

· 基础研究 ·

二至丸对 SAMP8 小鼠行为学及
海马蛋白质组表达的影响

梁梅亭 朱 宏 任 丹 肖 岚 李广诚 李雅悦 萨依腊西

摘要 目的 观察二至丸对阿尔茨海默病(AD)模型 SAMP8 小鼠行为学和海马组织蛋白质表达的影响,探讨二至丸治疗 AD 可能的作用机制。**方法** 6 月龄雄性 SAMP8 小鼠 40 只随机分为二至丸低浓度组、中浓度组、高浓度组及模型组,每组 10 只,另选择 10 只 6 月龄雄性 SAMR1 小鼠作为正常组。二至丸低、中、高浓度组分别予 0.15、0.3、0.6 g/mL 二至丸灌胃;正常组、模型组予等体积生理盐水灌胃,每天干预 1 次,连续干预 8 周。干预结束后,采用水迷宫对各组小鼠进行行为学测试,同时筛选最佳有效剂量浓度组进行后续实验。水迷宫实验结束后,采用 iTRAQ 蛋白质组学筛选差异表达蛋白,对差异蛋白进行生物信息学分析,包括 GO 功能注释分析、KEGG 通路分析以及 STRING-DB 网络构建。运用 Western Blot 方法验证部分差异蛋白的表达水平。**结果** 与正常组比较,模型组逃避潜伏期延长($P < 0.01$),穿越平台象限次数和停留在原平台象限的时间缩短($P < 0.01$)。与模型组比较,二至丸中、高浓度组逃避潜伏期缩短($P < 0.05$),穿越平台象限次数和停留在原平台象限的时间延长($P < 0.05$)。根据水迷宫实验结果,选取最佳有效剂量即二至丸中浓度组进行后续实验。与模型组比较,二至丸中浓度组有 46 个差异蛋白,其中 15 个蛋白上调,31 个蛋白下调;正常组有 192 个差异蛋白,其中 25 个蛋白上调,167 个蛋白下调;二至丸中浓度组与正常组均有表达并且表达趋势相同的差异蛋白有 20 个,其中 10 个蛋白上调,10 个蛋白下调。这些蛋白质参与多种生物学途径,包括代谢通路、糖酵解/糖异生通路、程序性坏死通路等,涉及二至丸中浓度组和正常组均重复的 KEGG 通路有 69 条,差异蛋白之间彼此相互联系构成网络。通过 Western Blot 验证 Hp 和 Vdac2 在中浓度组的表达比模型组减弱($P < 0.05$)。**结论** 二至丸能改善 SAMP8 小鼠学习记忆能力,调节其海马组织中多种蛋白质的表达,主要涉及代谢、糖酵解/糖异生、程序性坏死等相关通路蛋白,这可能是二至丸治疗 AD 的作用机制。

关键词 二至丸;阿尔茨海默病;SAMP8 小鼠;同位素标记相对和绝对定量技术;蛋白质组学

Effect of Erzhi Pill on Behavior and Hippocampal Protein Expression in SAMP8 Mice LIANG Mei-ting, ZHU Hong, REN Dan, XIAO Lan, LI Guang-cheng, LI Ya-yue, and SAYI La-xi Department of Traditional Chinese Medicine, Xiangya Third Hospital, Central South University, Changsha (410013)

ABSTRACT Objective To study the effect of Erzhi Pill on the behavior and the expression of proteome in hippocampus of SAMP8 mouse model with Alzheimer's disease (AD), and to explore the possible mechanism of Erzhi Pill in the treatment of AD. **Methods** Forty 6-month-old male SAMP8 mice were randomly divided into low-concentration Erzhi Pill group, middle-concentration Erzhi Pill group, high-concentration Erzhi Pill group and model group, 10 mice in each group, 10 6-month-old male SAMR1 mice were recruited as normal group. The rats in low, middle and high concentration groups Erzhi Pill were given 0.15 g/mL, 0.3 g/mL and 0.6 g/mL Erzhi Pill, respectively, the normal group and model group were given equal volume of normal saline, once a day for 8 successive weeks. After the intervention, morris water maze was used to test the behavior of mice in each group, and the best effective dose group was selected for subsequent experiment. After the morris water maze experiment, isobaric tags for relative

基金项目:国家自然科学基金青年资助项目(No. 81202730)

作者单位:中南大学湘雅三医院中医科(长沙 410013)

通讯作者:朱 宏, Tel: 0731-88618209, E-mail: yellingu@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190827.028

and absolute quantification (iTRAQ) analysis was used to screen differentially expressed proteins, the differentially expressed proteins were analyzed by GO functional annotation, KEGG path analysis and STRING-DB networks construction. Western Blot was used to verify the expression level of some differential proteins. Results Compared with the normal group, the escape latency of the model group was significantly prolonged ($P < 0.01$), and the times of crossing the platform quadrant and the time of staying in the original platform quadrant were significantly shortened ($P < 0.01$). Compared with the model group, the escape latency in the medium and high concentration group were significantly shortened ($P < 0.05$), and the times of crossing the platform quadrant and staying in the original platform quadrant were significantly prolonged ($P < 0.05$). According to the results of the water maze experiment, the optimal effective dose group, namely the medium concentration Erzhi Pill group, was selected for the follow-up experiment. Compared with the model group, there were 46 differential proteins in the medium concentration group, of which 15 were up-regulated and 31 were down-regulated, there were 192 differential proteins in the normal group, of which 25 were up-regulated and 167 were down-regulated; there were 20 same differentially expressed proteins in the medium concentration group and the normal group, among which 10 proteins were up-regulated and 10 proteins were down-regulated. Bioinformatics analysis showed that these proteins were involved in a variety of biological pathways, including metabolic pathway, glycolysis / glycosylation pathway, programmed necrosis pathway, and so on. There were 69 KEGG pathways repeated in both medium and normal groups. Differential proteins were linked to each other to form a network. The expression of Hp and Vdac2 in the medium concentration group was lower than that in the model group by Western Blot ($P < 0.05$). Conclusions Erzhi Pill can improve the learning and memory ability of SAMP8 mice and regulate the expression of multiple proteins in hippocampus. These differential proteins are mainly involved in metabolism, glycolysis / glycosylation, programmed necrosis, and other related pathway proteins, such as metabolism, glycolysis/glycosylation, programmed necrosis and other related pathway proteins. This might be the mechanism of Erzhi Pill in the treatment of AD.

KEYWORDS Erzhi Pill; Alzheimer's disease; SAMP8 mice; isobaric tags for relative and absolute quantification; proteomics

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种年龄相关的、进行性的、不可逆转的慢性神经退行性疾病, 主要临床表现为学习记忆功能减退及认知功能障碍。海马是大脑边缘系统的重要组成部分, 是学习记忆功能与认知功能密切相关的重要脑区, 研究表明在 AD 中海马是最早也是最易受累部位^[1]。

快速老化 SAMP8 小鼠是一种常用的较理想的 AD 动物模型, 研究表明 SAMP8 小鼠在早期就存在不同程度的学习记忆功能减退, 而且在脑组织内也存在 Tau 蛋白异常磷酸化、A β 淀粉样蛋白的沉积等 AD 典型的病理改变^[2]。SAMR1 是正常老化的小鼠, 常用作 SAMP8 的对照组。

二至丸具有抗氧化、调节免疫力、改善血流等作用^[3], 在去卵巢所致 AD 小鼠模型中, 二至丸通过促进能量代谢与囊泡运输, 同时减少 A β 的生成与神经细胞的氧化损伤来发挥治疗作用^[4]。

本研究选用 AD 模型 SAMP8 小鼠, 通过二至丸灌胃干预后, 利用水迷宫对其进行行为学测试, 观察二

至丸对 SAMP8 小鼠学习记忆功能的影响; 通过同位素标记相对和绝对定量 (isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ) 结合液相色谱-串联质谱法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 的定量蛋白质组学技术, 筛选二至丸干预后 SAMP8 小鼠海马的差异表达蛋白, 同时利用生物信息学技术对差异蛋白的相关信号途径进行整合、绘制网络结构图, 探讨二至丸治疗 AD 可能的作用机制。

材料与方法

1 实验动物 6 月龄雄性 SAMP8 小鼠 40 只, 雄性 SAMR1 小鼠 10 只, 清洁级, 体重 (25 ± 3) g, 均购自天津中医药大学第一附属医院动物实验中心 (合格证号: 1200294033)。小鼠在饲养温度 $18 \sim 22$ °C, 相对湿度 40% ~ 50%, 保证充足的光照通风, 自由摄食饮水的环境中适应性饲养 1 周后进行后续实验。本实验经中南大学湘雅三医院实验动物伦理委员

会批准[No.LLSC(LA)2017-008]。

2 实验药物 二至丸由墨旱莲、女贞子按 1:1 配伍组成,饮片均购于中南大学湘雅三医院门诊中药房,墨旱莲产于江苏,女贞子产于湖南,经过中南大学湘雅三医院中药房副主任药师朱胜平鉴定,均为优质产品。根据中药药理实验方法学^[5]将女贞子、墨旱莲各 250 g 加水适量煎煮 2 次,每次 30 min,合并 2 次煎液后过滤,通过蒸馏浓缩分别配制成实验所需浓度的溶液,低浓度(0.15 g/mL)、中浓度(0.3 g/mL)、高浓度(0.6 g/mL)。每周定期制备各组药液,4 ℃ 冰箱保存备用。

3 主要试剂及仪器 蛋白提取试剂盒(南京建成生物工程研究所),iTRAQ 试剂盒(美国 AB Sciex 公司),去高纯度蛋白试剂盒(美国 Sigma 公司),Anti-Hp(英国 Abcam 公司),Anti-VDAC2(美国 Proteintech 公司)。Morris 水迷宫(北京硕林苑科技有限公司),冷冻离心机(H2050R,湘仪公司),高效液相色谱仪(HPLC,LC20A 型,日本 Shimadzu 公司),质谱仪(美国 Thermo Scientific 公司),蛋白质电泳仪(DYY-Ⅲ28A 型,北京六一仪器厂)。

4 动物分组及干预方法 小鼠适应性喂养 1 周后,将 40 只 SAMP8 小鼠随机分为二至丸低、中、高浓度组和模型组,每组 10 只。另选择 10 只 SAMR1 小鼠作为正常组。依据人与实验用动物给药剂量换算公式^[5],二至丸低、中、高浓度组分别予 0.15、0.3、0.6 g/mL 二至丸药液灌胃,按体表面积折算,分别相当于 70 kg 成人用药剂量 6、12、24 倍二至丸;模型组和正常组予等体积生理盐水灌胃。每天干预 1 次,连续干预 8 周。

5 水迷宫行为学测试 参照参考文献[6],通过水池式水迷宫测试各组小鼠行为学改变,以小鼠逃避潜伏期(即从入水至找到平台所用的时间和无平台状态下小鼠 60 s 内穿越平台次数及原平台象限停留时间)衡量小鼠的学习记忆能力。通过 Morris 水迷宫行为学测试,筛选最佳有效剂量浓度组进行后续的 iTRAQ 蛋白质组学和 Western Blot 等相关实验。

6 iTRAQ 蛋白质组学检测 水迷宫实验结束后,断颈处死小鼠,取出小鼠海马组织,提取并纯化海马蛋白质,通过 Bradford 法测定各组蛋白质浓度,对测定好的蛋白质进行胰蛋白酶酶解和 iTRAQ 试剂标记,模型组用 114 标记,二至丸中浓度组用 115 标记,正常组用 113 标记。将各组标记样品混合均匀后进行 LC-MS/MS 分析,利用 ProteinPilot Software 5.0 (ABSciex)进行检索,设置 Unused $\geq$ 1.3 进行筛选,

使蛋白的可信度在 95% 以上,去除重复性不好的蛋白,确定了各组显著性差异的上调倍数为 1.5 倍,下调倍数为 1.5 的倒数倍即 0.67 倍,筛选变异系数(coefficient of variation, CV) > 0.5, $P \leq 0.05$ 的蛋白作为差异蛋白,然后对差异蛋白进行功能分析,包括 GO 分析、KEGG 通路分析、STRING-DB 蛋白网络分析;细胞组分、分子功能、生物学过程等指标是通过 GO 功能注释分析得出,蛋白质或者基因可以通过 ID 对应或者序列注释的方法找到与之对应的 GO 号,而 GO 号可对应到 Term,即功能类别或者细胞定位。

7 Western Blot 检测 Hp、Vdac2 蛋白表达 将提取纯化的海马蛋白质通过 Bradford 法进行蛋白定量,然后将蛋白质用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,转膜 4 h 后封闭过夜,在蛋白质中加入按 1:1 000 的稀释比例的兔源一抗 Anti-Hp、Anti-Vdac2,4 ℃ 孵育过夜,TBST 漂洗 3 次后,加入羊抗兔二抗抗体,室温下于摇床孵育 1 h,洗膜后适量 ECL 显色液孵育 3 min。暗室内于 X 光胶片上曝光、显影。使用 Image J 软件读取图片灰度值,将读取后的 Hp 和 Vdac2 的 IntDen 与内参 β -actin 的 IntDen 进行比较,得到蛋白质表达的相对强度。用 GraphPad Prism 6 软件进行绘图。

8 统计学方法 采用 SPSS 22.0 对数据进行统计分析,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用随机分组设计,采用 One-Way ANOVA,方差齐性时,用 SNK 检验或 LSD-t 进行两两比较,方差不齐时,用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组各时间点逃避潜伏期比较(图 1、2) 与正常组比较,模型组各时间点逃避潜伏期延长($P < 0.01$)。与模型组比较,二至丸中、高浓度组逃避潜伏期缩短($P < 0.05$)。与二至丸低浓度组比较,二至丸中、高浓度组逃避潜伏期缩短($P < 0.05$)。

2 各组穿越平台次数及停留原平台象限时间比较(图 3) 与正常组比较,模型组穿越平台次数及原平台象限停留时间减少($P < 0.01$)。与模型组及低浓度组比较,二至丸中、高浓度组小鼠穿越平台象限次数和停留在原平台象限的时间增加($P < 0.05$)。本实验基于临床用药原则及经济因素等多方面考虑,选取中浓度进行后续相关实验。

3 二至丸中浓度组和正常组重复差异蛋白表达(表 1) 与模型组比较,中浓度组有 46 个差异蛋白,其中 15 个蛋白上调,31 个蛋白下调。正常组有 192 个差异蛋白,其中 25 个蛋白上调,167 个蛋白下调。

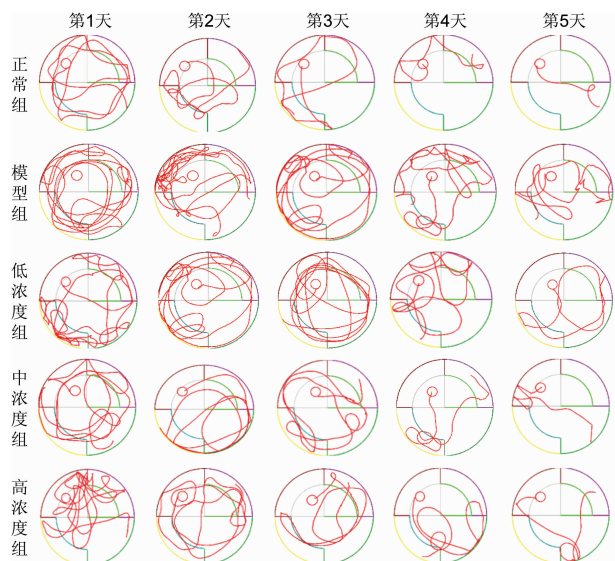
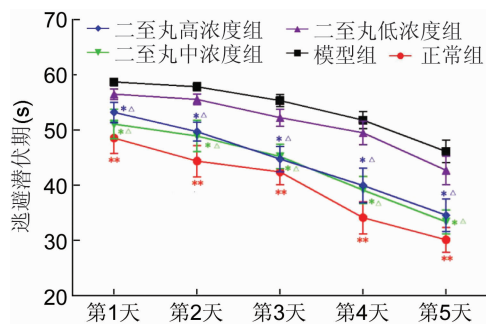
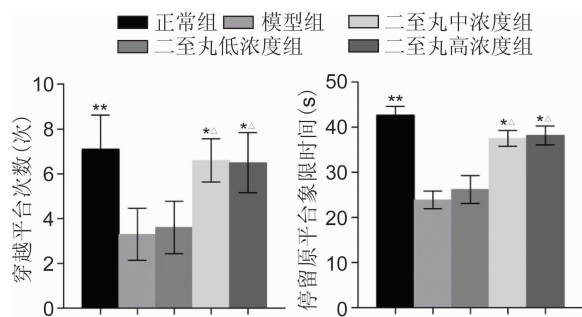


图1 各组小鼠逃避潜伏期测试轨迹图



注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;
与低浓度组比较, $\Delta P < 0.05$; $n = 10$

图2 各组各时间点逃避潜伏期比较



注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与低浓度组
比较, $\Delta P < 0.05$; $n = 10$

图3 各组穿越平台次数及原平台象限停留时间比较

中浓度组与正常组均有表达并且表达趋势相同的差异蛋白有 20 个,其中 10 个蛋白上调,10 个蛋白下调。

4 蛋白质 GO 注释与分类分析

4.1 二至丸中浓度组及正常组细胞组分 与模型组比较,二至丸中浓度组细胞组分由高至低分别为:

胞外区(18%)、细胞液(14%)、细胞质(13%)、细胞外间隙(11%)、细胞核(11%)、蛋白质络合物(10%)、线粒体(7%)、胞内区(6%)、质膜(6%)、细胞骨架(4%),正常组分别为:胞外区(18%)、细胞质(16%)、线粒体(12%)、胞液(12%)、蛋白质络合物(10%)、细胞核(9%)、质膜(7%)、胞内区(6%)、细胞外间隙(5%)、细胞骨架(5%),二至丸中浓度组和正常组差异蛋白的细胞组分主要为细胞质基质。

4.2 二至丸中浓度组及正常组分子功能 与模型组比较,二至丸中浓度组分子功能由高至低分别为:离子结合(25%)、酶结合(16%)、酶调节活性(12%)、RNA 结合(8%)、细胞骨架蛋白结合(8%)、氧化还原酶活性(7%)、水解酶活性(7%)、异构酶活性(6%)、转运体活性(6%)、DNA 结合(5%),正常组分别为:离子结合(30%)、RNA 结合(14%)、酶结合(14%)、氧化还原酶活性(9%)、酶调节活性(8%)、转运体活性(7%)、细胞骨架蛋白结合(6%)、结构分子活性(5%)、脂结合(4%)、激酶活性(3%),二至丸中浓度组和正常组筛选得到的差异蛋白的分子功能主要与 RNA 结合、酶调节活性、酶结合以及离子结合相关。

4.3 二至丸中浓度组及正常组生物学过程 与模型组比较,二至丸中浓度组生物学过程由高至低分别为:应激反应(11%)、细胞氮复合代谢过程(11%)、解剖结构发育(11%)、转运(11%)、信号转导(10%)、小分子代谢过程(10%)、免疫系统过程(9%)、分解代谢过程(9%)、生物合成过程(9%)、细胞分化(9%),正常组分别为:细胞氮复合代谢过程(12%)、转运(11%)、生物合成过程(11%)、解剖结构发育(11%)、应激反应(10%)、小分子代谢过程(10%)、信号转导(9%)、分解代谢过程(9%)、细胞分化(9%)、细胞蛋白修饰(9%),二至丸中浓度组与正常组大部分差异表达蛋白与信号转导、物质转运、细胞氮化合物合成代谢过程以及应激反应有关,其中以代谢过程和信号转导为主。

5 KEGG 通路分析(表 2) 与模型组比较,二至丸中浓度组差异表达蛋白匹配到 85 条 KEGG 通路,正常组差异表达蛋白匹配到 157 条 KEGG 通路。二至丸中浓度组和正常组重叠的通路有 69 条,包括代谢通路、糖酵解/糖异生通路、程序性坏死通路等。

6 二至丸中浓度组 STRING-DB 蛋白网络分析(图 4) 与模型组比较,二至丸中浓度组和正常组均有表达的 20 个差异蛋白(见表 1),在中浓度组的网络结构图大都居于中心位置,部分蛋白之间相互关联。

表 1 二至丸中浓度组和正常组重复差异蛋白表达

基因简称	蛋白名称	正常组/模型组	二至丸中浓度组/模型组	表达变化
Hsp90ab1	Heat shock protein HSP 90-beta	0.23	0.39	上调
Hp	Haptoglobin	0.29	0.20	下调
Aco2	Aconitate hydratase,mitochondrial	2.94	1.85	上调
Eno2	Gamma-enolase	7.69	2.22	上调
Pkm	Pyruvate kinase PKM	2.70	2.44	上调
Pgk1	Phosphoglycerate kinase 1	4.00	2.78	上调
Vdac2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	0.22	0.38	下调
Tpi1	Triosephosphate isomerase	7.14	2.86	上调
Prdx5	Peroxiredoxin-5,mitochondrial	0.14	0.34	下调
Pgam1	Phosphoglycerate mutase 1	4.17	1.96	上调
Sncb	Beta-synuclein	0.29	0.54	下调
Vdac3	Voltage-dependent anion-selective channel protein 3	0.25	0.37	下调
Calb2	Calretinin	0.66	0.59	下调
Glo1	Lactoylglutathione lyase	0.41	0.32	下调
Cycs	Cytochrome c,somatic	0.52	0.47	下调
Igh-1a	Ig gamma-2A chain C region,membrane-bound form	2.31	2.27	上调
Pcbp2	Poly(rC)-binding protein 2	0.40	0.50	下调
Mif	Macrophage migration inhibitory factor	0.44	0.57	下调
Krt6b	Keratin,type II cytoskeletal 6B	1.51	2.47	上调
Mobp	Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	2.40	1.66	上调

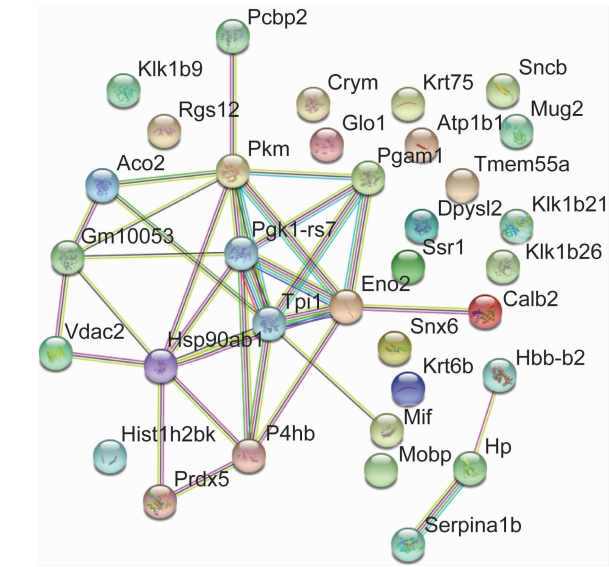


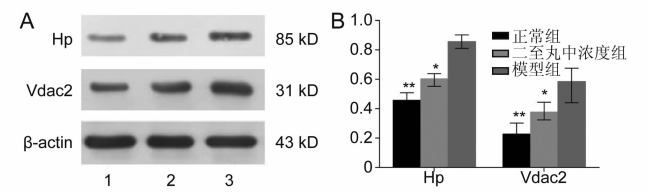
图 4 二至丸中浓度组网络结构

7 各组 Hp 和 Vdac2 蛋白表达比较(图 5) 与正常组比较,模型组 Hp 和 Vdac2 蛋白表达升高($P < 0.01$)。与模型组比较,二至丸中浓度组 Hp 及 Vdac2 蛋白表达降低($P < 0.05$)。

讨 论

二至丸是补肾经方,由墨旱莲和女贞子两味药:等比配伍组成,是平补佳品,具有补肝益肾、滋阴止血、强筋骨、乌须发等功效。研究表明,二至丸及其组成药味女贞子和墨旱莲中的多种成分如齐墩果酸^[7]、红景天苷^[8]、槲皮素^[9]等均能够改善 AD 模型大鼠的学习记

忆能力,延缓 AD 发展,改善 AD 症状。本研究 Morris 水迷宫结果表明二至丸能够改善 SAMP8 小鼠的学习记忆能力。



注: 1 为正常组; 2 为二至丸中浓度组; 3 为模型组; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; A 为 Western Blot 结果; B 为蛋白定量表达

图 5 各组小鼠海马 Hp 和 Vdac2 蛋白表达比较

本实验基于 iTRAQ 蛋白质组学技术研究发现,与模型组相比较,二至丸中浓度组与正常组重复的差异蛋白有 20 个,上调的蛋白有 10 个,下调的蛋白有 10 个,根据蛋白质数据库中所提供的蛋白质功能注释,这些差异表达蛋白大致涉及以下几类通路:(1)代谢通路,如:线粒体乌头酸(aconitate hydratase, mitochondrial, ACO2)、Hp;(2)糖酵解/糖异生通路,如:磷酸甘油酸酯激酶 1(phosphoglycerate kinase 1, Pgm1)、丙酮酸激酶(phosphoglycerate kinase 1, Pkm)、磷酸丙糖异构酶(triosephosphate isomerase, Tpi1)、磷酸甘油酸变位酶 1(phosphoglycerate mutase 1, Pgam1)、 γ -烯醇化酶(gamma-enolase, Eno2);(3)程序性坏死通路,如热休克蛋白 90

表 2 中浓度组及正常组重叠 KEGG 通路

KEGG 通路	通路名称	蛋白数量	
		二至丸中浓度组	正常组
mmu01100	Metabolic pathways	7	49
mmu05143	African trypanosomiasis	6	4
mmu01200	Carbon metabolism	6	22
mmu01230	Biosynthesis of amino acids	6	10
mmu00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	5	15
mmu04961	Endocrine and other factor-regulated calcium Reabsorption	4	3
mmu04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	3	5
mmu05203	Viral carcinogenesis	2	15
mmu04022	cGMP-PKG signaling pathway	2	4
mmu04066	HIF-1 signaling pathway	2	6
mmu05230	Central carbon metabolism in cancer	2	7
mmu04217	Necroptosis	2	9
mmu00620	Pyruvate metabolism	2	11
mmu04216	Ferroptosis	2	3
mmu05012	Parkinson's disease	2	15
mmu05016	Huntington's disease	2	16
mmu04922	Glucagon signaling pathway	2	7
mmu04621	NOD-like receptor signaling pathway	2	4
mmu05200	Pathways in cancer	2	4
mmu05322	Systemic lupus erythematosus	1	14
mmu05034	Alcoholism	1	14
mmu05010	Alzheimer's disease	1	12
mmu00020	Citrate cycle (TCA cycle)	1	11
mmu04932	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	1	8
mmu05134	Legionellosis	1	6
mmu00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	1	6
mmu05152	Tuberculosis	1	5
mmu00260	Glycine,serine and threonine metabolism	1	4
mmu04144	Endocytosis	1	4
mmu04610	Complement and coagulation cascades	1	4
mmu04260	Cardiac muscle contraction	1	4
mmu04210	Apoptosis	1	4
mmu05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	1	3
mmu03018	RNA degradation	1	3
mmu04024	cAMP signaling pathway	1	3
mmu05166	HTLV-I infection	1	3
mmu04020	Calcium signaling pathway	1	3
mmu04218	Cellular senescence	1	3
mmu00350	Tyrosine metabolism	1	3
mmu04915	Estrogen signaling pathway	1	3
mmu00230	Purine metabolism	1	3
mmu04914	Progesterone-mediated oocyte maturation	1	2
mmu04612	Antigen processing and presentation	1	2
mmu01210	2-Oxocarboxylic acid metabolism	1	2
mmu05165	Human papillomavirus infection	1	2
mmu04151	PI3K-Akt signaling pathway	1	2
mmu00920	Sulfur metabolism	1	2
mmu00051	Fructose and mannose metabolism	1	2
mmu04657	IL-17 signaling pathway	1	2
mmu05167	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection	1	2
mmu04964	Proximal tubule bicarbonate reclamation	1	2
mmu04659	Th17 cell differentiation	1	2
mmu05168	Herpes simplex infection	1	2
mmu05215	Prostate cancer	1	2
mmu04911	Insulin secretion	1	1
mmu04930	Type II diabetes mellitus	1	1
mmu04146	Peroxisome	1	1
mmu04976	Bile secretion	1	1
mmu05161	Hepatitis B	1	1
mmu05416	Viral myocarditis	1	1
mmu01524	Platinum drug resistance	1	1
mmu05164	Influenza A	1	1
mmu04978	Mineral absorption	1	1
mmu00562	Inositol phosphate metabolism	1	1
mmu04215	Apoptosis-multiple species	1	1
mmu05014	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	1	1
mmu05145	Toxoplasmosis	1	1
mmu04115	p53 signaling pathway	1	1
mmu05210	Colorectal cancer	1	1

(heat shock protein HSP 90- β , HSC90 β)、细胞色素 C (cytochrome c, Cycs)、钙视网膜蛋白 (calretinin)、电压依赖性阴离子通道 3 (voltage dependent anion channel 3, Vdac3)、Vdac2 等。而其中程序性坏死通路异常将直接启动相关凋亡途径,引起细胞凋亡;其余通路即代谢通路、糖酵解/糖异生通路异常将会导致线粒体能量代谢障碍,产生大量氧自由基导致脑内氧化应激损伤。

ACO2 是线粒体中对氧化应激很敏感的酶,在 AD 等神经退行性病变中起着重要作用^[10]。除此之外,ACO2 是增龄性活性下降的酶^[11],其活性降低可引起活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 产生过量,导致能量代谢障碍;过多的 ROS 攻击细胞膜后释放出的 Fe^{2+} ,通过 Fenton 反应产生更多的超氧阴离子,加重细胞氧化应激,加快 AD 的发生。本研究中,与模型组比较,二至丸治疗后 ACO2 表达水平上调,ACO2 表达上调能够减轻氧化应激状态,这可能是二至丸治疗 AD 的作用机制之一。

Hp 是 $\alpha 2$ 球蛋白中的一种酸性糖蛋白,具有抗氧化活性、抗炎、抗菌、促进血管生成等作用。Song IU 等^[12]观察到 AD 患者血清 Hp 水平明显高于健康对照组,他们发现血清中的 Hp 水平与认知功能损害的严重程度呈正相关性。本研究中,与模型组比较,二至丸中浓度组、正常组的 Hp 表达水平下调,推测二至丸作用机制可能与调节 Hp 表达水平,进而抑制游离血红蛋白的神经毒性有关。

糖酵解是糖代谢过程中重要生化途径。在细胞质中, Pkg1、Pkm、Tpi1、Pgam1、Eno2 等一起构成糖酵解酶复合体共同作用于糖酵解途径。糖酵解途径异常时,其相应脑区的 A β 产生增加,同时也能够增加兴奋性谷氨酸神经毒性,引起神经变性,导致脑组织功能异常^[13];除此之外,糖酵解重要的中间产物丙酮酸能够使 p38 mAPK 信号通路的激活受到抑制,使机体促炎因子的产生减少,降低机体的炎症损伤,从而发挥保护作用^[14]。本研究中,和模型组比较,中浓度组、正常组的糖酵解酶复合体即 Pkg1、Pkm、Tpi1、Pgam1、Eno2 的表达水平均上调,它们都参与糖酵解途径,推测二至丸通过调节 Pkg1、Pkm、Tpi1、Pgam1、Eno2 的表达水平,从而影响糖酵解途径,这可能是二至丸治疗 AD 的作用机制之一。

Calb2 是一种重要的钙结合蛋白,主要分布在中枢神经元如大脑皮质的中间神经元、海马组织、和部分周围神经元中^[15]。钙超载可激活蛋白激酶和磷脂酶、促进 ROS 生成、导致线粒体功能障碍进而引起细胞

损伤、细胞骨架被破坏从而诱导细胞凋亡,导致神经退行性疾病的发生^[16]。Calb2 能调控细胞内 Ca^{2+} 浓度,结合过多的 Ca^{2+} ,防止钙超载的发生,减轻钙超载引起的细胞凋亡,改善神经退行性疾病^[17]。本研究中,和模型组比较,二至丸中浓度组、正常组 Calb2 的表达水平均下调,推测二至丸作用机制可能与通过调节 Calb2 表达水平,抑制钙超载,减轻细胞凋亡有关。

Cycs 从线粒体膜间隙进入细胞质是线粒体途径细胞凋亡的关键步骤^[18]。Cycs 从膜间隙释放进入胞浆后,和 Cycs 结合后的 Apaf-1 的 Caspase 募集结构域可以募集结合 Caspase-9 形成凋亡小体启动凋亡程序^[19]。HSP90 是一种作用非常广泛的分子伴侣,它参与炎症反应、细胞凋亡信号转导途径、抗自由基和减少钙超载、A β 聚集等多个反应机制^[20]。一方面, HSP90 在神经系统组成性和诱导性的表达特性与 AD 患者脑中 A β 聚集和神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT) 关系密切,它能够抑制脑组织中蛋白质的异常聚集,减少 A β 的产生;同时它能够激活 NF- κ B 和 p38 mAPKs 信号通路,清除异常聚集的 A β ;另一方面, HSP90 可抑制线粒体通路介导的内源性细胞凋亡,阻止 Apaf-1 与 Cycs 结合,抑制 Caspase-3 介导的细胞凋亡途径^[21]。Vdac2 是线粒体外膜最丰富的蛋白, Vdac2 可与 Bak 结合导致线粒体外膜通透性改变,引起凋亡因子的释放,导致细胞凋亡,同时也能与一些细胞内因子如 Bax、Bcl-2、己糖激酶发生相互作用^[22],参与细胞程序性死亡。本研究中,与模型组比较,二至丸中浓度组、正常组的 Cycs、Vdac2 表达水平均下调, HSP90 表达水平上调。它们都能够与细胞内凋亡因子相互作用来调控细胞凋亡,推测二至丸通过调节 Cycs、VDAC、HSP90 的表达水平,作用于程序性坏死通路从而调节细胞凋亡。

综上所述,二至丸能改善 SAMP8 小鼠的学习记忆能力,调节 SAMP8 小鼠海马组织中涉及到代谢、糖酵解/糖异生、程序性坏死等相关通路的多种蛋白质的表达,为之后研究中药治疗 AD 提供实验基础。但本研究同时还存在不足之处,缺乏西药阳性对照组是一缺憾,需要下一步的研究中继续完善和深入。

利益冲突: 针对此次投稿,本文作者未曾接受第三方的金钱或服务支持 (除基金外),不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's dis-

- ease[J]. *Eur J Neurol*, 2018, 25(1): 59–70.
- [2] Su D, Li W, She X, et al. Chronic noise exposure exacerbates AD-like neuropathology in SAMP8 mice in relation to Wnt signaling in the PFC and hippocampus[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14622.
 - [3] 刘春柳, 王炳权, 李玲, 等. 基于网络药理学的二至丸作用机制研究[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2018, 18(8): 1027–1030.
 - [4] 黄丽萍, 燕波, 侯敏, 等. 二至丸对去卵巢所致 AD 小鼠海马蛋白质组学的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(17): 150–156.
 - [5] 李仪奎主编. *中药药理实验方法学*[M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 35–36.
 - [6] Schoenfeld R, Schiffelholz T, Beyer C, et al. Variants of the Morris water maze task to comparatively assess human and rodent place navigation[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2017, 139: 117–127.
 - [7] 宋宛珊, 张玉莲, 孙伟明, 等. 齐墩果酸唤醒阿尔兹海默病大鼠海马沉默突触作用及机制研究[J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(9): 3471–3474.
 - [8] Seo EJ, Fischer N, Efferth T. Phytochemicals as inhibitors of NF- κ B for treatment of Alzheimer's disease[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 129: 262–273.
 - [9] Ay M, Luo J, Langley M, et al. Molecular mechanisms underlying protective effects of quercetin against mitochondrial dysfunction and progressive dopaminergic neurodegeneration in cell culture and MitoPark transgenic mouse models of Parkinson's disease[J]. *J Neurochem*, 2017, 141(5): 766–782.
 - [10] Khodagholi F, Shaerzadeh F, Montazeri F. Mitochondrial aconitase in neurodegenerative disorders: role of a metabolism-related molecule in neurodegeneration[J]. *Current Drug Targets*, 2017, 19(8): 973–985.
 - [11] Figueiredo PA, Powers SK, Ferreira RM, et al. Aging impairs skeletal muscle mitochondrial bioenergetic function[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2009, 64(1): 21–33.
 - [12] Song IU, Kim YD, Chung SW, et al. Association between serum haptoglobin and the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Intern Med*, 2015, 54(5): 453–457.
 - [13] Tucker WC, Chapman ER. Role of synaptotagmin in Ca^{2+} -triggered exocytosis[J]. *Biochemical J*, 2002, 366(Pt 1): 1–13.
 - [14] Lee YJ, Kang IJ, Bunger R, et al. Enhanced survival effect of pyruvate correlates MAPK and NF- κ B activation in hydrogen peroxide-treated human endothelial cells[J]. *J Appl Physiol*, 2004, 96(2): 793–801.
 - [15] Todkar K, Scotti AL, Schwaller B. Absence of the calcium-binding protein calretinin, not of calbindin D-28k, causes a permanent impairment of murine adult hippocampal neurogenesis[J]. *Front Mol Neurosci*, 2012, 5: 56.
 - [16] Xiao J, Feng X, Huang XY, et al. Spautin-1 ameliorates acute pancreatitis via inhibiting impaired autophagy and alleviating calcium overload[J]. *Mol Med*, 2016, 22: 643–652.
 - [17] Schwaller B. Calretinin: from a "simple" Ca^{2+} buffer to a multifunctional protein implicated in many biological processes[J]. *Front Neuroanat*, 2014, 8: 3.
 - [18] Tam ZY, Cai YH, Gunawan R. Elucidating cytochrome C release from mitochondria: insights from an in silico three-dimensional model[J]. *Biophys J*, 2010, 99(10): 3155–3163.
 - [19] Saikia M, Jobava R, Parisien M, et al. Angiogenin-cleaved tRNA halves interact with cytochrome c, protecting cells from apoptosis during osmotic stress[J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(13): 2450–2463.
 - [20] Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, et al. Mitochondrial import of PKCepsilon is mediated by HSP90: a role in cardioprotection from ischaemia and reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88(1): 83–92.
 - [21] Hoffman-Goetz L, Spagnuolo PA. Effect of repeated exercise stress on caspase 3, Bcl-2, HSP 70 and CuZn-SOD protein expression in mouse intestinal lymphocytes[J]. *J Neuroimmunol*, 2007, 187(1–2): 94–101.
 - [22] Naghdi S, Hajnoczky G. VDAC2-specific cellular functions and the underlying structure[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(10): 2503–2514.

(收稿: 2018–12–16 在线: 2019–10–21)

责任编辑: 赵芳芳