



# 姜黄素对 APP/PS1 双转基因小鼠突触 相关蛋白表达的影响

魏鹏<sup>1,2</sup>, 李瑞晟<sup>3</sup>, 王虹<sup>4</sup>, 任映<sup>1,2</sup>, 孙海芸<sup>1,2</sup>, 杨金铨<sup>1,2</sup>, 王蓬文<sup>1,2\*</sup>

(1. 国家中医药管理局三级实验室 北京中医药大学东直门医院 中药药理学实验室, 北京 100700;  
2. 北京中医药大学教育部重点实验室, 北京 100700; 3. 新疆医科大学第二附属医院,  
新疆 乌鲁木齐 830028; 4. 北京美中宜和妇儿医院, 北京 100016)

**[摘要]** 目的:观察姜黄素对 AD 模型 APP/PS1 双转基因小鼠突触相关蛋白突触后致密蛋白-95 (postsynaptic density protein-95, PSD-95) 和骨架蛋白 Shank1 表达的影响。方法:将 3 月龄的 APP/PS1 双转基因小鼠随机分为模型组、罗格列酮阳性对照组 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )、姜黄素高、中、低剂量组 ( $400, 200, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 正常对照组为相同背景非转基因小鼠。灌胃 3 个月后,应用免疫组织化学和 Western blot 方法进行检测。结果:行为学检测,治疗组与模型组相比定位航行实验和空间探索实验存在不同程度的差异 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ )。PSD-95 和 Shank1 免疫组化,模型组小鼠大脑海马 CA1 区较对照组阳性细胞明显减少 ( $P < 0.01$ ),姜黄素干预组有所恢复。Western blot 检测海马 PSD-95 的蛋白结果显示,模型组小鼠海马 PSD-95 的蛋白表达条带均比对照组小鼠明显变细、颜色变浅 ( $P < 0.01$ );姜黄素干预组小鼠海马 PSD-95 的蛋白表达条带均明显增粗、颜色加深 ( $P < 0.05$ )。结论:姜黄素增加 APP/PS1 双转基因小鼠突触相关蛋白 shank1 和 PSD-95 表达,改善 APP/PS1 双转基因小鼠突触的结构和可塑性,提高空间学习记忆能力。

**[关键词]** 姜黄素;APP/PS1 双转基因小鼠;突触后致密蛋白-95;骨架蛋白 Shank1

近年来的研究发现,突触丢失是与 AD 认知功能下降关系最密切的神经生物学因素<sup>[1]</sup>, $A\beta$  沉积前早已出现行为学的异常,AD 患者的记忆障碍为患病早期的突出表现,其程度与突触数目的丢失及突触功能的丧失密切相关。在对单个神经元进行的组织病理学研究中,发现有 2 个条件对神经元的存活是关键性的,一是完整的细胞核,二是有完整的信使核糖核酸 (mRNA)。AD 脑组织中的神经元虽然满足以上 2 个条件并得以存活相当长的时间,但存在很多异常变化:在结构上,神经元细胞骨架被破坏、突起消失;在分子水平上,与突触功能有关的很多蛋白表达降低<sup>[2]</sup>。脑内  $A\beta$  蛋白的聚集可破坏突触的完整性和可塑性,使突触功能丧失<sup>[3]</sup>。突触的结构和功能复杂,涉及的蛋白和信号转导途径众多,突触后致密区是接受和整合突触信号并将其传导给突触

后细胞的分子装置,在突触可塑性中起重要作用。

本课题拟采用的实验动物为 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> 双转基因小鼠,该小鼠表达突变人  $\beta$ -淀粉样前体蛋白基因 swe ( $\beta$ -amyloid precursor protein, APP<sup>swe</sup>) 和突变早老蛋白 1-A246 基因 (presenilin 1-246E, PS1-246E) 的双转基因 (APP/PS1 double transgenic, APP/PS1 dtg),可在短期内大量产生  $A\beta_{42}$  及  $A\beta$  寡聚体 ( $A\beta$  oligomer) 或称 ADDLs ( $A\beta$ -derived diffusible ligands),出现拟 AD 的病理改变,随年龄的增加这些病理改变会逐渐加重<sup>[4,5]</sup>,是公认的研究  $A\beta$  级联反应和 AD 的防治策略转基因动物模型。研究发现胰岛素受体对 ADDLs 的损伤作用极其敏感,ADDLs 又可以影响胰岛素信号转导通路下游 Akt serine473 磷酸化,而应用胰岛素和胰岛素增敏剂罗格列酮可以使病理性 ADDLs 结合显著减少<sup>[6]</sup>,因此,阳性对照药物选用罗格列酮。本实验选用对突触信号传导有重要作用的突触后致密区的 PSD-95 和 Shank1 蛋白作为观察突触结构和功能变化的指标,研究姜黄素对 APP/PS1 双转基因小鼠神经元以及突触相关蛋白表达的影响。

## 1 材料

**1.1 试剂与仪器** 姜黄素为美国 Sigma-adrich 公

**[稿件编号]** 20110722004

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目 (81073076);北京市自然科学基金面上项目 (7092057);高等学校学科创新引智基地 (111 计划)教育部和国家外国专家局 [B08006]项目

**[通信作者]** \* 王蓬文,博士,教授,博士生导师, Tel: (010) 84013195

**[作者简介]** 魏鹏,硕士研究生, E-mail:472792896@qq.com



司产品(批号 c1386);马来酸罗格列酮片[葛兰素史克(天津)有限公司产品,批号 09060108];一抗兔抗小鼠 Shank1 购自 Lifespan 公司;兔抗小鼠 PSD95 抗体购自 Abcam 公司;SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。Mini-PROTEAN 3 电泳仪(BIO-RAD)。

**1.2 动物** 3 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠 45 只,同背景 C57/BL6J 小鼠 9 只,购自中国医学科学院动物研究所,许可证号 SCXK(京)2009-0004,饲养于北京中医药大学东直门医院中药药理学实验室屏障环境动物室[SYXK(京)2004-2009]。实验过程中动物自由摄食和饮水。

## 2 方法

**2.1 分组和给药** 随机将 AD 模型动物 APP/PS1 双转基因小鼠分为 5 组,模型组、罗格列酮组(10 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>)、姜黄素高、中、低剂量(400, 200, 100 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>)组,每组 9 只,于 3 月龄对小鼠分别实施灌胃治疗,每日 1 次,连续灌胃 3 个月。正常对照组为同月龄同背景非转基因小鼠,模型组和对对照组给予等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)灌胃。

**2.2 新鲜组织标本** 小鼠快速断头处死,剥离海马,分别置于 EP 管中,于 -70 °C 液氮罐中储存备用,每组各 3 只,左右海马,每组各 6 只。

**2.3 石蜡切片** 小鼠于末次行为学测试后灌杀,石蜡包埋、切片。每只小鼠脑于海马 CA1 区出现后连续冠状切片,片厚 4 μm。每组各 6 只。

**2.4 免疫组织化学检测及分析** 将固定好的小鼠脑脱水、石蜡包埋,露出海马区行冠状切面连续切片,取相邻部位的脑片按说明书进行免疫组化染色。每组选取 5 张脑片,在 20 倍物镜下,记数海马 CA1 区内染色阳性神经元数目;并以 Image-pro Plus 图象分析系统采集图像和分析,记录每组图像阳性细胞数和阳性细胞平均灰度值。

**2.5 Western blot 检测** 蛋白质电泳、转膜、封闭、抗原抗体反应。

**2.6 统计学分析** 所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用统计软件 SPSS 15.0 进行统计分析,组间数据比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 3 结果

**3.1 姜黄素对 APP/PS1 双转基因小鼠海马 CA1 区 Shank1 表达的影响** 免疫组化法检测小鼠海马

CA1 区神经元 Shank1 的表达,阳性反应细胞可见胞浆内充满棕黄色的阳性反应颗粒,部分临近胞膜处染色较深,海马 CA1 区阳性细胞体积大,呈圆形或椭圆形,齿状回阳性细胞体积较小,胞浆和突起均着色(因切片为 4 μm 突起着色不连续)。Motic 图像分析系统显示,与正常小鼠相比,模型组小鼠海马 CA1 区免疫组织化学染色 Shank1 和 PSD-95 阳性细胞数量明显减少( $P < 0.01$ )、平均灰度值明显增加( $P < 0.05$ );与模型组相比,姜黄素中剂量组和罗格列酮小鼠阳性细胞数量增加( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且二者之间没有差异;与罗格列酮组相比姜黄素高剂量和低剂量组仍有差异( $P < 0.05, P < 0.01$ )(表 1)。

表 1 各组间海马 CA1 区 Shank1 阳性神经细胞数目和阳性细胞平均灰度值的比较( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Number and average gray value of Shank1 positive cells in hippocampal CA1 area in each group( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

分组	剂量 /mg · kg <sup>-1</sup> · d <sup>-1</sup>	阳性 细胞数	平均 灰度值
对照	-	99.33 ± 2.52	54.53 ± 5.45
模型	-	42.00 ± 2.00 <sup>1)</sup>	81.95 ± 4.81 <sup>2)</sup>
罗格列酮	10	83.67 ± 4.51 <sup>3)</sup>	61.11 ± 2.21 <sup>4)</sup>
姜黄素	400	57.33 ± 5.77 <sup>6)</sup>	72.49 ± 0.41 <sup>6)</sup>
	200	68.00 ± 12.12 <sup>4)</sup>	68.29 ± 0.69 <sup>4)</sup>
	100	47.67 ± 2.31 <sup>5)</sup>	74.41 ± 1.91 <sup>6)</sup>

注:与对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组相比<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.05$ ;与罗格列酮组相比<sup>5)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>6)</sup>  $P < 0.05$ (表 2,3 同)。

**3.2 免疫组化法检测 APP/PS1 双转基因小鼠海马 CA1 区神经元 PSD-95 的表达** 阳性反应细胞可见胞浆内有棕黄色的阳性反应颗粒,部分临近胞膜处染色较深,海马 CA1 区阳性细胞体积大,呈圆形或椭圆形,齿状回阳性细胞体积较小,胞浆和突起均着色。Motic 图像分析系统显示,免疫组织化学染色的 PSD-95 阳性细胞,与对照组相比,模型组小鼠海马神经元 PSD-95 阳性细胞表达数量减少、染色变浅( $P < 0.01$ )、细胞吸光值减少( $P < 0.05$ );与模型组相比,姜黄素中剂量组和罗格列酮组小鼠阳性细胞数量显著增加,小鼠 PSD-95 阳性细胞的细胞吸光度值明显增加( $P < 0.01$ ),且二者之间没有差异;姜黄素高剂量组小鼠阳性细胞数量也明显增加( $P < 0.05$ );与罗格列酮组相比姜黄素高剂量和低剂量组仍有差异( $P < 0.05, P < 0.01$ )(表 2)。



表 2 各组间海马 CA1 区 PSD-95 阳性神经细胞数目和阳性细胞平均灰度值的比较( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Number and average gray value of PSD-95 positive cells in hippocampal CA1 area in each group( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

分组	剂量 /mg · kg <sup>-1</sup> · d <sup>-1</sup>	阳性 细胞数	平均 灰度值
对照	-	84.66 ± 1.08	35.51 ± 2.56
模型	-	36.57 ± 3.43 <sup>1)</sup>	86.32 ± 3.19 <sup>2)</sup>
罗格列酮	10	69.33 ± 1.74 <sup>3)</sup>	47.86 ± 1.85 <sup>3)</sup>
姜黄素	400	57.63 ± 2.07 <sup>4,6)</sup>	71.16 ± 2.21 <sup>6)</sup>
	200	60.33 ± 1.83 <sup>3)</sup>	58.36 ± 1.41 <sup>3)</sup>
	100	46.34 ± 1.35 <sup>5)</sup>	78.24 ± 2.64 <sup>6)</sup>

**3.3 Western blot 检测 APP/PS1 双转基因小鼠海马 PSD-95 的表达** 模型组小鼠海马 PSD-95 的蛋白表达条带均比对照组小鼠明显变细、颜色变浅,表明其 PSD-95 蛋白表达减少( $P < 0.01$ );与模型组小鼠相比,各干预组小鼠海马 PSD-95 的蛋白表达条带均明显增粗、颜色加深( $P < 0.05$ ),表明蛋白表达增多;与罗格列酮组相比姜黄素低剂量组仍有差异( $P < 0.05$ )(表 3,图 1)。

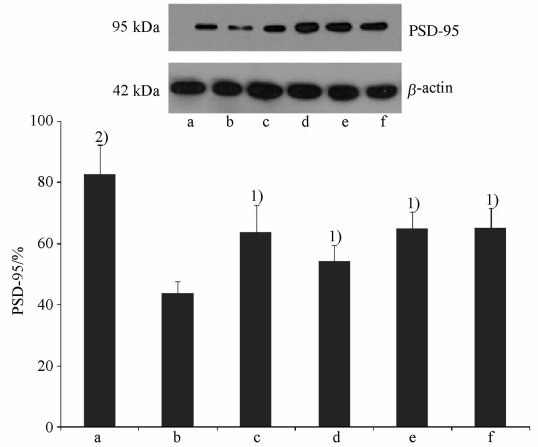
表 3 姜黄素对 APP/PS1 双转基因小鼠海马 PSD-95 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 The effect of curcumin on the expression of PSD95 of the hippocampus of APP/PS1( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ mg · kg <sup>-1</sup> · d <sup>-1</sup>	相对灰度/%
内参		100.00 ± 0.00
对照	-	82.83 ± 9.59
模型	-	43.81 ± 3.89 <sup>1)</sup>
罗格列酮	10	63.78 ± 9.11 <sup>4)</sup>
姜黄素	400	54.49 ± 5.11 <sup>4)</sup>
	200	65.22 ± 5.31 <sup>4)</sup>
	100	65.41 ± 6.32 <sup>4,6)</sup>

#### 4 讨论

在 AD 中,  $A\beta$  的直接毒性作用是造成突触破坏的重要原因。由细胞代谢产生的  $A\beta$  小的寡聚体较为稳定,  $A\beta$  也可形成寡聚体-ADDLs 可与树突支(dendritic arbors)上的敏感位点(hotspots)结合。超过 90% 的 hotspot 与 PSD-95 共定位,表明 ADDLs 是特异的靶突触的配体。 $A\beta$  级联反应是由于神经元胞内  $A\beta$  聚集成可溶性 ADDLs,并可释放和结合到特殊位点,影响突触的结构和功能蛋白的改变,影响信号转导,而使突触丧失可塑性,造成记忆丢失。对



a. 对照组; b. 模型组; c. 罗格列酮组; d. 姜黄素高剂量组; e. 姜黄素中剂量组; f. 姜黄素低剂量组;与模型组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

图 1 姜黄素对 APP/PS1 双转基因小鼠海马 PSD-95 表达的影响

Fig. 1 The effect of curcumin on the expression of PSD-95 in hippocampus of the APP/PS1 double transgenic mice

$A\beta$  及其生成酶和降解酶的研究也表明姜黄素对  $A\beta$  级联反应有影响<sup>[6-7]</sup>。

神经元死亡会导致突触的丧失,一些治疗着眼于保护神经元而完全忽略了突触。但实验显示,仍然存活神经元也存在突触的丢失,并且这种丢失占到了全部突触丢失数量的 38%。丢失突触的神经元功能受到严重损伤。此外还有一些突触虽然结构完整,但功能失调。突触的损伤是 AD 发病最早期的病理变化,有效的治疗方法应该能够保护突触的功能,防止突触丢失,因此及早进行突触保护治疗在 AD 的治疗中具有很大的潜力。

Shank 蛋白家族在细胞信号转导中起重要作用,是突触后蛋白网络的核心部分,作为一种中心骨架蛋白,连接了突触后的谷氨酸、磷酸肌醇、生长抑素等多型受体、多种蛋白和细胞骨架,因此在介导各种受体间的信号转导,维持突触正常功能方面有重要作用,在神经元突触发育、突触后膜受体锚定及细胞间信号传递中发挥关键作用<sup>[8]</sup>。突触后致密区(postsynaptic density, PSD)是位于突触后膜胞浆面的半圆形区域,是突触后信号转导和整合的结构基础。PSD-95 通过不同结构域与其他蛋白相互作用,不仅能够聚集 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(*N*-methyl-*D*-aspartic acid, NMDA)受体及其信号通路中的相关蛋白分子,组成受体-信号分子-调节分子-靶分子复合



物,还可通过突触后致密区多种蛋白分子的相互作用,参与突触连接的形成和维持,在介导和整合 NM-DA 受体信号转导中具有关键性作用<sup>[9]</sup>。

本研究发现,姜黄素改善 APP/PS1 双转基因小鼠的空间学习记忆能力可能与其改善突触结构和突触相关蛋白 Shank1 和 PSD-95,提高 APP/PS1 双转基因小鼠海马突触数量,进而改善突触的可塑性有关。

#### [参考文献]

[1] Scheff S W, Price D A. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies[J]. *Neurobiol Aging*, 2003, 24:1029.  
[2] Galvan V, Bredesen D E. Neurogenesis in the adult brain: implications for Alzheimer's disease[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2007, 6(5):303.  
[3] Sokol D K, Maloney B, Long J M, et al. Alzheimer disease, and fragile X: APP, FMRP, and mGluR5 are molecular links[J]. *Neurology*, 2011, 76(15):1344.

[4] 王虹,王蓬文. 阿尔茨海默病转基因小鼠的特点和应用[J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(6):465.  
[5] Fernanda G De Felice, Marcelo N N Vieira, Theresa R Bomfim, et al. Protection of synapses against Alzheimer's-linked toxins: insulin signaling prevents the pathogenic binding of A $\beta$  oligomers[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(6):1971.  
[6] 王蓬文,王虹,孙建宁,等. 姜黄素对 APP/PS1 双转基因小鼠 A $\beta$ 2 及其降解酶 NEP 表达的影响[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(8):1079.  
[7] 王蓬文,李瑞晟,王虹,等. 姜黄素对 APP/PS1 双转基因小鼠 A $\beta$  生成和降解的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(5):367.  
[8] Iki J, Inoue A, Bito H, et al. Bi-directional regulation of postsynaptic cortactin distribution by BDNF and NMDA receptor activity[J]. *Eur J Neurosci*, 2005, 22(12):2985.  
[9] Li Y, Liu L, Barger S W, et al. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(5):1605.

## Effect of curcumin on synapse-related protein expression of APP/PS1 double transgenic mice

WEI Peng<sup>1,2</sup>, LI Ruisheng<sup>3</sup>, WANG Hong<sup>4</sup>, REN Ying<sup>1,2</sup>, SUN Haiyun<sup>1,2</sup>, YANG Jinduo<sup>1,2</sup>, WANG Pengwen<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Pharmacology, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Class III Biosafety Lab of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China;  
2. Key Laboratory of Chinese Internal Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Ministry of Education, Beijing 100700, China; 3. The Second Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830028, China;  
4. Amcare Women and Children's Hospital, Beijing 100016, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of curcumin on the expression of synapse-related proteins PSD-95 and Shank1 in APP/PS1 double transgenic mice. **Method:** Three-month-old APP/PS1 dtg mice were randomly divided into the model group, the positive Rosiglitazone control group and curcumin high (400 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>), medium (200 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>) and low (100 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>) dose groups, with non-genetically modified mice with the same background as the normal group. After the oral administration for three months, immunohistochemistry and Western blot were adopted for detection. **Result:** According to the behavioral detection, the treatment group and the model group showed differences in the place navigation test and the spatial probe test to varying degrees ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The expression of PSD-95 and Shank1-positive cells of hippocampus CA1 region significantly decreased in model mice compared with normal control group ( $P < 0.01$ ); while the curcumin intervention group showed recovery to some extent. Western blot results showed that the strap of PSD-95 protein expression became significantly thinner and lighter in the model group compared with the normal control group ( $P < 0.01$ ); while the curcumin intervention group showed notably thicker and darker straps of PSD-95 protein expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Curcumin can increase the expression of synapse-related proteins PSD95 and Shank1 in APP/PS1 double transgenic mice, improve structure and plasticity of synapse in APP/PS1 double transgenic mice and enhance their learning and memory abilities.

[Key words] curcumin; APP/PS1 double transgenic mice; PSD-95; Shank1

doi:10.4268/cjmm20121226

[责任编辑 张宁宁]