

天然の抗酸化物質であるアンティエは、アミロイド形成、炎症、オートファジー、および酸化ストレス経路を標的とする散発性アルツハイマー病のストレプトゾトシン誘発マウスモデルの認知機能障害を軽減します

マンドウ・H・ゴーンナム

学部手術、医学や科学のドリュー大学、ロサンゼルス、カリフォルニア、USA

対応する著者：マムドウ・ゴーンナム博士、チャールズ・R・ドリュー医科学大学、外科、1621 E. 120th Street、ロサンゼルス、CA 90059、米国。メール：

mghoneum@ucla.edu

キーワード：アルツハイマー病、オートファジー、酸化ストレス、アンティア、アミロイドベータ

抽象

背景：アルツハイマー病などの多くの神経変性疾患は、酸化ストレスに関連しています。したがって、抗酸化療法は、神経変性疾患の予防と治療に提案されています。この研究では、マウスで誘発される散発性アルツハイマー病に対して保護効果を発揮する抗酸化物質 Antia の能力を調査します。Antia 食用から抽出される天然物である

yamabushitake のキノコ、gotsukora の植物および diosgenin MRN-100（鉄系流体）で処理した後。

方法： マウスにおける散発性アルツハイマー病の誘発には、ストレプトゾトシン（STZ）（3mg/kg）の単一脳室内（ICV）注射を使用しました。Antia は、3用量（25、50、100 mg/kg/日）で 21 日間腹腔内（IP）注射されました。注射の最終日から 24 時間以内に神経行動学的検査を実施した。その後、マウスは頸部脱臼と断頭により犠牲になりました。海馬を迅速に切除し、重みをつけ、ホモジナイズして生化学パラメータの推定に使用した。

結果： T の Antia と treatment 大幅 IMPRO の VED マウスのパフォーマンスモリス水迷路を。また A、Biochem i が分析 CAL Antia を含むいくつかの化合物の保護効果発揮することが示された GSH、MDA、NF- κ B、IL-6、TNF- α 、及び m 個の yloid-ベータ。ウエスタンブロットを用いたさらなる研究により、JAK2/STAT3 経路に対する Antia の保護効果が示されました。

結論： Antia は、ICV-STZ 注射によって誘発される認知機能障害に対して有意な保護を発揮します。この効果は、アミロイド形成、炎症、酸化ストレス経路を標的とすることで達成されます。JAK2/STAT3 経路は、SAD などの神経炎症性疾患および神経変性疾患の保護的役割を果たしました。

謝辞： Antia は、ACM Co., Ltd, Japan から提供されました。

キーワード： アルツハイマー病、アンティエ、JAK2/STAT3、...

1) 背景

アルツハイマー病（AD）などの加齢に伴う神経障害が増加しています。AD は、記憶および認知の進行性の低下を特徴とする神経変性障害であり、認知症の最も一般的な原因であり、すべての症例の 60~80% を占めています（Patterson : 2018）。高齢者で最も一般的なタイプの AD である散発性アルツハイマー病（SAD）は、中枢神経系の進行性神経変性に関連しています（Blennow et al 2006）。酸化ストレス、アミロイド形成、炎症、およびオートファジー経路を含む、いくつかの経路が SAD の可能なターゲットとして検討されています。

酸化ストレスマーカーの出現は、目に見えるアミロイド沈着と神経原線維変化の蓄積に先行する、AD 脳の最も初期の変化の 1 つです（Nunomura et al 2000）。酸化ストレスは、慢性炎症、AD、パーキンソン病などの多くの障害に関与しています（Polidori、

2004)。脳のニューロンは、高い酸素消費とエネルギー生産を示すため、活性酸素種 (ROS) と酸化的損傷の過剰な発生のリスクが非常に高い (Bélanger et al 2011)。

AD 脳では、通常、固形アミロイド- β ($A\beta$) およびタウタンパク質は、プラークおよびもつれと呼ばれるアミロイド様フィラメントに集合します。現在、 $A\beta$ が中枢神経系に蓄積して細胞疾患を開始する方法は未解決ですが、 $A\beta$ が損傷して神経細胞死を引き起こす可能性のある推奨されるメカニズムには、 $A\beta$ の自己凝集中の ROS 生成が含まれます。これが *in vitro* でニューロンの膜で起こると、最終的にシナプス膜の脱分極、過剰なカルシウム流入、およびミトコンドリア障害につながります (Mattson 2004, Flagmeier et al 2017)。

AD などの神経変性疾患も神経炎症を伴います。転写因子 NF- κ B は、ニューロンの炎症反応に重要な役割を果たすことがわかっています。通常の生理学的条件下では、NF- κ B はその阻害剤 I κ B α と細胞質複合体を形成しますが、刺激されると NF- κ B はシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)、インターロイキンなどの炎症性標的遺伝子の転写を誘導します I β (IL-1 β)、インターロイキン-6 (IL-6)、および腫瘍壊死因子- α (TNF- α)。さらに、神経炎症は、神経変性疾患のオートファジーと関連しています。オートファジーの病理学的破壊は、神経炎症の開始または悪化を引き起こす可能性があり、逆に、神経炎症は、神経変性を悪化させる自食障害を引き起こす可能性があります (Zheng et al. 2013)。ヒト AD および AD のマウスモデルでは、オートファジーが減少し、タウ凝集体の病理学的蓄積に寄与することがわかっています (Zare-Shahabadi et al 2015)。オートファジーは、ラパマイシンの哺乳類標的である mTOR によって調節されることが知られており、mTOR 阻害は脳性麻痺のマウスモデルで神経炎症を防ぐことが示されています (Srivastava et al 2016)。さらに、GSK-3 β 阻害は、オートファジーを活性化することにより、虚血性脳損傷を受けたラットの皮質の神経炎症を抑制することが実証されています (Zhou et al.、2011)。

AD の薬理学的管理はこれまでに限られていた。非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID) の長期使用は、2007 年に AD 発症の可能性の減少と関連すると考えられていました (Szekely et al 2007)。証拠はまた、NSAID がアミロイド斑に関連する炎症を軽減できるという概念を示唆したが、高い有害事象のために試験が中断された (Hsu and Marshall, 2017)。AD のリスクを低下させることが示されている薬やサプリメントはありません (Hsu D, Marshall GA, 2017)。残念ながら、現在の FDA 承認の AD 治療は症状の緩和のみを提供し、病気を遅らせたり治癒させることはできません (パターンソン：2018)。

最近、抗酸化物質は、酸化ストレス傷害を低減することにより、AD の発症を防ぐことに注目が集まっています (Markesbery 2018, Gugliandolo : 2017)。さらに、植物からの薬物と栄養補助食品の使用と検索は、伝統的な医学で使用が実証されている植物化学物質に見られる健康上の利点もあり、近年加速しています (Choi et al 2005)。例えば、ヤマブシタケと呼ばれる伝統的な中国薬用キノコの成分は、培養アストロサイト

の神経成長因子合成を促進し（川岸ら、1990; 川岸ら、1994）、ヒトの軽度認知障害を改善します（森ら、2009）。gotsukoraの植物は、伝統的に認知症および記憶の改善のために使用されてきた（Nadkarni 1954; Kirtikar、1987）、その抽出物をげっ歯類の記憶保持を改善することが示されてきた、海馬におけるアミロイドβ病理を変化させる（グプタら、2003）。ADのマウスモデルのモデルであり、ADで発生する神経変性変化に関係する酸化ストレス応答を調節します（Dhanasekaran et al 2009）。植物由来のステロイド性サポゲニンであるジオスゲニンは、抗がん効果を発揮し（McGeer and McGeer 2013）、加齢に関連する認知障害を改善し（Zhu et al 2007）、糖尿病性神経障害を緩和することが示されています（ブッシュ 2008）。最近、そのジオスゲニン改善メモリ証明された機能とADマウスモデルにおいて軸索変性を減少させた（Nadkarni 1954、Tohdaら、2013）。

この研究では、ヤマブシタケ、ゴツコラ、ジオスゲニンなどの成分を含むアンテアと呼ばれる抗酸化製品の認知保護効果を調べます。これらの成分は、アンテアを生成するためにヒドロフェレート液 MRN-100 と一緒に処理されます。MRN-100の以前の研究では、加齢に伴う酸化ストレス（Badr El-Din et al 2010）および内皮細胞ならびにマウスおよびヒト白血病細胞の酸化的損傷から保護することが示されています（Lin and Girotti 1997）。Antiaに関する最近の研究は、ヒト末梢血リンパ球における酸化ストレス誘発性ミトコンドリア機能障害を回復する能力を示しています（Ghoneum 2019）。上記のAntiaの植物成分の神経保護効果に照らして、AntiaはADに関連する経路、すなわち酸化ストレス、アミロイド形成、炎症、およびオートファジー経路に有益な効果があると仮定しました。ストレプトゾトシンの脳室内（ICV）注射を介してSADで誘発されたマウスに対するAntiaの効果を研究しました。これは、（インスリンに対する脳の抵抗に基づいてSADの十分に確立された動物モデルであるSalkovic-Petrisicら 2013）および模倣のヒトにおけるSADの年齢関連病状S（記憶障害、酸化ストレス、神経炎症および神経変性等 Kamat et al 2016）。ここでは、仮説を裏付ける行動、生化学、およびウェスタンブロット実験を紹介します。

2. 材料と方法

2.1. 動物

エジプトのカイロ大学薬局の動物施設から、体重25~30gのオスのアルビノマウスが提供され、その後、研究を実施する前に1週間順化させました。動物は、一定温度(25±2°C)、相対湿度60±10%、明暗サイクル(12/12時間)の制御された環境条件で飼育されました。標準的な食事と水は自由に摂取できました。動物の苦痛を最小限にし、使用する動物の数を減らすために、すべての努力が活用されました。この研究は、動物実験倫理委員会（カイロ大学薬学部）によって承認され、実験動物の管理と使用に関する国立衛生研究所ガイド（2011年）の推奨事項に準拠しています。

2.2. 化学薬品

STZ は、Sigma-Aldrich Co. (米国ミズーリ州セントルイス) から購入しました。STZ を生理食塩水 (0.9%NaCl) に溶解し、フリーハンド法により 10 μ L の ICV を注入しました。Antia は生理食塩水に 3 回投与して溶解しました。成人用量 (4 錠/日) に相当する 25mg / kg、50mg / kg および 100mg / kg、その後、0.1ml / 20g マウスの体積で腹腔内 (ip) 投与。実験の各日に新鮮な薬液を調製しました。対照群には、同じ投与量の同じ量の生理食塩水の注射を受けた。その他の化学物質はすべて最高の分析グレードでした。

2.3. アンティエ

アンティエは、食用ヤマブシタケ、ゴツコラ植物、およびジオスゲニン (ヤマノイモの塊茎からの抽出物) を含む、さまざまなキノコおよび植物に由来する天然化合物です。成分は、MRN-100 と呼ばれる鉄ベースの液体で処理されます。MRN-100 はフィトシンから作られ、2 価および 3 価の鉄酸塩 (ハイドロ鉄酸塩流体) から誘導された鉄ベースの化合物です。Antia の化学組成はまだ活発に調査中です。Antia は、ACM Co., Ltd, Japan によって提供されました。この研究では、約 2×10^{-12} mol / L の濃度の Fe²⁺ および Fe³⁺ イオンを含む蒸留水 (DW) で Antia を調製しました (36)。本研究では、0.0、0.1275、0.3825、および 1.1475 mg / ml の濃度を使用しました。

2.4. SAD の誘導

SAD は、フリーハンド手順 (Pel leymounter et al 2002) に従ってマウスの側脳室に STZ (3 mg/kg) を ICV 注射することにより誘発され、回避するために Warnock et al 2010 により更新されました。脳静脈が貫通する確率。マウスをチオペンタール (5 mg/kg, ip) で麻酔し、耳の上から下向きの圧力を使用して頭を安定させ、針を皮膚と頭蓋骨から側脳室に直接挿入しました。目と頭蓋骨の中心でブレグマの位置を特定し、この点から約 1mm 外側に針を挿入します。マウスは、注射の 1 分後に正常に行動した。

2.5. 実験計画

マウスは、通常、それぞれ 12 匹の動物を含む 5 つのグループに分けられました。グループ I (対照) : マウスに ICV および腹腔内 (ip) 生理食塩水をそれぞれ 1 回および連続 21 日間投与し、正常対照群として使用した。グループ II (STZ) : マウスは STZ (3 mg / kg, ICV) を 1 回投与され、SAD のモデルとして使用されました (Mehla et al 2012)。グループ III (STZ+抗 1) : マウスは、連続した 21 日間、5 時間後に毎日、STZ (3 mg / kg, ICV) に続いてアンティエ (25 mg / kg, ip) を受けました。グループ IV (STZ+ Antia 2) : マウスに STZ (3 mg / kg, ICV) を投与し、続いて 5 時間後にアンティエ (50 mg / kg、

ip) を 21 日間連続して投与しました。グループ V (STZ+抗 3) : マウスは、連続 21 日間 5 時間、その後毎日、STZ (3 mg / kg、ICV) に続いてアンティエ 3 (100 mg / kg、腹腔内) を受けました。治療の終了から 24 時間後に、以下を含む神経行動学的試験が行われました：物体認識、Morris 水迷路試験 (MWM)、最小ストレス試験から最大ストレス試験まで順番に配置。可能な日内変動を最小限に抑えるため。すべてのテストは、上部照明の下で動物の光のサイクル中に実施されました。

2.6。行動評価

2.6.1。物体認識テスト

物体認識テストは、長期記憶を評価し、認知を推定するために使用されます (Ennaceur 2010)。この研究では、実行されたテストは 3 日間連続で行われました。初日 (馴化期) に、周囲の環境に適応するために、各マウスを 30 x 30 x 30 cm f または 30 分の寸法の木製の箱に個別に入れました。T 彼第二日たために指定習熟やトレーニング、2 つの形状の同じ木製のキューブ、色とサイズが反対の角に配置されたボックス内に壁から 2 センチ。E の ACH のマウスたボックスの中央に配置し、左 10 分間、これらの 2 つのオブジェクトを探索します。三日目に、試験は、O、起こった二つの同一のキューブの NE たに置き換え形状の異なる新規オブジェクト、サイズおよび色を加えました。各マウスは、2 つの異なるオブジェクトに 5 分間再びさらされました。追加されたオブジェクトは、振舞いが ODO のにより案内されなかったことを確実にするために、動物を用いた実験の間に 70%エタノールで洗浄した r 個の合図。すべてのオブジェクトと場所は、特定の場所またはオブジェクトの傾斜による潜在的なバイアスを減らすように調整されました。マウスはオブジェクトを移動することができず、被験者は常に同じ壁に面したボックスに入れられました。動物の行動をビデオで記録し、次のパラメーターを計算しました。

- 1) 識別指数 : 新規オブジェクトと見慣れたオブジェクトを探索する時間の差を両方のオブジェクトの探索に費やした合計時間で割った値 (この結果は+1 から-1 の間で変化します。おなじみのオブジェクトに費やす時間が増え、スコアが 0 の場合は、設定が null であることを示します。
- 2) 認識指標 : 動物が新規オブジェクトを探索するのに費やした時間。両方のオブジェクトの合計探索時間の割合として。

2.6.2。モリス水迷路テスト

MWM テストは、実験マウスの空間学習と記憶を調査するために使用されます (Morris、1981)。迷路は、4 つの象限に分割されたステンレス鋼の円形タンク (直径 210 cm、高さ 51 cm) で構成され、深さ 35 cm まで水 (25±2°C) で満たされていました。黒に塗ら

れた水中プラットフォーム（幅 10 cm、高さ 28 cm）を水面下 2 cm の目標四分円の内側に配置しました。プラットフォームは、トレーニングとテストの間、一貫した位置に保たれました。プラットフォームを見えなくするために、水を不透明にするために紫色の無毒の染料が追加されました。記憶獲得トライアル（120 秒/トレイル）は、トライアルの間に少なくとも 15 分の間隔を空けて、4 日間連続で 1 日に 2 回実行されました。各取得トライアル中に、動物を自由に残して、ターゲット象限に隠されたプラットフォームを見つけました。マウスがプラットフォームを見つけたら、さらに 20 秒放置して安静にし、一方、動物が 120 秒以内にプラットフォームに到達できなかった場合は、静かにプラットフォームに誘導され、20 秒間保持されました。平均エスケープレイテンシは、各 r が隠れプラットフォームを見つけるまでにかかった時間として計算され、習得または学習の指標として使用されました。5 日目に、マウスをプローブ試験セッションにかけ、そこでプラットフォームをプールから取り去り、各ラットに 60 秒間プールをプローブさせた。隠されたプラットフォームが以前に配置されたターゲット象限で各ラットが費やした時間は、検索または記憶の指標として記録されました。

2.7. 脳の処理

行動試験の後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、そして b 雨が急速に氷のように冷たい S で洗浄し、解剖したアリン。T 彼は海馬（N=6）の氷冷ガラス板上の各脳から切除しました。海馬は、いくつかのアリコートに分割した 10% ホモジネートを調製するために、氷冷生理食塩水中でホモジナイズした -80°C で保存します。他の海馬は、-80°C で保存し、W エステルブロット分析に使用しました。

2.8. 生化学的測定

2.8.1. 酸化ストレスと炎症性バイオマーカーの決定

マロンジアルデヒド（MDA）のレベルを測定することにより、海馬の脂質過酸化を推定しました。MDA は、1978 年に内山と三原が記述した方法に従って、チオバルビツール酸反応性物質を測定することにより決定されました。さらに、脳グルタチオン（GSH）含有量は、Beutler et al. によって記載された方法に従って、エルマン試薬を使用して分光光度的に決定された 1963 年。結果は、Mmol / mg タンパク質として表されます。

酵素免疫測定法

Hippocampal TNF- α および IL-6 レベルは、から購入したラット ELISA キット用いて推定した RayBiotech 株式会社を。（米国ジョージア州ノークロス）、R&D Systems Inc.（米国ミネアポリス）。手順は、製造元の指示に従って実行されました。結果は、TNF- α および IL-6 の pg / mg タンパク質として示されています。

2.8.2. ウェスタンブロット分析

タンパク質溶液は、脳組織から抽出した後、等しいタンパク質の量（20～30 μg の総タンパク質）を SDS により分離した-PAGE（10%アクリルアミドゲル）及びポリビニリデンジフルオリド膜に移し（Pierce 社、ロックフォード、IL、USA）Bio-Rad Trans-Blot システムを使用します。の免疫検出 ウェスタンブロットはインキュベーションにより実施されました室温で膜 1 つの溶液ブロッキング H からなる 20 mM のトリス-Cl、pH7.5 で、150 mM の塩化ナトリウム、0.1% トウイーン 20 と 3% ウシ血清アルブミン。膜を以下の一次抗体のいずれかと共に 4°C で一晩インキュベートした：P-JAK2（Tyr で 1008 分の 1007）、P-STAT3（Tyr の 705）、I κ B- α 、GSK-3 β の mTOR、COX2 および β アクチンを得ます Thermo Fisher Scientific Inc.（米国イリノイ州ロックフォード）から。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を添加し、そして膜をインキュベートした室温のために 1 時間。Image Lab™ ソフトウェアバージョン 5.1（Bio-Rad Laboratories Inc.、米国カリフォルニア州ハーキュリーズ）を備えた ChemiDoc™ イメージングシステムを使用して、バンド強度を分析しました。結果は、 β -アクチンタンパク質のレベルに正規化した後の任意の単位として表示されます。

タンパク質含有量の決定

タンパク質含量を測定したところ、ACC Bradford の方法にオルディングを。すべての結果は、タンパク質 mg あたりの組織濃度として表されました。

2.9。統計分析

データは S.±手段として提示されている E。データは、一元配置分散分析 (ANOVA) に続いて Tukey-Kramer 多重比較検定を使用して分析されました。GraphPad Prism ソフトウェア (バージョン 6; GraphPad Software, Inc., 米国カリフォルニア州サンディエゴ) を使用して、統計分析を実行し、グラフィカルなプレゼンテーションを作成しました。有意水準は、すべての統計検定で $p < 0.05$ に設定されました。

3. 結果

ICV-STZ の行動および生化学的機能の Antia の影響マウスに 1 を含み、以下のセクションに記載されている処理された) 神経行動試験、および 2) 生化学分析の海馬内容。

3.1 Neuro behavioral 分析

神経行動試験に対する STZ およびアンティエ (25、50 および 100 mg / kg) の効果は、アンティエ注射の最終日から 24 時間以内に実施されました。

3.1.1 Antia は認識メモリを強化します

モリス水迷路をされたために使用調べることができ、保護の効果 Antia の治療上の ICV-STZ を注入エドマウス。モリスの水迷路における平均逃避潜時 (MEL) に対するアンティエの効果を図 2 A に示します。M の氷の異なるグループでは、かかった異なる時間秒にエスケープするの DAY 2。アルツハイマーメートの氷は、対照マウスと比較して 2 日目にエスケープする限り 1.63 倍を取りました。一方、アルツハイマーメートの Antia と氷は 2 日目のみ 1.08 倍の長として、対照マウスを取りました。これらの結果は、3 日目および 4 日目にさらに確認されました。

3.1.2 対象象限で費やされた時間

S の目標に費やされた時間に Antia の効果に studies モリス水迷路における象限があることを示したアルツハイマーマウスは、対照マウスと比較して、象限の時間の 25.4% を費やし、一方とアルツハイマーマウス 25、50、および 100mg / kg の Antia の対照マウスと比較して、それぞれ PENT 72.5 パーセント、75.8 パーセント、及び時間 85.4% (図 2B) 。

3.1. 新規オブジェクト認識テストの 3D 識別および選好指標

Effect STZ および Antia の新規物体認識試験における差別と優先指標に (NOR) を調べました。T は、彼識別インデックスは、グループを制御するために比較した場合、STZ 誘導性散発性 AD マウスでは減少したが、用量依存的に STZ 群と比べて有意に Antia (25、50 及び 100mg の / kg) の投与後に増加しました。さらに、新規オブジェクトの探索に費

やした時間は、ICV-STZ を注入したマウスでは、コントロールグループと比較して 63% 短縮されました。一方、Antia (25、50、および 100mg/kg) の投与は嗜好指数を標準化し、Antia 処理マウスは用量依存的に見慣れた物体よりも新しい物体を好むことを示しました (図 2C)。

図 2 A : ICV-STZ を注入したマウスのモリス水迷路における平均逃避潜時 (MEL) に対する Antia の効果。

* $p < 0.05$ で正常群と有意に異なる

@ $p < 0.05$ で ICV-STZ グループと有意に異なる

図 2B : ICV-STZ を注射したマウスのモリス水迷路の標的象限で費やされた時間に対するアンティエの効果

* $p < 0.05$ で正常群と有意に異なる

@ $p < 0.05$ で ICV-STZ グループと有意に異なる

図 2C : 新規オブジェクト認識テストで ICV-STZ を注入したマウスの認知機能に対する Antia の効果

* $p < 0.05$ で正常群と有意に異なる

@ $p < 0.05$ で ICV-STZ グループと有意に異なる

3.2 生化学分析における海馬コンテンツ。

我々はいくつかの生化学的解析を行った中で海馬コンテンツのマウスの治療 ICV-STZ するため検討にまで Antia の能力を評価し、アミロイド形成、炎症、オートファジーと酸化ストレス経路を。

3.2.1 Antia は、グルタチオン (GSH) を増加させ、マロンジアルデヒド (MDA) を減少させます。

本研究の保護効果 Antia の治療上の G のレベル glutathione (GSH) と MDA のレベル MDA 海馬コンテンツ WERE CA アウトリニド。で結果図 3A は、ことを示しているアルツハイマー病のマウスモデルだった GSH レベル 15.5% GSH の対照マウスのレベル。一方、Antia のアルツハイマー病マウスでは、用量依存的に GSH 含有量の上昇が見られ、100 mg / kg Antia 治療では対照 GSH レベルの 78.7% で最大化されました。結果のレベル MDA 海馬含有量が示された重要な LYS 高 ER レベル S の

MDA における ICV-STZ マウスを注射した対照マウスと比較して 4.3 倍の係数で。一方、Antia とアルツハイマー病のマウスは、の上昇を示した MDA 含有量 2.5 倍、わずか 3.5 倍、1.8 倍マウスについては receiv で ING の 25、50 および 100mg / kg での用量で Antia をそれぞれ（図 3 B）。

図 3A&B。ICV-STZ を注入したマウスの GSH および MDA 海馬含有量に対する Antia の効果。

* $p < 0.05$ で正常群と有意に異なる

@ $p < 0.05$ で ICV-STZ グループと有意に異なる

$p < 0.05$ で Antia (25 mg / kg) とは大きく異なる

\$ $p < 0.05$ で Antia (50 mg / kg) と大幅に異なる

3.2.2 Antia は腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α)、インターロイキン 6 (IL-6)、および NF- κ B p65 のレベルを低下させます

抗炎症性サイトカインの海馬含有量に対する ICV-STZ 注入イオンの効果を、Antia 治療の存在下および非存在下で調べた。TWO サイトカイン検査：腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α) およびインターロイキン 6 (IL-6)。図中の結果図 4 は STZ モデルマウスは、の有意な増加を示した TNF- α 及び IL-6 サイトカイン対照マウスと比較して、しかし Antia による治療が用量でこの誘導を抑制 dependent T FAS H イオンのレベルに達し 100 mg / kg のコントロール。

同様の傾向 W_s はで見られるの海馬コンテンツ NF- κ B の P65。図 4 の結果は、アルツハイマー病のマウスで NF- κ B p65 のレベルが増加していること、および Antia を投与したアルツハイマー病のマウスで徐々に減少していることも示しています。

図 4 ICV-STZ を注入したマウスの TNF- α 、IL-6、および NF-KB p65 海馬含有量に対する Antia の効果。

*p<0.05 で正常群と有意に異なる

@p<0.05 で ICV-STZ グループと有意に異なる

#p<0.05 で Antia (25 mg / kg) とは大きく異なる

\$p<0.05 で Antia (50 mg / kg) と大幅に異なる

3.2.3 Antia は減少したアミロイド β を \square 表現。

アミロイド β は、これらの通常固体のタンパク質がアミロイド様フィラメントに組み立てるところ、アルツハイマー病のプラークを作るので、我々が調べた E β アミロイドに effect Antia のを ₁₄₂ICV-STZ における海馬コンテンツは、マウスを注入しました。結果描写図で 5 STZ モデルマウスを發揮シヨ一約 4 倍の増加の発現アミロイド β を比較して、対照マウスと。これは、ことに注意することが重要であるレベルの β アミロイドワット ERE significant トンの LY がで減少アルツハイマーメートルの Antia と氷。効果は用量依存的であり、100 mg / kg で最低レベルに達した。

図 5 : ICV-STZ 注射マウスのアミロイド_{β1-42} 海馬含有量に対する Antia の効果。

*p<0.05 で正常群と有意に異なる

@p<0.05 で ICV-STZ グループと有意に異なる

#p<0.05 で Antia (25 mg / kg) とは大きく異なる

\$p<0.05 で Antia (50 mg / kg) と大幅に異なる

3.3 リン酸化 STAT タンパク質発現に対する Antia の効果

リン酸化のレベル STAT および JAK タンパク質発現のは十分メトの確立されている D を使用してアルツハイマー病の研究を。私たちは、Antia による治療を抑制するかどうかを調べるトンの STAT の彼はリン酸化 STZ-マウスでの表現。期待 T 彼の STAT のリン酸化のレベルはタンパク質発現が有意に減少した対照マウスと比較して。ただし STZ の治療- Antia 有するマウスは有意な阻害をもたらしにおけるリン酸化 STAT3 のレベル (図 6A) 。

3.4 JAK2 タンパク質発現のリン酸化イオンに対する Antia の効果

JAK2 タンパク質の発現でも同様の結果の傾向が観察されました。T の reatment と Antia が生じのリン酸化レベルの有意な阻害 JAK2 に起因する STZ 用の注入 (図 6A) 。これらの結果は、JAK2 / STAT3 経路に対する Antia の保護効果を示しています。

p-STAT

p-JAK

図 6A : ICV-STZ 注射マウスの海馬におけるリン酸化 STAT および JAK タンパク質発現に対する Antia の効果

* $p < 0.05$ で正常群と有意に異なる

@ $p < 0.05$ で ICV-STZ グループと有意に異なる

$p < 0.05$ で Antia (25 mg/kg) とは大きく異なる

\$ $p < 0.05$ で Antia (50 mg/kg) と大幅に異なる

3.5 リン酸化 GSK3 β および IKB α タンパク質発現に対する Antia の効果

耳 L 研究 IER があることを示したグリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 (GSK3) は二病理学的特徴、タウタンパク質、神経原線維変化の主要成分をリン酸化、GSK-3 α の阻害はアミロイド斑と神経原線維変化の両方の形成を低減するために新しいアプローチを提供しますアルツハイマー病 (Phiel et al 2003)。図中の結果 6B は、アルツハイマー病のマウスが持っていたことを示しているの高発現 GSK3 β のだったレベル 7 つの折り目

の GSK3 β のレベルコントロールマウスを。一方、Antia による治療は原因と劇的な阻害を式の中の GSK3 β 程度だった 3 倍の制御。

図 6B の結果はまた、アルツハイマー病マウスは、コントロールマウスの IKB α レベルの 6.5 倍である IKB α レベルの高い発現を示した。一方、Antia での処理により、コントロールの約 2.8 倍である IKB α の発現が劇的に抑制されました。

p- GSK3 β

p- IKB α

図 6B : ICV-STZ 注射マウスの海馬におけるリン酸化 GSK3 β および IKB α タンパク質発現に対する Antia の効果

*p<0.05 で正常群と有意に異なる

@p<0.05 で ICV-STZ グループと有意に異なる

#p<0.05 で Antia (25 mg / kg) とは大きく異なる

\$p<0.05 で Antia (50 mg / kg) と大幅に異なる

3.6 mTOR および p-AKT タンパク質発現に対する Antia の効果。

いくつかの研究により、哺乳類のラパマイシン標的 (mTOR) がアミロイドβ およびタウ誘発神経変性に関与する可能性があることが示されました (Oddo 2012)。以前の研究では、AD 症例の内側側頭皮質の Ser2481 でリン酸化された mTOR のレベルが、対照症例と比較して高いことが示されました (Li et al 2005、Griffin et al 2005)。結果図 6C は、あることを示した STZ マウスに注射示し有意の増加したレベルの mTOR 及び P-AKT タンパク質発現を w のこと ERE 5X および 6x より大きい対照マウスのレベルを、それぞれ、しかし Antia による治療が逆その増加をし、近隣にそれをもたらしましたコントロール値のそれ。

mTOR

p-AKT

図 6C : ICV-STZ 注射マウスの海馬における mTOR および p-AKT タンパク質発現に対する Antia の効果

*p<0.05 で正常群と有意に異なる

@p<0.05 で ICV-STZ グループと有意に異なる

#p<0.05 で Antia (25 mg/kg) とは大きく異なる

\$p<0.05 で Antia (50 mg/kg) と大幅に異なる

3.7 Antia は、COX-2 タンパク質発現の上方制御を阻害します。

COX-2 は、炎症プロセスの重要な酵素です。図中の結果 6D は、アルツハイマー病のマウスがあることを示す発揮重要 induc のにシオンを COX-2 発現、すなわちた 600 % の COX-2 対照マウスのレベル、時間 owever の Antia による処置著しく低減の発現 COX-2 に対して 150%-300 %。

COX-2

図 6D : ICV-STZ 注射マウスの海馬における COX-2 タンパク質発現に対する Antia の効果

* $p < 0.05$ で正常群と有意に異なる

@ $p < 0.05$ で ICV-STZ グループと有意に異なる

$p < 0.05$ で Antia (25 mg / kg) とは大きく異なる

\$ $p < 0.05$ で Antia (50 mg / kg) と大幅に異なる

4) ディスカッション

本研究の結果は、抗酸化物質 Antia がマウスで誘導された SAD に対して保護効果を発揮する能力を実証した。Antia は、アミロイド形成、炎症、オートファジー、および酸化ストレス経路などのいくつかのリンクされた経路を標的とすることにより、マウスモデルの認知機能障害を軽減します。

本研究では、STZ によるマウスでの SAD の誘導により、モリス水迷路および NOR テストの有意な認知機能低下が誘発されました。STZ の ICV 注入は、人間の脳に似た SAD の進行性病態を模倣する実験モデルです (Kamat et al.、2016)。モリス水迷路と NOR タスクで示されるように、マウスが見慣れたオブジェクトと新しいオブジェクトを区別できないことに気付くように、STZ 処理マウスは有意な学習および記憶障害を示しました。これは以前の研究と調和しています (Halawany et al.、2017、Abdel Rasheed et al.、2018)。しかし、取得試行中の脱出潜時の大幅な上昇と、Morris 水迷路試験でのプローブトレイル中のターゲットクアドラントで費やされた時間、および NOR での差別と選好指数の増加により、Antia は STZ による障害を予防したことが証明されました空間および短期記憶。オブジェクト認識の記憶不足のこの改善は、アンティアのいくつかの成分の以前に証明された効果に起因する可能性があります。例えば、そのジオスゲニン抗アミロイド形成性効果を有することが示されている

(Lecanu ら 2010; Tohda ら、2013) と、その *Hericium* のハリネズミ属は、AD におけるニューロン損失および認知症に強い神経保護効果を有する (永井ら al.、2006; Kawagishi and Zhuang、2008)。さらに、ヤマブシタケの乾燥粉末の経口投与は、ヒトの軽度認知障害の改善に有効であることが実証されています (Mori et al.、2009)。

STZ 投与は、NF- κ B および抗炎症性サイトカインの海馬内容の発現の有意な増加を示しました。Tumor 壊死因子 α (TNF- α) およびインターロイキン 6 (IL-6)。NF- κ B は、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)、インターロイキン-1 β 、IL-6 および TNF- α を含む炎症性標的遺伝子の転写を誘導するニューロンの炎症反応において重要な役割を果たします (Xiao et al.、2005)。TNF- α は、全身性炎症に関与しています。特に、AD 関連の脳神経炎症、および β -セクレターゼ制御によるアミロイド形成に関与しています。さらに、パーキンソン病やアルツハイマー病などの深刻な神経病理学的変化は、脳内の IL-6 発現の増加と関連しています (Alam、2016)。NF- κ B は、アミロイド β の産生に関与する律速酵素である BACE-1 発現レベルも調節することが示されています。我々の結果は、Antia がアルツハイマー病マウスの TNF- α 、IL-6、および NF- κ B のレベルを低下させることを示しました用量依存的な方法。さらに、Antia のアルツハイマー病マウスは、TNF- α 産生に関連するリン酸化 STAT3 および JAK2 の発現の劇的な阻害を示しました (Huang et al 2008、Nishiki et al 2004)。

神経炎症はオートファジーの不足にリンクされており、これは神経変性に寄与する可能性があります (Zheng et al.、2013)。哺乳類のラパマイシン標的 (mTOR)

は、プロテインキナーゼ B (Akt) とともにオートファジーを調節することが知られています (Jung et al.、2010)。セレン verbal の研究では、AD における mTOR シグナル伝達および A β プラークの存在と認知障害との間に密接な関係を強調 (Paccalin ら 2006、カイら 2012、Pozueta ら 2013、Lafay-Chebassier らは 2005)。また、In は、ヒトおよびラットの研究 AD の、オートファジー活性化に関連している GSK-3 β 阻害剤及びその赤字が見出されたタウの病理学的蓄積は (集約 Zhou ら。、2011 に寄与する Zare-Shahabadi ら。、2015)。我々の結果は、Antia での治療が STZ 注射による mTOR、Akt、IKB α および GSK-3 β レベルの高発現を逆転させ、それを制御のレベルに持っていくことを示しています。

Antia の成分は、さまざまな神経再生および保護特性を持つことが示されています。ヤマブシタケは神経成長因子を合成することが示されました (森 : 2008、Ma : 2010、スペルマン : 2017)。ゴツコラ抽出物は、実験動物のアルツハイマー病にかかった脳のベータアミロイドレベルを低下させました (Dhanasekaran : 2009)。ジオスゲニンは、マウスの認知能力を高めます (Tohda : 2013)。さらに、最近、Antia が酸化ストレスによるミトコンドリア機能不全とヒト末梢血リンパ球のアポトーシスを逆転させる能力があることを *in vitro* で発見しました (Ghoneum : 2019)。以前の研究では、Antia の成分を処理し、GSH、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼの脳内レベルを高め、酸化ストレスバイオマーカーのレベルを阻害するために使用されるヒドロフェラート液である MRN-100 の有益な抗酸化特性が示されましたマロンジアルデヒド (MDA)、一酸化窒素、総フリーラジカルを含む (Badr El-Din : 2010)。以前の研究では、自己凝集中のアミロイド β を介した活性酸素種 (ROS) の生成が、神経細胞の損傷と損傷を引き起こす可能性があることが示されました (Ahmad et al 2017)。グルタチオン (GSH) は、ROS によって引き起こされる損傷を防止する能力を持つ抗酸化剤であり、オリゴメトリックアミロイドベータの酸化および神経毒性の変性から保護する可能性があります (Monks : 1999、Lasierra-Cirujeda : 2013)。この研究の結果は、Antia がアルツハイマー病マウスの GSH を増加させ、MDA レベルを減少させることを示しました。

5) 結論

本研究から、Antia はストレプトゾトシンの脳室内注射によって誘発される認知機能障害に対して有意な保護を発揮すると結論付けることができます。この効果は、アミロイド形成、炎症、酸化ストレス経路を標的とすることで達成されます。JAK2 / STAT3 経路は、SAD などの神経炎症性疾患および神経変性疾患の保護的役割を果たしました。

6) 参考文献