

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002469

瑞舒伐他汀钙联合多奈哌齐对阿尔茨海默病模型小鼠炎症反应的影响

刘忠锦¹, 王海军¹, 李瑞卿¹, 张海燕², 刘佳¹, 孟明¹, 郎尉雅²

(齐齐哈尔医学院 1. 附属第一医院神经内科; 2. 基础医学院组胚教研室, 齐齐哈尔 161000)

【摘要】目的:研究瑞舒伐他汀钙联合多奈哌齐对阿尔茨海默病模型小鼠炎症因子表达的影响。**方法:**APP/PS1 双转基因小鼠随机分为模型组、多奈哌齐组、瑞舒伐他汀钙组和联合治疗组, 每组 10 只。多奈哌齐组剂量为 1.3 mg/(kg·d), 瑞舒伐他汀钙组剂量为 1 mg/(kg·d), 联合治疗组采用瑞舒伐他汀钙和盐酸多奈哌齐联合给药, 剂量分别为 1 mg/(kg·d) 和 1.3 mg/(kg·d), 3 组均采用灌胃给药。模型组不予治疗。Morris 水迷宫实验测试各组小鼠逃避潜伏期, 亚甲蓝染色观察各组小鼠海马神经元损伤的形态改变, 免疫组化法检测小鼠海马白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK)表达, Western blot 检测小鼠海马 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 含量。**结果:**治疗后多奈哌齐组、瑞舒伐他汀钙组和联合治疗组逃避潜伏期缩短, 但联合治疗组好于多奈哌齐组、瑞舒伐他汀钙组。免疫组化显示, 与模型组比较, 联合治疗组 IL-1 β (0.37 $\pm$ 0.05 vs. 0.52 $\pm$ 0.09, $P=0.001$)、TNF- α (0.42 $\pm$ 0.08 vs. 0.69 $\pm$ 0.11, $P=0.002$) 和 p38MAPK (0.39 $\pm$ 0.06 vs. 0.61 $\pm$ 0.10, $P=0.001$) 平均光密度的表达明显降低。Western blot 检测结果再次验证, 与模型组比较, 多奈哌齐组、瑞舒伐他汀钙组和联合治疗组 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 蛋白表达水平降低。**结论:**瑞舒伐他汀钙联合多奈哌齐对 APP/PS1 转基因小鼠的空间学习记忆和神经元损伤有明显的改善作用, 可能通过抑制 p38MAPK 通路, 共同降低海马中的炎症因子产生。

【关键词】瑞舒伐他汀钙; 多奈哌齐; 炎症因子; 阿尔茨海默病**【中图分类号】**R741.02**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-01-06

Effects of rosuvastatin calcium combined with donepezil on inflammatory response in mice with Alzheimer's disease

Liu Zhongjin¹, Wang Haijun¹, Li Ruiqing¹, Zhang Haiyan², Liu Jia¹, Meng Ming¹, Lang Weiya²

(1. Department of Neurology, The First Hospital Affiliated to Qiqihar Medical College;

2. Teaching and Research Section of Histology and Embryology, Basic Medical College, Qiqihar Medical University)

【Abstract】Objective: To study the effects of rosuvastatin calcium combined with donepezil on the expression of inflammatory factors in rats with Alzheimer's disease. **Methods:** APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into model group, donepezil group, rosuvastatin group and combined treatment group, 10 mice in each group. The dose of donepezil hydrochloride group [donepezil 1.3 mg/(kg·d) infusion], rosuvastatin calcium group [rosuvastatin calcium 1 mg/(kg·d) infusion], combined treatment group [rosuvastatin calcium 1 mg/(kg·d), donepezil 1.3 mg/(kg·d) infusion]. The model group was not treated. Morris water maze was used to test the escape latency of mice in each group. Methylene blue staining was used to observe the morphological changes of hippocampal neurons in each group. Immunohistochemical method was used to detect the expression of IL-1 β , TNF- α and p38MAPK in hip-

pocampus of mice. Western blot was used to detect the content of IL-1 β , TNF- α and p38MAPK in hippocampus of mice. **Results:** After treatment, the escape latency was shortened in donepezil group, rosuvastatin group and combined therapy group, but the combined therapy group was better than donepezil group and rosuvastatin group. The results of immunohistochemistry showed

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:**黑龙江省教育厅资助项目(编号: 2016-KYYWF-0877)。**优先出版:** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200507.1605.006.html>

(2020-05-08)

that the average optical density of IL-1 β (0.37 ± 0.05 vs. 0.52 ± 0.09 , $P=0.001$), TNF- α (0.42 ± 0.08 vs. 0.69 ± 0.11 , $P=0.002$) and p38MAPK (0.39 ± 0.06 vs. 0.61 ± 0.10 , $P=0.001$) in combined treatment group were lower than that in model group. The results of Western blot showed that the expression of IL-1 β , TNF- α and p38MAPK in donepezil group, rosuvastatin group and combined treatment group were lower than that in model group. **Conclusion:** Rosuvastatin calcium combined with donepezil can significantly improve the spatial learning, memory and neuron damage of APP/PS1 transgenic mice. It may decrease the production of inflammatory factors in hippocampus by inhibiting p38MAPK pathway.

[Key words] rosuvastatin calcium; donepezil; inflammatory factors; Alzheimer's disease

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 发病隐匿, 是患者出现认知功能障碍和进行性记忆减退为主要表现的一种神经系统退行性疾病。近年来学者研究认为炎症反应参与 AD 的病理过程^[1]。AD 的发生与 β -淀粉样蛋白 (amyloid- β protein, A β) 表达及高血脂水平密切相关, β -淀粉样蛋白过度表达激活周围的星形胶质细胞, 促进多种炎症因子如白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、补体等的产生, 从而导致一系列的炎症反应, 神经元损伤影响记忆及认知功能^[2]。APP/PS1 双转基因小鼠能很好地模拟 AD 的病理变化, 是目前国际公认的 AD 模型小鼠之一。多奈哌齐为常见的胆碱酯酶抑制剂, 可抑制胆碱能神经活动保护神经的作用, 现已被广泛用于 AD 治疗。瑞舒伐他汀是新一代他汀类药物, 能够通过抑炎、抗氧化、降低血黏度、保护血管内皮功能等作用来加速神经传导和突触传递^[3], 对大脑的学习和记忆起重要作用。目前, 国内尚缺乏瑞舒伐他汀钙联合多奈哌齐对 AD 炎症影响的报道。本实验通过观察瑞舒伐他汀钙联合多奈哌齐对 AD 小鼠海马组织炎症因子的影响, 为临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 4 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠 [南京模式动物研究所, 动物合格证编号: SCXK(苏)2018-0008] 共 40 只, 体质量 (25 ± 2) g。于齐齐哈尔医学院动物中心饲养, 饲养温度 20°C 左右, 相对湿度 40%, 保证充足的进食和饮水。经齐齐哈尔医学院动物伦理委员会批准。

1.2 药物

瑞舒伐他汀钙, 10 mg/片, Astra Zeneca UK Limited, CAS 号: 147098-20-2; 盐酸多奈哌齐片, 5 mg/片, 上海迈瑞尔化学技术有限公司, CAS 号: 120011-70-3。

1.3 主要试剂和仪器

鼠 IL-1 β 、TNF- α 、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinases, p38MAPK) 试剂盒由 Abcam 提供; SDS-PAGE 试剂盒购于碧云天生物技术有限公司; Morris 水迷宫装置及 SMART 3.0 软件购自深圳瑞沃德公司; 光学显微镜 (OLIPAS); 超薄切片机 (德国 Leica 公司); 自动染色机 (德国 Leica 公司); 凝胶成像分析仪 (Bio-Rad 公司)。

1.4 方法

1.4.1 分组和给药方法 实验分为 4 组, 其中 APP/PS1 双转基因小鼠随机分为模型组、多奈哌齐组、瑞舒伐他汀钙组和联合治疗组, 每组 10 只。多奈哌齐组剂量为 $1.3 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 瑞舒伐他汀钙组剂量为 $1 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[4], 联合治疗组采用瑞舒伐他汀钙和盐酸多奈哌齐联合灌胃给药, 剂量分别为 $1 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 和 $1.3 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 3 组均采用灌胃给药。模型组不予治疗。连续给药 3 个月后结果检测。

1.4.2 Morris 水迷宫检测 小鼠每天分别于 9:00 和 15:00 进行 2 次训练, 每次训练时间为 60 s, 依照顺时针方向逐次从 4 个入水点面向池壁放入水中, 视频摄像系统追踪并记录寻找上平台所需的时间 (逃避潜伏期)。如在 60 s 内未找到平台, 实验人员需引领小鼠到达平台, 并停留 20 s, 引导小鼠学习记忆^[5]。第 5 天, 记录小鼠在 60 s 内找到平台的时间。

1.4.3 海马 CA1 区病理观察 每组取 5 只小鼠断头处死后, 冰台上快速取脑组织分离并提取完整海马组织放入液氮中快速冷冻并包埋, 用恒冷箱切片 (片厚 $10 \mu\text{m}$), 亚甲蓝染液 15 min 后, 置于显微镜下观察小鼠海马 CA1 区神经元形态变化情况。

1.4.4 免疫组化法检测小鼠海马 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 表达 石蜡切片脱蜡后, 5% 标准山羊血清封闭 1 h, PBS 中

洗涤 3 次,每次 5 min。使用柠檬酸钠缓冲液在高压锅中加热 10 min,冷却至室温,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;滴入血清,然后放置到 37 °C 温箱中 30 min。取出滴加一抗(IL-1 β :1:250, TNF- α :1:250,p38MAPK:1:250)4 °C 孵育过夜。第 2 天恢复室温后滴加二抗(IL-1 β :1:200, TNF- α :1:200,p38MAPK:1:200)室温孵育 90 min。PBS 洗涤 5 次,每次 5 min 后,加入 DAB 显色液 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,再用双蒸水冲洗。

1.4.5 Western blot 检测小鼠海马 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 蛋白表达水平 每组剩余 5 只鼠,取海马组织加入 RIPA 裂解液后磨碎,离心 10 min 取上清。取适量蛋白,加入溴酚蓝与 RIPA,煮沸将蛋白样品彻底变性,进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后,将所在的条带切下并转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 1h 后,加入一抗(IL-1 β :1:250, TNF- α :1:250, p38MAPK:1:250)孵育过夜。次日摇床上洗 3 次,每次 10 min,再加入二抗(IL-1 β :1:500, TNF- α :1:500, p38MAPK:1:500)室温孵育 60 min, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,显色分析结果。

1.5 统计学处理

所有计量资料数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用 One-Way ANOVA 单因素方差分析,2 组间比较采用 LSD 检验分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠学习记忆能力情况

治疗前各组小鼠的逃避潜伏期与模型组无统计学差异。治疗后多奈哌齐组、瑞舒伐他汀钙组和联合治疗组逃避潜伏期缩短,与模型组比较,差异有统计学意义($P=0.000$),联合治疗组优于多奈哌齐组、瑞舒伐他汀钙组,但无统计学差异(表 1)。

表 1 小鼠逃避潜伏期情况($\bar{x} \pm s, n=10, s$)

组别	治疗前	治疗后
模型组	50.97 $\pm$ 5.40	47.41 $\pm$ 5.08
多奈哌齐组	47.36 $\pm$ 2.98	39.57 $\pm$ 3.39 ^a
瑞舒伐他汀钙组	46.15 $\pm$ 2.21	40.12 $\pm$ 3.26 ^a
联合治疗组	47.85 $\pm$ 2.34	35.09 $\pm$ 3.74 ^a
<i>F</i> 值	33.052	101.697
<i>P</i> 值	0.100	0.000

注:a,与模型组比较, $P<0.05$

2.2 各组小鼠海马神经元病理改变情况

模型组海马区神经元排列紊乱稀疏,结构不清,胞核固缩,核仁模糊。多奈哌齐组、瑞舒伐他汀钙组细胞排列紊乱,但细胞层数增多,个别细胞胞核固缩、深染。联合治疗组海

马区神经元层排列较规则,仅有个别细胞胞核固缩、深染(图 1)。

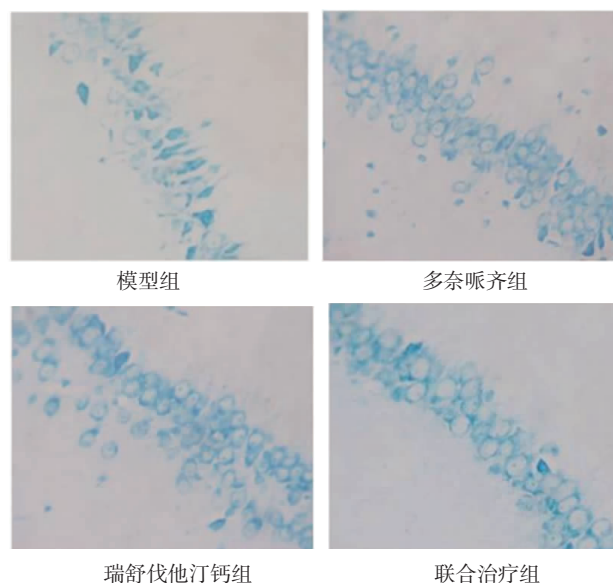


图 1 各组小鼠海马神经元病理改变(亚甲蓝染色,400 $\times$)

2.3 各组小鼠免疫组化海马 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 蛋白表达

海马 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 蛋白阳性表达在胞体内。模型组中 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 平均光密度的高表达。与模型组比较,多奈哌齐组、瑞舒伐他汀钙组和联合治疗组 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 平均光密度的表达明显降低,差异有统计学意义($P=0.001, P=0.002, P=0.001$),联合治疗组低于单独用药组,但无统计学差异(表 2,图 2)。

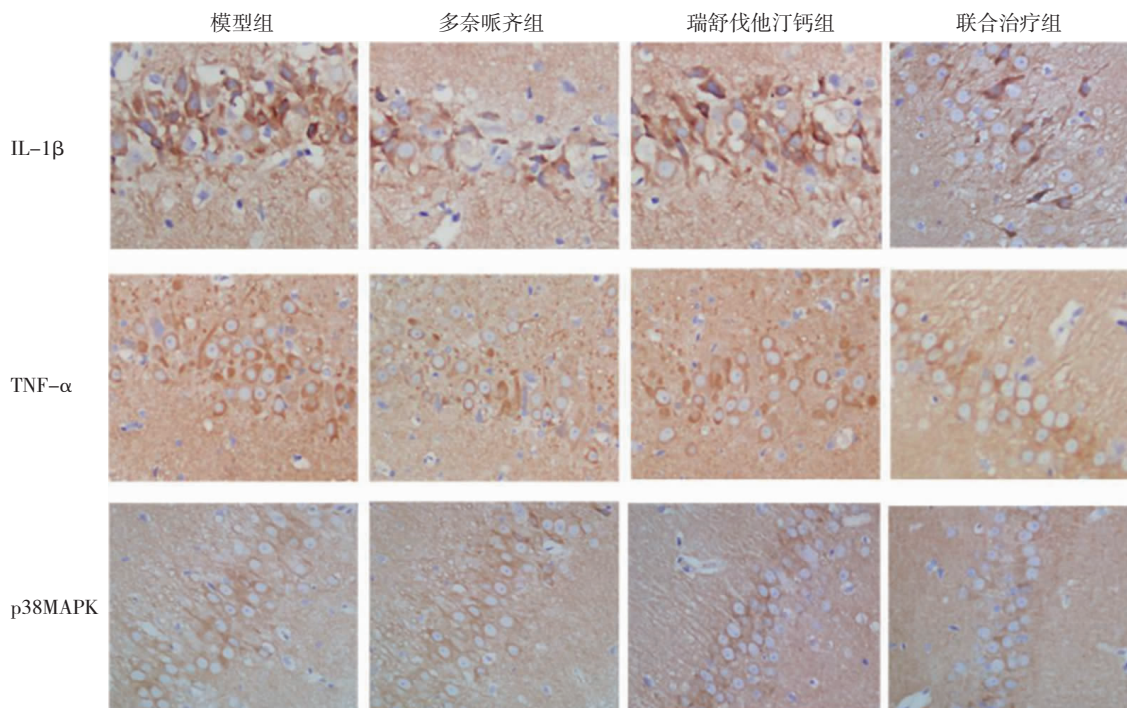
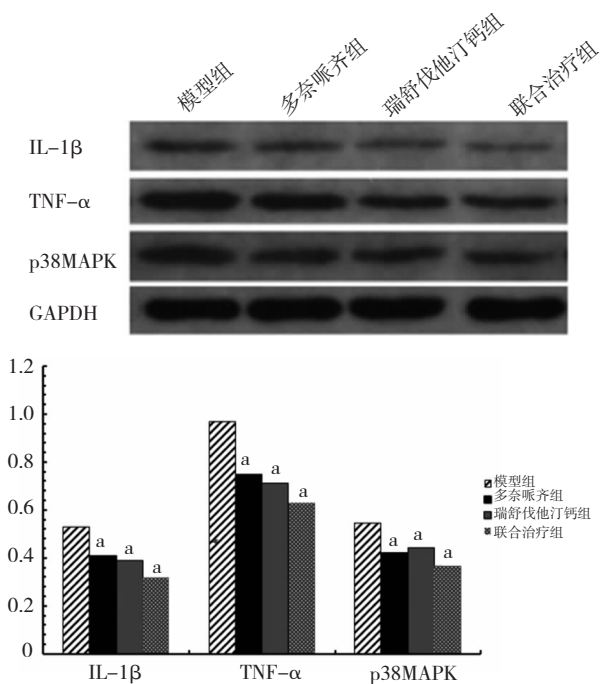
表 2 各实验小鼠海马 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 平均光密度表达($n=5$)

组别	IL-1 β	TNF- α	p38MAPK
模型组	0.52 $\pm$ 0.09	0.69 $\pm$ 0.11	0.61 $\pm$ 0.10
多奈哌齐组	0.41 $\pm$ 0.06 ^a	0.51 $\pm$ 0.09 ^a	0.46 $\pm$ 0.08 ^a
瑞舒伐他汀钙组	0.43 $\pm$ 0.07 ^a	0.54 $\pm$ 0.12 ^a	0.52 $\pm$ 0.09 ^a
联合治疗组	0.37 $\pm$ 0.05 ^a	0.42 $\pm$ 0.08 ^a	0.39 $\pm$ 0.06 ^a
<i>F</i> 值	14.269	11.647	13.254
<i>P</i> 值	0.001	0.002	0.001

注:a,与模型组比较, $P<0.05$

2.4 各组小鼠 Western blot 检测海马 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 表达

模型组中 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 蛋白表达水平升高。与模型组比较,多奈哌齐组、瑞舒伐他汀钙组和联合治疗组 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义($P=0.000, P=0.000, P=0.000$)(图 3)。

图 2 各组小鼠海马组织 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 的表达 (200 $\times$)注:a,与模型组比较, $P<0.05$ 图 3 Western blot 检测小鼠海马组织 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 的表达

3 讨论

AD是全球面临的一个重大公共卫生问题。21世纪人口老龄化加剧,发病率显著提高。65岁以上

人群中超过 1/8 受此病影响^[6]。然而,目前 AD 的发病机制尚未完全明确,导致其治疗仍限于对症阶段。AD 的发病机制与 A β 的生成/清除不平衡、tau 蛋白过度磷酸化和神经元凋亡相关。A β 沉积是 AD 进程中的关键性标志。A β 还可激活胶质细胞释放促炎因子,从而诱导中枢神经系统炎症级联放大反应,进一步损伤神经元。本实验用 Morris 水迷宫检测结果:治疗前各组小鼠的逃避潜伏期与模型组无明显差异。治疗后多奈哌齐组、瑞舒伐他汀钙组和联合治疗组逃避潜伏期缩短,但联合治疗组好于多奈哌齐组、瑞舒伐他汀钙组,说明瑞舒伐他汀钙联合多奈哌齐治疗后小鼠的学习记忆能力明显改善。病理检测显示,模型组神经元数量减少,排列紊乱。联合治疗组小鼠海马区神经元层排列较规则,仅有个别细胞胞核固缩、深染。多奈哌齐组、瑞舒伐他汀钙组细胞排列紊乱,但细胞层数增多,提示瑞舒伐他汀钙联合多奈哌齐治疗对 AD 模型小鼠的神经元形态起恢复作用。

有证据表明,损伤的神经或 A β 沉积刺激炎症因子自我增殖,IL-1 β 水平持续升高,继而神经元和突触功能缺陷更严重^[7]。TNF- α 也是重要的炎症因

子,正常人体中枢神经系统只有神经元可产生低水平的 TNF- α 。然而 TNF- α 通过增加淀粉样 β 前体蛋白裂解酶的表达和 γ 分泌酶的活性诱导 A β 生成。TNF- α 可使离体海马中少突胶质细胞生长和髓鞘生长受抑制^[8]。因此 IL-1 β 、TNF- α 炎症因子水平升高在 AD 中起重要作用。作为 MAPK 家族的重要成员,氧化应激、炎症因子等因素可以激活 p38MAPK 信号通路,诱导 AD 神经元凋亡^[9]。MAPK 通路在 AD 中 A β 的沉积密切相关,可激活 p38MAPK 通路,诱导小胶质细胞活化产生 TNF- α 等因子。TNF- α 能以非依赖的方式激活 MAPK,诱导 MAPK 释放多种炎症因子如 IL-1 β 、TNF- α 等^[10],所以抑制 p38MAPK 的激活,可以减少炎症因子的释放^[11]。

多奈哌齐增加脑血流量,减少 MAPK 激活,抑制 p38MAPK 表达,降低炎症因子表达,有助于改善 AD 模型小鼠的认知功能^[12]。瑞舒伐他汀钙抑制巨噬细胞活化,下调炎症细胞因子表达,从而改善脑代谢^[13]。本实验免疫组化结果显示,与模型组比较,多奈哌齐组、瑞舒伐他汀钙组和联合治疗组 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 平均光密度的表达明显降低,联合治疗组效果更佳;Western blot 检测结果也一致。说明联合用药抑制 IL-1 β 、TNF- α 和 p38MAPK 表达。

综上所述,瑞舒伐他汀钙和多奈哌齐联合治疗后,共同抑制海马中的炎症因子产生,最终实现改善认知功能障碍等症状,但其具体机制仍需进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Domingues C, da Cruz E, Hennques AG, et al. Impact of cytokines and chemokines on Alzheimer's disease neuropathological hallmarks[J]. Curr Alzheimer Res, 2017, 14(8): 870-882.
- [2] 王喜丰,汪敏,李刚,等. 中性鞘磷脂酶-2(neutral sphingomyelin-2, N-SMase2)对大鼠脑缺血再灌注损伤中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 炎症因子的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35(4): 310-313.
- [3] 韩燕,唐春霞. 多奈哌齐联合瑞舒伐他汀治疗老年血管性痴呆疗效及对血清炎症因子、氧化应激的影响[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2018, 15(6): 116-119.
- [4] 杨之雪,唐成林,李小宏,等. 电针调控 SAMP8 小鼠血脑屏障增强盐酸多奈哌齐对 A β 清除效果的机制研究[J]. 针刺研究, 2019, 44(11): 1-10.
- [5] 刘忠锦,张海燕,孙丽慧,等. EGCG 对 APP/PS1 双转基因小鼠神经突触损伤的保护作用[J]. 重庆医科大学学报, 2019, 44(4): 430-433.
- [6] Galasko DR, Shaw LM. Alzheimer disease: CSF biomarkers for Alzheimer disease—approaching consensus[J]. Nat Rev Neurol, 2017, 13(3): 131-132.
- [7] 甘娜,尹飞,彭镜,等. IL-1 β 通过 PI3K/Akt/mTOR 途径促进神经元活化[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(3): 397-402.
- [8] 苗强,张晓雪,阴俊俊,等. 银杏内酯 K 通过抑制小胶质细胞介导的炎症反应保护髓鞘[J]. 山西中医学院学报, 2019, 20(4): 250-253.
- [9] Li H, Zhou S, Wu L, et al. The role of p38MAPK signal pathway in the neuroprotective mechanism of limb postconditioning against rat cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. J Neurol Sci, 2015, 357(1-2): 270-275.
- [10] Feld MI, Krawczk MC, Solfratiana M, et al. Decrease of ERK/MAPK overactivation in prefrontal cortex reverses early memory deficit in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2014, 40(1): 69-82.
- [11] 张晓璇,马征,于宁,等. 丁苯酞对缺血性脑卒中大鼠海马神经元凋亡的抑制作用及其对 p38MAPK 信号通路的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2019, 45(5): 1086-1091.
- [12] 何群. 瑞舒伐他汀联合盐酸多奈哌齐治疗阿尔茨海默病疗效观察[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2017, 20(8): 107-108.
- [13] 郭思繁,胡洁云,楼晓霞,等. 瑞舒伐他汀联合盐酸多奈哌齐对阿尔茨海默病患者认知功能的改善效果观察[J]. 中国医师杂志, 2018, 20(8): 1199-1201.

(责任编辑:唐秋姗)