神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000937

姜黄素通过调节 α-synuclein 和 MAP2 的表达改善 AD 转基因鼠的认知功能

杨　军[1]，戴颂阳[1]，康清梅[1]，张　雄[2]，林　晓[1]，李　昱[1]
（重庆医科大学基础医学院 1. 病理教研室；2. 神经科学中心，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：观察姜黄素（curcumin）对 APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠认知功能的影响以及对海马组织中 α-突触素（α-synuclein）和微管相关蛋白 2（microtubule associated protein-2，MAP2）表达的影响，并探讨其可能的机制。**方法**：将 3 月龄 APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠随机分为未处理组、姜黄素低剂量组和姜黄素高剂量组，每组 10 只，未处理组给予正常饲料，低、高剂量姜黄素组按照 160、1 000 mg/kg 拌饲喂养，连续喂养 6 个月，采用 Morris 水迷宫检测姜黄素对双转基因鼠空间学习记忆能力的影响；采用免疫组化检测姜黄素对双转基因鼠海马中 α-synuclein 和 MAP2 表达的影响。**结果**：Morris 水迷宫实验表明姜黄素可以明显改善双转基因鼠学习记忆能力（$P<0.05$）；免疫组化结果显示与未处理组相比，低、高剂量姜黄素处理组小鼠海马内 α-synuclein 阳性细胞数均减少（$P<0.05$），呈剂量依赖性；但 MAP2 阳性表达随着姜黄素浓度的升高而增加（$P<0.05$）。**结论**：姜黄素可能通过抑制 α-synuclein 表达并增强 MAP2 的表达，从而改善 AD 转基因鼠的认知和记忆功能起到神经保护作用。

【关键词】姜黄素；阿尔茨海默病；α-synuclein；微管相关蛋白 2
【中图分类号】R741.02　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2015-10-04

Curcumin improves AD transgenic mice's cognitive function via regulating the expression of α-synuclein and MAP2

Yang Jun[1], Dai Songyang[1], Kang Qingmei[1], Zhang Xiong[2], Lin Xiao[1], Li Yu[1]
(1. Teaching and Research Section of Pathology; 2. Institute of Neuroscience, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To observe the effects of curcumin on cognitive function of APPswe/ PS1dE9 double transgenic mice and the expression of α-synuclein and MAP2 in hippocampus, and to explore the potential mechanisms. ***Methods***: The 3-month-old APPswe/PS1dE9 double transgenic mice were randomly divided into untreated group (n=10), curcumin low-dose group (n=10) and curcumin high dose group (n=10). Normal diet, diet mixed with 160 mg/kg curcumin and diet mixed with 1 000 mg/kg curcumin were given, respectively. The Morris water maze test was used to detect the effects of curcumin on spatial learning and memory of AD mice. IHC was carried out to evaluate the expression of α-synuclein and microtubule associated protein-2 (MAP2) in hippocampus. ***Results***: Morris water maze test showed that curcumin could improve learning and memory of AD mice. IHC results showed that compared with those of untreated group, the expressions of α-synuclein in the hippocampus were significantly reduced in low and high dose of curcumin group; however, the expressions of MAP2 were significantly increased in curcumin treatment group in a dose-dependent manner ($P<0.05$). ***Conclusion***: Curcumin could play a role in improving cognition and memory ability of AD transgenic mice via up-regulating the expression of MAP2 and down-regulating α-synuclein.

【Key words】curcumin; Alzheimer's disease; α-synuclein; microtubule associated protein-2

阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD）是一种以细胞内神经纤维缠结、细胞外老年斑和突触丢失为主要病理特征的神经退行性疾病[1]，临床主要表现为认知功能障碍和进行性记忆缺失。然而，认知功能障碍和记忆缺失的病理生理机制特别是分子机制还尚未阐明。认知和记忆是脑的高级功能，其神经基础可能与中枢神经系统网络的高度可塑

作者介绍：杨　军，Email：23021560@qq.com，研究方向：老年痴呆的发病机制。
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）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.0944.020.html（2016-05-13）

性有关[2]。突触连接是细胞间信息传递、神经突触生长和神经可塑性的关键部位。AD 突触丢失、认知功能障碍和记忆缺失都与突触可塑性降低有关，但其机制尚不清楚。α-突触素（α-synuclein）和微管相关蛋白 2（microtubule associated protein-2，MAP2）都是参与突触可塑性调节的重要蛋白质，与认知功能关系密切。姜黄素（curcumin）是一种从姜黄科姜黄根茎提取主要酚类化合物，具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤的作用[3]。目前，许多实验都证实姜黄素可以改善小鼠学习记忆功能，其机制尚未完全阐明。因此，拟观察姜黄素对 APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠认知功能的影响以及对海马组织中 α-synuclein 和 MAP2 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠，3 月龄，购自南京大学模式动物研究所，动物许可证号：SCXK（苏）2010-0111。

1.2 主要试剂

姜黄素购自美国 Sigma 公司（产品编号 C1386-5G）；兔多克隆抗体 α-synuclein 购自美国 SANTA CRUZ 公司（产品编号 sc-7011-R）；兔单抗 MAP2 购自美国 Abcam 公司（产品编号：ab24640）；免疫组化试剂盒（包含 DAB 试剂盒，产品编号 CW2069A）购自北京康为试剂生物有限公司。

1.3 动物分组及给药

将 30 只 3 月龄 AD 双转基因小鼠（雌雄各半）随机分为处理组、姜黄素低剂量组和姜黄素高剂量组，每组 10 只。未处理组给予正常饲料喂养，姜黄素低、高剂量组按姜黄素 160、1 000 mg/kg 加入饲料中充分搅拌后喂养，连续喂养 6月。

1.4 Morris 水迷宫实验

将 30 只老鼠从不同象限面对池壁放入，每天训练 5 次，连续 5 d，观察老鼠在水池中游泳轨迹，并记录老鼠爬上平台所用时间，如果 60 s 后老鼠还未爬上平台则逃避潜伏期记为 60 s，并引导老鼠到平台上停留 10 s。第 6 天，撤掉平台，从第 1 象限放入老鼠，观察老鼠穿越平台所在象限的次数、停留的时间以及距离。

1.5 灌注及切片

用 3.5%水合氯醛（350 mg/kg）对小鼠进行腹腔麻醉后固定于手术板上，迅速剪开皮肤和腹膜，暴露心脏和主动脉弓，灌注穿刺针从心尖刺入左心室并伸至主动脉根部，止血钳固定后用灌注机将 PBS（0.01 mol/L，pH 7.4）从左心室灌入，同时剪开右心耳使血液流出，当右心耳流出无色液体，肝脏变白时，换预冷的 4%多聚甲醛缓冲液继续灌注，直到小鼠僵硬，在冰上快速断头取脑，放入 4%多聚甲醛中固定过夜，常规石蜡包埋切片。

1.6 免疫组化检测

取小鼠大脑切片，经脱蜡处理，按照 SP 免疫组化试剂盒说明书进行染色：切片经 PBS 缓冲液（0.01 mol/L，pH 7.4）冲洗 3 次后，置于柠檬酸盐（0.01 mol/L）中微波修复 20 min 以暴露抗原，自然冷却后加入 3%的 H_2O_2 静置 15 min 以灭活内源性过氧化物酶，经正常山羊血清封闭液封闭 60 min 后，分别加入兔抗鼠 α-synuclein（1∶100）和 MAP2 抗体（1∶100 稀释），4 ℃冰箱孵育过夜。第 2 天于 37 ℃复温 1 h 后加入生物素标记的羊抗兔 IgG，37 ℃孵育 60 min 后、后加入 HRP 标记的链霉亲和素，37 ℃孵育 30 min，最后 DAB 显色，苏木素复染，脱水、透明、中性树脂封片，光学显微镜下观察，采图后图片使用 Image Pro Plus 6.0 对免疫组化的阳性细胞或斑块进行光密度分析。

1.7 统计学分析

使用 SPSS 18.0 统计软件对各组数据进行正态检验和方差齐性检验，所有免疫组化数据均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。多组数据间采用单因素方差分析，组内两两比较采用 LSD-t 检验；水迷宫数据首先对重复测量数据在各时间点之间的关系进行球形检验，其检验的结果均为 $P>0.05$，说明重复测量数据之间实际上不存在相关性，资料满足 Huynh-Feldt 条件，使用重复测量设计资料的单变量方差分析处理资料。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 低剂量和高剂量的姜黄素均可明显改善转基因小鼠的学习记忆能力

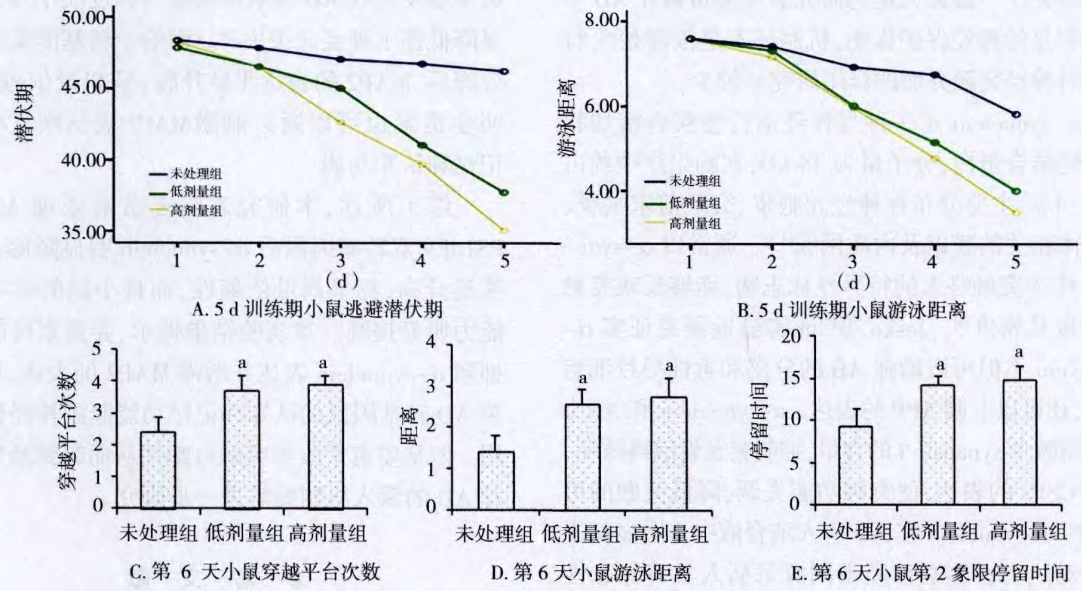
如图 1 A、B 所示，随着训练时间的延长，姜黄素低剂量处理组和高剂量组的逃避潜伏期和距离逐渐减小的趋势，差异有统计学意义（A 组 $F=5.158$，$P=0.001$；B 组 $F=37.503$，$P=0.000$），说明姜黄素处理的小鼠随着时间延长，空间学习记忆能力明显改善。C、D、E 所示，第 6 天，姜黄素处理组在第 2 象限穿越次数和停留时间明显高于对照组（$P<0.05$），在第 2 象限的游泳距离明显高于对照组（$P<0.05$）。

2.2 姜黄素对 APPswe/PS1dE9 双转基因鼠海马区 α-synuclein 表达的影响

免疫组化结果显示，与未处理对照组图 A 平均光密度（0.213 8 ± 0.0148 2）相比，α-synuclein 在 AD 模式鼠海马中的表达随姜黄素的剂量升高逐渐降低（图 2）。

2.3 姜黄素对 APPswe/PS1dE9 双转基因鼠海马区 MAP2 表达的影响

免疫组化结果显示，与未处理对照组相比，MAP2 在 AD 模式鼠海马中的表达随姜黄素的剂量升高逐渐增加（图 3）。



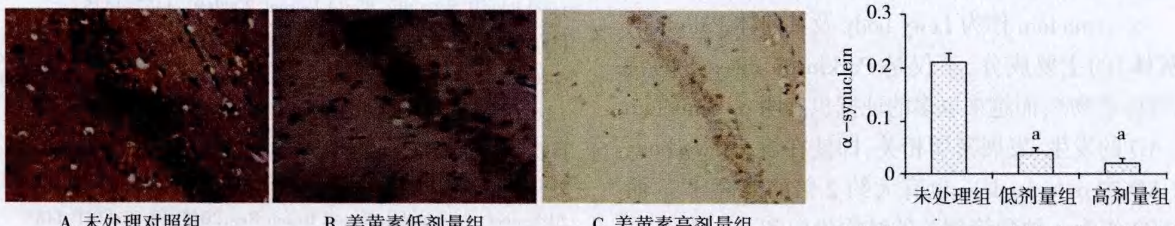
A. 5 d 训练期小鼠逃避潜伏期　B. 5 d 训练期小鼠游泳距离

C. 第 6 天小鼠穿越平台次数　D. 第 6 天小鼠游泳距离　E. 第 6 天小鼠第 2 象限停留时间

a：与未处理组相比，$P<0.05$，$n=10$

图 1　不同组别的水迷宫实验结果

Fig.1　Morris maze tests results of transgenic AD mice in different groups

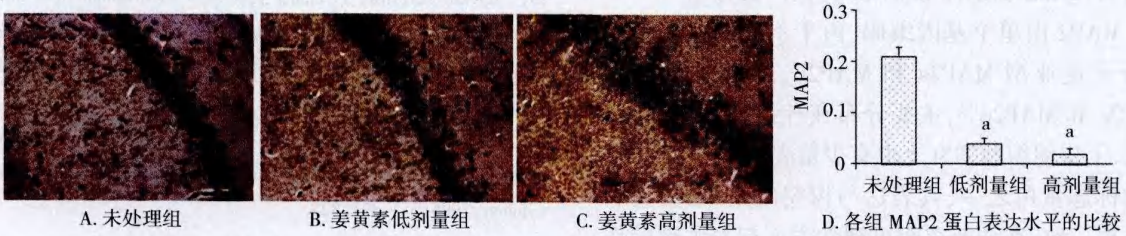


A. 未处理对照组　B. 姜黄素低剂量组　C. 姜黄素高剂量组　D. 各组 α-synuclein 蛋白表达水平的比较

a：$P<0.001$ vs. 未处理组，$n=10$

图 2　α-synuclein 在不同处理组双转基因鼠海马的表达(400×)

Fig.2　Expression of α-synuclein in hippocampus of transgenic AD mice treated with different dosage of curcumin(400×)



A. 未处理组　B. 姜黄素低剂量组　C. 姜黄素高剂量组　D. 各组 MAP2 蛋白表达水平的比较

a：$P<0.001$ vs. 未处理组；$n=10$

图 3　MAP2 在不同处理组 APPswe/PS1dE9 双转基因鼠海马区的表达（400×）

Fig.3　Expression of MAP2 in hippocampus of transgenic AD mice treated with different dosage of curcumin（400×）

3　讨　论

AD是老年痴呆的主要类型，随着人口老年化的进程，AD 已经成为威胁老年人群的主要疾病，给社会和家庭带来严重的经济负担，AD 的发病机制很复杂，至今尚未阐明，而找到低毒安全的植物类化合物成为研究的热点。姜黄素作为一种植物提取药物，具有许多药理活性，比如，抗炎、抗氧化、抗凝、抑制肿瘤生长。加上毒副作用小，越来越受到研究

人员的关注。最近大量的研究表明姜黄素在 AD 中具有明显的神经保护作用，机制还不是很清楚[4]，特别是对神经突触方面的作用研究还较少。

α-synuclein 是一种与神经退行性疾病密切相关的钙结合蛋白，分子量为 38 kD，在脑组织中约占 0.5%~1%，主要分布在神经元胞浆、突触前末端膜、线粒体相关的膜以及内质网膜[3,5]。通常以 α-synuclein 作为突触终末的特异性标志物，能够反映突触的数量及密度[6]。Jesko 等[7]证实最近研究证实 α-synuclein 不但可以增强 Aβ 的分泌和毒性导致细胞死亡，还可以上调 APP 的表达。α-synuclein 和 Aβ协同作用减少 synapsin I 的含量，抑制突触囊泡再循环，下调 CSPa 的表达，使突触功能失调，降低突触的可塑性[8]。α-synuclein 在 AD 病人脑脊液中也明显高于正常对照[9]，在鉴别诊断不同痴呆病人具有标志性作用。本研究用姜黄素处理双转基因鼠之后，α-synuclein 明显降低，水迷宫实验也表明姜黄素处理后小鼠的学习记忆能力明显改善，说明姜黄素可以改善突触的可塑性，从而起到神经保护作用。

α-synuclein 作为 Lewy body 及其前体 Pale body（灰体）的主要成分，不仅是 Parkinson disease 的特征性标志物[10]，而越来也多的证据也表明 α-synuclein 与 AD 的发生、发展密切相关，即使在没有lewy body 的 AD 中 α-synuclein 也有大约 2 倍的升高[11]。而 MAP2 作为一种微管相关的结构蛋白和 α-synuclein 共定位，且研究证实 MAP1 和 MAP5 是 Lewy body 的重要组成成分结构，Mukaetova-Ladinska 等[1]第 1 次阐明 MAP2 也是在 Lewy body 内广泛分布。

MAP2 由单个基因编码，由于不同的剪切产生高分子量亚型 MAP2a 和 MAP2b，低分子量亚型 MAP2c 和 MAP2d[12]，主要分布在神经细胞上，在骨骼肌、上皮组织和睾丸上也有少量表达[13]。作为突触后的标志蛋白之一，其表达与树突的生长、分支和重塑相一致，在调节突触可塑性方面起着关键的作用[14]。同时，MAP2 也是细胞骨架中微管的组成成分之一，与肌动蛋白、中间丝组成多聚体构成细胞骨架[15]，参与微管的组装与稳定，调节神经元的发育、突触形成、突触的可塑性以及物质的运输[16]。应用反义寡核苷酸肽干扰 MAP2 的表达可以阻止突触生长，对脊索受损的小鼠给予丙戊酸刺激 MAP2 表达，可使神经元树突形成和轴突生长[17]。也有学者发现 MAP2，Aβ 以及 p-Tau 在 AD 病人中明显增加[18]，多数学者发现在 AD 转基因鼠海马和皮质中 MAP2 明显降低提示神经元丢失[19]。而给予转基因鼠姜黄素处理后，MAP2 的表达明显升高，呈剂量依赖性，说明姜黄素也可以通过刺激MAP2 表达恢复小鼠的记忆和认知功能。

综上所述，本研究表明姜黄素处理 APPswe/PS1dE9 双转基因鼠后 α-synuclein 明显降低，MAP2 明显升高，都呈剂量依赖性，而且小鼠的学习记忆能力明显提高。本实验结果提示，姜黄素可能通过抑制 α-synuclein 表达并增强 MAP2 的表达，从而改善 AD 转基因鼠的认知和记忆功能起到神经保护作用。但是姜黄素改善突触可塑性从而起到预防和治疗 AD 的深入机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Mukaetova-Ladinska EB, Xuereb JH, Garcia-Sierra F, et al. Lewy body variant of Alzheimer's disease: selective neocortical loss of t-SNARE proteins and loss of MAP2 and alpha-synuclein in medial temporal lobe[J]. Scientific World Journal, 2009(9): 1463-1475.

[2] Grinke E, Tetzlaff C, Worgotter F, et al. Synaptic plasticity in a recurrent neural network for versatile and adaptive behaviors of a walking robot[J]. Front Neurorobot, 2015(9): 11-26.

[3] Venigalla M, Gyengesi E, Münch G. Curcumin and Apigenin-novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. Neural Regen Res, 2015, 10(8): 1181-1185.

[4] Hatcher H, Planalp R, Cho J, et al. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(11): 1631-1652.

[5] Mackin RS, Insel P, Zhang J, et al. Cerebrospinal fluid alpha-synuclein and Lewy body-like symptoms in normal controls, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease[J]. Journal Alzheimers Disease, 2015, 43(3): 1007-1016.

[6] Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, et al. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses[J]. Neurocytology, 1996(25): 821-828.

[7] Jesko H, Okada T, Strosznajder RP, et al. Sphingosine kinases modulate the secretion of alnyloid β precursor protein from SH-SY5Y neuroblastoma cells: the role of α-synuclein[J]. Folia Neuropathologica, 2014, 52(1): 70-78.

[8] Xie C, Soeda Y, Shinzaki Y, et al. Identification of key amino acids responsible for the distinct aggregation properties of microtubule-associated protein 2 and tau[J]. Journal Neurochem, 2015(474): 1321-1336

[9] Slaets S, Vanmechelen E, Le Bastard N, et al. Increased CSF α-synuclein levels in Alzheimer's disease: Correlation with tau levels[J]. Alzheimer's & Dementia, 2014, 10(5): S290-S298.

神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001021

抑制钙蛋白酶对大鼠脊髓损伤后神经功能保护作用研究

杨　函，王　松，康建平，丁裕明

（西南医科大学附属医院脊柱外科，泸州　646000）

【摘　要】目的：探讨钙蛋白酶抑制剂 E-64-D 对大鼠脊髓损伤后神经功能保护作用。**方法**：制备大鼠脊髓损伤模型，并将造模成功的大鼠随机分为脊髓损伤组（24 只）和脊髓损伤干预组（24 只）。另选取 10 只正常大鼠作为对照组，仅行假手术。脊髓损伤干预组在术后给予 E-64-D 静脉微量泵入。在术后 1、7、14 d 和 28 d 时（n=6）对大鼠脊髓 Calpain-1 mRNA 水平进行检测，并且对大鼠后肢功能进行评价。采用 HE 和 Nissl 染色法对大鼠伤处脊髓组织进行染色和评价。**结果**：对照组大鼠 Calpain-1 mRNA 水平在不同时间点之间无统计学差异，而脊髓损伤组和脊髓损伤干预组在不同时间点之间的差异均具有统计学意义，呈逐渐下降趋势（P<0.05）。在第 28 天时，脊髓损伤干预组和对照组 Calpain-1 mRNA 表达水平差异无统计学意义（P >0.05）。脊髓损伤组和脊髓损伤组干预组大鼠 Tarlov 评分和斜板实验结果在术后 3 个时间差异均具有统计学意义（P<0.05），并且脊髓损伤组干预组大鼠运动功能恢复情况显著优于脊髓损伤组大鼠。脊髓损伤组干预组大鼠神经元染色形态及数量均优于脊髓损伤组大鼠。**结论**：抑制钙蛋白酶能够抑制脊髓损伤后神经元的凋亡及坏死，促进脊髓功能恢复。

【关键词】钙蛋白酶；脊髓损伤；神经功能

【中图分类号】R338.2+1　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-10-15

作者介绍：杨　函，Email：cqyanghan1984@163.com，研究方向：脊柱脊髓损伤。

通信作者：王　松，Email：466325292@qq.com。

基金项目：泸州市科技局创新苗子培育计划资助项目[编号：2014-R-52(14/20)]。

优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160706.1714.026.html（2016-07-06）

[10] Goedert M. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled Abeta, tau, and alpha-synuclein[J]. Science, 2015, 349(6248): 601-612.

[11] Larson ME, Sherman MA, Greimel S, et al. Soluble alpha-synuclein is a novel modulator of Alzheimer's disease pathophysiology[J]. Journal Neuroscience, 2012, 32(30): 10253-66.

[12] Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function[J]. Neurobiology, 2000(61): 133-170.

[13] Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: impact on the aging process[J]. Ageing Research Reviews, 2013, 12(2): 520-34.

[14] Schedin-Weiss S, Winblad B, Tjernberg LO. The role of protein glycosylation in Alzheimer disease[J]. FEBS Journal, 2014, 281(1): 46-62.

[15] Mohan R, John A. Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules[J]. IUBMB Life, 2015, 67(6): 395-403.

[16] Shelton MA, Newman JT, Gu H, et al. Loss of Microtubule-Associated Protein 2 Immunoreactivity Linked to Dendritic Spine Loss in Schizophrenia[J]. Biological Psychiatry, 2015, 78(6): 374-385.

[17] Schwab M, Antonow-Schlorke I, Kuhn B, et al. Effect of antenatal betamethasone treatment on microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2 in fetal sheep[J]. Physiology, 2003, 530(3): 497-506.

[18] Lewba G, Savioz A, Vernay A, et al. Differential Changes in Synaptic Proteins in the Alzheimer Frontal Cortex with Marked Increase in PSD-95 Postsynaptic Protein[J]. Alzheimer's Disease, 2008 (15): 212-125.

[19] Tajiri N, Kelloqq SL, Shimizu T, et al. Traumatic brain injury precipitates cognitive impairment and extracellular Abeta aggregation in Alzheimer's disease transgenic mice[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e78851-78861.

（责任编辑：张辉洁）