· 基础研究 ·

维生素 K2 联合盐酸多奈哌齐对阿尔茨海默病的改善作用

宋伟玲[1],薛君[2,3*],贺佳丽[1],李宏举[4]

([1]内蒙古科技大学包头医学院研究生院,内蒙古自治区 包头 014040;[2]乌兰察布市中心医院老年医学科,内蒙古自治区 乌兰察布 012000;[3]内蒙古包钢医院老年医学科,内蒙古自治区 包头 014010;[4]内蒙古医科大学研究生院,呼和浩特 010107)

【摘 要】 目的 探讨维生素 K2 联合盐酸多奈哌齐对阿尔茨海默病(AD)的改善作用。**方法** 应用 D-半乳糖溶液联合三氯化铝建立 AD 大鼠模型,将成模后的 AD 大鼠分为生理盐水组(NS)、盐酸多奈哌齐组(DZ)及维生素 K2 联合盐酸多奈哌齐组(VK2),以正常对照组(NC)大鼠作为空白对照。对 DZ 组予以盐酸多奈哌齐进行灌胃干预,VK2 组予以维生素 K2 联合盐酸多奈哌齐灌胃干预,NC 组及 NS 组予以等体积生理盐水灌胃干预。采用 Morris 水迷宫实验评估大鼠的学习及记忆力。采用酶联免疫吸附实验检测大鼠血清及海马组织中白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-px)。采用苏木素-伊红(HE)染色及尼氏染色观察大鼠海马组织病理改变情况。采用 Western-blot 法检测各组大鼠海马组织的 β-淀粉样蛋白$_{1-42}$($A\beta_{1-42}$)及脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白的表达量。采用 SPSS 26.0 及 GraphPrism9.0 统计软件进行数据分析。**结果** 与 NC 组相比,NS 组大鼠的逃避潜伏期及首次跨越原平台时间显著增加,穿越平台次数及在原平台象限停留时间显著减少($P<0.05$);血清及海马组织中 IL-6、TNF-α 及 MDA 显著升高,IL-10、SOD 及 GSH-px 显著降低($P<0.05$);海马区病理染色可见神经元损伤,尼氏体数量减少;$A\beta_{1-42}$的蛋白表达量显著升高,BDNF 蛋白表达量显著降低($P<0.05$)。与 NS 组相比,VK2 组大鼠逃避潜伏期及首次跨越原平台时间显著缩短,穿越平台次数及在原平台象限停留时间显著增加($P<0.05$);血清及海马组织中 IL-6、TNF-α 及 MDA 显著降低,IL-10、SOD 及 GSH-px 显著升高($P<0.05$);海马区病理染色可见神经元损伤有所改善,尼氏体数量增加;$A\beta_{1-42}$的蛋白表达量显著减少,BDNF 蛋白表达量显著升高($P<0.05$)。**结论** 维生素 K2 可改善 AD 大鼠的认知功能障碍,其机制可能涉及抑制炎症及氧化应激反应,减少 Aβ 沉积及提高 BDNF 水平,最终实现神经保护作用。

【关键词】 阿尔茨海默病;维生素 K2;盐酸多奈哌齐;神经保护

【中图分类号】 R749.1^{+}6 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2025.09.149

Ameliorative effect of vitamin K2 combined with donepezil hydrochloride on Alzheimer's disease

Song Weiling[1], Xue Jun[2,3*], He Jiali[1], Li Hongju[4]

([1]Graduate School of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, Inner Mongolia Autonomous Region, China; [2]Department of Geriatrics, Ulanqab Central Hospital, Ulanqab 012000, Inner Mongolia Autonomous Region, China; [3]Department of Geriatrics, Baogang Hospital of Inner Mongolia, Baotou 014010, Inner Mongolia Autonomous Region, China; [4]Graduate School, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010107, China)

【Abstract】 Objective To explore the ameliorative effect of vitamin K2 combined with donepezil hydrochloride on Alzheimer's disease (AD). **Methods** A D-galactose solution combined with aluminum trichloride was used to establish an AD rat model. The AD model rats were divided into a normal saline (NS) group, a donepezil hydrochloride (DZ) group, and vitamin K2 combined with donepezil hydrochloride (VK2) group, with a normal control (NC) group as the blank controls. *Via* gavage, the DZ group received donepezil hydrochloride, the VK2 group received vitamin K2 combined with donepezil hydrochloride, and the NC and NS groups received equal volumes of normal saline. Morris water maze tests were performed to evaluate learning and memory. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure serum and hippocampal levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor-α (TNF-α), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione peroxidase (GSH-px). Hematoxylin-eosin (HE) staining and Nissl staining were used to observe the pathological changes in the hippocampal tissues. Western blotting was used to detect the protein expression of hippocampal β-amyloid $_{1-42}$ ($A\beta_{1-42}$) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). SPSS 26.0 and GraphPad Prism 9.0 were used for data analysis. **Results** Compared with the NC group, the NS group showed significantly prolonged escape latency and time to first crossing the original platform and reduced frequency of platform crossings and duration of stay in the original quadrant ($P<0.05$); significantly increased IL-6, TNF-α and MDA, and decreased IL-10, SOD and GSH-px in serum and hippocampal

收稿日期: 2024-11-19; **接受日期**: 2025-02-20

基金项目: 内蒙古自然科学基金(2024LHMS08073);中国金属学会冶金安全与健康分会健康卫生科研项目(jkws202028);包头市卫生健康科技计划(wsjkkj098)

通信作者: 薛君, E-mail: byxuejun@sina.com

tissues ($P<0.05$). Pathological staining of the hippocampus showed neuronal damage, reduced Nissl bodies, significantly increased $A\beta_{1-42}$ expression ($P<0.05$), and significantly decreased BDNF expression ($P<0.05$). Compared with the NS group, the VK2 group showed shortened escape latency and time to first crossing the original platform and increased number of platform crossings and duration of stay in the original quadrant; significantly decreased IL-6, TNF-α and MDA, and increased IL-10, SOD and GSH-px in serum and hippocampal tissues ($P<0.05$). Pathological staining of the hippocampus showed improved neuronal damage, increased Nissl bodies, significantly reduced $A\beta_{1-42}$ expression ($P<0.05$), and significantly increased BDNF expression ($P<0.05$). **Conclusion** Vitamin K2 ameliorates cognitive dysfunction in AD rats, and the mechanism may be related to its ability to suppress inflammation and oxidative stress, decrease Aβ deposition, and increase BDNF levels, thereby exerting neuroprotective effects.

【Key words】 Alzheimer's disease; vitamin K2; donepezil hydrochloride; neuroprotection

This work was supported by Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2024LHM08073), *Health Research Project of Metallurgical Safety and Health Branch of Chinese Society for Metals* (jkws202028), *Baotou Health Science and Technology Plan* (wsjkkj098).

Corresponding author: *Xue Jun*, *E-mail*: *byxuejun@sina.com*

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是一种由于中枢神经系统退行性改变导致的疾病,是老年人痴呆中最常见的类型之一。全球AD的患病人数已高达5000万,预计至2050年,患病人数将达到1.52亿[1]。我国AD的患病人数占痴呆症总人数的63%~70%[2],且患病率随着人口老龄化的日益增加而逐年升高。AD发病隐匿,早期确诊率低,病程较长,致残率较高,且预后较差,给社会和家庭带来了沉重的负担。

盐酸多奈哌齐是一种胆碱酯酶抑制剂,通过抑制乙酰胆碱酯酶对乙酰胆碱的水解,进而使突触间隙的乙酰胆碱的浓度增加,促进间隙间胆碱能的传递,从而起到改善AD认知功能障碍的作用,被食品药品监督管理局批准用于治疗轻中度的AD患者。盐酸多奈哌齐还可抑制谷氨酸毒性,减少自由基对脑组织的损害,进而保护脑细胞,在多项临床及基础实验中被证明能够改善AD的认知功能障碍。

维生素K2是一种脂溶性维生素,具有穿越血脑屏障的能力[3]。维生素K2可以通过调节鞘脂代谢在大脑中发挥作用。鞘脂是一种脂质,鞘脂代谢的改变与神经退行性疾病如阿尔茨海默病有关[4]。同时,维生素K2具有抗炎及抗氧化等作用,在预防骨质疏松、心脑血管钙化以及神经退行性病变中发挥重要作用[5]。目前尚无可以治愈AD的方案,临床上仅仅以药物对症治疗为主,以预防为辅,延缓其发生发展[6]。基于维生素K2的生物学作用,本研究通过探讨维生素K2联合盐酸多奈哌齐对AD大鼠的认知功能、炎症、氧化应激、海马组织病理损伤、β-淀粉样蛋白$_{1-42}$(β-amyloid$_{1-42}$,$A\beta_{1-42}$)及脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor,BDNF)蛋白表达情况的作用机制,以期为临床治疗AD提供更多的途径。

1 材料与方法

1.1 研究材料

1.1.1 研究对象 3月龄体质量为300~400 g的健康雄性SD大鼠40只(SPF级),所有大鼠均购自北京斯贝福生物技术有限公司,动物许可证号为SCXK(京)2019-0010。进行动物实验前,所有大鼠均饲养于实验动物中心屏障环境内。饲养环境通风良好,温度恒定在(22±2)℃,湿度保持在50%~70%,光照均匀。适应性饲养1周后开始实验。

1.1.2 主要药物及试剂 D-半乳糖购自国药集团化学试剂有限公司;三氯化铝购自上海埃彼化学试剂品牌商城;稀盐酸购自广州和为医药科技有限公司;盐酸多奈哌齐片购自江苏豪森药业集团有限公司;维生素K2购自多特倍斯有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-px)、白介素-6(interleukin-6,IL-6)、白介素-10(interleukin-10,IL-10)及肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)试剂盒均购自江苏泽雨生物技术有限公司;苏木素-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色试剂盒及尼氏染色试剂盒购自索莱宝公司;$A\beta_{1-42}$、BDNF一抗及二抗均购买自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 AD大鼠模型建立及筛选 40只健康雄性大鼠进行适应性喂养1周,随机数表法将其分为正常对照(normal control,NC)组10只和模型组30只。模型组大鼠腹腔注射D-半乳糖溶液120 mg/(kg·d)联合三氯化铝10 mg/(kg·d)灌胃60 d后,进行Morris水迷宫实验评估大鼠学习及记忆能力,筛选出AD大鼠。以正常对照组大鼠的平均逃避潜伏期均数+2倍标准差值作为下限,平均逃避潜伏期均数+1倍标准差值作为上限,将模型组大鼠分为AD模型成功组(平均逃避潜伏期>均数+2倍标准差)以及AD模型不成功组(平均逃避潜伏期<均数+1倍标准差)。对于潜伏期介于上下限范围之间的大鼠进行剔除。

1.2.2 分组及给药方式 AD大鼠模型建成后,将其随机分为生理盐水(normal saline,NS)组、盐酸多奈哌齐(donepezil hydrochloride,DZ)组及维生素K2联合盐酸多奈哌齐(VK2)组,每组各6只。对DZ组大鼠应用盐酸多奈哌齐1.0 mg/(kg·d)进行灌

胃,VK2 组大鼠应用维生素 K2 100 mg/(kg · d)联合盐酸多奈哌齐 1.0 mg/(kg · d)进行灌胃,NS 组大鼠和 NC 组大鼠则给予同样体积的生理盐水灌胃,每天各给药 1 次。对以上各组大鼠均干预 6 周。

1.2.3 Morris 水迷宫实验评估大鼠的学习及记忆能力 Morris 水迷宫是一个圆形水箱,水箱被划分为4 个象限,其中第 4 象限包含一个圆形逃生平台,水迷宫周围设有视觉线索。在 1~5 d 的定位航行试验中,每天对每只大鼠在水迷宫的 4 个象限分别进行一次测试,连续进行 5 d。记录每次训练测试中每只大鼠到达水下平台所花费的时间即逃避潜伏期,逃避潜伏期越短,表明大鼠的学习能力越强。于实验的第 6 天,开展空间探索实验。撤掉平台,利用视频跟踪系统记录大鼠在第 4 象限的停留时间、越过原平台位置的次数以及首次跨越原平台所在象限的时间。通过对这些数据进行处理以及分析,来评估大鼠的记忆能力。

1.2.4 组织样本收集 Morris 水迷宫实验结束后,大鼠禁食 12 h 后取材。使用戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉,腹主动脉采血,离心机离心 15 min(3 500 r/min),取上清血冻存。取血后处死,冰面上分离出海马组织,放入多聚甲醛固定液中固定在-80℃冰箱中待检。

1.2.5 相关指标检测方法 采用酶联免疫吸附实验检测各组大鼠血清及海马组织的炎症指标及氧化应激指标,包括 IL-6、IL-10、TNF-α 以及 SOD、MDA、GSH-px。HE 染色及尼氏染色:将大鼠海马组织固定后,依次进行组织修剪、脱水、浸蜡、包埋、制备切片,切片取出常温保存备用,参照试剂盒说明书进行操作,在显微镜下观察切片的病理学变化。采用 Western-blot 法对大鼠海马组织中 $A\beta_{1-42}$ 及 BDNF 蛋白的表达水平进行检测。将海马组织匀浆后离心取上清液,依次进行二喹啉甲酸法蛋白定量、蛋白变性、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转模操作,随后完成封闭和抗体孵育,使用 ECL 试剂盒显色,使用灰度值软件 Gelpro32 对条带进行灰度值分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 26.0 及 GraphPrism9.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,水迷宫实验潜伏期数据的处理采用重复测量方差分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用两独立样本均数 t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 维生素 K2 对 AD 大鼠学习及记忆能力的影响

在 Morris 水迷宫定位航行实验中,与 NC 组相比,NS 组大鼠的逃避潜伏期明显延长($P<0.01$)。与 NS 组相比,DZ 组大鼠第 2~5 天逃避潜伏期明显缩短($P<0.01$),VK2 组大鼠的逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$)。与 DZ 组相比,VK2 组大鼠第 4 及第 5 天逃避潜伏期明显缩短($P<0.01$;表 1)。

Morris 水迷宫第 6 天空间探索实验发现,与 NC 组相比,NS 组穿越平台次数明显减少($P<0.01$),在原平台象限停留的时间明显减少($P<0.05$),首次跨越原平台象限的时间明显延长($P<0.01$),提示 AD 大鼠的记忆能力明显减弱。与 NS 组相比,DZ 组与 VK2 组穿越平台次数明显增加($P<0.01$),在原平台象限停留的时间明显增加($P<0.05$),首次跨越原平台象限的时间明显缩短($P<0.01$)。与 DZ 组相比,VK2 组首次跨越原平台象限的时间明显缩短($P<0.01$;图 1)。

2.2 维生素 K2 对 AD 大鼠血清中炎症指标及氧化应激指标的影响

与 NC 组相比,NS 组 IL-6 和 TNF-α 明显升高,IL-10 明显降低($P<0.01$)。与 NS 组相比,DZ 组及 VK2 组的 IL-6 和 TNF-α 明显降低,IL-10 明显升高($P<0.05$)。与 DZ 组相比,VK2 组的 IL-6 及 TNF-α 明显降低,IL-10 明显升高($P<0.05$;图 2)。

与 NC 组相比,NS 组的 SOD、GSH-Px 活性明显降低,MDA 含量明显升高($P<0.01$)。与 NS 组相比,DZ 组及 VK2 组的 SOD、GSH-Px 活性明显升高,MDA 含量明显降低($P<0.01$)。与 DZ 组相比,VK2 组的 SOD、GSH-Px 活性明显升高,MDA 含量明显降低($P<0.05$;图 3)。

2.3 维生素 K2 对 AD 大鼠海马组织中炎症指标及氧化应激指标的影响

与 NC 组相比,NS 组的 IL-6 和 TNF-α 明显升高,IL-10 明显降低($P<0.01$)。与 NS 组相比,DZ 组及 VK2 组的 IL-6 和 TNF-α 明显降低,IL-10 明显升高($P<0.01$)。与 DZ 组相比,VK2 组的 IL-6 及 TNF-α 明显降低,IL-10 明显升高($P<0.05$;图 4)。

表 1 各组大鼠 Morris 水迷宫定位航行实验中逃避潜伏期比较

Table 1 Comparison of escape latency in Morris water maze navigation experiment among different groups of rats ($n=6$, sec, $\bar{x}\pm s$)

Group	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
NC	56.07±3.25	43.68±3.16	37.89±2.77	23.80±3.16	9.19±1.19
NS	60.20±2.74**	52.35±1.03**	52.16±4.92**	50.95±3.27**	47.49±5.01**
DZ	58.25±1.97	49.14±1.02*##	44.10±2.74*##	37.86±1.57**##	27.19±3.05**##
VK2	57.02±1.32#	46.72±3.78##	40.08±4.14##	28.40±1.89**##△△	16.51±2.59**##△△
F	3.230	12.329	16.753	129.042	156.668
P value	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

NC: normal control; NS: normal saline; DZ: donepezil hydrochloride; VK2: vitamin K2. Compared with NC group, *$P<0.05$, **$P<0.01$; compared with NS group, #$P<0.05$, ##$P<0.01$; compared with DZ group, △△$P<0.01$.

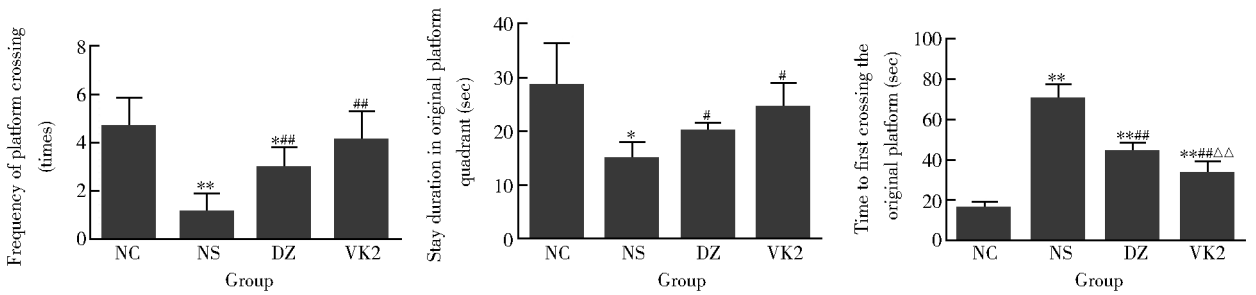


图 1 各组大鼠 Morris 水迷宫第 6 天空间探索实验结果比较

Figure 1 Comparison of spatial exploration experiment results on day 6 of Morris water maze among different groups of rats

NC: normal control; NS: normal saline; DZ: donepezil hydrochloride; VK2: vitamin K2. Compared with NC group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; compared with NS group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$; compared with DZ group, $^{\triangle\triangle}P<0.01$.

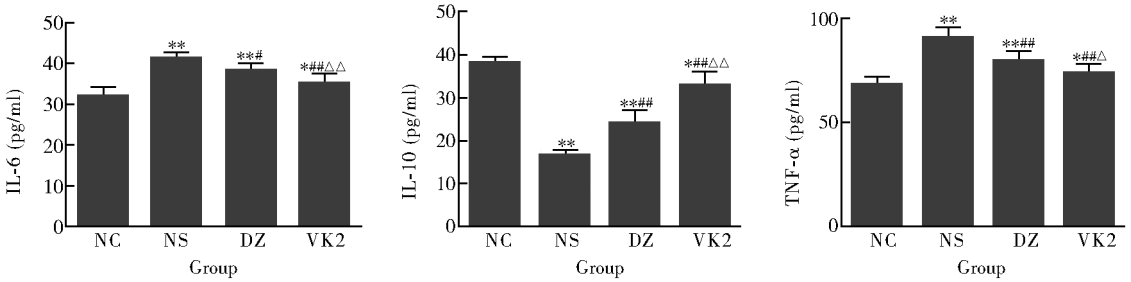


图 2 各组大鼠血清中 IL-6、IL-10、TNF-α 水平比较

Figure 2 Comparison of serum IL-6, IL-10 and TNF-α levels among different groups of rats

IL-6: interleukin-6; IL-10: interleukin-10; TNF-α: tumor necrosis factor-α; NC: normal control; NS: normal saline; DZ: donepezil hydrochloride; VK2: vitamin K2. Compared with NC group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; compared with NS group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$; compared with DZ group, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$.

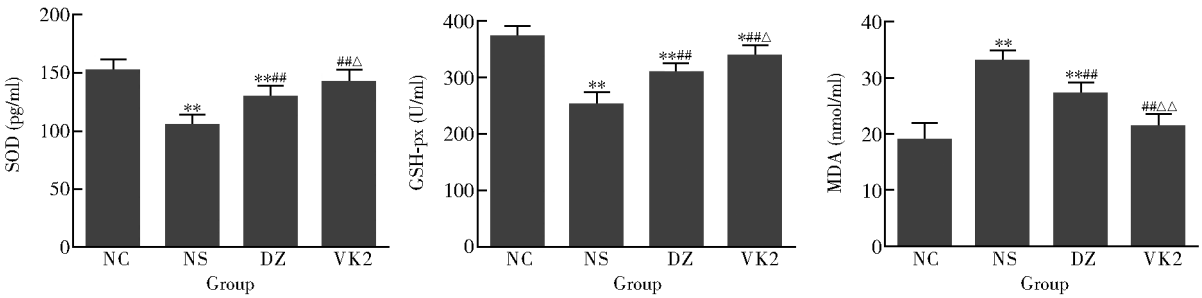


图 3 各组大鼠血清中 SOD、GSH-px 活性及 MDA 含量比较

Figure 3 Comparison of serum SOD, GSH-px activities and MDA content among different groups of rats

SOD: superoxide dismutase; GSH-px: glutathione peroxidase; MDA: malondialdehyde; NC: normal control; NS: normal saline; DZ: donepezil hydrochloride; VK2: vitamin K2. Compared with NC group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; compared with NS group, $^{\#\#}P<0.01$; compared with DZ group, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$.

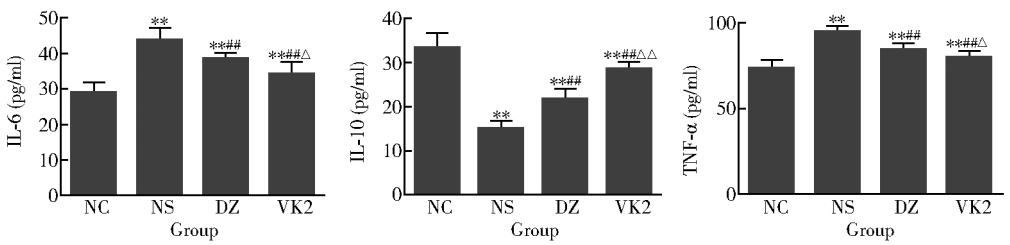


图 4 各组大鼠海马组织中 IL-6、IL-10、TNF-α 水平比较

Figure 4 Comparison of IL-6, IL-10 and TNF-α levels in hippocampal tissue among different groups of rats

IL-6: interleukin-6; IL-10: interleukin-10; TNF-α: tumor necrosis factor-α; NC: normal control; NS: normal saline; DZ: donepezil hydrochloride; VK2: vitamin K2. Compared with NC group, $^{**}P<0.01$; compared with NS group, $^{\#\#}P<0.01$; compared with DZ group, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$.

与 NC 组相比,NS 组的 SOD、GSH-Px 活性明显降低,MDA 含量明显升高($P<0.01$)。与 NS 组相比,DZ 组及 VK2 组的 SOD、GSH-Px 活性明显升高,MDA 含量明显降低($P<0.01$)。与 DZ 组相比,VK2 组的 SOD、GSH-Px 活性明显升高,MDA 含量明显降低($P<0.05$;图 5)。

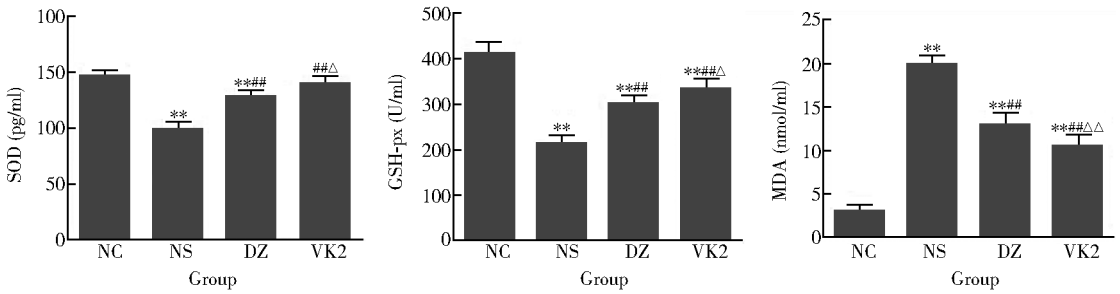


图 5 各组大鼠海马组织中 SOD、GSH-px 活性及 MDA 含量比较

Figure 5 Comparison of SOD, GSH-px activity and MDA content in hippocampus tissue among different groups of rats

SOD: superoxide dismutase; GSH-px: glutathione peroxidase; MDA: malondialdehyde; NC: normal control; NS: normal saline; DZ: donepezil hydrochloride; VK2: vitamin K2. Compared with NC group, $^{**}P<0.01$; compared with NS group, $^{\#\#}P<0.01$; compared with DZ group, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$.

2.4 维生素 K2 对 AD 大鼠海马组织病理学改变的影响

NC 组海马组织病理变化不明显,神经元染色均一,神经元数量丰富,排列整齐,层次分明,胞核大而圆,染色质少,核仁明显,未见明显的神经元水肿、坏死。NS 组可见神经元数量明显减少,神经元排列不整齐,存在核固缩、胞体萎缩等现象。DZ 组的神经元数量较 NS 组增多,神经元排列较 NS 组整齐。VK2 组的神经元数量较 NS 组明显增多,神经元结构完整,排列整齐,少见病理性改变。详见图 6。

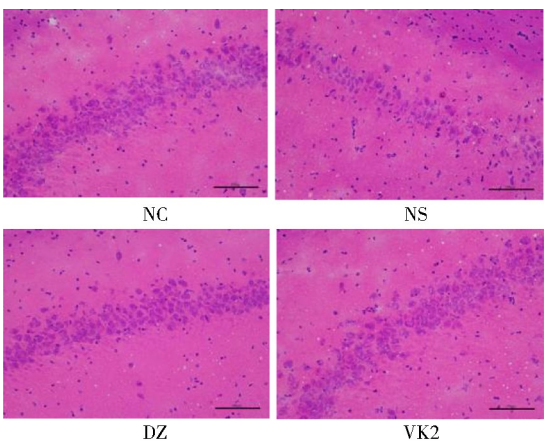


图 6 各组大鼠海马组织 HE 染色

Figure 6 HE staining of hippocampal tissue of rats in each group (×200)

NC: normal control; NS: normal saline; DZ: donepezil hydrochloride; VK2: vitamin K2; HE: hematoxylin-eosin.

NC 组的尼氏体着色呈蓝紫色且数量较多,神经元细胞数量丰富且排列整齐。NS 组尼氏体和神经元细胞核虽仍被染为蓝紫色,但着色程度较浅,神经元细胞排列紊乱且层次明显减少。与 NS 组相比,DZ 组及 VK2 组大鼠的神经细胞尼氏体和神经元细胞数量均出现不同程度的增多,着色程度较深,神经元细胞排列层次明显增多且排列更加有序。详见图 7。

2.5 Western-blot 法测定各组大鼠 $A\beta_{1-42}$、BDNF 蛋白表达情况

与 NC 组相比,NS 组 $A\beta_{1-42}$ 蛋白表达量较明显增加,BDNF 蛋白表达量明显减少($P<0.01$)。与 NS 组相比,DZ 组及 VK2 组 $A\beta_{1-42}$ 蛋白表达量明显下降,BDNF 蛋白表达量明显增加($P<0.01$)。与 DZ 组相比,VK2 组 $A\beta_{1-42}$ 蛋白表达量明显下降,BDNF 蛋白表达量明显增加($P<0.01$)。详见图 8,9。

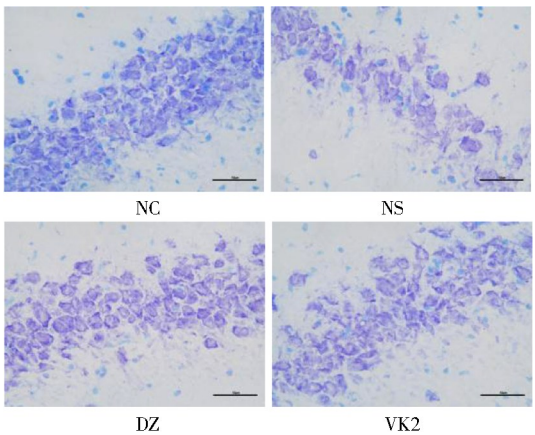


图 7 各组大鼠海马组织尼氏染色

Figure 7 Nissl staining of hippocampal tissue of rats in each group (×400)

NC: normal control; NS: normal saline; DZ: donepezil hydrochloride; VK2: vitamin K2.

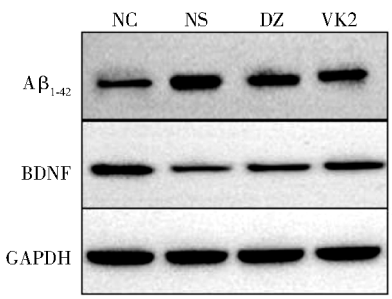


图 8 Western-blot 检测各组大鼠海马组织中 $A\beta_{1-42}$ 及 BDNF 蛋白水平

Figure 8 Western blot detection of $A\beta_{1-42}$ and BDNF protein levels in hippocampal tissue among different groups of rats

$A\beta_{1-42}$: β-amyloid$_{1-42}$; BDNF: brain-derived neurotrophic factor; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NC: normal control; NS: normal saline; DZ: donepezil hydrochloride; VK2: vitamin K2.

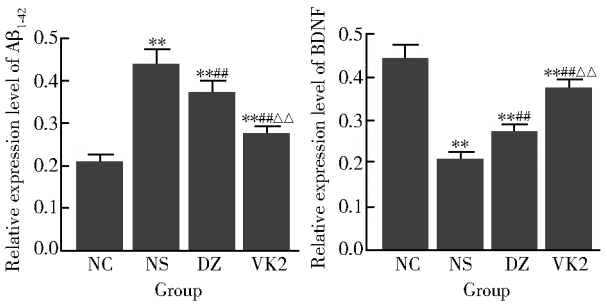


图 9 各组大鼠海马组织中 $A\beta_{1-42}$ 及 BDNF 比较

Figure 9 Comparison of $A\beta_{1-42}$ and BDNF in hippocampal tissue among different groups of rats

NC: normal control; NS: normal saline; DZ: donepezil hydrochloride; VK2: vitamin K2; $A\beta_{1-42}$: β-amyloid$_{1-42}$; BDNF: brain-derived neurotrophic factor. Compared with NC group, $^{**}P<0.01$; compared with NS group, $^{\#\#}P<0.01$; compared with DZ group, $^{\triangle\triangle}P<0.01$.

3 讨 论

AD 的发病机制尚不明确,其中 Aβ 异常沉积及 tau 蛋白的过度磷酸化是其主要的发病机制之一[7]。有研究表明,Aβ 的积累引发了活性氧自由基的生成,而活性氧自由基会进一步促使 Aβ 沉积的增加,这种相互作用导致了线粒体功能障碍和神经元细胞膜损伤,最终引起 AD[8]。另有研究表明,三氯化铝和 D-半乳糖联用能导致神经毒性,是研究抗 AD 药物活性和机制的常用的 AD 模型[9,10]。本研究通过 Morris 水迷宫检测大鼠认知功能及学习记忆能力,观察维生素 K2 对 AD 大鼠认知障碍的改善作用,并从抗炎、抗氧化应激,海马组织病理损伤的改善情况,$A\beta_{1-42}$ 蛋白的沉积以及 BDNF 蛋白表达情况等角度对维生素 K2 的作用机制进行进一步探讨。

Morris 水迷宫实验被应用于动物的学习、记忆及行为等多个学科的研究,是学习与记忆研究的首选经典实验[11,12]。本研究中水迷宫实验结果表明 AD 大鼠的潜伏期明显增加,大鼠的穿越平台次数及在目标象限中停留的时间明显减少,与之前的研究一致[13],表明 AD 模型成功。同时,本研究结果发现,AD 大鼠经过维生素 K2 干预后,VK2 组大鼠的逃避潜伏期及首次跨越原平台象限的时间较 NS 组及 DZ 组缩短,且其穿越平台次数及在原平台象限停留的时间增加。表明维生素 K2 联合盐酸多奈哌齐治疗比单用盐酸多奈哌齐改善 AD 大鼠的学习及记忆能力效果更好。

神经炎症是 AD 的主要特征之一,有研究表明,激活小胶质细胞有助于加快吞噬、降解和清除 Aβ。但随着免疫细胞的长时间激活,会导致促炎细胞因子释放,引发炎症级联反应,导致 Aβ 的沉积和 Tau 蛋白过度磷酸化,进而加速或加剧神经退行性过程,最终导致认知能力下降[14,15]。TNF-α 在炎症的细胞因子级联反应中起核心作用,TNF-α 能够刺激 IL-6 及 IL-8 等因子的生成,当 IL-6 水平升高时,会促进下游炎症因子的释放,导致神经元细胞损伤和凋亡。TNF-α 与 IL-6 之间相互作用,使机体产生持续存在的炎症反应,最终引发 AD。有研究表明,IL-10 可以下调促炎细胞因子的表达并减少淀粉样蛋白的沉积,进一步改善认知功能障碍[16,17]。本研究结果显示,经维生素 K2 干预后,可显著降低 AD 大鼠血清及海马体组织中的炎症水平,且其降低炎症的效果比单用盐酸多奈哌齐好,提示维生素 K2 能够通过降低神经炎症反应,改善 AD 的认知功能障碍。

氧化应激参与了 AD 的多种发病机制。当机体发生氧化应激反应时,会加速 Aβ 的积累和 Tau 蛋白的过度磷酸化,最终引起 AD[18]。反之,Aβ 的异常聚集和 Tau 蛋白的过度磷酸化也会引起氧化应激反应。SOD 是一种酶促抗氧化剂,反映了机体抗氧化的能力。有研究显示,SOD 的缺乏使 Aβ 的水平升高,进而使转基因小鼠出现痴呆[19]。GSH 在神经元的抗氧化及维持氧化还原的稳态中起着重要的作用,反映机体清除自由基的能力。GSH-Px 可促使 GSH 向氧化型谷胱甘肽转化,从而将毒性较高的过氧化物转化为无毒性的羟基化合物,有效地减轻了自由基对组织细胞膜的损害。MDA 反映体内脂质过氧化的程度和速度,从而间接反应氧化损伤程度。本研究结果显示,维生素 K2 能够显著降低 AD 大鼠的氧化应激反应,与 Hadipour 等[20]及 Huang 等[21]的研究结果一致,且其效果比单用盐酸多奈哌齐好,提示维生素 K2 能够通过降低氧化应激损伤进而改善 AD。

对动物脑组织进行病理学检查是评估 AD 损伤程度及治疗效果的主要方法,可以直接反映神经细胞的形态及功能状态[22]。海马是大脑中与学习记忆功能相关的重要区域,海马区神经元细胞数量的减少会影响树突棘的形成,从而影响学习和记忆能力[23]。本研究通过 HE 染色、尼氏染色检测观察海马组织区病理结构,发现 NS 生理盐水组可见神经元数量明显减少,存在核固缩、胞体萎缩等现象,与 Awad 等[24]的研究结果一致,说明 AD 模型制备成功。经维生素 K2 干预后,神经元数量明显增多,神经元结构完整,排列整齐,尼氏体较多,少见病理性改变,提示维生素 K2 能够改善 AD 大鼠的病理损伤,具有神经保护作用。

Aβ 的异常沉积是 AD 的主要病理特征之一,$A\beta_{1-42}$ 是 Aβ 通过蛋白水解产生的,具有毒性大及聚集速度快等特点。$A\beta_{1-42}$ 在大脑内沉积,会导致免疫炎症和神经毒性级联反应的发生,进而引起神经元变性坏死,导致认知障碍,在 AD 的诊断及检测中具有重要的意义[25,26]。本研究结果显示,经过维生素 K2 干预后,$A\beta_{1-42}$ 的表达水平较 NS 组降低,说明维生素

K2 可以降低大脑中 $A\beta_{1-42}$ 的水平。BDNF 是大脑中关键的神经营养因子,在海马及大脑皮层等组织中分布广泛,在促进神经生长和成熟、调节突触传递和可塑性方面起着至关重要的作用。BDNF 与学习和记忆紧密相关,BDNF 的表达减少通常与衰老及精神疾病有关[27]。在 AD 中,BDNF 的减少与 tau 磷酸化、Aβ 积累、神经炎症和神经元凋亡有关[28]。本研究结果提示,经过维生素 K2 干预后的 AD 大鼠 BDNF 的表达量较 NS 组明显提高。且 VK2 组较 DZ 组大鼠的 BDNF 的表达量也有明显提高,说明维生素 K2 能够提高 AD 的 BDNF 水平,进而改善认知功能障碍。

综上,本研究通过应用三氯化铝联合 D-半乳糖建立 AD 大鼠模型,发现维生素 K2 可能通过降低炎症及氧化应激反应,改善病理损伤,减低 $A\beta_{1-42}$ 的沉积以及提高 BDNF 的水平,进而改善 AD 大鼠的认知功能障碍,起到保护神经的作用。依据维生素 K2 的药理作用,可为临床治疗 AD 提供理论基础。但目前维生素 K2 治疗 AD 的基础实验研究及机制尚不完善,需进行进一步的深入研究。

【参考文献】

[1] 汪睿彤, 刘珏. 阿尔茨海默病的流行病学研究进展[J]. 中国慢性病预防与控制, 2021, 29(9): 707-711.DOI: 10.16386/j.cjpccd.issn.1004-6194.2021.09.016.

[2] 王刚, 齐金蕾, 刘馨雅, 等. 中国阿尔茨海默病报告 2024[J]. 诊断学理论与实践, 2024, 23(3): 219-256.DOI: 10.16150/j.1671-2870.2024.03.001.

[3] 李守信. 维生素 K2 通过降低细胞焦亡对创伤性脑损伤大鼠神经保护作用的研究[D]. 大连医科大学, 2021.

[4] 郁晓丹, 虞燕霞, 沈明强. 帕金森病患者血清中维生素 K2 及其他相关炎症指标变化和危险因素分析[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(5): 1110-1113.DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.05.026.

[5] Jadhav N, Ajgaonkar S, Saha P, *et al*. Molecular pathways and roles for vitamin K2-7 as a health-beneficial nutraceutical: challenges and opportunities [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 896920.DOI: 10.3389/fphar.2022.896920.

[6] 王春芸, 裴丽俊, 朱海芳. 当归芍药散联合多奈哌齐片治疗老年阿尔茨海默病的临床效果[J]. 中国医学创新, 2023, 20(18): 99-102.DOI: 10.3969/j.issn.1674-4985.2023.18.023.

[7] 金洪, 彭永, 饶桂兰, 等. 阿尔茨海默病药物治疗的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2023, 50(1): 87-92.DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2023.01.017.

[8] Jurcău MC, Andronie-Cioara FL, Jurcău A, *et al*. The link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in the pathophysiology of Alzheimer's disease: therapeutic implications and future perspectives[J]. Antioxidants (Basel), 2022, 11(11): 2167.DOI: 10.3390/antiox11112167.

[9] Wongpun J, Chanmanee T, Tocharus J, *et al*. The potential effects of festidinol treatment against the NLRP3 inflammasome and pyroptosis in D-galactose and aluminum chloride-induced Alzheimer's-like pathology in mouse brain[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 119: 110181.DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110181.

[10] Zhang J, Hao J, Liu R, *et al*. Hawthorn flavonoid ameliorates cognitive deficit in mice with Alzheimer's disease by increasing the levels of *Bifidobacteriales* in gut microbiota and docosapentaenoic acid in serum metabolites[J]. Food Funct, 2022, 13(23): 12371-12382.DOI: 10.1039/d2fo02871a.

[11] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. J Neurosci Methods, 1984, 11(1): 47-60.DOI: 10.1016/0165-0270(84)90007-4.

[12] Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris water maze in the study of memory and learning[J]. Int J Neurosci, 1989, 48(1-2): 29-69.DOI: 10.3109/00207458909002151.

[13] Wang YJ, Wang XY, Hao XY, *et al*. Ethanol extract of *Centipeda minima* exerts antioxidant and neuroprotective effects *via* activation of the Nrf2 signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 9421037.DOI: 10.1155/2019/9421037.

[14] Sinyor B, Mineo J, Ochner C. Alzheimer's disease, inflammation, and the role of antioxidants[J]. J Alzheimers Dis Rep, 2020, 4(1): 175-183.DOI: 10.3233/ADR-200171.

[15] Dionisio-Santos DA, Olschowka JA, O'Banion MK. Exploiting microglial and peripheral immune cell crosstalk to treat Alzheimer's disease[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 74.DOI: 10.1186/s12974-019-1453-0

[16] Guillot-Sestier MV, Doty KR, Gate D, *et al*. IL-10 deficiency rebalances innate immunity to mitigate Alzheimer-like pathology[J]. Neuron, 2015, 85(3): 534-548.DOI: 10.1016/j.neuron.2014.12.068

[17] Bagyinszky E, Giau VV, Shim K, *et al*. Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis[J]. J Neurol Sci, 2017, 376: 242-254.DOI: 10.1016/j.jns.2017.03.031

[18] 邓磊, 张俊丽, 韩发彬. 转录因子 NRF2 在阿尔茨海默病中的作用及治疗研究[J]. 生命科学, 2022, 34(9): 1090-1100.DOI: 10.13376/j.cbls/2022121.

[19] Bennett JP. Medical hypothesis: neurodegenerative diseases arise from oxidative damage to electron tunneling proteins in mitochondria[J]. Med Hypotheses, 2019, 127: 1-4.DOI: 10.1016/j.mehy.2019.03.034.

[20] Hadipour E, Tayarani-Najaran Z, Fereidoni M. Vitamin K2 protects PC12 cells against $A\beta_{(1-42)}$ and H_2O_2-induced apoptosis *via* p38 MAP kinase pathway[J]. Nutr Neurosci, 2020, 23(5): 343-352.DOI: 10.1080/1028415X.2018.1504428.

[21] Huang SH, Fang ST, Chen YC. Molecular mechanism of vitamin K2 protection against amyloid-β-induced cytotoxicity[J]. Biomolecules, 2021, 11(3): 423.DOI: 10.3390/biom11030423.

[22] Pavlovic D, Pekic S, Stojanovic M, *et al*. Traumatic brain injury: neuropathological, neurocognitive and neurobehavioral sequelae[J]. Pituitary, 2019, 22(3): 270-282.DOI: 10.1007/s11102-019-00957-9.

[23] Dorostkar MM, Zou C, Blazquez-Llorca L, *et al*. Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities[J]. Acta Neuropathol, 2015, 130(1): 1-19.DOI: 10.1007/s00401-015-1449-5.

[24] Awad HH, Desouky MA, Zidan A, *et al*. Neuromodulatory effect of vardenafil on aluminium chloride/D-galactose induced Alzheimer's disease in rats: emphasis on amyloid-beta, p-tau, PI3K/Akt/p53 pathway, endoplasmic reticulum stress, and cellular senescence[J]. Inflammopharmacology, 2023, 31(5): 2653-2673.DOI: 10.1007/s10787-023-01287-w.

[25] 王治国, 战莹, 武晓丹, 等. 血浆和脑脊液 Aβ42、tau 水平对阿尔茨海默病患者的早期诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(3): 314-316.DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2018.03.008.

[26] 南茜. "调神益智"针刺法治疗卒中后认知障碍非痴呆的疗效评价及基于 Aβ1-42 的机制探讨[D]. 天津中医药大学, 2022.

[27] Wang CS, Kavalali ET, Monteggia LM. BDNF signaling in context: from synaptic regulation to psychiatric disorders[J]. Cell, 2022, 185(1): 62-76.DOI: 10.1016/j.cell.2021.12.003.

[28] Gao L, Zhang Y, Sterling K, *et al*. Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential[J]. Transl Neurodegener, 2022, 11(1): 4.DOI: 10.1186/s40035-022-00279-0.

(编辑: 和雨璇)