

白桦脂醇对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠认知及海马突触功能相关蛋白表达的影响

傅增辉, 姜岩, 杜姝, 张广萍, 刘晶, 陈团团, 林再红, 金艳

齐齐哈尔医学院附属第三医院神经内科, 黑龙江 齐齐哈尔 161002

摘要:目的 探讨白桦脂醇对阿尔茨海默病(AD)小鼠的学习记忆功能的干预作用及海马突触功能相关蛋白表达的影响,为探索治疗 AD 提供新的可能。方法 采用白桦脂醇干预 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠,将小鼠随机分为模型组、药物高剂量组和低剂量组,C57BL/6J 健康小鼠为对照组。通过行为学观察学习记忆能力、在体电生理记录海马神经元的生物电、TUNEL 法检测神经元凋亡、Realtime PCR 法检测 PSD-95 和 Synapsin-I 水平。结果 水迷宫检测结果发现白桦脂醇能改善模型小鼠认知功能障碍;电生理检测 AD 模型组长时程增强(LTP)幅值低于对照组,经过白桦脂醇干预治疗后,白桦脂醇各组 LTP 幅值较 AD 模型组升高;AD 模型组神经元凋亡率显著高于对照组,经过白桦脂醇干预治疗后凋亡率下降;AD 小鼠模型海马区 PSD-95 和 Synapsin-I 表达下降,但经白桦脂醇干预后其表达上升。结论 白桦脂醇通过使海马 PSD-95 和 Synapsin-I 的表达增加,发挥对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠认知功能的保护,使海马长时程增强。

关键词:阿尔茨海默病;白桦脂醇;认知;PSD-95;Synapsin-I;小鼠

中图分类号:R741

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2020.04.005

Effect of betulin on cognitive function and the expression of hippocampal synaptic function-related proteins in an APP/PS1 double transgenic mouse model of Alzheimer's disease

FU Zeng-Hui, JIANG Yan, DU Shu, ZHANG Guang-Ping, LIU Jing, CHEN Tuan-Tuan, LIN Zai-Hong, JIN Yan. Department of Neurology, The Third Affiliated Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161002, Heilongjiang, China

Corresponding author: FU Zeng-Hui, Email: fzh92@foxmail.com

Abstract: Objective To investigate the interventional effect of betulin on the learning and memory functions and the expression of hippocampal synaptic function-related proteins in Alzheimer's disease (AD) mice, and to provide new insights into the treatment of AD. **Methods** APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into model group, high-dose betulin group, and low-dose betulin group. Healthy C57BL/6J mice were used as controls. The learning and memory abilities of the mice were determined by behavioral observation, and the bioelectricity of hippocampal neurons was measured by electrophysiological recording. In addition, neuronal apoptosis was measured by TUNEL staining, and postsynaptic density-95 (PSD-95) and synapsin-I expression was measured by real-time PCR. **Results** The water maze test showed that betulin improved the cognitive impairment of model mice. The amplitude of long-time potentiation (LTP) was lower in the AD model group than in the control group, but was higher in the betulin groups than in the AD model group. Compared with the control mice, the neuronal apoptosis rate was increased in the model mice but was reduced in the model mice treated with betulin. Furthermore, hippocampal expression of PSD-95 and synapsin-I was decreased in AD mice but was increased following betulin intervention. **Conclusions** Betulin can protect the cognitive function of APP/PS1 double transgenic mice with Alzheimer's disease by increasing the expression of PSD-95 and synapsin-I and enhancing the LTP of the hippocampus.

Key words: Alzheimer's disease; betulin; cognition; postsynaptic density-95; synapsin-I; mouse

基金项目:黑龙江省教育厅基本科研业务费基础研究项目(2017-KYYWF-0700)

收稿日期:2020-04-26;修回日期:2020-07-06

作者简介:傅增辉(1992-),男,医师,医学硕士,主要从事老年痴呆与认知功能障碍的基础与临床研究。Email:fzh92@foxmail.com。

阿尔兹海默病 (Alzheimer disease, AD) 发病机制复杂,迄今尚无特效的治疗药物。Latocha 等^[1] 研究报道,白桦脂醇 (betulin) 为桦树皮提取物的关键活性分子,动物学实验中其表现出丰富的生物学活性,且低毒性。Ma 等^[2] 研究报道,早期 AD 的海马及皮质区域突触数量显著减少,其中突触前标志物突触蛋白 I (Synapsin-I) 和突触后标志物 (postsynaptic densities-95, PSD-95) 的表达明显下降。课题组前期研究发现,白桦脂醇能够抑制 A β 25-35 诱导产生的 PC12 细胞凋亡^[3],白桦脂醇能够改善慢性应激抑郁模型大鼠的抑郁行为,且对其海马神经元具有一定保护作用^[4]。白桦脂醇是否可以通过影响突触功能而发挥对痴呆小鼠的神经保护作用,本研究采用白桦脂醇干预 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠,通过观察学习记忆能力、记录海马神经元的生物电、TUNEL 法检测神经元凋亡、检测 PSD-95 和 Synapsin-I 水平,探讨白桦脂醇对 AD 小鼠的学习记忆功能的干预作用。

1 材料

1.1 实验动物

雄性 12 月龄 SPF 级 APP/PS1 双转基因 AD 模型 C57BL/6J 小鼠 36 只,12 月龄具有相同遗传背景的雄性 C57BL/6J 健康小鼠 12 只,均由东北农业大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK (黑) 2009-01070。

1.2 主要仪器与试剂

白桦脂醇 (大兴安岭林格贝寒带生物产业公司);免疫荧光试剂盒 (美国 Focus 公司);兔抗鼠多克隆抗体 (美国 Abbkine 公司);Revert Aid First Strand cDNA synthesis、SYBR Premix Ex TaqTM、ROXReference Dye II (美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 实验分组

实验共分为 4 组,每组 12 只。APP/PS1 双转基因 AD 小鼠随机分为模型组、药物高剂量组和低剂量组,C57BL/6J 健康小鼠为对照组。药物高剂量组和低剂量组分别给予 50 mg/(kg·L) 和 25 mg/(kg·L) 药物灌胃,对模型组行蒸馏水灌胃。各组小鼠连续 3 个月每天均药物或蒸馏水灌胃 1 次。

2.2 采用 Morris 水迷宫实验小鼠学习与记忆行为测试

Morris 水迷宫用直径为 120 cm 的圆形水池,内部装有小的白色塑料颗粒。将直径为 11 厘米的透明平台放置在目标象限中固定位置的水面下方 1 cm 处。训练时候,每天进行 4 次实验,连续 6 d。在第

7 天进行了 1 次试探实验。在试探实验期间,允许小鼠自由探索 1 min,后将平台从池的目标象限中移出。自动跟踪系统监视这些数据以进行分析。

2.3 电生理检测

药物实验结束时随机取每组一半的实验动物 (6 只) 进行电生理实验。

2.3.1 诱发电位检测 麻醉下断头,取脑置于 4℃ 的人工脑脊液中,小心剥出双侧海马,垂直于海马长轴切成 400 μ m 厚度的薄片。刺激器输出方波信号 (电流强度 0.1 ~ 0.4 mA、波宽 100 μ m) 作用于孵育后的脑片。双极电极进行 CA3 区 Schaffer 侧支刺激,记录电极为自制玻璃微电极,内充 4 mol/L NaCl,电极电阻 4 ~ 15 M Ω ,经微电极放大器放大后的电信号于示波器 (Kohden VC-10) 上监测,记录 CA1 区椎体细胞诱发群峰电位 (population spike, PS)。

2.3.2 高频刺激诱导长时程增强 高频刺激 (high frequency stimulation, HFS) 是指波宽为 100 μ s、强度为 150 μ A 的直流电流每 10 s 作用 1 次,至最佳 fEPSP 出现,固定电极。记录基础波,30 min 后给予 200 Hz,波宽为 100 μ s,包括 3 串 (每串 20 个脉冲),间隔 30 s 的高频刺激,诱发出长时程增强 (long time potentiation, LTP),并记录 1 h。每个时间点的突触传递水平以与基础突触传递水平比较的相对值 (%) 表示,相对值 = (实测值 - 相对值) / 相对值 \times 100%。

2.4 TUNEL 法检测神经元凋亡

每组剩余小鼠 (6 只) 在麻醉后下快速取出全脑,冰盘上分离左侧海马,多聚甲醛固定 24 h,梯度乙醇脱水、浸蜡、包埋、切片,严格按 TUNEL 凋亡试剂盒说明书进行染色,洗涤后封片,显微镜观察凋亡细胞,每张切片随机观察 5 个非重叠视野。

2.5 采用 Realtime PCR 法检测 PSD-95 和 Synapsin-I 水平

冰浴分离出步骤 2.4 右侧海马,制作组织匀浆,提取总 RNA, cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录。

所需引物序列: PSD-95 正向: 5'-CCACAAGAGTGC-CATACGA-3', 反向: 5'-GGAACACACTCCTTGGGAAAGT-3'; Synapsin-I 正向: 5'-GAGCATGCTTCACGATTAGG-3', 反向: 5'-CATACCCCTAAGCAGCAGCT-3'。以 GAPDH 为内参,正向: 5'-CCGCTACATCCGCATACAAC-3', 反向: 5'-GACCCCGGAAAGGT-3'。

反应体系为: 2 \times Realtime PCR Master Mix (SYBR Green): 10 μ L; 上、下游引物 (各 10 μ mol/L), 各

1 μL ; cDNA 模板 1 μL ; 加入灭菌蒸馏水使总反应体积至 20 μL 。

标准对照物为 GAPDH, 引物序列为正向: 5'-CGGTGGAGAACGAATGGTCA-3', 反向: 5'-ATCCTGTGGGATACCAGCATAA-3'。

扩增程序: 95℃, 5 min, 1 个循环; (95℃, 15 s; 60℃, 20 s; 72℃, 40 s) \times 40 个循环。

按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量计算公式计算各样品的目的基因相对定量结果, 分析目的基因 mRNA 转录水平差异。

2.6 采用 Western blotting 检测 PSD-95 和 Synapsin-I 蛋白水平

取 2.5 步骤中右侧海马制作匀浆, 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度后, SDS-PAGE 分离等量蛋白, 冰上行转膜反应, 添加 BSA 封闭, 清洗后添加抗 PSD-95、Synapsin-I 和 β -actin 的抗体 (1:500),

4℃ 过夜孵育, 添加二抗 (1:5 000), 室温下孵育 2 h, ECL 发光显影后置于凝胶成像仪中, 采用 Image-Pro Plus 软件对蛋白表达进行定量分析。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 对所有数据进行处理。所有实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。数据分析前经正态性分布检验和方差齐性检验。多组间资料的比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 q 检验 (Newman-Keuls 法)。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠空间探索测试结果

与对照组比较, 模型组在定位航行实验中的逃避潜伏期 (escape latency, EL) 延长, 除第 1 天外差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 药物低、高剂量组 EL 均减少 ($P < 0.01$); 药物高剂量组较低剂量组 EL 亦缩短 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 小鼠在水迷宫中寻找隐蔽平台的逃避潜伏期 [s; ($\bar{x} \pm s$)]

| 组别 | 第 1 天 | 第 2 天 | 第 3 天 | 第 4 天 | 第 5 天 |
|------|------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 对照组 | 72.64 \pm 2.03 | 36.73 \pm 3.93 | 26.74 \pm 1.93 | 19.54 \pm 2.96 | 14.76 \pm 2.74 |
| 模型组 | 82.03 \pm 5.84 | 59.63 \pm 4.07 ^a | 48.89 \pm 3.61 ^a | 40.37 \pm 2.73 ^a | 36.83 \pm 2.94 ^a |
| 低剂量组 | 78.42 \pm 4.57 | 47.26 \pm 3.18 ^b | 35.82 \pm 2.54 ^b | 28.16 \pm 2.44 ^b | 23.49 \pm 2.50 ^b |
| 高剂量组 | 77.73 \pm 3.81 | 44.53 \pm 2.83 ^b | 31.83 \pm 2.50 ^{bc} | 24.11 \pm 3.14 ^{bc} | 18.94 \pm 2.93 ^{bc} |

注: a 为与对照组比较, $P < 0.01$; b 为与模型组比较, $P < 0.01$; c 为与低剂量组比较, $P < 0.05$

与对照组小鼠在目标象限内游泳的距离占总距离的百分比 (51.54 \pm 7.53) % 比较, 模型组 (31.76 \pm 6.14) % 增大 ($P < 0.01$); 与模型组小鼠比较, 药物高、低剂量组增大 [(47.85 \pm 5.03) %、(41.77 \pm 4.32) % , $P < 0.01$]; 且高剂量组较低剂量组增多 ($P < 0.05$)。

3.2 各组小鼠海马神经元电活动水平

不同组别小鼠 HFS 均能诱导海马神经元突触传递明显增强, 呈现 LTP 样电位变化, 对 LTP 幅值增加的相对值进行比较: 与对照组 LTP 幅值比较, 模型组下降 ($P < 0.01$); 与模型组 LTP 幅值比较, 药物高、低剂量组均增加 (均 $P < 0.01$), 且高剂量组较低剂量组增加 ($P < 0.05$)。见图 1。

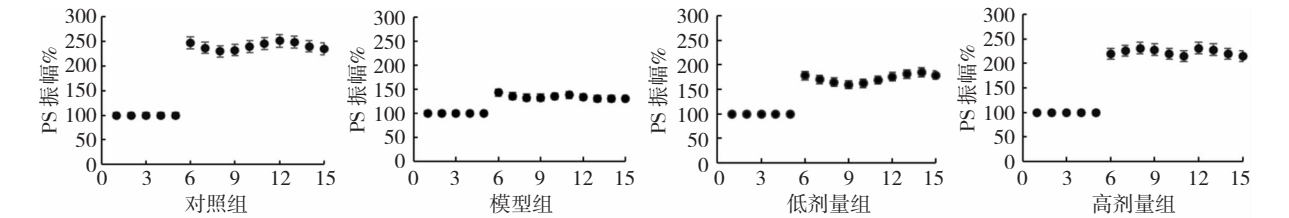
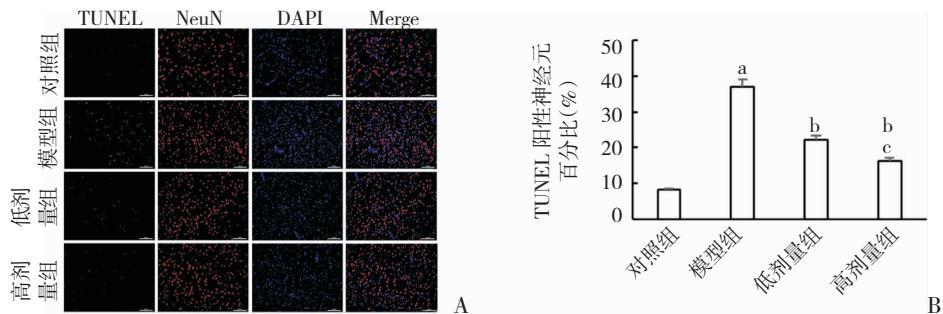


图 1 各组小鼠 HFS 前后 PS 波幅

3.3 各组小鼠海马神经细胞细胞凋亡率

与对照组小鼠海马神经细胞凋亡率 (8.25 \pm 1.84) % 比较, 模型组增加 [(37.14 \pm 3.74) % , $P < 0.01$]; 与模型组小鼠比较, 药物高、低剂量组

下降 [(16.25 \pm 2.74) %、(22.26 \pm 1.74) % , 均 $P < 0.01$], 且高剂量组较低剂量组下降 ($P < 0.05$)。见图 2。



A: 免疫荧光显微镜所示; B: 神经元凋亡百分比; a 为与对照组比较, $P < 0.01$; b 为与模型组比较, $P < 0.01$; c 为与低剂量组比较, $P < 0.05$

图 2 各组小鼠海马 TUNEL 神经元百分率

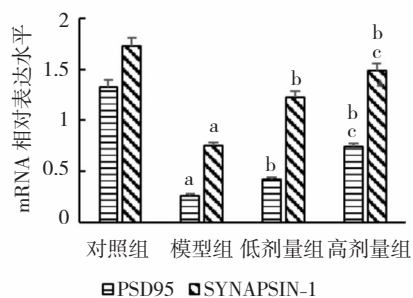
3.4 各组小鼠海马神经细胞 PSD-95 和 Synapsin-I mRNA 水平

与对照组小鼠 PSD-95 和 Synapsin-I mRNA 相对表达水平 (1.33 ± 0.07 、 1.73 ± 0.11) 比较, 模型组均降低 [(0.26 ± 0.01) 、 (0.75 ± 0.10)], (均 $P < 0.01$); 与模型组比较, 药物高、低剂量组均升高 [(0.42 ± 0.04) 、 (1.23 ± 0.18)], (0.74 ± 0.10 、 1.49 ± 0.21), (均 $P < 0.01$); 与药物低剂量组比较, 且高剂量组较低剂量组升高 (均 $P < 0.05$)。见图 3。

3.5 各组小鼠海马神经细胞 PSD-95 和 Synapsin-I 蛋白水平

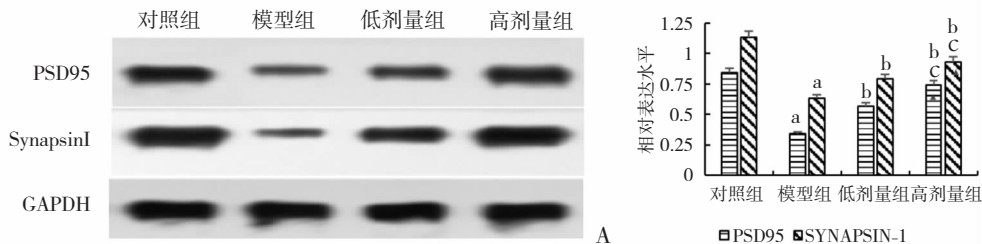
与对照组小鼠 PSD-95 和 Synapsin-I 蛋白相对表达水平 (0.84 ± 0.06 、 1.13 ± 0.09) 比较, 模型组均降低 [(0.34 ± 0.02) 、 (0.63 ± 0.07)], (均 $P < 0.01$); 与模型组比较, 药物高、低剂量组均升高 [(0.57 ± 0.07) 、 (0.79 ± 0.12)], (0.71 ± 0.08 、

0.93 ± 0.11), (均 $P < 0.01$); 与药物低剂量组比较, 且高剂量组较低剂量组升高 (均 $P < 0.05$)。见图 4。



a 为与对照组比较, $P < 0.01$; b 为与模型组比较, $P < 0.01$; c 为与低剂量组比较, $P < 0.05$

图 3 各组小鼠海马神经元 PSD-95 和 Synapsin-I mRNA 水平



A: 电泳图; B: 蛋白相对表达水平; a 为与对照组比较, $P < 0.01$; b 为与模型组比较, $P < 0.01$; c 为与低剂量组比较, $P < 0.05$

图 4 各组小鼠海马神经元 PSD-95 和 Synapsin-I 蛋白水平

4 讨论

神经突触减少是 AD 重要的标志性病理变化, 易受累区域突触丢失与 AD 病人的认知损害水平密切相关, 海马在学习和记忆中扮演重要角色^[6-8], 海马中突触的早期丢失与轻度认知损害相关^[5]。本研究发现, 白桦脂醇可以通过降低氧化应激对海

马神经元的损害, 保护实验动物的认知功能。电生理实验中, 高频刺激可引起各组小鼠海马的 LTP, 但就程度幅值上, 对照组高于 AD 模型组的值, 经过白桦脂醇干预治疗后, 白桦脂醇各组 LTP 幅值较 AD 模型组显著升高, 提示白桦脂醇对神经细胞的损伤有一定程度的保护作用。

Leugering 等^[9]和 Kaneda 等^[10]提出突触重塑是学习和记忆的基础。在本研究中,模型组 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠海马神经元 Synapsin-I 表达下调,但给予白桦脂醇治疗后可以上调 Synapsin-I 表达。Zhu 等^[11]和 Mirza 等^[12]报道, Synapsin-I 以磷酸化激活途径调节递质的释放,主要功能是调节突触前氨基酸递质的释放,其含量的减少标志着突触发生了功能可塑性损伤,结合突触结构参数的变化,使神经信息的传递、编辑及存储等出现损害,从而引起认知功能的异常,白桦脂醇可能通过上调 Synapsin-I 而发挥保护突触的作用,进而改善认知功能。

突触后致密物位于突触后膜下方,特别容易被外界因素影响,而突触后致密物的形态变化直接影响突触的功能活动^[13]。PSD-95 是突触后致密物内含的一种关键的因子,其与突触增强、认知及神经重塑直接相关^[14]。在本研究中,模型组 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠海马神经元 PSD-95 表达下调,但给予白桦脂醇治疗后可以上调 PSD-95 表达,突触的丢失是认知功能缺陷的核心事件,PSD-95 是信息传递和记忆形成的主要场所,其主要功能是维持突触的功能和形态^[15], PSD-95 减少会引起海马的学习记忆能力降低^[16],白桦脂醇治疗可以上调 PSD-95 表达,在客观上说明其神经突触保护作用。

本实验中选取的 PSD-95 和 Synapsin-I 是在突触可塑性中发挥重要生理作用的突触相关蛋白进行研究。在本研究中,AD 小鼠模型海马区 PSD-95 和 Synapsin-I 表达下降,但经白桦脂醇干预后却表达上升,说明二者或为白桦脂醇发挥保护神经元的靶点。本研究从行为学、电生理学以及 Western Blotting 实验多方面证实了白桦脂醇通过增加海马 PSD-95 和 Synapsin-I 的表达,起到对 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠的学习记忆能力的改善作用,增强海马 LTP。推测可能是白桦脂醇降低 A β 或 tau 蛋白的神经毒性而保护神经细胞,引起通道和受体的功能性改变,进而引起细胞内信号转导通路和基因转录、蛋白表达等过程的变化,最终影响 LTP 与学习和记忆功能,但其中的具体机制还有待我们更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Latocha M, Mertas A, Czuba Z, et al. Novel triazole hybrids of betulin: synthesis and biological activity profile[J]. *Molecules*, 2017, 11(1): 11-22.
- [2] Ma C, Long H. Protective effect of betulin on cognitive decline in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats[J]. *Neurotoxicology*, 2016, 57(11): 104-111.
- [3] 傅增辉,姜岩,刘晶,等.白桦脂醇对 A β (25-35) 诱导的 PC12 细胞氧化应激和凋亡的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(6): 56-63.
- [4] 傅增辉,金艳,林再红,等.白桦脂醇对慢性应激抑郁模型大鼠行为及神经营养因子表达的影响[J]. *解剖学杂志*, 2020, 43(3): 200-205.
- [5] 谢时帅,牛万祥,徐峰,等. miR-15b 对 MPP⁺ 损伤 SH-SY5Y 细胞中 α 突触核蛋白表达的影响[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2018, 45(6): 591-596.
- [6] Brett FM, Kearney H. Neuropathology correlates of cognitive assessments[J]. *Ir J Med Sci*, 2018, 18(6): 502-508.
- [7] 方力群,王亚楠,高红梅,等.姜黄素对阿尔茨海默病模型小鼠脑内胶质细胞介导的炎症反应的抑制作用[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2017, 44(4): 347-351.
- [8] Gallimore AR, Kim T, Tanaka-Yamamoto K, et al. Switching on depression and potentiation in the cerebellum[J]. *Cell Rep*, 2018, 22(3): 722-733.
- [9] Leugering J, Pipa G. A unifying framework of synaptic and intrinsic plasticity in neural populations[J]. *Neural Comput*, 2018, 17(1): 1-42.
- [10] Kaneda M, Sakagami H, Hida Y, et al. Synaptic localization of SRF coactivators, MKL1 and MKL2, and their role in dendritic spine morphology[J]. *Sci Rep*, 2018, 15(1): 727-731.
- [11] Zhu W, Ge X, Gao P, et al. Adolescent cocaine exposure induces prolonged synaptic modifications in medial prefrontal cortex of adult rats[J]. *Brain Struct Funct*, 2017, 15(11): 274-280.
- [12] Mirza FJ, Zahid S. The role of synapsins in neurological disorders[J]. *Neurosci Bull*, 2017, 27(11): 513-519.
- [13] Dong J, Zhao J, Lin Y, et al. Exercise improves recognition memory and synaptic plasticity in the prefrontal cortex for rats modelling vascular dementia[J]. *Neurol Res*, 2018, 40(1): 68-77.
- [14] Teves LM, Cui H, Tymianski M. Efficacy of the PSD-95 inhibitor Tat-NR2B9c in mice requires dose translation between species[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(3): 555-61.
- [15] He XF, Liu DX, Zhang Q, et al. Voluntary exercise promotes glymphatic clearance of amyloid beta and reduces the activation of astrocytes and microglia in aged mice[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10(6): 144-150.
- [16] Xu J, de Winter F, Farrokhi C, et al. Neuregulin 1 improves cognitive deficits and neuropathology in an Alzheimer's disease model[J]. *Sci Rep*, 2016, 25(6): 31692-31698.