,双蒸水洗涤后乙醇脱水 $2\text{ min}$ ,无水乙醇、二甲苯各洗涤 $10\text{ min}$ ,镜下观察受损神经元体积缩小或含有液泡,细胞核染色加深,每张切片随机选取 $5$ 个视野,Image-Pro Plus 6.0评估单位面积内存活神经元数,取平均值。

### 1.2.5 刚果红染色

海马组织经 $4\%$ 多聚甲醛固定 $24\text{ h}$ 后常规石蜡包埋并制备 $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚度切片;二甲苯脱蜡,乙醇水化, $1\%$ 刚果红染色 $15\text{ min}$ ,碱性乙醇分化液分化 $10\text{ s}$ ,水洗,苏木素复染 $2\text{ min}$ ,水洗,常规脱水,透明后中性树脂封片;电子显微镜下观察并拍照记录,A $\beta$ 淀粉样物呈桔红色。

### 1.2.6 ELISA法检测海马组织中A $\beta$ 42,TNF- $\alpha$ ,

IL- $1\beta$ ,MDA,SOD水平

取 $50\text{ mg}$ 海马组织于 $0.5\text{ mL}$ 生理盐水中充分匀浆, $12000\text{ r/min}$ , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 $15\text{ min}$ ,取上清;严格按照试剂盒说明书操作步骤计算A $\beta$ 42,TNF- $\alpha$ ,IL- $1\beta$ ,MDA,SOD水平。

### 1.2.7 Western blot检测Wnt3/ $\beta$ -catenin通路因子及A $\beta$ 相关转运体蛋白表达水平

取海马组织于预冷的裂解液中裂解, $12000\text{ r/min}$ , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 $10\text{ min}$ 后取上清,二辛可宁酸(Bicinchoninic acid,BCA)试剂盒检测蛋白水平并加热变性;十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)分离蛋白,湿转蛋白至聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene fluoride,PVDF)膜, $5\%$ 脱脂乳[ $1\times\text{Tris-HCl}$ 缓冲盐溶液+Tween 20(Tris HCl buffer salt solution+Tween 20,TBST)稀释]封闭蛋白 $2\text{ h}$ 后于一抗(均利用 $1\times\text{TBST}$ 行 $1:1000$ 稀释)内 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 $15\text{ h}$ ;  $1\times\text{TBST}$ 洗膜 $5$ 次后于二抗( $1:10000$ 稀释)内室温孵育 $2\text{ h}$ ,洗膜 $5$ 次后将PVDF膜与增强化学发光(Enhanced chemiluminescence,ECL)液反应 $1\sim 2\text{ min}$ ,化学发光凝胶成像系统曝光并拍照记录;Image J软件分析条带灰度值,以目的蛋白Wnt3a,GSK3 $\beta$ ,p-GSK3 $\beta$ , $\beta$ -catenin,Axin2,LRP-1,P-gp与内参 $\beta$ -actin灰度值比值表示蛋白的相对表达水平。

### 1.2.8 统计学处理

采用SPSS 26.0软件,计量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,多样本比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- $t$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠Morris水迷宫逃避潜伏期及穿台次数

Morris水迷宫组间大鼠 $1\sim 5\text{ d}$ 逃避潜伏期及第 $5\text{ d}$ 穿台次数均有明显差异( $P<0.05$ )。与空白组比较,其它 $4$ 组大鼠逃避潜伏期延长,穿台次数减少( $P<0.05$ );与模型组比较,BRE低、高剂量组及多奈哌齐组大鼠逃避潜伏期缩短,穿台次数增加( $P<0.05$ );与BRE低剂量组比较,BRE高剂量组及多奈哌齐组大鼠逃避潜伏期缩短,穿台次数增加( $P<0.05$ );与BRE高剂量组比较,多奈哌齐组大鼠逃避潜伏期缩短,穿台次数增加( $P<0.05$ )(表1)。

表 1 各组大鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期及穿台次数比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	逃避潜伏期(s)					穿台次数 (次)
	第 1 d	第 2 d	第 3 d	第 4 d	第 5 d	
空白组	62.38 ± 6.60	53.12 ± 5.83	40.03 ± 5.08	23.29 ± 4.08	11.31 ± 1.96	8.80 ± 1.33
模型组	103.36 ± 10.87*	91.07 ± 9.97*	79.58 ± 8.62*	61.08 ± 7.28*	46.89 ± 5.13*	1.13 ± 0.88*
BRE 低剂量组	91.89 ± 9.99*△	83.41 ± 8.99*△	68.06 ± 7.10*△	49.61 ± 5.49*△	35.15 ± 4.21*△	2.07 ± 0.68*△
BRE 高剂量组	81.03 ± 8.48*△#	70.19 ± 7.84*△#	57.11 ± 6.26*△#	38.24 ± 4.24*△#	24.09 ± 3.75*△#	5.40 ± 1.08*△#
多奈哌齐组	72.16 ± 7.07*△#▲	62.88 ± 6.13*△#▲	46.17 ± 4.35*△#▲	30.29 ± 3.55*△#▲	19.26 ± 3.14*△#▲	7.13 ± 1.45*△#▲

注:与空白组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,△ $P<0.05$ ;与 BRE 低剂量组比较,# $P<0.05$ ;与 BRE 高剂量组比较,▲ $P<0.05$

2.2 大鼠海马 CA3 区神经元损伤情况

组间大鼠海马 CA3 区存活神经元数有明显差异( $P<0.05$ )。与空白组比较,其它 4 组大鼠海马 CA3 区存活神经元数减少( $P<0.05$ );与模型组比较,BRE 低、高剂量组及多奈哌齐组大鼠 CA3 区存活神经元数增加( $P<0.05$ );与 BRE 低剂量组比较,BRE 高剂量组及多奈哌齐组大鼠海马 CA3 区存活神经元数增加( $P<0.05$ );与 BRE 高剂量组比较,多奈哌齐组大鼠海马 CA3 区存活神经元数增加( $P<0.05$ )(表 2、图 1)。

表 2 各组海马 CA3 区存活神经元数比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 7, \text{个}/\mu\text{m}^2$ )

组别	存活神经元数
空白组	68.57 ± 5.26
模型组	24.14 ± 5.59*
BRE 低剂量组	34.29 ± 5.47*△
BRE 高剂量组	48.86 ± 4.79*△#
多奈哌齐组	56.86 ± 4.22*△#▲

注:与空白组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,△ $P<0.05$ ;与 BRE 低剂量组比较,# $P<0.05$ ;与 BRE 高剂量组比较,▲ $P<0.05$

2.3 海马 CA1 区 Aβ 斑块状沉积情况

刚果红染色显示,空白组大鼠海马 CA1 区无桔红色 Aβ 斑块状沉积;与空白组比较,其它 4 组大鼠

海马 CA1 区见有桔红色 Aβ 斑块状沉积;与模型组比较,BRE 低、高剂量组及多奈哌齐组大鼠海马 CA1 区 Aβ 斑块状沉积程度逐渐减轻(图 2)。

2.4 海马组织中 Aβ42, TNF-α, IL-1β, MDA, SOD 水平

组间大鼠海马 Aβ42, TNF-α, IL-1β, MDA, SOD 水平均有明显差异( $P<0.05$ )。与空白组比较,其它 4 组大鼠海马 Aβ42, TNF-α, IL-1β, MDA 水平升高,SOD 水平降低( $P<0.05$ );与模型组比较,BRE 低、高剂量组及多奈哌齐组大鼠海马 Aβ42, TNF-α, IL-1β, MDA 水平降低,SOD 水平升高( $P<0.05$ );与 BRE 低剂量组比较,BRE 高剂量组及多奈哌齐组大鼠海马 Aβ42, TNF-α, IL-1β, MDA 水平降低,SOD 水平升高( $P<0.05$ );与 BRE 高剂量组比较,多奈哌齐组大鼠海马 Aβ42, TNF-α, IL-1β, MDA 水平降低,SOD 水平升高( $P<0.05$ )(表 3)。

2.5 海马组织中 Wnt/β-catenin 通路相关蛋白及 LRP-1、P-gp 相对表达水平

组间大鼠海马组织中 GSK3β 相对表达水平无显著性差异( $P>0.05$ ), Wnt3a, p-GSK3β, β-catenin, Axin2, LRP-1 及 P-gp 相对表达水平均有明显

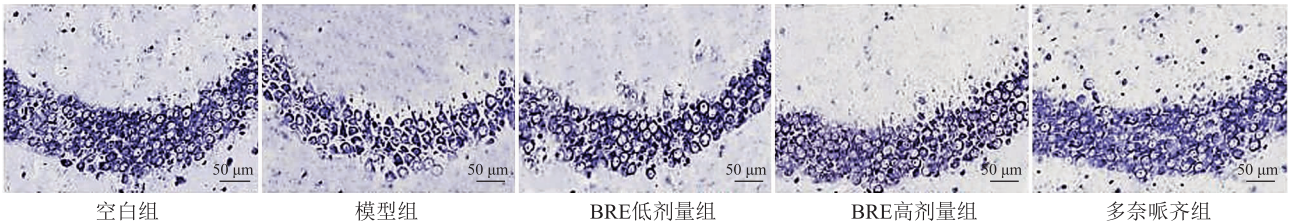


图 1 各组大鼠海马 CA3 区尼氏染色(×400 倍)



图 2 各组大鼠海马 CA1 区刚果红染色(×400 倍)



表 3 各组大鼠海马 Aβ42,TNF-α,IL-1β,MDA,SOD 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	Aβ42(pg·mg <sup>-1</sup> )	TNF-α(pg·mg <sup>-1</sup> )	IL-1β(pg·mg <sup>-1</sup> )	MDA(mM·mg <sup>-1</sup> )	SOD(U·mg <sup>-1</sup> )
空白组	24.63 ± 2.58	17.25 ± 1.99	18.64 ± 1.84	3.45 ± 0.32	114.22 ± 10.70
模型组	89.64 ± 9.85*	46.99 ± 5.12*	51.62 ± 5.86*	5.66 ± 0.63*	72.33 ± 7.49*
BRE 低剂量组	72.16 ± 7.69*△	37.16 ± 3.77*△	45.15 ± 4.64*△	5.09 ± 0.35*△	81.48 ± 4.51*△
BRE 高剂量组	57.89 ± 6.26*△#	29.85 ± 3.53*△#	34.06 ± 3.42*△#	4.48 ± 0.34*△#	95.06 ± 6.31*△#
多奈哌齐组	45.93 ± 4.75*△#▲	24.19 ± 2.94*△#▲	25.13 ± 2.51*△#▲	3.97 ± 0.20*△#▲	103.80 ± 8.31*△#▲

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,△ $P < 0.05$ ;与 BRE 低剂量组比较,# $P < 0.05$ ;与 BRE 高剂量组比较,▲ $P < 0.05$

差异( $P < 0.05$ )。与空白组比较,其它 4 组大鼠海马组织中 Wnt3a,β-catenin,LRP-1 及 P-gp 相对表达水平降低,p-GSK3β,Axin2 相对表达水平升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,BRE 低、高剂量组及多奈哌齐组大鼠海马组织中 Wnt3a,β-catenin,LRP-1 及 P-gp 相对表达水平升高,p-GSK3β,Axin2 相对表达水平降低( $P < 0.05$ );与 BRE 低剂量组比较,BRE 高剂量组及多奈哌齐组大鼠海马组织中 Wnt3a,β-catenin,LRP-1 及 P-gp 相对表达水平升高,p-GSK3β,Axin2 相对表达水平降低( $P < 0.05$ );与 BRE 高剂量组比较,多奈哌齐组大鼠海马组织中 Wnt3a,β-catenin,LRP-1 及 P-gp 相对表达水平升高,p-GSK3β,Axin2 相对表达水平降低( $P < 0.05$ ) (图 3、表 4)。

3 讨论

Aβ 积累被认为是产生和清除之间不平衡的最终结果,其清除是 1 个复杂过程,与跨 BBB 的血管运输、淋巴引流、常驻小胶质类型细胞吞噬和降解以及先天免疫细胞浸润等相关<sup>[9]</sup>,其中跨 BBB 转运至血液是其清除的重要机制<sup>[10]</sup>,而 BBB 完整性和功能性活动受损与 Aβ 跨 BBB 的清除障碍、Aβ 斑块形成、神经炎症、氧化应激及神经元损伤密切相关<sup>[11]</sup>。

Morris 水迷宫测试环境减少了气味踪迹干扰,可用于测试大鼠海马认知、学习及空间记忆功能。本研 究结果显示,与空白组比较,模型组及治疗组大鼠逃避潜伏期延长,穿台次数减少,提示大鼠认知功能及记忆能力下降,注入 Aβ25-35 于脑室内可能造成大鼠海马功能障碍而促进 AD 进展。尼氏体可反映神经元存活情况,病理条件下受损神经元可溶解甚至消失;另研究发现,BRE 可以挽救学习缺陷,缓解记忆保留,提高探索外部世界的能力<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,经 BRE 治疗后模型大鼠逃避潜伏期缩短,穿台次数减少,海马 CA3 区存活神经元数增加,提示 BRE 具有挽救 AD 大鼠模型认知功能障碍并恢复记忆力的神经保护作用,可作为抗 AD 的潜力药物。

淀粉样蛋白前体在 β-分泌酶及 γ-分泌酶作用下产生 Aβ,Aβ 斑块是 AD 大脑中的 1 个重要神经病理学标志,可反映不溶性 Aβ 原纤维的水平,可溶性 Aβ42 对神经细胞毒性较大,其聚集是引发 AD 神经元功能进行性丧失的关键因素<sup>[12]</sup>。BBB 由毛细血管内皮细胞、星形胶质细胞、周细胞及神经元紧

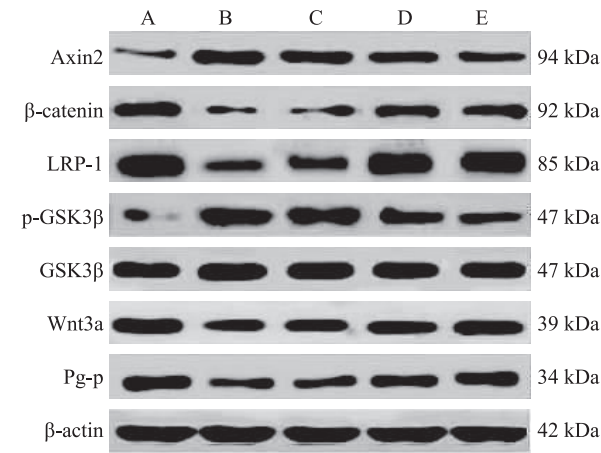


图 3 各组大鼠海马组织相关蛋白 Western blot 条带 A 为空白组;B 为模型组;C 为 BRE 低剂量组;D 位 BRE 高剂量组;E 为多奈哌齐组

表 4 大鼠海马信号通路相关因子及 LRP-1,P-gp 相对表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	Wnt3a	GSK3β	p-GSK3β	β-catenin	Axin2	LRP-1	P-gp
空白组	0.69 ± 0.07	0.76 ± 0.06	0.09 ± 0.02	0.37 ± 0.04	0.11 ± 0.02	0.75 ± 0.08	0.45 ± 0.05
模型组	0.21 ± 0.04*	0.79 ± 0.05	0.67 ± 0.06*	0.11 ± 0.03*	0.42 ± 0.03*	0.09 ± 0.02*	0.17 ± 0.03*
BRE 低剂量组	0.28 ± 0.05*△	0.78 ± 0.04	0.34 ± 0.03*△	0.15 ± 0.03*△	0.37 ± 0.03*△	0.14 ± 0.03*△	0.23 ± 0.03*△
BRE 高剂量组	0.36 ± 0.04*△#	0.75 ± 0.06	0.24 ± 0.03*△#	0.23 ± 0.03*△#	0.26 ± 0.03*△#	0.36 ± 0.06*△#	0.34 ± 0.03*△#
多奈哌齐组	0.44 ± 0.05*△#▲	0.76 ± 0.06	0.17 ± 0.04*△#▲	0.31 ± 0.04*△#▲	0.18 ± 0.04*△#▲	0.44 ± 0.04*△#▲	0.41 ± 0.03*△#▲

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,△ $P < 0.05$ ;与 BRE 低剂量组比较,# $P < 0.05$ ;与 BRE 高剂量组比较,▲ $P < 0.05$

密连接组成,对于维持大脑结构和功能的稳态微环境至关重要。AD 中可见 BBB 连接复合体被破坏,这与中枢神经系统免疫状态的改变如小胶质细胞过度活化有关,氧化应激可诱导小胶质细胞过度活化,通过释放促炎细胞因子来诱导神经炎症反应,进而引起 BBB 损伤;反过来, BBB 功能障碍可导致 A $\beta$  转运失败,进而引发神经炎症和氧化应激,形成恶性循环<sup>[13]</sup>。有研究发现,AD 患者大脑中炎性及氧化应激反应减弱,有利于减少 A $\beta$  沉积、神经元丢失及 AD 样病理进展<sup>[14]</sup>;BRE 具有显著抗炎及抗氧化特性,可减轻脑组织损伤及认知功能障碍<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,模型组大鼠海马组织中 A $\beta$  显著沉积, A $\beta$ 42, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MDA 水平升高, SOD 水平降低,经 BRE 治疗后促炎、促氧化因子及 A $\beta$ 42 水平降低,抗氧化因子水平升高, A $\beta$  斑块沉积减弱,提示 BRE 可能通过降低炎症及氧化反应,减轻 BBB 损伤及功能障碍,进而促进 A $\beta$  转运清除而避免 AD 病理的进一步进展。

跨内皮转运 A $\beta$  的最突出的受体之一是 LRP1,在构成 BBB 的所有功能元件中高度表达,可通过内吞和溶酶体降解或在 BBB 中跨细胞的胞吞作用,从间质液中快速清除可溶性 A $\beta$ ;转运外排蛋白 P-gp 在正常和 AD 患者的 A $\beta$  清除中起关键作用,两者在功能上相关<sup>[16]</sup>。有研究发现, P-gp 表达水平及转运活性的升高可降低 A $\beta$  积累<sup>[17]</sup>,上调 P-gp 和 LRP1 可增强 A $\beta$  跨 BBB 的清除率<sup>[18]</sup>。本研究结果显示,模型组大鼠海马组织中 LRP1, P-gp 表达水平降低,而经 BRE 治疗后二者阳性表达水平均显著升高,提示 BRE 可能通过提高 BBB 中 LRP1 表达水平及 P-gp 转运活性而促进 AD 大鼠模型脑组织中 A $\beta$  外排,进而降低 A $\beta$  斑块沉积及 A $\beta$ 42 积累。

Wnt 配体与 Frizzled(Fz)受体和 LRP5/6 共受体结合,分解破坏复合物并抑制 GSK-3 $\beta$  活性,  $\beta$ -catenin 积累并转移到细胞核,与转录因子 T 细胞因子/淋巴增强因子结合以诱导 Wnt 靶基因的转录, Axin2 负反馈调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路活性<sup>[19]</sup>。Wnt/ $\beta$ -catenin 信号传导功能障碍可促进 A $\beta$  的产生和聚集、Tau 磷酸化及海马依赖性认知功能障碍被视为 AD 发病机制的触发因素<sup>[20]</sup>。有研究发现, Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号激活可减少神经炎症并提高抗氧化应激能力<sup>[21-22]</sup>,改善 BBB 表型,降低细胞旁通透性,并增加 P-gp 外排转运蛋白活性<sup>[23]</sup>,阻止 A $\beta$  肽的形成和 A $\beta$  沉积物的形成<sup>[24]</sup>。本研究结果

显示,模型组大鼠 Wnt3a,  $\beta$ -catenin 相对表达水平降低, p-GSK3 $\beta$ , Axin2 相对表达水平升高,提示 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 通路被抑制,经 BRE 治疗后 Wnt3a,  $\beta$ -catenin 相对表达水平升高, p-GSK3 $\beta$ , Axin2 相对表达水平降低,提示 BRE 可能通过促进 Wnt3a 表达并降低 Axin2 表达负反馈,抑制 GSK-3 $\beta$  磷酸化,促进  $\beta$ -catenin 的核转移、积累,从而提高靶基因转录活性。

综上所述, BRE 可降低 AD 大鼠模型海马组织炎性及氧化应激因子水平,减轻海马神经元损伤,减轻 A $\beta$  斑块沉积并促进 A $\beta$  跨 BBB 转运清除,其机制可能与激活 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 通路有关。

## 参 考 文 献

- [1] Crous-Bou M, Minguillón C, Gramunt N, et al. Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention[J]. *Alzheimers Res Ther*, 2017, 9(1): 71.
- [2] Rao CV, Asch AS, Carr D, et al. "Amyloid-beta accumulation cycle" as a prevention and/or therapy target for Alzheimer's disease[J]. *Aging Cell*, 2020, 19(3): e13109.
- [3] Cordaro M, Salinaro AT, Siracusa R, et al. Key mechanisms and potential implications of hericium erinaceus in NLRP3 inflammasome activation by reactive Oxygen species during alzheimer's disease[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(11): 1664.
- [4] Dubois B, Hampel H, Feldman HH, et al. Preclinical alzheimer's disease: definition, natural history, and diagnostic criteria[J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(3): 292-323.
- [5] 张云莎,郭茂娟,李虎虎,等. A $\beta$  的外周清除与阿尔茨海默病[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(22): 4398-4400, 4338.
- [6] Jia L, Piña-Crespo J, Li Y. Restoring Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is a promising therapeutic strategy for Alzheimer's disease[J]. *Mol Brain*, 2019, 12(1): 104.
- [7] Li Z, Zhang XB, Gu JH, et al. Breviscapine exerts neuroprotective effects through multiple mechanisms in APP/PS1 transgenic mi-ce[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 468(1/2): 1-11.
- [8] Liu M, Guo HB, Li CY, et al. Cognitive improvement of compound danshen in an A $\beta$ 25-35 peptide-induced rat model of Alzheimer's disease[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15(1): 382.
- [9] Zuroff L, Daley D, Black KL, et al. Clearance of cerebral A $\beta$  in Alzheimer's disease: reassessing the role of microglia and monocytes[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(12): 2167-2201.
- [10] Wanek T, Zoufal V, Brackhan M, et al. Brain distribution of dual ABCB1/ABCG2 substrates is unaltered in a Beta-Amyloidosis mouse model[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8245.
- [11] Elfakhri KH, Duong QV, Langley C, et al. Characterization of hit compounds identified from high-throughput screening for their effect on blood-brain barrier integrity and amyloid- $\beta$  clearance: in vitro and in vivo studies[J]. *Neuroscience*, 2018, 379(2): 269-280.

- 机制研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2020, 47(6): 407-410.
- [7] 朱晓梦, 安光祖, 李铭明, 等. 过表达生存素对颅脑外伤大鼠神经细胞凋亡和神经功能的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2021, 38(7): 1287-1290.
- [8] Azemin WA, Alias N, Ali AM, et al. Structural and functional characterisation of HepTH1-5 peptide as a potential hepcidin replacement[J]. J Biomol Struct Dyn, 2021, 6(2021): 1-24.
- [9] Zhang X, Gou YJ, Zhang Y, et al. Hepcidin overexpression in astrocytes alters brain Iron metabolism and protects against amyloid- $\beta$  induced brain damage in mice[J]. Cell Death Discov, 2020, 6(1): 113.
- [10] Adams HJ, Bendixen BH, Kappelle LJ, et al. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment[J]. Stroke, 1993, 24(1): 35-41.
- [11] 中华医学会神经病学分会. 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9): 1006-7876.
- [12] 张磊, 刘建民. 改良 Rankin 量表[J]. 中华神经外科杂志, 2012, 28(5): 512.
- [13] 国家神经系统疾病医疗质量控制中心. 中国卒中学会. 急性缺血性卒中再灌注治疗医疗质量评价与改进专家建议[J]. 中国卒中杂志, 2021, 16(7): 1673-5765.
- [14] Berge E, Whiteley W, Audebert H, et al. European stroke organisation (ESO) guidelines on intravenous thrombolysis for acute ischaemic stroke[J]. Eur Stroke J, 2021, 6(1): I-LXII.
- [15] Mccullough LD, Roy-O'reilly M, Lai YJ, et al. Exogenous inter- $\alpha$  inhibitor proteins prevent cell death and improve ischemic stroke outcomes in mice[J]. J Clin Invest, 2021, 131(17): e144898.
- [16] Guzmán EA, Pitts TP, Tandberg KR, et al. Discovery of survivin inhibitors part 1: screening the harbor branch pure compound library[J]. Mar Drugs, 2021, 19(2): 73.
- [17] Li Y, Lu W, Yang J, et al. Survivin as a biological biomarker for diagnosis and therapy[J]. Expert Opin Biol Ther, 2021, 21(11): 1429-1441.
- [18] Sun JD, Li XM, Liu JL, et al. Effects of miR-150-5p on cerebral infarction rats by regulating the Wnt signaling pathway via p53[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(7): 3882-3891.
- [19] Zhan L, Liu D, Wen H, et al. Hypoxic postconditioning activates the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and protects against transient global cerebral ischemia through Dkk1 Inhibition and GSK-3 $\beta$  inactivation[J]. FASEB J, 2019, 33(8): 9291-9307.
- [20] 王立一, 王子豪, 范照鑫, 等. 铁代谢在创伤性颅脑损伤中的研究进展[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2021, 26(3): 133-136.
- [21] Yao MY, Liu T, Zhang L, et al. Role of ferroptosis in neurological diseases[J]. Neurosci Lett, 2021, 747(2021): 135614.
- [22] Zhao Y, Xin Z, Li N, et al. Nano-liposomes of lycopene reduces ischemic brain damage in rodents by regulating Iron metabolism[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 124(2018): 1-11.
- [23] Wang P, Cui Y, Ren Q, et al. Mitochondrial ferritin attenuates cerebral ischaemia/reperfusion injury by inhibiting ferroptosis[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(5): 447.
- [24] 朱蕊, 曾庆, 黄国志, 等. 铁死亡与脑卒中[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(23): 3734-3739.
- [25] Zhang Y, Lu X, Tai B, et al. Ferroptosis and its multifaceted roles in cerebral stroke[J]. Front Cell Neurosci, 2021, 15(2021): 615372.

(2022-03-28 收稿)

## (上接第 415 页)

- [12] Zhao J, Li K, Wan K, et al. Organoplatinum-Substituted polyoxometalate inhibits  $\beta$ -amyloid aggregation for alzheimer's therapy[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2019, 58(50): 18032-18039.
- [13] Janyou A, Wicha P, Jittiwat J, et al. Dihydrocapsaicin attenuates blood brain barrier and cerebral damage in focal cerebral ischemia/reperfusion via oxidative stress and inflammatory[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 10556.
- [14] Christopher KI, Xie W, Zhu H, et al.  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase-Resistant glutathione analog attenuates progression of alzheimer's disease-like pathology and neurodegeneration in a mouse model[J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(11): 1796.
- [15] Li Y, Li S, Li D. Breviscapine alleviates cognitive impairments induced by transient cerebral ischemia/reperfusion through its Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant properties in a rat model [J]. ACS Chem Neurosci, 2020, 11(24): 4489-4498.
- [16] Storck SE, Hartz A, Bernard J, et al. The concerted amyloid-beta clearance of LRP1 and ABCB1/P-gp across the blood-brain barrier is linked by PICALM[J]. Brain Behav Immun, 2018, 73(2): 21-33.
- [17] Peng HB, Bukuroshi P, Durk MR, et al. Impact of age, hypercholesterolemia, and the vitamin D receptor on brain endogenous  $\beta$ -amyloid peptide accumulation in mice[J]. Biopharm Drug Dispos, 2021, 42(8): 372-388.
- [18] Mohamed LA, Keller JN, Kaddoumi A. Role of P-glycoprotein in mediating rivastigmine effect on amyloid- $\beta$  brain load and related pathology in Alzheimer's disease mouse model[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(4): 778-787.
- [19] Nusse R, Clevers H. Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities[J]. Cell, 2017, 169(6): 985-999.
- [20] Tapia-Rojas C, Inestrosa NC. Loss of canonical Wnt signaling is involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Neural Regen Res, 2018, 13(10): 1705-1710.
- [21] Singh S, Mishra A, Shukla S. ALCAR exerts neuroprotective and Pro-Neurogenic effects by inhibition of glial activation and oxidative stress via activation of the Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling in parkinsonian rats[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(7): 4286-4301.
- [22] Ning WJ, Lv RJ, Xu N, et al. Lycopene-Loaded microemulsion regulates neurogenesis in rats with A $\beta$ -Induced alzheimer's disease rats based on the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. Neural Plast, 2021(13): 5519330.
- [23] Laksitorini MD, Yathindranath V, Xiong W, et al. Modulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes blood-brain barrier phenotype in cultured brain endothelial cells[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 19718.
- [24] Rivera DS, Lindsay C, Codocedo JF, et al. Andrographolide recovers cognitive impairment in a natural model of Alzheimer's disease (Octodon degus)[J]. Neurobiol Aging, 2016, 46(2): 204-220.

(2022-01-24 收稿)