

EGCG 对阿尔茨海默病小鼠神经保护作用及机制*

隋璐¹, 陈铎², 金戈³

摘要:目的 探讨茶多酚对小鼠行为学、海马组织中淀粉蛋白前体 β 位分解酶 1 (BACE1) 表达以及微管相关蛋白 (TAU 蛋白) 磷酸化水平影响。方法 结果 结论 关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG); SAM 系小鼠, 淀粉蛋白前体 β 位分解酶 1 (BACE1) 方法 以快速老化小鼠 (SAMP8) 作为衰老模型, SAMR1 小鼠 (非老化) 为对照, 以饮水方式给予茶多酚主要成分表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG), 使用 Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆能力, Western blot, 逆转录聚合酶链反应检测 BACE1 基因表达及 TAU 蛋白磷酸化水平的变化。结果 训练第 5 天, 与 SAMR1 组比较, 模型组小鼠逃避潜伏期 $[49 \pm 2.98]s$ 延长, 目标象限停留时间 $[13.52 \pm 3.11]s$ 缩短 ($P < 0.05$); 与模型组比较, EGCG 组小鼠逃避潜伏期 $[41 \pm 3.03]s$ 缩短, 目标象限停留时间 $[25.47 \pm 4.78]s$ 延长 ($P < 0.05$); 与 SAMR1 组比较, 模型组小鼠海马组织中 BACE1 基因 mRNA 水平 (2.835 ± 0.902) 、TAU 蛋白 s202 及 s396 位点磷酸化水平升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, EGCG 组小鼠海马组织 BACE1 基因 mRNA 水平 (1.574 ± 0.556) 、TAU 蛋白 s 202 及 s 396 位点磷酸化水平明显下降 ($P < 0.05$)。结论 茶多酚主要成分 EGCG 能明显改善快速老化小鼠学习记忆能力, 其机制与下调小鼠脑海马 BACE1 表达, 降低 TAU 蛋白磷酸化水平有关。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG); SAM 系小鼠, 淀粉蛋白前体 β 位分解酶 1 (BACE1)

中图分类号: R 749 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2014)10-1282-03 DOI: 10.11847/zgggws2014-30-10-15

Effects of EGCG on nerve protection and BACE1 expression level in hippocampus of mice with Alzheimer's disease

SUI Lu*, CHEN Duo, JIN Ge (* Department of Pathophysiology, Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning Province 110034, China)

Abstract: **Objective** To explore neuroprotective effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its influence on levels of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1) and Tau protein phosphorylation in hippocampus of mice with Alzheimer's disease. **Methods** We adopted senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) as Alzheimer's disease (AD) animal model; we used Morris water maze to measure learning and memory function of the mice and real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot to investigate neuroprotective effect of EGCG and its influence on levels of BACE1 expression and phosphorylation of TAU S202 and S396. **Results** Compared to those of SAMR1 mice (a strain of resistant to senescence), the escape latency $(49 \pm 2.98 s)$ prolonged and target quadrant residence time $(13.52 \pm 3.11 s)$ was shortened in SAMP8 group 5 days after the training ($P < 0.05$ for all). Compared with those of the SAMP8 group, the escape latency $(41 \pm 3.03 s)$ was shortened and target quadrant residence time $(25.47 \pm 4.78 s)$ was prolonged in EGCG-treated group ($P < 0.05$). The results of qRT-PCR and Western blot showed that the BACE1 level $(2.835 \pm 0.902$ for P8 and 1.574 ± 0.556 for EGCG group) was down-regulated and the phosphorylation level of TAU S202 and S396 decreased remarkably after EGCG treatment. **Conclusion** EGCG reduces BACE1 expression and TAU phosphorylation level and the neuroprotective effect of EGCG provides a new strategy for Alzheimer's disease prevention and treatment.

Key words: epigallocatechin-3-gallate; senescence-accelerated mouse; real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction; beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 已成为神经退行性改变继而引发痴呆的主要原因。AD 主要损害学习记忆能力, 病理特征表现在中枢神经系统老年斑、神经元纤维缠结的出现, 临床症状包括进行性智力减退。AD 发病率随着年龄的增长急剧升高, 西方发达国家 85 岁以上老人发病率达 24%~33%^[1]。伴随着中国老龄化社会进程加快, AD 在未来 20 年内将成为重要的公共健康问题^[2]。本

研究以快速老化小鼠 (SAMP8) 为模型动物, 给予茶多酚中重要成分表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin-3-gallate, EGCG), 观察小鼠海马组织中淀粉蛋白前体 β 位分解酶 1 (β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1, BACE1) 的表达, 以及微管相关蛋白 (Tau 蛋白) 磷酸化水平影响的变化, 探讨 EGCG 对老年痴呆小鼠的神经保护作用及机制。结果报告如下。

* 基金项目: 沈阳市科技计划项目 (F13-220-9-27); 辽宁省教育厅一般项目 (L2010547)

作者单位: 1. 沈阳医学院基础医学院病理生理教研室, 辽宁 沈阳 110034; 2. 中国医科大学附属盛京医院神经外科

作者简介: 隋璐 (1970-), 女, 辽宁沈阳人, 副教授, 硕士, 研究方向: 神经系统疾病。

数字出版日期: 2014-9-1 15:32

数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140903.1500.001.html>

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 Morris 水迷宫装置 (安徽淮北正华生物仪器设备有限公司), 7500 定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司), 电泳、转膜设备 (美国 BioRad 公司), 凝胶显影系统 (上海天能公司产品)。EGCG (美国 Sigma 公司、纯度 > 95%), 兔抗小鼠多克隆 BACE1 抗体、兔抗小鼠 Tau S202、S396 磷酸化单克隆抗体 (英国 Abcam 公司); 逆转录 PCR 引物序列由上海生物工程有限公司合成。

1.2 实验动物分组与处理 SAMP8 小鼠 40 只、SAMR1 小鼠 (非老化) 20 只, 小鼠均为雄性, 2 月龄 (天津中医学院第一附属医院实验动物中心), 合格证号: SCXK (津) 2008-0001。实验设 3 组, 每组 20 只, 分别为模型组 (自 2 月龄普通饲养至 8 月龄的 SAMP8 小鼠)、EGCG 组 (SAMP8 小鼠自 2 月龄起, 饮水中加入 EGCG, 每天 2 mg/kg, 连续 6 个月)、对照组 (自 2 月龄普通饲养至 8 月龄 SAMR1 小鼠)。饲养结束后, 先进行 Morris 水迷宫测定, 然后脱臼法处死小鼠, 迅速分离脑组织, 生理盐水清洗, 分离海马和皮层组织, 至 1.5 mL 离心管内, 液氮 30 min, -80 °C 保存。

1.3 指标与方法

1.3.1 EGCG 对小鼠学习记忆能力影响 采用 Morris 水迷宫测定, 训练阶段持续 2 d, 每天 2 次, 训练后开始记录逃避潜伏期, 目的象限停留时间, 测定共进行 5 d。

1.3.2 小鼠海马组织 BACE1 mRNA 水平检测 采用 Trizol 法提取总 RNA, 经紫外分光光度仪检测 RNA 质量后经 RT-PCR 反应, 测定海马组织中 BACE1 基因 mRNA 水平。采用比较 Ct 值的相对定量法, 以三磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为参照, 应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行相对定量。BACE1 引物序列: 上游 5'-TCGCTGTCTCACAGTCATCC-3', 下游 5'-AA-CAAACGGACCTTCCACTG-3'; GAPDH 引物序列: 上游 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3', 下游 5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3'。定量 PCR 反应体系 (25 μ L): SYBR premix (2 \times) 12.5 μ L, 目的基因上、下游引物各 0.5 μ L, cDNA 模板 2.0 μ L, ddH₂O 9.5 μ L, 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 15 s, 59 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。

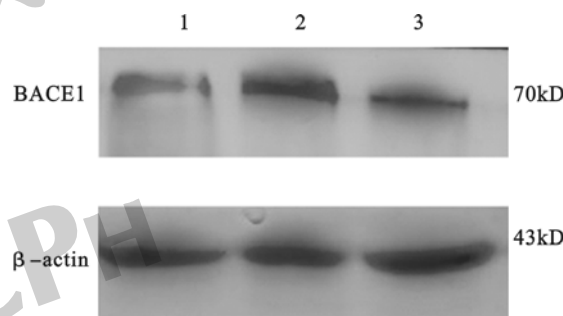
1.3.3 小鼠海马组织蛋白水平检测 小鼠海马组织, 加入预冷的裂解缓冲液, 冰上匀浆, 离心取上清, 考马斯亮蓝测定蛋白含量。SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 转膜, 封闭, 一抗及二抗孵育, BACE1 应用兔抗小鼠多克隆抗体, Tau 磷酸化位点 S202、S396 应用

兔抗小鼠磷酸化单克隆抗体, 经洗膜, ECL 发光, 照相。

1.4 统计分析 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料用百分比表示, 应用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

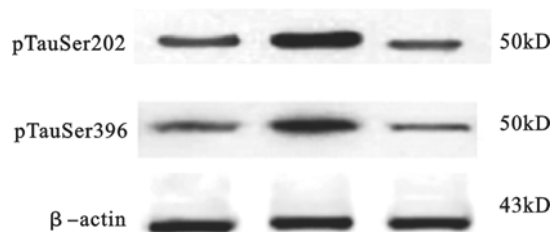
2 结果

2.1 EGCG 对小鼠学习记忆能力影响 (表 1) 随着学习时间增加, 各组小鼠逃避潜伏期均呈缩短趋势; 与 SAMR1 组比较, 第 5 天模型组小鼠平均逃避潜伏期明显延长, 目标象限停留时间明显缩短 ($P < 0.01$); 与模型组比较, EGCG 组小鼠平均逃避潜伏期明显缩短, 目标象限停留时间明显延长 ($P < 0.01$)。



注: 1: SAMR1 组; 2: 模型组; 3: EGCG 组。

图 1 EGCG 对小鼠 BACE1 蛋白表达影响



注: 1: SAMR1 组; 2: 模型组; 3: EGCG 组。

图 2 EGCG 对小鼠海马区 TAU 蛋白 Ser202 及 Ser396 位点磷酸化水平影响

2.2 EGCG 对小鼠海马组织中 BACE1 mRNA 与蛋白表达影响 (图 1) SAMR1、模型组、EGCG 组 BACE1 mRNA 相对表达量分别为 (1.434 \pm 0.646)、(2.835 \pm 0.902)、(1.574 \pm 0.556), 与 SAMR1 组比较, 模型组小鼠 BACE1 mRNA 相对表达量升高; 与模型组比较, EGCG 组小鼠 BACE1 mRNA 相对表达量下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 SAMR1 组比较, 模型组小鼠海马区 BACE1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, EGCG 组小鼠海马区 BACE1 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$)。

2.3 EGCG 对小鼠海马组织中 Tau 蛋白磷酸化水平影响(图 2) 与 SAMR1 组比较,模型组小鼠海马区 Tau 蛋白 S202、S396 位点磷酸化水平较明显

升高($P < 0.05$);与模型组比较,EGCG 组小鼠海马区 Tau 蛋白 S202、S396 位点磷酸化水平明显下降($P < 0.05$)。

表 1 EGCG 对小鼠学习记忆能力影响($s, \bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	检测时间					目标象限停留时间
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	
SAMR1 组	57.34 ± 3.67	53 ± 3.91	46 ± 3.15	43 ± 2.96	38 ± 2.57	28.79 ± 5.92
模型组	58.03 ± 4.21	56 ± 3.78	55 ± 3.12	52 ± 3.46 ^a	49 ± 2.98 ^a	13.52 ± 3.11 ^a
EGCG 组	55.25 ± 4.01	54 ± 3.65	49 ± 3.40	45 ± 3.27 ^b	41 ± 3.03 ^b	25.47 ± 4.78 ^b

注:与 SAMR1 组比较,a $P < 0.01$;与模型组比较,b $P < 0.01$ 。

3 讨论

EGCG 是茶多酚的主要生物活性物质,具有抗氧化、抗肿瘤以及改善心血管功能等生物活性。目前越来越多的研究发现 EGCG 的神经保护作用^[3], Jia 等^[4]发现 EGCG 可通过抑制肿瘤坏死因子 α /JUK 激酶信号途径并修复胰岛素受体底物 1 信号途径减轻淀粉样蛋白前蛋白/早老素 (APP/PS1) 小鼠空间记忆能力障碍。Dragicevic 等^[5]研究发现,EGCG 能显著改善 APP/PS1 小鼠的氧化损伤和线粒体功能障碍。EGCG 能激活细胞的抗氧化防御体系,减少由 A β 引起的细胞损伤及凋亡^[6]。本研究应用 SAMP8 小鼠模型^[7-8],探讨 EGCG 对小鼠海马组织 A β 形成过程中的关键酶^[9-10] BACE1 表达影响,结果显示,连续干预 6 个月后,EGCG 组 SAMP8 小鼠学习和记忆能力明显提高,小鼠脑海马组织中 BACE1 mRNA 和蛋白水平明显降低。

Tau 蛋白的磷酸化在阿尔茨海默病发生发展中起到的重要作用已引起研究者广泛关注^[11],很多学者认为 Tau 蛋白磷酸化是 AD 发病的关键,是治疗的重要靶点。本研究结果显示,模型组 SAMP8 小鼠海马组织中 Tau 蛋白 S202、S396 位点磷酸化水平明显高于 SAMR1 组(对照),EGCG 干预 6 个月后,SAMP8 小鼠海马组织中 Tau 蛋白 S202、S396 位点磷酸化水平均下降,接近 SAMR1 组小鼠水平。提示 EGCG 具有一定的改善学习记忆能力作用(神经保护功能),其机制可能与 EGCG 调控小鼠脑 BACE1 基因表达以及调节 Tau 蛋白磷酸化水平有关。

参考文献

- [1] Reiman EM. Alzheimer's disease and other dementias: advances in 2013[J]. Lancet Neurol, 2014, 13(1): 3-5.
- [2] Chan KY, Wang W, Wu JJ, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990 - 2010: a systematic review and analysis[J]. Lancet, 2013, 381(9882): 2016-2023.
- [3] 刘甜甜,赵海峰.植物化学物对阿尔茨海默病保护作用研究进展[J].中国公共卫生,2013,29(5):772-775.
- [4] Jia N, Han K, Kong JJ, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate alleviates spatial memory impairment in APP/PS1 mice by restoring IRS-1 signaling defects in the hippocampus[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 380(1-2): 211-218.
- [5] Dragicevic N, Smith A, Lin X, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and other flavonoids reduce Alzheimer's amyloid-induced mitochondrial dysfunction[J]. J Alzheimers Dis, 2011; 26(3): 507-521.
- [6] 闫玉芳,龚锴,马拓,等.表没食子儿茶素没食子酸酯通过抑制 BACE1 转录和翻译减少 A β 生成[J].生物物理学报,2013, 29(7): 486-495
- [7] Takeda J, Takeshita S. A new murine model accelerated senescence[J]. Mech Ageing Dev, 1981, 17(2): 83-194.
- [8] Orejana L, Barros-Minones L, Jordan J, et al. Sildenafil ameliorates cognitive deficits and Tau pathology in a senescence accelerated mouse model[J]. Neurobiol Aging, 2012, 33(3): 625-630.
- [9] Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, et al. The expression of microRNA miR-107 decrease early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme [J]. J Neurosci, 2008, 28(5): 1213-1223.
- [10] Chiocco MJ, Lamb BT. Spatial and temporal control of age-related APP processing in genomic-based beta-secretase transgenic mice [J]. Neurobiol Aging, 2007, 28(1): 75-84.
- [11] Sodhi RK, Singh N. Retinoids as potential targets for Alzheimer's disease[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2014, 120(5): 117-123.

收稿日期: 2014-06-20

(解学魁编辑 刘铁校对)