

继续分化为 Th1、Th2、Th3 和 Th17 细胞,其中 Th1 主要介导细胞免疫和炎症反应;Th2 主要是诱导和促进 B 细胞介导的体液免疫应答。又如: B 细胞根据是否表达 CD5 分子,可分为 B-1 细胞和 B-2 细胞 2 个亚群, B-1 细胞属固有免疫细胞,无需 Th 细胞的辅助,可自发分泌低亲和力 IgM,能与多种不同的抗原表位结合,在免疫应答的早期发挥作用; B-2 细胞是分泌抗体参与体液免疫应答的主要细胞,在抗原刺激和 Th 细胞的辅助下,最终分化为浆细胞,产生高亲和力的抗体,行使体液免疫功能。此外,每个亚群的免疫效应功能与其分泌的细胞因子密切相关。如:Th1 分泌的 IFN- γ 可活化巨噬细胞,增强其杀伤已被吞噬的病原体的能力,还可增强 NK 细胞的杀伤能力;Th2 分泌 IL-4、IL-5 等细胞因子可促进 B 细胞的增殖、分化和抗体的生成^[14]。机体内各细胞亚群及其分泌的细胞因子在免疫应答中相互协作,相互制约,从而维持机体内环境的稳定。因此 CsA 对机体免疫功能的影响及百令胶囊如何发挥免疫调节还要通过免疫器官、免疫细胞、免疫分子乃至基因水平进行不同层次的更进一步的研究。

REFERENCES

- [1] ZHAO X Z, LI L S. Experimental study on the protection of cordyceps sinensis from acute cyclosporine A nephrotoxicity [J]. Chin J Nephrol(中华肾脏病杂志), 1995, 11(1): 23-25, 62-63.
- [2] LIU L J, MA S Y, YUAN B R. The pharmacological action and clinical application of Bailing capsule [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2004, 26(6): 65-68.
- [3] XU H J, LI S Y. Pharmacological action and the research progress in lung diseases of Bailing capsule [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2010, 32(20): 2777-2780.
- [4] ZHANG A H, LIU W H. Damage effects of VEGF on peritoneum [J]. Chin J Blood Purif(中国血液净化), 2006, 5(7): 379-381.
- [5] ZHANG J J, XIE S Y. Meta-analysis of the efficacy of Bailing capsules on primary nephrotic syndrome [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(8): 907-910.
- [6] ZHANG Y J, DAI H F, WANG X S. Clinical observation of Fufanglingni capsule in treating AIDS patients [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm(中国民族医药杂志), 2011, 17(12): 168-170.
- [7] LUAN F L, ZHANG H, SCHAUBEL D E, et al. Comparative risk of impaired glucose metabolism associated with cyclosporine versus tacrolimus in the late posttransplant period [J]. Am J transplant, 2008, 8(9): 1871-1877.
- [8] CHEN J, LI L, WEN J, et al. Observation of efficacy and safety of convening the calcineurin inhibitor to sirolimus in renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy [J]. Transplant Proc, 2008, 40(5): 1411-1415.
- [9] TOMASZEWSKI J J, LARSON J A, SMALDONE M C, et al. Management of bladder cancer following solid organ transplantation [J]. Adv Urol, 2011, 2011: 256985.
- [10] ZENG L, BLAIR E Y, NATH C E, et al. Population pharmacokinetics of mycophenolic acid in children and young people undergoing blood off marrow and solid organ transplantation [J]. Br J Clin Pharmacol, 2010, 70(4): 567-579.
- [11] WANG F, SHI R, ZHAO L. Expression and significance of TGF- β 1 and VEGF in rabbit corneal neovascularization after corneal stitch [J]. Rec Adv Ophthalmol(眼科新进展), 2008, 28(2): 96-99.
- [12] SHANG M H, YUAN W J, ZHANG S J, et al. Intrarenal activation of renin angiotensin system in the development of cyclosporine A induced chronic nephrotoxicity [J]. Chin Med J(Engl), 2008, 121(11): 983-988.
- [13] ATAKAN A, ARIKAN H, MACUNLUOGLU B, et al. Renal protective effect of leukotriene receptor blockers in an experimental model of cyclosporine nephrotoxicity [J]. Transplant Proc, 2008, 40(1): 279-284.
- [14] LIN S Z, XU X Z, TONG H F, et al. Inhibitory effect of emodin on rejection following orthotopic liver transplantation in rats [J]. Chin J Organ Transplant(中华器官移植杂志), 2008, 28(3): 147-149.

收稿日期: 2013-06-09

鹰嘴豆异黄酮提取物对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆能力及其海马内 TNF- α 、IL-6 表达的影响

韩海红¹, 马剑茵² (1.浙江省舟山医院, 浙江 舟山 316021; 2.浙江海洋学院, 浙江 舟山 316022)

摘要: 目的 探讨鹰嘴豆异黄酮提取物(CIE)对阿尔茨海默病(AD)炎症模型大鼠记忆能力的影响,并探讨其可能的作用机制。方法 采用脂多糖右侧海马注射制备 AD 模型,40 只 Wistar 大鼠随机分为 CIE 高、中、低剂量组(100, 50, 25 mg·kg⁻¹)、模型组 and 对照组(生理盐水),灌胃给药 28 d 后,采用 Y-迷宫测试大鼠的学习记忆能力,采用免疫组化法检测大鼠海马内肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和细胞白介素-6(IL-6)的表达。结果 与对照组比较,模型组大鼠学习记忆能力明显下降,尝试次

数均明显增加($P<0.01$), TNF- α 和 IL-6 的表达水平有显著提高($P<0.01$); 经过灌胃给药不同剂量的 CIE 后, 与模型组相比, 大鼠学习记忆的尝试次数和 TNF- α 、IL-6 的表达水平有不同程度的降低, 并呈现一定的剂量依赖性, 特别在中、高剂量组差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 CIE 对 AD 模型大鼠的学习记忆能力有明显的改善作用, 其作用机制可能与抑制模型大鼠海马组织内 TNF- α 和 IL-6 的表达有关, 进而抑制海马神经元的炎症反应。

关键词: 鹰嘴豆异黄酮提取物; 阿尔茨海默病; 肿瘤坏死因子- α ; 细胞白介素-6; 海马

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)06-0689-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.06.012

Effect of Isoflavone Extract from *Cicer arietinum* on Learning Memory Abilities and Expressions of TNF- α and IL-6 in Hippocampus of Alzheimer's Disease Model Rats

HAN Haihong¹, MA Jianyin²(1.Zhoushan Hospital, Zhoushan 316021, China; 2.Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the influence of isoflavone extract from *Cicer arietinum*(CIE) on learning memory abilities of rats with Alzheimer's disease (AD) and discuss the possible mechanism of action. **METHODS** AD model rats were established by injection of lipopolysaccharides into the right hippocampus. Forty rats were allocated into five groups: high, middle and low-dose CIE group (100, 50, 25 mg·kg⁻¹), model group and control group (normal saline). After intragastrically administrated with different solution for 28 d, learning and memory abilities of rats were tested by Y-maze. The levels of TNF- α and IL-6 in rats' hippocampus were detected by immunohistochemistry. **RESULTS** Compared with control group, the learning and memory abilities of model group rats decreased obviously with counts of attempts were significantly increased($P<0.01$). The expressions of TNF- α and IL-6 in model group rats' hippocampus improved significantly($P<0.01$). After intragastrically administrated with different doses of CIE, the counts of attempts in learning and memory ability tests and expressions of TNF- α and IL-6 were lower than these in model group with a slightly dose-dependent manner. Especially in the middle-dose CIE group and high-dose CIE group, the differences were statistically significant ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSION** CIE can significantly improve the learning and memory abilities of AD model rats. Its mechanism may be related to inhibition of the expression of TNF- α and IL-6 in the AD rats' hippocampus to restrain the inflammatory response.

KEY WORDS: isoflavone extract from *Cicer arietinum*; Alzheimer's disease; TNF- α ; IL-6; hippocampus

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种起病隐匿的进行性发展的神经系统退行性疾病, 其病因和发病机制十分复杂。有证据显示^[1], 在 AD 发病初期及病程进展过程中, 海马的形态结构、神经病理会发生一系列的变化, 并在 AD 的发病与发展中具有重要作用。中枢神经系统的炎症反应是 AD 的关键性特征之一, 所涉及的多种炎症细胞因子加速了 AD 的整个病变过程, 因此有研究提出^[2], 抗炎治疗可能延缓神经元退行性病变的速度, 或将有利于缓解 AD 患者的症状。

鹰嘴豆 *Cicer arietinum* L. 属于豆科, 味甘、性平、无毒, 具有补中益气、温肾壮阳、润肺止咳等功效。有研究表明^[3], 鹰嘴豆具有广泛的药理活性, 包括保护心血管、抗肿瘤、调脂等功能, 这与其含有的活性成分异黄酮有着密切的关系, 如芒柄花黄素、鸡豆黄素 A。更有研究显示^[4], 鹰嘴豆异黄酮提取物(*Cicer arietinum* isoflavone extract, CIE)可改善 D-半乳糖衰老模型小鼠的学习记忆能力, 其作用机制与其抗氧化能力有关。

而 CIE 是否能够通过影响 AD 病程的炎症反应及炎症因子的表达, 从而缓解 AD 的症状, 国内外文献未见报道。本实验旨在观察 CIE 对 AD 模型大鼠学习记忆能力的影响, 并探讨其可能的机制, 为抗 AD 的药物研发提供实验依据和新的研究思路。

1 材料

1.1 动物

成年 Wistar 大鼠 40 只, ♂, 购自上海斯莱克实验动物有限公司, 合格证号: SCXK(沪)2012-0002, 清洁级, 体质量 200~250 g。

1.2 药品、试剂与仪器

CIE 为自行制备^[5], 紫外分光光度法测得异黄酮含量为 39.0%; 脂多糖(Sigma 公司, 批号: B5-L2880), 用生理盐水配成 5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的溶液; TNF- α (批号: 20130917)、IL-6(批号: 20131025)、非结合多克隆兔抗体(批号: 20131025)、S-P 试剂盒(批号: 20130818)及 DAB 显色试剂盒(批号: 20120320)均购自武汉博士德生物工程有限公司; UV-3100 紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有

限公司); MG-B 型 Y-迷宫刺激器(张家港三兴教学仪器厂); 大鼠脑立体定位仪(美国 Stoelting 公司); JD801 图像分析仪(江苏捷达科技公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药

将 Wistar 大鼠, ♂, 随机分为 5 组: CIE 高、中、低剂量组(100, 50, 25 mg·kg⁻¹)、模型组和对照组, 每组 8 只, 安静清洁环境下 4 只一笼饲养, 温度控制在(25±1)℃, 相对湿度 60%, 正常饮食。造模手术后第 2 天开始, 各试验组均灌胃给药进行干预, 每日 1 次, 模型组和对照组给予等量的生理盐水。

2.2 模型制备

采用 2%戊巴比妥钠(40~50 mg·kg⁻¹)腹腔注射对大鼠进行麻醉, 将其固定于脑立体定位仪上, 剪去顶部毛发, 碘酊消毒后切开皮肤, 参照《大鼠脑立体定位图谱》^[6]选择右侧侧脑室为注射靶区, 于前囟后 1.0 mm, 中线旁开 1.6 mm 处, 用柔性颅骨钻钻开颅骨, 暴露硬脑膜, 用微量注射器缓慢自脑表面垂直进针 3.4 mm, 将 5 μg·μL⁻¹ 的脂多糖溶液缓慢注入, 2 min 后将注射针缓慢抽出, 用骨蜡封住钻孔, 缝合切口。对照组注射等量的生理盐水。

2.3 Y-迷宫学习记忆能力测试

大鼠连续灌胃给药 28 d 后, 采用 Y-型迷宫测试大鼠的学习记忆能力。实验分 2 次进行, 每次测试固定在上 8: 00~12: 00, 测试环境应保持安静, 避光。第 1 次为学习能力测试: 训练前, 将大鼠放入 Y-迷宫自由活动适应 5 min, 适应后将 I 臂作为安全臂, II、III 臂给予 60 V, 0.5~0.7 mA 的电刺激, 持续 2 s, 以大鼠被电击后一次性逃离至安全臂为正确反应, 否则判定为错误反应。之后的训练将安全臂作为起始臂, 将大鼠放置于安全臂 1 min 加强记忆, 安全臂按照 I→II→III→I 的顺序依次改变, 其他臂再次给予电刺激, 依次类推, 以测试达到连续 10 次中有 9 次正确反应所需的电击次数作为评价大鼠学习能力的指标。第 2 次为记忆能力测试: 学习能力测试后 48 h 后, 以同样的方法测试, 以测试达到连续 10 次中有 9 次正确反应所需的电击次数作为评价大鼠记忆能力的指标。

2.4 取材方法和样品制备

在 Y-型迷宫学习记忆能力测试后, 用 2%戊巴

比妥钠(40~50 mg·kg⁻¹)腹腔注射对大鼠进行麻醉, 麻醉后剪开胸腔, 使心脏暴露, 将灌流针从大鼠的左心室插入至升主动脉, 剪开右心耳, 并同时快速灌注 37℃ 的生理盐水至流出液清亮, 然后用 4%多聚甲醛溶液灌注固定 1 h。灌注结束后迅速端头取脑, 去除嗅球和小脑, 将组织放入 4%多聚甲醛溶液中进行后固定 6 h。固定后修脑, 取包含海马组织的脑区经梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋后, 切片备用, 厚度为 4 μm。

2.5 大鼠海马内 TNF-α 和 IL-6 表达的检测

大鼠海马内 TNF-α 和 IL-6 表达的检测, 按照博士德生物工程有限公司提供的免疫组化试剂盒说明书进行操作。切片制作完成后, 每张切片随机观察 5 个高倍视野下的海马区域, 根据 TNF-α 和 IL-6 蛋白的表达, 利用生物医学图像分析系统对视野进行灰度值测定并记录结果

2.6 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析。2 组间的比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析及 Dunnett's 检验。

3 结果

3.1 CIE 对 AD 模型大鼠 Y-迷宫学习记忆能力的影响

在学习能力测试中, 与对照组相比, 模型组大鼠所需要的尝试次数明显增加($P<0.01$), 说明造模成功的 AD 大鼠学习能力降低。而灌胃给予不同剂量的 CIE 后, 尝试次数均有所下降, 并呈现一定的剂量依赖性, 中、高剂量组的差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。同样在记忆能力测试中, 模型组大鼠所需的尝试次数明显高于对照组($P<0.01$), 与模型组比较, 不同剂量 CIE 组的尝试次数均有所下降, 50 和 100 mg·kg⁻¹ 剂量组的差异具有统计学意义($P<0.01$), 且具有一定的剂量相关性。结果见表 1。

3.2 CIE 对 AD 模型大鼠海马内 TNF-α 和 IL-6 表达水平的影响

经图像分析系统测试显示, 模型组大鼠海马内 TNF-α 和 IL-6 的平均灰度值显著低于对照组($P<0.01$), 提示模型组大鼠海马内 TNF-α 和 IL-6 的表达呈现强阳性; CIE 各剂量组 TNF-α 和 IL-6 的平均灰度值相对于模型组有一定的提高, 说明 TNF-α 和 IL-6 的表达降低, 且差异在 CIE 中、高剂量组中具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结

果见表 2。

表 1 CIE 对各组大鼠学习记忆能力的影响($n=8$, $\bar{x} \pm s$)
Tab 1 Effect of CIE on learning and memory abilities of rats($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	学习能力/IOD	记忆能力/IOD
对照组	19.0±3.4	13.8±3.1
模型组	45.5±3.5 ¹⁾	36.4±3.0 ¹⁾
CIE 低剂量组	44.9±3.4	32.5±3.5
CIE 中剂量组	40.4±3.3 ²⁾	28.3±3.8 ³⁾
CIE 高剂量组	28.1±3.9 ³⁾	19.5±3.4 ³⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$
Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

表 2 各组大鼠海马内 TNF- α 和 IL-6 的平均灰度值($n=8$, $\bar{x} \pm s$)
Tab 2 Mean OD value of TNF- α and IL-6 in hippocampus of rats ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	IL-6
对照组	185.74±11.81	187.81±11.90
模型组	146.36±12.00 ¹⁾	141.58±110.62 ¹⁾
CIE 低剂量组	148.41±10.69	144.34±11.91
CIE 中剂量组	161.58±9.94 ²⁾	159.23±11.32 ²⁾
CIE 高剂量组	174.23±9.33 ³⁾	170.49±10.74 ³⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$
Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$

4 讨论

AD 发病机制虽然复杂,但目前学界公认炎症反应在 AD 的发病过程中起着重要的作用^[7]。有国外研究显示,大量 TNF- α 等炎症细胞因子会存在 AD 的神经病例过程中,异常高度表达的 TNF- α 提示其可能与 AD 的发病有关^[8]。IL-6 是一种炎症性细胞因子,处于 AD 中枢神经系统炎症反应的中心位置,参与 AD 患者炎症级联反应的形成。Sokolova 等^[9]通过大量试验表明,IL-6 在 AD 患者脑组织中呈显著上调趋势,认为 IL-6 具有神经毒性作用,参与 AD 的发病过程。与对照组相比,本研究中的模型组大鼠学习记忆的尝试次数明显增加($P<0.01$),海马内 TNF- α 和 IL-6 的平均灰度值显著降低($P<0.01$),提示表达呈现强阳性,说明 AD 模型大鼠学习记忆能力显著降低,中枢神经系统炎症反应明显,进一步证明了该模型的可靠,可以用于炎症反应介导的 AD 研究。

鹰嘴豆由于富含具有较强抗氧化活性的异黄酮类化合物,近几年成为天然抗氧化剂开发的研究热点。有研究表明^[4],CIE 可能通过抗氧化机制

改善 D-半乳糖致衰老模型小鼠的学习记忆能力,而氧化应激不仅直接参与了 AD 的发病机制,更重要的是通过其连接中介效应放大了 AD 神经炎症病变的发生^[10]。本研究结果显示,CIE 各剂量组 TNF- α 和 IL-6 的平均灰度值相对于模型组有一定的提高,提示海马内 TNF- α 和 IL-6 的表达降低,并呈现一定的剂量依赖性,且差异在 CIE 中、高剂量组中具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。说明 CIE 对海马组织神经胶质细胞的活化增生及 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的产生有一定的抑制作用,在一定程度上阻断了 AD 模型大鼠海马内的炎症损伤,而产生一定的保护作用。然而,CIE 是通过何种机制和通路对 TNF- α 、IL-6 等炎症因子起到精准调控,需要进一步地深入研究和探讨。

总之,CIE 对 AD 模型大鼠学习记忆障碍有一定的改善作用,其作用机制可能与抑制大鼠海马组织内 TNF- α 和 IL-6 的表达有关,并进而抑制海马神经元的炎症反应。

REFERENCES

- [1] ZHENG X Z, MA G Y. The pathological changes of hippocampus and Alzheimer disease [J]. Nerv Dis Mental Health(神经疾病与精神卫生), 2002, 2(1): 53-55.
- [2] GUAN J, LI H, LIU J G. Recent advance in inflammatory reaction and anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease [J]. Chin J Neuromed(中华神经医学杂志), 2012, 11(12): 1282-1285.
- [3] SALONIEMI H, WÄHÄLÄ K, NYKÄNEN-KURKI P, et al. Phytoestrogen content and estrogenic effect of legume fodder [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1995, 208(1): 13-17.
- [4] ZHU P H. Effect of isoflavone extract from *Cicer arietinum* on learning and memory abilities in senile mice induced by D-galactose [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2011, 42(5): 969-971.
- [5] ZHOU J J, ZHAO S H, GAO P, et al. Extraction technics of the total isoflavone from chickpea [J]. Food Res Dev(食品研究与开发), 2009, 30(12): 8-12.
- [6] GEORGE P, CHARLES W. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates [M]. 6th Revised Ed. Academic Press Inc, 2005: 6.
- [7] QI K, DU Y F. Advances in research on the role of inflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Chin J Neuroimmunol Neurol(中国神经免疫学和神经病学杂志), 2013, 20(4): 278-280.
- [8] SHEPHERD CE, THIEL E, MCCANN H, et al. Cortical inflammation in Alzheimer disease but not dementia with Lewy bodies [J]. Arch Neurol, 2000, 57(6): 817.
- [9] SOKOLOVA A, HILL M D, RAHIMI F, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 plays a dominant role in the chronic inflammation observed in Alzheimer's disease [J]. Brain Pathol, 2009, 19(3): 392-398.
- [10] CAI Z Y, YAN Y, WU F, et al. Microglia inflammation and Alzheimer's disease [J]. Chongqing Med(重庆医学), 2008, 37(7): 735-737.

收稿日期: 2013-10-08