

· 药理 ·

四君子丸对 SAMP8 小鼠海马 CA3 区神经元 Lon 蛋白表达的影响

刘旭东, 任路*, 马丹, 王松楠, 于化新, 王凌志, 刘慧慧, 赵丹玉, 单德红
(辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

[摘要] 目的:研究 SAMP8 小鼠海马 Lon 蛋白及线粒体动力学相关蛋白表达变化,为健脾益气法治疗阿尔茨海默病提供理论依据。方法:3月龄 SAMR1 小鼠 8 只作为正常组,3月龄 SAMP8 小鼠 32 只分为模型组、多奈哌齐组(0.013 g·kg⁻¹)、四君子丸低、高剂量组(3.24、12.56 g·kg⁻¹),每组 8 只,多奈哌齐组灌胃多奈哌齐,四君子丸低、高剂量组灌胃四君子丸溶液,灌胃 30 d;第 25 天开始水迷宫定位航行实验,第 30 天开始水迷宫空间探索实验;第 30 天取材后,免疫组化检测线粒体融合蛋白 2(MFN2)蛋白表达变化,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)表达,比色法检测三磷酸腺苷(ATP)含量,电镜检测神经元线粒体微观结构变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 β 淀粉样蛋白(A β)、Lon 蛋白、线粒体动力相关蛋白 1(DRP1)蛋白、MFN1 蛋白表达变化。结果:与正常组比较,模型组小鼠逃避潜伏期时间增加、穿越次数减少、AMPK 表达上调,ATP 含量降低,A β 蛋白表达升高($P<0.01$),DRP1 蛋白表达显著升高($P<0.01$),Lon、MFN1 蛋白表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),MFN2 蛋白减少,线粒体空泡化增加,嵴断裂;与模型组比较,四君子丸低、高剂量组逃避潜伏期时间减少($P<0.01$)、穿越次数明显增加($P<0.05$),AMPK 表达下调($P<0.01$);四君子丸高剂量组 ATP 含量显著升高($P<0.01$),A β 、DRP1 蛋白表达下调($P<0.05$, $P<0.01$);MFN1 蛋白表达上调($P<0.05$),四君子丸低剂量组空泡化较为明显,四君子丸高剂量组空泡化有所恢复,嵴较为清晰。结论:四君子丸可以通过上调 Lon 蛋白表达变化、纠正线粒体分裂融合蛋白紊乱,改变 SAMP8 小鼠的记忆功能,达到治疗阿尔茨海默病的目的。

[关键词] 四君子丸; 阿尔茨海默病; Lon 蛋白; 海马; 线粒体

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)24-0035-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221836

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220818.1603.004.html>

[网络出版日期] 2022-08-19 9:39

Effect of Si Junziwan on Expression of Lon Protein in Hippocampal CA3 Region of SAMP8 Mice

LIU Xudong, REN Lu*, MA Dan, WANG Songnan, YU Huaxin, WANG Lingzhi, LIU Huihui,
ZHAO Danyu, SHAN Dehong
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression changes of Lon protein and mitochondrial dynamics-related protein in the hippocampus of SAMP8 mice and provide a theoretical basis for the treatment of Alzheimer's disease by invigorating the spleen and supplementing Qi. **Method:** Eight 3-month-old SAMR1 mice were used as the normal group, and 32 3-month-old SAMP8 mice were divided into model group, western medicine group (0.013 g·kg⁻¹), low-dose Si Junziwan group (3.24 g·kg⁻¹), and high-dose Si Junziwan group (12.56 g·kg⁻¹), with 8 mice in each group. The western medicine group was gavaged with donepezil, and the Si Junziwan low- and high-dose groups were gavaged with Si Junziwan for 30 days. The positioning navigation

[收稿日期] 2022-01-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81803854);辽宁省教育厅基础科研项目(L202006)

[第一作者] 刘旭东,博士,副教授,从事中医药对老年疾病治疗及机制研究,E-mail:adong11@163.com

[通信作者] *任路,博士,教授,从事中医药治疗中医情志病基础与临床研究,E-mail:renlu2008.student@sina.com

experiment of the water maze was started on the 25th day, and the space exploration experiment of the water maze was started on the 30th day. On the 30th day, the protein expression of mitofusin 2 (MFN2) was detected by immunohistochemistry, the expression of adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the content of ATP was detected by colorimetry, the microstructure of neuron mitochondria was detected by electron microscope, and the expressions of A β protein, Lon protein, dynamin-related protein 1 (DRP1) protein, and MFN1 protein were detected by Western blot. **Result:** As compared with the normal group, the latency escape period increased, the number of crossings decreased, the expression of AMPK increased, and the content of ATP decreased in the model group. The expressions of A β protein and DRP1 protein increased ($P<0.01$), whereas the expressions of Lon protein, MFN1 protein decreased in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$), and MFN2 protein decreased. The vacuolation of mitochondria increased and the cristae broke in the model group. As compared with model group, the time of the latent escape period decreased ($P<0.01$), and the number of crossings increased in the low-dose and high-dose Si Junziwan groups ($P<0.05$). The expression of AMPK ($P<0.01$) decreased, the content of ATP increased ($P<0.01$), the expression of A β and DRP1 protein decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), and the expression of MFN1 protein was up-regulated ($P<0.05$) in high-dose Si Junziwan groups. The vacuolation was more obvious in the low-dose Si Junziwan group, whereas the vacuolation was restored and the ridge was clear in the high-dose Si Junziwan group. **Conclusion:** Si Junziwan treats Alzheimer's disease by up-regulating the protein expression of Lon, correcting the disorder of mitochondrial division and fusion protein, and changing the memory function of SAMP8 mice.

[Keywords] Si Junziwan; Alzheimer's disease; Lon protein; hippocampus; mitochondrion

阿尔茨海默病(AD)是一种中枢退行性疾病,患者以健忘、情感淡漠、性格改变为主要病症。目前发现AD是一个与年龄密切相关的疾病,在年龄 ≥ 60 岁之后,每10年发病率提高13%,当年龄为90岁时,发病率可以提高到45%^[1]。AD发病原因众多,其中能量代谢紊乱是发病关键因素之一。但是AD患者能量代谢紊乱产生原因没有定论。

本课题组前期研究发现,脾气虚大鼠中枢Lon蛋白及线粒体相关蛋白功能紊乱^[2-3],而Lon作为一种多功能蛋白酶,对线粒体的多种功能起着重要的调控作用,包括呼吸链蛋白复合体的组装、异常和受损伤蛋白质的降解、mtDNA完整性的维持等;因此,Lon蛋白酶的稳态对于线粒体及细胞的正常功能维持至关重要;同时,已有研究证据Lon蛋白酶的水平和活性与衰老和疾病有着密切的关系^[4]。前期的实验部分证明了应用健脾益气方药-四君子汤治疗阿尔茨海默病大鼠,可以纠正AD大鼠中枢能量代谢紊乱^[5]。

线粒体在通过自身数量及分裂或者融合来对抗环境的变化过程中,Lon蛋白表达异常也会伴随能量的变化,同时现有研究发现线粒体动力学相关蛋白与AD发病密切相关^[6]。四君子汤出自《太平惠民和剂局方》,药物组成为党参、茯苓、白术、炙甘

草4味中药组成,是经典补脾方药,其是否可以通过调节Lon蛋白及线粒体动力学蛋白,达到治疗AD的目的,未有报道。

因此,在课题组前期研究及中医理论的基础上,本研究采用四君子汤的丸剂进一步观察其是否可以通过调节线粒体相关蛋白,达到治疗AD的目的。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性同月龄正常老化SAMR1小鼠8只、SAMP8同月龄快速老化雌性小鼠32只,体重(30 \pm 5)g,购于北京大学医学部(实验动物科学部),合格证号SCXK(京)2016-0010。室温19~22 $^{\circ}$ C,相对湿度30%~40%,自由饮水进食,适应性饲养1周后开始实验。动物获得辽宁中医药大学动物伦理委员会批准。

1.2 药物与试剂 四君子丸(党参-茯苓-白术-炙甘草2:2:2:1),湖北广仁药业有限公司生产,批号Z42021149。多奈哌齐[安理申,卫才(中国)药业有限公司,批号国药准字H20050987];腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物有限公司,批号m1037632);三磷酸腺苷(ATP)含量试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号201901); β 淀粉样蛋白(A β ,武汉三鹰生物

技术有限公司,批号25524-1-A);Lon蛋白酶(LonP)一抗、线粒体动力相关蛋白1(DRP1)一抗、线粒体融合蛋白(MFN)1蛋白一抗、MFN2蛋白一抗、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体检测试剂盒(英国Abcam公司,批号分别为ab224316、ab184247、ab221661、ab260861、ab6272);山羊抗兔二抗(美国CST公司,批号7074P2)。

1.3 仪器 EthoVision XT Morris水迷宫系统、JEM-1011型透射电镜(日本电子);iMark型酶标仪(美国Bio-Rad公司);JJ-12J型脱水机、JB-P5型包埋机(武汉俊杰电子有限公司);RM2016型病理切片机(上海徠卡仪器有限公司);BOND-Max型全自动免疫组化一体机(德国徠卡公司);KZ-II型研磨仪、MX-F型涡旋混合器、D3024R型台式高速冷冻型微量离心机(北京大龙兴创实验仪器股份公司);Nikon Eclipse E100型正置光学显微镜、Nikon DS-U3型成像系统(日本尼康公司);M8Precipoint数字病理拍照系统(德国Precipoint公司)。

2 方法

2.1 药液制备 因大鼠不能自主进食丸剂,故将四君子丸配置成溶液进行灌胃。粉碎机将四君子丸粉碎,每1g含生药7.18g,按1:2、1:0.125剂量加入蒸馏水,灌胃前加热至37℃。每天灌胃2次,早晚各1次,持续30d。四君子丸灌胃剂量参照文献[7]计算。多奈哌齐组给予小鼠以10 mL·kg⁻¹体质量灌胃^[7],多奈哌齐粉碎后,用蒸馏水配置成浓度为0.013 g·L⁻¹混悬液。根据体表面积法换算,小鼠的等效剂量比值为9.1,正常成人体质量按60 kg计^[7],则四君子丸低、高剂量分别为3.24、12.56 g·kg⁻¹。

2.2 动物分组 将小鼠根据随机数字法分为正常组、模型组、多奈哌齐组、四君子丸低、高剂量组,每组8只;正常组、模型组不予干预,饮食水正常,适应性饲养1周后,开始实验。多奈哌齐组给予小鼠以10 mL·kg⁻¹体质量灌胃多奈哌齐混悬液;四君子丸灌胃剂量参照文献[7]计算。每天早晚各灌胃1次,持续30d,AD成模标准依据文献[8],依据穿越平台次数增加及潜伏期减少,检测小鼠认知功能。

2.3 Morris水迷宫实验检测小鼠认知功能^[7] 在小鼠给药第26天进行Morris水迷宫实验。Morris水迷宫实验中采用定位航行实验和空间探索实验2个阶段。EthoVision XT软件检测小鼠记忆。实验开始前,水迷宫注水,保持水温(20±1)℃,水深超过平台2 cm。定位航行实验:将小鼠平放于水中,放入位置由第一到第四象限起始位置中随机选择。如

果小鼠在60 s内无法找到平台,则引导动物到平台,停留10 s。在60 s内动物找到平台,则本次定位航行实验结束。每只小鼠每天训练2次,连续训练5 d。空间探索实验:实验第6天将平台撤除后,将小鼠由第一象限放入水中。记录动物逃避潜伏时间和平台穿越次数。

2.4 取材 4 mL·kg⁻¹乌拉坦麻醉后,快速取出大鼠一侧海马,置于4%多聚甲醛固定,用于免疫组化测定;4℃下用手术刀片将海马切成约1 mm³小块放于固定液中固定,用于电镜检测;其余小鼠取出大鼠海马后,生理盐水清洗后于-84℃低温冰箱冻存待检。

2.5 ELISA检测小鼠海马组织中AMPK含量 具体操作步骤严格参照试剂盒说明书检测要求。

2.6 比色法检测海马组织ATP含量 称取海马组织10 mg,经水煮沸,匀浆离心后,经BCA蛋白定量,严格参照试剂盒检测ATP含量。

2.7 免疫组化检测MFN2蛋白 固定、脱水、切片及脱蜡。采用微波修复;加入过氧化后室温孵育5~10 min;根据组织大小,滴加适当稀释的一抗(MFN2 1:1 000),放于湿盒中4℃冰箱过夜孵育;室温孵育5~10 min;滴加适量的增强酶标山羊抗大鼠免疫球蛋白(Ig)G聚合物,室温孵育5~10 min;DAB显色。苏木素复染,脱水机封片。拍照后,采用Image J软件分析平均积分吸光度AA。

2.8 各组小鼠海马神经元线粒体超微结构透射电镜切片 4℃下用手术刀片将海马切成约1 mm³小块,固定、漂洗后,用1%锇酸固定,脱水、环氧包埋聚合后应用超薄切片机制片,应用3%醋酸铀-枸橼酸铅双染,透射电镜观察并拍片。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠海马组织A β 、DRP1、MFN1、Lon蛋白的表达 取低温冻存的海马组织25~30 mg,加入裂解液200~300 μ L,高速研磨机研磨后4℃离心,用吸管吸取上清备用。BCA法检测每组海马蛋白浓度,凝胶电泳、转膜、切膜、封闭2 h,加入A β 、Lon抗体(1:2 000)、 β -actin抗体(1:1 000),加入1:1 500稀释的DRP1、MFN1抗体稀释液各4 mL,4℃摇床过夜。TBST洗膜,加入兔二抗(1:2 000)4 mL,室温摇床孵育,洗膜,曝光显影。应用Image J软件进行读取处理,应用目的蛋白/内参 β -actin表示各蛋白的相对表达量。

2.10 统计学方法 采用SPSS 25.0统计软件进行数据分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对SAMP8小鼠一般情况的影响 正常组小鼠活动自由,饮食、饮水正常;与正常组比较,模型组出现摄食量减少,懒动及反应较为迟钝;与模型组比较,四君子丸低、高剂量组小鼠饮食增加,活动较多,体质量增加。

3.2 对SAMP8小鼠的学习和记忆影响 与正常组比较,模型组小鼠的逃避潜伏期显著延长($P<0.01$),穿越平台次数显著减少($P<0.01$);与模型组比较,四君子丸低、高剂量组小鼠逃避潜伏期显著缩短($P<0.01$),穿越平台数明显增加($P<0.05$),多奈哌齐组小鼠逃避潜伏期明显缩短($P<0.01$),穿越平台数明显增加($P<0.05$)。见表1。

表1 四君子丸对SAMP8小鼠学习和记忆的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Si Junziwan on learning and memory in SAMP8 mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	潜伏期/s	穿越平台次数/次
正常组		19.875±5.915	5.375±1.847
模型组		37.750±8.972	2.250±1.669 ¹⁾
多奈哌齐组	0.013	22.750±8.225 ³⁾	4.750±1.281 ²⁾
四君子丸低剂量组	3.24	26.500±6.024 ³⁾	4.375±1.598 ²⁾
四君子丸高剂量组	12.56	24.250±7.741 ³⁾	4.475±1.921 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$

3.3 对SAMP8小鼠海马AMPK含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠的AMPK含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,四君子丸低、高剂量组小鼠AMPK含量显著降低($P<0.01$),多奈哌齐组AMPK含量显著降低($P<0.01$)。见表2。

3.4 对SAMP8小鼠海马ATP变化的影响 与正常

表2 四君子丸对SAMP8小鼠AMPK含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Si Junziwan on AMPK in SAMP8 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AMPK/ng·g ⁻¹
正常组		110.043±6.200
模型组		209.878±18.013 ¹⁾
多奈哌齐组	0.013	156.157±11.944 ²⁾
四君子丸低剂量组	3.24	129.009±9.362 ²⁾
四君子丸高剂量组	12.56	153.661±12.124 ²⁾

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

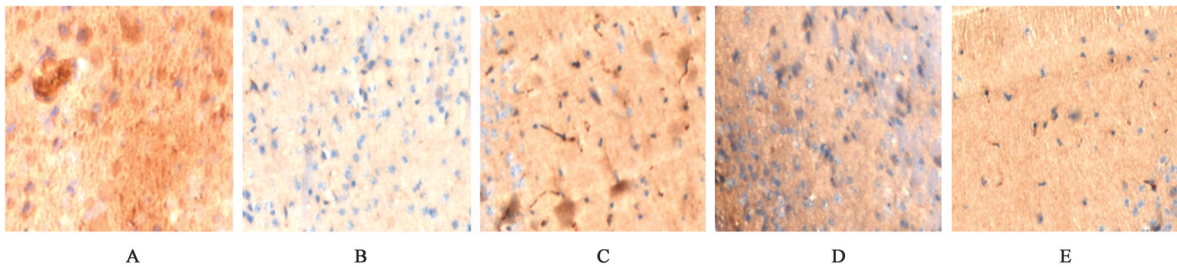
组比较,模型组小鼠的ATP含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,四君子丸高剂量组小鼠ATP含量显著升高($P<0.01$),多奈哌齐组ATP含量显著升高($P<0.01$)。见表3。

表3 四君子丸对SAMP8小鼠ATP含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Si Junziwan on ATP in SAMP8 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ATP/nmol·g ⁻¹
正常组		0.97±0.14
模型组		0.51±0.14 ¹⁾
多奈哌齐组	0.013	0.76±0.12 ²⁾
四君子丸低剂量组	3.24	0.61±0.08
四君子丸高剂量组	12.56	0.74±0.19 ²⁾

3.5 对SAMP8小鼠的海马神经元MFN2表达的影响 正常组棕黄色阳性表达颗粒较多,与正常组比较,模型组棕黄色阳性表达颗粒减少;与模型组比较,多奈哌齐组棕黄色阳性表达颗粒增多,四君子丸低、高剂量中药组棕黄色阳性表达颗粒增多。见图1、表4。



注:A.正常组;B.模型组;C.多奈哌齐组;D.四君子丸低剂量组;E.四君子丸高剂量组(图2和图3同)

图1 四君子丸对SAMP8小鼠海马神经元MFN2蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 1 Effect of Si Junziwan on MFN2 protein expression in hippocampal neurons of SAMP8 mice (IHC, ×400)

3.6 对SAMP8小鼠的海马CA3区神经元线粒体形态变化 正常组线粒体空泡化较少,线粒体嵴清新;模型组线粒体空泡化增加,嵴断裂;多奈哌齐组线粒体空泡化有所恢复,嵴较为清新;四君子丸低

剂量组空泡化较为明显,四君子丸高剂量组空泡化有所恢复,嵴较为清晰。见图2。

3.7 对SAMP8小鼠海马组织A β 、MFN1、DRP1、Lon蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠

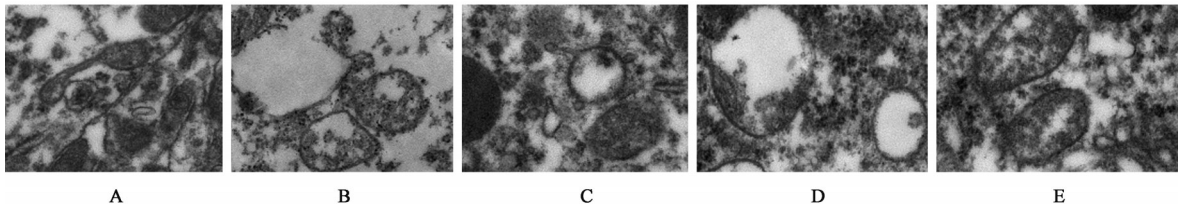


图2 四君子丸对SAMP8小鼠神经元线粒体形态的影响(电镜, ×10 000)

Fig. 2 Effect of Si Junziwan on morphological changes of neuron mitochondria in SAMP8 mice (TEM, ×10 000)

Aβ蛋白表达显著上调($P<0.01$), MFN1、DRP1、Lon蛋白表达明显下调($P<0.05, P<0.01$); 与模型组比较, 四君子丸低、高剂量组 Lon 蛋白表达显著上调($P<0.01$), 四君子丸高剂量组 Aβ、MFN1、DRP1 蛋白表达明显下调($P<0.05, P<0.01$)。见图3、表4。

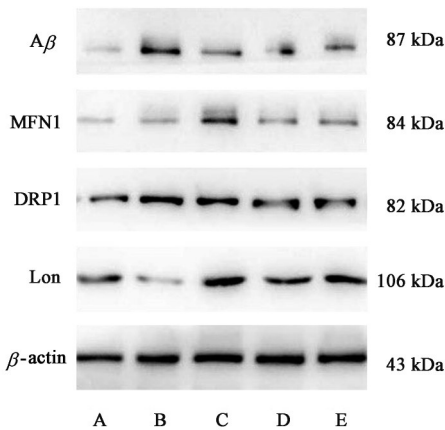


图3 SAMP8小鼠海马组织Aβ、MFN1、DRP1、Lon蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of Aβ, MFN1, DRP1 and Lon protein expression in SAMP8 mice

4 讨论

AD属于老年人一种高发疾病, 在中医属于“痴呆”“呆病”等范畴。中医认为此病定位于脑。脑, 又名头髓、髓海, 是精髓和神明高度汇集之处。《本草纲目》曰: “脑为元神之府”, 说明脑是生命的枢机, 可以主宰人体的生命活动。《寿世传真》曰: “人在出生之前, 形体毕具, 形具而神生。人始生先成精, 精成而脑髓生”。说明脑为机体是重要的器官之一, 由“精”所构成。因此, 治疗AD可以通过补

“人体之精”入手。根据中医理论, 精又有“先天之精”和“后天之精”之分。脾为后天之本, 气血生化之源, 主升清。脾胃健旺, 熏蒸腐熟五谷, 化源充足, 五脏安和, 九窍通利, 则清阳出上窍而上达于脑。脾胃虚衰则九窍不通, 清阳之气不能上行达脑而脑失所养。所以, 从脾胃入手补“后天之精”是治疗脑病的主要方法之一。

本次实验采用快速老化小鼠(SAM)是从AKR/J系小鼠特定子代中选择培育出的寿命短、毛发脱落、缺乏光泽等具有遗传特征的快速老化小鼠^[9], 根据其特征性的病理改变分为SAMP, 其特征性病理表现Aβ的沉积明显。SAMP8小鼠较好的模拟了人类衰老过程中病理性学习记忆障碍。已有研究发现, SAMP8小鼠脑内出现与AD患者相似的Aβ沉积病理特征, 且Aβ的沉积呈增龄性变化, 而Aβ的沉积与学习记忆障碍机制有关^[10], 同时SAMP8小鼠还表现出与其他AD早期临床特征, 常用作AD模型^[11]。

实验发现, 模型组小鼠Aβ沉积明显, Aβ是老年斑的主要成分, 错误折叠后呈β状, 极易聚是造成学习记忆障碍的主要物质^[12]。Aβ沉积会引起一系列的毒性反应, 导致学习记忆障碍, 因此, Aβ的发生机制是SAMP8小鼠学习记忆障碍的重要原因。本实验的水迷宫检测结果表明, 模型组小鼠记忆明显减退, 说明Aβ的大量沉积已经造成中枢功能的退化, 造模成功。已有研究表明, Aβ通过影响线粒体的代谢及动力学相关蛋白的影响, 都会引起记忆障碍。线

表4 四君子丸对SAMP8小鼠Aβ、MFN1、DRP1、Lon蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Si Junziwan on Aβ, MFN1, DRP1 and Lon protein expression in SAMP8 mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Aβ/β-actin	MFN1/β-actin	DRP1/β-actin	Lon/β-actin
正常组		0.280±0.158	0.492±0.175	0.362±0.217	0.742±0.120
模型组		0.953±0.162 ²⁾	0.294±0.172 ¹⁾	0.667±0.203 ²⁾	0.354±0.11 ²⁾
多奈哌齐组	0.013	0.426±0.210 ⁴⁾	0.536±0.217 ³⁾	0.659±0.213	0.682±0.14 ⁴⁾
四君子丸低剂量组	3.24	0.876±0.265	0.337±0.144	0.477±0.133	0.539±0.13 ⁴⁾
四君子丸高剂量组	12.56	0.372±0.203 ⁴⁾	0.527±0.197 ³⁾	0.466±0.203 ³⁾	0.583±0.17 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⁾ $P<0.01$

粒体动力学蛋白DRP1对整个神经元的线粒体分裂、大小、形状和分布至关重要。不同磷酸化形式的DRP1会增加线粒体的碎片化和/或增加融合。在AD发病时发现DRP1水平升高并导致线粒体过度碎片化,导致线粒体功能障碍和神经元损伤^[13-14]。说明在AD过程中,DRP1是参与的重要动力学蛋白之一。MFN也是线粒体动力学所必需的蛋白质,其作用是诱导线粒体融合,其功能紊乱也会影响线粒体功能^[15-16],在AD发病时报道较少。

本实验发现动力学蛋白DRP1水平上调, MFN1、MFN2水平下调,说明线粒体动力学存在功能异常;AMPK在模型组表达上调,ATP含量降低,说明模型组存在能量代谢紊乱。而和能量密切的Lon蛋白在模型组表达也同时明显降低。Lon蛋白是一种具有丝氨酸-赖氨酸催化二元组的同型六聚体环状蛋白质复合物,在几乎所有原核生物和真核生物中都高度保守。Lon蛋白通过选择性识别和降解线粒体基质中氧化修饰的线粒体蛋白,如氧化的乌头酸酶、磷酸化的线粒体转录因子A等,在维持线粒体内稳态中发挥重要作用。Lon作为一种关键的应激反应蛋白,参与线粒体、内质网(ER)和细胞核之间的串扰,参与了对细胞存活至关重要的多种重要细胞过程,如线粒体蛋白质量控制系统、线粒体未折叠蛋白反应、mtDNA维持和ER未折叠蛋白反应。Lon蛋白在多种组织中包括肝脏、大脑、骨骼肌和胰腺等高表达^[17]。Lon蛋白目前发现与衰老密切相关^[4]。Lon蛋白还有一个重要的功能,可以选择性降解异常蛋白,如错误折叠或突变蛋白。Lon蛋白对细胞内环境稳定和生存至关重要,主要通过控制蛋白质的控制来应对各种压力机械和新陈代谢的调节^[18-21]。还有报导, Lon蛋白下调会影响大脑中其他几种蛋白质的水平线粒体基质,包括参与和调节能量代谢^[22]、线粒体结构、线粒体DNA代谢和应激反应同时可能调控线粒体动力学蛋白^[23]。因此本实验证明, A β 的沉积可能引起线粒体动力学相关蛋白DRP1上调,同时伴随MFN1和MFN2下调、同时由于衰老引起Lon蛋白表达下调,不能降解异常蛋白在从而导致发病。

四君子丸为经典名方四君子汤的丸剂,由党参、茯苓、白术、炙甘草4味中药组成,人参补五脏,安精神,开心益智,久服轻身延年。茯苓久服安魂养神,开心益智,止健忘。白术作煎饵久服,轻身延年不饥。甘草久服轻身延年,通九窍,利血脉,益精养气。因此,4味中药合用,既可以补气养血,使气

血充足,脑髓得养,又可以调和气血。经过四君子丸干预后,小鼠海马组织Lon蛋白酶表达上调,说明具有衰老标志的Lon蛋白,上调后可以抑制和对抗中枢的能量代谢紊乱和各种应激刺激,消除异常蛋白,可能直接或者间接调节了线粒体相关蛋白的功能,从而部分恢复了记忆功能。

目前发现,四君子丸治疗AD与线粒体Lon蛋白及动力学蛋白密切相关。通过本实验证明,四君子丸通过健脾、生精作用,提高AD小鼠记忆功能。改善了海马ATP水平,机制之一可能与提高Lon蛋白酶表达,进而改变线粒体动力学相关蛋白功能紊乱,达到治疗AD的目的有关。而A β 蛋白的减少是否和其他线粒体蛋白(如Lon蛋白)有关,以及Lon蛋白在AD发病过程中是否直接或间接调控了DRP1、MFN1、MFN2动力学蛋白,需要实验进一步验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] JIA L, QUAN M, FU Y, et al. Dementia in China: Epidemiology, clinical management, and research advances[J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(1): 81-92.
- [2] 马丹, 刘文俊, 于化新, 等. 脾气虚大鼠海马神经元线粒体呼吸链功能及Lon蛋白酶表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2018, 58(26): 35-37.
- [3] 刘文俊, 陈伟仁, 宋因, 等. 脾气虚模型大鼠海马与下丘脑神经元线粒体分裂因子和线粒体分裂蛋白1的表达[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(11): 1356-1360.
- [4] AYU A, PETUKHOVA G V, GRIGORENKO V G, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for a human homolog of eubacterial ATP-dependent Lon proteases[J]. *FEBS Lett*, 1994, 340(1/2): 25-28.
- [5] 刘旭东, 王凌志, 刘慧慧, 等. 四君子汤对阿尔茨海默病大鼠行为学及海马神经元能量代谢功能的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(16): 1-6.
- [6] HAMON M P, BAYOT A, GAREIL M, et al. Effects of Lon protease down-regulation on the mitochondrial function and proteome[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 75(Suppl 1): S32-33.
- [7] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [8] 刘明, 刘杨, 邓颖, 等. 蓝布正提取物对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马NT-3, BDNF蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(17): 154-158.
- [9] FLOOD J F, MORLEY J E. Learning and memory in

- the SAMP8 mouse[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1998, 22(1):1-20.
- [10] AKIGUCHI I, PALLÀS M, BUDKA H, et al. SAMP8 mice as a neuropathological model of accelerated brain aging and dementia; Toshio Takeda's legacy and future directions[J]. *Neuropathology*, 2017, 37(4):293-305.
- [11] DAI R, ZHANG S, DUAN W, et al. Enhanced autophagy contributes to protective effects of GM1 ganglioside against $A\beta_{1-42}$ -induced neurotoxicity and cognitive deficits[J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(8):2417-2426.
- [12] TIWARI S, ATLURI V, KAUSHIK A, et al. Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics[J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 5541-5554.
- [13] OLIVER D, REDDY P H. Dynamics of dynamin-related protein 1 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases[J]. *Cells*, 2019, 8(9):961.
- [14] MANCZAK M, REDDY P H. Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein DRP1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: Implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21, 2538-2547.
- [15] MANCZAK M, KANDIMALLA R, YIN X, et al. Hippocampal mutant APP and amyloid beta-induced cognitive decline, dendritic spine loss, defective autophagy, mitophagy and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(8):1332-1342.
- [16] FU M, ST-PIERRE P, SHANKAR J, et al. Regulation of mitophagy by the Gp78 E3 ubiquitin ligase[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(8):1153-1162.
- [17] WANG N, GOTTESMAN S, WILLINGHAM M C, et al. A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(23):11247-11251.
- [18] VAN DYCK L, LANGER T. ATP-dependent proteases controlling mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 56(9/10):825-842.
- [19] REP M, GRIVELL L A. The role of protein degradation in mitochondrial function and biogenesis[J]. *Curr Genet*, 1996, 30(5):367-380.
- [20] GOTTESMAN S, WICKNER S, MAURIZI M R. Protein quality control: Triage by chaperones and proteases[J]. *Genes Dev*, 1997, 11(7):815-823.
- [21] JONAS K, LIU J, CHIEN P, et al. Proteotoxic stress induces a cell-cycle arrest by stimulating Lon to degrade the replication initiator DnaA[J]. *Cell*, 2013, 154(3):623-636.
- [22] QUIRÓS P M, ESPAÑOL Y, ACÍN-PÉREZ R, et al. ATP-dependent Lon protease controls tumor bioenergetics by reprogramming mitochondrial activity[J]. *Cell Rep*, 2014, 8(2):542-556.
- [23] GIBELLINI L, PINTI M, BORALDI F, et al. Silencing of mitochondrial Lon protease deeply impairs mitochondrial proteome and function in coLon cancer cells[J]. *FASEB J*, 2014, 28(12):5122-5135.

[责任编辑 孙丛丛]