

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.11.008
文章编号: 1005-8982 (2023) 11-0045-05

实验研究·论著

琐琐葡萄黄酮对 APP/PS-1 双转基因 阿尔茨海默病小鼠神经炎症的保护作用*

再娜甫古丽·买买提¹, 武梦月¹, 古力夏提·艾力², 张鹏², 袁芳¹

(新疆医科大学 1. 基础医学院, 2. 公共卫生学院, 新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 研究琐琐葡萄黄酮(VTF)对APP/PS-1双转基因阿尔茨海默病(AD)小鼠神经炎症保护作用的机制。**方法** 选取6月龄APP/PS-1双转基因雄性小鼠75只, 随机分为模型组(0.5% CMC-Na)、阳性组(多奈哌齐0.7 mg/kg体重)、VTF低剂量组(VTF 70 mg/kg体重)、VTF中剂量组(VTF 210 mg/kg体重)、VTF高剂量组(VTF 420 mg/kg体重), 每组15只; 另选取6月龄同背景SPF级C57BL/6小鼠15只为对照组(0.5% CMC-Na)。灌胃8周后, 免疫组织化学检测IBA1蛋白表达; Western blotting检测APP、IBA1蛋白表达; 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测脑组织的白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量。**结果** 对照组、阳性组及VTF各剂量组IBA1蛋白阳性表达率较模型组低($P < 0.05$); 对照组、阳性组及VTF各剂量组APP、IBA1蛋白相对表达量较模型组低($P < 0.05$); 对照组、阳性组及VTF各剂量组IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量较模型组减少($P < 0.05$)。**结论** VTF可以减少APP/PS-1双转基因AD小鼠神经炎症的发生, 并通过下调APP、IBA1蛋白的表达发挥神经保护作用。

关键词: 阿尔茨海默病; APP/PS-1双转基因AD小鼠; 琐琐葡萄黄酮; 神经炎症
中图分类号: R749.1 **文献标识码:** A

Protective effect of flavones from vitis vinifera L on neuroinflammation in APP/PS-1 double transgenic Alzheimer's disease mice*

Maimaiti Zinafuli¹, Wu Meng-yue¹, Aili Gulixiati², Zhang Peng², Yuan Fang¹

(1. School of Basic Medical Science, 2. School of Public Health, Xinjiang Medical University,
Urumqi, Xinjiang 830011, China)

Abstract: Objective To investigate the neuroprotective effect of flavones from vitis vinifera L (VTF) on APP/PS-1 double transgenic mice model of Alzheimer's disease (AD). **Methods** Seventy-five 6-month-old APP/PS-1 double transgenic male mice were randomly divided into model group (0.5% CMC-NA) and donepezil group (0.7 mg/kg) and low, medium, and high dose VTF group (70 mg/kg, 210 mg/kg, and 420 mg/kg), 15 mice in each group, and 15 6-month-old C57BL/6 mice with the same background SPF level were used as the wild control group (0.5% CMC-NA). All drug solvents were 0.5% CMC-Na solution. After 8 weeks of gavage, IBA1 protein expression was detected via immunohistochemistry and Western blotting. The protein expression levels of APP and Iba1 were detected by Western blotting. The contents of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor (TNF- α) in brain tissue were detected by ELISA. **Results** Compared with the model group, immunohistochemical results showed that the number of IBA1 protein positive cells was significantly reduced in the wild control,

收稿日期: 2022-12-28

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81960764)

[通信作者] 袁芳, E-mail: yuanfang398@163.com; Tel: 13199831902

donepezil, low, medium, and high dose VTF group; WB results showed that the relative expressions of APP and IBA1 protein in the wild control, donepezil, low, medium, and high dose VTF group were decreased; ELISA results showed that the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α were significantly decreased in the wild control, donepezil, low, medium, and high dose VTF group. **Conclusion** VTF can reduce the occurrence of neuroinflammation in APP/PS-1 mice, reduce the damage of hippocampal neurons, and play a protective role by down-regulating the expression levels of APP and Iba1 proteins.

Keywords: Alzheimer's disease; APP/PS-1 double transgenic AD mice; flavones from vitis vinifera L; neuroinflammation

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种痴呆症, 最常见于老年人。其特征是认知能力逐渐下降, 通常从记忆力下降开始^[1]。不同类型的痴呆症中以 AD 最常见^[2]。随着全球人口老龄化, AD 患者数量不可避免地增加, 这是一种快速增长的脑部疾病^[3]。据报道, AD 与其他类型的痴呆症是全球第 5 大死亡原因。大约有 5 000 万人患有痴呆症, 预计到 2030 年, 这一数据将翻一番, 到 2050 年将翻 3 倍。每年全球报告的新增病例约为 1 000 万^[2,4]。在 AD 与轻度认知障碍患者中发现了各种免疫炎症变化, 包括促炎细胞因子和活化小胶质细胞水平升高, 进一步说明神经炎症在 AD 的发病机制中起重要作用。人类超过 25 个基因位点与 AD 发病风险相关, 其中大多数基因位点主要表达于小胶质细胞, 并与神经炎症相关, 表明小胶质细胞活化参与 AD 的病理生理学改变^[5]。小胶质细胞的激活会增加促炎细胞因子和趋化因子的表达, 如白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-8 (Interleukin-8, IL-8) 等^[6]。而 IBA1 对基本神经胶质细胞发育过程中的小胶质细胞活动有重要作用^[7]。SPAGNUOLO 等^[8]总结了炎症在神经退行性疾病中的作用, 强调黄酮类化合物作为抗炎剂的潜在治疗作用。随着 AD 研究的深入, 天然药物及其提取物中的有效成分对 AD 的预防和治疗作用日益受到重视。琐琐葡萄作为新疆独特的葡萄品种, 其化学成分较复杂, 黄酮类化合物是其生物活性成分之一。黄酮类化合物是存在于植物中的多酚类化合物, 通过苯基丙酸类途径合成, 其具有抗氧化和消炎的作用^[9]。有研究表明, 摄入类黄酮可以降低痴呆的风险^[10]。

黄酮类化合物具有神经保护作用, 可以减少癫痫患者的氧化应激。摄入浆果类黄酮可以改善老年人的记忆力。此外, 现在越来越多的证据支持黄酮类化合物有干预 AD 相关途径的能力^[11]。前期研究结果表明, 琐琐葡萄提取物对模拟 AD 损伤的神经细胞和动物模型均有明显的神经保护作用^[12-13]。本实验探讨琐琐葡萄黄酮 (flavones from vitis vinifera L, VTF) 对 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠神经炎症的影响及其神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 药品和主要试剂

琐琐葡萄药材购自新疆吐鲁番维吾尔药材市场, 盐酸多奈哌齐 (批号: S60449) 购自上海源叶生物科技有限公司, 兔抗 APP (货号: Ab32136)、IBA1 (货号: Ab178846-40) 均购自英国 Abcam 公司, 浓缩型 DAB 试剂盒 (货号: ZLI-9018)、兔二步法试剂盒 (货号: PV-6001) 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 蛋白含量测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 主要仪器

酶标仪 (美国宝特)、切片机 (德国徕卡公司)、包埋机 (常州中威电子仪器有限公司)、组织脱水机 (武汉天之睿医疗科技有限公司)、摊片烤片机 (上海机密仪器仪表有限公司)、NIKON 正置研究级显微镜 (日本尼康)。

1.3 动物分组及给药

6 月龄 SPF 级雄性 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠 75 只和同龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 15 只均购自启

动子生物科技(北京)有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(浙)2019-0004, 实验动物使用许可证号: SYXK(新)2018-0003, 伦理审批号: IACUC-20210507-07。适应性饲养 7 d, APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠 75 只, 随机分为 5 组, 即模型组(0.5% CMC-Na)、阳性组(多奈哌齐 0.7 mg/kg 体重)、VTF 低剂量组(VTF 70 mg/kg 体重)、VTF 中剂量组(VTF 210 mg/kg 体重)、VTF 高剂量组(VTF 420 mg/kg 体重)。6 月龄同背景 SPF 级 C57BL/6 小鼠 15 只为对照组(0.5% CMC-Na), 连续给药 8 周。所有药物溶剂均为 0.5% CMC-Na 溶液。每组随机选取 6 只小鼠进行以下实验。

1.4 免疫组织化学检测各组小鼠大脑皮层 IBA1 蛋白阳性表达率

石蜡切片脱蜡至水, 抗原修复, 山羊血清封闭 25 min, 滴加一抗, 4℃ 过夜, 滴加二抗工作液, DAB 显色, 苏木精复染, 封片, 显微镜下观察。每组随机选取 6 张切片, 光学显微镜下观察, 保存图片, 应用图像分析软件 Image J 分析免疫组织化学染色结果。

1.5 Western blotting 检测 APP、IBA1 蛋白表达

分别称取各组小鼠大脑组织 50 mg, 研磨, 提取总蛋白。用 BCA 定量试剂盒测定总蛋白含量, 采用聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)制胶、电泳, 湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。将 PVDF 膜浸泡在稀释后的 APP(1:1 000)、IBA1(1:1 000), GAPDH(1:5 000)一抗中, 4℃ 摇床孵育过夜; 次日将洗涤后的 PVDF 膜浸泡在二抗(1:5 000)中, 室温孵育 1 h。洗膜后将 PVDF 膜浸泡在 ECL 化学发光剂中, 取出后凝胶成像仪曝光显色。用 Image J 软件分析条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算 APP、IBA1 蛋白相对表达量。

1.6 ELISA 检测小鼠脑组织中 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量

快速取出各组小鼠脑组织并置入 -80℃ 冰箱冷

冻保存。组织匀浆取上清液, 设定标准孔、空白孔、样本孔。每孔加生物素化抗体工作液体, 37℃ 孵育 1 h; 洗版, 每孔加酶结合物工作液; 洗版; 加底物溶液 37℃ 孵育 15 min; 加入加终止液; 15 min 内进行测定每孔光密度(OD)值, 根据标准品 OD 值和浓度计算 IL-1β、IL-6 及 TNF-α 的含量。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计学软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较用单因素方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠大脑皮层 IBA1 蛋白阳性表达率的比较

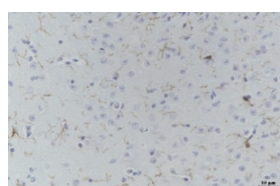
免疫组织化学检测结果显示, 各组小鼠大脑皮层 IBA1 蛋白阳性表达率的比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 模型组小鼠大脑皮层 IBA1 蛋白阳性表达率较对照组升高($P < 0.05$), 阳性组及 VTF 各剂量组 IBA1 蛋白阳性表达率较模型组降低($P < 0.05$)。见表 1 和图 1。

2.2 各组小鼠脑组织 APP、IBA1 蛋白相对表达量

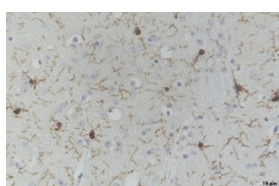
表 1 各组小鼠大脑皮层 IBA1 蛋白阳性表达率的比较
($n = 6, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	IBA1 蛋白阳性表达率
对照组	1.8 ± 0.2
模型组	7.9 ± 1.9 ^①
阳性组	2.1 ± 0.7 ^②
VTF 低剂量组	2.2 ± 0.4 ^②
VTF 中剂量组	2.6 ± 0.5 ^②
VTF 高剂量组	2.1 ± 0.5 ^②
F 值	40.559
P 值	0.000

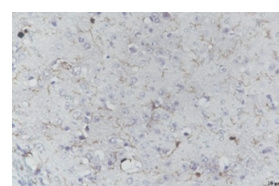
注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。



对照组



模型组



阳性组

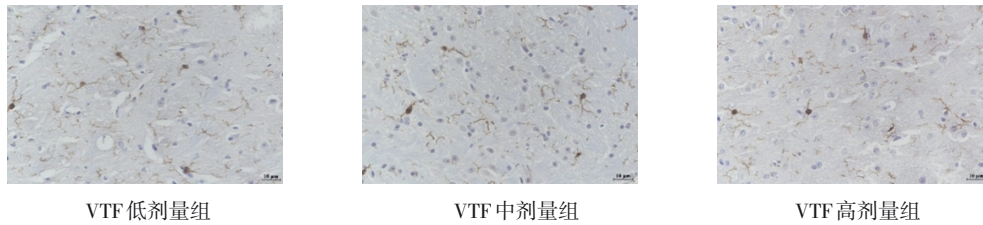


图 1 各组小鼠大脑皮层 IBA1 蛋白阳性表达 (免疫组织化学 × 400)

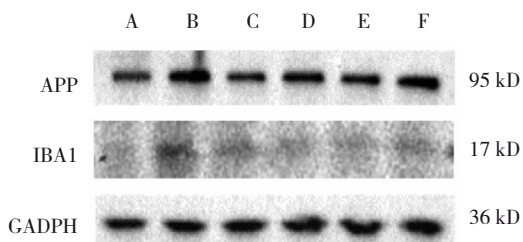
比较

Western blotting 检测结果显示, 各组小鼠脑组织 APP、IBA1 蛋白相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 模型组 APP、IBA1 蛋白相对表达量较对照组升高 ($P < 0.05$), 阳性组及 VTF 各剂量组 APP、IBA1 蛋白相对表达量较模型组降低 ($P < 0.05$)。见表 2 和图 2。

表 2 各组小鼠脑组织 APP 和 IBA1 蛋白相对表达量的比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	APP 蛋白	IBA1 蛋白
对照组	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.2
模型组	1.4 ± 0.8 ^①	1.1 ± 0.5 ^①
阳性组	0.8 ± 0.4 ^②	0.7 ± 0.3 ^②
VTF 低剂量组	0.7 ± 0.2 ^②	0.6 ± 0.2 ^②
VTF 中剂量组	0.6 ± 0.3 ^②	0.5 ± 0.3 ^②
VTF 高剂量组	0.7 ± 0.3 ^②	0.6 ± 0.3 ^②
F 值	3.061	2.733
P 值	0.024	0.038

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。



A: 对照组; B: 模型组; C: 阳性组; D: VTF 低剂量组; E: VTF 中剂量组; F: VTF 高剂量组。

图 2 各组小鼠脑组织蛋白表达

2.3 各组小鼠脑组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量的比较

ELISA 检测结果显示, 各组小鼠脑组织 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量比较, 差异有统计学意义 ($P <$

0.05), 模型组 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量较对照组增加 ($P < 0.05$), 阳性组及 VTF 各剂量组 IL-1β、IL-6、TNF-α 含量较模型组减少 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠脑组织炎症因子含量的比较 ($n = 6, \text{pg/mL}, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-1β	IL-6	TNF-α
对照组	196.9 ± 7.4	871.0 ± 26.2	89.8 ± 10.2
模型组	234.3 ± 5.6 ^①	955.6 ± 38.0 ^①	133.3 ± 20.1 ^①
阳性组	197.5 ± 34.6 ^②	866.2 ± 80.2 ^②	102.8 ± 11.6 ^②
VTF 低剂量组	173.5 ± 32.1 ^②	879.5 ± 21.9 ^②	84.5 ± 10.9 ^②
VTF 中剂量组	220.5 ± 36.4 ^②	889.0 ± 54.1 ^②	104.4 ± 9.0 ^②
VTF 高剂量组	176.4 ± 42.8 ^②	861.3 ± 49.2 ^②	91.9 ± 15.4 ^②
F 值	3.789	3.063	10.245
P 值	0.009	0.024	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

在 AD 的发病机制和进展中, β-淀粉样蛋白 (β amyloid protein, Aβ) 的神经毒性寡聚体的出现和传播被广泛认为是 AD 发病机制中的关键因素, 导致神经元损伤、氧化应激、线粒体功能障碍等, 并导致认知缺陷^[14]。Aβ 作为人体的正常代谢产物, 一般情况下其发生和降解保持一定的水平, 当淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 水解异常而导致其代谢异常时, 会产生更多 Aβ, 降解量的减少导致 Aβ 的大量聚集^[15]。有研究发现, AD 患者大脑海马结构及其他相关脑区内有大量淀粉样蛋白沉积, 同时出现 APP 免疫阳性神经元数量增加^[16]。因而推测 APP 过度产生是细胞内 Aβ 沉积形成及 AD 发病的主要机制之一。神经炎症可能是 AD 病理起始的重要组成部分。据报道, 在 AD 的发展过程中, Aβ 沉积可以激活小胶质细胞和星形细胞^[17]。小胶质细胞的激活会增加促炎细胞因子的

表达^[6]。

本实验对 6 月龄 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠用阳性药多奈哌齐和 VTF 进行灌胃 8 周。免疫组织化学结果显示, 对照组、阳性组及 VTF 各剂量组 IBA1 蛋白阳性表达率较模型组降低, 说明 VTF 可以通过减少 IBA1 在 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠脑内的过表达来起到减轻神经炎症的作用。Western blotting 检测结果显示, 阳性组及 VTF 各剂量组 APP、IBA1 蛋白相对表达量较模型组降低, 这说明 VTF 能够通过改善 AD 小鼠神经炎症水平起到神经保护作用。ELISA 检测结果显示, 阳性组及 VTF 各剂量组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量较模型组减少, 说明 VTF 可以减少神经炎症的发生。由于此次实验样本量少, 故 VTF 各剂量组之间没有呈现明显的量效关系, 后续会进一步加大样本量深入观察 VTF 各剂量组是否存在量效关系。

综上所述, VTF 通过降低 APP、IBA1 等蛋白表达, 以及减少 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等炎症因子含量对 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠大脑的神经元细胞起到较好的保护作用并减缓神经炎症的发生。本研究结果为深入探讨 VTF 对 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠的神经保护作用奠定基础, 但仍需进一步研究 VTF 发挥神经保护作用的具体过程, 并确定其在人体中的作用。

参 考 文 献 :

- [1] UDDIN M S, KABIR M T, AL MAMUN A, et al. APOE and Alzheimer's disease: evidence mounts that targeting APOE4 may combat Alzheimer's pathogenesis[J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(4): 2450-2465.
- [2] GIACOMELI R, IZOTON J C, DOS SANTOS R B, et al. Neuroprotective effects of curcumin lipid-core nanocapsules in a model Alzheimer's disease induced by β -amyloid 1-42 peptide in aged female mice[J]. *Brain Res*, 2019, 1721: 146325.
- [3] SHABBIR U, RUBAB M, TYAGI A, et al. Curcumin and its derivatives as theranostic agents in Alzheimer's disease: the implication of nanotechnology[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1): 196.
- [4] VOULGAROPOULOU S D, van AMELSVOORT T A M J, PRICKAERTS J, et al. The effect of curcumin on cognition in Alzheimer's disease and healthy aging: a systematic review of pre-clinical and clinical studies[J]. *Brain Res*, 2019, 1725: 146476.
- [5] CHENG J B, DONG Y, MA J, et al. Microglial calhm2 regulates

neuroinflammation and contributes to Alzheimer's disease pathology[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(35): eabe3600.

- [6] 周卿云, 夏天娇, 刘甜甜, 等. 免疫细胞参与调控阿尔茨海默病的研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(21): 2653-2656.
- [7] LITUMA P J, WOO E, O'HARA B F, et al. Altered synaptic connectivity and brain function in mice lacking microglial adapter protein Iba1[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(46): e2115539118.
- [8] SPAGNUOLO C, MOCCIA S, RUSSO G L. Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 153: 105-115.
- [9] MALEKI S J, CRESPO J F, CABANILLAS B. Anti-inflammatory effects of flavonoids[J]. *Food Chem*, 2019, 299: 125124.
- [10] KHAN A, IKRAM M, HAHM J R, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of citrus flavonoid hesperetin: special focus on neurological disorders[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(7): 609.
- [11] WILLIAMS R J, SPENCER J P E. Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(1): 35-45.
- [12] MA L J, XIAO H, WEN J, et al. Possible mechanism of *Vitis vinifera* L. flavones on neurotransmitters, synaptic transmission and related learning and memory in Alzheimer model rats[J]. *Lipids Health Dis*, 2018, 17(1): 152.
- [13] 袁芳, 周勇, 盛磊, 等. 琐琐葡萄多糖对阿尔茨海默病细胞模型 APP 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(18): 107-110.
- [14] 王金秀, 高凡, 孙慧珍, 等. A β 对阿尔茨海默病影响机制的研究进展[J]. *生命科学研究*, 2021, 25(1): 53-57.
- [15] 米日妮萨·凯才尔, 闫楚涵, 郭慧芳. 阿尔茨海默病的发病机制及相关研究进展[J]. *解剖学研究*, 2021, 43(3): 276-281.
- [16] LENG F D, EDISON P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here[J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(3): 157-172.
- [17] WYSS-CORAY T, ROGERS J. Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(1): a006346.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 再娜甫古丽·买买提, 武梦月, 古力夏提·艾力, 等. 琐琐葡萄黄酮对 APP/PS-1 双转基因阿尔茨海默病小鼠神经炎症的保护作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(11): 45-49.

Cite this article as: MAIMAITI Z, WU M Y, AILI G, et al. Protective effect of flavones from *vitis vinifera* L on neuroinflammation in APP/PS-1 double transgenic Alzheimer's disease mice[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(11): 45-49.