

神经疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.2014.02.004

姜黄素对 APP/PS1 双转基因鼠海马 ABCA1、apoA1 的表达和血清 TC、HDL 含量的影响

滕志朋,王 晨,张 雄,李 昱

(重庆医科大学基础医学院病理学教研室、重庆医科大学神经科学中心、重庆市神经生物学重点实验室,重庆 400016)

【摘要】目的:探讨姜黄素对 APP/PS1 双转基因鼠海马组织中三磷酸腺苷结合盒转运子 A1(ATP binding cassette transport protein A1, ABCA1)和载脂蛋白 A1(apolipoprotein A1, apoA1)的表达及血清中总胆固醇(total cholesterol, TC)和高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)含量的影响。**方法:**用 APP/PS1 双转基因鼠建立阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)模型,不同浓度姜黄素饲料喂养 6 个月。免疫组化 SP 法检测转基因鼠的海马组织 CA1 区 ABCA1 和 apoA1 的表达变化。胆固醇酶法比色法检测血清中 TC 和 HDL 的含量。**结果:**经过不同浓度姜黄素饲喂转基因鼠后,其海马组织 CA1 区 ABCA1 和 apoA1 的表达增加($P=0.005$ 和 0.003 ; $P=0.025$ 和 0.001),且血清中 HDL 的含量也随之增加,TC 的含量逐渐减少,其差异均有统计学意义($P=0.041$ 和 0.010 ; $P=0.046$ 和 0.002)。**结论:**ABCA1 在 AD 的发生发展中起着重要的作用,姜黄素可能是通过增加 ABCA1 表达和升高 apoA1 和 HDL 含量降低胆固醇水平。

【关键词】阿尔茨海默病;姜黄素;三磷酸腺苷结合盒转运子 A1;免疫组化;载脂蛋白 A1;高密度脂蛋白

【中图分类号】R741.05;R332

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-02-17

Effects of curcumin on serum total cholesterol and high-density lipoprotein contents and expression of ABCA1 and apoA1 in CA1 region of hippocampus in APP/PS1 double transgenic mice

Teng Zhipeng, Wang Chen, Zhang Xiong, Li Yu

(Teaching and Research Section of Pathology, Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Neurobiology)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of curcumin on serum total cholesterol(TC) and high-density lipoprotein(HDL) and expression of ATP binding cassette transport protein A1(ABCA1) and apolipoprotein A1(apoA1) in CA1 region of hippocampus in APP/PS1 double transgenic mice. **Methods:** Alzheimer's disease(AD) model was established with APP/PS1 double transgenic mice, which were fed for 6 months with different concentrations of curcumin diet. Immunohistochemistry(SP) was applied to evaluate the expressive change of ABCA1 and apoA1 in CA1 region of hippocampus of transgenic mice. Colorimetric method was applied to detect the content of TC and HDL in blood serum of transgenic mice. **Results:** After feeding transgenic mice with curcumin diet, expression of ABCA1 and apoA1 in CA1 region of hippocampus was increased in concentration dependent manner($P=0.005, 0.003; P=0.025, 0.001$). Content of HDL in blood serum was increased too while TC was decreased with significant differences between groups($P=0.041, 0.010; P=0.046, 0.002$). **Conclusions:** ABCA1 may play an important role in the generation or development of AD. Curcumin may lower the content of cholesterol by raising expression of ABCA1 and content of apoA1 and HDL.

【Key words】Alzheimer's disease; curcumin; ATP binding cassette transport protein A1; immunohistochemistry; apolipoprotein A1; high-density lipoprotein

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是以进行性记忆减退和认知功能障碍为主要临床特征,以神经元淀粉样蛋白沉积和神经纤维缠结为主要

病理特征的神经变性疾病,其病因至今未知。最近研究表明,AD 的发生发展与脂代谢紧密相关,尤其是三磷酸腺苷结合盒转运子 A1(ATP binding cassette transport protein A1, ABCA1)调节转运胆固醇与 β 淀粉样蛋白(β amyloid protein, A β)沉积有着密切联系^[1]。ABCA1 是近年来新发现的启动细胞内胆固醇外流、形成高密度脂蛋白(high-density lipoprotein,

作者介绍:滕志朋, Email: 252769898@qq.com,

研究方向:神经病理学。

通信作者:李 昱, Email: liyu100@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81271426, 81100948)。

HDL)、增加胆固醇逆向转运的关键蛋白^[2]。正常情况下,经 ABCA1 转运出细胞的胆固醇与 apoA1 共同形成 β -HDL,进而形成成熟的 HDL^[3]。

姜黄素是从植物姜黄中提取的一种酚类物质,近年来研究发现,姜黄素具有抗氧化、抗炎、抗凝、降血脂、抗动脉粥样硬化及抑制肿瘤生长等作用。研究已经证实姜黄素对于一些顽固性疾病如消化道溃疡、大肠癌、乳腺癌、动脉粥样硬化和肝病等具有很好的疗效^[4]。Begum 等^[5]在动物实验中发现姜黄素在神经退行性疾病中发挥了一定的治疗作用,而且可以有效的减少不溶性 A β 。

本实验用 APP/PS1 双转基因鼠建立 AD 体内模型,通过检测姜黄素对其海马 ABCA1 和血清胆固醇的影响,以期探索治疗 AD 新的靶点和药物。

1 材料与方法

1.1 实验动物

从南京大学模式动物研究所购买 AD 转基因鼠 Tg2576,种鼠为 B6C3-Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/j 品系双转基因小鼠,严格执行屏障系统饲养条件,饲养于重庆医科大学动物实验中心 SPF 级饲养条件下。

1.2 主要试剂

姜黄素购自 Sigma 公司;单克隆抗体 ABCA1 购自 Abcam 公司;SP 免疫组化试剂盒和浓缩型 DAB 试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司;总胆固醇(total cholesterol,TC)(CHO 酶法)测试盒和血清 HDL 测试盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 方法

1.3.1 建立动物模型 将 6 个月的 AD 转基因鼠随机分为痴呆组、低剂量组、高剂量组,每组 5 只,分别饲喂普通饲料、0.16 g/kg 姜黄素混合饲料、1.0 g/kg 姜黄素混合饲料,继续喂养 6 个月。

1.3.2 组织取材 用 3.5%水合氯醛麻醉转基因鼠,快速剪开腹壁,暴露出心脏和主动脉弓,左心室取血,离心取血清-20℃冻存。用灌注穿刺针刺穿左心室至主动脉根部,止血钳固定,将预热 PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)缓冲液从左心室灌入,同时剪开右心耳让血液流出,直到右心耳流出无血色液体后,换遇冷的 4%多聚甲醛缓冲液继续注入约 200 ml 直至小鼠呈僵硬状态,快速断头取脑,浸泡在 4%多聚甲醛中,24 h 后用梯度酒精脱水,进行石蜡包埋、切片、烘干。

1.3.3 免疫组化检测 将脑组织切片脱蜡后,枸橼酸缓冲液微波高温修复,3%过氧化氢抑制内源性过氧化物酶,山羊血清封闭,滴加一抗 4℃孵育过夜,滴加二抗和辣根酶标记液,DAB 染色,苏木精复染,脱水后用中性树胶封固。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。光学显微镜下观察显色反应。

计数方法:每张玻片随机取 5 个高倍镜视野,计数阳性细胞总数和每个视野下的均数。判定标准:阳性细胞百分

比 $\leq 10\%$ 为阴性,11%~30%为+,31%~70%为++,>70%为+++。

1.3.4 测血清 TC 和 HDL 的含量 根据胆固醇氧化酶法原理,首先按照南京建成生物工程研究所提供的 TC(CHO 酶法)测试盒使用说明书和血清 HDL 测试盒使用说明书进行配液,然后按照表 1 的方法进行加样,分别混匀后 37℃水浴 5 min,以空白管调零,在 500 nm 波长下比色,读取各管吸光度(absorbance,A)值。见表 1。

表 1 TC 检测(CHO 酶法)和 HDL 检测加样方法
Tab.1 Method of adding sample in checking TC and HDL
(CHO enzymatic method)

加入物	空白管(B)	标准管(S)	测定管(T)
蒸馏水(μ l)	2.5	—	—
血清(μ l)	—	—	2.5
标准品(μ l)	—	2.5	—
试剂(μ l)	250	250	250

计算结果:样品 TC 或 HDL 含量 =AT/AS $\times$ CS;- ,无该成分

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件分析,实验数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 组差异性比较采用单因素方差分析,组间两两比较行 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组 APP/PS1 转基因鼠海马组织 CA1 区 ABCA1 的表达 与痴呆组相比,低剂量组转基因鼠海马组织 CA1 区 ABCA1 表达阳性细胞数增加($P=0.005$),高剂量组转基因鼠海马组织 CA1 区 ABCA1 表达阳性细胞数继续增加,差异有统计学意义($P=0.003$)。见表 2,图 1。

2.2 各组转基因鼠的海马组织中 CA1 区 apoA1 的表达

各组转基因鼠海马组织 apoA1 的表达趋势与 ABCA1 的表达表现出的趋势是一致的,与痴呆组相比低剂量组的 apoA1 阳性表达数增加($P=0.025$),高剂量组与低剂量组相比进一步呈现出增加的趋势,其差异具有统计学意义($P<0.001$)。见表 2、图 2。

表 2 转基因鼠海马组织 CA1 区 ABCA1 和 apoA1 蛋白的阳性细胞数($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.2 ABCA1 and apoA1-positive cell counts in CA1 region of hippocampus of mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	ABCA1 阳性细胞数	apoA1 阳性细胞数
痴呆组	31.0 $\pm$ 3.67	44.6 $\pm$ 4.22
低剂量组	39.8 $\pm$ 3.83	50.4 $\pm$ 2.88
高剂量组	49.4 $\pm$ 4.72	62.0 $\pm$ 3.54

2.3 各组 APP/PS1 转基因鼠血清中 TC 和 HDL 的含量

与痴呆组相比,低剂量组转基因鼠血清中 TC 含量减少($P=0.046$),HDL 含量增加($P=0.041$);而高剂量组转基因鼠血清中 TC 含量继续降低($P=0.002$),HDL 含量继续增加($P=0.010$),其差异均有统计学意义。见表 3、图 3。

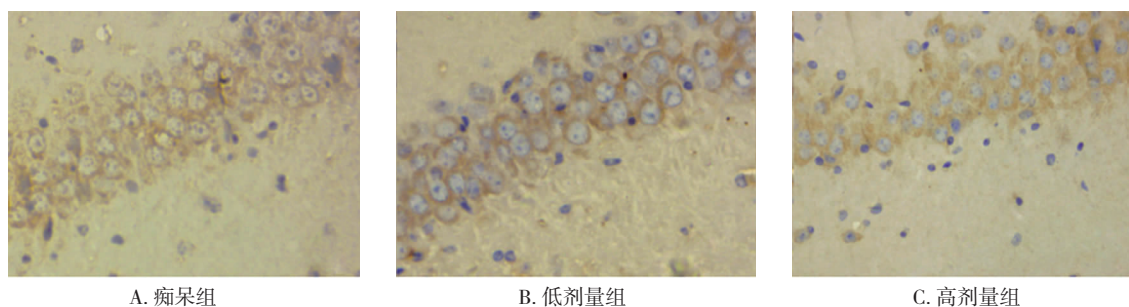


图 1 转基因鼠海马组织 CA1 区 ABCA1 蛋白的免疫组化染色 (400 ×)

Fig.1 Immunohistochemical staining of ABCA1 expression in CA1 region of hippocampus of mice (400 ×)

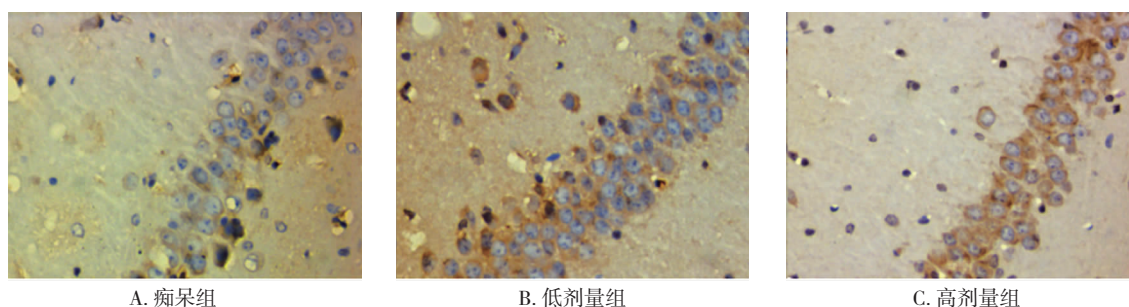


图 2 转基因鼠海马组织 CA1 区 apoA1 蛋白的免疫组化染色 (400 ×)

Fig.2 Immunohistochemical staining of apoA1 expression in CA1 region of hippocampus of mice (400 ×)

表 3 各组转基因鼠血清中 TC 和 HDL 的含量 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Tab.3 TC and HDL levels in serum of transgenic mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	TC	HDL
痴呆组	111.88 ± 5.60	36.80 ± 4.81
低剂量组	104.13 ± 2.21	48.65 ± 8.46
高剂量组	97.35 ± 5.56	52.95 ± 7.26

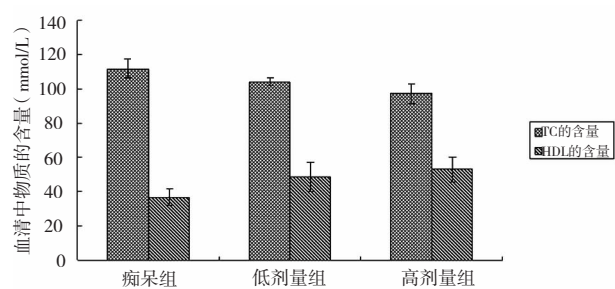


图 3 各组转基因鼠血清中 TC 和 HDL 的含量

Fig.3 TC and HDL levels in serum of transgenic mice in each group

3 讨 论

AD是以中枢神经系统退行性变性病理变化为主要特征的一种疾病,患者最初表现为记忆力下降,智力降低,认知障碍,最终生活无法自理。AD病理变化的中心环节是 $A\beta$ 的沉积,但是,目前仍缺乏确切有效的治疗方法,以至于投入大量的医疗护理

费用仍不能缓解病情进展。因此,探讨疾病发病的危险性因素及保护性因素,在早期针对性进行干预,对于预防和控制疾病的发生发展至关重要。

姜黄素是植物姜黄的主要成份,是一种特殊的酚类化合物。姜黄素的药理学研究已有百年历史,因其安全性高,无毒副作用,已被广泛用作食品添加剂,联合国世界卫生组织和食品药品监督管理局已经将其定义为天然食用色素。姜黄素具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、降低血胆固醇、保护心血管等广泛药理作用^[6],对 AD 的治疗也有报道。研究已经表明,在高胆固醇血症的动物模型中,姜黄素可以降低体内胆固醇含量来维持机体胆固醇平衡^[7-8]。而姜黄素对 AD 的影响也得到了越来越多的关注,Ringman 等^[9]已经指出姜黄素可以直接影响 $A\beta$ 的合成。本课题组前期研究也发现姜黄素对 AD 有一定的治疗作用,但其机制至今未知。

胆固醇是细胞膜和轴突髓鞘的重要组成部分,在维持神经元完整性和功能性方面起着重要作用。由于血脑屏障的存在,脑组织无法直接从血液系统中获取胆固醇,主要由星形胶质细胞和神经元合成胆固醇,使大脑成为人体胆固醇含量最高的器官。临床和流行病学研究表明胆固醇代谢异常与 AD 的发病有着密切联系。HDL 则是颗粒最小的血浆脂蛋白,其作用是将内源性胆固醇从组织向肝脏的逆向转运,是血管内的脂质清道夫。AD 患者的 TC 与低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 水平

高于正常水平,而血浆 HDL 水平则低于正常水平^[10]。Khalil 等^[11]最近发现在 AD 患者当中 ABCA1 跨膜转运胆固醇体系受损,导致 HDL 合成障碍,其逆转运功能受损,进而导致脑细胞胆固醇代谢障碍。Refolo 等^[12]用降低胆固醇的药物处理转基因鼠,证实这种药物可以下调转基因鼠脑 A β 水平,降低 AD 进展。实验中检测发现,随着姜黄素使用和药物浓度加大,血清中的 TC 含量减少,而 HDL 含量增加,其差异有统计学意义。

ABCA1 是三磷酸腺苷结合盒转运子超家族成员之一,是细胞膜上一种重要胆固醇流出调节蛋白,其介导的细胞内胆固醇流出是胆固醇逆向转运的起始环节,ABCA1 正常表达可提高循环 HDL 水平^[13-14]。ABCA1 介导的细胞胆固醇和磷脂流出是胆固醇逆转运的初始步骤,ABCA1 首先介导细胞内的磷脂流出,与 apoA1 结合形成盘状的磷脂-apoA1 复合物,随后细胞内的胆固醇通过扩散作用流出,被盘状的磷脂-apoA1 复合物捕获,形成前 β -HDL,在卵磷脂胆固醇脂酰转移酶(lecithin cholesterol acyl-transferase,LCAT)的作用下,转变成富含胆固醇酯(cholesteryl ester,CE)的球状的成熟 HDL,HDL 携带外周组织中过多的胆固醇随血液系统转运至肝脏,随后在胆固醇 7 α -羟化酶等的作用下变成胆汁排除体外。近来研究表明,高表达 ABCA1 的转基因小鼠可以升高血 HDL 水平,增加 HDL 介导的胆固醇流出至肝脏,从而降低动脉粥样硬化的危险性^[15]。Wahrle 等^[16]发现,在 AD 转基因小鼠体内增加 ABCA1 的表达可以降低 A β 的沉积,缓解了 AD 的进展。这些研究说明了 ABCA1 在 AD 发生发展中的重要地位,提示 ABCA1 很可能是 AD 进展过程中的一个重要的保护因子。而且 Lewis 等^[16]发现,同时表达 APP、PS1、apoA1 的转基因小鼠血清 HDL 水平明显高于只表达 APP 和 PS1 的转基因小鼠 HDL 水平,同时前者在行为学实验中的表现更接近正常老年鼠的表现,而后者则有空间和学习障碍的表现。本实验中检测了 APP/PS1 转基因小鼠在姜黄素用药后海马 CA1 区 ABCA1 和 apoA1 的表达情况,发现用药后两者的表达均呈增加趋势。

本实验通过对 APP/PS1 双转基因鼠用不同浓度姜黄素饲喂后发现,小鼠脑内 ABCA1 的表达增高,并且由 ABCA1 介导的 apoA1 和 HDL 的含量增加,导致 TC 含量减少。因此,姜黄素很可能是通过增加 ABCA1 的表达降低胆固醇含量,以此缓解了 AD 的进展。这为 AD 的临床研究和治疗提供了新的依据,但是脂质代谢的过程庞大而且复杂,仍需大量动物实验以及临床试用来验证治疗 AD 的药物。

参 考 文 献

- [1] Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, et al. Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(2): 671-682.
- [2] Yvan CL, Wang N, Tall AR. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(2): 139-143.
- [3] Repa JJ, Li H, Frank-Cannon TC, et al. Liver X receptor activation enhances cholesterol loss from the brain, decreases neuroinflammation, and increases survival of the NPC1 mouse[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(52): 14470-14480.
- [4] Youssef KM, El-Sherbeny MA. Synthesis and antitumor activity of some curcumin analogs[J]. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2005, 338(4): 181-189.
- [5] Begum AN, Jones MR, Lim GP, et al. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 326(1): 196-208.
- [6] Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30(2): 85-94.
- [7] Arafa HM. Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats[J]. *Med Sci Monit*, 2005, 11(7): BR228-234.
- [8] Peschel D, Koerting R, Nass N. Curcumin induces changes in expression of genes involved in cholesterol homeostasis[J]. *J Nutr Biochem*, 2007, 18(2): 113-119.
- [9] Ringman JM, Frautschy SA, Cole GM, et al. A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2005, 2(2): 131-136.
- [10] Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. Alzheimer's disease: the cholesterol connection[J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6(4): 345-351.
- [11] Khalil A, Berrougui H, Pawelec G, et al. Impairment of the ABCA1 and SR-BI-mediated cholesterol efflux pathways and HDL anti-inflammatory activity in Alzheimer's disease[J]. *Mech Ageing Dev*, 2012, 133(1): 20-29.
- [12] Refolo LM, Pappolla MA, LaFrancois J, et al. A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2001, 8(5): 890-899.
- [13] Jensen MK, Pai JK, Mukamal KJ, et al. Common genetic variation in the ATP-binding cassette transporter A1, plasma lipids, and risk of coronary heart disease[J]. *Atherosclerosis*, 2007, 195(1): e172-180.
- [14] Kruit JK, Kremer PH, Dai L, et al. Cholesterol efflux via ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and cholesterol uptake via the LDL receptor influences cholesterol-induced impairment of beta cell function in mice[J]. *Diabetologia*, 2010, 53(6): 1110-1119.
- [15] Vaisman BL, Demosky SJ, Stonik JA, et al. Endothelial expression of human ABCA1 in mice increases plasma HDL cholesterol and reduces diet-induced atherosclerosis[J]. *J Lipid Res*, 2012, 53(1): 158-167.
- [16] Lewis TL, Cao D, Lu H, et al. Overexpression of human apolipoprotein A-I preserves cognitive function and attenuates neuroinflammation and cerebral amyloid angiopathy in a mouse model of Alzheimer disease[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(47): 36958-36968.

(责任编辑:冉明会)