

地黄饮子改善AD小鼠脑星形胶质细胞能量代谢障碍及自噬损伤的作用机制

孙梦捷¹, 余虹霓¹, 韩广卉¹, 王凤丽¹, 康盛华¹, 李东岳², 马涛^{1*}

(1. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078; 2. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029)

[摘要] **目的:**研究地黄饮子改善阿尔茨海默病(AD)模型小鼠脑组织星形胶质细胞损伤,调节能量代谢和自噬障碍的作用机制。**方法:**4月龄雄性APP/PS1转基因小鼠40只,随机分为模型组、模型+地黄饮子组(2.5 g·kg⁻¹),每组20只;同背景、同月龄C57BL/6J小鼠40只,随机分为正常组、正常+地黄饮子组(2.5 g·kg⁻¹),每组20只。正常组和模型组均给予等量无菌生理盐水,每天灌胃1次,连续给药150 d。通过新物体识别实验和小鼠跳台实验评价小鼠学习记忆能力。免疫荧光法和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测星形胶质细胞中胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达。高效液相色谱法检测小鼠脑组织中三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、单磷酸腺苷(AMP),并计算能荷(EC)水平。Western blot检测小鼠脑组织肝激酶B1(LKB1)、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、自噬激活激酶1(ULK1)、哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)的磷酸化水平及自噬相关蛋白Beclin-1、微管相关蛋白1轻链3(LC3)-II/LC3-I、p62的表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组小鼠新物体识别实验辨别指数显著下降($P<0.01$),跳台实验停留潜伏期显著缩短,错误次数显著增加,星形胶质细胞GFAP蛋白表达显著上调,脑组织ATP、ADP含量及EC值显著降低,AMP含量显著上升,AMPK、LKB1、mTOR磷酸化水平和p62蛋白表达显著升高,ULK1磷酸化水平和Beclin-1、LC3-II/LC3-I蛋白表达显著下降($P<0.01$);正常+地黄饮子组小鼠中上述实验指标则差异无统计学意义。与模型组比较,模型+地黄饮子组小鼠新物体识别实验辨别指数明显增加($P<0.05$),跳台实验停留潜伏期显著延长($P<0.01$),错误次数显著减少($P<0.01$),星形胶质细胞GFAP蛋白表达量明显下降($P<0.05$),脑组织ATP、ADP含量及EC值明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),AMP含量明显下降($P<0.05$),AMPK、LKB1和mTOR磷酸化水平和p62蛋白表达显著降低,ULK1磷酸化水平和Beclin-1、LC3-II/LC3-I蛋白表达显著升高($P<0.01$)。**结论:**地黄饮子通过保护星形胶质细胞,改善AD小鼠脑内能量代谢和自噬障碍,提高模型小鼠学习记忆能力。

[关键词] 地黄饮子; 阿尔茨海默病; 星形胶质细胞; 能量障碍; 自噬; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/自噬激活激酶1(mTOR/ULK1)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)08-0019-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230607

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230215.1406.004.html>

[网络出版日期] 2023-02-16 10:07:41

Mechanism of Dihuang Yinzi in Improving Energy Metabolism Disorder and Autophagy Injury of Astrocytes in Brain of AD Mice

SUN Mengjie¹, YU Hongni¹, HAN Guanghui¹, WANG Fengli¹, KANG Shenghua¹, LI Dongyue², MA Tao^{1*}

(1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Dihuang Yinzi (DHYZ) in improving astrocyte injury in the brain and regulating energy metabolism and autophagy disorder in Alzheimer's disease (AD) model mice. **Method:** Forty male APP/PS1 transgenic mice aged four months were randomly divided into a model

[收稿日期] 2022-12-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973786,81673929)

[第一作者] 孙梦捷,在读硕士,从事神经退行性疾病的发病机制及中药干预研究,Tel:010-67689634,E-mail:sunmengjie1114@163.com

[通信作者] *马涛,博士,副研究员,从事神经退行性疾病发病机制及中药干预研究,Tel:010-67689634,E-mail:matao327@126.com

group and a model + DHYZ group ($2.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 20 mice in each group. Forty C57BL/6J mice with the same background and same age were randomly divided into a control group and a control + DHYZ group ($2.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 20 mice in each group. The mice in the control group and the model group were administered with an equal volume of sterilized normal saline by gavage, once a day for 150 days. Novel object recognition test and step-down test were performed to evaluate the learning and memory ability of mice. The expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in astrocytes was detected by immunofluorescence and Western blot. High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), and adenosine monophosphate (AMP) in brain tissues of mice, and the data obtained were used to calculate energy charge (EC) levels. The phosphorylation levels of liver kinase B1 (LKB1), adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK), UNC-51-like kinase 1 (ULK1), and mammalian target of rapamycin (mTOR) and the expression levels of autophagy-related proteins Beclin-1, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)- II/LC3- I, and p62 in mouse brain were measured by Western blot. **Result:** Compared with the control group, the model group showed decreased novel object recognition index, shortened retention latency, increased error times in the step-down test, up-regulated protein expression of GFAP, decreased content of ATP, ADP, and EC in brain tissues, elevated AMP, increased levels of p-AMPK, p-LKB1, and p-mTOR, and protein expression of p62, and down-regulated p-ULK1 level and protein expression of Beclin-1 and LC3- II/LC3- I ($P<0.01$), while the above experimental indexes were not significantly different in the control + DHYZ group. Compared with the model group, the model + DHYZ group showed increased novel object recognition index ($P<0.05$), prolonged retention latency ($P<0.01$), decreased error times ($P<0.01$) in the step-down test, reduced protein expression of GFAP ($P<0.05$), increased content of ATP, ADP, and EC in brain tissues ($P<0.05$, $P<0.01$), decreased AMP content ($P<0.05$), reduced p-AMPK, p-LKB1, and p-mTOR levels and protein expression of p62, and up-regulated p-ULK1 level and protein expression of Beclin-1 and LC3- II/LC3- I ($P<0.01$). **Conclusion:** By protecting astrocytes, DHYZ can improve energy metabolism and autophagy disorder in AD mice to improve the learning and memory ability of model mice.

[Keywords] Dihuang Yinzi; Alzheimer's disease; astrocytes; energy disorder; autophagy; mammalian target of rapamycin (mTOR)/UNC-51-like kinase 1 (ULK1)

阿尔茨海默病(AD)是以含有 β 淀粉样蛋白(A β)的胞外斑块和tau的胞内神经纤维缠结为病理特征的神经退行性疾病,是老年期痴呆最常见的类型。通常表现为显著的遗忘性认知障碍和记忆损伤^[1]。目前,全世界有超过5 000万痴呆患者,其中AD患者占60%~80%。随着人口的快速老龄化,AD的发病率也在不断增加,预计我国AD患者人数将从2020年的1 000万增加到2050年的4 000万以上^[2]。加强早期干预是AD治疗的国际共识。近年来有研究表明能量代谢障碍在AD发病过程中始于极早期^[3],且与星形胶质细胞损伤关系密切。有研究证实,在AD脑中A β 和Tau等显著病理特征出现之前就出现自噬功能障碍^[4-6],因此二者共同成为AD的早期病理事件。星形胶质细胞对脑组织能量供应发挥重要作用,其损伤表现为胶质纤维酸性蛋白(GFAP)蛋白表达增加,引起能荷水平下降和脑能量代谢障碍,从而激活腺苷酸化活化蛋白激酶

(AMPK)^[7]。AD能量代谢障碍可激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)激活,自噬启动因子——自噬激活激酶1(ULK1)去磷酸化,进而出现自噬障碍,使AD病理产物不能及时清除而加重病情。因此保护星形胶质细胞损伤,改善能量代谢和自噬功能障碍成为AD早期干预的理想策略。

地黄饮子出自《黄帝内经·素问·宣明论方》,是“寒凉派”宗师刘完素益肾填髓的经典温补名方。大量研究表明,地黄饮子可以明显改善AD患者的学习记忆能力和认知水平^[8]。本课题组前期发现,地黄饮子可通过保护线粒体结构和功能,抑制APP/PS1转基因小鼠脑能量代谢障碍,提高AD小鼠脑组织能荷水平;同时调节下游凋亡相关蛋白,发挥抗凋亡作用^[9],通过调控蛋白激酶R样内质网激酶(PERK)/真核细胞起始因子2 α (eIF2 α)信号通路,抑制 β 淀粉样前体蛋白水解酶1(BACE1)翻译,减少A β 累积,改善能量代谢损伤导致的认知功能

下降^[10]。然而,地黄饮子对AD小鼠脑组织能量代谢的改善作用是否与改善胶质细胞功能有关,这种改善作用是否会进一步提高细胞自噬功能发挥神经保护作用还未见报道。本文将围绕AD小鼠脑组织星形胶质细胞损伤,研究地黄饮子通过保护星形胶质细胞功能,改善AD小鼠脑组织能量障碍及自噬损伤的分子机制。

1 材料

1.1 动物 40只4月龄雄性APP/PS1转基因小鼠,40只4月龄雄性C57BL/6J小鼠,购自江苏华创信诺医药科技有限公司,合格证号SCXK(苏)2020-0009,饲养于北京中医药大学东方医院SPF实验动物中心,温度(24±2)℃,相对湿度(50±10)%,12 h/12 h明暗循环,光照时间8:00~20:00。小鼠维持饲料,自由饮食和饮水。动物实验获得了北京中医药大学东方医院动物实验伦理委员会批准(编号20211226)。

1.2 药物 地黄饮子方剂由熟地黄15 g、山茱萸15 g、肉苁蓉15 g、巴戟天15 g、附子15 g、肉桂15 g、麦冬15 g、石斛15 g、五味子15 g、茯苓15 g、石菖蒲15 g、远志15 g、薄荷15 g、生姜10 g、大枣5 g组成。饮片由北京同仁堂药店提供(批号分别为1312-315、2814-021、2131-512、3918-508、4492-070、3729-s091、2929-360、7926-y448、5982-u650、5104-617、3291-759、2760-j610、4501-336、3719-291、6640-739)。经北京中医药大学第三附属医院赵永烈主任医师鉴定为正品。按照地黄饮子原方剂量称取药物,混匀后的加入4倍量蒸馏水,浸泡2 h,100℃提取2次,每次2 h,收集煎液,混合过滤,60℃浓缩至浸膏(14 g中药生药合1 g浸膏),浸膏4℃保存,使用前用无菌生理盐水溶解至所需浓度。

1.3 试剂 GFAP、LKB1、磷酸化(p)-LKB1、AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR、ULK1、p-ULK1、Beclin-1、微管相关蛋白1轻链3(LC3)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为3670、3047、3482、5832、50081、2983、5536、8054、14202、3495、4599), β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国Santa Cruz公司,批号sc-47778),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体、山羊抗小鼠二抗、FITC标记的山羊抗小鼠二抗(中杉金桥生物公司,批号分别为ZB-2301、ZB-2305、ZF-0312),聚偏二氟乙烯PVDF膜(德国Merck公司,批号IPVH00010),RIPA组织蛋白裂解液、BCA蛋白测定试剂盒(普利来基因技术有限公司,批号分别为20220519、20220215),Pierce

ECL Plus显色试剂盒(美国Thermo Fisher公司,批号32134),单磷酸腺苷(AMP)钠、二磷酸腺苷(ADP)钠和三磷酸腺苷(ATP)二钠对照品(美国Sigma-Aldrich公司,批号分别为A1752、SML1231、A1852)。

1.4 仪器 新物体识别箱(自制),小鼠跳台(中国医学科学院药物所),Mini-Protean型小型垂直电泳系统及转膜仪(美国Bio-Rad公司),GeneGnome型ECL成像仪(美国SynGene公司),IX71型正置显微镜(日本Olympus公司),ELX800型酶标仪、Synergy H1型全波长酶标(美国Bio Tek公司),5810R型台式多功能高速冷冻离心机(美国Eppendorf公司),2695型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Waters公司),Ultrospec 3300pro型分光光度计(美国Amersham Biosciences公司),CM1900型冰冻切片仪(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 经7 d适应性喂养后,随机将40只4月龄APP/PS1转基因小鼠分为模型组(20只)、模型+地黄饮子组(20只);同背景、同月龄C57BL/6J小鼠40只随机分为正常组(20只)、正常+地黄饮子组(20只)。按照人临床用地黄饮子给药剂量为浸膏0.25 g·kg⁻¹体质量换算小鼠灌胃给药剂量为2.5 g·kg⁻¹。正常组和模型组小鼠灌胃给予等体积的无菌生理盐水,每天1次,给药150 d,给药结束后,进行小鼠行为学及相关指标测试。在给药结束后,模型组小鼠死亡2只,模型+地黄饮子组小鼠死亡1只,正常+地黄饮子组小鼠死亡2只。

2.2 新物体识别实验 新物体识别实验共进行3 d。该实验根据小鼠对已知熟悉物体和未知新物体的探究时长评价小鼠记忆能力。实验第1天,将小鼠置于新物体识别箱中,自由探索5 min。第2天,在新物体识别箱中放入2个相同物体,记录小鼠在5 min之内对这2个物体的探索时间。第3天,将其中一个物体换为形状不同的新物体,记录小鼠在5 min之内对新旧物体探索的时间。每次实验结束后都要清理行为箱。按照公式计算小鼠新物体识别的分辨指数,分辨指数=(新物体探索时间-旧物体探索时间)/(新物体探索时间+旧物体探索时间)。

2.3 跳台实验 小鼠跳台实验共进行2 d。在实验第1天,将小鼠置于站台上后,适应环境5 min后通电。小鼠因跳下站台触碰通电铜栅而受电击,通电持续5 min,训练结束。实验第2天,跳台装置先通电后,将小鼠缓慢置于站台上,小鼠从置于站台到

第1次跳下站台的时间记录为停留潜伏期,小鼠在5 min内跳下站台的次数记录为错误次数。

2.4 脑组织样品处理 小鼠新物体识别实验和跳台实验结束后,随机选取6只小鼠进行麻醉。复方聚维酮碘消毒后打开腹腔,生理盐水冲洗心脏后用4%中性多聚甲醛溶液进行心脏灌注,观察到小鼠肝脏颜色变白,四肢僵硬后断头取脑,于4℃条件下保存在4%中性多聚甲醛溶液中。经30%蔗糖溶液脱水,用冰冻切片连续切割得到小鼠脑组织切片,保存在-20℃冰箱,用于后续组织学检测。

2.5 免疫荧光法测定星形胶质细胞中GFAP蛋白表达 将小鼠脑切片平衡至室温,使用0.3% Triton X-100溶液透膜30 min,10%胎牛血清白蛋白(BSA)在室温条件下封闭1 h。根据说明书加入一抗稀释液(1:200),在4℃条件下孵育过夜。一抗孵育结束,采用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗完毕后加入二抗(1:200),室温避光孵育2 h,结束后使用PBS缓冲液冲洗二抗,滴加含DAPI的抗荧光淬灭封片剂封片。使用荧光显微镜观测切片并采集图像,采用Image J1.8.0图像分析软件进行定量分析。

2.6 小鼠脑组织AMP、ADP、ATP含量及能荷(EC)测定 玻璃匀浆器中加入预冷的生理盐水,脑组织置于玻璃匀浆器中于冰上迅速匀浆,制成20%匀浆液。加入4%高氯酸溶液混匀后离心,在4℃条件下12 000 r·min⁻¹离心20 min(离心半径16 cm)。取上清液加入20% KOH溶液80 μL,采用HPLC梯度洗脱,测定AMP、ADP、ATP含量。色谱条件:ODS HYPERSIL C18 色谱分析柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),柱温为25℃;流动相为0.05 mol·L⁻¹ PBS(pH 6.5);流速为1.0 mL·min⁻¹;样品室温度为10℃;进样体积为10 μL;紫外检测波长254 nm;实验采用内标法定量。按照公式计算EC值,EC=[ATP+0.5(ADP)]/(ATP+ADP+AMP)。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测LKB1、AMPK、ULK1、mTOR磷酸化及GFAP、Beclin-1、p62、LC3-II/LC3-I表达水平 将各组小鼠脑组织剪碎后,置玻璃匀浆器中,加入预冷的RIPA裂解液,在冰上进行匀浆后提取蛋白。根据试剂盒说明书操作,采用BCA法测定蛋白浓度。用SDS-PAGE电泳,每孔上样量为50 μg,恒压100 V电泳50 min,295 mA恒流转膜1.5 h。聚偏二氟乙烯(PVDF)膜用含5%BSA的PBST封闭液封闭1 h,加入封闭液稀释的一抗反应液(1:1 000)4℃孵育过夜。PBST洗膜后,加入封闭液稀释的第二抗体反应液[1:

(5 000~8 000)],室温条件下孵育1.5 h。PBST清洗后,ECL发光液反应1 min, GeneGnome ECL成像仪捕捉图像,采用Image J 1.8.0软件分析条带灰度值。

2.8 统计学分析 实验数据采用SPSS 26.0软件进行处理,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较使用One-way ANOVA结合Post Hoc检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对AD小鼠学习记忆的影响 与正常组比较,模型组小鼠辨别指数显著下降($P<0.01$),正常+地黄饮子组小鼠辨别指数差异无统计学意义;与模型组比较,模型+地黄饮子组小鼠辨别指数明显升高($P<0.05$)。与正常组比较,模型组小鼠的停留潜伏期显著缩短,错误次数显著增加($P<0.01$),正常+地黄饮子组的停留潜伏期和错误次数差异无统计学意义。与模型组比较,模型+地黄饮子组小鼠停留潜伏期显著延长,错误次数显著下降($P<0.01$)。见表1、表2。

表1 地黄饮子对AD小鼠新物体识别实验辨别指数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=18$)

Table 1 Effect of Dihuang Yinzi on discrimination index of AD mice in novel object recognition memory test ($\bar{x}\pm s$, $n=18$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	辨别指数
正常组		0.393±0.058
模型组		0.116±0.007 ²⁾
正常+地黄饮子组	2.50	0.379±0.094
模型+地黄饮子组	2.50	0.264±0.077 ³⁾

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7同)

表2 地黄饮子对AD小鼠跳台停留潜伏期和错误次数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=18$)

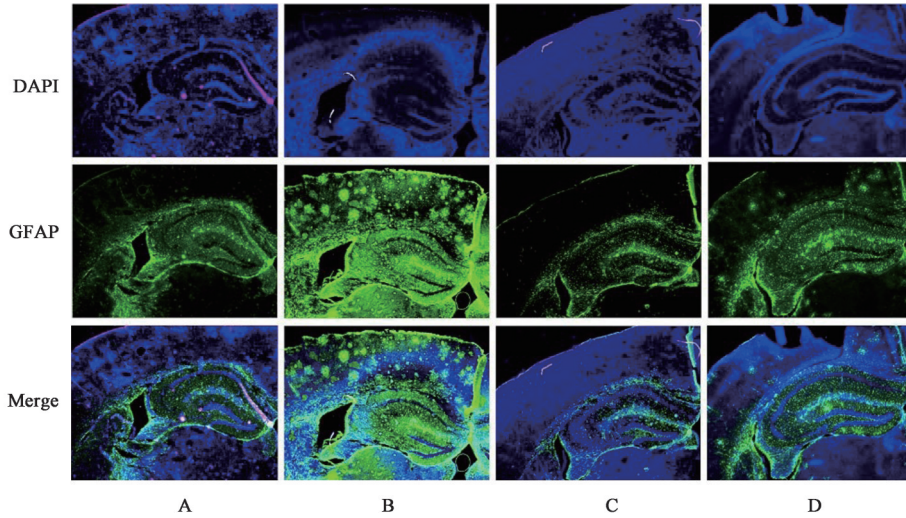
Table 2 Effect of Dihuang Yinzi on latency and error time of AD mice in step-down test ($\bar{x}\pm s$, $n=18$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	停留潜伏期/s	错误数/次
正常组		229.13±75.29	0.69±0.24
模型组		89.37±15.17 ²⁾	9.96±1.58 ²⁾
正常+地黄饮子组	2.50	207.94±59.26	0.57±0.21
模型+地黄饮子组	2.50	174.60±62.37 ⁴⁾	2.21±0.74 ⁴⁾

3.2 对AD小鼠脑组织星形胶质细胞GFAP蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠脑组织星形胶质细胞中GFAP表达量显著增强($P<0.01$),正常+地黄饮子组小鼠变化差异无统计学意义;与模型组比较,模型+地黄饮子组小鼠脑组织GFAP表达量明显降低($P<0.05$)。与正常组比较,模型组小鼠脑组

织GFAP蛋白表达显著上调($P<0.01$),正常+地黄饮子组GFAP的表达差异无统计学意义。与模型组比

较,模型+地黄饮子组小鼠星形胶质细胞中GFAP表达水平明显下降($P<0.05$)。见图1、图2和表3。



注:A.正常组;B.模型组;C.正常+地黄饮子组;D.模型+地黄饮子组(图2-图5同)

图1 地黄饮子对AD小鼠脑内GFAP蛋白表达的影响(免疫荧光,×40)

Fig. 1 Effect of Dihuang Yinzi on level of GFAP protein expression in brain of AD mice (IF, ×40)

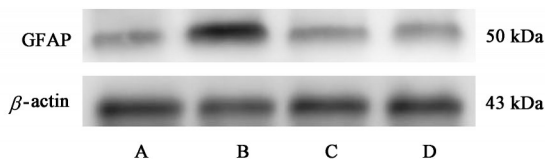


图2 各组小鼠脑组织GFAP蛋白水平电泳

Fig. 2 Electrophoresis of GFAP protein expression level in brain of mice

3.3 对AD小鼠脑组织ATP、ADP、AMP含量及EC的影响 与正常组比较,模型组小鼠ATP、ADP含量及EC值均显著下降($P<0.01$),AMP含量显著升高($P<0.01$),正常+地黄饮子组各值均差异无统计学意义。与模型组比较,模型+地黄饮子组小鼠

表3 地黄饮子对AD小鼠脑组织GFAP蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of Dihuang Yinzi on level of GFAP protein expression in brain of AD mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GFAP/β-actin
正常组		0.483±0.087
模型组		1.692±0.446 ²⁾
正常+地黄饮子组	2.50	0.437±0.091
模型+地黄饮子组	2.50	0.701±0.062 ³⁾

ATP、ADP含量及EC值均明显上升,差异有明显统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),AMP水平明显下降($P<0.05$)。见表4。

表4 地黄饮子对AD小鼠脑组织ATP、ADP、AMP含量及EC的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 4 Effect of Dihuang Yinzi on level of ATP, ADP, AMP and EC in brain of AD mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ATP/μmol·g ⁻¹	ADP/μmol·g ⁻¹	AMP/μmol·g ⁻¹	EC值
正常组		63.51±12.74	38.29±7.75	37.91±6.04	0.59±0.07
模型组		18.27±4.46 ²⁾	29.43±6.10 ²⁾	48.28±11.35 ²⁾	0.34±0.01 ²⁾
正常+地黄饮子组	2.50	66.19±10.03	39.10±11.41	38.26±9.52	0.60±0.09
模型+地黄饮子组	2.50	40.75±8.82 ⁴⁾	31.73±12.54 ³⁾	43.75±8.04 ³⁾	0.49±0.09 ⁴⁾

3.4 对AD小鼠脑组织AMPK和LKB1磷酸化水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠LKB1和AMPK磷酸化水平显著升高($P<0.01$),正常+地黄饮子组小鼠LKB1和AMPK磷酸化水平差异无统计学意义;与模型组比较,模型+地黄饮子组小鼠LKB1和AMPK磷酸化水平显著下降($P<0.01$)。见

图3、表5。

3.5 对AD小鼠脑组织mTOR和ULK1磷酸化水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠mTOR磷酸化水平显著升高,ULK1磷酸化水平显著下降($P<0.01$),正常+地黄饮子组小鼠LKB1和AMPK磷酸化水平差异无统计学意义;与模型组比较,模型+地

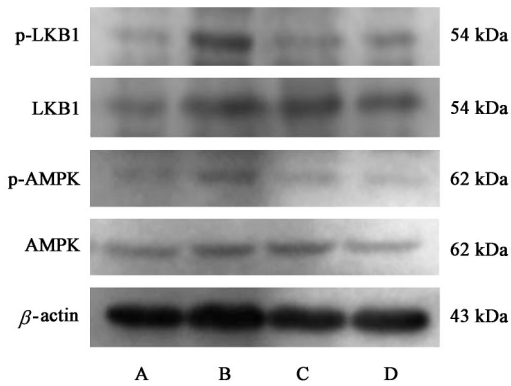


图3 各组小鼠脑组织中LKB1和AMPK磷酸化蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of phosphorylation of LKB1 and AMPK protein expression in brain of AD mice

表5 地黄饮子对AD小鼠脑组织中LKB1和AMPK磷酸化水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Dihuang Yinzi on phosphorylation of LKB1 and AMPK in brain of AD mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	p-LKB1/LKB1	p-AMPK/AMPK
正常组		0.763±0.094	0.328±0.071
模型组		2.427±0.178 ²⁾	1.186±0.069 ²⁾
正常+地黄饮子组	2.50	0.794±0.142	0.363±0.056
模型+地黄饮子组	2.50	1.106±0.086 ⁴⁾	0.527±0.041 ⁴⁾

地黄饮子组小鼠mTOR磷酸化水平显著下降, ULK1磷酸化水平显著升高 ($P < 0.01$)。见图4、表6。

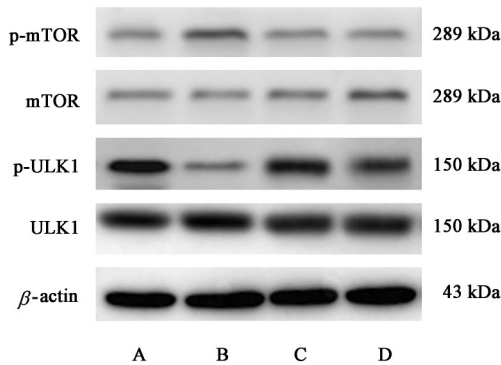


图4 各组小鼠脑组织中mTOR和ULK1磷酸化蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of phosphorylation of mTOR and ULK1 protein expression levels in brain of mice

表6 地黄饮子对AD小鼠脑组织中mTOR和ULK1磷酸化蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Dihuang Yinzi on phosphorylation of mTOR and ULK1 protein expression levels in brain of AD mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	p-mTOR/mTOR	p-ULK1/ULK1
正常组		0.863±0.071	0.974±0.063
模型组		4.321±0.379 ²⁾	0.478±0.052 ²⁾
正常+地黄饮子组	2.50	0.814±0.176	1.104±0.219
模型+地黄饮子组	2.50	0.949±0.092 ⁴⁾	0.786±0.057 ⁴⁾

3.6 对AD小鼠脑组织Beclin-1、LC3-II/LC3-I和p62表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠Beclin-1、LC3-II/LC3-I的表达水平显著下降 ($P < 0.01$), p62的表达水平显著上升 ($P < 0.01$), 而正常+地黄饮子组小鼠各值均差异无统计学意义; 与模型组比较,模型+地黄饮子组小鼠Beclin-1、LC3-II/LC3-I蛋白的表达显著上调 ($P < 0.01$), p62蛋白的表达则显著下降 ($P < 0.01$)。见图5、表7。

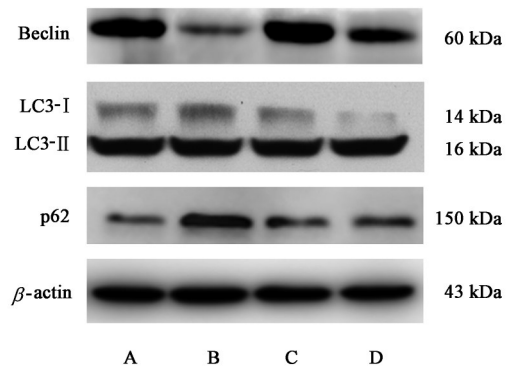


图5 各组小鼠脑组织中Beclin-1、LC3和p62蛋白表达水平电泳
Fig. 5 Electrophoresis of Beclin-1, LC3 and p62 protein expression levels in brain of mice

表7 地黄饮子对AD小鼠脑组织中Beclin-1、LC3和p62蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 7 Effect of Dihuang Yinzi on level of Beclin-1, LC3 and p62 protein expression levels in brain of AD mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Beclin-1/ β -actin	LC3-II/LC3-I	p62/ β -actin
正常组		1.373±0.439	8.427±0.516	0.389±0.074
模型组		0.416±0.037 ²⁾	3.112±0.411 ²⁾	0.947±0.072 ²⁾
正常+地黄饮子组	2.50	1.485±0.627	8.696±0.763	0.402±0.163
模型+地黄饮子组	2.50	0.997±0.153 ⁴⁾	9.984±0.0618 ⁴⁾	0.475±0.097 ⁴⁾

4 讨论

AD是以进行性认知功能障碍、语言功能障碍及记忆损伤为主要表现的神经退行性疾病^[1]。随着我国人口老龄化现象日益凸显,AD患者数量持续增加,给社会发展造成沉重经济负担。AD一经临床诊断,往往恶化速度较快且病程不能逆转,治疗效果不尽理想。因此对AD早期进行防治和干预已成为国内外研究和治疗AD的基本共识。能量代谢稳态是保证机体脑组织正常生理功能的重要条件,近年来有研究表明,能量障碍在AD早期就已出现^[3]。葡萄糖是能量代谢的主要底物,脑组织对葡萄糖的摄取取决于神经元对能量的需求^[11]。神经

元由于缺少相关酶,因此其糖酵解的能力相对有限,而星形胶质细胞在为神经元供给能量方面作用突出其损伤会导致脑组织能量缺乏,造成神经元的能量障碍^[12-13]。本研究以星形胶质细胞损伤及其所致的能量障碍和能量障碍所致的自噬损伤为切入点,探讨地黄饮子保护星形胶质细胞,改善能量障碍,促进自噬的作用机制。

APP/PS1双转基因小鼠是目前广泛应用于研究AD的动物模型,该模型小鼠脑中 $A\beta$ 水平与年龄的增长成正比,在9个月左右脑内出现较多的 $A\beta$ 沉积,临床和实验研究发现在AD典型病理特征形成以前,脑组织就已出现能量障碍^[3]和自噬障碍^[5-6]。随着病情不断发展,AD患者认知障碍和记忆损伤的症状日益明显,能量障碍也逐渐加重。因此本研究选用3月龄APP/PS1双转基因小鼠作为研究对象,以此模拟AD早期能量障碍的病理状态。近年来临床研究发现地黄饮子具有神经保护功能^[14-15],本研究组前期工作也发现地黄饮子可以改善AD小鼠能量代谢相关的认知功能障碍^[8]。本研究中采用新物体识别实验和跳台实验观察地黄饮子对APP/PS1双转基因小鼠学习记忆功能的影响。停留潜伏期与小鼠的被动回避记忆能力成正比,而错误次数与之成反比。分辨指数越高则预示着动物的学习记忆能力越好,实验结果说明APP/PS1双转基因小鼠学习记忆能力减退,地黄饮子能够明显改善AD模型小鼠学习记忆能力。

星形胶质细胞作为脑组织中最丰富的胶质细胞,通过输送葡萄糖,储存糖原及进行乳酸穿梭为神经元提供能量^[13]。星形胶质细胞的损伤会导致脑组织能量供应不足,出现一系列神经系统的损伤,继而星形胶质细胞会发生明显的形态和分子表型改变,其中最广泛的特征是胶质纤维酸性蛋白GFAP的表达上调^[16]。大量研究显示,脑组织中能量的减少会引起AMP含量上升,ATP和ADP含量下降,进而表现为EC下降^[17]。本实验研究结果显示,模型+地黄饮子组小鼠的GFAP水平下降,能荷水平明显增加,说明地黄饮子通过保护星形胶质细胞,有效改善星形胶质细胞损伤所致的能量障碍。AMPK作为细胞能量状态的传感器,在能量障碍时会被上游蛋白LKB1所激活^[18]。由于星形胶质细胞的损伤导致能荷的下降和AMP上调,而AMP作为低能电荷信号,其升高会增加LKB1与AMPK的亲合力^[19],促使LKB1组成性激活AMPK^[7]。在本研究发现地黄饮子使LKB1和AMPK的磷酸化下降,

说明地黄饮子可以调节AD小鼠体内的能量障碍,促进脑组织能量稳态的恢复。

ULK1磷酸化的增加和Beclin-1表达上调是自噬启动阶段的重要信号。在自噬小泡膜开始形成时,Atg8的同源物LC3开始发生改变。LC3-I经加工修饰转变成LC3-II,结合于自噬体膜上促进自噬体膜的封闭,在自噬体与溶酶体融合后被降解,因此LC3-II/LC3-I能够反映细胞自噬的程度^[20]。p62是参与自噬溶酶体降解的关键蛋白,直接与LC3结合而进入自噬体,并与自噬溶酶体一同降解。近年来研究显示,自噬障碍在AD病程的早期阶段就已出现^[6],自噬障碍导致神经纤维缠结和老年斑的清除率下降是推进AD病情恶化的重要原因^[21]。mTOR是自噬的负性调节激酶,参与到细胞自噬的众多调节通路中。有研究表明,在自噬障碍的AD小鼠中,mTOR处于激活状态,阻断自噬启动子ULK1与AMPK的联系而导致自噬不能被激活^[7]。Beclin-1和LC3在自噬障碍的AD小鼠体内表达下调,p62由于未能被降解而堆积,表达上调^[20]。本研究结果与此一致,并且大量研究表明能够通过药物改善AD神经细胞中受损的自噬功能,增加对错误折叠蛋白的清除,减少神经细胞损伤物质积累^[22-23]。本研究显示,AD小鼠存在自噬障碍,而地黄饮子给药后Beclin-1和LC3表达上调,p62表达下降,说明地黄饮子可以促进AD小鼠促进自噬体与溶酶体结合,改善自噬障碍,提高神经细胞自噬水平。

地黄饮子是益肾填髓的经典方剂,中医学认为,肾为先天之本,人体真阴、真阳之根本。肾藏精主骨,肾精能够生髓,包括脑髓、脊髓、骨髓。脑为髓海,脑髓充足则思维敏捷,反应灵敏;肾精不足,则脑髓化生减少,髓海空虚则生痴呆。肾精渐亏,又因饮食、情志等因素导致内伤积损,脏腑失调,气血失运,痰瘀阻络,脑失所养,最终导致神明失用,故本病的基本病机为肾气亏虚,痰浊上泛,脑失所养,髓减脑消。地黄饮子的4味君药中,熟地黄、山萸肉滋补肾阴;巴戟天、肉苁蓉温补肾阳,共同调节肾之阴阳平衡,附子肉桂助阳益火,协助肉苁蓉、巴戟天温暖下元,并可摄纳浮阳,引火归原,石斛、麦冬滋阴益胃,补先天以养后天,五味子酸涩收敛,合山茱萸固肾涩精,伍肉桂能纳气归肾,方中诸药合用发挥益肾填髓的作用。研究结果显示,地黄饮子可增强AD小鼠学习记忆能力,提高其脑组织能荷水平,改善自噬障碍。地黄饮子被广泛应用于AD临床治疗中,具有改善AD患者学习记忆能力,延缓

发病进程的显著疗效^[14-15]。星形胶质细胞损伤导致的能量障碍可加重脑组织能量供给失衡和引发自噬功能障碍,造成神经损伤物质累积,与AD肾虚下元虚衰,痰浊上泛损伤髓病机存在内在联系。

本课题组前期研究发现地黄饮子可以抑制能量代谢障碍AD小鼠脑内A β 的累积^[13]。本研究以APP/PS1小鼠为模型,模拟AD早期能量代谢障碍和星形胶质细胞损伤的状态,通过给予益肾填髓方剂地黄饮子进行干预和治疗,发现地黄饮子可以改善能量代谢障碍小鼠的学习记忆能力,通过保护星形胶质细胞,增加脑组织内ATP含量,提高EC水平,小鼠脑组织中自噬相关因子ULK1、Beclin-1、LC3-II表达上调,AD小鼠学习记忆能力明显改善。本研究初步揭示了地黄饮子对星形胶质细胞能量代谢和自噬的调节机制,但随着能量代谢障碍在AD初期到后期的变化过程,自噬也呈现由代偿性激活到损伤抑制的动态变化,地黄饮子在不同时段是否会表现出对自噬的不同的调节机制,还有待于进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] KNOPMAN D S, AMIEVA H, PETERSEN R C, et al. Alzheimer disease [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 7(1):33.

[2] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPELTO M, et al. Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2021, 397(10284):1577-1590.

[3] BORDONE M P, SALMAN M M, TITUS H E, et al. The energetic brain - A review from students to students [J]. J Neurochem, 2019, 151(2):139-165.

[4] 周彦均,黄南渠,巴智胜,等. 自噬在阿尔兹海默病发病机制中的作用[J],中国实用神经疾病杂志,2019, 22(12):1388-1392.

[5] LI Q, LIU Y, SUN M. Autophagy and Alzheimer's disease [J]. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(3): 377-388.

[6] LEE J H, YANG D S, GOULBOURNE C N, et al. Faulty autolysosome acidification in Alzheimer's disease mouse models induces autophagic build-up of A β in neurons, yielding senile plaques [J]. Nat Neurosci, 2022, 25(6):688-701.

[7] LI Y, CHEN Y. AMPK and autophagy [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1206:85-108.

[8] HAN G, ZHEN W, DAI Y, et al. Dihuang-Yinzi alleviates cognition deficits via targeting energy-related metabolism in an Alzheimer mouse model as

demonstrated by integration of metabolomics and network pharmacology [J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14:873929.

[9] 温彬宇,张志辰,高俊峰,等. 地黄饮子抑制能量障碍诱导的APP/PS1小鼠内质网应激及神经元凋亡的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 111-117.

[10] 张志辰,温彬宇,高俊峰,等. 地黄饮子调节PERK/eIF2 α 通路抑制能量代谢障碍AD小鼠脑内 β 淀粉样蛋白累积的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21):91-98.

[11] 李辉,蒋与刚. 阿尔茨海默病脑组织能量代谢紊乱及其机制[J]. 生理科学进展, 2022, 53(4):276-280.

[12] LOPEZ-GAMBERO A J, MARTINEZ F, SALAZAR K, et al. Brain glucose-sensing mechanism and energy homeostasis [J]. Mol Neurobiol, 2019, 56: 769-796.

[13] 罗程,夏贞焰,脑内神经元-星形胶质细胞能量代谢偶联研究进展[J]. 重庆医学, 2018, 47(9):1245-1247.

[14] 谢芳,谢宁,于水澜,等. 地黄饮子治疗老年痴呆研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(1): 106-109.

[15] 马玮莉,王亚东. 地黄饮子加味治疗老年期痴呆的理论探讨[J]. 中医临床研究, 2017, 9(6):8-10.

[16] PRICE B R, JOHNSON L A, NORRIS C M. Reactive astrocytes: The nexus of pathological and clinical hallmarks of Alzheimer's disease [J]. Ageing Research Reviews, 2021, 68, 101335.

[17] CROCKER H, PELOSSE M, SCHLATTNER U, et al. AMPfret: Synthetic nanosensor for cellular energy states [J]. Biochem Soc Trans, 2020, 48(1):103-111.

[18] GARCIA D, SHAW R J. AMPK: Mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance [J]. Mol Cell, 2017, 66(6):789-800.

[19] LIN S C, HARDIE D G. AMPK: Sensing glucose as well as cellular energy status [J]. Cell Metab, 2018, 27(2):299-313.

[20] RUNWAL G, STAMATAKOU E, SIDDIQI F H, et al. LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells [J]. Sci Rep, 2019, 9(1):10147.

[21] XIN S H, TAN L, CAO X P, et al. Clearance of amyloid beta and Tau in Alzheimer's disease: From mechanisms to therapy [J]. Neurotox Res, 2018, 34(3):733-748.

[22] 梅峥嵘,洪晔,袁中文,等. 瑞香素对阿尔兹海默病模型小鼠自噬的影响[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(17):2198-2203.

[23] 雷鑫,叶树,王国权,等. 芦荟大黄素对阿尔兹海默病大鼠PI3K/Akt/mTOR通路介导自噬的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2022, 41(3):71-78.

[责任编辑 周冰冰]