

姜黄素对 β 淀粉样蛋白诱导的老年性痴呆大鼠小胶质细胞活化的影响

王运良 尹红蕾 姜季宇 韩冰 耿爽 刘亚君

【摘要】 目的 探讨姜黄素对 β 淀粉样蛋白(A β)诱导的老年性痴呆(AD)大鼠学习记忆障碍及小胶质细胞活化的影响。方法 将 A β_{1-40} 微量注射至大鼠右侧海马,制作 AD 大鼠模型,干预组给予腹腔注射姜黄素连续 7 d,造模 1 个月后进行 Morris 水迷宫试验测定大鼠学习记忆能力,分为空白对照组、对照组和姜黄素给药组。免疫组织化学方法检测小胶质细胞。结果 AD 对照组大鼠较空白对照组逃避潜伏期延长,而跨越原平台位置次数明显减少;姜黄素给药组大鼠较 AD 对照组第 2~5 天平均逃避潜伏期明显缩短,与空白对照组比较无明显差异($P > 0.05$),跨越原平台位置次数明显增多,与空白对照组无明显差异($P > 0.05$),表明姜黄素干预后 AD 大鼠空间学习、记忆能力明显改善。与空白对照组相比,AD 对照组大鼠脑组织海马区可见小胶质细胞表达明显增多($P < 0.05$);姜黄素组大鼠脑组织海马区小胶质细胞较 AD 对照组明显减少($P < 0.05$)。结论 姜黄素能够改善 A β_{1-40} 诱导的 AD 模型大鼠空间学习记忆障碍,其机制可能与抑制 A β 所致小胶质细胞活化有关。

【关键词】 姜黄素; 阿尔茨海默病; 淀粉样 β 蛋白; 小神经胶质细胞; 大鼠

Effects of curcumin on microglia activation in Alzheimer disease rat by injecting A β_{1-40} WANG Yun-liang, YIN Hong-lei, LOU Ji-yu, HAN Bing, GENG Shuang, LIU Ya-jun. Department of Neurology, The 148 Hospital of PLA, Zibo 255300, China

Corresponding author: WANG Yun-liang, Email: wangyunliang81@163.com

【Abstract】 Objective To explore effects of curcumin on learning and memory impairment and microglia activation in Alzheimer disease rat. **Methods** Twenty-four rats were randomly divided into sham-operation group (SC), AD model group (AD) and curcumin treatment group (C). A β_{1-40} was microinjected into the right hippocampus of rats. The treatment group received curcumin intraperitoneal injection lasted for 30 days. Morris water maze was used to study the learning and memory ability of action, and immunohistochemistry was adopted to assess microglia in the hippocampus. **Results** The mean escape latency in AD group was obviously increased and the frequency of passing through the platform was visibly decreased compared with the sham operated group; the mean escape latency of curcumin group was obviously decreased on day 2-5 of place navigation test and the frequency of passing through the platform was visibly increased compared with the AD group. The number of microglia was increased significantly in the hippocampus of the AD group compared with the sham operated group; the number of microglia was decreased significantly in the hippocampus of the curcumin group compared with that in the AD group. **Conclusions** Curcumin could inhibit microglia activation induced by A β_{1-40} and improve learning and memory ability in AD rat.

【Key words】 Curcumin; Alzheimer disease; Amyloid beta-protein; Microglia; Rats

阿尔茨海默病(AD)的病因多样、复杂,其组织病理学特点主要包括:形成以 β 淀粉样蛋白(A β)沉淀为特征的老年斑;形成神经原纤维缠结(neurofibrillary tangle, NT);神经细胞及轴突数量减少。最近诸多研究

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2011.19.009

作者单位:255300 山东淄博,解放军第148医院神经内科(王运良、尹红蕾、韩冰、耿爽、刘亚君);郑州大学第二附属医院神经内科(姜季宇)

通讯作者:王运良,Email:wangyunliang81@163.com

提示,炎症反应在AD的病因和病理过程中也具有重要作用,并在 β 淀粉样沉淀中发现了被激活的小胶质细胞和炎症分子^[1],同时抗炎药物能够减缓AD发病的过程。因此,目前认为激活的小胶质细胞及炎症反应与老年性痴呆症的发病密切相关。姜黄素(curcumin)^[2-3]是从姜科植物姜黄中提取的一种重要活性成分,属小分子,分子式 $C_{21}H_{20}O_6$,安全低毒,具有抗炎、抗氧化、抗损伤、抑制血管生成、抗辐射、抗肿瘤的作用。临床研究表明,姜黄素有助于改善老年性痴呆患者的认知功能,另外,姜黄素具有亲脂特性,能通过细胞膜发挥它的细胞内作用,极小剂量的姜黄素即能影响神经胶质的增生和分化^[4]。目前,针对姜黄素在痴呆模型中在研究刚刚起步,其具体机制有待于我们进一步探讨。那么,姜黄素对小胶质细胞的激活会产生何种影响呢?体内体外实验表明, $A\beta$ 在脑内的异常沉积可能是炎症反应的激发因子,是AD发病的中心环节和病理特征,而AD动物模型的建立是研究AD的基础。既有的资料表明, $A\beta$ 纤维状聚合是其发挥毒性作用的重要条件,并受其本身的分子构型、浓度、溶剂、温度、pH值等影响^[5],本实验采用大鼠海马区注射聚集态 $A\beta_{1-40}$,全面模拟了AD病理、行为学和生化改变,进一步探讨了姜黄素对 $A\beta_{1-40}$ 诱导AD大鼠空间学习记忆能力及小胶质细胞活化的影响。

材料与方法

1. 动物及分组:健康雄性SD大鼠24只,体重230~250g,由重庆医科大学实验动物中心提供。大鼠适应性喂养1周后,先经Morris水迷宫测试,4个象限测试中有2个象限超过2min未找到安全平台者视为记忆障碍。淘汰后剩余大鼠被随机分为3组:空白对照组;海马注射等容量的生理盐水,腹腔注射与姜黄素等量的二甲亚砜(DMSO)($n=8$);AD对照组:腹腔注射与姜黄素等量的DMSO($n=8$);姜黄素给药组:腹腔注射溶解在DMSO的姜黄素($n=8$),每天1次,剂量为300mg/kg,连续注射7d^[6]。

2. 试剂及仪器: $A\beta_{1-40}$ (美国Sigma公司),姜黄素(美国Sigma公司),生物素标记的凝集素B4(isolectinB4,GSIB4)购于Sigma公司。Morris水迷宫,脑立体定位仪(日本成茂公司),BS-50型光学显微镜(Olympus, German),图像分析系统(北航CM-2000B型)。

3. $A\beta_{1-40}$ 诱导大鼠认知障碍模型的制备:用无菌生理盐水将 $A\beta_{1-40}$ 稀释成 $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育1周,使其变为聚集态 $A\beta$ 。大鼠经3.5%水合氯醛腹腔麻醉,固定于立体定位仪上,颅顶部正中切开皮肤,按Paxinos^[7]1998年版《大鼠脑立体定位图谱》,选择右侧海马CA1区为注射靶区,于前囟向后3.0mm,中线旁开2.2mm处,钻开颅骨,微量进样器自脑表面垂直进针2.8mm,将 $A\beta_{1-40}$ 缓慢注入($10\mu\text{l}$),留针10min以保证溶液充分弥散,然后缓慢撤针。空白对照组注入等体积生理盐水。各组术后均单笼饲养至大鼠完全清醒。

4. Morris水迷宫行为学测试:动物模型制备1个月后,用Morris水迷宫法测定大鼠的学习记忆能力^[8]。

(1)定位航行试验(place navigation):通过对训练大鼠游泳寻找平台,观测其逃避潜伏期长短可检测动物的学习能力。历时5d,每天各2次,将大鼠面向池壁分别从2个入水点放入水中,记录其在2min内寻找到平台的时间(逃避潜伏期,escape latency)和游泳路径。如果大鼠在2min未找到平台,潜伏期记为120s,并由实验者用木棒牵引其至平台上,让大鼠停留10s,再放回笼中。(2)空间探索试验(spatial probe):第6天撤除平台,任选一个入水点放入水中,记录2min内大鼠在池中的游泳轨迹和时间,分别计算在各象限所停留时间的百分比。

5. 标本取材:实验动物经行为学测试后,经腹腔注射3.5%的水合氯醛腹腔注射麻醉后(每组各8只动物),4%多聚甲醛缓冲固定液心内灌注、固定,开颅取脑,取大脑冠状面约2mm厚组织块(视交叉后0~2mm),石蜡包埋,作石蜡切片(片厚 $4\mu\text{m}$)。

6. GSIB4组织化学显色:切片常规脱蜡至水,微波修复抗原,滴加生物素标记的GSIB4($10\mu\text{g}/\text{ml}$), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;加二抗后,DAB显色,然后脱水、透明、封片;PBS代替一抗作阴性对照;光学显微镜下观察,以细胞膜棕褐色为阳性细胞。

7. 统计学分析:数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用SPSS 11.0统计软件行 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 即认为差异有统计学意义。

结 果

1. 大鼠行为学检测:大鼠在 Morris 水迷宫中定向航行试验,各组平均逃避潜伏期日渐缩短。表明各组大鼠学习寻找平台的能力在历次的学习训练中均得到提高,从第2天开始,AD 对照组与空白对照组分别比较,平均逃避潜伏期明显延长($P < 0.05$) (表1),大鼠轨迹图多以边缘式和随机式为主,表明造模成功;姜黄素给药组大鼠较 AD 对照组第2~5天平均逃避潜伏期明显缩短,与空白对照组比较无明显差异($P > 0.05$)。撤去平台后,以在原平台象限(第2象限)的活动时间为指标,AD 对照组与空白对照组和给药组分别比较,原平台象限活动时间明显缩短($P < 0.05$) (表2),显现出学习记忆力明显减退。而给药组与空白对照组间比较,大鼠学习、记忆能力无显著差异性($P > 0.05$)。表明姜黄素对改善认知功能障碍大鼠的学习及记忆能力有明显作用。

表1 各组大鼠逃避潜伏期变化($s, \bar{x} \pm s$)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
空白对照组	63.5 ± 13.4	38.9 ± 12.2	22.1 ± 7.37	14.3 ± 6.51	11.2 ± 5.07
AD 对照组	93.4 ± 12.9 ^a	84.7 ± 14.1 ^a	54.3 ± 11.3 ^a	45.6 ± 11.7 ^a	31.7 ± 10.2 ^a
姜黄素给药组	66.1 ± 12.9 ^b	41.5 ± 11.5 ^b	23.6 ± 5.79 ^b	16.9 ± 5.57 ^b	14.5 ± 5.36 ^b

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P > 0.05$

表2 大鼠在各象限所停留时间的百分比($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	I	II	III	IV
空白对照组	21.78 ± 6.35	43.32 ± 7.18	18.07 ± 3.54	16.75 ± 7.86
AD 对照组	26.25 ± 9.34	27.65 ± 5.68 ^a	22.67 ± 4.59	24.31 ± 5.19
姜黄素给药组	22.25 ± 4.72	40.61 ± 9.42 ^b	18.45 ± 5.91	18.73 ± 10.32

注:与 AD 对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P > 0.05$

2. 姜黄素对 AD 大鼠海马区 GSIB4 免疫阳性细胞数量及表达灰度的影响:空白对照组大鼠海马见少量稀疏分布 GSIB4 阳性细胞,体积较小,细胞轮廓清晰,有树枝状分枝(图1A)。而 AD 对照组大鼠海马神经元大量缺失,GSIB4 阳性细胞数目明显增多,细胞体积增大,大小不一,细胞突起及分叉减少,呈圆形或类圆形(图1B)。姜黄素给药组大鼠海马 GSIB4 阳性细胞呈圆形或类圆形,染色淡(图1C),数目(6.47 ± 8.69)较 AD 对照组(11.27 ± 10.73)明显减少($P < 0.05$),但较空白对照组(4.78 ± 1.49)仍增多($P < 0.05$)。

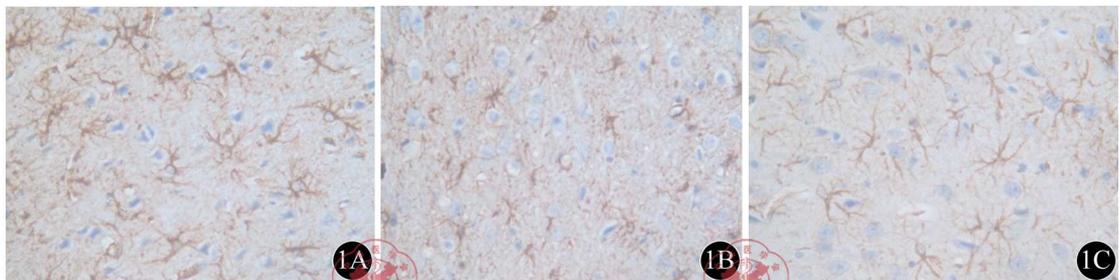


图1 大鼠海马GSIB4免疫阳性细胞表达(DAB × 400)。1A: 空白对照组; 1B: AD对照组; 1C: 姜黄素给药组

讨 论

AD 是一种进行性神经变性疾病,AD 的病理生理机制至今尚未完全阐明,但越来越多的证据说明, A β 沉积激活小胶质细胞引起的慢性炎症反应是 AD 的核心病理机制。有学者认为, A β 是小胶质细胞激活的始动因素,可诱导小胶质细胞的激活,然后释放炎症细胞因子,引起脑内炎症反应^[1]而炎症反应又能促进 A β 的沉积加重神经炎性斑的形成,导致恶性循环^[9]。

据报道,AD实验模型中活化的小胶质细胞数量明显增多,以海马部位最明显。小胶质细胞作为脑内主要的炎症反应细胞,在淀粉样斑块周围大量分布,AB β 激活小胶质细胞后能引起许多细胞毒性的炎症递质产生^[10]。离体实验证明,活化的小胶质细胞可有效地吞噬并降解源自AD脑的AB β 及老年斑。对AD动物模型的研究发现,清道夫受体A(SR-A)能介导小胶质细胞与AB β 纤维的黏着和小胶质细胞对AB β 纤维的胞饮作用。活化的小胶质细胞表达Fc受体,与AB β 抗体结合,产生吞噬反应,吞噬AB β ^[11]。但是在人的病理组织和AD动物模型中没有发现小胶质细胞吞噬AB β 的证据。这提示小胶质细胞在AD后期不能有效地通过受体系统发挥吞噬功能,逐渐增多的老年斑导致小胶质细胞持续激活,并分泌多种炎症分子,作用于邻近的星形细胞和神经元,导致爆发性的激活星形细胞,而大量的反应性星形胶质细胞增生又会影响神经纤维的传导和突触构建,最终对神经元产生毒性作用。我们之前关于姜黄素对AB β 诱导的老年性痴呆大鼠海马胶质纤维酸蛋白表达的影响研究结果与此相符。

那么,如果我们能有效地抑制AD脑内小胶质细胞活化及其介导的炎症反应就有可能减少活化小胶质细胞所致的神经损害,从而抑制或延缓AD病程的发展。流行病学调查研究显示,长期使用非甾体类抗炎药物(NSAIDs)可以减少发展为AD的风险^[12-13]。国内外学者曾选用布洛芬、米诺环素和大麻素等药物,能够有效阻断小胶质细胞激活,改善AD大鼠或小鼠的学习记忆能力^[14-16]。

姜黄素是从姜黄的根茎中提取的一种黄色略带酸性的酚类物质,据报道,姜黄素具有的抗氧化、抗炎和亲脂活性,能改善AD患者的认知功能,如缩小 β 淀粉样蛋白斑块、减缓神经元分解、螯和金属、抗炎、抗氧化、减少小胶质细胞形成、改善AD患者整体记忆等^[17-20]。在局灶性脑缺血/再灌注大鼠模型中的研究提示姜黄素对神经元能够产生一定的保护作用,能够有效地抑制急性损伤后氧化应激反应,明显减小梗死体积,减少病死率和降低脑组织的含水量,但具体机制有待进一步研究^[21]。姜黄素能够透过动物血脑屏障,在脑内与AB β 结合,抑制其聚集及纤维的形成^[22]。另外,姜黄素可以与铜、铁等金属离子结合,可以抑制由其介导的NF- κ B途径,从而对抗AB β 引起的细胞毒性作用^[23-25]。姜黄素对急性、亚急性及慢性炎症均有较强的抑制作用。其机制为下调炎性介质(前列腺素、白三烯)及炎症性细胞因子(IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、TNF)的表达。抗炎效果同非甾体类抗炎药及糖皮质激素相近,且安全性高,不良反应少^[26-28]。目前也有文献指出^[29],与非甾体抗炎药和其他抗氧化药物相比,应用姜黄素治疗AD更加安全、有效。

本研究Morris水迷宫显示,将聚集态AB β_{1-40} 注射入大鼠右侧海马后,大鼠定位航行实验中逃避潜伏期明显延长,空间探索实验中跨越原平台位置的次数明显减少,学习记忆能力明显障碍,成功模拟了AD的行为学改变。而AD对照组大鼠海马内GSIB4阳性的小胶质细胞数目明显增多,细胞体积增大,树枝状分支消失,支持AD的小胶质细胞活化神经炎症学说。而姜黄素给药组大鼠术后平均逃避潜伏期从第2天开始即较未接受治疗的AD大鼠明显缩短,跨越原平台位置次数明显增多,说明姜黄素对AB β 所致大鼠学习记忆障碍有改善作用。同时,姜黄素组大鼠海马活化的小胶质细胞明显减少,说明姜黄素可以抑制AD大鼠脑内小胶质细胞的激活及其相关炎症反应。因此,姜黄素可以通过抑制AB β 所介导的小胶质细胞活化及相关神经炎症,改善AD大鼠的学习记忆能力。

由此,作用于激活后小胶质细胞及其所介导的神经炎症性损伤治疗途径可能是一个新的老年性痴呆治疗靶点。本研究提示姜黄素可部分改善AB β_{1-40} 诱导的AD模型大鼠空间学习记忆障碍,其机制可能与通过抑制AB β 所介导的小胶质细胞活化及相关神经炎症有关。根据以上研究发现,姜黄素的化学特点和对AD多种作用的临床研究显示姜黄素能够治疗AD,是未来具有广阔前景的治疗AD的较好药物。

参 考 文 献

- [1] Matsuoka Y, Picciano M, Malester B, et al. Inflammatory response to amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 2001, 158: 1345-1354.
- [2] Gomez G, Mansouraty G, Gardea J, et al. Acceleration of oxidative protein folding by curcumin through novel non-redox chemistry. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 364: 561-566.
- [3] Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR. Biological properties of curcumin cellular and molecular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2004, 44: 97-111.
- [4] Ambegaokar SS, Wu L, Alamshahi K, et al. Curcumin inhibits dose-dependently and time-dependently neuroglial cell proliferation and growth. *Neuro Endocrinol Lett*, 2003, 24: 469-473.

- [5] Burdick D, Soreghan B, Kwon M, et al. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem*, 1992, 267:546-554.
- [6] Thiagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci*, 2004, 74:969-985.
- [7] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinate fourth edition. Academic Press, 1998:80-89.
- [8] Nakamura S, Murayama N, Noshita T, et al. Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide. *Brain Res*, 2001, 912:128-136.
- [9] Hsuw YD, Chang CK, Chan WH, et al. Curcumin prevents methylglyoxal-induced oxidative stress and apoptosis in mouse embryonic stem cells and blastocysts. *J Cell Physiol*, 2005, 205:379-386.
- [10] Cagnin A, Brooks DJ, Kermody AM, et al. In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet*, 2001, 358:461-467.
- [11] Bard F, Cannon C, Barbour R, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med*, 2000, 6:916-919.
- [12] Powitzky ES, Hayman LA, Chau J, et al. High-resolution computed tomography of temporal bone: Part IV: Coronal postoperative anatomy. *J Comput Assist Tomogr*, 2006, 30:548-554.
- [13] Powitzky ES, Hayman LA, Bartling SH, et al. High-resolution computed tomography of temporal bone: Part III: Axial postoperative anatomy. *J Comput Assist Tomogr*, 2006, 30:337-343.
- [14] Mazziotti S, Arceri F, Vinci S, et al. Role of coronal oblique reconstruction as a complement to CT study of the temporal bone: normal anatomy. *Radiol Med(Torino)*, 2006, 111:607-617.
- [15] Boemo RL, Navarrete ML, Pumarola F, et al. Morphometric study of the mastoid segment of the facial nerve. *Acta Otorrinolaringol Esp*, 2007, 58:178-181.
- [16] Paleri V, Watson C. Objective assessment of the perineural vascular plexus as a landmark for the horizontal part of the facial nerve in middle ear and mastoid surgery. *Otol Neurotol*, 2005, 26:280-283.
- [17] Ng TP, Chiam PC, Lee T, et al. Curry consumption and cognitive function in the elderly. *Am J Epidemiol*, 2006, 164:898-906.
- [18] Mukhopadhyay A, Banerjee S, Stafford LJ, et al. Curcumin induced suppression of cell proliferation correlates with downregulation of cyclinD1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene*, 2002, 21:8852-8861.
- [19] Takeuchi H, Kanzawa T, Kondo Y, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor signaling induces autophagy in malignant glioma cells. *Br J Cancer*, 2004, 90:1069-1075.
- [20] Aoki H, Takada Y, Kondo S, et al. Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol*, 2007, 72:29-39.
- [21] Rathore P, Dohare P, Varma S, et al. Curcuma oil: reduces early accumulation of oxidative product and is anti-apoptogenic in transient focal ischemia in rat brain. *Neurochem Res*, 2008, 33:1672-1682.
- [22] Yang F, Lim GP, Begum AN, et al. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem*, 2005, 280:5892-5901.
- [23] Kuner P, Schubnel R, Hertel C. Beta-amyloid binds to p57NTR and activates NF-kappaB in human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res*, 1998, 54:798-804.
- [24] Singh S, Ggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kB is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *J Biol Chem*, 1995, 270:24995-25000.
- [25] Wyss-Coray T, Lin C, Yan F, et al. TGF-beta 1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat Med*, 2001, 7:612-618.
- [26] Literat A, Su F, Norwicki M, et al. Regulation of pro-inflammatory cytokine expression by curcumin in hyaline membrane disease (HMD). *Life Sci*, 2001, 70:253-267.
- [27] Joe B, Lokesh BR. Effect of curcumin and capsaicin on arachidonic acid metabolism and lysosomal enzyme secretion by rat peritoneal macrophages. *Lipids*, 1997, 32:1173-1180.
- [28] Banerjee M, Tripathi LM, Srivastava VM, et al. Modulation of inflammatory mediators by ibuprofen and curcumin treatment during chronic inflammation in rat. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2003, 25:213-224.
- [29] Cole GM, Morigara T, Lim GP, et al. NSAID and antioxidant prevention of Alzheimer's disease: lessons from in vitro and animal models. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1035:68-84.

(收稿日期:2011-01-14)

(本文编辑:戚红丹)