

TRP 对 KA 诱导的 AD 模型大鼠学习记忆的影响及其作用机制 *

杨 腊 邓月琴 黄荣华 郑 涛 刘 丰 李建明[△]

(长沙医学院人体解剖学教研室 湖南 长沙 410219)

摘要 目的 观察雷公藤甲素(Triptolide,TRP)对海人藻酸(Kainic acid,KA)海马内注射后大鼠学习记忆的影响及其作用机制。方法:采用 Morris 水迷宫筛选空间学习记忆能力正常的 SD 雄性大鼠 90 只(200~220g)。将实验动物分成 3 组:右侧海马注射生理盐水后生理盐水灌胃对照组(NS+NS)、右侧海马注射海人藻酸后生理盐水灌胃干预组(KA+NS)、右侧海马注射海人藻酸后雷公藤甲素灌胃干预组(KA+TRP)。动物存活 1 天,3 天,5 天,7 天,14 天,每个时间点 6 只,处死前分别于各相应时间点用 Morris 水迷宫检测各组动物空间位置记忆能力。免疫组织化学方法结合图像分析技术检测海马 CA1 区神经元 COX-2 的表达。结果:与 NS 组(NS+NS)比较,KA 组(KA+NS)大鼠逃避潜伏期延长($P<0.05$),跨越原平台次数减少($P<0.05$)。海马 CA1 区的神经元 COX-2 表达升高($P<0.05$)。TRP 组(TRP+KA)与 KA 组比较,大鼠的平均逃避潜伏期从第 5 天起缩短($P<0.05$),跨越原平台次数增多($P<0.05$),海马 CA1 区神经元 COX-2 表达在 5 天,7 天时下调($P<0.05$)。结论 KA 海马内注射,可以导致大鼠学习记忆功能障碍及上调海马 CA1 区神经元 COX-2 表达;雷公藤甲素干预治疗,能够改善动物的学习和记忆能力,能抑制 KA 诱导的海马 CA1 区神经元 COX-2 的表达。

关键词 KA;Triptolide;学习和记忆;Morris 水迷宫;海马

中图分类号 Q95-3,R285.5,R74 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)25-4816-04

Effects of Triptolide on Learning and Memory and its Mechanism on AD Rats Induced by KA*

YANG La, DENG Yue-qin, HUANG Rong-hua, ZHENG Tao, LIU Feng, LI Jian-ming[△]

(Department of Anatomy, Changsha Medical University, Changsha Hunan 410219, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effects of triptolide (TRP) on learning and memory of rats induced by injection of kainic into hippocampus and its mechanism. **Methods:** 90 SD rats with normal learning and memory were selected by Morris water maze method, and then divided randomly into three groups: NS treated after NS injection into the right dorsal hippocampus group (NS+NS, n=30); NS treated after KA injection into the right dorsal hippocampus group (KA+NS, n=30); TRP treated after KA injection into the right dorsal hippocampus group (KA+TRP, n=30). The animals were sacrificed at d1, d3, d5, d7, d14 after KA injection, 6 rats for each time point. The behavior of rats was detected by Morris water maze before sacrificed. COX-2 expression in CA1 region of hippocampus was investigated by immunohistochemistry and computer image analysis methods. **Results:** Compared with that of NS+NS group, a significant increase in the mean escape latencies of rats and an obvious decrease in frequency of passing through the platform of rats occurred in KA+NS group ($P<0.01$). COX-2 expression of CA1 hippocampus obviously increased in KA+NS group ($P<0.01$). Compared with KA+NS group, the mean escape latencies of rats decreased and the frequency of passing through the platform of rats increased at d 5, d 7, d 14 in KA+TRP group ($P<0.05$). COX-2 expression in CA1 hippocampus significantly decreased at d 5, d 7 in KA+TRP group ($P<0.05$). **Conclusion:** Kainic acid can contribute to the decreased learning and memory and the increased expression of COX-2 in area CA1 of the hippocampus *in vivo*. Treatment with triptolide can inhibit the expression of COX-2 which was induced by kainic acid in CA1 area of hippocampus.

Key words: Kainic acid; Triptolide; Learning and memory; Morris Water Maze; Hippocampus

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R285.5, R74 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)25-4816-04

前言

阿尔茨海默和帕金森病是由于兴奋性毒素过度作用刺激谷氨酸受体导致神经细胞损伤或死亡^[1,2]。海人藻酸(kainic

acid,KA)是谷氨酸受体亚型的协同剂。祝威等^[3]经鼻滴入 KA 后,成功地在 C57BL/6 鼠上建立了神经系统退行性疾病动物模型。炎症过程是许多神经病理过程包括神经退行性疾病等的共同特征。环氧合酶(Cyclooxygenase,COX)及产生的前列腺素在

* 基金项目 湖南省自然科学基金项目(11JJ5072) 湖南省科技计划项目(2010FJ4118/2011SK) 湖南省医药卫生科研计划课题(B2011-071); 湖南省教育厅科学研究项目(11C0146) 湖南省大学生创新实验项目(374)

作者简介 杨腊,男,主要从事神经退变的基础研究,电话 1(0731)88498021,E-mail:1322191573@qq.com

[△]通讯作者 李建明,讲师,电话 1(0731)88498021,E-mail:ljmj0901@sina.com

(收稿日期 2012-02-15 接受日期 2012-03-12)

神经系统炎症过程中起重要的作用,在包括脑在内的多种组织中广泛表达^[1]。COX-2 是炎症过程中的重要介质^[2],且 COX-2 表达增加与许多神经疾病的病理过程中神经元凋亡有关^[3]。在阿尔茨海默病人脑内^[4]及帕金森(氏)病患者的黑质及尾状核内 COX-2 表达及活性增高^[5,6]。雷公藤甲素(Triptolide,TRP)是雷公藤的醇类提取物,具有免疫抑制与抗炎的功效^[4],研究发现雷公藤甲素具有神经元保护作用^[5]。本文研究了雷公藤甲素对通过大鼠右侧海马微量注射海人藻酸(kainic acid,KA)建立的神经退行性变动物模型动物的行为学的变化及神经元 COX-2 表达变化。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型制备

90 只成年健康 SD 大鼠随机分为 右侧海马生理盐水注射 + 生理盐水灌胃对照组(NS+NS,n=30) 右侧海马海人藻酸注射 + 生理盐水灌胃干预组(KA+NS 组,n=30) 右侧海马海人藻酸注射 + 雷公藤甲素(TRP)灌胃干预组(KA+TRP 组,n=30)。

神经退行性变动物模型制备方法参照我们前期的文献报道^[7,8]。各组动物分别存活 1 d,3 d,5 d,7 d,14 d。

1.2 Morris 水迷宫测试与水迷宫空间位置记忆检测

所有动物于分组前用 Morris 水迷宫进行为期 3 天的行为学训练。Morris 水迷宫测试实验与操作参照前期研究文献进行^[7,8],不达标的动物剔除。Morris 水迷宫空间位置记忆检测:各组成

术后 1 d,3 d,5 d,7 d,14 d 再作水迷宫检测,比较各组动物处理前后潜伏期的差别以及游泳轨迹改变和跨越原平台次数以衡量动物空间位置记忆能力。

1.3 组织制备与 COX-2 免疫组织化学检测

组织制备参照前期研究文献进行,COX-2 免疫组织化学检测采用 ABC 试剂盒漂浮法进行,具体操作参照试剂盒操作说明进行。

1.4 图像采集和统计学分析

在德国 Motic 公司生产的 Motic 显微镜下观察切片注射区附近随机选取 5 个高倍视野(400×)统计 COX-2 阳性细胞数,并测量其灰度值,实验数据以均数±标准差表示,组间比较采用方差分析,每个标本随机选取 5 张海马区切片。统计处理采用 SPSS15.0 软件进行操作处理,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雷公藤甲素对大鼠学习和记忆的影响

从表 1 可以获知:从第 3 天开始,与 NS+NS 组比较,其它 2 组的平均逃避潜伏期延长 ($P<0.05$);与 KA+NS 组相比,TRP+KA 组大鼠平均逃避潜伏期缩短 ($P<0.05$)。

从图 1 可以获知:NS+NS 组动物比较 KA+NS 组动物跨越原平台位置次数减少 ($P<0.05$),与 KA+NS 组动物比较,TRP+KA 组动物跨越原平台位置次数增多 ($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠在定位航行试验中的平均逃避潜伏期(s, $\bar{x}\pm SD$)

Table 1 Mean escape latencies of rats in each group

组别 Groups	N	1d	3d	5d	7d	14d
NS+NS group	6	22.4±3.13	23.06± 3.76	25.64± 3.27	28.14± 5.87	36.93± 2.38
KA+NS group	6	24.5± 3.13	36.08± 3.56#	52.31± 4.03#	63.24± 3.26#	91.25± 5.85#
TRP+KA group	6	23.82± 2.35	30.84± 3.63	39.25± 2.25△	41.21± 3.16△	50.00± 3.33△

注 #: vs NS+NS 组 $P<0.01$; △ vs KA+NS 组 $P<0.05$ 。

Note: * vs NS+NS 组 $P<0.01$ # vs KA+NS 组 $P<0.05$ 。

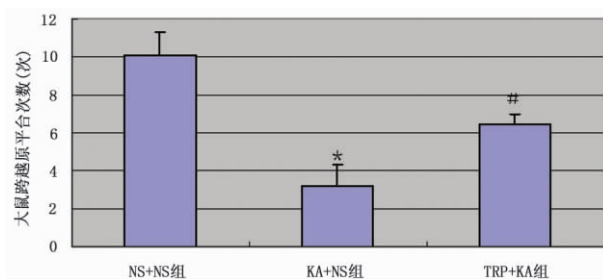


图 1 5d 各组大鼠在空间探索试验跨越原平台位置次数

Fig. 1 Frequency of passing through the platform of rats at 5 d in each group

2.2 雷公藤甲素对大鼠海马内神经元 COX-2 表达的影响

COX-2 阳性产物位于胞浆,少量位于核膜(图 2 B-F)。NS+NS 组仅见少量的 COX-2 阳性神经元分布于海马 CA1 区锥体层及非锥体层,细胞轮廓不清晰(Fig.1A)。KA+NS 组和 TRP+KA 组可见细胞胞浆清晰,阳性细胞数目增多(图 2 B, C)。KA+NS 组 1 天,3 天,5 天,7 天海马 CA1 区 COX-2 阳性

细胞数均高于 NS+NS 组 ($P<0.01$ 图 2)。灰度值测定结果低于 NS+NS 组 ($P<0.05$, 表 1)。TRP+KA 组与 KA+NS 组比较,COX-2 阳性细胞数减少,5 天,7 天有统计学意义 ($P<0.05$, 图 3),灰度值测定结果显示 5 天,7 天有差异 ($P<0.05$, 表 1)。KA+NS 组和 TRP+KA 组 COX-2 阳性细胞数在第 5 天达到高峰。

3 讨论

本实验采用经典的学习记忆能力测试 Morris 水迷宫实验来检测 SD 大鼠 KA 损伤经雷公藤甲素干预的恢复情况时发现 NS+NS 组大鼠平均潜伏期较稳定,搜索策略中运动轨迹多位于原平台位置所在的象限。KA+NS 组大鼠从第 3 天开始,平均逃避潜伏期较对照组明显延长 ($P<0.05$, 表 3-1),其搜索策略与对照组相比,大多绕池壁游泳,较少游向原平台位置,其运动轨迹随机分布于各象限中。与 NS+NS 组比较,动物跨越原平台位置次数明显减少 ($P<0.05$)。表明 KA 损伤后,大鼠的空间辨别和记忆能力下降。文献表明,KA 与谷氨酸受体结合导致的神

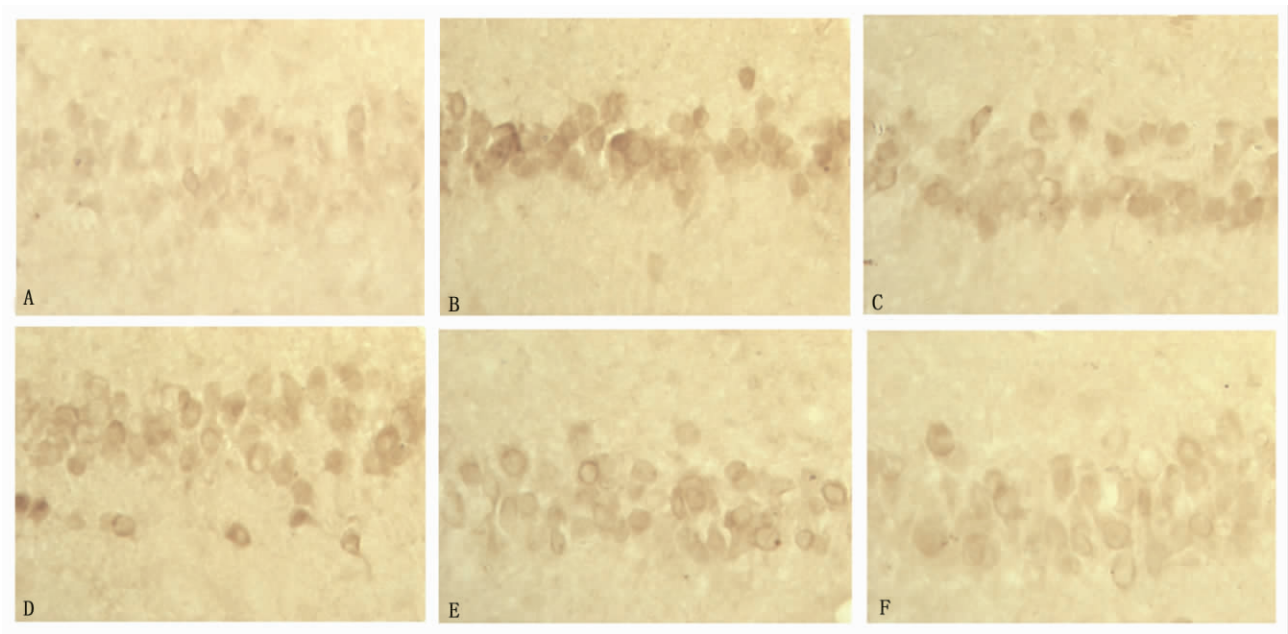


图2 海马 CA1 区 COX-2 免疫染色

Fig. 2 Immunohistochemistry results of COX-2 expression in CA1 region of hippocampus

A NS+NS 组, (× 400) B KA+NS 组, 1d (× 400)
C TRP+KA 组, 1d (× 400) D KA+NS 组, 5d (× 400)
E TRP+KA 组, 5d (× 400) F TRP+KA 组, 7d (× 400)

* vs NS+NS 组 P<0.01 # vs KA+NS 组 P<0.05

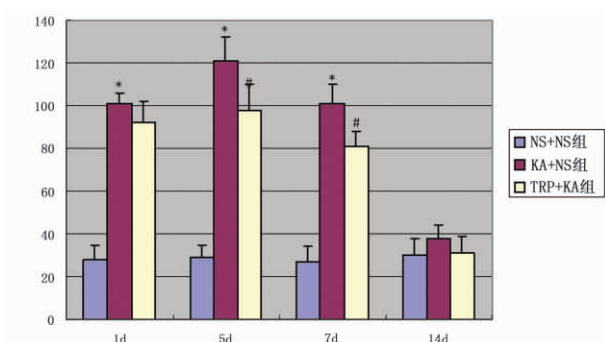


图3 大鼠海马 CA1 区 COX-2 阳性细胞计数

Fig. 3 Positive cell counting of COX-2 in CA1 region of hippocampus

神经元去极化引起记忆减退^[9]。而且,KA 能通过影响 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK) 的活性影响空间

记忆能力^[10]。TRP+KA 组动物与 KA+NS 组比较,从第 5 天起,雷公藤甲素治疗后大鼠平均逃避潜伏期明显缩短 ($P<0.05$),在空间探索策略中,与 NS+NS 组大鼠类似,运动轨迹多位于原平台位置所在象限,跨越原平台位置明显增多 ($P<0.05$,图 3)。雷公藤甲素治疗后大鼠的行为学变化均显示出较好的空间记忆能力。这表明,雷公藤甲素治疗后,大鼠空间记忆能力有所改善。

COX-2 是花生四烯酸代谢产生前列腺素 PG 过程中的限速酶。COX-2 的表达与炎症有密切关系^[11]。正常情况下,许多组织检测不到 COX-2 的表达,当组织损伤和炎症因子刺激下,神经细胞而不是胶质细胞能表达大量的 COX-2。我们的实验结果进一步证实了这一结论。我们观察到 KA 注射后,神经元大量表达 COX-2 而星形胶质细胞没出现 COX-2 的表达。我们的实

表 1 大鼠海马 CA1 区 COX-2 免疫染色平均灰度值($\bar{x} \pm SD$)

Table 1 Mean gray scale of COX-2 in CA1 region of hippocampus

	N	1d	5d	7d	14d
NS+NS group	6	181± 3.36	186± 2.31	184± 2.32	183± 3.21
KA+NS group	6	153± 2.23*	130± 3.21*	156± 3.16*	175± 2.14
TRP+KA group	6	160± 1.16	145± 2.33 #	168± 2.26 #	180± 3.15

Note: * vs NS+NS 组 P<0.01 # vs KA+NS 组 P<0.05.

验进一步发现,COX-2 表达在 KA 注射后表达明显上升,5 天达到高峰,14 天回到基线水平,与文献报道基本一致^[11]。COX-2 作为一种炎症反应因子参与机体的炎症反应,在许多疾病包括

神经退行性疾病的发病机制中发挥重要的作用^[12,13]。COX-2 可以调节下游炎症介质的形成,发挥炎症损伤作用。实验证实氧化应激介导了 COX-2 在 PD 发病机制中的毒性作用^[14,15]。另外,

在 COX-2 炎症环路中,上游调节基因 NF- κ B 在介导 COX-2 的作用中扮演重要角色。COX-2 启动子上含有 2 个 NF- κ B 位点序列,NF- κ B 位点为 COX-2 转录激活所必需。外界刺激经过一定的信号转导,使一系列蛋白激酶磷酸化激活,作用于这些位点,引起相应的转录因子表达上调,从而激活 COX-2 基因转录。谷氨酸及其受体能够激活 NF- κ B,从而引起 COX-2 的表达。

KA 是谷氨酸受体激动剂,我们的实验证实了谷氨酸受体活化与 COX-2 表达的关系。我们发现,KA 注射后,大鼠海马 CA1 区神经元 COX-2 表达明显高于 NS+NS 组 ($P<0.01$),说明谷氨酸受体激活诱导 COX-2 的生成。因此,COX-2 的生成在神经系统病变过程中起重要的作用,能通过多种机制对神经元产生有害影响。同时提示,在炎症环路中,阻断 COX-2 的活性,可以影响炎症通路,限制神经元的兴奋性损伤。

研究发现雷公藤甲素还能抑制人类气管上皮细胞 IL-6 和 IL-8 的表达^[16]。研究进一步证实,雷公藤甲素能够剂量依赖式减少原代培养微胶质细胞由脂多糖诱导的 TNF- α 和 IL-1 β 的释放及 mRNA 的表达^[17]。雷公藤甲素具有亲脂性和小分子量等特性,能够轻易通过血-脑屏障,本实验探讨其在中枢神经系统的抗炎作用。本研究结果显示:雷公藤甲素可以抑制 KA 损伤所致的 COX-2 表达,TRP+KA 组与 KA+NS 组比较,5 d,7 d,大鼠海马 CA1 区 COX-2 表达明显降低 ($P<0.05$,Fig.2.B,C)。导致上述情况的原因可能与雷公藤甲素能通过阻断环氧化酶-2 上调达到抑制单核细胞及成纤维细胞前列腺素产生的作用,也可能通过抑制 NF- κ B 的活性来抑制 COX-2 的表达来实现^[18]。但具体机制需要进一步的研究。

参考文献 (References)

- [1] Saba A^d, Sang-Ho Choi, Christopher D. Toscano and Francesca Bosetti. Distinct Roles of Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2 in Inflammatory and Excitotoxic Brain Injury[J]. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice, 2011: 119-136
- [2] Dinesh Kumar Dhull, Ankur Jindal, Rakesh K. Dhull, et al. Neuroprotective Effect of Cyclooxygenase Inhibitors in ICV-STZ Induced Sporadic Alzheimer's Disease in Rats [J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2012, 46(1): 223-235
- [3] Kunz T,Olivi EH. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib reduces kainate-induced cell death in the rat hippocampus [J]. Eur J Neurosci, 2001, 13(3):569-575
- [4] Willis SA, Nisen PD. Differential induction of the mitogen-activated protein kinase pathway by bacterial lipopolysaccharide in cultured monocytes and astrocytes[J]. Biochem J, 1996, 313(pt2): 519-524
- [5] 崔香艳, 祝威, 祝捷. B 细胞和 T 细胞亚型在海人藻酸引起的 C57BL/6 鼠海马神经元损伤过程中不同的作用[J]. 中风与神经疾病杂志, 2007, 24(6): 706-709
Cui Xiang-yan, Zhu Wei, Zhu Jie. B cell and T cell subsets contribute differently to the pathogenesis that the KA-induced hippocampal neurodegeneration in C57BL/6 mice [J]. Journal of Apoplexy and Nervous Diseases, 2007, 24(6): 706-709
- [6] 刘智良, 徐如祥, 姚志彬, 等. 红藻氨酸致病后大鼠海马 ERK、p38MAPK 和 JNK 的活性变化 [J]. 中华神经医学杂志, 2006, 5(2): 137-140
Liu Zhi-liang, Xu Ru-xiang, Yao Zhi-bin, et al. Change of MAPKs activation in rat hippocampus following kainic acid-induced epileptic seizures[J]. Chinese Journal of Neuromedicine, 2006, 5(2):137-140
- [7] 李建明, 吴仪, 高劲松, 等. 雷公藤甲素对 KA 损伤大鼠星形胶质细胞的影响[J].现代生物医学进展, 2007, 7(10): 1497-1499
Li Jian-ming, Wu Yi, Gao Jin-song, et al. Effects of Triptolide on Astrocytes Induced by KA Injection Into Rat Hippocampus [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2007, 7(10):1497-1499
- [8] 李建明, 雷德亮. KA 海马注射对大鼠学习和记忆的影响及雷公藤甲素的保护作用[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(19): 3651-3654
Li Jian-ming, Lei De-liang. The protective effect of triptolide on the learning and memory of rats induced by injection of KA into hippocampus [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009,9 (19): 3651-3654
- [9] Teismann P, Tieu K, Choi DK, et al. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration [J].Proc Natl Acad Sci, 2003,100(9):5473-5478
- [10] Gu WZ, Chen R, Brandwein S, et al. Isolation, purification, and characterization of immunosuppressive compounds from tripterygium: triptolide and triptidiolide [J]. Int J Immunopharmacol, 1995, 17(5): 351-356
- [11] Tao X, Lipsky PE. The Chinese anti-inflammatory and immunosuppressive herbal remedy Tripterygium wilfordii Hook F[J]. Rheum Dis Clin North Am, 2000,26(1):29-50
- [12] Hinz B, Brune K. Cyclooxygenase-2-10 years later [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002,300(2):367-375
- [13] Yermakova A,O'Banion MK. Cyclooxygenases in the central nervous system: implications for treatment of neurological disorders [J]. Curr Pharm Des, 2000,6(17):1755-1776
- [14] Teismann P, Tieu K, Choi DK, et al. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration [J]. Natl Acad Sci USA, 2003, 100(9): 5473-5478
- [15] Shen XM, Li H, Dryhurst G. Oxidative metabolites of 5-S-cysteinyldopamine inhibit the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: possible relevance to the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. J Neural Transm, 2000, 107(8-9): 959-978
- [16] Zheng J. Screening of active anti-inflammatory, immunosuppressive and antifertility components of Tripterygium wilfordii: III. A comparison of the antiinflammatory and immunosuppressive activities of 7 diterpene lactone epoxide compounds in vivo [J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae,1991,13(3):391-397
- [17] Niu DB, Xue B, Li FQ, et al. Triptolide inhibits TNF- α ,IL-1 β and NO production in primary microglial cultures [J]. NeuroReport, 2003, 14(7):1091-1095
- [18] Yu Chao, Shan Ting, Feng Ai-wen, et al. Triptolide ameliorates Crohn's colitis is associated with inhibition of TLRs/NF- κ B signaling pathway[J].Fitoterapia, 2011,82(4): 709-715