

# 矢车菊素-3-葡萄糖苷对 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>ΔE9</sup> 阿尔茨海默病模型小鼠糖脂代谢的影响

宋楠, 张玲, 陈巍, 张倩, 韩云林, 秦川\*

(北京协和医学院比较医学中心, 中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

**【摘要】 目的** 探讨矢车菊素-3-葡萄糖苷(Cy3G)对阿尔茨海默病(AD)模型小鼠糖脂代谢的影响。**方法** 将7月龄 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>ΔE9</sup>(PAP)的AD模型小鼠随机分为AD模型组(PAP)、Cy3G治疗组(PAPCy, 5mg/kg/d)及同窝阴性对照组(nPAP);另外选择相同月龄的正常野生型C57BL/6J小鼠分别作为空白对照组(WT)和Cy3G干预组(WTCy, 5mg/kg/d);每组12只,雌雄各半。Cy3G灌胃8周后,用MicroPET/CT检测脑葡萄糖代谢率;血生化方法检测小鼠肝肾功能及脂代谢相关指标;取全脑称重并计算脏器系数,HE染色进行组织病理学检查;透射电镜观察海马中老年斑沉积情况;Western-blot分析Jun氨基末端激酶(JNK)和蛋白激酶B(AKT)的表达情况。**结果** MicroPET/CT结果显示,与WT组相比,PAP组小鼠脑<sup>18</sup>F-FDG的摄取率显著降低( $P < 0.05$ ),尤其在额叶和海马区降低尤为明显;与PAP组相比,PAPCy组小鼠额叶和海马区的<sup>18</sup>F-FDG的摄取率显著升高( $P < 0.05$ )。血生化结果显示,与WT组相比,PAP组小鼠血清中天冬氨酸转氨酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH)水平显著升高( $P < 0.05$ ),脂代谢指标相对正常;与PAP组相比,PAPCy组血清LDH水平显著降低( $P < 0.05$ )。脑组织HE染色未发现异常,但是在脑系数比较中,与WT组相比,PAP组小鼠脑系数显著降低( $P < 0.05$ );与PAP组相比,PAPCy组小鼠大脑的脑系数显著升高( $P < 0.05$ )。透射电镜下观察发现,WT组、WTCy组及nPAP组海马中未见有老年斑沉积,PAP组小鼠海马可观察到有老年斑沉积,而PAPCy组小鼠海马中老年斑沉积有所减少。Western blot结果显示,与WT组相比,PAP组JNK蛋白水平显著降低( $P < 0.05$ )、AKT蛋白水平显著升高( $P < 0.05$ );与PAP组相比,PAPCy组JNK蛋白水平显著升高( $P < 0.05$ ),而AKT蛋白水平显著降低( $P < 0.05$ )。**结论** Cy3G可以有效改善AD模型小鼠脑葡萄糖代谢障碍,但对脂代谢调节并不显著,同时还能抑制大脑海马中老年斑的沉积。提示,Cy3G可能是通过JNK/AKT通路调节胰岛素抵抗和炎症反应。

**【关键词】** 阿尔茨海默病;矢车菊素-3-葡萄糖苷;葡脂代谢

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0015-09

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.003

## Effect of cyaniding-3-glucoside on glucose and lipid metabolism in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>ΔE9</sup> mouse model of Alzheimer's disease

SONG Nan, ZHANG Ling, CHEN Wei, ZHANG Qian, HAN Yun-lin, QIN Chuan\*

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science (CAMS); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Beijing 100021, China)

**【基金项目】** 国家自然科学基金(81500938);协和青年基金(3332015151)。

**【作者简介】** 宋楠,女,博士研究生,研究方向:病理学与病理生理学,神经退行性疾病的机制研究。E-mail:nannanjwstu@163.com。

**【通讯作者】** 秦川,女,研究员,教授,博士生导师,研究方向:病理学与病理生理学。E-mail:qinchuan@pumc.edu.cn。

**[Abstract] Objective** To investigate the effect of cyaniding-3-glucoside (Cy3G) on glucose and lipid metabolism in the APP<sup>swc</sup>/PS1<sup>ΔE9</sup> mouse model of Alzheimer's disease (AD). **Methods** Seven-month-old APP<sup>swc</sup>/PS1<sup>ΔE9</sup> (PAP) mice were randomly divided into model group (PAP), Cy3G treatment group (PAPCy, 5 mg/kg/d) and negative-control group (nPAP). In addition, age-matched and normal wild-type of C57BL/6J mice were selected and divided into vehicle group (WT), Cy3G intervention group (WTCy, 5 mg/kg/d). Each group containing 12 mice, with equal number of male and female mice. After 8-week Cy3G supplementation, microPET/CT was used to measure cerebral glucose metabolism rate of mice in each group. Biochemical methods were used to detect the liver / kidney function as well as indicators associated with lipid metabolism. After weighting brain tissue, the brain coefficient was tested and pathological examination was used to observe tissues changes. Transmission electron microscope was used to observe neuropathological amyloid plaques deposition. Western-blot was used to determine protein levels of AKT and JNK. **Results** Compared with the WT group, PAP mice had low levels of <sup>18</sup>F-FDG uptake rates, especially in the regions of the frontal lobe and hippocampus accompanied by the decreased brain coefficient and amyloid plaques deposition in hippocampus. And levels of aspartate transaminase (AST) and lactic dehydrogenase (LDH) were also increased in PAP mice, but lipid metabolism index was relatively normal. In addition, the expression of JNK was decreased and AKT was increased in mice of PAP. However, in the PAPCy group, <sup>18</sup>F-FDG uptake rates were obviously increased in the regions of the frontal lobe and hippocampus compared with those in the PAP mice. And the reduction of brain atrophy and amyloid plaques deposition, normal lipid metabolism and no obvious liver/kidney toxicity were also observed. Cy3G also could reverse the changes of JNK and AKT protein. **Conclusions** Cy3G can improve glucose metabolism disorders instead of lipid metabolism, inhibit the senile plaques deposition in hippocampus and regulate insulin resistance and inflammatory reaction associated with JNK/AKT pathway. Thus, Cy3G has a good safety profile and may be used as an ideal alternative to traditional disease-modifying treatments against AD.

**[Key words]** Alzheimer's disease; Cyaniding-3-glucoside; Glucose and lipid metabolism

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 作为常见的神经退行性疾病的一种,特征性的病理学表现有:β 淀粉样肽 (β amyloid peptides, Aβ) 沉积形成的老年斑和 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结<sup>[1, 2]</sup>。临床上常伴有进行性认知功能障碍、人格和行为改变等<sup>[3, 4]</sup>。越来越多的研究均证实,随着 AD 病程的发展,大脑葡萄糖代谢障碍是 AD 一个典型的病理生理特征,比认知功能障碍和其他病理改变早出现几十年<sup>[5-8]</sup>,并对 AD 病程的发展起着重要作用<sup>[4]</sup>。因此,如何有效预防 AD 是关键。

矢车菊素-3-葡萄糖苷 (cyaniding-3-glucoside, Cy3G) 是酚类化合物中矢车菊色素 (cyanidin, Cy) 的一种糖苷形式,是植物中常见的且含量较为丰富的花色苷糖苷单体。研究发现, Cy3G 具有神经保护作用<sup>[9, 10]</sup>,其发挥神经保护作用的机制也主要是涉及抗氧化作用和调节神经细胞间信号转导<sup>[2, 11]</sup>。此外,在非酒精性脂肪肝和 2-型糖尿病的研究中发现, Cy3G 可改善胰岛素抵抗、调节脂代谢及缓解氧化应激损伤<sup>[9, 12, 13]</sup>。但其是否通过调节糖脂代谢进而改善 AD 尚未有文献报道。本研究拟用 APP<sup>swc</sup>/PS1<sup>ΔE9</sup> (PAP) 转基因 AD 模型小鼠,观察 Cy3G 对 AD 模型小鼠糖脂代谢的影响及其相关生

化、病理指标的改变,初步探讨可能的分子机制,以期能为 Cy3G 改善 AD 认知的机制研究及潜在临床应用提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

实验所采用的 APP<sup>swc</sup>/PS1<sup>ΔE9</sup> (PAP) 双转基因阿尔茨海默病小鼠模型由本所遗传中心构建培育。该模型以 C57BL/6J 小鼠为背景,含有人 APP 瑞典突变位点 (K595N/M596L) 和人 PS1 第九外显子敲除 (ΔE9) 突变位点。用于繁殖的野生雌性 C57BL/6J 小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK-(京)2014-0004】,实验在中国医学科学院医学实验动物研究所开展【SYXK-(京)2011-0022】。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

#### 1.1.2 实验药物和试剂

Cy3G 购自 (纯度 ≥ 99%) 购自芬兰 Polyphenols AS 公司; RIPA 裂解液 (强) 购于江苏碧云天公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS)、过硫酸胺 (APS)、Tris-HCl、甘氨酸、TEMED、Tween-20 购自美国 Sigma 公司; N,

N'-亚甲基双丙烯酰胺和丙烯酰胺购自美国 Bio-Rad 公司;磷酸酶抑制剂购自美国 Thermo 公司;苯甲基磺酰氟(PMSF)购自美国 Amresco 公司;丽春红、溴酚蓝购自北京鼎国生物技术公司; $\beta$ -巯基乙醇购自美国 Biotech 公司;二硫苏糖醇(DTT)购自北方同正科技发展有限公司;BCA™ Protein Assay Kit、蛋白 Marker 与 ECL 发光试剂盒购于美国 Pierce 公司;脱脂奶粉购自伊利公司;兔抗小鼠的 JNK 多克隆抗体和 AKT 单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司;小鼠单克隆抗体 GAPDH 和 HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Micro-PET 示踪剂( $^{18}\text{F}$  标记的脱氧葡萄糖, $^{18}\text{F}$ -FDG)由中国医学科学院肿瘤医院提供。

### 1.1.3 仪器和设备

MicroPET/CT 及 INVEON 分析系统(Siemens, 美国);全自动生化分析仪(日立 7100, 日本);透射电镜(JEOL JEM-1400, 日本)及倒置显微镜(Olympus, 日本);电泳电源、垂直电泳仪、湿式转印槽(北京凯元信瑞仪器有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组与处理

将 7 月龄 PAP 模型小鼠分为 AD 模型组(PAP)、Cy3G 治疗组(PAPCy, 5 mg/kg/d)及同窝阴性对照组(nPAP);另外选择相同月龄的正常野生型 C57BL/6J 小鼠分别作为空白对照组(WT)和 Cy3G 干预组(WTCy, 5 mg/kg/d);小鼠体重(23~25)g, 每组 12 只,雌雄各半;Cy3G 灌胃 8 周,灌胃体积为 0.2 mL/只,溶剂对照为等体积无菌水。

### 1.2.2 MicroPET/CT 检测脑葡萄糖代谢水平

干预结束后,随机从各组中选择 3 只小鼠(雄性)并提前禁食不禁水 12 h,实验前提前适应周围实验环境。

1)小鼠吸入含 1.5%~2% 异氟烷的纯氧进行吸入麻醉(1~2 L/min),待小鼠麻醉完全后,腹腔注射放射性示踪剂 $^{18}\text{F}$ -FDG,注射量在 14.5~21.9 MBq 之间,活度 $\geq 0.5$  mCi。

2)注射 1 h 后,将小鼠俯卧位固定在扫描床上,使其头部长轴与扫描器长轴保持平行且在扫描器视野内。

3)利用 PET/CT 进行图像采集,整个扫描过程中小鼠头部固定,并使小鼠一直处于麻醉状态。

4)Micro-PET 影像重建。采用滤波后投影算法和 CT 光子衰减校正重建影像,得到 10min 的单帧

图像。

5)感性兴趣区(region of interest, ROI)的选取。通过三维感兴趣区(3DROI)技术,在小鼠脑部横断面、矢状面和冠状面手动选取除小脑外的立体全脑 3DROI,计算 ROI 内平均每克脑组织 $^{18}\text{F}$ -FDG 的摄取率(% ID/g)。

### 1.2.3 血生化及脂代谢指标检测

于实验结束时,各组小鼠经眼眶静脉采血,按照试剂盒相关说明,并使用全自动生化分析仪进行血液生化检测。血液生化指标包括谷丙转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST);脂代谢指标包括乳酸脱氢酶(LDH)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)及低密度脂蛋白(LDL)。

### 1.2.4 脏器系数及病理学检查

将小鼠眼眶静脉取血后,颈椎脱臼处死,称全脑重量并根据当日体重计算脏器指数。脏器系数=(脏器重量/体重) $\times 100\%$ ;沿脑横断面从中切开,入恒冷冰冻切片机行 10  $\mu\text{m}$  连续横断面切片,隔 3 取 1,切片于 4% 多聚甲醛溶液中固定 20 min,再在 0.01 mol/L PBS 中放置 30 min,最后经纯乙醇脱水 2 min 入蒸馏水,进行 HE 染色,封固镜检。

### 1.2.5 透射电镜观察老年斑沉积

取小鼠海马 CA1 区,将组织修成 1 mm  $\times$  1 mm  $\times$  1 mm 大小的长条形,在含 2.5% 戊二醛的固定液中 4°C 固定 2 h,0.1 mol/L PBS 洗三次,每次 10 min;1% 锇酸 4°C 固定 2 h,双蒸水冲洗三次,每次 10 min;梯度酒精脱水(50%, 70%, 90%)各 10 min,100% 酒精 2 次,各 15 min;环氧树脂 Epon812 包埋,超薄切片用醋酸双氧铀及枸橼酸铅双染色,透射电镜观察(JEOL JEM-1400)。

### 1.2.6 Western-blot 检测 JNK 和 AKT 蛋白表达的变化

提取脑组织蛋白并测定蛋白浓度。取含有 60  $\mu\text{g}$  蛋白的样品(用生理盐水调成等体积)加入 5  $\times$  上样缓冲液,100°C 沸水浴变性 5 min,置于冰上骤冷后进行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳、湿转法转膜并用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,分别加入稀释好的抗体 JNK(1:500)、AKT(1:500)和 GAPDH(1:15 000);于摇床孵育,4°C 过夜。次日弃去一抗,TBST 摇床上洗膜 3 次,10 min/次,加入稀释好的二抗(1:15 000),室温孵育 1 h。加入化学发光试剂并置于天能化学发光成像系统(Tannon 5500)中成像,并用 Image J 进行条带灰度值分析,利用

目的蛋白与内参蛋白条带的光密度比值衡量目的蛋白的相对表达量。

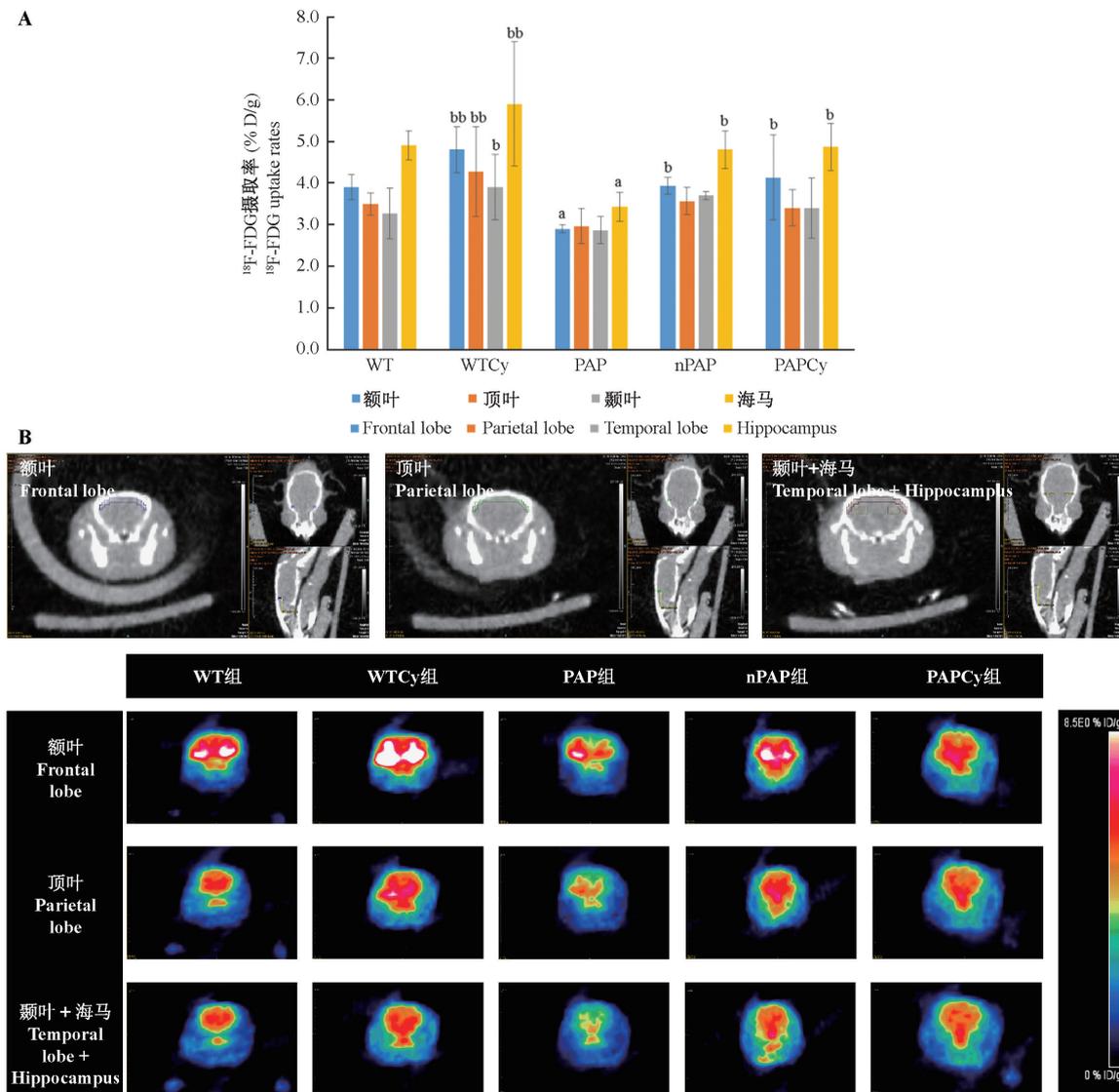
### 1.2.7 数据分析

数据若无说明均采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。采用统计软件 SPSS 20.0 进行统计分析。结果采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),  $t$  检验, wilcox 秩和检验和 Tukey 检验分析组间差异是否显著,  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Cy3G 对 PAP 小鼠脑葡萄糖代谢的影响

如图 1A 所示, MicroPET/CT 检测小鼠额叶 (frontal lobe)、顶叶 (parietal lobe)、颞叶 (temporal lobe) 和海马 (hippocampus) 区对  $^{18}\text{F}$ -FDG 摄取率的变化。结果显示, 各组间不同 ROI 内的平均每克脑组织  $^{18}\text{F}$ -FDG 的摄取率 (% ID/g) 存在显著差异。即



注: (A) Cy3G 对 PAP 小鼠不同 ROI 内平均每克脑组织  $^{18}\text{F}$ -FDG 的摄取率 (% ID/g) 的影响,

与 WT 组比较,  $^aP < 0.05$ ,  $^{aa}P < 0.01$ ; 与 PAP 组比较,

$^bP < 0.05$ ,  $^{bb}P < 0.01$ ; (B) 各组小鼠脑不同区域横断面 MicroPET/CT 影像。

图 1 Cy3G 对 PAP 小鼠脑葡萄糖代谢的影响 ( $n = 3$ )

Note. (A) Comparison of  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake rates in the ROI of mice brains after Cy3G supplementation for 8 weeks ( $n = 3$ ; closely age-matched). Compared with WT group,

$^aP < 0.05$ ,  $^{aa}P < 0.01$ ; Compared with PAP group,  $^bP < 0.05$ ,  $^{bb}P < 0.01$ .

(B) MicroPET/CT imaging of mice after Cy3G supplementation for 8 weeks.

Fig. 1 Effects of Cy3G on cerebral glucose metabolism in PAP mice.

与 WT 组相比, PAP 组小鼠脑<sup>18</sup>F-FDG 的摄取率显著降低( $P < 0.05$ ), 尤其在额叶和海马区降低尤为明显; 与 PAP 组相比, PAPCy 组小鼠额叶和海马区的<sup>18</sup>F-FDG 的摄取率显著升高,  $P$  值分别为 0.019 和 0.036。

在横断面 PET 影像中 % ID/g 使用相同阈值, 色标从上到下分别代表高、中、低<sup>18</sup>F-FDG 摄取水平, 相应为高、中、低脑葡萄糖代谢水平。结果显示(图 1B), WT 组和 WTCy 组小鼠大脑感兴趣区(额叶、顶叶、颞叶和海马区)<sup>18</sup>F-FDG 的摄取率较高, PAP 组小鼠<sup>18</sup>F-FDG 摄取率较低, 而 PAPCy 组小鼠则有所

缓解。

## 2.2 Cy3G 对 PAP 小鼠血生化及脂代谢的影响

结果如表 1 所示, 与 WT 组相比, PAP 组小鼠血清中 AST 和 LDH 水平显著升高( $P < 0.05$ ), 而 LDL 尽管有升高趋势, 但差异不显著; 与 PAP 组相比, PAPCy 组血清 LDH 水平显著降低( $P < 0.05$ )。此外, 血清中 ALT 水平在各组小鼠中均无显著性差异。提示: PAP 组小鼠存在肝肾功能障碍, 但脂代谢相对正常; Cy3G 干预的各组小鼠无明显的肝肾损伤, 并且脂代谢正常。

表 1 各组间小鼠血生化检测

Tab. 1 Blood biochemical tests among groups of mice

组别 Group	ALT(U/L)	AST(U/L)	LDH(U/L)	TG(mmol/L)	HDL(mmol/L)	LDL(mmol/L)
WT	59.7 ± 13.8	136.0 ± 23.2	711.3 ± 122.1	0.807 ± 0.204	1.31 ± 0.229	0.308 ± 0.060
WTCy	60.4 ± 7.5	137.9 ± 29.4 <sup>b</sup>	720.3 ± 323.4 <sup>bb</sup>	0.810 ± 0.176	1.35 ± 0.173	0.304 ± 0.056
PAP	64.7 ± 22.3 ↑	178.1 ± 53.9 <sup>aaa</sup>	1337.9 ± 104.3 <sup>aaa</sup>	0.848 ± 0.192 ↑	1.12 ± 0.206 ↓	0.332 ± 0.075 ↑
nPAP	53.9 ± 14.3	144.4 ± 20.7 <sup>b</sup>	1105.0 ± 291.8 <sup>aa</sup>	0.818 ± 0.254	1.34 ± 0.248	0.312 ± 0.037
PAPCy	56.6 ± 15.6	149.5 ± 21.4	1115.9 ± 204.7 <sup>aaa</sup>	0.781 ± 0.088	1.23 ± 0.389	0.301 ± 0.039

注: 与 WT 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>aa</sup> $P < 0.01$ , <sup>aaa</sup> $P < 0.001$ ; 与 PAP 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>bb</sup> $P < 0.01$ , <sup>bbb</sup> $P < 0.001$ 。

Note. Compared with WT group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>aa</sup> $P < 0.01$ , <sup>aaa</sup> $P < 0.001$ ; Compared with PAP group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>bb</sup> $P < 0.01$ , <sup>bbb</sup> $P < 0.001$ 。

## 2.3 Cy3G 对 PAP 小鼠脑系数的影响及病理学检查

脑系数结果显示(表 2), 与 WT 组相比, PAP 组小鼠脑系数显著降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.001$ ); 与 PAP 组相比, PAPCy 组小鼠脑系数显著升高, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。HE 染色结果表明, 各组小鼠脑组织病理检查未见明显异常, 细胞形态和结构规则、完整(图 2)。

表 2 各组间小鼠脑系数

Tab. 2 Body weight and brain index among groups of mice

组别 Group	脑 Brain
WT	0.0213 ± 0.0022
WTCy	0.0207 ± 0.0004 <sup>bbb</sup>
PAP	0.0158 ± 0.0022 <sup>aaa</sup>
nPAP	0.0204 ± 0.0013 <sup>bb</sup>
PAPCy	0.0186 ± 0.0021 <sup>bb</sup>

注: 与 WT 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>aa</sup> $P < 0.01$ , <sup>aaa</sup> $P < 0.001$ ; 与 PAP 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>bb</sup> $P < 0.01$ , <sup>bbb</sup> $P < 0.001$ 。

Note. Compared with WT group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>aa</sup> $P < 0.01$ , <sup>aaa</sup> $P < 0.001$ ; Compared with PAP group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>bb</sup> $P < 0.01$ , <sup>bbb</sup> $P < 0.001$ 。

## 2.4 Cy3G 对 PAP 小鼠海马老年斑生成的影响

细胞外 A $\beta$  沉积形成的老年斑是 AD 的主要病理特征之一。通过透射电镜观察不同处理组小鼠海马中老年斑的生成情况, 如图 3 所示, 野生小鼠(包括 WT 组和 WTCy 组)及同窝阴性对照组

(nPAP)海马内未见有老年斑形成, 周围分布的线粒体结构正常; 而 AD 模型小鼠(PAP 组)小鼠海马中可观察到有老年斑沉积, 其周围还有大量聚集在一起的自噬小体。而 PAPCy 组小鼠海马中老年斑沉积有所减少。

## 2.5 Cy3G 对 PAP 小鼠脑组织 JNK 和 AKT 蛋白表达的影响

结果如图 4 所示, JNK 蛋白主要介导炎症反应, 与 WT 组比, PAP 组 JNK 蛋白水平显著降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ); 与 PAP 组相比, PAPCy 组 JNK 蛋白显著升高, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。AKT 是调节胰岛素抵抗的蛋白, 与 WT 和 WTCy 组相比, PAP 组 AKT 蛋白水平显著升高, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与 PAP 组相比, PAPCy 组 AKT 蛋白水平显著降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)作为是世界上最常见的一种老年痴呆症, 在中国患者数也已超过 600 万, 60 岁人群中 AD 的患病率为 3%~5%, 并随着人口老龄化其患病率呈上升趋势, 影响着我国经济和社会发展<sup>[14]</sup>。临床用于治疗 AD 的主要药物如胆碱酯酶抑制剂只能减轻部分症状,

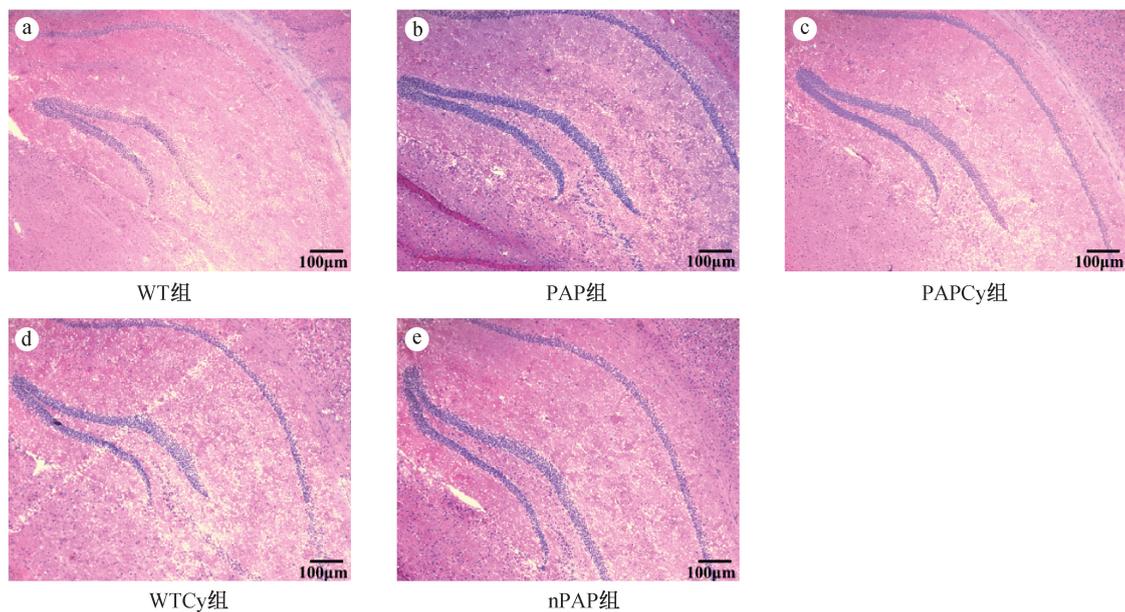


图 2 脑组织病理学检查 ( $\times 40$ , bar = 100  $\mu\text{m}$ ,  $n = 6$ )

Fig. 2 Pathological examination on tissue of mice.

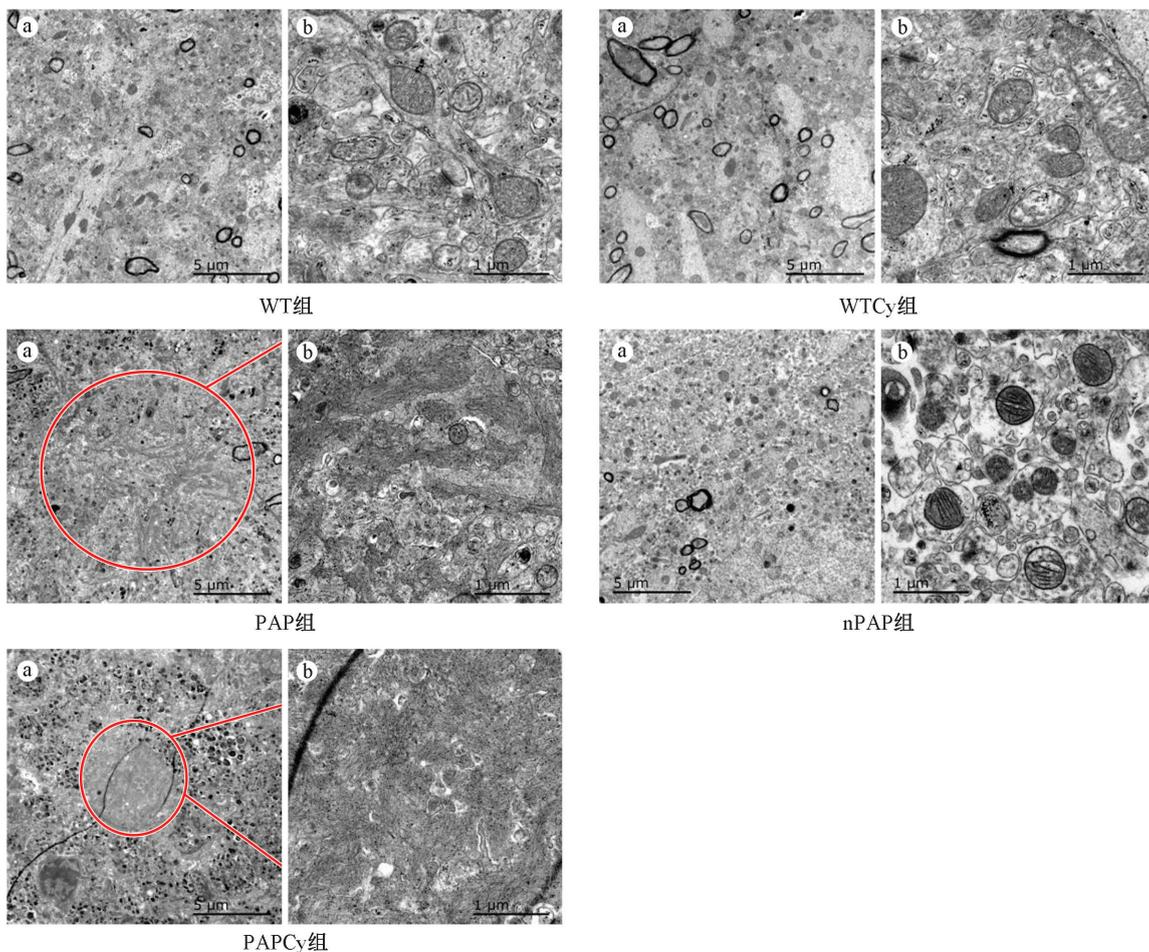
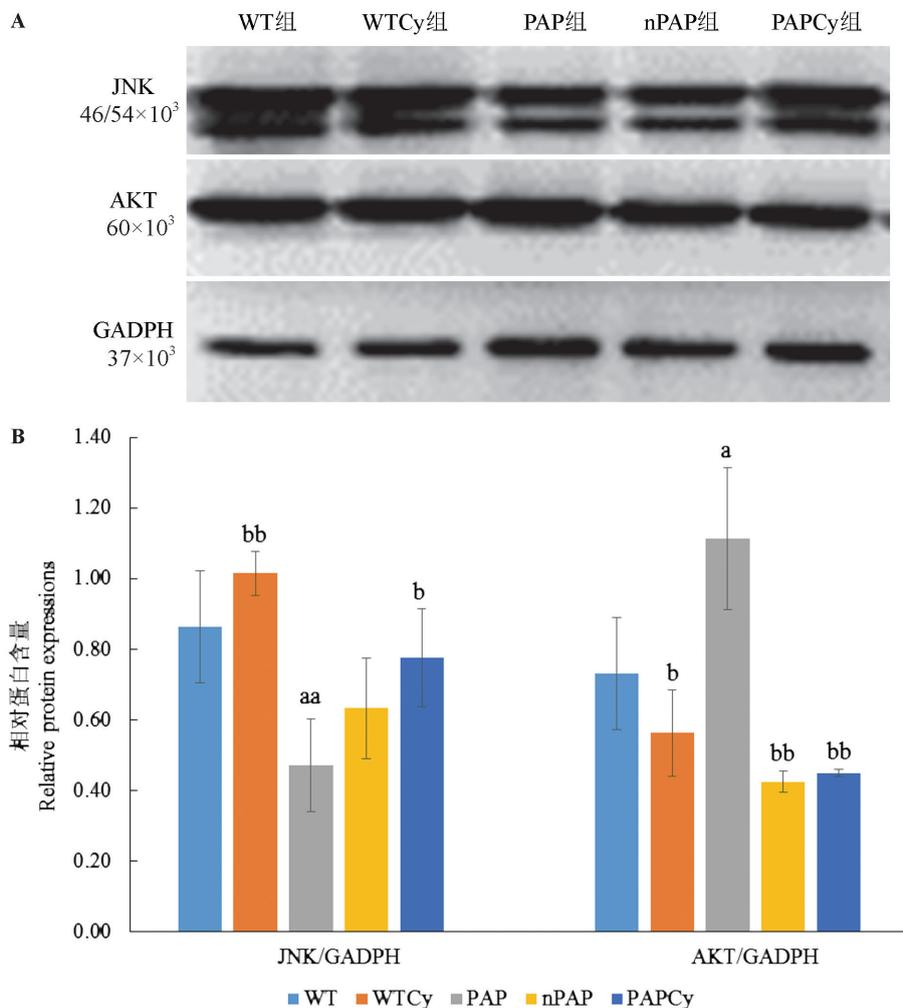


图 3 透射电镜下海马区老年斑及其周围组织的超微结构 (A:  $\times 600$ , bar = 5  $\mu\text{m}$ ; B:  $\times 3000$ , bar = 1  $\mu\text{m}$ ;  $n = 3$ )

Fig. 3 Representative electron microscopy of senile plaques surrounded by dystrophic neuritis and autophagic vacuoles in hippocampus of each group



注：(A)为脑组织中 JNK 和 AKT 蛋白表达条带；(B)JNK 和 AKT 蛋白表达灰度分析结果；与 WT 组比较，<sup>a</sup>*P* < 0.05, <sup>aa</sup>*P* < 0.01；与 PAP 组比较，<sup>b</sup>*P* < 0.05, <sup>bb</sup>*P* < 0.01。

图 4 Cy3G 对 PAP 小鼠 JNK 和 AKT 蛋白表达的影响 (*n* = 3)

Note. (A) The immunoreactive bands (JNK, 46/54 kDa; AKT, 60 kDa) were detected using chemiluminescence reagents. (B) The relative density of the detected bands was measured and calculated by an automatic chemiluminescence imaging analysis system; Compared with PAP group, <sup>a</sup>*P* < 0.05, <sup>aa</sup>*P* < 0.01; Compared with PAP group, <sup>b</sup>*P* < 0.05, <sup>bb</sup>*P* < 0.01.

Fig. 4 Effect of Cy3G on the expression of JNK and AKT in different groups.

对患者脑内的主要病理变化并无明显改善作用,不能用于早期 AD 病理事件的干预或控制病情的发展,病人的生活质量无法有效改善,且药物毒副作用大<sup>[15]</sup>。此外,葡萄糖代谢功能障碍可增加老年人认知损伤的风险。而葡萄糖代谢动态平衡的失调,会引起大脑慢性代谢性疾病,其中也包括 AD。即 AD 也是一种葡萄糖摄取和利用障碍的退行性代谢疾病。<sup>[16]</sup>

越来越多的研究证实,Cy3G 除了具有清除自由基,抗氧化、抗炎,防止内皮功能紊乱,调节胆固醇代谢,改善胰岛素抵抗,预防癌症、糖尿病和心脑血管疾病等作用外,还具有神经保护作用<sup>[9-11, 17]</sup>。体外

实验发现,用 Cy3G 活性单体预处理 PC12 (大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤)细胞可有效改善 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 造成的氧化损伤,也可显著抑制缺氧缺糖 (oxygen glucose deprivation, OGD) 所致的 PC12 细胞存活率降低<sup>[18]</sup>。Tarozzi 等<sup>[19]</sup> 研究还发现,该活性物质对 Aβ 致人神经母细胞瘤 (SH-SY5Y) 细胞损伤也具有保护作用,即细胞存活率升高、细胞凋亡和坏死率降低、ROS 生成量减少、细胞膜完整性得到保护。而 Aβ 可以通过扩散方式进入大脑实质,是 AD 发生的主要致病因素。体内研究发现,Cy3G 可以降低大脑缺血损伤,对短暂中脑动脉阻塞 (MCAO) 造成的脑损伤模型小鼠具有神经保护作用<sup>[11]</sup>; Shih 等<sup>[2]</sup> 研究发现,

给快速老化(SAMP)小鼠饲喂富含 Cy3G 的提取物 12 周,可使大脑中过氧化氢酶及谷胱甘肽过氧化物酶活性升高,脂质过氧化水平降低,  $A\beta$  生成减少,学习记忆能力提高,即 Cy3G 能改善衰老小鼠的认知和行为能力<sup>[20]</sup>。体内外实验均证实: Cy3G 可以透过血-脑屏障,在与学习和记忆相关的脑区发挥其神经保护功能<sup>[10, 21-23]</sup>,因此,研究 Cy3G 对 AD 的预防或缓解作用具有现实意义。

本研究发现, Cy3G 还能有效改善 AD 小鼠大脑中不同脑区的葡萄糖利用率,即补充 Cy3G 的 AD 小鼠其脑葡萄糖代谢率显著升高,尤其以海马区最为显著,其次是额叶、颞叶和顶叶。因此,推测 Cy3G 具有安全的胰岛素样活性,可调节大脑胰岛素敏感区的葡萄糖/能量代谢, Cy3G 这种生物学效用与 Shih 和 Scazzocchio 等<sup>[9, 13]</sup>观点一致,即他们在非酒精性脂肪肝、2-型糖尿病的研究中发现, Cy3G 可以通过活化过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 通路改善胰岛素抵抗、缓解氧化应激。 Cy3G 在脑中发挥其生物活性的机制可能与其在生理 pH 下化学性质不稳定、易分解有关,并且能迅速降解成酚酸(如原儿茶酸),这可能是其在体液中半衰期相对较短的原因;另一种可能是,在肠道中花青素首先通过肠道微生物将其糖苷键部分水解,生成花青素的糖苷配基(Cy)<sup>[24]</sup>。同时, Fleschhut<sup>[25]</sup>研究也已经证实,肠道菌群具有潜在的水解 Cy3G 的能力,即将 Cy3G 水解成 Cy 和 PA,而后者可到达不同组织中,其中也包括脑组织<sup>[26]</sup>。此外,通过血生化检测并结合病理学检查,来评价 Cy3G 干预期间各组小鼠肝肾功能及脂代谢情况。结果显示: PAP 小鼠存在肝肾功能紊乱,但是脂代谢相对正常;而 Cy3G 干预的各组小鼠均无明显的肝肾损伤,并且脂代谢正常。但是, Jia 等<sup>[12]</sup>研究发现,在脂肪组织和肝脏中 Cy3G 可显著降低脂肪变性的肝细胞的脂质浓度,其激活肝细胞脂代谢的效果类似于降血脂药物。提示,在本研究中 Cy3G 可能对 AD 小鼠糖代谢方面发挥重要作用,而在脂代谢调节中的作用并不显著,这可能是因实验对象不同所致, Jia 等是基于细胞水平上的研究,而本研究是从整体水平检测。为进一步研究 Cy3G 通过调节脑葡萄糖代谢改善 AD 的可能机制,在 Cy3G 干预期间,我们检测了脑系数并结合透射电镜观察海马区发现,尽管病理检查未发现异常,但是 PAP 小鼠脑系数明显减小。提示, AD 模型小鼠可能出现了脑萎缩,同时海马区可观察到老

年斑沉积;而补充 Cy3G 的 PAP 小鼠其脑萎缩趋势有明显改善,老年斑沉积也有所缓解。结合上述脑糖代谢紊乱的情况,应用免疫印迹法检测了 AKT/JNK 蛋白的变化。因为,根据文献报道,使用罗格列酮干预三转基因( APP<sup>swE</sup>/PS1<sup>ΔE9</sup>/TAU) AD 模型小鼠 4 个月,观察其对认知功能和 AD 相关病理变化的影响,发现这种长期治疗改善了空间学习能力与 AKT 信号通路改变有关,进而可缓解 tau 蛋白磷酸化和神经炎症<sup>[27]</sup>。而 JNK 的磷酸化水平升高可以导致胰岛素受体底物-1 (IRS-1, 第 307 位的丝氨酸)磷酸化,使 AKT 去磷酸化,进而出现胰岛素抵抗<sup>[28]</sup>。 Shih 等<sup>[13]</sup>研究进一步证实, Cy3G 及曲格列酮分别或共同处理人类肝母细胞瘤 HepG2 细胞后,一方面 Cy3G 通过其代谢产物 Cy (cyanidin) 通过调控细胞外信号调节激酶 (ERK) 和 JNK 信号通路,发挥抗氧化作用;另一方面,两者可发挥协同效应,抑制由 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的脂代谢相关基因的表达水平下调、ROS 的生成和细胞的凋亡,缓解氧化应激介导的肝毒性。此外,  $A\beta$  能引起 JNK 信号转导通路的改变,导致海马神经元损伤<sup>[29, 30]</sup>。本研究发现 PAP 小鼠脑组织中 AKT 蛋白表达水平上调、JNK 蛋白表达水平下调,而 Cy3G 干预后则逆转了上述蛋白的变化。提示 Cy3G 可能通过对 AKT/JNK 通路的调节进而改善了 AD 小鼠脑胰岛素抵抗及炎症反应<sup>[28]</sup>,可进一步解释 Cy3G 干预的 AD 小鼠脑葡萄糖代谢率升高的原因。

综上所述, Cy3G 改善 AD 的神经保护作用机制可能与其改善脑葡萄糖代谢,调节胰岛素抵抗和缓解炎症反应有关,因此 Cy3G 可能具有潜在胰岛素增敏剂的活性。

#### 参考文献:

- [ 1 ] S. Y. Hong, W. S. Jeong, M. Jun. Protective effects of the key compounds isolated from Corni fructus against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells[J]. *Molecules*, 2012, 17 (9): 10831 - 10845.
- [ 2 ] PH Shih, YC. Chan, J. W. Liao, *et al.* Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease[J]. *J Nutr Biochem*, 2010, 21 (7): 598 - 605.
- [ 3 ] Z Chen, C. Zhong. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies[J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 108: 21 - 43.
- [ 4 ] S. M. de la Monte. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2012, 9 (1): 35 - 66.

- [ 5 ] R. J. Caselli, K. Chen, W. Lee, *et al.* Correlating cerebral hypometabolism with future memory decline in subsequent converters to amnesic pre-mild cognitive impairment[J]. *Arch Neurol*, 2008, 65 (9): 1231 – 1236.
- [ 6 ] L. Mosconi, A. Pupi, M. J. De Leon. Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1147: 180 – 195.
- [ 7 ] L. Mosconi, R. Mistur, R. Switalski, *et al.* FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2009, 36 (5): 811 – 822.
- [ 8 ] J. B. Langbaum, K. Chen, R. J. Caselli, *et al.* Hypometabolism in Alzheimer-affected brain regions in cognitively healthy Latino individuals carrying the apolipoprotein E epsilon4 allele [J]. *Arch Neurol*, 2010, 67 (4): 462 – 468.
- [ 9 ] B. Scazzocchio, R. Vari, C. Filesi, *et al.* Cyanidin-3-O-beta-glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPARgamma activity in human omental adipocytes [J]. *Diabetes*, 2011, 60 (9): 2234 – 2244.
- [ 10 ] A. Tarozzi, F. Morroni, A. Merlicco, *et al.* Neuroprotective effects of cyanidin 3-O-glucopyranoside on amyloid beta (25 – 35) oligomer-induced toxicity [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 473 (2): 72 – 76.
- [ 11 ] T. H. Kang, J. Y. Hur, H. B. Kim, *et al.* Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O-beta-d-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia [J]. *Neurosci Lett*, 2006, 391 (3): 122 – 126.
- [ 12 ] Y. Jia, J. Y. Kim, H. J. Jun, *et al.* Cyanidin is an agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha reducing hepatic lipid[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831 (4): 698 – 708.
- [ 13 ] P. H. Shih, S. L. Hwang, C. T. Yeh, *et al.* Synergistic effect of cyanidin and PPAR agonist against nonalcoholic steatohepatitis-mediated oxidative stress-induced cytotoxicity through MAPK and Nrf2 transduction pathways[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60 (11): 2924 – 2933.
- [ 14 ] Alzheimer's Association. Alzheimer's 2015 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2015, 11 (3): 332 – 384.
- [ 15 ] T. Sobow. Combination treatments in Alzheimer's disease: risks and benefits[J]. *Expert Rev Neurother*, 2010, 10 (5): 693 – 702.
- [ 16 ] S. C. Correia, R. X. Santos, C. Carvalho, *et al.* Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria; major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation[J]. *Brain Res*, 2012, 1441: 64 – 78.
- [ 17 ] A. Castañeda-Ovando, M. d. L. Pacheco-Hernández, M. E. Pérez-Hernández, *et al.* Chemical studies of anthocyanins: A review [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113 (4): 859 – 871.
- [ 18 ] W. H. Shin, S. J. Park, E. J. Kim. Protective effect of anthocyanins in middle cerebral artery occlusion and reperfusion model of cerebral ischemia in rats [J]. *Life Sci*, 2006, 79 (2): 130 – 137.
- [ 19 ] A. Tarozzi, A. Merlicco, F. Morroni, *et al.* Cyanidin 3-O-glucopyranoside protects and rescues SH-SY5Y cells against amyloid-beta peptide-induced toxicity [J]. *Neuroreport*, 2008, 19 (15): 1483 – 1486.
- [ 20 ] P. C. Bickford, T. Gould, L. Briederick, *et al.* Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats [J]. *Brain Res*, 2000, 866 (1 – 2): 211 – 217.
- [ 21 ] C. Andres-Lacueva, B. Shukitt-Hale, R. L. Galli, *et al.* Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory [J]. *Nutr Neurosci*, 2005, 8 (2): 111 – 120.
- [ 22 ] L. Qin, J. Zhang, M. Qin. Protective effect of cyanidin 3-O-glucoside on beta-amyloid peptide-induced cognitive impairment in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 534: 285 – 288.
- [ 23 ] J. Min, S. W. Yu, S. H. Baek, *et al.* Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 500 (3): 157 – 161.
- [ 24 ] A. Tarozzi, F. Morroni, S. Hrelia, *et al.* Neuroprotective effects of anthocyanins and their in vivo metabolites in SH-SY5Y cells [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 424 (1): 36 – 40.
- [ 25 ] J. Fleschhut, F. Kratzer, G. Rechkemmer, *et al.* Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro [J]. *European Journal of Nutrition*, 2006, 45 (1): 7 – 18.
- [ 26 ] M. A. El Mohsen, J. Marks, G. Kuhnle, *et al.* Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats [J]. *Br J Nutr*, 2006, 95 (1): 51 – 58.
- [ 27 ] Y. Yu, X. Li, J. Blanchard, *et al.* Insulin sensitizers improve learning and attenuate tau hyperphosphorylation and neuroinflammation in 3xTg-AD mice [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2015, 122 (4): 593 – 606.
- [ 28 ] C. J. Chang, C. S. Lin, C. C. Lu, *et al.* *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7489.
- [ 29 ] S. Mandrekar-Colucci, J. C. Karlo, G. E. Landreth. Mechanisms underlying the rapid peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated amyloid clearance and reversal of cognitive deficits in a murine model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2012, 32 (30): 10117 – 10128.
- [ 30 ] M. Ahmadian, J. M. Suh, N. Hah, *et al.* PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future [J]. *Nat Med*, 2013, 19 (5): 557 – 566.