

· 研究论文 ·

短期高脂饮食缓解冈田酸诱导的大鼠认知功能损伤

朱天碧^{1,2}, 张 钊², 罗 飘^{1,2}, 楚世峰², 陈乃宏^{1,2*}

(1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208;

2. 中国医学科学院, 北京协和医学院药物研究所 神经科学中心, 北京 100050)

摘要: 观察短期高脂饮食对阿尔茨海默病模型鼠认知功能损伤的影响及相关机制。建立阿尔茨海默病模型并给予高脂饮食喂养后, 对大鼠进行水迷宫 (Morris water maze, MWM) 行为学实验检测动物的学习记忆能力。取材后对海马切片进行尼氏染色检测神经元损伤, Western blot 检测 NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) 和 caspase-1 通路的表达。水迷宫结果表明短期高脂饮食能缓解冈田酸造成认知功能损伤, 海马病理检测表明短期高脂饮食可能通过调节 NLRP3 及 caspase-1 信号通路缓解对神经元的损伤, 发挥了神经保护功能。

关键词: 阿尔茨海默病; 冈田酸; 高脂饮食; 神经保护; 炎性小体

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 03-0383-05

Short term high-fat diet feeding alleviates the cognitive impairment induced by okada acid injection in rats

ZHU Tian-bi^{1,2}, ZHANG Zhao², LUO Piao^{1,2}, CHU Shi-feng², CHEN Nai-hong^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Neuroscience Center, Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract: This study was designed to test the effect of short-term high-fat diet feeding on the cognitive impairment in a rat model of Alzheimer's disease. After establishment of Alzheimer's disease model, the rats were fed on a high-fat diet, and subjected to water maze (Morris water maze, MWM) behavioral test for learning and memory ability. Western blot was used to detect the expression of caspase-1 pathway. The results showed that short-term high-fat diet could alleviate the damage of okada acid in Morris water maze. The mechanism may be mediated by the regulation of the NLRP3/caspase-1 signaling pathway, which alleviates neuronal damage, resulting in a protective effect.

Key words: Alzheimer's disease; okada acid; high fat diet; neuroprotection; inflammasome

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种严重的中枢神经系统退行性疾病, 主要临床表现为进行性的认知功能减退。神经病理学特征主要包括淀

粉样蛋白 (β -amyloid protein, A β)^[1-3]沉积形成的细胞外老年斑 (senile plaque, SP), Tau 蛋白过度磷酸化^[4]形成的神经细胞内神经原纤维缠结、神经元丢失及伴随的胶质细胞增生等^[5, 6]。有文献表明, 注射冈田酸 (okada acid, OKA) 到啮齿动物的大脑会引起 Tau 蛋白磷酸化, 导致认知缺陷。说明 OKA 可用作实验工具研究神经变性的机制和探究阿尔茨海默病的病理研究靶标, 并可用于临床药物的开发^[7]。

收稿日期: 2017-10-16; 修回日期: 2017-11-20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603316); 2017 年湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心开放基金资助项目 (BG201701); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助项目 (2016-I2M-1-004).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165177, E-mail: chennh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-1009

除脂肪组织外, 人体脂肪在中枢神经系统 (central

nervous system, CNS) 内的含量最高。在 CNS 中, 脂肪并不存储于脂肪组织中, 而是通过脂肪酸组成髓鞘层, 继而包绕脑与脊髓内的轴索。CNS 来源的脂肪因子可以由不同脑区内的非脂肪细胞类型与核团生成, 如调节饮食行为的下丘脑弓状核。以往有关痴呆的研究认为神经退行性病变与血管病变进程能够影响多个脑区及核团, 在此病程中脂肪因子可能通过激活胶质细胞等加重炎症反应, 进而加剧神经退行性病变进程^[8, 9]。然而近年来, 关于高脂饮食与 AD 的研究对此类结果产生质疑^[10]。在柳叶刀近期报道的^[11, 12]一项历时 10 年、由超过 13.5 万名受试者参与的大型流行病学研究结果中指出, 与脂肪摄入量较低、主要通过碳水化合物获取能量的人群相比, 适当提高脂肪摄入量, 不仅没有增加心血管疾病的患病风险, 反而降低了总死亡率, 颠覆了以往的高脂饮食对心血管疾病的损伤论断, 提示高脂饮食是否真的对脑神经系统造成损伤作用。基于此, 本文探究短期内的高脂饮食对冈田酸所致脑认知功能损伤的影响并检测其可能的生物学机制, 为阿尔茨海默病的日常预防及辅助治疗提供理论和实验依据。

材料与方 法

实验动物 雄性 SD 大鼠, 体重 200~220 g。北京维通利华实验技术有限公司购买 (合格证号 11400700223216)。

药品与试剂 脂肪供能比为 60% 的高脂纯化饲料 (H10060), 购自北京华阜康生物科技股份有限公司; BCA 法蛋白浓度测定试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司); OKA (78111-17-8, Sigma 公司); TAU 抗体 (ab64193)、p-tau (S396) 抗体 (ab32057), 购自 Abcam 公司; 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteiny l aspartate specific proteinase, caspase)-1 抗体 (22915-1-AP)、NLRP3 抗体 (19771-1-AP), 购自 Proteintech 公司。

阿尔茨海默病动物模型建立 将 24 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、OKA 组、高脂饮食联合 OKA 组, 每组 8 只。正常组: 右侧脑室定位注射生理盐水 5 μL , 饲养给予正常饲料; OKA 组: 右侧脑室定位注

射 OKA ($40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 5 μL , 饲养给予正常饲料; 高脂饮食联合 OKA 组: 右侧脑室定位注射 OKA 5 μL , 当天起饲养给予高脂饲料^[7, 13-15] (图 1)。

Morris 水迷宫实验检测大鼠空间记忆能力 2 个月高脂饮食后进行 Morris 水迷宫实验, 检测各组大鼠空间记忆能力。隐藏平台搜索实验: 每天按随机顺序依次从平台所在象限对侧的入水点将大鼠面向池壁放入, 设置时间为 60 s, 规定时间内未找到平台记为逃避期 60 s, 引导鼠上平台, 每只鼠平台停留时间为 10 s, 每天测量 1 次, 共测量 4 天。空间搜索实验: 第 5 天撤掉平台, 选择之前平台所在象限对侧入水点入水, 测量 60 s 内动物在目标象限的时间和穿越目标象限的次数, 并统计大鼠游泳速度。

尼氏染色 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 灌注固定。选择海马部位进行石蜡包埋切片, 片厚 4 μm 。切片脱腊至水, 蒸馏水稍洗; 加 1% 甲苯胺蓝溶液后置于 54 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱内浸染 25 min, 蒸馏水稍洗, 95% 乙醇分化 30 s; 无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片。

Western blot 大鼠断头处死, 冰上分离海马, 液氮速冻后加入 RIPA 裂解液超声破碎, 以 BCA 法测定蛋白浓度, 加入 1/4 体积 5 \times loading buffer 后 95 $^{\circ}\text{C}$ 处理 10 min, 样品-40 $^{\circ}\text{C}$ 保存。蛋白上样量为 70 μg , 分离胶浓度 12%, 将蛋白转印至 PVDF 膜后以 5% BSA 封闭 1 h, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 洗 5 min \times 3 次, 二抗室温孵育 2 h, PBS 洗 5 min \times 3 次, 加入 ECL 发光液显影。使用 Quality one 4.6.2 凝胶分析软件对蛋白条带进行灰度分析。

统计学分析 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Graphpad Prism 5 统计分析软件进行统计分析。数据组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 结合 Newman-keuls *post-hoc* 检验。以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

结 果

1 高脂饮食对冈田酸诱导大鼠认知功能影响的行为学检测

实验动物脑室注射 OKA 或生理盐水后给予 2 个月高脂饮食 (对照组及 OKA 组给予正常饮食, 图 1),



Figure 1 Design of the experiment. HFD: High-fat diet; MWM: Morris water maze

随后进行 Morris 水迷宫定位航行实验。在 4 天的连续训练过程中, 各组大鼠逃避潜伏期逐渐缩短, OKA 组和 OKA 联合高脂饮食组与对照组大鼠相比逃避潜伏期延长, 第 4 天 OKA 联合高脂饮食组逃避潜伏期明显低于 OKA 组。第 5 天撤去平台进行 Morris 水迷宫空间探索实验, OKA 联合高脂饮食组在第一次穿越目标象限时间和穿越平台次数的测试中均优于 OKA 组, 且 3 组间游泳速度无明显差异性, 排除速度影响, 提示 OKA 造模后采用短期高脂饮食处理在认知行为学测试中的表现优于正常饮食组 (图 2)。

2 高脂饮食对冈田酸诱导的大鼠海马神经元损伤的影响

尼氏染色结果显示, OKA 组与对照组相比, CA1 区和 DG 区神经元明显减少, 且细胞皱缩, 并形成大量空泡结构, 表明 OKA 对海马神经元造成损伤; 而 OKA 联合高脂饮食组细胞数目明显多于 OKA 组, 且形态正常, 皱缩现象缓解, 未见明显的空泡结构, 提示高脂饮食对 OKA 造成的神经元损伤具有明显的保护作用 (图 3)。

3 高脂饮食降低冈田酸诱导的海马组织 Tau 蛋白异常磷酸化

正常情况下, Tau 蛋白通过磷酸化维持细胞的正

常形态和物质运转, 而在 AD 患者脑中 Tau 蛋白异常磷酸化导致微管稳定性改变, 引起神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs), 导致神经细胞的大量死亡, 是 AD 发病机制中一个极为重要的因素。Western blot 结果显示, 与对照组相比, OKA 组的 Tau S396 位点磷酸化水平明显增加, OKA 后给予高脂饮食处理降低了 OKA 诱导的异常磷酸化水平, 与行为学及尼氏病理染色结果相一致 (图 4)。

4 高脂饮食降低 OKA 对大鼠海马 NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3)/caspase-1 炎症通路的激活

OKA 组与 control 组相比, NLRP3 含量明显增加, cleaved-caspase-1 活化增加, 提示炎症因子表达增多。

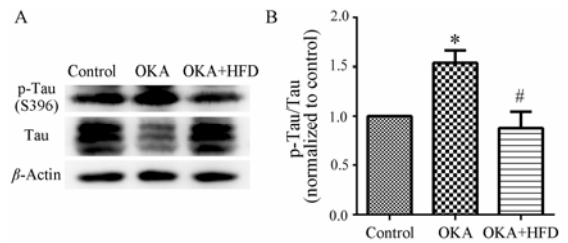


Figure 4 HFD reduced the high phosphorylation of Tau (S396). Western blot results of Tau protein, p-Tau (S396) and β -actin. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs OKA

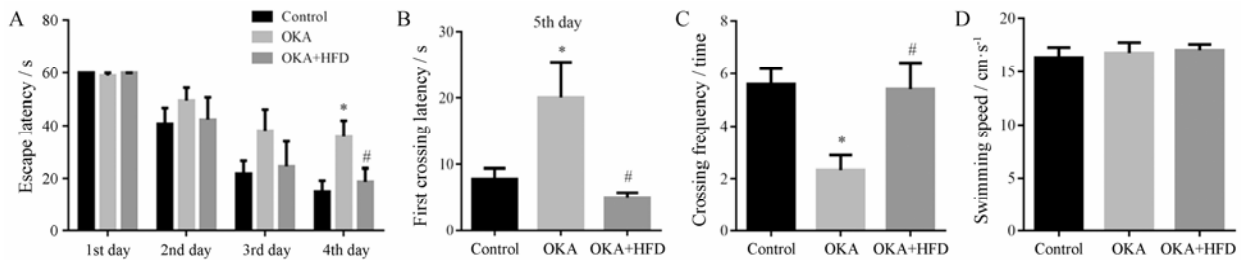


Figure 2 HFD attenuated memory deficits induced by okada acid (OKA) injection in the lateral ventricle of rats. (A) Escape latency to platform in the four days of navigate test. (B) First crossing latency of the target quadrant in spatial probe test. (C) Numbers of platform crossing in spatial probe test. (D) The swimming speed. $n=8$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs OKA

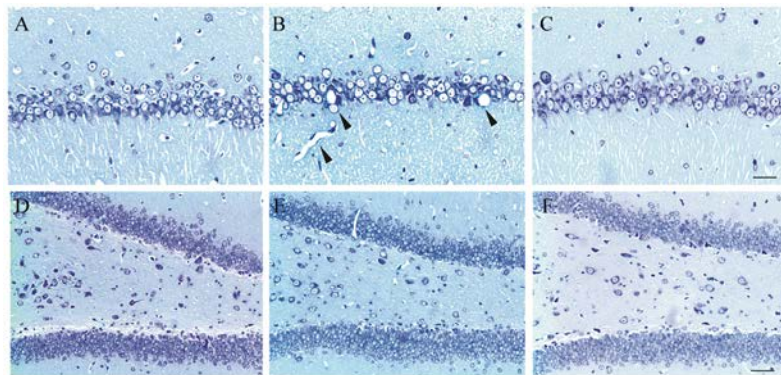


Figure 3 High fat diet attenuated neuron damage in hippocampus caused by OKA. Nissl's staining of hippocampus CA1 of control group (A), OKA group (B) and OKA+HFD group (C). Black arrows indicated the cell damage. Scale bar = 20 μ m. Nissl's staining of dentate gyrus of control group (D), OKA group (E), and OKA+HFD group (F). Scale bar = 50 μ m

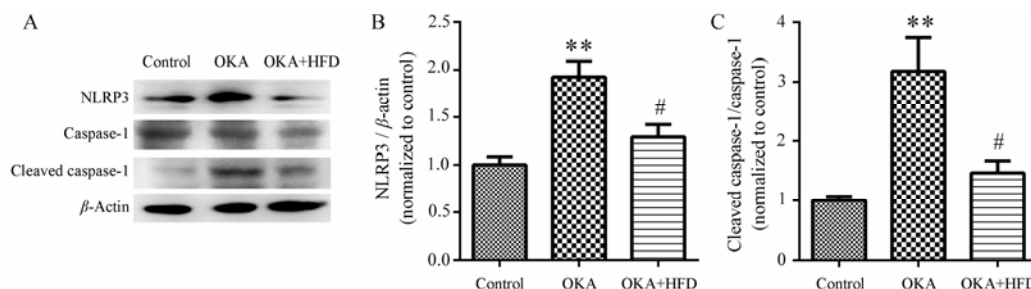


Figure 5 HFD alleviated the activation of NLRP3/caspase-1 inflammation pathway. Western blot results of NLRP3, cleaved caspase-1, caspase-1 and β -actin. $n=3$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$ vs OKA

而 OKA 给予高脂饮食可明显缓解 NLRP3 及 caspase-1 信号通路的活化,提示高脂饮食降低了炎症通路的激活(图 5)。

讨论

NFTs 是 AD 发病中一个极为重要的因素,由异常磷酸化的 Tau 蛋白组成。正常情况下 Tau 蛋白可以通过磷酸化来维持细胞的正常形态和物质运转,而在 AD 患者脑中, Tau 蛋白发生异常磷酸化,导致神经细胞的大量死亡。OKA 是蛋白磷酸酶 PP2A 的特异抑制剂,可引起神经细胞 Tau 蛋白异常高度磷酸化。本实验中侧脑室注射 OKA 造成 Tau 蛋白磷酸化明显增加,表明认知功能损伤模型建立成功。

炎症反应涉及细胞内炎症小体的相互作用,组织损伤可诱发固有免疫应答从而激活 caspase 依赖的炎性反应。炎症小体位于细胞质内,可激活 caspase 家族,尤其是 caspase-1,通过诱导 caspase-1 切割并释放 IL-1 和 IL-8 等促炎因子,最终产生炎症反应。已有文献^[16]报道,在中枢神经系统中,神经细胞表面均表达 IL-1 和 IL-8 的受体,且不同类型的炎症小体在不同神经细胞中各司其职,发挥神经免疫炎症的调节功能。有研究表明,中枢神经系统炎症和自噬功能障碍参与神经退行性疾病。NLRP3 炎症小体介导的 caspase-1 与神经系统疾病具有特异性^[17]。

上世纪 90 年代就有研究报道高脂饮食是 AD 发病的危险因素^[18, 19],高脂饮食能通过增加 $\alpha\beta$ 产生、诱导神经炎症、促进 Tau 蛋白过度磷酸化、损伤突触可塑性及胆碱能神经系统而降低认知功能,成为 AD 发病的危险因素。而近期又有研究表明,脂肪摄入较多的人群死亡率比脂肪摄入少的人群低 23%,脑卒中几率也更小^[9, 10]。提示高脂饮食可能不仅不会对机体造成以前研究认为的损伤,甚至在某种程度上发挥了保护性作用。在本实验结果中发现了类似的现象。首先采用侧脑室脑定位注射 OKA 以建立认知功

能障碍模型,但在给予高脂饮食喂养 2 个月后发现大鼠认知功能损伤没有被加剧,反而有减缓的趋势。在行为学上表现为减弱 OKA 所致的空间学习记忆能力损伤。尼氏染色也提示神经元损伤在高脂饮食组得到明显缓解。Western blot 结果表明高脂饮食组减少了 Tau 蛋白的异常磷酸化,因此对其可能的机制进行推测,认为其一可能是高脂饮食通过介导 NLRP3/caspase-1 通路,减少了炎症因子的表达。其二可能是由于中枢神经系统是人体除脂肪组织外,脂肪含量最多的部位,短期的高脂饮食可能对脑神经产生一定的营养作用,使其对 OKA 造成的神经损伤产生保护作用。

以上结果提示,适度的高脂饮食对神经系统可能起到一定的保护作用,为阿尔茨海默病的日常预防及辅助治疗提供了一个新的思路及理论依据,但不同的高脂饮食含量比和不同作用时程对于 AD 的影响及具体机制仍有待进一步的探究。

References

- [1] Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease [J]. Trends Pharmacol Sci, 1991, 12: 383–388.
- [2] Mudher A, Lovestone S. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? [J]. Trends Neurosci, 2002, 25: 22–26.
- [3] Gong HC, Wang YL, Wang HW. Epigenetic mechanisms of Alzheimer's disease and related drug research [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 1005–1013.
- [4] Iqbal K, Alonso AC, Chen S, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1739: 198–210.
- [5] Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease [J]. Nature, 1999, 399: A23–A31.
- [6] Tiraboschi P, Hansen LA, Thal LJ, et al. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD [J]. Neurology, 2004, 62: 1984–1989.

- [7] Kamat PK, Rai S, Swarnkar S, et al. Molecular and cellular mechanism of okadaic acid (OKA)-induced neurotoxicity: a novel tool for Alzheimer's disease therapeutic application [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 50: 852–865.
- [8] Kiliaan AJ, Arnoldussen IA, Gustafson DR. Adipokines: a link between obesity and dementia? [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13: 913–923.
- [9] Calvochoa E, Hernándezortega K, Ferrera P, et al. Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34: 1001–1008.
- [10] Gratuze M, Julien J, Morin F, et al. High-fat, high-sugar, and high-cholesterol consumption does not impact tau pathogenesis in a mouse model of Alzheimer's disease-like tau pathology [J]. *Neurobiol Aging*, 2016, 47: 71–73.
- [11] Dehghan M, Mente A, Zhang X, et al. Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study [J]. *Lancet*, 2017, 390: 2050–2062.
- [12] Mente A, Dehghan M, Rangarajan S, et al. Association of dietary nutrients with blood lipids and blood pressure in 18 countries: a cross-sectional analysis from the PURE study [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5: 774–787.
- [13] Arendt T, Holzer M, Fruth R, et al. Paired helical filament-like phosphorylation of tau, deposition of β /A4-amyloid and memory impairment in rat induced by chronic inhibition of phosphatase 1 and 2A [J]. *Neuroscience*, 1995, 69: 691–698.
- [14] Arendt T, Holzer M, Fruth R, et al. Phosphorylation of tau, A β -formation, and apoptosis after *in vivo* inhibition of PP-1 and PP-2A [J]. *Neurobiol Aging*, 1998, 19: 3–13.
- [15] Song XY, Hu JF, Chu SF, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates okadaic acid induced spatial memory impairment by the GSK3 β /tau signaling pathway and the A β formation prevention in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 710: 29–38.
- [16] Qiao C. The novel roles and mechanism of NLRP3-Caspase-1 inflammasome in the pathogenesis of Parkinson's disease [D]. Nanjing: Nanjing Medical University, 2016.
- [17] Wang D, Zhang J, Jiang W, et al. The role of NLRP3-CASP1 in inflammasome-mediated neuroinflammation and autophagy dysfunction in manganese-induced, hippocampal-dependent impairment of learning and memory ability [J]. *Autophagy*, 2017, 13: 914–927.
- [18] Kanoski SE, Davidson TL. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity [J]. *Physiol Behav*, 2011, 103: 59–68.
- [19] Zhang XC, Dong F, Jun R, et al. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex [J]. *Exp Neurol*, 2005, 191: 318–325.