

阿尔茨海默病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001998

EGCG对 APP/PS1 双转基因小鼠神经突触损伤的保护作用

刘忠锦¹, 张海燕², 孙丽慧², 朱坤杰², 郎尉雅², 廉洁², 王月静², 张萌², 朱春雨³

(1. 齐齐哈尔医学院附属第一医院神经内科, 齐齐哈尔 161000; 2. 齐齐哈尔医学院基础医学院组胚教研室, 齐齐哈尔 161000; 3. 大庆油田总医院神经内科, 大庆 163000)

【摘要】目的:研究表没食子儿茶素没食子酸酯(epi-gallocatechin-3-gallate, EGCG)对 APP/PS1 双转基因小鼠中神经突触损伤的保护作用及其可能机制。**方法:**实验采用 APP/PS1 双转基因小鼠, 随机分为模型组(0.1 mL/10 g, 生理盐水灌胃)、EGCG 组[20 mg/(kg·d), EGCG 灌胃], 每组 10 只, 另以同窝同性别阴性小鼠 10 只设立正常组(0.1 mL/10 g, 生理盐水灌胃), 共 3 组。Morris 水迷宫实验测试各组小鼠逃避潜伏期和跨越平台变化, 电镜观察各组小鼠海马神经元损伤情况, 免疫组化法检测小鼠海马 PSD95、GAP43 表达, RT-PCR 检测小鼠海马 PSD95 mRNA、GAP43 mRNA 含量。**结果:**模型组逃避潜伏期明显延长, 海马神经元损伤严重, PSD95 表达下降、GAP43 表达增高。免疫组化结果表示, EGCG 组 PSD95 平均光密度高于模型组[(0.11 ± 0.03) vs. (0.05 ± 0.02), *P*=0.001], EGCG 组 GAP43 平均光密度低于模型组[(0.10 ± 0.03) vs. (0.16 ± 0.04), *P*=0.002]。RT-PCR 检测结果再次验证, EGCG 组 PSD95 mRNA 表达高于模型组[(0.82 ± 0.11) vs. (0.50 ± 0.06), *P*=0.000], EGCG 组 GAP43 mRNA 表达低于模型组[(1.12 ± 0.11) vs. (1.56 ± 0.16), *P*=0.000]。**结论:**EGCG 对 APP/PS1 转基因小鼠的空间学习记忆和突触损伤具有明显的改善作用, 其机制可能与影响小鼠海马突触结构, 提高 PSD95 表达、下调 GAP43 表达有关。

【关键词】表没食子儿茶素没食子酸酯; 神经元; 突触; 阿尔茨海默病

【中图分类号】R741.02

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-01-04

Protective effect of EGCG on neurosynaptic damage in APP/PS1 double transgenic mice

Liu Zhongjin¹, Zhang Haiyan², Sun Lihui², Zhu Kunjie², Lang Weiyi²,
Lian Jie², Wang Yuejing², Zhang Meng², Zhu Chunyu³

(1. Department of Neurology, The First Hospital Affiliated to Qiqihar Medical College;
2. Histology and Embryology Department of Basic Medical College of Qiqihar Medical University;
3. Department of Neurology, Daqing Oilfield General Hospital)

【Abstract】Objective: To study the protective effect of EGCG on neurosynaptic damage in APP/PS1 double transgenic mice and its possible mechanism. **Methods:** APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into two groups: model group(0.1 mL/10 g, normal saline infusion), EGCG group[20 mg/(kg·d), EGCG infusion]. Ten negative mice in the same sex were treated with normal group(0.1 mL/10 g, normal saline infusion). Morris water maze was used to test the escape latency and platform-crossing changes of mice in each group. Electron microscopy was used to observe the damage of hippocampal neurons in each group. Immunohistochemical method was used to detect the expression of PSD95 and GAP43 in hippocampus of mice. RT-PCR was used to detect the content of PSD95 mRNA and GAP43 mRNA in hippocampus of mice. **Results:** The escape latency of the model group was significantly prolonged, the hippocampal neurons were severely damaged, the expression of PSD95 was decreased, and the expression of GAP43 was increased. The results of immunohistochemistry showed that the average optical density of PSD95 in EGCG group was higher than that in model group[(0.11 ± 0.03) vs. (0.05 ± 0.02), *P*=0.001] and that of GAP43 in EGCG group was lower than that in model group [(0.10 ± 0.03) vs. (0.16 ± 0.04), *P*=0.002]. The results of RT-PCR showed that the expression of PSD95 in EGCG group was higher than that in model group[(0.82 ± 0.11) vs. (0.50 ± 0.06), *P*=0.000]. The expression of GAP43 in EGCG group was lower than that in model group[(1.12 ± 0.11) vs. (1.56 ± 0.16), *P*=0.000]. **Conclusion:** EGCG can significantly improve the spatial learning, memory

and synaptic damage of APP/PS1 transgenic mice. The mechanism may be related to the effect of EGCG on the synaptic structure of hippocampus, the increase of PSD95 expression and the down-regulation of GAP43 expression.

【Key words】epi-gallocatechin-3-gallate; neuron, synapse; Alzheimer's disease

作者介绍: 刘忠锦, Email: 23741166@qq.com,

研究方向: 神经退行性疾病。

通信作者: 张海燕, Email: 296513983@qq.com。

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(编号: H2016101)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190301.0933.002.html>

(2019-03-04)

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是由于神经退行性改变而引发的痴呆。AD 病理特征表现在中枢神经系统出现大量老年斑和神经原纤维缠结以及大量神经元受损和突触丧失,临床表现为记忆障碍、失认、视空间能力损害等^[1]。随着中国人口结构老龄化的加快,AD 将成为 21 世纪重要的公共健康问题。目前 AD 治疗效果并不理想,无法从根本上阻止 AD 的进展。表没食子儿茶素没食子酸酯(epi-gallocatechin-3-gallate, EGCG)从绿茶中提取的儿茶素类单体,也是绿茶的主要活性成份。目前研究^[2-3]证实 EGCG 具有很强的抗氧化活性,可抑制各种诱因导致的神经元凋亡,对中枢神经系统具有一定的保护作用。APP/PS1 双转基因小鼠是目前国际公认的 AD 动物模型^[4],本研究以 APP/PS1 双转基因小鼠为模型动物,观察 EGCG 对小鼠空间学习记忆能力、海马 CA1 区神经元超微结构和突触功能相关蛋白及受体表达的变化,探讨 EGCG 对老年痴呆小鼠的神经突触损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

雄性 8 周龄 APP/PS1 双转基因小鼠共 20 只,体质量(20±2) g。均购买自南京模式动物研究所,动物合格证编号:SCXK(苏)2018-0008。所有动物在齐齐哈尔医学院 SPF 级实验室的独立送风系统动物中心饲养,(25℃左右,相对湿度 40%,屏障环境,并保证充足的进食和饮水。所有动物饲养和实验操作程序按照国际动物实验委员会有关的规章制度进行,并经齐齐哈尔医学院动物伦理委员会批准。所有小鼠称重后,APP/PS1 双转基因小鼠随机分为模型组、EGCG 组,每组 10 只,另以同窝同性别阴性小鼠 10 只设立正常组,共 3 组。

1.2 药物

EGCG,大连美仑生物科技有限公司,CAS 号:989-51-5。

1.3 主要试剂和仪器

兔抗小鼠突触后致密物质-95(PSD95)抗体;兔抗小鼠生长相关蛋白 43(GAP43)抗体;FITC 标记山羊抗兔与抗鼠二抗、HRP 标记山羊抗兔与抗鼠二抗、BCA 蛋白定量试剂盒,由 Cell Signaling Technology 提供;Morris 水迷宫(Morris water maze, MWM)装置及 SMART 3.0 软件购自深圳瑞沃德生命科技有限公司;透射式电子显微镜(FE1 Tecnai 12 荷兰);超薄切片机(德国 Leica 公司);自动染色机(德国 Leica 公司);ChemiDoc XRS + 凝胶成像分析仪(Bio-Rad,上海天能科技有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 给药方法 EGCG 组用生理盐水溶解,按 20 mg/(kg·d)剂量灌胃给药,每天 1 次;正常组及模型组均给予等量生理盐水按 0.1 mL/10 g 的量给药。连续灌胃给药 6 个月后进行

行为学测试。

1.4.2 行为学测试 采用 Morris 水迷宫实验方法^[5]分别进行定位航行实验和空间探索平台实验。小鼠每天分别于上午 8:00 和下午 2:00 各进行 2 次试验,每次实验时间 60 s,分别以 4 个象限池壁作为入水点,各组小鼠每天训练 2 次,历时 8 d,经 60 s 未找到平台者,将其引领至平台,放置 30 s 引导其学习记忆。记录小鼠找到平台用时即为潜伏期。第 8 天,撤掉平台,记录小鼠在 60 s 内在目的象限的游泳距离及穿越平台次数。

1.4.3 电镜观察海马超微结构 小鼠于末次行为学测试后,每组随机选取 5 只小鼠,动物麻醉后打开胸腔,暴露心脏,自右心尖轻柔进针,剪开左心耳,先以 0.9%生理盐水灌注直至流出液体为澄清肝脏变白,然后用含 0.2%戊二醛的 4%的福尔马林充分灌注后,低温下快速取脑组织,分别光镜和电镜观察脑组织结构。放入 0.2%的戊二醛溶液固定 24 h。将经戊二醛固定过的脑组织用 0.1 mol/L PBS 缓冲液浸洗 30 min,冲洗后的脑组织放入 1%四氧化锇固定液中固定 2 h 后取出 0.1 mol/L PBS 缓冲液浸洗,10 min;然后依次逐级乙醇脱水 10 min;70%乙醇醋酸双氧铀处理 1h;还氧丙烷置换 10 min;环氧树脂包埋^[6];超薄切片机进行超薄切片 70 nm;采用电子显微镜下观察、拍照。

1.4.4 免疫组化法检测小鼠海马 PSD95、GAP43 蛋白表达 石蜡切片脱蜡至水。3% H₂O₂ 室温孵育 5~10 min,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min。5%~10%正常山羊血清封闭,室温孵育 10 min。倾去血清,勿洗,滴加适当比例稀释的一抗工作液,4℃过夜。PBS 冲洗,5 min×3 次。滴加适当比例稀释的生物素标记二抗,37℃孵育 10~30 min。PBS 冲洗,5 min×3 次。滴加适当比例稀释的辣根酶标记链霉卵白素,37℃孵育 10~30 min。PBS 冲洗,5 min×3 次。DAB 显色剂显色。自来水充分冲洗,复染,封片。光学显微镜下观察、拍照。

1.4.5 RT-PCR 检测小鼠海马 PSD95、GAP43 蛋白表达 治疗结束后第 2 天,颈椎脱臼处死每组剩余的 5 只小鼠,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:PSD95(498 bp):上游引物:5'-GCCCTGTTTGATT-ACGAC-3',下游引物:5'-GAAGTTGTGTGCCTGGATGT-3' GAP43(206 bp):上游引物:5'-CGCGAAAAGATCCCAAGT-CCA-3',下游引物:5'-GAACGGAACATTGCACACAC-3' β-actin(302 bp):上游引物:5'-TCAGGAGTAGCAATGATCTTG-3',下游引物:5'-TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA-3'。PCR 反应体系 25 μL,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 的产物 5 μL 和溴酚蓝载样缓冲液 1 μL,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,计算 PSD95 mRNA、GAP43 mRNA 条带灰度值与 β-actin 条带灰度值的比值反映 PSD95 mRNA、GAP43 mRNA 表达水平。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 进行统计分析,所得数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠空间学习记忆能力比较

治疗后模型组逃避潜伏期无明显变化,与模型组比较,EGCG 组逃避潜伏期均明显缩短,差异有统计学意义($P=0.000$)。治疗后模型组跨越平台次数无明显变化,与模型组比较,EGCG 组跨越平台次数均增多,差异有统计学意义($P=0.000$)(表 1)。

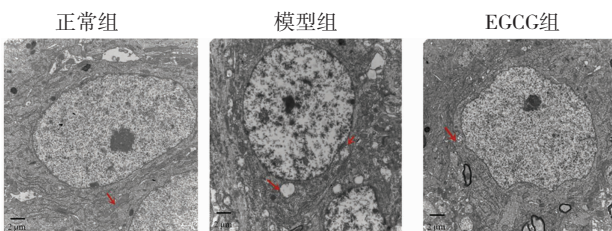
表 1 各组小鼠逃避潜伏期和跨平台次数比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	逃避潜伏期(s)		跨越平台次数(次)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
正常组	31.95 ± 7.07 ^a	21.02 ± 3.39 ^a	6.60 ± 1.35 ^a	7.00 ± 1.63 ^a
模型组	51.21 ± 5.67	47.51 ± 5.24	2.90 ± 1.29	2.80 ± 1.03
EGCG组	47.97 ± 4.89	35.29 ± 3.67 ^a	3.30 ± 1.57	4.71 ± 1.16 ^a
<i>F</i> 值	30.113	100.677	20.848	26.133
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与模型组比较,a, $P<0.05$

2.2 各组小鼠海马神经元超微结构

对照组海马神经元核膜完整,染色质分布均匀,线粒体圆形或杆状,脊清晰可见;模型组染色质稀疏,线粒体肿胀,脊消失,EGCG 组显著改善了这一状况,染色质分布均匀,偶有线粒体肿胀,脊欠清晰(图 1)。



注:箭头所示为线粒体

图 1 各组小鼠海马神经元超微结构

2.3 各组小鼠免疫组化海马 PSD95、GAP43 蛋白表达

EGCG 治疗后可以提高小鼠海马中 PSD95 的表达,并且降低 GAP43 的表达(表 2,图 2)。PSD95 的免疫组化结果显示,与模型组相比,EGCG 组的平均光密度值明显增加且低于正常组,差异有统计学意义($P=0.001$)。同时,GAP43 的免疫组化结果显示,与模型组相比,EGCG 组的平均光密度值降低但略高于正常组,差异有统计学意义($P=0.006$)。

2.4 RT-PCR 检测各组小鼠海马 PSD95 mRNA、GAP43 mRNA 表达

EGCG 治疗后可以提高小鼠海马中 PSD95 mRNA 的表达,并且降低 GAP43 mRNA 的表达(表 3,图 3)。PSD95 的 RT-PCR 结果显示,与模型组相比,EGCG 组的 PSD95 mRNA

明显增加且低于正常组,差异有统计学意义($P=0.000$)。同时,GAP43 的 RT-PCR 结果显示,与模型组相比,EGCG 组的 GAP43 mRNA 明显降低且高于正常组,差异有统计学意义($P=0.000$)。

表 2 各实验组中 PSD95、GAP43 蛋白平均光密度的表达

组别	($\bar{x} \pm s, n=5$)	
	PSD95	GAP43
正常组	0.15 ± 0.03 ^a	0.07 ± 0.02 ^a
模型组	0.05 ± 0.02	0.16 ± 0.04
EGCG组	0.11 ± 0.03 ^a	0.10 ± 0.03 ^a
<i>F</i> 值	14.399	11.364
<i>P</i> 值	0.001	0.002

注:与模型组比较,a, $P<0.05$

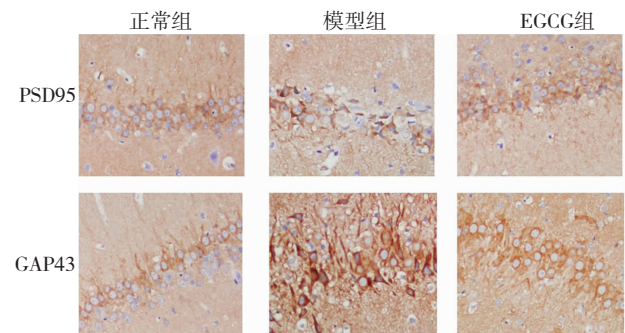


图 2 免疫组化海马 PSD95、GAP43 蛋白在各实验组中的表达 (10 × 40)

表 3 各实验组中 PSD95 mRNA、GAP43 mRNA 表达水平

组别	($\bar{x} \pm s, n=5$)	
	PSD95mRNA	GAP43mRNA
正常组	0.98 ± 0.10 ^a	0.76 ± 0.11 ^a
模型组	0.50 ± 0.06	1.56 ± 0.16
EGCG组	0.82 ± 0.11 ^a	1.12 ± 0.11 ^a
<i>F</i> 值	34.299	48.472
<i>P</i> 值	0.000	0.000

注:与模型组比较,a, $P<0.05$

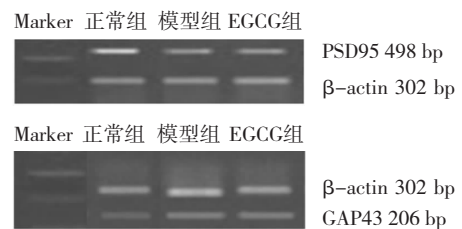


图 3 各实验组中 PSD95 mRNA、GAP43 mRNA 表达

3 讨论

AD 属于老年神经退行性疾病,临床表现主要为记忆、认知和性格逐渐减退。有研究证实,神经系统

中起到信息传递作用的结构是突触,神经元结构受损,海马突触联系的丧失是引起记忆和认知障碍的原因,也是 AD 患者脑内重要的神经病理学改变。突触在形态结构、数量及功能状态调节方面的可塑性在很大程度上决定了神经系统的可塑性^[7]。因此,突触丧失是 AD 的结构基础。本实验运用 Morris 水迷宫实验方法来检测小鼠学习记忆能力,治疗后模型组逃避潜伏期无明显变化,EGCG 组逃避潜伏期均明显缩短。治疗后模型组跨越平台次数无明显变化,EGCG 组跨越平台次数均增多,说明 EGCG 治疗后小鼠的学习记忆能力得到改善。超微结构显示:模型组海马神经元细胞核内的染色质分布不均,线粒体呈空泡状,EGCG 组细胞核内的染色质分布正常,线粒体偶有肿胀,脊欠清晰,提示 EGCG 对神经元形态的损伤起到保护作用。

富含脯氨酸的 PSD95 位于突触后膜上,是突触后成分致密区的核心构架蛋白,是膜结合鸟氨酸蛋白激酶超家族中的一员。PSD95 参与突触活性和细胞内信号转导,是重要的神经细胞骨架蛋白。同时 PSD95 能接受和整合信号并将其传导给突触后神经元^[8],同时能够稳定突触后膜的结构,在突触可塑性中具有重要作用。检测 PSD95 的蛋白含量可估算突触发生和突触传递效能,是反映突触重建水平的重要标志^[9]。本实验免疫组化结果显示,与模型组相比,EGCG 组 PSD95 的平均光密度值明显增加且低于正常组,PSD95 mRNA 明显增加且低于正常组,提示 EGCG 治疗 AD 的有效性可能与促进 PSD95 的表达,从而稳定突触连接、改善突触可塑性、恢复信号传递相关。

在神经元发育和神经再生过程中,GAP43 是一种突触前膜蛋白,在神经元的轴丘、轴突及突触前末梢大量表达。该蛋白可通过加速轴丘基部膜的扩展而促进轴突生长,调节轴丘及神经元形态,参与神经元损伤后轴突再生和突触重建过程,被认为是神经元发育和再生的一个内在决定因子,可作为神经元损伤后再生的标志^[10]。正常情况下 GAP43 呈低水平表达,在神经元发育和损伤等情况下大量表达。本实验免疫组化结果显示,与模型组相比,EGCG 组的 GAP43 的平均光密度值降低但略高于正常组,GAP43 mRNA 明显降低,提示 EGCG 治疗 AD 的有效性可能下调 GAP43 的表达,两种突触相关蛋白在突触连接中起到了上下贯通的“桥梁”作用,从而改善突触可塑性。

EGCG 被认为是茶叶中重要的活性成份^[11]。属

于儿茶素一种,分子量为 453 kD,含有 8 个酚羟基,从结构上使得 EGCG 具有强抗氧化性。有研究^[12]证实 EGCG 对成年动物海马神经干细胞增殖和神经元存活具有促进作用,说明 EGCG 对神经系统具有保护作用。本实验结果与其一致,EGCG 对 APP/PS1 转基因模型小鼠学习记忆能力改善,其机制可能与其提高 PSD95 及降低 GAP43 在小鼠海马组织中表达有关。当然,本实验研究结果仍属初步探索,关于 EGCG 改善学习记忆能力,防治 AD 的深层次作用机制,值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Reiman EM. Alzheimer's disease and other dementias: advances in 2013[J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(1): 3-5.
- [2] Ahmed NA, Radwan NM, Aboul Ezz HS, et al. The antioxidant effect of Green Tea Mega EGCG against electromagnetic radiation-induced oxidative stress in the hippocampus and striatum of rats[J]. *Electromagn Biol Med*, 2017, 36(1): 63-73.
- [3] 杨海玉,刘勇,胡建新,等. 绿茶提取物表没食子儿茶素没食子酸酯对酒精诱导 SH-SY5Y 细胞损伤的作用研究[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(12): 1900-1904.
- [4] Yao ZG, Zhang L, Liang L, et al. The effect of PN-1, a traditional Chinese prescription, on the learning and memory in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Evid-Based Complement Alternat Med*, 2013, 2(17): 2-12.
- [5] Renno WM, Al-Khaledi G, Mousa A, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates neurological function when intravenously infused in acute and, chronically injured spinal cord of adult rats[J]. *Neuropharmacology*, 2014, 77: 100-119.
- [6] 张磊,顾晶晶,谢敏娟,等. 基于定位技术的脑组织超薄电镜切片制作方法[J]. *中国临床解剖杂志*, 2013, 31(4): 487-488.
- [7] 朱田田,邢家铭,严兴科. 针刺对单眼剥夺大鼠视皮层突触结构可塑性的调节机制研究[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(5): 2319-2322.
- [8] 狄亚琪,桑旭星,方芳. 开心散对 APP/PS1 转基因小鼠在体 LTP 和 PSD95 表达的影响[J]. *中成药*, 2017, 39(03): 471-475.
- [9] 刘炜,刘丽星,史晓伟,等. 三七皂苷对局灶性脑缺血大鼠不同恢复时点神经重塑和突触重建的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(5): 1556-1559.
- [10] 高彦斌,第五永长,唐学成,等. 洗心汤对 APP/PS1 双转基因小鼠突触功能相关蛋白及受体表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志* 2018, 38(4): 694-699.
- [11] Huang CC, Tung YT, Huang WC, et al. Beneficial effects of cocoa, coffee, green tea, and garcinia complex supplement on diet induced obesity in rats[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2016, 16: 100-110.
- [12] 杨海玉,刘勇,胡建新,等. 绿茶提取物 EGCG 对乙醇诱导原代海马神经元损伤的保护作用及其机制[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(4): 694-699.

(责任编辑:唐秋姍)