

· 经典名方 ·

六味地黄丸通过PI3K/Akt/FoxO3a通路调控自噬对 SAMP8小鼠记忆功能的影响

宋军营^{1,2,3}, 丁蕊^{1,2,3}, 李俊霖^{1,2,3}, 蔡菊^{1,2,3}, 袁永^{1,3}, 贾亚泉^{1,3}, 张振强^{1,3*}

(1. 河南中医药大学 中医药科学院, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学 医学院, 郑州 450046;
3. 河南省神经退行性疾病防治工程研究中心, 郑州 450046)

[摘要] 目的:探讨六味地黄丸通过磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/叉头框转录因子O3a(FoxO3a)通路调控自噬对快速老化小鼠8型(SAMP8)小鼠记忆功能的影响。方法:6月龄SPF级抗快速老化亚系小鼠(SAMR1)雄性小鼠6只设为正常组,6月龄SPF级SAMP8雄性小鼠24只随机均分为模型组、多奈哌齐组(0.747 mg·kg⁻¹)、六味地黄丸高、低剂量组(2.700、1.350 g·kg⁻¹),灌胃给药2个月。Morris水迷宫法检测各组小鼠学习和记忆能力;尼氏染色观察小鼠皮层、海马神经元;免疫组化(IHC)检测皮层、海马微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)阳性表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组小鼠皮层自噬关键分子酵母ATG6同系物(Beclin1)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、自噬相关基因5(ATG5)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、Caspase-9、Akt、p-Akt、FoxO3a、p-FoxO3a的蛋白表达水平。结果:与正常组小鼠比较,模型组小鼠逃避潜伏期明显延长($P<0.05$, $P<0.01$),穿越平台次数、目标象限停留时间显著减少($P<0.01$);皮层、海马神经细胞数量明显减少、体积缩小,分布疏散,LC3B阳性表达显著增多($P<0.01$);皮层Beclin1、ATG5表达显著升高($P<0.01$),Bcl-2表达水平降低($P<0.01$),Caspase-3、Caspase-9表达水平显著升高($P<0.01$),p-Akt/Akt、p-FoxO3a/FoxO3a表达水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,多奈哌齐组及六味地黄丸高、低剂量组小,3 d逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$, $P<0.01$);穿越平台次数显著增加($P<0.01$);目标象限停留时间显著增加($P<0.01$);多奈哌齐组皮层海马神经元神经细胞数量增多,六味地黄丸高、低剂量组小鼠神经元数目及尼氏体明显增加且分布致密,细胞损伤程度较低;多奈哌齐组及六味地黄丸高、低剂量组皮层、海马LC3B阳性表达显著降低($P<0.01$);六味地黄丸高、低剂量组Beclin1表达显著降低($P<0.01$),多奈哌齐组和六味地黄丸低剂量组ATG5表达显著降低($P<0.01$),多奈哌齐组及六味地黄丸高、低剂量组皮层Bcl-2表达水平显著升高($P<0.01$),Caspase-3表达水平显著降低($P<0.01$),Caspase-9表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),p-Akt/Akt、p-FoxO3a/FoxO3a表达水平显著升高($P<0.01$)。结论:六味地黄丸有效改善了快速老化SAMP8 AD模型小鼠的学习记忆能力,保护神经元,其机制可能与调控PI3K/Akt/FoxO3a信号通路,下调自噬相关因子ATG5、Beclin1和LC3B表达和减少凋亡有关。

[关键词] 六味地黄丸;阿尔茨海默病;自噬;凋亡;叉头框转录因子O3a(FoxO3a)

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R742 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)17-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221540

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220610.1519.002.html>

[网络出版日期] 2022-06-11 9:24

Effect of Liuwei Dihuangwan on Cognitive Ability of SAMP8 Mice by Regulating Autophagy Through PI3K/Akt/FoxO3a Pathway

SONG Junying^{1,2,3}, DING Rui^{1,2,3}, LI Junlin^{1,2,3}, CAI Ju^{1,2,3}, YUAN Yong^{1,3},
JIA Yaquan^{1,3}, ZHANG Zhenqiang^{1,3*}

(1. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046,

[收稿日期] 2022-01-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目(U1504829);中原科技创新领军人才项目(204200510022);河南省高校科技创新团队支持计划项目(21IRTSTHN026);河南省中医药科学研究专项重点课题(2018ZY1009);河南省科技攻关项目(212102311084)

[第一作者] 宋军营,博士,副教授,硕士生导师,从事中西医结合防治神经退行性疾病研究,E-mail:junying1206@126.com

[通信作者] *张振强,博士,教授,博士生导师,从事中西医结合防治脑病基础与临床研究,E-mail:zhang_zhenqiang@126.com

China; 2. School of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;
3. Henan Engineering Research Center for Prevention and Treatment of Neurodegenerative Diseases,
Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Liuwei Dihuangwan on memory function of senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice by regulating autophagy through the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/forkhead box O3a (FoxO3a) pathway. **Method:** Six male senescence-accelerated mouse resistant 1 (SAMR1) mice of SPF grade aging 6 months were assigned to a normal group, and 24 male SAMP8 mice of SPF grade aging 6 months were randomly divided into a model group, a donepezil group ($0.747 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high- and low-dose Liuwei Dihuangwan groups (2.700 and $1.350 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 6 mice in each group. The mice were treated with drugs by gavage for 2 months. Morris water maze was used to detect the learning and memory abilities of mice in each group. Nissl staining was used to observe the neurons in the cortex and hippocampus. The positive expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B) in the cortex and hippocampus was detected by immunohistochemistry (IHC). Western blot was used to detect the protein expression of the mammalian ortholog of yeast ATG6 (Beclin-1), B cell lymphoma-2 (Bcl-2), autophagy-related gene 5 (ATG5), cysteinyl aspartate-specific protease 3 (Caspase-3), Caspase-9, Akt, p-Akt, FoxO3a, and p-FoxO3a. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed prolonged escape latency ($P<0.05$, $P<0.01$), reduced number of platform crossings and the residence time in the target quadrant ($P<0.01$), decreased neurons with reduced volume and dispersed distribution in the cortex and hippocampus, increased positive expression of LC3B ($P<0.01$), elevated expression of Beclin-1 and ATG5 in the cortex ($P<0.01$), declined Bcl-2 expression ($P<0.01$), up-regulated Caspase-3 and Caspase-9 expression ($P<0.01$), and decreased expression levels of p-Akt/Akt and p-FoxO3a/FoxO3a ($P<0.01$). Compared with the model group, the donepezil group and the Liuwei Dihuangwan groups showed shortened 3 d escape latency ($P<0.05$, $P<0.01$), increased number of platform crossings ($P<0.01$), and prolonged residence time in the target quadrant ($P<0.01$). In the donepezil group, the number of neurons in the cortex and hippocampus was increased. In the Liuwei Dihuangwan groups, the number of neurons and Nissl bodies increased with denser distribution and lower degree of cell damage. The positive expression of LC3B in the cortex and hippocampus was decreased in the donepezil group and Liuwei Dihuangwan groups ($P<0.01$). The expression of Beclin-1 was decreased in the Liuwei Dihuangwan groups ($P<0.01$). The expression of ATG5 was decreased in the donepezil group and the low-dose Liuwei Dihuangwan group ($P<0.01$). The donepezil group and the Liuwei Dihuangwan groups showed the increased expression level of Bcl-2 in the cortex ($P<0.01$), decreased expression level of Caspase-3 ($P<0.01$), reduced expression level of Caspase-9 ($P<0.05$, $P<0.01$), and elevated expression levels of p-Akt/Akt and p-FoxO3a/FoxO3a ($P<0.01$). **Conclusion:** Liuwei Dihuangwan can effectively improve the learning and memory abilities of the SAMP8 mice and protect neurons. Its mechanism may be related to the regulation of the PI3K/Akt/FoxO3a signaling pathway, down-regulation of the expression of ATG5, Beclin-1, and LC3B, and the inhibition of apoptosis.

[Keywords] Liuwei Dihuangwan; Alzheimer's disease; autophagy; apoptosis; forkhead box O3a (FoxO3a)

阿尔茨海默病(AD)属于神经退行性疾病,病程呈进行性,临床表现为理解、判断力下降,语言障碍,空间定向障碍和人格改变等,是常见的老年性疾病之一。AD发病率与年龄呈正相关,随着老龄化问题加剧,AD发病率呈上升趋势,预计至2050年,痴呆患

病人数将达到1.52亿,其中AD患者约占60%~70%^[1],AD逐渐成为威胁老年人健康的重要疾病之一。自噬是细胞内重要的降解途径,能清除受损细胞器、错误折叠蛋白和入侵的致病菌等,对于维持神经元内稳态具有重要作用。有大量研究表明,

自噬异常是促使AD发展因素之一。磷脂酰肌醇3-激酶(P13K)及其下游效应子蛋白激酶B(Akt)与多种AD致病因素相关,如 β 淀粉样蛋白(A β)沉积、Tau蛋白过度磷酸化、细胞凋亡、神经炎症^[2]和神经元丢失等^[3]。叉头框转录因子O3a(FoxO3a)是P13K/Akt的效应因子,研究发现^[4],FoxO3a参与自噬的调节,但在AD疾病发生发展中的作用还不清楚。

AD在中医中属于“痴呆”范畴,清代王清任《医林改错》记载:“年高无记性者,脑髓渐空也。”肾主骨髓,肾精与脑具有密切联系,痴呆的发生可归于肾精的减少^[5]。六味地黄丸是滋阴补肾的经典名方,有滋阴填精、补益肝肾之功效。有研究表明,六味地黄丸能够改善AD患者的记忆、智力和精神行为^[6]。结合网络药理学研究发现,六味地黄丸可通过调控A β 聚集、tau蛋白磷酸化、凋亡、氧化应激反应、炎症等发挥治疗AD的作用^[7]。课题组前期研究发现六味地黄丸调控血脑屏障晚期糖基化终产物受体(RAGE)/低密度脂蛋白受体相关蛋白1(LRP1)系统保护脑微血管改善快速老化小鼠易感8(SAMP8)AD小鼠的学习记忆^[8]。同时,也发现六味地黄丸含药血清能够通过调节VEGF表达影响保护A β_{25-35} 损伤的PC12细胞^[9],及调节A β_{25-35} 刺激PC12细胞中FoxO3a的磷酸化状态,保护神经元,但具体机制需要进一步研究^[10]。

本实验以SAMP8小鼠为AD模型^[11],加以六味地黄丸干预,探究六味地黄丸对AD小鼠学习记忆的影响及是否通过调控P13K/Akt/FoxO3a影响AD小鼠神经元自噬和凋亡。

1 材料

1.1 动物 SAMP8可表现出AD发病机制的大部分特征,如氧化应激、炎症、淀粉样蛋白的异常表达、tau过度磷酸化、异常自噬活动等^[12]。SAMP8常作为肾精亏虚型AD模型^[13],SAMR1小鼠具有与其他品系正常小鼠相仿的生理过程,一般作为SAMP8小鼠的正常对照。选用6月龄SPF级雄性SAMR1小鼠6只、SAMP8小鼠24只,体质量(30 \pm 5)g,购自北京华阜康实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(京)2020-0004,动物质量合格证号37009200004690。本实验通过河南中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(No. DWLL201903268)。

1.2 药品与试剂 六味地黄丸(仲景宛西制药股份有限公司,批号18110401),盐酸多奈哌齐[卫材(中

国)药业有限公司,批号1701069]。参照《中药药理学实验方法》计算给药量,将六味地黄丸溶于生理盐水中制成悬浊液,六味地黄丸每8丸相当于原生药材3g。参照实验室前期研究基础,本次实验六味地黄丸灌胃剂量为低剂量相当于成人(60kg)1倍剂量,即1.350g \cdot kg⁻¹,高剂量为成人剂量的2倍,即2.700g \cdot kg⁻¹,阳性药盐酸多奈哌齐为0.747mg \cdot kg⁻¹,每日1次。FoxO3a、p-FoxO3a、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(中国Abways公司,批号分别为F057302、F062107、F068409),胱天蛋白酶(Caspase)-3抗体(中国Proteintech公司,批号10013378),LC3B抗体(美国GeneTex公司,批号43565),皮层自噬关键分子酵母ATG6同系物(Beclin1)、磷酸化(p)-Akt、Akt抗体(美国Abcam公司,批号分别为GR3198372-13、GR242901-32、GR240003-93),Caspase-9(美国Bioworld公司,批号XS2021052),Bcl-2、自噬相关基因5(ATG5)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗、HRP标记的羊抗鼠二抗(中国Boster公司,批号分别为BST17174985、BST17664603、BST15J22C15K55、BST16K30C16L50),RIPA裂解液、蛋白磷酸酶抑制剂、BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20200826、20211010、20210406),甲苯胺蓝染液(中国Servicebio公司,批号Ac20220106024)。

1.3 仪器 Multiskan GO型酶标仪、Fresco 21型台式冷冻离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司),Morris水迷宫(深圳瑞沃德生命科技有限公司),EG1150型石蜡包埋机、RM2245型石蜡切片机(德国Leica公司);AL204型精密电子秤(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),KZ-III-F型高速低温组织研磨仪(武汉塞维尔生物科技有限公司),Mini-ProteanTetra型电泳转膜仪、Mini-PROTEAN型自动凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 6月龄SPF级SAMP8雄性小鼠24只随机均分为模型组、多奈哌齐组、六味地黄丸高、低剂量组,6只6月龄SPF级SAMR1小鼠设为正常组。每天上午9:00开始灌胃,参照小鼠体质量,小鼠灌胃体积为10mL \cdot kg⁻¹,正常组和模型组给予等体积生理盐水,连续灌胃2个月。

2.2 用Morris水迷宫实验测定小鼠学习记忆能力 小鼠灌胃给药2个月后进行行为学实验。水迷宫装置是一个圆形水箱,圆形水池分为4个面积相等

的象限,在其中一个象限的中点放置一个略高于水面的平台。使用视频跟踪系统监测和分析小鼠的游泳行为。对小鼠进行连续5 d的训练,计算逃逸潜伏期时间。第6天撤掉平台每只小鼠在池中搜索平台60 s,以小鼠在目标象限中花费的时间以及跨越平台次数评估记忆巩固的程度。

2.3 标本采集与制备 动物禁食12 h后,每组各3只进行腹腔注射麻醉,固定四肢,剪开胸腔,充分暴露心脏,进行心脏灌注。灌注后断头在冰盒上取出全脑,4%多聚甲醛溶液充分浸泡,24 h后更换固定液,固定后石蜡包埋、切片、片厚4 μm ,后续进行尼氏染色、免疫组化实验;每组余下的3只小鼠断头取脑,在冰盒上剥离出皮层和海马,液氮快速冷冻后于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,后续提取蛋白进行蛋白免疫印迹法(Western blot)实验。

2.4 尼氏染色观察皮层和海马神经元 将各组小鼠皮层、海马组织的石蜡切片染色:二甲苯脱蜡,蒸馏水冲洗,甲苯胺蓝染液染色37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中30 min,然后切片用蒸馏水冲洗,再用70%乙醇浸泡3 min,80%乙醇浸泡3 min,95%乙醇中浸泡3 min,100%乙醇I中浸泡2 min,100%乙醇II中浸泡2 min,二甲苯透明,中性树脂胶封片,镜检。

2.5 免疫组化测定皮层、海马LC3B表达 取各组小鼠皮层、海马组织石蜡切片,进行常规脱蜡、抗原修复后,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3次,每次3 min,血清封闭后37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。加完一抗LC3B(1:500)后在4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中孵育过夜,PBS冲洗,HRP标记的二抗37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min,PBS水洗后使用DAB显色。苏木素复染,脱水、透明并用中性树脂密封。封片后于显微镜下观察。

表1 六味地黄丸对SAMP8小鼠定位航行能力的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Liuwei Dihuangwan(LWDHW) on place navigation in SAMP8 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	逃避潜伏期/s				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
正常组		56.78±2.79	52.71±4.56	47.42±2.27	43.70±2.90	37.68±4.70
模型组		59.72±0.68 ¹⁾	58.63±2.60 ¹⁾	55.91±6.37 ²⁾	59.91±0.22 ²⁾	50.94±5.35 ²⁾
多奈哌齐组	0.747×10 ⁻³	56.33±2.53	53.27±5.34	47.43±4.06 ⁴⁾	46.47±4.35 ⁴⁾	37.17±3.42 ⁴⁾
六味地黄丸高剂量组	2.700	56.81±3.90	49.45±6.80 ⁴⁾	47.91±6.78 ³⁾	43.15±5.34 ⁴⁾	38.53±6.09 ⁴⁾
六味地黄丸低剂量组	1.350	56.49±2.57	44.84±2.56 ⁴⁾	41.63±4.43 ⁴⁾	46.62±5.44 ⁴⁾	37.24±6.78 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2-表6同)

3.2 对SAMP8皮层、海马神经元的影响 尼氏染色结果显示,与正常组小鼠比较,模型组小鼠神经细胞数量明显减少、体积缩小,分布疏散,轮廓欠清

2.6 Western blot检测皮层Bcl-2、Beclin1、ATG5、Caspase-3、Caspase-9、Akt、p-Akt、FoxO3a、p-FoxO3a蛋白表达 取出皮层组织放入研磨管中,加入裂解液,研磨后4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,抽取上清液。使用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性冷却后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳。然后利用湿转法转膜,将蛋白转至硝酸纤维素膜(PVDF)上。把PVDF膜放入5%脱脂奶粉(TBST配制)缓冲液中,室温摇床封闭2 h,加入一抗Bcl-2、Beclin1、ATG5、Caspase-3、Caspase-9、Akt、p-Akt、FoxO3a、p-FoxO3a(1:1 000),GAPDH(1:3 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,用TBST洗膜3次,5 min/次。HRP标记的羊抗兔二抗(1:1万)室温孵育条带60 min,用TBST洗膜3次,10 min/次。使用ECL化学发光液进行曝光、显影,Image J图像分析软件定量分析Western blot各条带的灰度值,以目标条带和GAPDH的灰度值比值表达其相对含量。

2.7 统计学处理 采用SPSS 21.0统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差异法(LSD)- t 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对SAMP8小鼠空间学习记忆能力的影响 与正常组比较,模型组小鼠逃避潜伏期明显延长($P<0.05, P<0.01$),穿越平台次数、目标象限停留时间显著减少($P<0.01$);与模型组比较,多奈哌齐、六味地黄丸高、低剂量干预后小鼠逃避潜伏期显著缩短($P<0.05, P<0.01$),多奈哌齐、六味地黄丸高、低剂量干预后小鼠穿越平台次数显著增加($P<0.01$),目标象限停留时间显著增加($P<0.01$)。见表1和表2。

晰。与模型组小鼠对比,多奈哌齐干预后,皮层海马神经元神经细胞数量增多,六味地黄丸高、低剂量组小鼠神经元数目及尼氏体明显增加且分布致

表2 六味地黄丸对SAMP8小鼠空间探索能力的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of LWDHW on spatial capacity in SAMP8 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	跨越平台 /次	目标象限停留 时间/s
正常组		2.60±0.55	34.97±4.67
模型组		0.40±0.55 ²⁾	16.02±6.19 ²⁾
多奈哌齐组	0.747×10 ⁻³	1.60±0.55 ⁴⁾	29.24±6.91 ⁴⁾
六味地黄丸高剂量组	2.700	1.60±0.55 ⁴⁾	27.45±5.34 ⁴⁾
六味地黄丸低剂量组	1.350	2.40±0.55 ⁴⁾	30.47±4.21 ⁴⁾

密,细胞损伤程度较低。见图1。

3.3 对SAMP8小鼠皮层、海马LC3B表达的影响

免疫组化结果中皮层、海马组织中LC3B阳性表达呈棕黄色或黄褐色。与正常组比较,模型组皮层、海马LC3B表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组皮层、海马LC3B表达显著降低($P<0.01$);六味地黄丸高剂量组皮层、海马LC3B表达显著降低($P<0.01$);六味地黄丸低剂量组皮层、海马LC3B表达显著降低($P<0.01$)。见图2、表3。

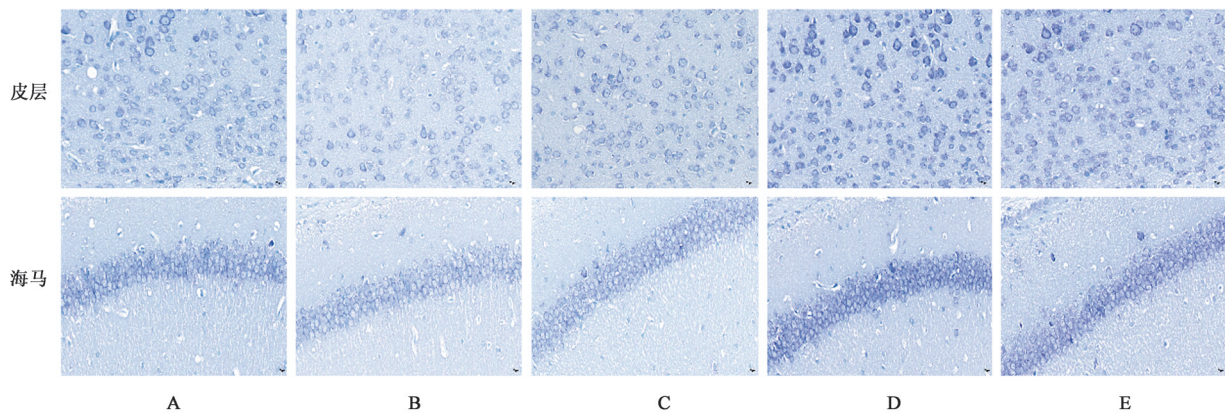
表3 六味地黄丸对SAMP8小鼠皮层、海马LC3B表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of LWDHW on expression of LC3B in cortical and hippocampus brain tissues of mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	皮层LC3B	海马LC3B
正常组		142.97±6.26	145.09±2.19
模型组		169.41±1.83 ²⁾	160.32±3.97 ²⁾
多奈哌齐组	0.747×10 ⁻³	141.15±2.73 ⁴⁾	146.59±2.23 ⁴⁾
六味地黄丸高剂量组	2.700	130.36±3.92 ⁴⁾	137.89±3.01 ⁴⁾
六味地黄丸低剂量组	1.350	154.37±1.47 ⁴⁾	151.66±0.23 ⁴⁾

3.4 对SAMP8小鼠皮层自噬相关蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组Beclin1、ATG5表达显著升高($P<0.01$),Bcl-2表达水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,多奈哌齐组Bcl-2表达水平显著升高($P<0.01$),ATG5表达显著降低($P<0.01$),Beclin1的表达差异无统计学意义;与模型组比较,六味地黄丸高剂量组Beclin1表达量显著降低($P<0.01$),Bcl-2表达水平显著升高($P<0.01$),ATG5差异无统



注:A.正常组;B.模型组;C.多奈哌齐组;D.六味地黄丸高剂量组;E.六味地黄丸低剂量组(图2-图5同)

图1 六味地黄丸对SAMP8小鼠皮层、海马神经元的影响(尼氏染色,×400)

Fig. 1 Effect of LWDHW on neurons of cortex and hippocampus in SAMP8 mice (Nissl, ×400)

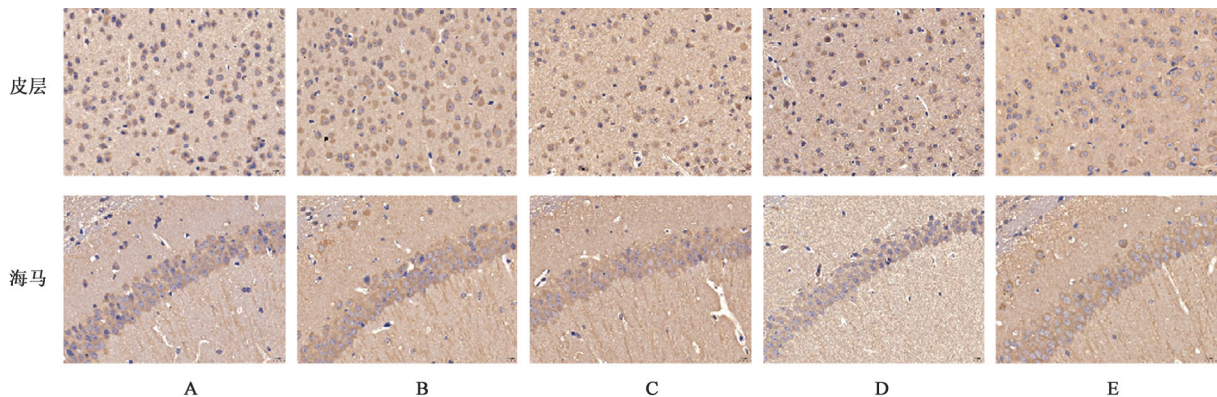


图2 各组小鼠皮层、海马LC3B表达情况(免疫组化,×400)

Fig. 2 Expression of LC3B in cortex and hippocampus of each group of mice (IHC, ×400)

计学意义;六味地黄丸低剂量组 Beclin1 表达显著降低 ($P<0.01$), Bcl-2 表达水平显著升高 ($P<0.01$), ATG5 表达显著降低 ($P<0.01$)。见图3、表4。

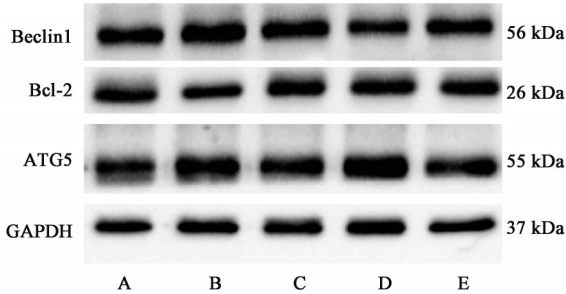


图3 各组小鼠皮层组织 Beclin1、Bcl-2、ATG5 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of Beclin1, Bcl-2 and ATG5 protein expression in brain tissues of each group

表4 六味地黄丸对各组小鼠皮层组织 Beclin1、Bcl-2、ATG5 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of LWDHW on expression of Beclin1, Bcl-2 and ATG5 in brain tissues of each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	Beclin1 /GAPDH	Bcl-2 /GAPDH	ATG5 /GAPDH
正常组		0.86±0.02	0.95±0.02	1.12±0.01
模型组		0.91±0.01 ²⁾	0.81±0.02 ²⁾	1.31±0.04 ²⁾
多奈哌齐组	0.747×10 ⁻³	0.89±0.01	1.03±0.01 ⁴⁾	1.11±0.01 ⁴⁾
六味地黄丸高剂量组	2.700	0.62±0.01 ⁴⁾	0.98±0.01 ⁴⁾	1.29±0.01
六味地黄丸低剂量组	1.350	0.76±0.02 ⁴⁾	0.95±0.03 ⁴⁾	1.09±0.03 ⁴⁾

3.5 对 SAMP8 小鼠皮层凋亡蛋白 Caspase-3、Caspase-9 表达的影响 与正常组比较,模型组 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组、六味地黄丸高、低剂量组 Caspase-3 表达水平显著降低 ($P<0.01$), Caspase-9 表达明显降低 ($P<0.05, P<0.01$)。见图4、表5。

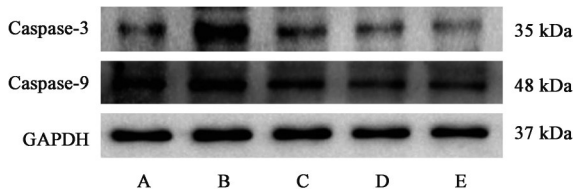


图4 各组小鼠皮层组织 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of Caspase-3 and Caspase-9 protein expression in brain tissues of each group

3.6 对 SAMP8 小鼠皮层 p-Akt /Akt 和 p-FoxO3a/FoxO3a 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 p-Akt/Akt、p-FoxO3a/FoxO3a 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组、六味地黄丸高、低剂量组 p-Akt/Akt、p-FoxO3a/FoxO3a 蛋白表

表5 六味地黄丸对各组小鼠皮层组织 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of LWDHW on expression of Caspase-3 and Caspase-9 in brain tissues of each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	Caspase-3 /GAPDH	Caspase-9 /GAPDH
正常组		0.42±0.03	0.27±0.02
模型组		0.76±0.03 ²⁾	0.36±0.02 ²⁾
多奈哌齐组	0.747×10 ⁻³	0.45±0.02 ⁴⁾	0.33±0.01 ³⁾
六味地黄丸高剂量组	2.700	0.38±0.02 ⁴⁾	0.31±0.01 ⁴⁾
六味地黄丸低剂量组	1.350	0.34±0.02 ⁴⁾	0.27±0.02 ⁴⁾

达水平显著升高 ($P<0.01$)。见图5、表6。

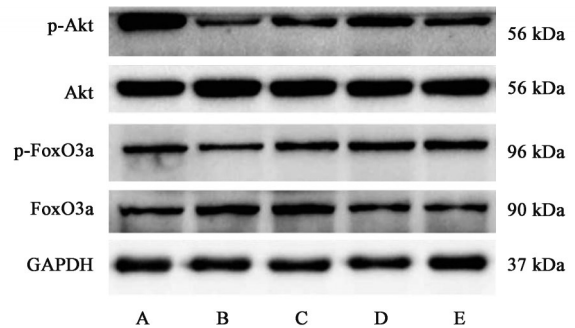


图5 各组小鼠皮层组织 p-Akt、Akt、p-FoxO3a、FoxO3a 蛋白表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of p-Akt, Akt, p-FoxO3a and FoxO3a protein expression in brain tissues of each group

表6 六味地黄丸对各组小鼠皮层组织 Akt、p-Akt、FoxO3a、p-FoxO3a 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of LWDHW on expression of Akt, p-Akt, FoxO3a and p-FoxO3a in brain tissues of each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	p-Akt/Akt	p-FoxO3a /FoxO3a
正常组		0.99±0.02	1.46±0.03
模型组		0.40±0.01 ²⁾	0.73±0.02 ²⁾
多奈哌齐组	0.747×10 ⁻³	0.54±0.01 ⁴⁾	0.95±0.02 ⁴⁾
六味地黄丸高剂量组	2.700	0.68±0.01 ⁴⁾	1.51±0.03 ⁴⁾
六味地黄丸低剂量组	1.350	0.57±0.01 ⁴⁾	1.74±0.03 ⁴⁾

4 讨论

AD 在近代中医的病名为“老年呆病”“老年痴呆”等^[14]。痴呆病位在脑,与心、肝、脾、肾功能失调相关,但其关键在于肾。《黄帝内经·灵枢·经脉》中有“人始生,先成精,精成而后脑髓生。”可见肾精不足不能充养脑髓,脑髓消减以致神机失用,进而发展成痴呆症状^[15-16]。随着中医中药的现代化发展,中医药在 AD 中应用价值得到普遍关注。宋代钱乙《小儿药证直诀》中的滋阴补肾的代表方—六味地

黄丸,可以起到抗氧化,保护脑细胞,改善脑功能的作用^[17],在老年病的防治方面具有重要作用。六味地黄丸三补三泻,以补为主。方中熟地黄为君,山萸肉、山药共为臣药,三药配合,补肝脾肾三阴之不足,且重在补肾,是为“三补”。牡丹皮、泽泻、茯苓三药合用,可泻肝脾肾三阴虚火湿浊,是为“三泻”。有研究发现六味地黄丸可有效抑制细胞炎症反应,调节学习记忆能力,进而改善AD相关病理^[18]。并且临床研究表明,六味地黄丸用于治疗老年痴呆伴精神行为异常患者具有较好临床疗效^[19]。本实验以肾精亏虚型SAMP8小鼠作为AD动物模型,实验发现SAMP8小鼠学习记忆能力显著下降。采用治疗药物六味地黄丸干预后,AD小鼠学习记忆能力得到了明显改善。这提示了六味地黄丸能够改善SAMP8小鼠的学习记忆能力,但具体的分子机制需要进一步研究。

有研究报道自噬可能参与AD的发病机制^[20]。研究也发现在许多AD动物模型和AD患者的大脑中检测到自噬小体增加。自噬是维持细胞内环境稳定的主要机制之一,降解和回收异常折叠积聚的蛋白质以及衰老、损伤的细胞器等^[21]。然而,自噬是一把双刃剑,过度自噬也会导致神经元凋亡^[22]。在神经退行性疾病中,自噬功能异常无法降解细胞内的异常蛋白,并且导致神经干细胞增殖、分化异常,导致学习记忆能力下降^[23]。在对自噬机制研究过程中发现有趣现象,不同月龄的SAMP8小鼠中自噬的特异性标记物Beclin1、LC3等表达水平发生不同的变化,神经元的结构也发生明显改变^[24-25],推测自噬活性可能与AD的病程发展密切相关。在AD发生初期增加,随着病程进展,发生自噬障碍或自噬-溶酶体清除途径障碍导致神经元凋亡,致使自噬溶酶体在神经元内堆积,随着机体衰老,自噬水平下降,这一详细机制还需要进一步探究。

本研究8月龄SAMP8小鼠脑组织自噬情况,结果发现模型组Beclin1、ATG5、LC3表达水平升高, Bcl-2表达下降,凋亡基因Caspase-3、Caspase-9蛋白表达上调,同时尼氏染色观察到神经元损伤。这与研究报道7月龄SAMP8小鼠的神经元自噬情况相似^[25],说明AD模型小鼠大脑神经元自噬水平上调,可能发生自噬障碍。六味地黄丸给药组Bcl-2表达增加,Beclin1、ATG5、LC3B、Caspase-3、Caspase-9蛋白表达降低,这表明六味地黄丸能够调控自噬,减少凋亡,从而保护神经元。Beclin1作为自噬启动的关键蛋白与各种自噬相关疾病有关,例如神经退行

性疾病、心脏病、癌症等^[26]。Bcl-2是重要的抗凋亡蛋白,正常生理条件下与Beclin1结合,使自噬保持在基础水平。当应激或炎症反应发生时Bcl-2与Beclin1分离,激活自噬。LC3B蛋白是重要的自噬相关蛋白,通过结合自噬体膜完成脂质化修饰形成LC3B II蛋白。当自噬发生时,LC3 I被活化转变为LC3 II,通常以LC3 II/LC3 I值判断自噬水平的高低^[27]。ATG5是自噬体形成的关键调控者之一,还参与细胞死亡进程,ATG5的异常表达使细胞对凋亡刺激更为敏感^[28]。本实验仅采用六味地黄丸干预8月龄SAMP8小鼠探讨AD自噬变化不够全面,后续实验需要进一步探讨六味地黄丸对不同月龄SAMP8小鼠自噬水平的调节作用,为AD的早期预防提供实验依据。

FoxO3a蛋白是首个被发现具有诱导果蝇幼虫体内自噬发生的转录因子。FoxO3a能够诱导多种自噬相关基因如LC3B、Beclin1等的转录表达。FoxO3a受其上游PI3K/Akt信号通路的调控,参与调节下游细胞增殖/凋亡相关靶基因的转录表达^[29]。Akt使FoxO3a磷酸化,促进FoxO3a与14-3-3蛋白结合,导致其从细胞核转运到细胞质,失去转录活性。反之,当Akt活性下降,FoxO3a在细胞核内表达水平升高,进而发挥其对自噬的调控能力。本次的研究结果显示,模型组中p-Akt、p-FoxO3a蛋白表达水平下降,FoxO3a表达水平上升,使用六味地黄丸干预之后,则逆转了这一现象。这说明六味地黄丸可上调PI3K/Akt磷酸化水平,促进FoxO3a的磷酸化增强,提示六味地黄丸对AD小鼠神经保护作用,可能与调节PI3K/Akt/FoxO3a通路有关。

综上,本研究表明六味地黄丸有效改善了快速老化SAMP8 AD模型小鼠的学习记忆能力,保护神经元,其机制可能与调控PI3K/Akt/FoxO3a信号通路,下调自噬相关因子ATG5、Beclin1和LC3B表达和减少凋亡有关。本研究结果为进一步深化六味地黄丸临床应用防治早期AD提供科学的理论基础,但其详细作用机制仍需进一步探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ZHANG Y, LI Y, MA L. Recent advances in research on Alzheimer's disease in China[J]. J Clin Neurosci, 2020, 81: 43-46.
- [2] ALI T, KIM T, REHMAN S U, et al. Natural dietary supplementation of anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 pathways mitigate oxidative stress,

- neurodegeneration, and memory impairment in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(7):6076-6093.
- [3] LI H, KANG T, QI B, et al. Neuroprotective effects of ginseng protein on PI3K/Akt signaling pathway in the hippocampus of *D*-galactose/AlCl₃ inducing rats model of Alzheimer's disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179:162-169.
- [4] HIN H R, KIM H, KIM K I, et al. Epigenetic and transcriptional regulation of autophagy[J]. *Autophagy*, 2016, 12(11):2248-2249.
- [5] 矫增金,陈民. 论老年性痴呆中医病因病机[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016, 18(6):58-60.
- [6] 张春梅. 六味地黄丸配合治疗老年痴呆症的临床研究[J]. *中医临床研究*, 2012, 4(19):88, 90.
- [7] 张运辉,周小青,伍大华,等. 基于网络药理学研究六味地黄丸治疗阿尔茨海默病作用机制[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(2):154-160.
- [8] 贾亚泉,宋军营,袁永,等. 六味地黄丸通过 RAGE/ LRP1 受体介导对 SAMP8 小鼠脑微血管的调节作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, doi: 10. 13422/j. cnki. syfjx. 20220804.
- [9] 宋军营,袁永,张振强,等. 六味地黄丸含药血清对 β -淀粉样蛋白损伤大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞的保护作用研究[J]. *中国全科医学*, 2017, 20(30):3763-3769.
- [10] 袁永,宋军营,王丛笑,等. 六味地黄丸含药血清对 β -淀粉样蛋白损伤 PC12 细胞中 FoxO3a/p-FoxO3a 蛋白表达的影响[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2022, 24(1):320-327.
- [11] 贾亚泉,宋军营,曾华辉,等. 阿尔茨海默病动物模型研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(3):381-386.
- [12] LIU B, LIU J, SHI J S. SAMP8 Mice as a model of age-related cognition decline with underlying mechanisms in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2020, 75(2):385-395.
- [13] 狄波,李澎涛,潘彦舒,等. 快速老化小鼠和脑内注射 A β ₁₋₄₀ 小鼠模型的神经行为学差异[J]. *河南中医*, 2012, 32(8):993-995.
- [14] 崔远武,张玉莲. 中医对老年性痴呆的认识和辨证思路分析[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(5):1419-1422.
- [15] 张运辉,周小青,伍大华,等. 中药复方治疗阿尔茨海默病的临床研究进展[J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(10):1275-1278.
- [16] 迟淑梅,沈涌. 补肾填精益髓方联合西药治疗阿尔茨海默病临床研究[J]. *新中医*, 2018, 50(7):71-74.
- [17] 张力,李方玲,马丽. 六味地黄丸联合西药治疗轻度阿尔茨海默病的临床观察[J]. *世界中医药*, 2017, 12(11):2659-2661, 2665.
- [18] 崔勇. 六味地黄丸对 APP/PS1 双转基因小鼠 TLR4/ NF- κ B 信号通路影响的实验研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2016.
- [19] 古剑珂,罗海龙,张准. 探讨六味地黄丸和奥氮平对老年痴呆患者精神症状改善的效果[J]. *中医临床研究*, 2018, 10(14):66-67, 69.
- [20] ZHANG Z, YANG X, SONG Y Q, et al. Autophagy in Alzheimer's disease pathogenesis: Therapeutic potential and future perspectives[J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 72:101464.
- [21] OCZYPOK E A, OURY T D, CHU C T. It's a cell-eat-cell world: Autophagy and phagocytosis [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(3):612-622.
- [22] HAN K, KIM J, CHOI M. Autophagy mediates phase transitions from cell death to life [J]. *Heliyon*, 2015, 26, 1(1):e00027.
- [23] 马瑞,胡海燕. 神经退行性疾病中的自噬与再生研究进展[J]. *神经解剖学杂志*, 2019, 35(6):680-684.
- [24] XU TT, LI H, DAI Z, et al. Spermidine and spermine delay brain aging by inducing autophagy in SAMP8 mice[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 8, 12(7):6401-6414.
- [25] MA Q, QIANG J, GU P, et al. Age-related autophagy alterations in the brain of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice [J]. *Exp Gerontol*, 2011, 46(7):533-541.
- [26] KAUR S, CHANGOTRA H. The beclin 1 interactome: Modification and roles in the pathology of autophagy-related disorders[J]. *Biochimie*, 2020, 175:34-49.
- [27] 郑知强. 氧化苦参碱介导细胞自噬减轻溃疡性结肠炎小鼠结肠黏膜氧化性损伤的作用机制研究[J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(16):2014-2019.
- [28] CHEN J, ZHANG L, ZHOU H, et al. Inhibition of autophagy promotes cisplatin-induced apoptotic cell death through Atg5 and Beclin 1 in A549 human lung cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5):6859-6865.
- [29] LINK W. Introduction to FOXO Biology[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1890:1-9.

[责任编辑 孙丛丛]