

白藜芦醇对血管性痴呆大鼠学习、记忆能力的影响及机制研究*

嵇建刚¹, 张 莉², 王 冠³, 刘文娟⁴, 刘文婷^{5△}

(山东省潍坊市中医院 1. 脑病科; 2. 检验科, 潍坊 261041; 3. 山东省潍坊市安丘市人民医院神经内科, 安丘 262100; 4. 山东省肿瘤医院基础实验室, 济南 250117; 5. 山东省潍坊市人民医院神经内科, 潍坊 261000)

摘要 目的:探讨白藜芦醇对血管性痴呆(VD)模型大鼠学习记忆、能力的影响及其可能机制。**方法:**将40只雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、白藜芦醇低剂量组(20 mg/kg)及高剂量组(50 mg/kg)。除假手术组外,其他各组应用双侧颈总动脉永久性结扎(2-VO)法复制VD大鼠模型。采用Morris水迷宫装置检测大鼠的学习、记忆能力,western blotting法检测脑组织tau蛋白及其磷酸化蛋白(p-tau)的表达情况。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠行为学训练第3~5天逃避潜伏期明显延长($P < 0.01$),第6天100 s内穿越平台次数明显减少($P < 0.01$)。与模型组比较,白藜芦醇高剂量组大鼠行为学训练第3~5天逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$),100 s内穿越平台次数显著增多($P < 0.05$);而白藜芦醇低剂量组逃避潜伏期、100 s内穿越平台次数与模型组比较,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。与假手术组比较,模型组p-tau蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$);白藜芦醇高剂量组p-tau蛋白表达水平较模型组显著降低($P < 0.05$),而白藜芦醇低剂量组p-tau蛋白表达水平与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);4组tau蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**白藜芦醇可能通过降低脑内tau蛋白磷酸化水平,改善VD模型大鼠的学习和记忆能力。

关键词 白藜芦醇;血管性痴呆;学习记忆能力;tau蛋白磷酸化

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1005-930X(2017)09-1266-04

DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2017.09.002

Effects of resveratrol on learning and memory in rats with vascular dementia

Ji Jiangang¹, Zhang Li², Wang Guan³, Liu Wenjuan⁴, Liu Wenting⁵. (1. Department of Neurology; 2. Clinical Laboratory, Weifang Traditional Chinese Hospital, Weifang 261041, China; 3. Department of Neurology, The People's Hospital of Anqiu City, Weifang 262100, China; 4. Shandong Cancer Hospital and Institute, Shandong Academy of Medical Sciences, Ji'nan 250117, China; 5. Department of Neurology, The People's Hospital of Weifang City, Weifang 262100, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of resveratrol on learning and memory in rats with vascular dementia (VD) and the possible mechanism. **Methods:** 40 male SD rats were randomly divided into sham group, model group, low-dose resveratrol (20 mg/kg) group and high-dose resveratrol (50 mg/kg) group. The rat model of vascular dementia was established by bilateral occlusion of common carotid arteries. Morris water maze was used to detect the learning and memory abilities of rats. The expressions of tau protein and phosphorylated tau (p-tau) were determined by western blotting. **Results:** Compared to the sham group, rats in the model group exhibited an increased escape latency in the Morris water maze ($P < 0.01$), and decreased times of platform crossing ($P < 0.01$). High-dose resveratrol obviously decreased escape latency, and increased the number of crossing ($P < 0.05$). The p-tau expression in hippocampus of vascular dementia rats was significantly up-regulated ($P < 0.05$), and was reversed by high dose of resveratrol treatment ($P < 0.05$). **Conclusion:** Resveratrol improved the learning and memory abilities of rats with vascular dementia possibly by decreasing the level of p-tau protein in brain.

Keywords resveratrol; vascular dementia; learning and memory; tau phosphorylation

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81502691)

△通信作者

收稿日期:2017-05-31

血管性痴呆(vascular-dementia disease, VD)是指由缺血性卒中、出血性卒中和特殊脑区低灌注等脑血管疾病所致的严重认知功能障碍综合征^[1]。我国VD

的患病率为1.1%~3.0%,年发病率为5~9/1 000人^[2]。VD所致的认知功能障碍主要表现在学习、记忆力下降,注意力、始动性和执行功能减退等。目前认为,VD的发病机制可能与中枢胆碱能系统受损、突触可塑性病变、兴奋性氨基酸、氧化应激、细胞凋亡等相关。近年来有研究发现,tau蛋白过度磷酸化使得神经元微管组装能力下降,细胞稳定性减弱,从而影响突触神经递质转运、摄取和释放,最终导致认知功能障碍,可能是VD发病的重要病理因素^[3]。白藜芦醇是一种含有芪类结构的非黄酮类多酚化合物,广泛存在于藜芦、葡萄及虎杖等植物中,具有抗炎^[4]、抗氧化^[5]和诱导细胞凋亡^[6]等多种药理活性。有研究表明,白藜芦醇能够对抗心血管疾病,减轻心肌缺血/再灌注损伤,且对受损血管有一定的调节作用^[7]。刘贵珊等^[8]研究表明,白藜芦醇可改善D-半乳糖所致痴呆小鼠的学习、记忆能力,具有一定的抗衰老作用。本研究采用双侧颈总动脉永久结扎(2-vessel occlusion, 2-VO)法复制VD大鼠模型,旨在探讨白藜芦醇对VD大鼠学习、记忆能力的影响及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只, 6~7 周龄, 体重 220~250 g, 均购自潍坊医学院实验动物中心[动物许可证号: SCXK(鲁)2012-0005]。大鼠分笼饲养(3~4 只/笼), 维持温度 22~26 °C, 湿度 50%~60%, 给予自然昼夜节律光照, 自由饮食与活动, 标准饮水及饲料。动物实验过程严格按照国家实验动物伦理委员会规定的原则进行。

1.2 实验分组、造模及给药

40 只大鼠随机分为假手术组、模型组、白藜芦醇低剂量组及高剂量组, 每组 10 只。除假手术组外, 其他各组均应用 2-VO 法复制 VD 动物模型^[9], 具体方法: 大鼠术前禁食、禁饮 4 h, 以 10% 水合氯醛(4 mL/kg)腹腔内注射麻醉后, 将其仰卧固定于手术台上, 手术区域消毒, 沿颈部正中中线切开皮肤, 分离双侧颈总动脉(CCA), 用 4 号无菌丝线结扎 CCA, 待大鼠呼吸和心跳平稳后进行缝合、消毒。假手术组大鼠仅暴露双侧 CCA 但不结扎, 其他手术过程同模型组。造模后次日开始给予药物干预, 白藜芦醇低剂量组、高剂量组分别给予白藜芦醇(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 20 mg/kg·d⁻¹、50 mg/kg·d⁻¹ 腹腔注射, 连续给药 14 d。假手术组和模型组给予等量生理盐水。

1.3 Morris 水迷宫行为学测试

给药完成后, 利用 Morris 水迷宫(Panlab, Barcelona, Spain) 装置对各组大鼠进行学习、记忆能力检测。Morris 水迷宫检测系统由圆柱形水池迷宫和计算机图像采集分析系统两部分组成。迷宫水池直径

160 cm, 高 50 cm, 池内水深 25 cm, 水温保持在 22~25 °C。将水池平分为 4 个象限, 在目标象限中心放置有直径 12 cm、高 23 cm 的圆柱形黑色平台。迷宫正上方安置有摄像头, 可连接计算机显示、采集及分析系统。采用 Morris 水迷宫视频分析系统(SLY-WMS MWM system v. 2. 1) 进行数据分析处理。

1.3.1 定位航行实验 行为学测试前 1 d 将大鼠放入水池中自由游泳 2 min 以熟悉迷宫及周围环境。定位航行实验中, 依次将大鼠从不同的入水点面向池壁放入水池, 每日训练 4 次, 共 5 d。记录大鼠找到平台的时间, 即逃避潜伏期。若大鼠在 90 s 内找不到平台, 其逃避潜伏期记为 90 s。每只大鼠每天取 4 次训练的平均值作为当天成绩。

1.3.2 空间探索试验 行为学测试第 6 天撤除原平台, 将大鼠依次从 4 个象限入水点放入水中, 记录大鼠在 100 s 内跨越原平台位置的次数。

1.4 Western blotting 法检测 tau 及其磷酸化蛋白(p-tau)的表达

行为学测试完成后, 各组大鼠以 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 断头取脑, 冰上快速分离两侧海马组织, 提取组织蛋白, BCA 蛋白定量, 蛋白煮沸变性, 利用 SDS-PAGE 分离蛋白(美国 Bio-Rad, 恒压 90~110 V, 1.5 h), 将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 分别加入相应一抗(p-tau、tau、 β -actin, 美国 Abcam 公司)稀释液(1:2 500), 4 °C 孵育过夜; PBST 洗膜 3 次后, 加入二抗稀释液(山羊抗兔, 美国 Abcam 公司, 1:4 000)中室温孵育 1 h, ECL 显色, Image J 分析条带灰度值。以目的蛋白条带灰度值与内参 β -actin 条带灰度值的比值作为目的蛋白表达量。

1.5 统计学方法

应用 GraphPad Prism 5 软件对实验数据进行统计及作图, 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VD 大鼠模型成功率

模型组造模过程中死亡 1 只, 1 只大鼠无法游泳, 最终 8 只大鼠完成实验。白藜芦醇低剂量组、高剂量组各有 1 只大鼠在造模后死亡, 最终每组 9 只大鼠完成实验。本实验 VD 大鼠造模成功率为 90% (27/30)。

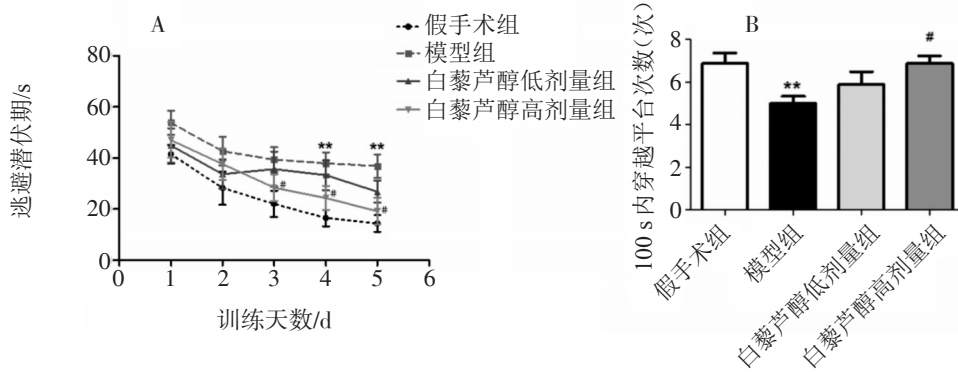
2.2 行为学测试结果

2.2.1 定位航行实验结果 与假手术组比较, 模型组大鼠行为学训练第 3~5 天逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 白藜芦醇高剂量组大鼠行为学训练第 3~5 天逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$), 而白藜芦醇低剂量组逃避潜伏期与模型组比较, 差异

无统计学意义($P>0.05$),见图1A。

2.2.2 空间探索实验结果 与假手术组比较,模型组大鼠第6天100 s内穿越平台次数明显减少($P<0.01$);白藜芦醇低剂量组大鼠100 s内穿越平台次数与

模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),白藜芦醇高剂量组大鼠100 s内穿越平台次数较模型组显著增多($P<0.05$),见图1B。



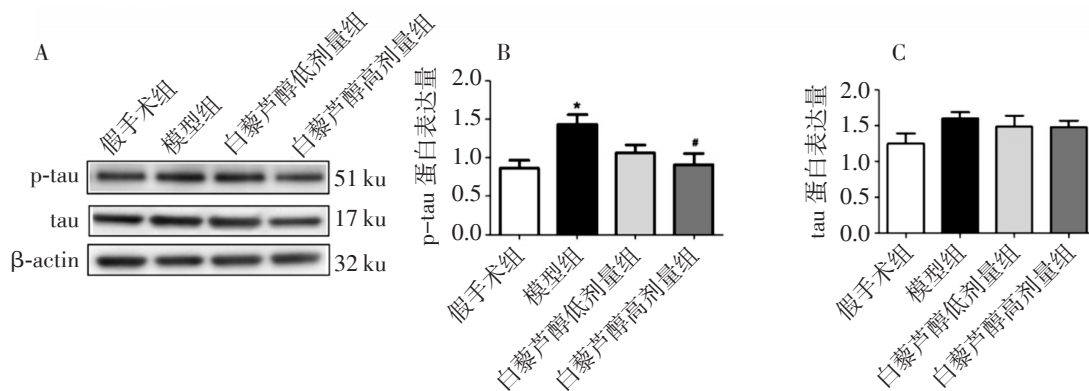
A: 定位航行实验; B: 空间探索实验; 与假手术组比较, $^{**}P<0.01$; 与模型组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

图1 Morris水迷宫行为学测试结果

2.3 4组大鼠海马组织中p-tau和tau蛋白表达量比较

Western blotting结果显示:与假手术组比较,模型组p-tau蛋白表达水平明显升高($P<0.05$);白藜芦醇低剂量组p-tau蛋白表达水平与模型组比较,差异

无统计学意义($P>0.05$),白藜芦醇高剂量组p-tau蛋白表达水平较模型组显著降低($P<0.05$);4组tau蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图2。



A: western blotting 蛋白条带; B: 4组p-tau蛋白表达量; C: 4组tau蛋白表达量; 与假手术组比较, $^{*}P<0.05$; 与模型组比较, $^{\#}P<0.05$ 。

图2 4组大鼠海马组织中p-tau和tau蛋白表达量比较

3 讨论

海马区脑组织参与信息的贮存和回忆,是缺血损伤最敏感脑区,脑缺血造成海马损伤引起学习、记忆功能下降,是发生VD的重要原因。2-VO法通过线栓阻断双侧CCA的70%血流,使脑组织出现低灌注,造成海马区缺血缺氧,导致认知功能障碍。该模型制作方法简单、成模率高,是目前国内外学者公认的VD造模方法^[9]。本研究利用2-VO法复制VD大鼠模型的成功率为90%(27/30)。

Morris水迷宫测试利用大鼠在游泳过程中会本能寻找水中休息场所的特性,通过寻找平台的复杂的记忆过程,包括收集与空间定位有关的视觉信息,

再对这些信息进行整理、记忆、加固以及再取出,最终成功定向找到隐藏在水中的平台,从水中逃脱,从而检测大鼠的空间学习与记忆能力^[10]。本研究通过Morris水迷宫系统测试VD大鼠的学习、记忆能力,结果发现,与假手术组相比,模型组大鼠逃避潜伏期延长,100 s内穿越平台次数明显降低($P<0.05$),说明VD大鼠学习、记忆能力受损;而白藜芦醇干预可部分改善大鼠的学习、记忆功能缺陷,这与牛文亚等^[11]研究结论相一致。目前,白藜芦醇应用于VD大鼠的剂量研究较少,本研究观察了20 mg/kg和50 mg/kg两个剂量白藜芦醇对VD大鼠学习、记忆的影响,结果显示:白藜芦醇低剂量组大鼠的逃避潜伏期、100 s内穿越平台的次数与模型组比较,差异无统计学意

义($P>0.05$),而白藜芦醇高剂量组大鼠的逃避潜伏期较模型组明显缩短,且100 s内穿越平台的次数显著增多(均 $P<0.05$),表明50 mg/kg白藜芦醇对VD大鼠的学习、记忆能力均有提高作用。

有研究表明,白藜芦醇通过保护脑缺血大鼠海马区的神经元细胞以及改善神经元细胞突触可塑性提高脑缺血模型大鼠的运动及行为能力^[12]。另有研究表明,白藜芦醇对星形胶质细胞具有明显的保护作用^[13]。本研究对VD大鼠海马组织中tau蛋白及其磷酸化(p-tau)蛋白表达水平进行检测分析,结果显示:与假手术组相比,模型组大鼠p-tau蛋白表达量显著升高($P<0.05$),提示tau蛋白过度磷酸化可能与VD发病有关。tau蛋白过度磷酸化后,与微管蛋白结合能力降低,可影响微管功能稳定性,造成神经纤维退化,影响突触的稳定性及神经递质的传递^[14]。GSK3 β 和CDK5为tau蛋白磷酸化的主要激酶^[15],因此,研究GSK3 β 和CDK5激酶在VD患者中的活性变化,可进一步探讨tau蛋白磷酸化的调节机制。本研究中,白藜芦醇低剂量组p-tau蛋白表达水平与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),白藜芦醇高剂量组p-tau蛋白表达水平较模型组显著降低($P<0.05$);4组tau蛋白表达水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。提示VD所致的脑组织缺血缺氧不会影响tau蛋白总量,白藜芦醇可能通过降低tau蛋白磷酸化水平促进微管组装活性及神经纤维结构稳定,改善神经递质的合成、转运、摄取和释放,从而提高VD大鼠学习、记忆能力。

综上所述,白藜芦醇可能通过下调tau蛋白磷酸化水平,改善VD大鼠的学习、记忆功能。白藜芦醇作为多生物活性药物,其参与调节认知功能的信号通路及对tau蛋白的具体调控机制仍待进一步研究。

参考文献:

- [1] IEMOLO F, DURO G, RIZZO C, et al. Pathophysiology of vascular dementia [J]. *Immunity Ageing*, 2009, 11(6): 6-13.
- [2] O'BRIEN J T, THOMAS A. Vascular dementia [J]. *Lancet*, 2015, 386(10004): 1698-1706.
- [3] CHEN J, ZHOU S N, ZHANG Y M. Glycosides of cistanche improve learning and memory in the rat model of vascular dementia [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(7): 1234-1240.
- [4] 王冲,华子春.白藜芦醇的免疫调节作用研究进展[J].*中国生化药物杂志*, 2012, 33(1): 84-87.
- [5] BANERJEE S, BUESO RAMOS C, AGGARWAL B B. Suppression of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor kappa-B, cyclooxygenase 2, and matrix metalloproteinase 9 [J]. *Cancer Research*, 2002, 62(17): 4945-4954.
- [6] LIN H Y, SHIH A, DAVIS F B, et al. Resveratrol induced serine phosphorylation of P53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line [J]. *J Urol*, 2002, 168(2): 748-755.
- [7] HATTORI R, OTANI H, MAULIK N, et al. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide [J]. *Am J Physiol Heart CircPhysiol*, 2002, 282: H1988-H1995.
- [8] 刘贵珊,杨博,张泽生,等.白藜芦醇对D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力和脑组织抗氧化能力的影响[J].*食品科学*, 2014, 35(5): 204-207.
- [9] 杨申. P38MAPK抑制剂对血管性痴呆大鼠海马细胞凋亡、Bcl-2、Caspase-3表达及其学习记忆能力的影响[D]. 山东大学, 2013.
- [10] 王俊亚,张冬梅. Morris水迷宫实验的测试方法介绍及注意事项[J]. *现代医药卫生*, 2012, 28(21): 3289-3290.
- [11] 牛文亚. 康体训练联合白藜芦醇干预治疗血管性痴呆大鼠模型的疗效[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 15: 3612-3614.
- [12] 李华钢,饶艳,聂华. 白藜芦醇对脑缺血大鼠突触可塑性的影响[J]. *海南医学*, 2017, 3: 348-352.
- [13] 王景,何超明. 白藜芦醇对星形胶质细胞氧化损伤的保护作用[J]. *医药导报*, 2015, 34(8): 1002-1006.
- [14] WONG H S, KO K M. Herba Cistanches stimulates cellular glutathione redox cycling by reactive oxygen species generated from mitochondrial respiration in H9c2 cardiomyocytes [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(1): 64-73.
- [15] COLE A R, NOBLE W, VAN AALTEN L, et al. Colapsin response mediator protein-2 hyperphosphorylation is an early event in Alzheimer's disease progression [J]. *J Neurochem*, 2007, 103(3): 132-144.

(本文编辑: 禰霏霏)