



# 初步探讨鸟嘌呤核苷、姜黄素对 AD 双转基因小鼠学习记忆的影响

樊惠, 冯慧利, 党惠子, 陈晓培, 任映, 杨金铎, 王蓬文

(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;  
北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部和北京市重点实验室, 北京 100700)

**【摘要】** 目的 通过 Morris 水迷宫检测学习记忆和记忆保持能力, 判断鸟嘌呤核苷、姜黄素对 4 月龄 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> 双转基因小鼠认知功能的影响。方法 将 3 月龄 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> 双转基因小鼠随机分为模型组、盐酸多奈哌齐组 0.92 mg/(kg·d)、鸟嘌呤核苷组 20 mg/(kg·d)、姜黄素组 200 mg/(kg·d)、姜黄素 200 mg/(kg·d) 和鸟嘌呤核苷组 20 mg/(kg·d), 每组 12 只; 并以同月龄野生型 C57/BL6J 小鼠作对照。每天给药 1 次, 连续给药 1 个月。应用 Morris 水迷宫进行行为学检测。结果 鸟嘌呤核苷、姜黄素对空间探索、定位航行障碍有改善作用, 尤其以姜黄素组明显。结论 鸟嘌呤核苷、姜黄素能改善 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> 双转基因小鼠的早期出现的认知障碍。

**【关键词】** 鸟嘌呤核苷; 姜黄素; APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> 双转基因小鼠; 行为学

**【中图分类号】** Q95-33, R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0032-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.007

## Preliminary discussion on the effects of guanosine, curcumin on learning and memory in AD double transgenic mice

FAN hui, FENG Hui-li, DANG Hui-zi, CHEN Xiao-pei, REN Ying, YANG Jin-duo, WANG Peng-wen

(Laboratory of Pharmacology of Dongzhimen Hospital affiliated to BUCM, Tertiary Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine; Key Laboratory of Internal Medicine of Traditional Chinese Medicine under Ministry of Education and Key Laboratory of Beijing, Dongzhimen Hospital affiliated to BUCM, Beijing 100700, China)

**【Abstract】 Objective** Using Morris water maze test to evaluate the effects of guanosine and curcumin on cognitive function of APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> double transgenic mice. **Methods** 3-month old APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> dtg mice were randomly divided into model group, donepezil HCL group, guanosine group, curcumin group, curcumin and guanosine group (n = 12), with age-matched Wild C57BL/6J mice of the same genetic background as normal control group. Medication was given once a day for 1 month. Using Morris water maze to test the spatial learning and memory ability of mice. **Results** Guanosine and curcumin could improve spatial learning and memory disorders of AD mice, particularly in the group of curcumin. **Conclusion** Guanosine and curcumin improve the cognitive ability of APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> double transgenic mice with early cognitive impairment.

**【Key words】** Guanosine; Curcumin; APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> double transgenic mice; Ethology

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是痴呆最常见的类型,也是导致老年人群发病和死亡的主要原因之一。2005 年全世界 AD 发病人数已

高达 2430 万,并且还在以每年 460 万的速度增加,预计到 2040 年将会达到 8110 万,且绝大多数发生在发展中国家(约占 70%)<sup>[1]</sup>。AD 发病最大

[基金项目]国家自然科学基金面上资助项目(No. 81073076);教育部高等学校创新团队(IRT0810)。

[作者简介]樊惠(1989-),女,在读硕士,神经变性病的中医药防治。E-mail: 1881505930@163.com

[通讯作者]王蓬文,博士生导师。E-mail: pw\_wang@163.com

的危险因素是年龄<sup>[2]</sup>,随着各国人口老龄化,AD 引发的医疗和社会经济负担在未来几十年会逐年攀升,目前对 AD 的治疗药物多为对症治疗,急需开发针对病因、早期阻断 AD 发展的更有效的治疗药物(disease-modifying drugs)。研究表明鸟嘌呤核苷具有神经营养和神经保护作用,包括星形胶质细胞增生,促进轴突的生长,增加合成和释放神经/多效蛋白如神经生长因子、TGF- $\beta$  和基本成纤维细胞生长因子<sup>[3,4]</sup>。因此,鸟苷可能在神经炎性/神经变性疾病,特别是 AD 的治疗中是一种极具疗效的潜在药物。

本研究采用动物模型为 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> 双转基因小鼠,该模型是国际公认的研究 AD 的基因修饰模型,该模型的特点是短期内产生大量的 A $\beta$ ,发生拟 AD 的病理改变,研究表明 3.5 月龄的 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> 双转基因小鼠出现空间记忆障碍,伴有明显降低乙酰胆碱、胆碱乙酰转移酶,超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶<sup>[5]</sup>。以胆碱酯酶抑制剂盐酸多奈哌齐为阳性对照,同时选用以往课题证明对神经有保护作用的姜黄素为中药治疗组<sup>[6]</sup>,通过水迷宫检测行为学改变,观察鸟嘌呤核苷和姜黄素对小鼠行为学影响,初步探讨鸟嘌呤核苷、姜黄素对 AD 早期学习记忆的影响,为探寻防治 AD 的潜在靶标提供实验和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂与仪器

姜黄素<sup>[6]</sup>;盐酸多奈哌齐为卫材药业有限公司制造,中国,批号 H20050978;鸟嘌呤核苷为 Sigma-Aldrich 公司产品,批号 G6264;羧甲基纤维素钠(carboxymethyl cellulose, CMC)为北京精求化工有限责任公司,批号为 3405005。MD-021 小鼠 Morris 水迷宫,上海移码数字有限公司(中国)。

#### 1.1.2 实验动物

SPF 级 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> 双转基因小鼠 60 只和 C57/BL6J 小鼠 12 只,均为 3 月龄雄性小鼠,体重 25~30 g。均购自中国医学科学院动物研究所[SCXK(京)2009-0004],于北京中医药大学东直门医院屏障环境动物室[SYXK(京)2009-0028]饲养。所有动物在实验中自由摄食和饮水。实验操作程序均通过东直门医院实验动物伦理委员会和使用管理委员会批准(批准号为 2013-09)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分组和给药

随机将 3 月龄 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> 双转基因小鼠分为模型组、盐酸多奈哌齐组、鸟嘌呤核苷组、姜黄素组、姜黄素鸟苷组,每组 12 只,每天给药 1 次,连续给药 1 个月。盐酸多奈哌齐组,盐酸多奈哌齐 0.92 mg/(kg·d)灌胃和等体积的生理盐水腹腔注射;鸟嘌呤核苷组,鸟嘌呤核苷 20 mg/(kg·d)腹腔注射和等体积的 0.5% CMC 灌胃;姜黄素组,姜黄素 200 mg/(kg·d)灌胃和等体积的生理盐水腹腔注射;姜黄素鸟苷组,鸟嘌呤核苷 20 mg/(kg·d)腹腔注射和姜黄素 200 mg/(kg·d)灌胃;选用同月龄 C57/BL6J 小鼠为正常对照组,该组和模型组给予等体积 0.5% 灌胃和等体积生理盐水腹腔注射。

#### 1.2.2 Morris 水迷宫测试

Morris 水迷宫检测小鼠的定位航行和空间搜索等学习记忆和记忆保持能力<sup>[6]</sup>。

### 1.3 统计学分析

统计分析采用统计软件 SPSS 15.0 进行,统计结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示,游泳距离组间比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA),多重比较用最小显著差异法(LSD 法)。游泳时间及穿台次数运用非参数检验 Kruskal-Wallis Test,组间比较采用 Mann-Whitney Test。以  $P < 0.05$  有统计学意义,  $P < 0.01$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 鸟嘌呤核苷、姜黄素对 4 月龄 AD 小鼠定位航行能力的影响

随训练次数增加,各组小鼠的逃避潜伏期中间有波动,但整体呈下降趋势。第 4 天,与模型组相比,正常对照组小鼠逃避潜伏期明显缩短( $P < 0.01$ );治疗组与模型组小鼠相比逃避潜伏期相比减短( $P < 0.05$ )。第 5 天,与正常对照组相比,模型组小鼠逃避潜伏期明显减短( $P < 0.01$ ),模型组小鼠逃避潜伏期与姜黄素组、姜黄素鸟苷组相比延长( $P < 0.05$ )(表 1)。

### 2.2 鸟嘌呤核苷、姜黄素对 4 月龄 AD 小鼠空间探索能力的影响

随着训练时间的延长,各组小鼠的游泳距离而有所减少,中间略有的波动。第 3 天,模型组游泳距离比正常组明显延长( $P < 0.01$ ),治疗各组游泳距离比模型组有所减少( $P < 0.05$ ),而姜黄素鸟苷组

游泳距离则明显减少 ( $P < 0.01$ )。第 4、5 天, 模型组游泳距离比正常组均明显延长 ( $P < 0.01$ ), 姜黄素组、姜黄素鸟苷与模型组相比, 游泳距离均减少 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

表 1 鸟嘌呤核苷、姜黄素对 4 月龄 AD 小鼠逃避潜伏期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Tab. 1 Effect of guanosine and curcumin on the escape latency in the AD mice

分组 Groups	第 1 天 Day 1	第 2 天 Day 2	第 3 天 Day 3	第 4 天 Day 4	第 5 天 Day 5
正常组 Normal group	82.16 ± 48.34	73.58 ± 43.47	85.67 ± 40.87	44.62 ± 39.19 <sup>△△</sup>	48.22 ± 46.89 <sup>△△</sup>
模型组 Model group	97.58 ± 41.35	113.78 ± 14.78	107.45 ± 25.08	107.08 ± 26.67 <sup>**</sup>	97.41 ± 41.75 <sup>**</sup>
盐酸多奈哌齐组 Donepezil HCL group	98.33 ± 39.55	102.25 ± 34.88	70.16 ± 52.47	71.50 ± 47.07 <sup>△</sup>	71.11 ± 42.41
鸟苷组 Guanosine group	109.64 ± 31.16	94.28 ± 40.47	75.00 ± 55.66	78.69 ± 40.40 <sup>△</sup>	63.02 ± 37.71
姜黄素组 Curcumin group	97.25 ± 43.37	94.95 ± 33.84	65.95 ± 49.27	59.23 ± 44.10 <sup>△</sup>	61.69 ± 43.14 <sup>△</sup>
姜黄鸟苷组 Curcumin + guanosine group	100.40 ± 40.04	87.33 ± 36.36	86.15 ± 45.08	71.16 ± 45.24 <sup>△</sup>	54.51 ± 45.43 <sup>△</sup>

注: 与正常组比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比, <sup>△</sup>  $P < 0.05$ , <sup>△△</sup>  $P < 0.01$ 。

Note: compare with the normal group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; compare with the model group, <sup>△</sup>  $P < 0.05$ , <sup>△△</sup>  $P < 0.01$ 。

表 2 鸟嘌呤核苷、姜黄素对 4 月龄 AD 小鼠空间探索能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Tab. 2 Effects of guanosine and curcumin on the spatial memory ability in four months old AD mice

组别 Group	第 1 天/cm Day 1	第 2 天/cm Day 2	第 3 天/cm Day 3	第 4 天/cm Day 4	第 5 天/cm Day 5
正常组 Normal group	1171.25 ± 632.36	799.55 ± 601.79	796.77 ± 346.19 <sup>△△</sup>	574.29 ± 330.85 <sup>△△</sup>	566.09 ± 448.95 <sup>△△</sup>
模型组 Model group	1319.74 ± 593.21	1109.61 ± 505.87	1276.97 ± 385.57 <sup>**</sup>	1225.73 ± 474.58 <sup>**</sup>	1186.59 ± 532.92 <sup>**</sup>
盐酸多奈哌齐组 Donepezil HCL group	1259.83 ± 446.40	770.30 ± 563.44	938.52 ± 296.83 <sup>△</sup>	865.64 ± 474.83	1005.69 ± 451.08
鸟苷组 Guanosine group	1204.68 ± 497.41	846.90 ± 651.96	960.27 ± 452.04 <sup>△</sup>	928.43 ± 243.79	1068.05 ± 492.59
姜黄素组 Curcumin group	1277.82 ± 471.35	1058.93 ± 744.48	971.04 ± 294.39 <sup>△</sup>	818.68 ± 523.49 <sup>△</sup>	764.99 ± 78.73 <sup>△</sup>
姜黄鸟苷组 Curcumin + guanosine group	1405.55 ± 607.46	1168.09 ± 514.58	863.36 ± 347.50 <sup>△△</sup>	844.43 ± 551.13 <sup>△</sup>	779.72 ± 464.32 <sup>△</sup>

注: 同表 1

Note: the same as table one

### 2.3 鸟嘌呤核苷、姜黄素对 AD 双转基因小鼠空间学习记忆和记忆保持能力的影响

撤台实验小鼠穿越平台次数: 与正常对照组比, 模型组小鼠 120 s 内穿越平台次数显著减少 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比, 鸟苷组、盐酸多奈哌齐组、姜黄

素鸟苷组穿越平台次数有所增加 ( $P < 0.05$ ), 姜黄素组则显著增加 ( $P < 0.01$ )。撤台后小鼠的目标象限停留时间结果与穿越平台次数基本一致 (表 3)。

表 3 鸟嘌呤核苷、姜黄素对 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> 双转基因小鼠穿越平台次数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Tab. 3 Effect of guanosine and curcumin on transversing frequency of APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> dtg mice

组别 Group	剂量/ mg/(kg·d) Dose	目标象限停留时间/s Retention time in target quadrant	穿越平台次数 Frequency of transversing platform
正常组 Normal group	-	28.58 ± 8.58 <sup>△△</sup>	4.33 ± 3.60 <sup>△△</sup>
模型组 Model group	-	16.83 ± 6.93 <sup>**</sup>	0.58 ± 0.79 <sup>**</sup>
盐酸多奈哌齐组 Donepezil HCL group	-	25.24 ± 10.13 <sup>△</sup>	1.75 ± 1.36 <sup>△</sup>
鸟苷组 Guanosine group	20	26.95 ± 13.40 <sup>△</sup>	3.08 ± 2.47 <sup>△</sup>
姜黄素组 Curcumin group	200	28.40 ± 11.75 <sup>△△</sup>	3.25 ± 4.03 <sup>△</sup>
姜黄鸟苷组 Curcumin + guanosine group	-	25.51 ± 8.69 <sup>△</sup>	1.92 ± 1.78 <sup>△</sup>

注: 同表 1

Note: the same as table one

## 3 讨论

鸟苷 (guanosine) 是核苷的一种, 是由鸟嘌呤与核糖 (呋喃核糖) 环组成。鸟苷经过磷酸化之后可变成鸟苷单磷酸 (GMP)、环鸟苷单磷酸 (cGMP)、鸟苷双磷酸 (GDP) 或鸟苷三磷酸 (GTP)。若鸟苷与脱氧核糖相连, 则会产生脱氧鸟苷。鸟苷的用途十分

广泛, 磷酸化产物可以作为激素的第 2 信使, 在细胞内发挥激素调节生理机能和物质代谢作用, 能改变细胞膜的功能, 对糖、脂肪代谢、核酸、蛋白质的合成调节等起着重要的作用。鸟嘌呤核苷是一种分布在大脑细胞外的嘌呤核苷, 在生理和病理条件其浓度甚至高于其有较多认识的同类嘌呤核苷—腺苷。我们实验结果显示, 结果显示, 对 AD 双转基因小鼠出

现的学习记忆障碍,鸟嘌呤核苷有改善作用, A $\beta$  除了是 AD 的致病因素,正常情况下它们在大脑中也会少量的产生,一些证据表明它们可以调节突触可塑性和记忆功能<sup>[7]</sup>。有研究证实在用 A $\beta$ 42 处理的人成神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞中,鸟苷能明显降低 A $\beta$ 42 引起的早期氧化反应物的形成,也能够抑制细胞内外的 A $\beta$ 42 的释放和抑制  $\beta$  分泌酶的活性<sup>[8]</sup>,体外实验证实鸟嘌呤核苷保护大鼠星形胶质细胞,抵抗星形孢菌素诱导的细胞星形胶质细胞凋亡和对抗  $\beta$ -淀粉样蛋白诱导 SH-SY5Y 细胞的凋亡,在这两种情况下,鸟嘌呤核苷的抗凋亡作用是由磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/Akt 蛋白和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)细胞的生存通路介导的<sup>[9]</sup>。

姜黄素是从中药姜黄、郁金等根茎中提取的多酚色素。研究表明姜黄素可以有效地预防和改善认知功能障碍,与它抗氧化、抗炎并调节胆碱能系统等作用有关<sup>[10]</sup>,作为一种天然的抗氧化剂,其含有的酚性羟基可以直接捕获或清除 A $\beta$  产生的自由基,还可通过超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物等抗氧化酶介导发挥抗氧化作用。体外研究表明,姜黄素抑制脑小胶质细胞的炎症反应,抑制 A $\beta$  寡聚体的形成和缠结,体内研究表明,姜黄素可以逆转 A $\beta$  造成神经炎症反应<sup>[11]</sup>。我们以往的研究表明,姜黄素治疗 3 个月或 6 个月可以通过改善突触结构、增加 A $\beta$  降解酶 NEP 和 IDE 的表达,改善胰岛素信号转导(PI-3-K/Akt 通路)和突触后膜相关蛋白进而改善 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> 双转基因小鼠的学习记忆能力<sup>[12-14]</sup>。本实验进一步探讨姜黄素灌胃治疗 1 个月即可早期改善 AD 小鼠的学习记忆和记忆保持能力。

如上所述鸟嘌呤核苷和姜黄素同样可以通过降低 A $\beta$  和作用于 PI3K/Akt 通路发挥神经保护作用,本次实验设计观察二者叠加是否会出现协同作用,结果短期协同作用并不明显,原因不明,考虑是否与  $\beta$  分泌酶量和通路受体结合量等因素有关。实验选用临床治疗 AD 广泛应用的可逆的高度选择性乙酰胆碱酯酶抑制剂盐酸多奈哌齐为阳性对照,结果显示,单独应用鸟嘌呤核苷、姜黄素以及两者联合均可改善 AD 小鼠的认知,尤其是姜黄素单独使用作用明显,与盐酸多奈哌齐相比无显著差异,由此得出鸟嘌呤核苷和姜黄素虽改善 AD 小鼠空间探索和记忆保持能力,从而改善 AD 小鼠的学习记忆能力,作用机制有待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Cleusa P Ferri, Martin Prince, Carol Brayne, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study[J]. Lancet, 2005, 366 (9503): 2112 - 2117.
- [ 2 ] Appleby BS, Cummings JL. Discovering New Treatments for Alzheimer's disease by repurposing approved medications[J]. Curr Top Med Chem, 2013, 13(18): 2306 - 2327.
- [ 3 ] Frizzo ME, Lara DR, Dahm KC, et al. Activation of glutamate uptake by guanosine in primary astrocyte cultures[J]. Neuroreport, 2001, 12(4): 879 - 881.
- [ 4 ] D'Alimonte I, Flati V, D'Auro M, et al. Guanosine inhibits CD40 receptor expression and function induced by cytokines and beta amyloid in mouse microglia cells[J]. J Immunol, 2007, 178(2): 720 - 731.
- [ 5 ] Zhang W, Bai M, Xi Y, et al. Early memory deficits precede plaque deposition in APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice: involvement of oxidative stress and cholinergic dysfunction[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(8): 1443 - 1452.
- [ 6 ] 樊惠,魏鹏,陈晓培,等. 姜黄素对 9 月龄 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> 双转基因小鼠行为学的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(6): 33 - 37.
- [ 7 ] Townsend M, Shankar GM, Mehta T, et al. Effects of secreted oligomers of amyloid beta2protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers[J]. J Physiol, 2006, 572 (pt2): 477 - 492.
- [ 8 ] Tarozzi A, Merlicco A, Morroni F, et al. Guanosine protects human neuroblastoma cells from oxidative stress and toxicity induced by Amyloid-beta peptide oligomers[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2010, 24(3): 297 - 306.
- [ 9 ] Pettifer KM, Kleywegt S, Bau CJ, et al. Guanosine protects SH-SY5Y neuroblastoma cells against  $\beta$ -amyloid-induced apoptosis[J]. Neuroreport, 2004, 15(5): 833 - 836.
- [ 10 ] Ishrat T, Hoda MN, Khan MB, et al. Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT)[J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2009, 19(9): 636 - 647.
- [ 11 ] Davinelli S, Sapere N, Zella D, et al. Pleiotropic protective effects of phytochemicals in Alzheimer's disease[Published online]. Oxid Med Cell Longev, 2012, 2012: 386527.
- [ 12 ] 樊惠,魏鹏,陈晓培,等. 姜黄素对 9 月龄 AD 模型双转基因小鼠海马超微结构的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(9): 608 - 611.
- [ 13 ] 党惠子,李瑞晟,王虹,等. 姜黄素对 APP/PS1 双转基因小鼠海马 AKT 及 p-AKT 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 64 - 68.
- [ 14 ] 王蓬文,李瑞晟,王虹,等. 姜黄素对 APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> 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 - 371.

[收稿日期] 2013-10-12