DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20231018.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20231018.1019.002

二苯乙烯苷调控MKK7/JNK信号通路改善阿尔茨海默病大鼠神经元损伤作用及机制研究

李 悦[1],康碧倩[1],何晓璇[2],胡 睿[1],肖 振[1],罗陈亮[2],吴桂有[2],黄忠仕[1]✉
(1.右江民族医学院基础医学院,广西 百色 533000;2.广西中医药大学药学院,广西 百色 533000)

[摘要] **目的**:探讨二苯乙烯苷(TSG)通过调控MKK7/JNK通路改善阿尔茨海默病大鼠神经元损伤中的作用机制。**方法**:采用24月龄的雄性老年大鼠42只,随机分为正常组,假手术组,模型组,阳性药组(0.15 mg/kg石杉碱甲),以及TSG低剂量组(0.033 g/kg)、TSG中剂量组(0.1 g/kg)、TSG高剂量组(0.3 g/kg),每组6只。模型组、TSG各剂量组采用立体定位$A\beta_{25\text{-}35}$溶液构建老年痴呆模型,于造模28 d后经被动回避实验筛选造模成功的大鼠。筛选后阳性药物组、TSG各剂量组按照对应剂量灌胃给药,给药28 d后进行实验。采HE染色镜下观察每组大鼠大脑内海马区神经元细胞形态学变化;IHC检测各组大鼠脑组织MKK7、JNK蛋白的表达情况;qRT-PCR检测各大鼠脑组织内MKK7、JNK mRNA的表达情况。**结果**:(1)HE染色观察,与正常组,假手术组相比,模型组神经细胞数量减少且排列紊乱无规则,细胞膜发生皱缩,细胞核溶解变形。与模型组比较,阳性药组以及TSG各组神经细胞数量增多且排列相对整齐。(2)TUNEL染色阳性细胞比值结果:与正常组、假手术组相比,模型组凋亡细胞数量明显上调;与模型组相比,阳性药物组、TSG各组染色凋亡细胞减少($P<0.05$)。(3)免疫组化测定结果表明:与正常组和假手术组相比,模型中MKK7、JNK在大鼠脑中的蛋白表达含量显著增加($P<0.05$);与模型组比较,阳性药及TSG各剂量组蛋白表达量均有不同程度降低($P<0.05$)。(4)qRT-PCR结果显示,与正常组、假手术组相比,模型组大鼠脑组织中MKK7、JNK mRNA水平明显上升($P<0.05$);与模型组相比,各组给药大鼠脑组织中MKK7、JNK mRNA的表达含量均明显下调($P<0.05$)。**结论**:二苯乙烯苷对神经元的损伤修复有一定的作用效果,其作用机制可能与下调MKK7、JNK激酶的mRNA转录及蛋白的表达有关。

[关键词] 神经系统;阿尔茨海默病;二苯乙烯苷;MKK7;JNK
[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2023)21-1601-06

The effect and mechanism of stilbene glycosides on improving neuronal injury in Alzheimer´s disease rats by regulating ASK/MKK7/JNK pathway

LI Yue[1], KANG Bi-qian[1], HE Xiao-xuan[2], HU Rui[1], XIAO Zhen[1], LUO Chen-liang[2], WU Gui-you[2], HUANG Zhong-shi[1]✉
(1. *School of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise* 533000, *China*; 2. *School of Pharmacy , Guangxi University of Chinese Medicine, Baise* 533000, *China*)

[*Foundation Project*]: *Supported by the National Natural Science Foundation of China* (81860709); *Project of Baise City Regional Multiple Development Joint Special Plan* [*Bai Zi* (2022) 41-39]

[*Author*]: *LI Yue*, *E-mail*: 2414726343@qq.com.
[*Correspondence to*]: *HUANG Zhong-shi*, *Professor*, *Master's Supervisor*, *E-mail*: *hzs*1004@163.com.

Received: 2023-08-21 *Revised*: 2023-10-14 *JHMU*, 2023;29(21):1601-1606

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(81860709);百色市区域多发联合专项计划课题[百字(2022)41-39]
[作者简介]李悦,E-mail:2414726343@qq.com。
[通讯作者]黄忠仕,教授,硕士生导师,E-mail:hzs1004@163.com。
[收稿日期]2023-08-21 [修回日期]2023-10-14 网络出版时间:2023-10-18 19:16:44

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] Objective: To investigate the mechanism of action of tetrahydroxy stilbene glycosides (TSG) in ameliorating neuronal damage in Alzheimer's disease rats by regulating MKK7 and JNK kinases. Methods: A total of 24-month-old 42 SD rats were randomly selected for the experiment in 7 groups: normal group, sham-operated group, model group, positive drug group, low, medium and high dose TSG group at 0.033 g/kg, 0.1 g/kg, 0.3 g/kg. The model group and the TSG groups were established by stereotaxic $A\beta_{25\text{-}35}$ solution. After 28 days, the model rats were selected by passive avoidance test. After screening, each dosage group of TSG and positive drug group was given intragastrically according to the corresponding dosage, and the experiment was carried out after 28 days. The pathological changes of hippocampal CA1 region were observed by tissue staining, and the amount of MKK7 and JNK proteins and the expression content of MKK7 and JNK mRNA by histochemical method of protein, and qRT-PCR assay. Results: (1) HE staining observation: Compared with the normal group and the sham-operated group, the number of nerve cells in the model group decreased and arranged irregularly, the cell membrane shrank, and the nucleus deformed and dissolved. The number of neurons in the positive drug group and TSG group also increased significantly, the order is also relatively well. (2) From the results of the tunel staining experiments: The positive apoptotic cells in the model group were higher than control group and sham-operated group, positive drug group and TSG drugs group was significantly smaller than that in the model group ($P < 0.05$). (3) Compared with the control group and the virtual operation group, the MKK7 and JNK protein concentrations in the brain of the model group were increased ($P<0.05$) by data analysis of immunohistochemistry: Compared with the model group, the protein expression of positive drug and TSG each dose group were reduced ($P<0.05$). (4) The results of QRT-PCR data showed that the levels of MKK7 and JNK mRNA in the brain tissue of the model group were increased compared with the normal group and sham-operated groups ($P<0.05$). Conclusion: Stilbene glycoside has a certain effect on neuronal injury and repair which may be related to the changes of mRNA transcription and protein expression of MKK7 and JNK kinases.

[KEYWORDS] Nervous system; Alzheimer's disease; Stilbene glycoside; MKK7; JNK

阿尔茨海默氏病(AD)是最常见的痴呆症类型,正在成为全球健康和社会保健的主要挑战。然而,目前对AD发病机制的了解有限,目前尚无早期诊断和公认根治该疾病的药物疗法[1]。AD是一种基于神经系统方面的退行性改变的疾病,目前认为,其发病的主要机制是和人脑皮质的边缘区域中淀粉样蛋白β(Aβ)斑块形成以及tau蛋白过度磷酸形成纤维缠结,炎症的发生,氧自由基的形成有关,AD的特点是记忆力减退和进行性神经认知功能障碍并且影响日常生活活动和社会功能[2]。随着预期寿命的延长和人口老龄化的发生,全球患病率预计将继续上升,尤其是在发展中国家,给社会和家庭带来高昂的疾病负担[3]。

2,3,5,4-四羟基二苯乙烯葡萄糖苷(TSG)又称二苯乙烯苷,是中药何首乌中发挥主要药理作用的成份,有抗炎修复,抗氧化,抗细胞凋亡和清除自由基的作用,对神经系统起到保护作用,改善学习记忆能力修复脑损伤,对改善AD有一定的疗效,可舒张血管,促进血管内皮细胞增殖,降低胆固醇及抑制动脉粥样硬化等多种作用[4,5]。有研究表明TSG能提高多种AD有关蛋白的表达量,从而降低小鼠脑内APP及Aβ的过度产生进而防治AD[6]。在当前老龄化日渐普遍的背景下,研究TSG防治AD的作用机制有重要意义[7]。本实验通过观察老年大鼠AD模型给药TSG后MKK7、JNK因子的变化来进一步探讨TSG在治疗AD的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级大鼠,SD雄鼠,24月龄,长沙市天勤生物技术有限公司,许可证编号:SCXK(湘)2019-0014。喂养、取材以及实验等操作均于广西百色市右江民族医学院动物实验中心(SPF级)进行,适应环境一周后用于实验。本实验由广西百色市右江民族医学院伦理委员会审批通过后开展,整个实验过程均严格按照《关于善待实验动物的指导性意见》规范要求进行。

1.2 主要试剂

二苯乙烯苷提取物(成都克洛玛生物科技有限,公司批号:CHB180810),染料法定量PCR预混液(莫纳生物有限,公司批号:100649),封闭用正常山羊血清(北京索莱宝科技有限公司,批号:SL038)淀粉样β蛋白溶液25-35(美国SIGMA公司,批号:118M4893V),MKK7、JNK多克隆抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司批号:AB08284512)。

1.3 主要方法

1.3.1 动物造模 将SD雄性老年大鼠随机分为7组,通过海马体注射$A\beta_{25\text{-}35}$溶液制造老年痴呆模型,用1%戊巴比妥(40 mg/kg)进行腹腔注射麻醉后,将大鼠头部置于脑立体定位仪上,前囟和后囟充分

暴露后，使其呈同一条直线。剃毛备皮，无菌碘伏消毒备皮区域后，选定手术区域[8]，颅骨打孔采用直径为0.3 mm注射器垂直进针，左右海马区以1 μL/min的速率注射5 μL的$A\beta_{25-35}$溶液，操作完成后，停留大约5 min使针管尖端液体被动扩散，为避免液体溢出，应使其充分浸入溶液后缓慢出针，伤口保持清洁。假手术组在大脑上述区域注射相同量的生理盐水，正常组日常喂养，不进行任何其他操作[9]。

1.3.2 模型的筛选 采用被动回避实验行为学测试，作为筛选造模是否成功的标志。第一阶段将实验大鼠从亮室入口放入实验箱体，亮暗室两室之间入口互通，让动物自由适应10 min。将大鼠头朝室壁放入亮室，当大鼠完全进入暗室后，关闭入口后给予电刺激，使大鼠形成记忆。第二阶段进行被动回避测试，把大鼠由明室入口放入，将大鼠从明室进入暗室费时记为大鼠潜伏期，记录大鼠潜伏期以及5 min内遭受电击的错误次数，不进入暗室的大鼠潜伏期记录为300 s，对各组大鼠实验数据进行分析。

1.3.3 分组及给药 将42只雄性大鼠随机分组：正常组，假手术组，模型组，阳性药组，TSG低、中、高剂量组，每组6只。经造模筛选后，阳性药物组给予石杉碱甲0.15 mg/kg，配置TSG溶液浓度分别为0.033 g/kg、0.1 g/kg、0.3 g/kg后分别按照低、中、高剂量组进行给药，其余各组给予生理盐水25 mL/kg进行连续灌胃4周[10]。

1.3.4 小鼠海马、皮层病理学形态观察(HE染色) 每组随机选取3只大鼠，采用多聚甲醛心脏注射，置于冰上取出大鼠完整脑组织，参考海马分区图谱剥离大鼠两侧海马组织。采用多聚甲醛固定大鼠海马组织，设置切片厚度为4 μm，石蜡包埋后连续切片，60 ℃烘箱过夜，组织切片经脱蜡、脱水后，使用HE染液进行病理学形态染色后封片，显微镜下观察各组大鼠脑组织中海马区域病理学形态改变特点并进行分析描述。

1.3.5 TUNEL染色法 使用TUNEL染色技术对石蜡包埋的切片进行染色。将切片3次脱蜡，乙醇脱水，NaCl洗涤和PBS洗涤。复水后，将切片与蛋白酶K(20 μg/mL)在室温下温育后制备TUNEL反应混合液，进行末端标记反应，浸入停止缓冲液15 min，封闭、染色、梯度脱水、透明、封片晾干后，镜下观察海马区细胞凋亡情况。

1.3.6 免疫组化法检测大鼠海马区MKK7、JNK蛋白的表达 石蜡块切片4 μm，60 ℃烘箱过夜，石蜡切片经二甲苯脱蜡、无水乙醇梯度脱水后，用柠檬酸钠缓冲液作为修复液进行抗原预处理(100 ℃，20 min)，过氧化氢阻断剂阻断10 min，血清封闭；孵育一抗MKK7(1∶150)、JNK(1∶150)，4 ℃封闭过夜；孵育二抗；DAB试剂染色，在镜下观察见染色充分后停止反应；苏木素复染自来水控制反应时长；经梯度脱水、透明后中性树胶封片；检测大鼠海马CA1区中各蛋白的表达含量，将平均光密度值作为蛋白相对表达量的统计结果利用Image Pro plus 6.0对数据进行分析。

1.3.7 实时荧光定量聚合酶链式反应法(qRT-RCR) 实时荧光定量聚合酶链式反应法(qRT-RCR)取各组大鼠海马组织50 mg，在预冷条件下在组织中加入1 mL Trizol提取大鼠总RNA，检测所提总大鼠RNA的浓度、纯度级(OD_{260}/OD_{280})及完整性。逆转录为cDNA后，按照预混液说明书上加入引物等配置反应体系。$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目标mRNA的表达量，物序列见表1。

表1 引物序列

Tab 1 Sequences of the primers

Name	Primer sequence	Product (bp)
JNK	Forward: 5′-CCCACCACCAAAGATCCCTGAC-3′ Reverse: 5′-GAGACGGCTGCCCTCTTATGAC-3′	137
MKK7	Forward: 5′-TCAGGTGTGGAAGATGCGGTTC-3′ Reverse: 5′-GGCAGTCGTGGCTCTTGAGTAC-3′	134
GAPDH	Forward: 5′-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3′ Reverse: 5′-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3′	92

1.4 统计学处理

采用SPSS 23.0进行数据处理和Image Pro plus6.0进行图像分析。所有实验数据资料均采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　被动回避实验行为学测试

观察实验数据表明，与正常组相比，模型组的错误次数明显增加（$P<0.01$），潜伏期明显缩短（$P<0.05$）；与假手术组相比，模型组的错误次数显著增加（$P<0.01$），潜伏期显著缩短（$P<0.05$），将造模成功的大鼠进行后续的分组给药，正常组、假手术组不进行特殊操作。

表2　行为学测试结果

Tab 2　Behavioral test results

组别	错误次数	潜伏期(s)
正常组	0.50±0.58	283.70±10.13
假手术组	0.75±0.52	261.87±22.71
$A\beta_{25-35}$造模组	5.00±0.82[ab]	40.65±17.34[ab]

注：与正常组比较，[a]$P<0.01$；与假手术组比较，[b]$P<0.01$。

2.2　HE染结果

镜下观察可见，正常组和假手术组中海马CA1区，正常细胞数量较多，边缘清晰，细胞形态饱满丰富，核仁明显；与正常组和假手术组比较，模型组的大鼠海马CA1区正常神经元细胞数目明显减少、神经细胞结构排列紊乱、细胞形态皱缩；与模型组相比，阳性药物组、TSG低、中、高剂量组大鼠海马CA1区神经细胞细胞数量相对增加，结构形态均有所改善；与阳性药相比，TSG低、中、高剂量组大鼠海马CA1区神经细胞数量以及细胞形态结构明显，见图1。

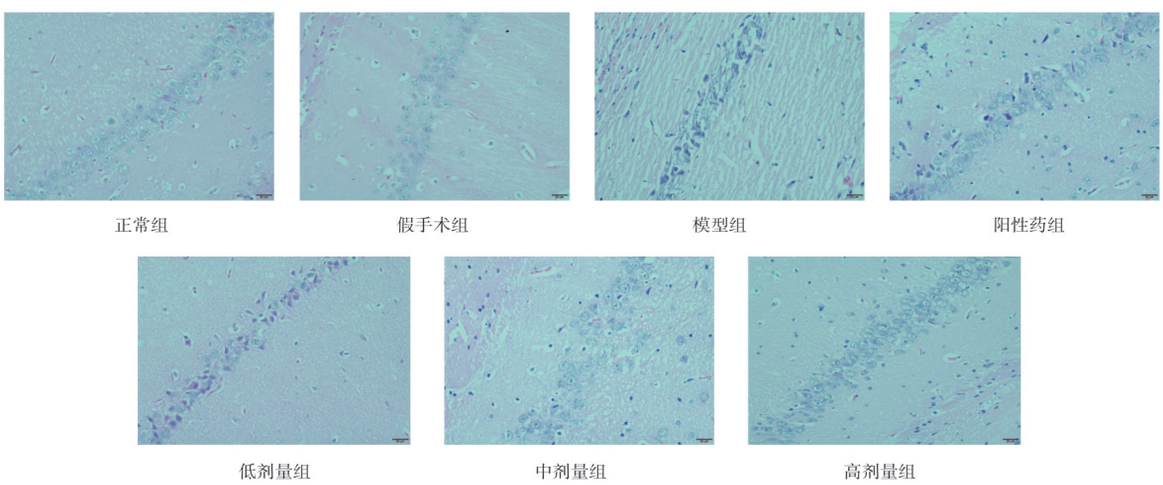


图1　各组海马CA1区病理染色结果（×400，Bar=20 μm）

Fig 1　The results of pathological staining in hippocampal CA1 region of each group（×400，Bar=20 μm）

2.3　TUNEL染色结果

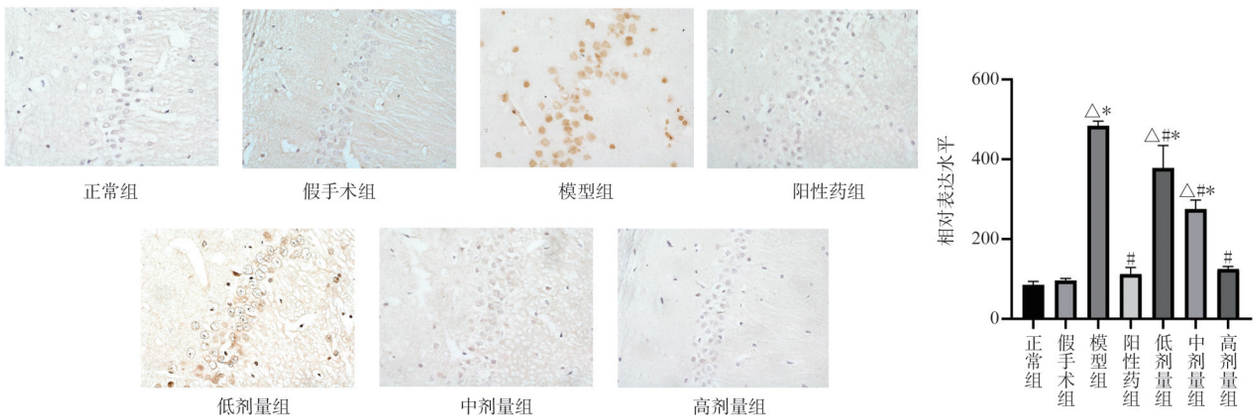
显微镜下观察可见，与正常组、假手术组比较，模型组海马CA1区TUNEL阳性染色细胞阳性细胞数量明显增加，细胞凋亡数量明显增加（$P<0.05$）；与模型组相比，阳性药物组、TSG低、中、高剂量组TUNEL染色阳性细胞数量明显减少，细胞凋亡数量显著减少（$P<0.05$）；与阳性药物组比较，TSG低、中剂量组TUNEL染色阳性细胞数相对增加（$P<0.05$），TSG高剂量组TUNEL染色阳性细胞数表达无明显变化，见图2。

2.4　免疫组化结果

显微镜下观察可见，与正常组、假手术组比较，模型组大鼠海马CA1区MKK7、JNK蛋白表达量呈现显著的高表达（$P<0.05$）；与模型组相比阳性药物组、TSG低、中、高剂量组海马区MKK7、JNK蛋白表达量均明显下调（$P<0.05$）；与阳性药物组相比MKK7蛋白的表达量TSG低剂量组有所升高（$P<0.05$）、中剂量组表达无明显变化、高剂量组表达量有所降低（$P<0.05$）；JNK蛋白的表达量，TSG低、中剂量剂量组表达量上调（$P<0.05$），高剂量与阳性药物表达量相似，见图3、4。

2.5　qRT-PCR结果

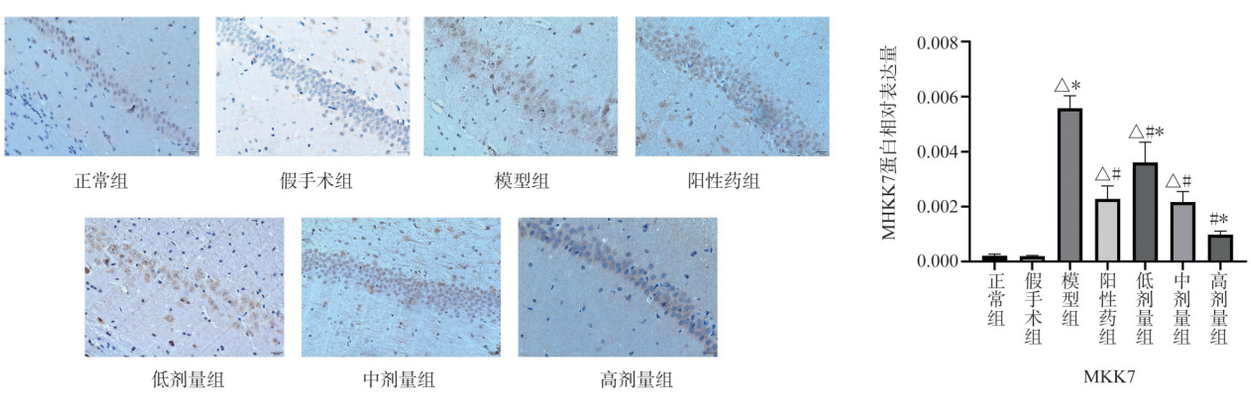
与正常组、假手术组比较，模型组MKK7、JNK-mRNA表达量显著增加（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性药物组中MKK7、JNK mRNA表达量明显降低（$P<0.05$），TSG中、高剂量组MKK7、JNK mRNA含量相对下调（$P<0.05$），TSG低剂量组中MKK7 mRNA含量相对下降（$P<0.05$）、JNK mRNA的表达量出现小幅减少但差异无统计学意义；与阳性药比较，TSG低剂量组MKK7、JNKmRNA表达量相



与正常组比较，$^{\triangle}P<0.05$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$；与阳性药比较，$^{*}P<0.05$。

图2　各组海马区神经元TUNEL染色结果（×400，Bar=20 μm）

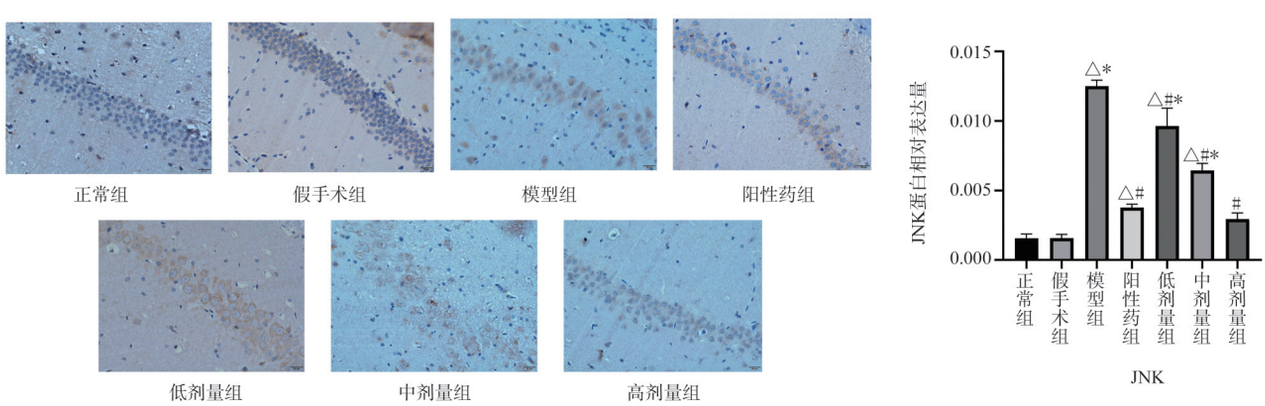
Fig 2　TUNEL staining of hippocampal neurons in each group (×400, Bar=20 μm)



与正常组比较，$^{\triangle}P<0.05$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$；与阳性药比较，$^{*}P<0.05$

图3　大鼠海马区MKK7蛋白表达的影响（×400，Bar=20 μm）

Fig 3　Expression of MKK7 protein in rat hippocampus (×400, Bar=20 μm)

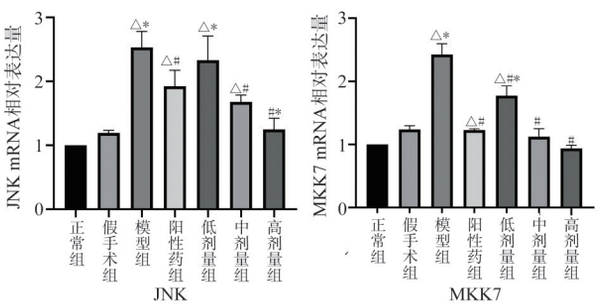


与正常组相比，$^{\triangle}P<0.05$；与模型组相比，$^{\#}P<0.05$；与阳性药比较，$^{*}P<0.05$

图4　大鼠海马区JNK蛋白表达的影响（×400，Bar=20 μm）

Fig 4　Expression of JNK protein in rat hippocampus (×400, Bar=20 μm)

对增加（$P<0.05$），TSG中、高剂量组MKK7、JNK表达量相对减少，但仅有TSG高剂量组对JNK的表达具有意义（$P<0.05$），见图5。



与正常组比较，$^{\triangle}P<0.05$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$；与阳性药比较，$^{*}P<0.05$；正常组mRNA指标均为1

图5 各组大鼠脑组织MKK7、JNK mRNA相对表达量

Fig 5 The relative expression levels of ASK1, MKK7 and JNK mRNA in the brain tissue of rats in each group

3 讨论

AD是一种基于神经系统方面的退行性改变疾病主要常发生在老年，其主要表现为记忆力减退、失语、失用、身份丧失、思维以及计算能力受损、性格和日常行为改变等[11]。其主要病理变化是Aβ斑块的积累、神经原纤维缠结、胆碱能神经元丢失、炎症和代谢功能障碍[12]。相关研究表明，Aβ积累及其相关炎症被认为是AD大脑神经变性和神经元丢失之前的早期事件[13]。

MKK7属于MAPKKs家族的一员，在神经系统氧化应激、凋亡中起到关键的作用。MKK7激活的同时受到磷酸化和泛素化的调节，活化的MKK7可以激活JNK[14]。MKK7是JNK的特异性上游激酶，仅能激活JNK，是调节JNK级联活性最重要的MAP2K[15]。许多体外和体内研究已经报道了MKK7对不同细胞内功能的重要性，如细胞生长、增殖、衰老、分化、转化，细胞周期调节和肿瘤代谢以及在神经系统中的作用[16]。凋亡刺激物如TNF-α，ROS可以作用于MKK7导致JNK激活，从而诱导细胞的凋亡。有研究已经从MKK7、JNK信号因子为切入点，研究药物对脑内疾病的作用及影响[17]

JNK信号通路属于丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路中的一个亚型在该信号通路发挥作用，在神经系统方面主要参与激活了Aβ诱导的细胞凋亡、突触可塑性功能障碍和tau过度磷酸化等，揭示了JNK可以作为治疗AD的一个靶点[18]。JNK参与多种生理过程的关键介质，JNK通路在中枢神经系统(CNS)中非常活跃，并且在细胞需要应对发育和成年期间的病理生理损伤时、损伤后的再生、修复，以及神经退行性疾病和神经细胞死亡都发挥重要作用[19]。其具有3种主要亚型JNK1/JNK2/JNK3，C-Jun N-末端激酶3(JNK3)被认为在以AD为首的神经退行性疾病中起到了至关重要的作用，并且受上游激酶和磷酸酶的复杂调节[20]。在本实验中通过对大鼠注射$A\beta_{25-35}$溶液模拟大鼠AD模型，通过免疫组化以及qRT-PCR实验显示，与正常组及假手术组比较，在模型组中JNK的表达量明显增高，提示JNK的上调可能与Aβ斑块的积累，诱导细胞凋亡导致的老年痴呆有关。通过TSG给药治疗后，随着药物剂量的提高JNK的表达了有所下降，提示TSG可能通过下调JNK的含量为作用靶点对AD的治疗。

综上所述，实验推断TSG可能通过下调MKK7、JNKmRNA的转录及蛋白的表达从而达到对海马神经元损伤的保护和修复作用，但更具体的作用机制及靶点因子尚不清楚，需进一步的研究。

作者贡献度说明：

李悦：整体实验流程的设计与操作，后期数据的整理与分析，以及论文写作及文献查阅；康碧倩、何晓璇、胡睿、肖振、罗陈亮：协助完成实验；吴桂有：文献的查阅；黄忠仕：论文思路的修正，经费支持。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Sun BL, Li WW, Zhu C, et al. Clinical research on alzheimer's disease: Progress and perspectives[J]. Neurosci Bull, 2018,34(6):1111-1118.

2 Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, et al. Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics[J]. Int J Nanomed, 2019,14(19):5541-5554.

3 Zhang XX, Tian Y, Wang ZT, et al. The epidemiology of alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention[J]. J Prev Alzheimers Dis, 2021,8(3):313-321.

4 徐东川，杨宗统，苏敏. 何首乌的现代药理作用及机制研究进展[J]. 西安文理学院学报(自然科学版)，2022，25(2):79-83.

5 王宏杨，迟继铭，姜雪，等. 何首乌提取物二苯乙烯苷药理及临床研究进展[J]. 中华中医药学刊，2019,37(10):2464-2469.

6 黄忠仕，谢海源，农嵩，等. 二苯乙烯苷对D-半乳糖致拟痴呆小鼠学习记忆和海马APP、Aβ表达的影响[J]. 右江民族医学院学报，2008(5):713-716.

7 吴晓青. 何首乌化学成分与药理活性的研究进展[J]. 时珍国医国药，2009,20(1):146-147.

8 Bloom GS. Amyloid-beta and tau: The trigger and bullet in alzheimer disease pathogenesis[J]. JAMA Neurol, 2014,71(4):505-508.

(下转第1613页)