

当归芍药散调控泛素-蛋白酶体途径改善 SAMP8 小鼠 认知能力的作用及其机制

陈云慧¹, 夏军¹, 淮文英¹, 刘丹², 张天娥¹, 李岩³, 谢永美², 唐宋琪^{4*}, 游宇¹, 彭伟^{1*}

(1. 成都中医药大学, 成都 611137; 2. 四川大学, 成都 610041;

3. 路易斯维尔大学, 美国 路易斯维尔 40202; 4. 海南医学院, 海口 570102)

[摘要] 目的:探讨当归芍药散(DSS)调控泛素-蛋白酶体途径(UPP)改善 SAMP8 阿尔茨海默病(AD)模型小鼠认知能力的作用机制。方法:15 只 SAMR1 小鼠为正常组,60 只 SAMP8 小鼠随机分为模型组及 DSS 高、中、低剂量组(57.6、28.8、14.4 g·kg⁻¹·d⁻¹),连续灌胃给药 8 周。Morris 水迷宫实验测试定位航行与空间探索能力;苏木素-伊红(HE)染色法检测海马 CA1 区神经元病理结构改变;免疫组化法(IHC)和酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测海马β淀粉样蛋白(Aβ)和磷酸化(p)-Tau 蛋白含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织泛素(Ub)、泛素连接酶 E3(E3)、26S 蛋白酶体、泛素羧基端水解酶 1(UCHL1)、UCHL3 mRNA 和蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠逃避潜伏期延长($P<0.05$),穿越平台象限次数和平台象限停留百分比减少($P<0.05$);CA1 区神经元明显减少、胞体聚缩;β-淀粉样前体蛋白(β-APP)和 p-Tau 阳性细胞数量明显增多($P<0.05$);Aβ 和 p-Tau 蛋白水平升高($P<0.05$);Ub mRNA 和蛋白表达升高($P<0.05$);E3、26S 蛋白酶体、UCHL1、UCHL3 mRNA 和蛋白表达下降($P<0.05$)。与模型组比较,DSS 高、中剂量组逃避潜伏期缩短($P<0.05$),穿越平台象限次数和停留百分比增加($P<0.05$);DSS 各剂量组 CA1 病理改变明显改善;各剂量组 β-APP 及中、低剂量组 p-Tau 阳性染色细胞数量减少($P<0.05$);各剂量组 Aβ 及 p-Tau 蛋白水平下降($P<0.05$);各剂量组 Ub mRNA 表达降低($P<0.05$),高、中剂量组 26S、E3、UCHL3 mRNA 表达水平升高($P<0.05$),中剂量组 UCHL1 mRNA 表达升高($P<0.05$);各剂量组 Ub 蛋白表达降低,高、中剂量组 26S、E3、UCHL1+3 蛋白表达升高($P<0.05$)。结论:DSS 可改善 SAMP8 小鼠认知能力,其机制可能与降低 UPP 途径中 Ub 及升高 E3、26S、UCHL1、UCHL3 的表达,减少 Aβ 和 p-Tau 异常沉积有关。

[关键词] 当归芍药散; 阿尔茨海默病; 泛素-蛋白酶体途径(UPP)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)24-0008-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211107

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210414.1454.004.html>

[网络出版日期] 2021-04-14 15:59

Effect of Danggui Shaoyaoan on Improvement of Cognitive Ability of SAMP8 Mice and Its Mechanism via Regulating Ubiquitin Proteasome Pathway

CHEN Yunhui¹, XIA Jun¹, HUAI Wenyong¹, LIU Dan², ZHANG Tiane¹, LI Yan³,

Xie Yongmei², TANG Songqi^{4*}, YOU Yu¹, PENG Wei^{1*}

(1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

2. Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. University of Louisville, Louisville 40202,

United States; 4. Hainan Medical University, Haikou 570102, China)

[收稿日期] 2021-02-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603537,81473668);四川省科技厅国际合作与交流项目(2017HH0004);国家留学基金委项目(201908510279);四川省教育厅重点项目(17ZA0163);成都中医药大学青年学者人才项目(QNXZ2019043);the 2019 Internationalization Incentive Fund of University of Otago(IIFUO2019)

[第一作者] 陈云慧,博士,副教授,从事经方配伍规律与作用机制研究工作、中医药数据挖掘研究工作、中医经典国际传播与传承研究工作, Tel:028-61800000, E-mail:chenyunhui@cdutcm.edu.cn

[通信作者] * 唐宋琪,博士,教授,从事中医药防治感染性及变态反应性疾病研究, E-mail:tangsongqi@hainmc.edu.cn;

* 彭伟,博士,副教授,从事中药物质基础及其机制研究工作, Tel:028-61800000, E-mail:pengwei@cdutcm.edu.cn

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Danggui Shaoyaoan (DSS) in the improvement of the cognitive ability of SAMP8 mice with Alzheimer's disease (AD) via regulating the ubiquitin-proteasome pathway (UPP). **Method:** Fifteen SAMR1 mice were used as a normal group, and 60 SAMP8 mice were randomly divided into a model group and DSS high, medium, and low-dose groups (57.6, 28.8, and 14.4 g·kg⁻¹·d⁻¹), with 15 mice in each group. Intragastric administration was conducted for eight continuous weeks. Place navigation and spatial capacity were evaluated by Morris water maze. Pathological structure changes in neurons in the hippocampal CA1 area was detected by hematoxylin-eosin (HE) staining. The protein expression levels of hippocampal β -amyloid protein (A β) and phosphorylation (p)-Tau were determined by immunohistochemical staining (IHC) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the mRNA and protein expression levels of hippocampal ubiquitin (Ub), ubiquitin ligase E3 (E3), 26S proteasome, ubiquitin carboxyl terminal hydrolase-1 (UCHL1), and UCHL3 were determined by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot, respectively. **Result:** As compared with the normal group, the escape latency was prolonged in the model group ($P<0.05$) with the reduced number of crossing platform quadrants and time ratio in the platform quadrant ($P<0.05$). The model group decreased neurons and condensed cell bodies in the CA1 area, and increased β -amyloid precursor protein (β -APP) and p-Tau positive cells ($P<0.05$). In the model group, the protein expression levels of A β and p-Tau were increased ($P<0.05$), the mRNA and protein expression levels of Ub were increased ($P<0.05$), and the mRNA and protein expression levels of E3, 26S proteasome, UCHL1, and UCHL3 were decreased ($P<0.05$). As compared with the model group, the escape latency was shortened in the DSS high and medium-dose groups ($P<0.05$) with an increased number of crossing platform quadrants and residence time ratio ($P<0.05$). The pathological changes in CA1 of each DSS group were significantly improved, and the number of β -APP positive staining cells decreased ($P<0.05$). The number of p-Tau positive staining cells decreased in the DDS medium and low-dose groups ($P<0.05$). The protein expression levels of A β and p-Tau in each DDS group decreased ($P<0.05$), and the mRNA expression level of Ub in each group decreased ($P<0.05$). The mRNA expression levels of 26S, E3, and UCHL3 in the DDS high and medium-dose groups increased ($P<0.05$), and the mRNA expression level of UCHL1 in the DDS medium-dose group increased ($P<0.05$). The protein expression level of Ub in each DDS group decreased, and the protein expression levels of 26S, E3, UCHL1+3 in the DDS high and medium-dose groups increased ($P<0.05$). **Conclusion:** DSS can improve the cognitive ability of SAMP8 mice, and its mechanism may be related to the reduction of the abnormal deposition of A β and p-Tau via decreasing the expression of Ub and increasing that of E3, 26S, UCHL1, and UCHL3 in the UPP.

[Keywords] Danggui Shaoyaoan (DSS); Alzheimer's disease (AD); ubiquitin proteasome pathway (UPP)

阿尔茨海默病(AD)是一种起病隐匿并呈进行性发展的神经退行性疾病,临床表现为认知和记忆功能不断恶化、日常生活能力进行性减退、并伴有各种神经精神症状和行为障碍,是当今世界面临的全球性重大健康和社会问题,积极探索防治药物并阐明作用机制已成为国内外研究关注的热点和焦点^[1]。目前,现代医学对AD主要为对症治疗,作用靶点较为单一,临床疗效有限^[2]。因此,积极开展中医药治疗本病的研究、并阐明作用机制,具有重要意义。大脑神经细胞要维持正常生命活动,必须在进行合成代谢的同时,及时将代谢废物排除胞外。

而细胞外 β 淀粉样蛋白(A β)聚集形成的老年斑和细胞内异常磷酸化Tau蛋白(p-Tau)聚集形成的神经原纤维缠结是AD特征性病理改变^[3]。因此,降解、清除异常沉积的A β 和p-Tau蛋白可能是具有根治性意义的AD治疗新策略^[4],这也为开展中医药治疗AD的作用机制研究开辟了新思路。泛素-蛋白酶体途径(UPP)是真核细胞内蛋白质降解的主要途径,85%以上的蛋白质通过UPP进行降解,能够识别多余的和错误折叠的蛋白质。该途径主要由泛素(Ub)、泛素连接酶E3(E3)等泛素相关酶、泛素羧基端水解酶(UCHL)等去泛素化酶、蛋白酶体

(PS)及其底物组成^[5]。大量研究表明UPP功能障碍与AD患者脑内A β 沉积、Tau蛋白磷酸化等关系密切,提示药物可通过调控UPP途径多个靶点发挥治疗作用^[6-9]。中医经典方剂当归芍药散(DSS)出自《金匮要略》,又被称为 Toki-shakuyaku-san(TJ-23,日本)和 Dangguijakyak-san(DJS,韩国),集中体现了医圣张仲景“肝脾同调、血水并治”的学术思想,具有改善认知能力、抗炎、抗氧化、调节神经递质等活性^[10-11],自20世纪80年代以来逐渐被广泛应用于AD的临床治疗和基础研究中,再次彰显了经方的应用价值。但其对于学习记忆的改善作用是否与调控UPP途径清除AD脑内积聚的A β 和p-Tau有关,目前尚未见报道。因此,本研究拟以广泛使用的AD模型动物快速老化SAMP8小鼠为研究对象,探讨其改善认知功能障碍、调控UPP中Ub、E3、PS、UCHL1和UCHL3等重要靶点清除AD脑内异常沉积蛋白的相关作用机制。

1 材料

1.1 动物 7月龄SPF级雄性SAMP8快速老化小鼠60只(20 \pm 2)g、同月龄SPF级雄性SAMR1正常老化小鼠15只(20 \pm 2)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。实验动物饲养环境为SPF级屏障系统,温度(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度40%~60%,光照12h,自由摄食饮水,单笼饲养,小鼠适应性饲养7d后开始实验。本实验获得成都中医药大学实验动物伦理委员会批准(备案编号为2017-010),符合实验动物福利与伦理原则。

1.2 药物 DSS由当归、白芍、川芎、白术、茯苓、泽泻组成,购自于四川(北京同仁堂)大药房有限公司,经成都中医药大学药学院张廷模教授鉴定为正品,符合2020年版《中华人民共和国药典》相关项下要求。按照《金匮要略》中的原方药物比例(当归-白芍-茯苓-白术-泽泻-川芎3:16:4:4:8:8)称取药物,置于圆底烧瓶中,混匀,加10倍量水,浸泡30min,煎煮30min,收集药液,用4~6层纱布过滤,收集滤液,倒入容器。剩余药渣再加入8倍量水,煎煮2次,每次各20min,过滤,收集滤液。合并3次滤液,浓缩至生药含量质量浓度为2.0g \cdot mL⁻¹的DSS水煎剂,4 $^{\circ}$ C保存备用。

1.3 试剂 重组Anti-Tau(phospho S404)抗体[EPR2605]、重组A β ₁₋₄₀抗体、Anti-E3(Parkin)抗体、内参 β -肌动蛋白(β -actin)抗体[AC-15]辣根过氧化物酶(HRP)、Prestained Protein Ladder(10~

245kDa)、DAB Substrate Kit、Anti-Ubiquitin抗体、Anti-Proteasome 26S S2抗体、Anti-Proteasome 26S S3抗体、Anti-UCHL1+3抗体、重组Anti-Tau(phospho S396)抗体[EPR2731](英国Abcam公司,批号分别为ab92676、ab201060、ab77924、ab49900、ab116028、ab64238、ab7780、ab197054、ab154963、ab75275、ab109390);7.5%免染预混液、10%免染预混液、12%免染预混液、PVDF膜、封闭液、ECL化学发光试剂盒、iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit、SsoAdvanced Univ SYBR Grn Suprmix(美国Bio-Rad公司,批号分别为1610181、1610183、1620177、12010947、1705061、1725035、1725271);PageRulerTM Prestained Protein Ladder(10~180kDa)(美国Thermo公司,批号26616);牛血清白蛋白(美国Sigma-aldrich公司,批号分别为B2064-100G);小鼠A β ₁₋₄₀、Tau酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为m1001859-J、m1037981-J);RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、蛋白酶和磷酸化酶抑制剂混合物(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为P0013B、P1050、P0010);Animal Total RNA Isolation Kit(成都峰际生物技术有限公司,批号RE-03011);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号G1120)。

1.4 仪器 HI1210型摊片机、RM2245型切片机、EG1150型包埋机、ST5010型全自动染色机、DM500型普通光学显微镜(德国Leica公司);N50T型微量核酸分析仪(德国Implen公司);Multiskan Go型全波长酶标仪(美国Thermo Scientific公司);JL-MWGM型Morris水迷宫视频分析系统(上海吉量软件科技有限公司);Bioprep-6型组织破碎仪(北京奥盛创新科技有限公司);SCIENTZ-IIID型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);MINI-P4/MT-BLOT MOD/PP BAS型垂直电泳转印系统、CFX Connect型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司);Champ Chemi 610型全自动化学发光凝胶成像系统(北京赛智创业科技有限公司);A300型普通PCR(杭州朗基科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 SAMR1正常老化小鼠15只,为正常组。SAMP8快速衰老小鼠60只,按随机数字表法随机分为4组,模型组及DSS高、中、低剂量组,每组15只。正常组和模型组以等体积生理盐水灌

胃, DSS高、中、低剂量组采用DSS药物灌胃处理, 给药剂量按照人与小鼠体表面积换算给药剂量的方法。根据前期预实验结果, DSS高、中、低剂量组给药剂量生药含量分别为57.6、28.8、14.4 g·kg⁻¹·d⁻¹, 并以每kg体质量10 mL蒸馏水稀释制成混悬液; 每日灌胃1次。各组均连续灌胃给药或生理盐水8周。

2.2 Morris水迷宫检测定位航行和空间探索能力
连续干预8周后, 采用Morris水迷宫检测小鼠学习记忆行为学。水迷宫外观为直径160 cm、高60 cm、水深30 cm的圆形水池, 水池侧面均光滑, 放置在光线柔和、安静的房间内; 控制水温为(24±2) °C。Morris水迷宫行为学测试包括两部分: 定位航行实验和空间探索实验。实验前1 d不安装平台, 将小鼠放置在水池内自由游泳5 min以适应环境, 每天行为学检测均在同一时间完成。第1~5天行定位航行实验, 圆柱形平台(直径10 cm)置于IV象限, 没于水下2 cm, 每次60 s, 将小鼠依次从各象限中点面向池壁放入水中, 使其自由寻找平台, 记录其找到平台所用的时间, 为逃避潜伏期。设定寻找时间为60 s, 如超时未找到平台则将其引导至平台停留20 s, 记录其逃避潜伏期为60 s。在测试的第6天进行空间探索实验, 撤除平台, 在平台所在象限对侧象限中点将小鼠面向池壁入水, 记录并分析小鼠的逃避潜伏期及60 s内穿越平台次数和在平台所在目标象限停留的时间。

2.3 标本采集与制备 行为学测试结束3 h后, 小鼠腹腔注射麻醉后打开胸腔, 暴露心脏, 于心尖灌注生理盐水(约40 mL/只), 剪开右心耳, 待小鼠肝脏完全变白且右心耳流出澄清液体后, 断头处死, 在冰盒内剥离小鼠大脑, 沿中间矢状缝切开, 将每只小鼠左侧半脑置于10%中性甲醛溶液中, 行固定, 脱水、透明、浸蜡后常规制备石蜡切片, 片厚4 μm, 行HE染色、免疫组化(IHC)染色检测; 右侧半脑仔细分离出海马和皮质, 置于-80 °C冻存, ELISA、蛋白免疫印迹法(Western blot)、Real-time PCR检测。

2.4 HE染色观察海马CA1区病理形态学变化 取常规石蜡切片, 二甲苯脱蜡, 二甲苯(I)(II)均20 min(2次), 经乙醇并水洗: 100%、95%、80%、75%乙醇各5 min; 苏木素染色10~20 min; 自来水冲洗1~3 min; 盐酸乙醇分化5~10 s; 自来水冲洗1~3 min; 放入50 °C温水中或弱碱性水溶液返蓝, 直到出现蓝色为止; 自来水冲洗1~3 min; 放入85%的乙

醇3~5 min; 伊红染色3~5 min; 水洗3~5 s; 梯度乙醇脱水; 二甲苯透明; 中性树胶封固, 放置在自然条件下晾干。BA200Digital数码三目摄像显微摄像系统对切片进行图像采集, 每张切片先于40倍下观察全部组织, 观察大体病变, 选择拟观察区域采集100倍和400倍图片, 观察具体病变。图像使用Image-Pro Plus 6.0软件处理。

2.5 IHC染色观察海马组织β-淀粉样前体蛋白(β-APP)和p-Tau蛋白的表达 切片常规脱蜡脱水, 3%甲醇双氧水室温10 min; 磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次, 每次5 min; 将切片浸入0.01 mol·L⁻¹柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0), 微波炉中高火加热至沸腾后断电, 间隔5 min后, 反复1次, 冷却后, PBS洗2次, 每次5 min; 滴加山羊血清封闭液, 室温20 min; 滴加一抗(1:500), 4 °C过夜; 滴加生物素化二抗(1:2 000), 37 °C 30 min; PBS水洗3次, 每次5 min; DAB显色为用DAB显色试剂盒, 混匀试剂后滴加到切片上, 室温显色, 镜下控制反应时间, 2 min后, 蒸馏水洗涤; 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 中性树胶封片, 放置在自然条件下晾干。以上标本均按病理检验SOP程序进行。脱水、修剪、包埋、切片、染色、封片等, 最后镜检。采用BA200Digital数码三目摄像显微摄像系统对切片进行图像采集, 每张切片先于100倍下观察全部组织, 再选取3个视野分别采集400倍显微图像。采用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统测定图像积分吸光度IA和面积(Area)。

2.6 ELISA检测海马组织Aβ₁₋₄₀和p-Tau蛋白含量
取海马组织, 生理盐水洗净, 用滤纸吸干后称重, 按质量体积比1:10加入4 °C RIPA裂解液, 电动匀浆机制备10%的组织匀浆后(冰上操作), 转移至离心管, 4 °C, 12 000 r·min⁻¹离心20 min(离心半径8.55 cm), 取上清液, 分装至多个微型离心管, -80 °C冷冻备用。BCA蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度, 严格按照ELISA试剂盒说明书操作, 检测各组小鼠海马组织中Aβ₁₋₄₀和p-Tau蛋白含量。全波长酶标仪450 nm波长检测, 检测结果以吸光度A表示, 根据标准曲线和总蛋白浓度计数目标蛋白含量。

2.7 Real-time PCR检测Ub、26S、E3、UCHL1、UCHL3 mRNA表达水平 取海马组织50 mg, 采用Animal Total RNA Isolation Kit试剂盒提取总RNA, 微量核酸分析仪检测RNA浓度和纯度。采用iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit试剂盒进行逆转录反应, 应用Sso Advanced™ Universal SYBR®

Green Supermix 试剂盒进行荧光定量反应。反应条件为 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火/延伸 30 s, 重复反应 40 个循环。扩增反应后进行熔解曲线分析, 判断产物是否有非特异性扩增; 分析扩增曲线, 计算 C_t 值; 以 β -actin 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组间 mRNA 相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Ub	上游 TGGCTATTAATTATTCGGTCTGCAT	70
	下游 GCAAGTGGCTAGAGTGCAGAGTAA	
26S	上游 GAAACCAGGAACAGATGAAACC	102
	下游 CTTCCAAGTTCCTACAGACAT	
E3	上游 TTTTTCATCTACTGCAAAGGCC	133
	下游 TTGGAATTAAGACATCGTCCCA	
UCHL1	上游 ATAGAGCCAAGTGTTCGAGAA	95
	下游 ATTCACCTTGTCTACCTACCCGA	
UCHL3	上游 TCAAGGACAAGATGTGACATCA	118
	下游 TTCGAAGTGCATCTTGTCTTTG	
β -actin	上游 GTGACGTTGACATCCGTAAGA	245
	下游 GCCGGACTCATCGTACTCC	

2.8 Western blot 检测海马组织 Ub、26S、E3、UCHL1、UCHL3 蛋白水平 取 2.6 项下制备的蛋白

提取液, 蛋白上样量 50 μ g, 经 SDS-PAGE 电泳后, 转移至 PVDF 膜, 封闭液封闭 2 h, TBST 洗膜后, 加入 TBST 稀释的一抗, 分别为 β -actin(1:1 000)、Ub(1:500)、26 S(1:1 000)、E3(1:1 000)、UCHL1(1:1 000)、UCHL3(1:1 000), 4 °C 过夜; TBST 洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的二抗山羊抗兔 IgG 抗体(1:20 000)室温孵育 2 h, TBST 洗涤; 化学发光剂避光反应 2~3 min, ECL 显影并拍照。以 β -actin 作为内参, 采用化学发光成像系统扫描分析结果。采用 Lane 1D 图像分析软件进行光密度分析, 将各光密度值与内参蛋白 β -actin 条带灰度值的比值作为蛋白的相对表达量。

2.9 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 SAMP8 小鼠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($P < 0.05$); 与模型组比较, DSS 高、中剂量组逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$); 与正常组比较, 模型组小鼠穿越平台象限次数明显减少($P < 0.05$), 在目标象限停留百分比明显降低($P < 0.05$); 与模型组比较, DSS 高、中剂量组小鼠穿越平台象限次数和目标象限停留百分比明显提高($P < 0.05$)。见表 2 和表 3。

表 2 DSS 对 SAMP8 小鼠定位航行能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 2 Effect of Danggui Shaoyaoan(DSS) on place navigation in SAMP8 mice ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	逃避潜伏期/s				
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
正常组		21.80 \pm 2.82	20.08 \pm 3.40	15.90 \pm 2.54	10.90 \pm 1.82	9.98 \pm 1.32
模型组		38.20 \pm 1.32 ¹⁾	36.03 \pm 2.85 ¹⁾	32.46 \pm 3.55 ¹⁾	28.66 \pm 3.24 ¹⁾	29.93 \pm 1.85 ¹⁾
DSS 低剂量组	14.4	30.20 \pm 5.09 ²⁾	26.26 \pm 3.31 ²⁾	23.16 \pm 1.74 ²⁾	25.96 \pm 3.27	26.08 \pm 3.27
DSS 中剂量组	28.8	29.60 \pm 1.78 ²⁾	23.91 \pm 3.40 ²⁾	23.56 \pm 2.93 ²⁾	18.72 \pm 1.11 ²⁾	18.52 \pm 0.87 ²⁾
DSS 高剂量组	57.6	29.64 \pm 5.27 ²⁾	23.72 \pm 9.14 ²⁾	23.16 \pm 4.84 ²⁾	23.76 \pm 2.13 ²⁾	22.96 \pm 2.25 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3-表 7 同)

表 3 DSS 对 SAMP8 小鼠空间探索能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

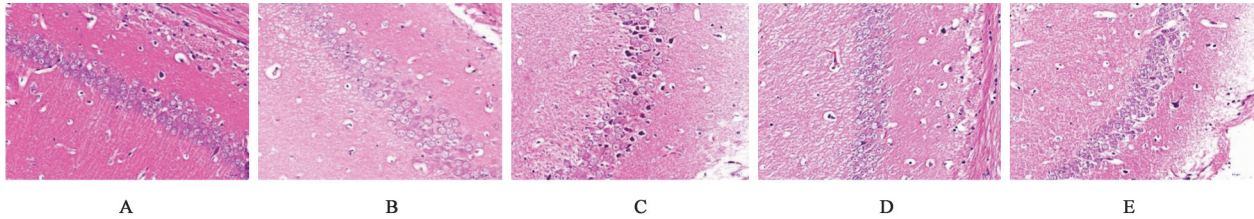
Table 3 Effect of DSS on spatial capacity in SAMP8 mice ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	穿越平台象限次数/次	目标象限停留百分比/%
正常组		3.20 \pm 0.79	26.38 \pm 6.42
模型组		1.20 \pm 0.42 ¹⁾	10.67 \pm 8.89 ¹⁾
DSS 低剂量组	14.4	1.80 \pm 1.55	17.60 \pm 5.43
DSS 中剂量组	28.8	3.10 \pm 0.99 ²⁾	24.55 \pm 7.91 ²⁾
DSS 高剂量组	57.6	2.90 \pm 2.13 ²⁾	23.45 \pm 3.08 ²⁾

3.2 对 SAMP8 小鼠海马 CA1 区病理改变的影响

正常组小鼠海马 CA1 区神经元细胞核呈圆形、细胞轮廓及边界较清晰,细胞分布均匀、致密,且排列整齐、核仁明显、胞核无固缩;模型组小鼠 CA1 区神经元明显减少、排列较紊乱,神经元细胞核可

见空泡变性、细胞周围间隙增大,且核仁显示不清楚或消失,染色质浓缩趋边,核固缩,有切迹,核偏位;DSS 各剂量组病理改变明显改善,神经元排列整齐,胞体清晰、饱满,凋亡细胞明显减少。见图 1。



注:A.正常组;B.模型组;C.DSS 低剂量组;D.DSS 中剂量组;E.DSS 高剂量组(图2-图4同)

图 1 DSS 对 SAMP8 小鼠海马 CA1 区病理改变的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of DSS on pathologic change of hippocampus CA1 in SAMP8 mice (HE, ×400)

3.3 对 SAMP8 小鼠海马 CA1 区 β -APP 和 p-Tau 表达的影响

与正常组比较,模型组小鼠 CA1 区 β -APP 和 p-Tau 阳性细胞数量明显增多($P < 0.05$);与

模型组比较,DSS 各剂量组 β -APP 阳性染色细胞数量明显减少($P < 0.05$);中、低剂量组 p-Tau 阳性染色细胞数量明显减少($P < 0.05$)。见图 2、图 3 和表 4。

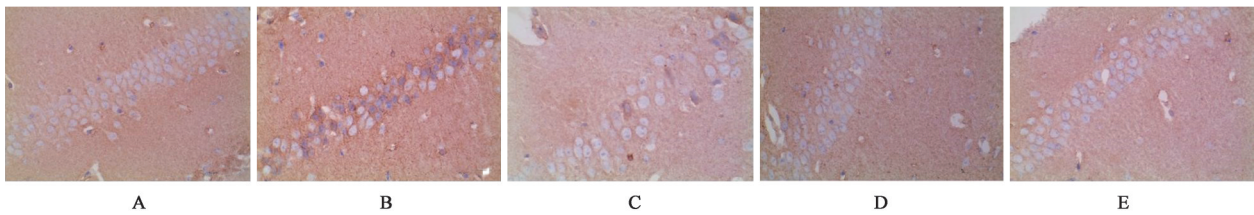


图 2 DSS 对 SAMP8 小鼠海马 CA1 区 β -APP 表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 2 Effect of DSS on pathological changes in hippocampal CA1 of SAMP8 mice for β -APP positive areas (IHC, ×400)

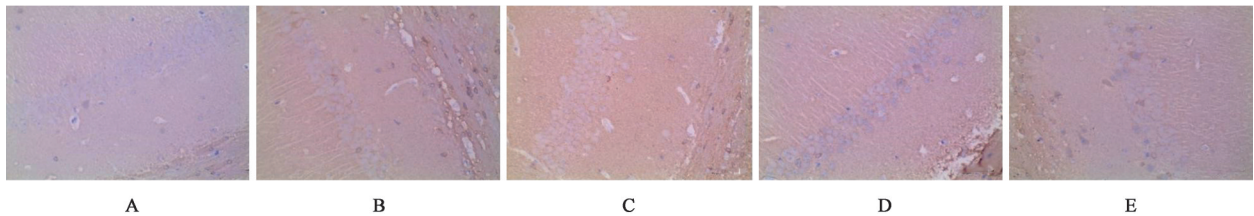


图 3 DSS 对 SAMP8 小鼠海马 CA1 区 p-Tau 表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 3 Effect of DSS on Pathological changes in hippocampal CA1 of SAMP8 mice for p-Tau positive areas(IHC, ×400)

表 4 DSS 对 SAMP8 小鼠海马 CA1 区 β -APP 和 p-Tau 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 4 Effect of DSS on β -APP and p-Tau expression in hippocampal CA1 of SAMP8 mice ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	β -APP	p-Tau
正常组		0.188±0.005	0.191±0.002
模型组		0.205±0.003 ¹⁾	0.212±0.003 ¹⁾
DSS 低剂量组	14.4	0.184±0.007 ²⁾	0.192±0.006 ²⁾
DSS 中剂量组	28.8	0.181±0.006 ²⁾	0.196±0.008 ²⁾
DSS 高剂量组	57.6	0.192±0.006 ²⁾	0.207±0.004 ²⁾

3.4 对 SAMP8 小鼠海马组织 $A\beta$ 和 p-Tau 表达水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马 $A\beta$ 和

p-Tau 表达水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,DSS 各剂量组 $A\beta$ 和 p-Tau 表达水平均明显降低($P < 0.05$)。见表 5。

3.5 对 SAMP8 小鼠海马组织 Ub、PS、E3、UCHL1、UCHL3 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马组织 Ub mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$),PS、E3、UCHL1、UCHL3 mRNA 表达水平均明显下降($P < 0.05$);与模型组比较,DSS 各剂量组 Ub mRNA 表达水平均明显下降($P < 0.05$);高、中剂量组 26S、E3、UCHL3 mRNA 表达水平均明显升高($P < 0.05$);中剂量组 UCHL1 mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$)。见表 6。

表 5 DSS 对 SAMP8 小鼠海马组织 A β 和 p-Tau 表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=15$)

Table 5 Effect of DSS on A β and p-Tau expressions in hippocampus of SAMP8 mice ($\bar{x}\pm s, n=15$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	A β /μg·g ⁻¹	p-Tau/ng·g ⁻¹
正常组		52.17±4.80	18.91±3.46
模型组		77.68±7.16 ¹⁾	35.02±3.02 ¹⁾
DSS 低剂量组	14.4	62.82±5.57 ²⁾	26.65±8.64 ²⁾
DSS 中剂量组	28.8	58.02±1.73 ²⁾	21.93±4.50 ²⁾
DSS 高剂量组	57.6	64.31±13.72 ²⁾	26.74±5.07 ²⁾

3.6 对 SAMP8 小鼠海马 Ub、PS、E3、UCHL1+3 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马 Ub 蛋白表达明显升高($P<0.05$),26S、E3、UCHL1+3 蛋白表达水平明显下降($P<0.05$);与模型组比较,DSS 各剂量组 Ub 蛋白表达水平均明显下降($P<0.05$),

高、中剂量组 26S、E3、UCHL1+3 蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$)。见图 4、表 7。

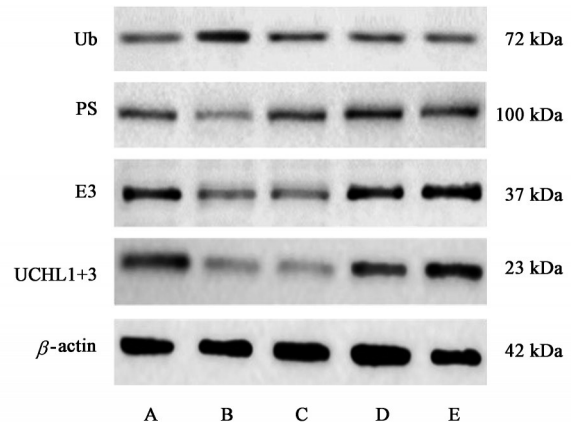


图 4 小鼠海马组织 Ub、PS、E3、UCHL1+3 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Ub, PS, E3, and UCHL1+3 proteins in mice hippocampus

表 6 DSS 对 SAMP8 小鼠海马组织 Ub、PS、E3、UCHL1、UCHL3 mRNA 表达影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 6 Effect of DSS on Ub, PS, E3, UCHL1, and UCHL3 levels in hippocampus of SAMP8 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ub	PS	E3	UCHL1	UCHL3
正常组		0.71±0.01	1.25±0.05	1.51±0.03	1.18±0.02	1.30±0.02
模型组		1.05±0.03 ¹⁾	1.01±0.02 ¹⁾	1.02±0.04 ¹⁾	1.04±0.01 ¹⁾	1.00±0.05 ¹⁾
DSS 低剂量组	14.4	0.86±0.03 ²⁾	1.07±0.02	1.09±0.01	1.06±0.06	1.01±0.01
DSS 中剂量组	28.8	0.84±0.01 ²⁾	1.17±0.01 ²⁾	1.23±0.02 ²⁾	1.13±0.01 ²⁾	1.16±0.01 ²⁾
DSS 高剂量组	57.6	0.85±0.02 ²⁾	1.13±0.02 ²⁾	1.32±0.07 ²⁾	1.09±0.06	1.17±0.05 ²⁾

表 7 DSS 对 SAMP8 小鼠海马组织 Ub、PS、E3、UCHL1+3 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 7 Effect of DSS on Ub, PS, E3, UCHL1+3 protein expressions in hippocampus of SAMP8 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Ub/ β -actin	PS/ β -actin	E3/ β -actin	UCHL1+3/ β -actin
正常组		0.49±0.05	1.62±0.04	1.58±0.06	1.51±0.09
模型组		1.02±0.04 ¹⁾	1.05±0.07 ¹⁾	1.01±0.10 ¹⁾	1.03±0.14 ¹⁾
DSS 低剂量组	14.4	0.64±0.04 ²⁾	1.37±0.04 ²⁾	1.06±0.09	1.08±0.11
DSS 中剂量组	28.8	0.61±0.02 ²⁾	1.49±0.02 ²⁾	1.33±0.07 ²⁾	1.37±0.08 ²⁾
DSS 高剂量组	57.6	0.55±0.06 ²⁾	1.55±0.06 ²⁾	1.45±0.01 ²⁾	1.43±0.11 ²⁾

4 讨论

AD 属于中医“好忘、喜忘、呆、呆痴、愚痴、健忘”等病范畴,既往实验研究多集中在虚、痰、瘀致神机失用,立论多以肾虚精亏、气血不足、心肾两虚为本,痰蒙清窍、瘀血阻络、浊毒痹阻为标^[12]。中医辨证规律因子分析研究提示,肝郁、脾虚、痰浊、瘀血是 AD 发生发展的关键证素^[13]。DSS 出自东汉·张仲景所著《金匱要略·妊娠病脉证并治第二十二篇》:“妇人怀妊,腹中疝痛,当归芍药散主之”和《金匱要略·妇人杂病脉证并治第二十二篇》:“妇人腹中诸疾痛,当归芍药散主之。”功善疏肝活血、健脾

除湿,本为疗妇人之疾而设,但自 20 世纪 80 年代末首次被日本学者用于治疗 AD 获效后,已被广泛用于临床^[14]。基于临床病案的数据挖掘研究表明该方为临床治疗 AD 的常用有效方剂^[15];Meta 分析结果亦证实其能有效提高 AD 患者的智力及生活能力,明显改善认知功能,疗效确切^[16]。因此,本实验以 DSS 为研究对象。

AD 特征性病理改变为神经元凋亡、细胞外 A β 聚集形成的老年斑和细胞内 p-Tau 聚集形成神经原纤维缠结^[3]。SAMP8 快速老化小鼠脑内存在 A β 蛋白沉积和 Tau 蛋白异常磷酸化等典型病理改变,认

知障碍明显,是一种经典AD动物模型^[17-18]。在本研究中,与SAMR1正常小鼠相比,SAMP8小鼠逃避潜伏时间明显延长、穿越平台次数明显减少,说明其学习记忆能力明显降低;CA1区神经元明显减少、胞体聚缩;海马区 β -APP和p-Tau阳性细胞明显增加, $A\beta$ 和p-Tau蛋白水平显著升高。连续灌胃DSS8周后,小鼠逃避潜伏时间明显缩短、穿越平台象限次数和停留时间明显增加,说明其学习记忆能力明显升高;CA1病理改变明显改善; β -APP和p-Tau阳性染色细胞数量显著减少; $A\beta$ 和p-Tau蛋白含量显著降低。提示DSS有改善SAMP8小鼠学习记忆能力、清除脑内 $A\beta$ 和p-Tau异常沉积的作用。

UPP是目前已知的最精细的蛋白降解途径,能够识别与降解多余的、错误折叠或变性的蛋白质,在降解异常蛋白质中发挥核心作用,因此该通路被认为是细胞内蛋白降解的“卫士”。在UPP中,泛素Ub是标记靶蛋白降解的信号分子,蛋白酶体PS是靶蛋白降解的场所,泛素连接酶E3决定靶蛋白的特异性识别,UCHL1、UCHL3等多种去泛素化酶则将泛素羧基端所连接小肽或酯类分子进行水解,促进泛素再循环,以维持泛素系统正常运行。UPP功能障碍影响蛋白质未折叠和折叠错误导致的垃圾和毒素的清除,导致 $A\beta$ 和p-Tau蛋白不能及时有效被降解,在AD的发生发展进程中扮演极其重要的角色^[19-21]。自1987年PERRY等^[22]首次证实AD患者脑内UPP发生功能障碍,不能及时有效地清除 $A\beta$ 和p-Tau蛋白,导致神经细胞凋亡以来,现已有大量研究证实AD患者大脑存在泛素蛋白Ub表达异常、蛋白酶体PS活性下降,E3泛素连接酶Parkin参与调控AD重要效应分子tau蛋白降解、 $A\beta$ 清除,UCHL1、UCHL3含量减少与AD的发生发展密切相关。提示UPP功能障碍程度与AD脑内 $A\beta$ 沉积、Tau蛋白磷酸化有明显相关性,药物可通过调控UPP相关靶点、降解异常折叠或修饰的或变性的蛋白质,以阻止这些无效蛋白质蓄积造成细胞损伤或死亡发挥治疗作用^[8,23-25]。在本研究中,与SAMR1小鼠相比,SAMP8模型小鼠脑内Ub蛋白及mRNA表达水平升高,E3、26S、UCHL1、UCHL3蛋白及mRNA表达水平下降, $A\beta$ 和p-Tau表达显著增加,提示UPP功能发生障碍,不能有效及时地清除脑内积聚的 $A\beta$ 和异常磷酸化Tau蛋白,过量代谢废物堆积,影响细胞新陈代谢,最终造成神经细胞凋亡而出现学习记忆功能障碍。DSS连续干预8周后,SAMP8小鼠海马Ub蛋白表达量和mRNA表达水

平显著下降,26S、E3、UCHL1、UCHL3蛋白表达量和mRNA表达水平显著升高, $A\beta$ 和p-Tau明显下降。提示DSS改善SAMP8小鼠学习记忆能力、清除脑内 $A\beta$ 和p-Tau异常沉积的作用可能与其调控Ub、PS、E3、UCHL1、UCHL3等UPP信号通路的靶点有关。

综上所述,DSS可改善SAMP8小鼠认知能力,其作用机制可能与降低UPP途径中Ub及升高E3、26S、UCHL1、UCHL3的表达,减少 $A\beta$ 和p-Tau异常沉积有关。将在细胞模型上继续探讨其调控UPP通路治疗AD的作用机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] DUMURGIER J, SABIA S. Epidemiology of Alzheimer's disease: Latest trends[J]. Rev Prat, 2020, 70(2):149-151.
- [2] WANG T. New drug research and development for Alzheimer's pathology: Present and Prospect [J]. Shanghai Arch Psychiatry, 2017, 29(4):237-239.
- [3] WELLER J, BUDSON A. Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment [J]. F1000Res, 2018, 7.
- [4] CIECHANOVER A, KWON Y T. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: Therapeutic targets and strategies [J]. Exp Mol Med, 2015, 47:e147.
- [5] ROOS-MATTJUS P, SISTONEN L. The ubiquitin-proteasome pathway [J]. Ann Med, 2004, 36(4):285-295.
- [6] GONG B, RADULOVIC M, FIGUEIREDO-PEREIRA M E, et al. The ubiquitin-proteasome system: Potential therapeutic targets for Alzheimer's disease and spinal cord injury [J]. Front Mol Neurosci, 2016, 9:4.
- [7] AL MAMUN A, UDDIN M S, KABIR M T, et al. Exploring the promise of targeting ubiquitin-proteasome system to combat Alzheimer's disease [J]. Neurotox Res, 2020, 38(1):8-17.
- [8] TRAMUTOLA A, DI DOMENICO F, BARONE E, et al. It is all about (U)biqutin: Role of altered ubiquitin-proteasome system and UCHL1 in Alzheimer disease [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016:2756068.
- [9] GADHAVE K, BOLSHETTE N, AHIRE A, et al. The ubiquitin proteasomal system: A potential target for the management of Alzheimer's disease [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(7):1392-1407.

- [10] 陈云慧,张天娥,龚圆渊,等. 基于泛素-蛋白酶体途径探讨当归芍药散“肝脾同调-血水同治”治疗阿尔茨海默病的作用机制[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2020, 22(1):93-100.
- [11] 余婧萍,贺春香,成绍武,等. 当归芍药散通过调控NF- κ B炎性通路改善H₂O₂诱导的SH-SY5Y细胞氧化损伤的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(10):1-7.
- [12] 陈付艳,于建春,韩景献. 中医药治疗老年期痴呆进展[J]. 山西中医, 2015, 13(5):56-58.
- [13] 刘兆崇. 基于因子分析的老年性痴呆的中医辨证规律研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学, 2011.
- [14] 水岛宣昭. 当归芍药散对老年痴呆的作用[J]. 和汉医药学会志, 1989, 6(3):456-458.
- [15] 李强,崔远武,张玉莲. 中医药治疗老年性痴呆临床应用文献分析[J]. 辽宁中医杂志, 2012, 39(7):1207-1210.
- [16] KIM Y, CHO S H. Danggui-Shaoyao-San for dementia: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(4):e18507.
- [17] 刘荣强,陈云慧. 阿尔茨海默病动物模型的研究进展[J]. 西部医学, 2019, 31(2):326-328, 封3.
- [18] 普元柱,苏灿. 灯盏细辛及其活性成分防治阿尔茨海默病的药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23):5650-5657.
- [19] NANDI D, TAHILIANI P, KUMAR A, et al. The ubiquitin-proteasome system [J]. *J Biosci*, 2006, 31(1):137-155.
- [20] CIECHANOVER A, KWON Y T. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: Therapeutic targets and strategies [J]. *Exp Mol Med*, 2015, 47(3):e147.
- [21] SCHMIDT M F, GAN Z Y, KOMANDER D, et al. Ubiquitin signalling in neurodegeneration: Mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(2):570-590.
- [22] PERRY G, FRIEDMAN R, SHAW G, et al. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(9):3033-3036.
- [23] HARRIS L D, JASEM S, LICCHESI J. The ubiquitin system in Alzheimer's disease [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1233:195-221.
- [24] HONG L, HUANG H C, JIANG Z F. Relationship between amyloid-beta and the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease [J]. *Neurol Res*, 2014, 36(3):276-282.
- [25] ZHANG M, CAI F, ZHANG S, et al. Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) delays Alzheimer's progression *in vivo* [J]. *Scientific Reports*, 2014, (4):7298.

[责任编辑 周冰冰]