

补肾填精法对肾虚阿尔茨海默小鼠海马自噬的干预作用

朱仲康, 张林, 柳春, 王旭, 刘慧慧, 赵丹玉*
(辽宁中医药大学 中西医结合学院, 沈阳 110847)

[摘要] **目的:** 通过研究六味地黄丸对肾虚阿尔茨海默病(AD)小鼠海马神经元自噬水平的改善作用及部分机制,探讨补肾填精法对 AD 的部分治疗机制。**方法:** 健康雄性 C57-B6 小鼠分为正常组, AD 组, 肾虚 AD 组, 六味地黄丸组(1.08 g·kg⁻¹)。正常组与 AD 组每日皮下注射生理盐水(15 mL·kg⁻¹), 肾虚 AD 组和六味地黄丸组每日皮下注射氢化可的松注射液(15 mL·kg⁻¹), 连续注射 20 d。第 21 天除正常组侧脑室注射无菌生理盐水外, 其余 3 组侧脑室注射 β 淀粉样蛋白 25-35(A β_{25-35}), 6 μ g/只。采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测各组小鼠血清皮质醇、睾酮水平; 透射电镜观察海马神经元细胞形态变化; 免疫荧光检测微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)的表达; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测选择性自噬接头蛋白(p62)的蛋白表达。**结果:** 与正常组比较, AD 组和肾虚 AD 组小鼠的血清皮质醇、睾酮水平显著降低($P < 0.01$), 小鼠海马 LC3 表达显著减少($P < 0.01$), 小鼠海马 p62 蛋白表达显著增加($P < 0.01$); 与 AD 组比较, 肾虚 AD 组小鼠的血清皮质醇、睾酮水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 小鼠海马 p62 蛋白表达显著增加($P < 0.01$); 与 AD 组和肾虚 AD 组比较, 六味地黄丸组小鼠的血清皮质醇、睾酮水平显著升高($P < 0.01$), 小鼠海马 LC3 表达显著增多($P < 0.01$), p62 蛋白表达显著减少($P < 0.01$)。正常组和六味地黄丸组小鼠神经元细胞内可见自噬小体, AD 组和肾虚 AD 组小鼠神经元细胞内自噬小体鲜见。**结论:** 补肾填精法能保护海马神经元细胞, 增加海马神经元中 LC3 表达, 降低 p62 表达水平, 提高海马神经元自噬水平, 对肾虚阿尔茨海默病具有一定的治疗作用。

[关键词] 自噬; 阿尔茨海默病; 海马神经元; 六味地黄丸; β 淀粉样蛋白 25-35

[中图分类号] R2-0; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)20-0043-06

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.20192038

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190703.1556.005.html>

[网络出版时间] 2019-07-05 11:07

Intervention Effect of Kidney-tonifying and Essence-filling Therapy on Hippocampal Autophagy in Kidney-deficiency Alzheimer Mice

ZHU Zhong-kang, ZHANG Lin, LIU Chun, WANG Xu, LIU Hui-hui, ZHAO Dan-yu*
(College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Liuwei Dihuangwan on the improvement of autophagy level of hippocampal neurons in mice with kidney deficiency Alzheimer's disease (AD) and its partial mechanism, in order to explore part of therapeutic mechanisms of kidney-tonifying and essence-filling therapy for AD. **Method:** Healthy male C57-B6 mice were divided into control group, AD group, kidney deficiency AD group and Liuwei Dihuangwan group (1.08 g·kg⁻¹). The control group and the AD group were subcutaneously injected with normal saline (15 mL·kg⁻¹) daily, and the kidney deficiency AD group and the Liuwei Dihuangwan group were subcutaneously injected with hydrocortisone injection (15 mL·kg⁻¹) daily for 20 consecutive days. On the 21st day, the other three groups were injected with 6 μ g amyloid beta protein 25-35 (A β_{25-35}) in the lateral ventricle, while the control

[收稿日期] 20190423(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81803854); 辽宁省自然科学基金项目(20121100)

[第一作者] 朱仲康, 在读硕士, 从事中医药防治代谢性疾病分子机制的研究, E-mail: zzk1223@foxmail.com

[通信作者] * 赵丹玉, 博士, 教授, 从事中医药防治代谢性疾病分子机制的研究, E-mail: danyu1978@163.com

group was injected with sterile saline into the lateral ventricle. The levels of serum cortisol and testosterone in each group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the morphological changes in hippocampal neurons were observed by transmission electron microscopy, the expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) was detected by immunofluorescence, and the expression of selective autophagic junction protein (p62) was detected by Western blot. **Result:** Compared with normal group, serum cortisol and testosterone levels in AD group and kidney deficiency AD group were significantly reduced ($P < 0.01$), LC3 expression in hippocampus of mice was significantly reduced ($P < 0.01$), and p62 protein expression in hippocampus of mice was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with AD group, serum cortisol and testosterone levels in kidney deficiency AD group were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and p62 protein expression in hippocampus of mice was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with AD group and kidney deficiency AD group, serum cortisol and testosterone levels of mice in Liuwei Dihuangwan group were significantly increased ($P < 0.01$), LC3 expression in hippocampus was significantly increased ($P < 0.01$), and p62 protein expression was significantly reduced ($P < 0.01$). Autophagosomes were observed in mouse neuron cells in normal group and Liuwei Dihuangwan group, and rarely in AD group and kidney deficiency AD group. **Conclusion:** Kidney-tonifying and essence-filling therapy can protect hippocampal neurons, increase LC3 expression in hippocampal neurons, decrease p62 expression level and increase autophagy level of hippocampal neurons. It has a certain therapeutic effect on kidney-deficiency Alzheimer's disease.

[**Key words**] autophagy; Alzheimer's disease; hippocampal neurons; Liuwei Dihuangwan; amyloid beta protein 25-35

阿尔茨海默病(AD)是一种神经退行性疾病,其起病隐匿呈进行性发展。主要病理特征是海马和皮质中产生由 β 淀粉样蛋白($A\beta$)沉积形成的老年斑,由 Tau 蛋白过度磷酸化形成的神经纤维缠结(NFTs)以及神经突触丢失伴胶质细胞增生等^[1]。研究表明,细胞自噬过程失调对 AD 的发生具有极为重要的作用^[2-3]。自噬是由溶酶体介导的清除异常蛋白和受损的细胞器的过程,细胞质内需要降解的内容物被封装在双层膜结构中,形成“自噬体”,自噬体将细胞“废物”运输到溶酶体中进行降解^[4-5]。自噬过程可以清除 $A\beta$ 和过度磷酸化的 Tau 等异常的蛋白,减少神经突触丢失,对于 AD 的发生及发展发挥了重要的调控作用^[6]。

中医认为肾主骨,骨生髓,脑为髓之海,肾精足则记忆力增强,行动轻捷;当肾精亏耗导致髓海空虚,则出现痴顽呆滞,行作笨拙。因此肾虚、髓海不足是导致 AD 的重要原因^[7]。另一方面肾主气是肾脏生理功能的高度概括,也是中医阴阳平衡理论的体现,肾之精气上达,化髓冲脑,灌髓海此为阳,下降之浊气则排出体外此为阴,阴阳互根互用,相互对立制约,处于一种动态的平衡。这与细胞的自我吞噬降解功能非常相似,生理状态下自噬通过降解并清除细胞内异常的代谢产物(阴)来产生新的可供机体利用的能量物质(阳)^[8],当肾虚发生即阴阳

平衡被打破,自噬的过程也随之改变,导致异常蛋白无法被降解,在脑内形成病理产物导致 AD 的发生。

研究表明,通过中药单体的干预来改善自噬水平,对 AD 具有一定的治疗作用^[9-10]。中医方剂学中很多补肾方有补肾,填精益髓的功效,对于 AD 有很好的治疗作用^[11-12]。但是补肾方与脑内自噬水平的相关研究比较少见,且具体作用机制也有待进一步深入研究。六味地黄丸出自于钱乙的《小儿药证直诀》,是补肾方中的经典方剂之一。有研究表明六味地黄丸对改善小鼠的学习记忆能力^[13]有一定的作用。本研究在小鼠侧脑室注射 $A\beta_{25-35}$ 建立小鼠 AD 模型,并利用皮下注射氢化可的松建立肾虚 AD 模型,旨在研究补肾填精法对于自噬水平的干预作用及其机制,为阿尔茨海默病的治疗提供新的思路及实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 3 月龄 C57-B6 小鼠 40 只,SPF 级,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2016-0002。动物实验在中国医科大学实验动物部进行,动物使用许可证号 SYXK(辽)2015-0001。本研究所涉及的动物实验部分均符合中国医科大学实验动物福利伦理委员会批准,批准号 IACUC. 2018019。

1.2 试剂 氢化可的松注射液(国药集团荣生

制药有限公司,批号 H20023069);六味地黄丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司,批号 Z11021283); $\text{A}\beta_{25-35}$ (美国 Sigma 公司,批号 A4559);小鼠皮质醇,睾酮酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海通蔚实业有限公司,批号分别为 TWp001959, TWp001948);全蛋白抽提试剂盒(中国南京凯基生物科技发展有限公司,批号 KGP2100);兔抗鼠选择性自噬接头蛋白(p62)抗体(美国 Proteintech 公司,批号 18420-1-AP);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔抗鼠抗体(英国 Abcam 公司,批号 AB181602);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 抗体(美国 Abbkine 公司,批号 A23920);钨酸,柠檬酸铅,醋酸双氧铀(北京中镜科仪技术有限公司,批号分别为 GP18456, GZ02618, GS02624);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号 KGA215)。

1.3 仪器 ZS-FD 型小鼠脑立体定位仪(北京众实迪创科技发展有限公司);Axio LSM 700 型激光共聚焦显微镜(德国卡尔蔡司公司);UV-2550 型分光光度计(日本 Shimadzu 公司);042BR14173 型电泳仪,Trans-Blot Turbo 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);Tanon5200 型显影仪(上海天能科技有限公司);H-7650 型透射电镜(日本 Hitachi 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备 将小鼠 40 只采用随机数字表法分为 4 组:正常组、AD 组、肾虚 AD 组、六味地黄丸组,每组 10 只,适应性喂养 1 周后进行模型的制备。正常组与 AD 组每日皮下注射生理盐水 $15 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,肾虚 AD 组和六味地黄丸组每日皮下注射氢化可的松注射液 $15 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,连续注射 20 d。第 21 天采用 0.4% 戊巴比妥钠麻醉小鼠,剪掉小鼠头顶毛发,固定于脑立体定位仪,75% 乙醇消毒头部皮肤,在两耳连线处剪一纵向切口,暴露脑壳,以前囟的十字交叉点为参照并标记,在该点向后 1 mm,向右 1.5 mm 处进行标记并用颅骨钻在颅骨表面钻取小孔,缓慢进针深度约 2 mm,AD 组、肾虚 AD 组和六味地黄丸组侧脑室注射 $\text{A}\beta_{25-35}$, $6 \mu\text{g}/\text{只}$,正常组侧脑室注射等量的无菌生理盐水,注射完成后留针 4 min 后缓慢拔针,伤口处涂抹青霉素,医用缝合线缝合皮肤,整个过程周围环境温度应在 $25 \sim 28 \text{ }^\circ\text{C}$,直至小鼠苏醒。注射氢化可的松后以小鼠出现体质量增长缓慢、毛发发黄、光泽度差,皮质醇、睾酮含量明显降低作为肾虚造模成功的纳入标准;AD

组以识记能力出现障碍为 AD 模型纳入标准;肾虚基础上识记能力出现障碍为肾虚 AD 组模型的纳入标准^[14]。造模成功第 2 天开始,六味地黄丸组按照 $1.08 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给与灌胃(按照人与小鼠体表面积比换算给药等效剂量^[15])。正常组,AD 组,肾虚 AD 组给予等体积生理盐水灌胃,每日灌胃 1 次,连续给药 4 周。

2.2 $\text{A}\beta_{25-35}$ 老化处理 在无菌条件下称取 $\text{A}\beta_{25-35}$ 干粉 1 mg,溶于灭菌生理盐水 0.5 mL 中配制成 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{A}\beta_{25-35}$ 溶液,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 7 d,使其变为聚合态。

2.3 ELISA 检测各组小鼠血清皮质醇、睾酮水平 小鼠眼眶取血,血样放置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, $3\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清检测皮质醇、睾酮含量,操作过程按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

2.4 透射电镜观察海马神经元细胞形态变化 将小鼠断头取脑,于冰上取海马组织并修成 1 mm^3 的小块,置于 4% 的多聚甲醛内固定 2 h 以上,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗。1% 钨酸固定 2 h, PBS 冲洗。梯度乙醇、丙酮脱水,包埋剂包埋,恒温箱内聚合。 $1 \mu\text{m}$ 半薄切片,甲苯胺蓝染色定位, $50 \sim 70 \text{ nm}$ 超薄切片,柠檬酸铅-醋酸双氧铀双染,透射电子显微镜下观察,拍照。

2.5 免疫荧光检测各组小鼠海马 LC3 表达 海马切片经 PBS 清洗后,加入山羊血清室温封闭 60 min,加入一抗 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜, PBS 清洗,荧光二抗孵育 60 min; PBS 清洗 2 次,加入含 DAPI 的抗荧光淬灭剂封片,激光共聚焦显微镜下观察,并用 Image J 分析各组 LC3 平均荧光强度。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组小鼠海马 p62 表达水平 取各组小鼠海马组织提取总蛋白,使用 BCA 蛋白质测定试剂盒定量。定量后取各组总蛋白按 $40 \mu\text{g}/\text{泳道}$ 上样,进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后转移到 PVDF 膜上,加入一抗(p62, 1:1 000, GAPDH, 1:1 万), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 封闭过夜, TBST 洗涤 3 次,每次 5 min。加入 HRP 标记的二抗(1:5 000),按试剂盒的说明进行曝光。显影和固定后使用凝胶自动分析成像软件扫描分析结果, GAPDH 作为内部参考分析蛋白条带灰度值。

2.7 统计学方法 所有结果采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计处理,各指标采用单因素方差分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,通过最小显著性差异法(LSD)进行组间多重比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对各组小鼠一般状态的影响 正常组小鼠被毛光滑,有光泽,自主活动度正常,体质量增长较快;与正常组比较,肾虚 AD 组小鼠皮下注射氢化可的松 7 d 后,出现体质量增长缓慢,被毛发黄,毛发光泽度差,自主活动降低等症状,随着给药时间延长,以上症状渐渐加重;AD 组和肾虚 AD 组小鼠侧脑室注射 $\text{A}\beta_{25-35}$ 后,小鼠的学习记忆能力明显下降;与各模型组比较,六味地黄丸组小鼠给药 4 周后以上症状均明显改善。

3.2 对各组小鼠血清皮质醇、睾酮水平的影响 与正常组比较,AD 组和肾虚 AD 组小鼠血清皮质醇、睾酮含量显著减少 ($P < 0.01$);与 AD 组比较,肾虚 AD 组小鼠血清皮质醇、睾酮含量明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$);与 AD 组和肾虚 AD 组比较,六味地黄丸组小鼠血清皮质醇、睾酮含量显著提升 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 六味地黄丸对各组小鼠血清皮质醇、睾酮水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

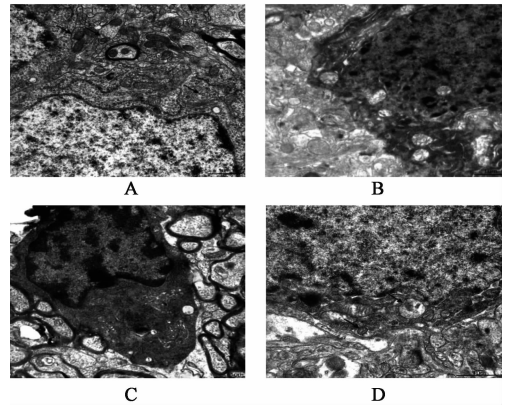
Table 1 Effect of Liuwei Dihuangwan on levels of serum cortisol and testosterone in mice of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	皮质醇	睾酮
正常	-	7.10 ± 1.20	23.00 ± 0.66
AD	-	5.03 ± 0.52 ¹⁾	17.20 ± 0.53 ¹⁾
肾虚 AD	-	3.05 ± 0.05 ^{1,3)}	14.44 ± 1.97 ^{1,2)}
六味地黄丸	1.08	6.42 ± 1.23 ^{3,4)}	21.97 ± 1.05 ^{3,4)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 AD 组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与肾虚 AD 组比较⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 对各组小鼠海马神经元细胞形态的影响 正常组小鼠海马镜下可见神经元细胞结构清晰,细胞器丰富,线粒体结构完整,可见双层膜结构的自噬小体;与正常组比较,AD 组和肾虚 AD 组小鼠海马神经元的体积缩小,细胞核呈不规则形态,线粒体数量减少,线粒体嵴畸形,自噬小体鲜见;与 AD 组和肾虚 AD 组比较,六味地黄丸组小鼠海马神经元结构、细胞核形态有明显改善,线粒体增多,自噬小体数量有所增加。见图 1。

3.4 对各组小鼠海马 LC3 蛋白表达的影响 图中可见红色荧光标记的 LC3 蛋白,在正常组小鼠海马区大量表达;与正常组比较,AD 组和肾虚 AD 组小鼠海马区 LC3 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$);与 AD 组比较,肾虚 AD 组小鼠海马区 LC3 蛋白表达无统计学差异;与 AD 组和肾虚 AD 组比较,六味地黄丸



A. 正常组;B. AD 组;C. 肾虚 AD 组;D. 六味地黄丸组(图 2~3 同)
图 1 六味地黄丸对各组小鼠海马神经元细胞形态的影响(电镜扫描, $\times 50\ 000$)

Fig. 1 Effect of Liuwei Dihuangwan on morphology of hippocampal neurons in mice of each group (EMT, $\times 50\ 000$)

组小鼠海马区 LC3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。见图 2,表 2。

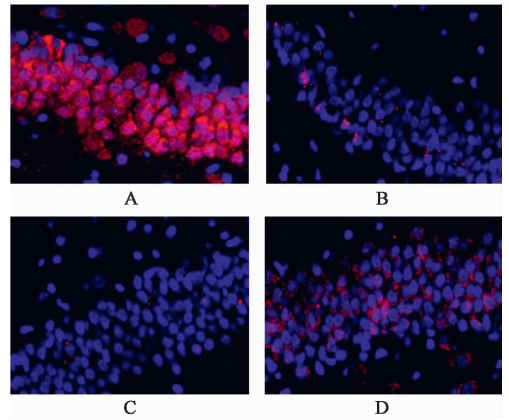


图 2 六味地黄丸对各组小鼠海马 LC3 蛋白表达的影响(免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of Liuwei Dihuangwan on LC3 expression in hippocampus of mice in each group (IF, $\times 400$)

表 2 六味地黄丸对各组小鼠海马 LC3 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Liuwei Dihuangwan on LC3 expression in hippocampus of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	LC3
正常	-	50.89 ± 1.88
AD	-	2.96 ± 0.37 ¹⁾
肾虚 AD	-	1.14 ± 0.23 ¹⁾
六味地黄丸	1.08	23.47 ± 1.91 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 AD 组比较²⁾ $P < 0.01$;与肾虚 AD 组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

3.5 对各组小鼠 p62 蛋白表达的影响 p62 蛋白在各组小鼠海马中的相对表达情况为正常组

0.83 ± 0.02, AD 组 0.97 ± 0.01, 肾虚 AD 组 1.08 ± 0.01, 六味地黄丸组 0.90 ± 0.02, 以上数据均为 p62/GAPDH。与正常组比较, AD 组和肾虚 AD 组小鼠海马 p62 表达显著增多 ($P < 0.01$); 与 AD 组比较, 肾虚 AD 组小鼠海马 p62 表达显著增多 ($P < 0.01$); 与 AD 组和肾虚 AD 组比较, 六味地黄丸组小鼠海马 p62 表达量显著下降 ($P < 0.01$)。见图 3。

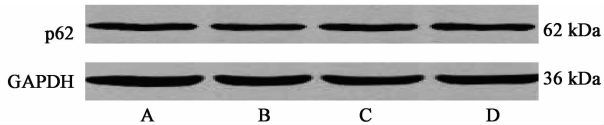


图 3 各组小鼠海马 p62 蛋白表达电泳

Fig.3 Electrophoresis of p62 protein expression in hippocampus of mice in each group

4 讨论

AD 是一种很常见的痴呆类型,属于中医的“健忘”“呆病”等范畴,临床主要表现为渐进性和不可逆的认知功能障碍,影响日常生活能力。中医认为肾藏精,精能生髓,脑为髓海,如肾精不足,髓海空虚,会导致痴呆^[16]。因此肾精亏虚所致的髓海不足是 AD 发病的关键。现代中医学研究证明,肾虚与细胞自噬功能失调密切相关^[17]。肾虚会导致细胞自噬缺陷,影响细胞的正常生命活动,细胞自噬缺陷会影响 AD 的发生发展^[18]。本研究中药六味地黄丸对于肾虚 AD 小鼠海马神经元自噬水平的影响,从而探讨补肾填精法对阿尔茨海默病的治疗机制。补肾经典方剂六味地黄丸以熟地黄为君药,重在补肾填精益髓。山茱萸滋补肝肾,秘涩精气;山药健脾补虚,涩精固肾,同为臣药。君臣相伍,补肾之力相得益彰。泽泻利湿泄浊,防熟地黄滋腻恋邪;牡丹皮清泻相火,制山茱萸之温;茯苓淡渗脾湿,具为佐药。全方三补三泻,以补为主。

本研究建立 AD 及肾虚 AD 小鼠模型。其中肾虚 AD 组又分为 2 组,分别给予生理盐水和六味地黄丸干预。皮质醇由肾上腺皮质分泌,反映肾上腺皮质功能状态,睾酮是受下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴的调节,对于生长发育和运动能力有重要作用,两个指标都能反映肾精是否充沛^[19]。ELISA 结果显示,AD 组和肾虚 AD 组小鼠血清皮质醇、睾酮水平显著降低,说明当 AD 发生时会出现肾虚的证候,证明 AD 与肾虚关系密切;与 AD 组比较,肾虚 AD 组小鼠血清皮质醇、睾酮水平进一步显著降低,说明皮下注射氢化可的松可以造出肾虚小鼠模型,与文献报道一致^[20];而六味地黄丸组小鼠血清皮

质醇、睾酮水平均有明显提升,这与六味地黄丸的补肾填精作用相符。通过透射电镜观察发现,正常组小鼠海马神经元细胞内可见自噬小体,而 AD 组和肾虚 AD 组小鼠海马神经元细胞内自噬小体鲜见,经六味地黄丸干预后,小鼠海马神经元细胞内自噬小体数量明显增多。可见在 AD 发生发展的过程中,自噬受到抑制,自噬水平下降;六味地黄丸通过补肾填精的作用提高了自噬水平,结合 ELISA 实验结果说明自噬功能异常可能与中医肾的功能关系密切,自噬很可能是肾主气化功能的某种微观体现。

LC3 是目前可信的自噬标志物^[21],判断自噬水平的重要指标,当 LC3 表达量降低时自噬被抑制,当自噬水平恢复正常,LC3 表达量会随之增加^[22]。p62 蛋白作为自噬的接头蛋白,与泛素化蛋白及 LC3 等相互作用形成复合物,进入自噬溶酶体完成降解^[23-24]。当自噬水平下降时,p62 蛋白会不断积累,在细胞中表达量升高^[25],另一方面,p62 能通过激活雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mTORC1) 信号通路负性调节自噬水平^[26],因此 p62 水平升高通常被认为是自噬活性受到抑制的标志。通过 Western blot 检测各组小鼠 p62 蛋白表达水平结果与 LC3 的研究结果相符,表明 AD 组及肾虚 AD 组小鼠海马 LC3 表达降低,自噬受到抑制,导致 p62 堆积,同时大量的 p62 又会抑制细胞的自噬;六味地黄丸组小鼠 LC3 表达升高,同时 p62 蛋白表达量降低,提示自噬水平升高。自噬流是评价细胞自噬水平的重要依据,包括自噬体形成、自噬体与溶酶体融合、底物降解等动态过程。LC3 与 p62 蛋白是检测自噬流活化或受阻的关键,自噬流受阻时 p62 含量增多,LC3 表达量减少^[27]。本研究表明,AD 组和肾虚 AD 组海马神经元的自噬流受阻,自噬水平降低,六味地黄丸的干预可以使自噬流活化,自噬水平提升。但其具体的分子机制和对基因表达的影响,还有待进一步研究。

综上所述,在肾虚 AD 的发生发展过程中,海马的自噬功能受到抑制, A β 无法正常降解在脑内堆积形成老年斑, Tau 蛋白过度磷酸化并无法及时被清除,并且由于 Tau 蛋白异常引起的微管结构不稳定又影响自噬体运输至溶酶体, A β 神经毒性导致突触丧失。补肾填精法干预能够提高自噬水平,发挥神经保护作用,对 AD 具有明显的改善效果。本文期待能够通过补肾填精策略调控自噬水平,为阿尔茨海默病的治疗提供思路及方向。

[参考文献]

- [1] Thal D R, Fndrich M. Protein aggregation in Alzheimer's disease; $A\beta$ and τ and their potential roles in the pathogenesis of AD[J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 129(2):163-165.
- [2] Jo C, Gundemir S, Pritchard S, et al. Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52[J]. *Nat Commun*, 2014, 5:3496.
- [3] Hensley K, Harris W M E. Redox regulation of autophagy in healthy brain and neurodegeneration[J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 84:50-59.
- [4] LI L, ZHANG X, Le W. Autophagy dysfunction in Alzheimer's disease[J]. *Neurodegener Dis*, 2010, 7(4):265-271.
- [5] Madeo F, Eisenberg T, Kroemer G. Autophagy for the avoidance of neurodegeneration[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(19):2253-2259.
- [6] 王苏雷. 冬凌草甲素改善阿尔茨海默病模型小鼠认知功能及机制研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2016.
- [7] 任晨斌, 伍大华. 国医大师刘祖贻用温肾活血法治疗阿尔茨海默病经验[J]. *中医导报*, 2016, 22(16):14-15, 25.
- [8] 韦云, 刘剑刚, 李浩, 等. 从中医阴阳理论探讨神经细胞自噬现象对阿尔茨海默病的影响[J]. *中医杂志*, 2013, 54(13):1085-1087.
- [9] 李欢, 苗明三. 自噬及中医药调控自噬在治疗和防治疾病中的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(20):200-207.
- [10] 章梦琦, 滕燕, 王文, 等. 自噬在阿尔茨海默病中的作用及中药的干预作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(17):355-359.
- [11] 罗俊, 张科楠, 肖帅, 等. 镇心省睡益智方及其精油对AD模型小鼠学习记忆的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(9):74-81.
- [12] 王璐, 孙丽娥, 康湘潭, 等. 补肾益气方药左归丸和益气聪明汤对老年大鼠学习记忆能力及相关基因表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(6):15-22.
- [13] 崔勇, 王艳杰, 赵丹玉, 等. 六味地黄丸对APP/PS1小鼠学习记忆能力及胆碱能系统的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(3):148-151.
- [14] 周岚. 老年痴呆的中医辨证分型特点及其与APOE基因多态性相关性的初探[D]. 武汉:湖北中医学院, 2004.
- [15] 陈奇. 中药药理实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社, 1994:176-179.
- [16] 黄贵华, 纪云西, 吴大力, 等. 细胞自噬与中医气虚痰瘀关系探讨[J]. *中医杂志*, 2011, 52(20):1717-1719.
- [17] 马妍, 闫晨, 张连城, 等. 老年性痴呆肾虚痰瘀发病机制中细胞自噬研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(10):2570-2572.
- [18] 李长禄, 王红梅, 王立为. 肾虚型老年痴呆大鼠模型的复制[J]. *安徽中医学院学报*, 2013, 32(3):62-67.
- [19] 王秀凤, 李静, 张磊, 等. 基于因子分析的肾虚证动物模型垂体-靶腺轴关键指标的评价[J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(6):825-829.
- [20] 宋彩梅, 王红梅, 刘新民, 等. 肾虚型老年痴呆动物模型的建立[J]. *现代中西医结合杂志*, 2011, 20(22):2744-2748.
- [21] 杜欣芸, 李常青, 陈滨, 等. 叶下珠复方II号对肝癌Huh7细胞增殖、凋亡与自噬的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(2):48-54.
- [22] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing[J]. *EMBO J*, doi:10.1093/emboj/19.21.5720.
- [23] Park S, Choi S G, Yoo S M, et al. Choline dehydrogenase interacts with SQSTM1/p62 to recruit LC3 and stimulate mitophagy[J]. *Autophagy*, 2014, 10(11):1906-1920.
- [24] 游宇, 刘玉晖, 廖旺娣. 参苓白术散抗炎症性肠病作用与调节肠上皮细胞自噬的关系探讨[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(15):51-56.
- [25] Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1[J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(3):399-403.
- [26] WANG X, LI L, NIN X, et al. mTOR enhances foam cell formation by suppressing the autophagy pathway[J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(4):198-204.
- [27] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132(1):27-42.

[责任编辑 孙丛丛]