

本文引用:李富周,贺春香,余婧萍,宋祯彦,李平,成绍武.当归芍药散改善 APP_{swc}/PS1_{ΔE9}转基因小鼠学习记忆能力及机制研究[J].湖南中医药大学学报,2020,40(9):1094-1100.

当归芍药散改善 APP_{swc}/PS1_{ΔE9} 转基因小鼠 学习记忆能力及机制研究

李富周^{1,2}, 贺春香^{1,2}, 余婧萍^{1,2}, 宋祯彦^{1,2}, 李平^{1,2}, 成绍武^{1,2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室,湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 探讨当归芍药散(Danggui Shaoyao San, DSS)改善 APP_{swc}/PS1_{ΔE9} 双转基因(APP/PS1)小鼠学习记忆能力及机制研究。**方法** 30只 APP/PS1 小鼠随机分为模型组、药物组和阳性对照组,每组10只;C57BL/6 野生型小鼠10只作为正常对照组。药物组予以当归芍药散水提液灌胃干预30 d [含生药剂量 26 g/(kg·d)], 阳性对照组予以腹腔注射法尼基转移酶抑制剂 [FTI-277, 25 mg/(kg·d)], 模型组和正常对照组予以同等剂量的生理盐水灌胃;采用 Morris 水迷宫实验检测小鼠学习记忆能力;免疫组化和免疫荧光技术分别检测海马区域 β-淀粉样蛋白(β-amyloid protein, Aβ)的水平及 Aβ 斑块沉积数量;qPCR 法检测尼基转移酶 mRNA 表达水平。**结果** 与正常对照组比较,模型组小鼠呈现学习记忆功能障碍,药物组干预可改善其学习记忆能力,表现为逃避潜伏期缩短和隐藏平台穿越次数增加($P<0.05$);同时,DSS 能有效地减少模型小鼠脑内海马区 Aβ 的水平和斑块数量($P<0.05$);模型组法尼基转移酶 mRNA 表达水平较正常组高($P<0.05$),DSS 干预能下调其水平。**结论** 当归芍药散可抑制 APP/PS1 小鼠脑内 Aβ 纤维斑块,同时可明显改善其学习记忆及认知能力。初步研究其机制,发现可能与调节蛋白法尼基修饰水平有关。

[关键词] 当归芍药散;认知功能障碍;蛋白法尼基修饰;β-淀粉样蛋白

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.09.010

Study on Danggui Shaoyao San Improves Learning and Memory Ability of APP_{swc}/PS1_{ΔE9} Transgenic Mice and Its Mechanism

LI Fuzhou^{1,2}, HE Chunxiang^{1,2}, YU Jingping^{1,2}, SONG Zhenyan^{1,2}, LI Ping^{1,2}, CHENG Shaowu^{1,2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Key Laboratory of Hunan Province for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral Diseases, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Danggui-Shaoyao-San (DSS) on improving the learning and memory ability in APP_{swc}/PS1_{ΔE9} double transgenic (APP/PS1) mice and its mechanism. **Methods** A total of 30 (APP/PS1) mice were randomly divided into a model group, a drug group and a positive control group, with 10 mice in each group, and 10 C57BL/6 wild-type mice served as normal control group. The drug group mice were treated with DSS water extract by gavage for 30 days (containing a dose of crude drug 26 g/(kg·d)). The positive control group mice were given intraperitoneal injection of farnesyltransferase inhibitor (FTI-277, 25 mg/(kg·d)). The model group and the normal control group mice were administered the same dose of normal saline by means of intragastric administration. The learning and memory ability of the mice were evaluated

[收稿日期]2020-04-07

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(81774129);湖南省自然科学基金面上项目(2018JJ2296,2019JJ50441);湖南省中医药管理局科研项目(2018025);湖南省教育厅优秀青年科研项目(18B246)。

[作者简介]李富周,男,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合防治神经退行性疾病。

[通讯作者]* 成绍武,男,教授,博士研究生导师,E-mail:docshwcheng@hotmail.com。

by Morris Water Maze test. The β -amyloid protein A β levels and A β plaque deposition were detected by immunohistochemistry and immunofluorescence. Farnesyltransferase (FT) mRNA expression was detected by qPCR. **Results** Compared with the normal control group, the mice in model group showed learning and memory dysfunction. DSS intervention could improve their learning and memory ability, which was manifested by shortening the escape latency and increasing the number of hidden platform crossing ($P<0.05$). Simultaneously, DSS could effectively reduce the level of A β and the number of plaques in the hippocampus of APP/PS1 mice ($P<0.05$). Moreover, the farnesyltransferase mRNA level in the model group was higher than that in the normal group ($P<0.05$), which could be down regulated by DSS intervention. **Conclusion** DSS could inhibit A β plaques in the brain of APP/PS1 mice, and significantly improve the learning, memory and recognition ability. The initial study on its mechanism found that it may be related to the modification level of protein farnesylation.

[**Keywords**] Danggui-Shaoyao-San; cognitive dysfunction; protein farnesylation; β -amyloid

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种致死率、致残率很高的神经退行性疾病,主要临床特征表现为空间学习、记忆力障碍。据统计,我国已经有超过500万AD患者^[1]。AD的发病机制尚未明确,目前尚无明确有效的干预治疗药物。随着我国人口老龄化加剧,阐明AD具体的发病机制及寻求新的治疗靶点已成为亟待解决的焦点、难点问题。

细胞外 β -淀粉样蛋白(β -amyloid protein, A β)沉积是AD的主要病理特征^[2]。研究认为A β 的过量分泌和异常聚集都会影响神经细胞的正常生理功能,进而造成AD的发生与发展^[3]。特别是A β 寡聚体的大量聚集易引起突触功能障碍,促使神经元丢失,从而导致AD的发生^[4]。近年来发现A β 和APP裂解产物(如AICD)能通过调节甲羟戊酸途径相关酶的活性影响蛋白异戊二烯化修饰促进AD的发生与发展^[5]。蛋白质的异戊二烯化修饰包括法尼基化(farnesylation, FPP)和香叶基化两种,胆固醇从头合成的甲羟戊酸途径中非固醇类异戊二烯中间产物,包括法尼基焦磷酸(farnesyl pyrophosphate, FPP)和香叶基香叶基焦磷酸,分别经过法尼基蛋白转移酶(farnesyl transferase, FT)和香叶基蛋白转移酶I和II的催化修饰相应蛋白的C末端。最新研究表明,类异戊二烯化合物产生和蛋白异戊二烯化修饰改变与多种疾病有关,包括心血管和脑血管疾病、癌症、骨骼疾病、早衰和AD等疾病^[6]。其中蛋白FPP修饰与AD发病密切相关,有报道称,AD患者大脑中FPP的水平显著升高^[7]。且FPP可通过刺激 γ -分泌酶促进A β 的产生^[8]。同时,通过基因沉默技术或药物抑制FT活性可降低AD模型小鼠A β 水平,从而改善其认知功能^[9]。因此,FT可能是AD防治药物的靶点之一。

当归芍药散(Danggui Shaoyao San, DSS)由当归、芍药、茯苓、白术、泽泻、川芎6味药组成^[10],出自张仲景的《金匱要略》。大量研究发现DSS具有神经保护作用,且在预防和治疗老年痴呆上具有很好的临床疗效,但具体机制有待进一步研究。本研究以APP_{swc}/PS1_{ΔE9}双转基因(APP/PS1)小鼠为模型,探讨DSS对学习记忆能力、A β 表达及FT水平的影响,为其开发和临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级APP/PS1双转基因小鼠30只,6月龄,体质量(20 \pm 5)g,由北京华阜康生物科技有限公司提供,许可证号为SCXK(京)2014-0004;同月龄的C57BL/6野生型小鼠10只,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号为SCXK(湘)2015-0010,小鼠饲养于湖南中医药大学第一附属医院SPF级动物实验室;室内温度20~24℃,相对湿度35%~45%,室内光线12h明暗交替,所有实验过程对动物处置符合动物伦理学要求。

1.2 药品与试剂

1.2.1 实验药品 DSS根据《金匱要略》按当归(*Angelica sinensis*)、白芍(*Cynanchum otophyllum*)、茯苓(*Wolfiporia cocos*)、白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz)、泽泻(*Alisma plantago-aquatica* Linn)、川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort)6味药(3:16:4:4:8:8)组方,所有药材均购置于湖南中医药大学第一附属医院药剂科,并由药剂科鉴定为正品;依据成人用量称取当归芍药散200g,经水煎法提取并浓缩冷冻备用^[11],调整至含生药浓度2.0g/mL。通过高效液相色谱法检查提取液中阿魏酸、芍药苷和茯苓酸含量分别

为 127.6、6081.8、14.7 $\mu\text{g/g}$ 。

1.2.2 主要试剂 DNA 提取试剂盒 (DP304, TIAN GEN 公司); RNA 提取试剂盒 (DP431, TIAN GEN 公司); 引物由华大基因根据引物序列合成 (见表 1); 反转录 cDNA 试剂盒 (RR820L, 日本 TaKaRa 公司); SYBR Premix Ex Taq II 染料 (RR047A, 日本 TaKaRa 公司); $\text{A}\beta$ -6E10 鼠单克隆抗体 (B247600) 购自 BioLegend 公司; Alexa 488 标记山羊抗鼠 IgG (H+L) (1562298, Molecular Probes); 通用二步法检测试剂盒 (PV9000, 北京中杉金桥生物技术有限公司); 蛋白质法尼基转移酶抑制剂 FTI-277 (F9803, Sigma-Aldrich 公司)。

1.3 主要仪器

多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); Real-time PCR 系统 (BIO-RAD 公司); 生物显微镜 (Motic); 激光共聚焦显微镜 (Nikon); 低温高速离心机 (Henle Labortechnik); 电脑生物包埋机 (浙江金华科迪仪器设备有限公司); 石蜡切片机 (HistoSTAT)。

1.4 方法

1.4.1 分组及给药 将 30 只 APP/PS1 小鼠随机分为药物组、模型组和阳性药物对照组, 每组 10 只; 10 只 C57BL/6 野生型小鼠作为正常对照组。药物组给予 DSS 灌胃, 给药剂量依据成人临床等效剂量, 按以下公式计算: 小鼠剂量 (g/kg) = $9.1 \times [\text{成人剂量}(\text{g}) / \text{成人体质量}(70 \text{ kg})]$, 小鼠给药量约为 $26 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 阳性药物对照组给予腹腔注射法尼基转移酶抑制剂 FTI-277, 小鼠剂量为 $25 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[2], 每天中午 11:00 定时进行灌胃给药及阳性药物腹腔注射, 连续 30 d; 模型组和正常对照组小鼠均给予等量的生理盐水灌胃。

1.4.2 水迷宫实验检测 APP/PS1 小鼠学习记忆能力 给药 30 d 后, 进行水迷宫实验, 采用 SMART 3.0 小鼠水迷宫视频分析系统, 水迷宫实验为 6 d, 前 5 d 进行定位航行实验, 将小鼠头朝池壁依次放入第一、二、三、四象限固定起始位置, 其中第二象限为小鼠站台所在的目标象限, 记录小鼠 60 s 内找到隐蔽于水面下的站台时间, 此段时间称为逃避潜伏期; 第 6 天除去站台, 选择原站台位置对角线象限将小鼠头朝池壁放入水中, 进行空间探索实验。空

间探索实验结束 2 h 后, 将平台露出水面以使小鼠能够看见平台, 测试动物的游泳能力和视力, 校正前面两部分的实验结果, 此为可视平台实验。测试时室内安静, 物品陈设、照明度一致。

1.4.3 动物取材 最后一次给药后 2 h, 给予 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 给予常规消毒, 开胸, 用预冷的 PBS 经心脏灌注, 待血液完全排除后进行断头, 在冰板上进行开颅取材。取小鼠大脑组织, 用刀片将其分为左右脑, 右脑固定在 4% 的多聚甲醛中备用, 取左脑在冰上分离大脑皮质、海马及其余脑 3 部分, 液氮速冻后, 放 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冻存备用。

1.4.4 石蜡切片 小鼠右脑组织固定于 4% 的多聚甲醛静置 48 h, 依次经 75%、85%、95%、100% 乙醇脱水, 二甲苯透明剂透明, 浸蜡, 石蜡包埋。切片, 摊片至载玻片上后烤箱烘干备用。

1.4.5 免疫组化检测脑内海马区 $\text{A}\beta$ 的水平 选备用的石蜡切片, 各组 10 只小鼠, 每只选 3 张切片, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温箱中烤片 5 h, 放入二甲苯 I 15 min、二甲苯 II 15 min、100% 乙醇 3 min、95% 乙醇 3 min、85% 乙醇 3 min、75% 乙醇 3 min、流水 1 次。内源性过氧化物酶阻断后, 将切片放入 90% 蚁酸处理 5 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min。5% 马血清封闭 10 min 后滴加 $\text{A}\beta$ 源单抗 6E10 (1:500), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱孵育过夜。次日 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加生物素标记的山羊抗鼠二抗 (1:1 000) 常温孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 每次 2 min; 滴加 ABC 液常温孵育 20 min。PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 加 DAB 显色, 显微镜下观察显色结果, 自来水终止反应; 苏木素复染: 3 min, 水洗; 盐酸乙醇分色, 自来水中促蓝; 放入 75%、85%、95%、100% 乙醇各 2 min 梯度脱水; 二甲苯透明 5 min, 中性树脂胶封片, 常温晾干。每张切片随机选取 4 个视野, 在 10 倍物镜下采集图像, 使用 ImageJ 8.0 分析图像, 测量累计光密度值 IOD 和图像面积 (Area), 用 IOD/Area 所得平均光密度 MOD 进行下一步统计分析。

1.4.6 免疫荧光检测脑内海马区 $\text{A}\beta$ 斑块沉积数量 免疫荧光方法操作步骤基本同免疫组化, 一抗使用 β -淀粉样蛋白鼠源单抗 6E10 (1:500) 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 二抗使用 Alexa 488 荧光标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) (1:600) 常温孵育 1 h, 用含抗荧光淬

灭剂的封片液封片。每只动物取3张切片,每张切片在荧光显微镜下随机选取4个视野,在40倍物镜下采集图像,使用ImageJ 8.0分析图像,计数脑内海马区A β 斑块沉积数目(个/视野)。取4个视野的算术平均数,并计算各组均数及标准差进行统计分析。

1.4.7 qPCR检测海马组织FT基因表达水平 使用Trizol法提取海马区组织总RNA,按照逆转录cDNA试剂盒说明书将总RNA逆转录成cDNA。使用伯乐公司CFX96 Real-time PCR系统采用SYBR染料法进行Real-time PCR检测,qPCR条件:变性(95℃,5 min),变性(95℃,15 s)——退火(58℃,15 s)进行40次循环,每次退火完成读取荧光值,溶解曲线:65~95℃,所用引物序列见表1。扩增完成后,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算实验组目的基因相对于对照组目的基因的变化倍数。

表1 引物序列

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
FT	CACCAACATCATCACTCCAGAC	CAGCCAAGCCACAGAAGGT
GAPDH	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	TGATGGCAACAATGTCCACT

1.5 统计学处理

采用Prism Graphpad 6.0进行数据统计与分析,计量资料“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,若各组数据满足正态分布和方差齐性,采用单因素方差分析法,若数据不满足正态性和方差齐性,采用Kruskal-Wallis检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DSS对APP/PS1小鼠学习记忆能力的影响

采用Morris水迷宫实验检测各组小鼠学习记

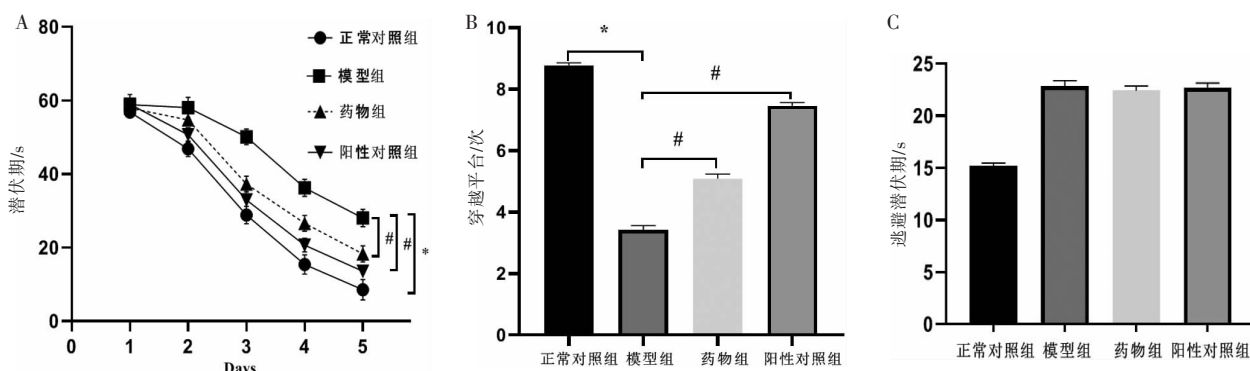
忆能力,如图1所示。在5 d的定位航行实验中,第1天各组小鼠的潜伏期无差异,但随着训练次数的增加,平均潜伏期时间总体呈下降趋势;从第2天到第5天实验的潜伏时间,模型组小鼠较正常对照组寻找平台时间明显延长($P<0.05$);与模型组比较,DSS治疗后能显著缩短APP/PS1小鼠逃避潜伏期($P<0.05$),且阳性药物也能显著缩短小鼠逃避潜伏期,差异具有统计学意义($P<0.05$)(图1A)。第6天空间探索实验中,模型组较正常对照组穿越平台次数明显减少($P<0.05$),DSS药物组和阳性对照组均比模型组小鼠穿越平台次数多,差异具有统计学意义($P<0.05$)(图1B)。而可视平台实验中,实验各组动物表现出相似的行为,差异无统计学意义(图1C)。

2.2 DSS对APP/PS1小鼠海马区A β 水平的影响

APP/PS1小鼠大脑海马区A β 聚集明显,染色后呈现褐色团块状淀粉样斑块沉积,在海马区相同视野下,采用IOD/Area所得平均光密度进行统计分析。阳性对照组和药物组小鼠大脑海马区A β 聚集较模型组明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。正常对照组小鼠未出现A β 聚集。见表2和图2。

2.3 DSS对APP/PS1小鼠海马区A β 斑块沉积数量的影响

老年斑主要由A β 构成,且具有神经毒性,其形状和大小不同。免疫荧光标记A β 斑块结果显示,模型组小鼠海马区出现大量的A β 斑块聚集,且散在分布。阳性对照组与药物组老年斑形成数量显著低于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表3和图3。



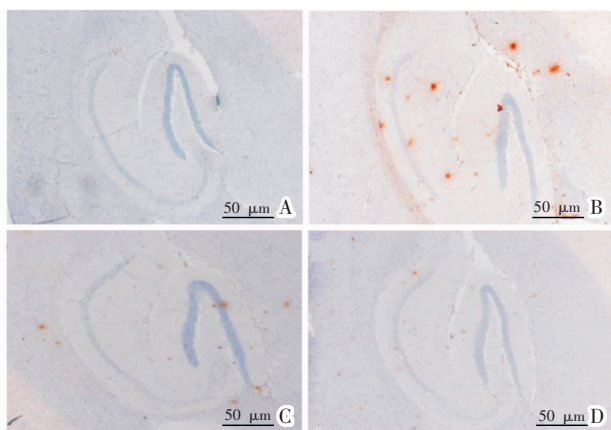
注:A.Morris水迷宫定位导航;B.Morris水迷宫空间探索;C.Morris水迷宫可视平台;n=10,与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

图1 Morris水迷宫实验结果

表2 当归芍药散对APP/PS1小鼠脑内海马区A β 水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	A β 水平(MOD)
正常对照组	0
模型组	0.45 \pm 0.06
药物组	0.25 \pm 0.11*
阳性对照组	0.14 \pm 0.03*

注:与模型组比较,* $P<0.05$



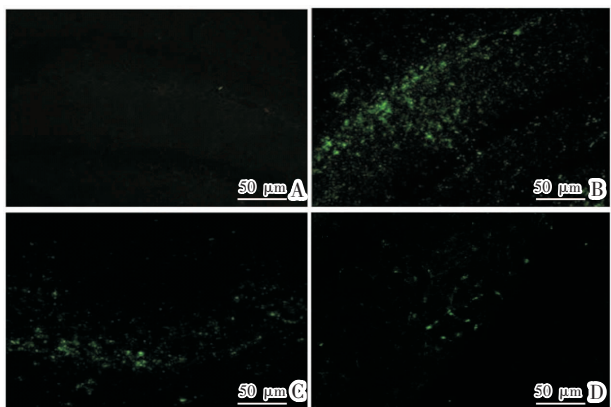
注:A.正常对照组;B.模型组;C.药物组;D.阳性对照组

图2 各组小鼠脑内海马区A β 水平免疫组化检测代表性图(IHC, $\times 40$)

表3 当归芍药散对APP/PS1转基因鼠脑内海马区老年斑形成的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	老年斑数量/个
正常对照组	0
模型组	25.16 \pm 1.87
药物组	14.42 \pm 1.35*
阳性对照组	6.13 \pm 0.76*

注:与模型组比较,* $P<0.05$

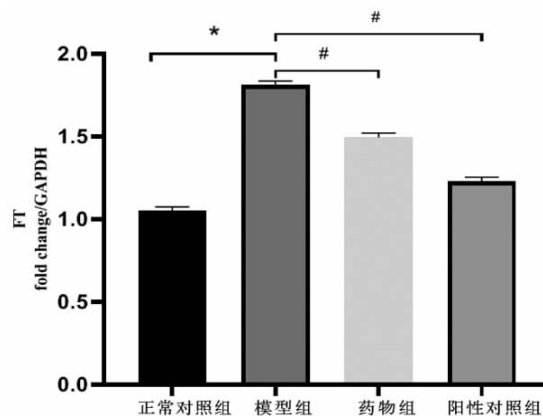


注:A.正常对照组;B.模型组;C.药物组;D.阳性对照组(图中绿色标记为A β 斑块沉积)

图3 各组小鼠脑内海马区A β 斑块沉积免疫荧光检测代表性图

2.4 DSS对APP/PS1小鼠海马区FT mRNA水平的影响

qPCR检测海马组织FT mRNA表达结果显示,与正常对照组比较,模型组海马组织的FT mRNA水平明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,药物组与阳性对照组海马组织的FT mRNA水平明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图4。



注: $n=10$,与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

图4 qPCR检测各组小鼠海马组织FT mRNA表达水平

3 讨论

AD是痴呆性疾病中最常见的一大类,是一种隐性起病、进行性发展的中枢神经系统退行性疾病,表现为智力、记忆和人格的全面损害。AD的病理特征包括细胞外A β 沉积形成老年斑、细胞内tau蛋白过度磷酸化引发神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NTF)及突触丢失、神经炎症、神经细胞死亡^[13]。AD的发病机制尚未明确,而A β 的级联反应假说是对AD发病机理的重要诠释^[14]。但目前尚未研发出明确有效的干预治疗药物,因此,有效药物的开发对AD的防治具有重大临床意义。

AD属中医学“老年呆证”“文痴”“善忘”“癫证”“郁证”等范畴^[15]。中医学认为,老年痴呆的病位在脑,且与心肝脾肾诸脏虚损有密切联系,但与肝联系尤为密切^[16]。古人认为肝为五脏之贼,若肝血不足,母病及子则易致心血亏虚;若肝阴不足,子病及母则易致肾阴亏损,肝主疏泄能调畅脾胃气机,与血和津液的运行密切相关。水液代谢与血液运行失调所产生的痰饮瘀血是老年痴呆常见的致病因素^[17]。因此,我们认为治肝为防治老年痴呆的第一要务。DSS载于汉代张仲景《金匮要略》,由当归、芍药、茯

苓、白术、泽泻、川芎 6 味药组成, 全方补泻兼施, 泻中寓补, 肝脾同调, 血水并治。历代医家认为该方具有养血柔肝、健脾利湿等功效。中医主治肝脾失调、气血郁阻证^[18]。该方的特点为“调和肝脾, 血水同治”, 除了用于妇人腹痛外, 临床上广泛应用于其它疾病治疗, 如神经系统疾病、消化系统疾病、心血管疾病、皮肤病等, 且疗效显著^[19]。近年来, 随着学者们对 DSS 的研究不断深入, 发现 DSS 具有很好的神经保护作用, 能有效减少 A β 的沉积^[20]、突触损伤^[21], 且在预防和治疗老年痴呆上取得了较好的临床疗效, 被认为是最适合用于防治 AD 的经方之一^[22]。前期研究表明, DSS 能通过抗神经元细胞凋亡、抗炎来改善 AD 的作用^[23]。同时 DSS 能改善 AD 模型鼠的学习记忆能力^[24]。

本研究采用 APP/PS1 小鼠为模型, 该模型是 AD 病理改变比较成熟的模型之一^[25]。目前, AD 病因学的主要假设, 诊断 AD 的神经病理学指南以及大多数引人注目的治疗方法均是围绕 A β 建立的^[26]。A β 导致老年斑形成、NFT、神经细胞凋亡, 且对神经系统具有毒性, 损伤患者记忆力, 从而导致 AD 的发生。本研究采用 Morris 水迷宫实验检测 APP/PS1 模型小鼠的空间学习记忆能力, 结果显示该模型鼠学习记忆能力受损。DSS 药物干预能缩短 APP/PS1 小鼠逃避潜伏期和增加站台穿越次数, 提示 DSS 能改善 AD 小鼠的认知功能。同时, 通过可视平台实验校正实验各组小鼠的游泳能力与视力差异, 证实了 DSS 改善 AD 模型鼠认知功能结果的可靠性。而 A β 是 AD 发病的中心环节^[27], 减少 A β 的产生和增强 A β 的清除是防治 AD 的重要靶点。免疫组化检测结果显示 DSS 干预能降低 APP/PS1 小鼠脑内海马区 A β 水平; 免疫荧光也进一步表明它能减少脑内海马区老年斑的形成, 提示 DSS 能通过降低 A β 水平有效改善 AD 的认知功能, 与其他学者研究结果一致^[19-23]。

最新研究表明, 异戊二烯化过程和 APP/A β 代谢之间的联系存在相互性。异戊二烯化修饰蛋白在 AD 的发病机制中发挥重要的作用, 调节蛋白异戊二烯化水平能影响 APP/A β 代谢^[28]、tau 蛋白磷酸化^[29]、神经炎症^[30]、氧化应激^[31]以及突触认知功能^[32]等方面。AD 患者脑内异戊二烯化修饰蛋白含量明显升

高, 而且蛋白法尼基化水平影响 APP 的加工以及 A β 的产生和分泌^[33]。同时, AD 病理产物 A β 和其他 APP 裂解产物(如 AICD)能直接调节甲羟戊酸途径相关酶的活性, 导致类异戊二烯化合物水平的改变影响异戊二烯化过程^[6]。最新研究表明, AD 患者脑内类异戊二烯中间产物 FPP 水平显著升高, 提示 AD 患者脑内整体法尼基修饰水平已发生改变^[34]。本课题组前期研究结果表明, AD 模型小鼠中 FT 的基因杂合缺失, 可以减轻其神经病理损害和改善其空间学习与记忆功能^[9]。本实验应用 FT 特异性抑制剂干预, 也能改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆功能和降低海马区域 A β 水平, 与前期结果一致。同时, DSS 干预能降低 APP/PS1 模型小鼠海马组织 FT 的基因表达水平, 提示 DSS 可能通过影响蛋白法尼基修饰水平, 降低 A β 生成, 改善认知功能。

综上所述, DSS 能改善 APP/PS1 模型小鼠的认知功能和减轻其病理损伤, 可能与调节蛋白 FPP 修饰水平有关, 但其具体作用机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 蒋平静, 傅一笑. 阿尔茨海默病行为和临床症状的治疗研究进展[J]. 现代医药卫生, 2019, 35(17): 2657-2660.
- [2] ZHANG T, CHEN D, LEE T H. Phosphorylation signaling in APP processing in Alzheimer's disease[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(1): 209.
- [3] TRIPATHI T, KHAN H. Direct interaction between the β -Amyloid core and tau facilitates cross-seeding: A Novel Target for Therapeutic Intervention[J]. Biochemistry, 2020, 59(4): 341-342.
- [4] ARCOS-BURGOS M, ACOSTA M T, MARTINEZ A F, et al. Neural plasticity in obesity and psychiatric disorders[J]. Neural Plasticity, 2016: 6053871.
- [5] GRIMM M O, ROTHHAAR T L, HARTMANN T. The role of APP proteolytic processing in lipid metabolism[J]. Experimental Brain Research, 2012, 217(3/4): 365-375.
- [6] HUSAIN I, KHAN S, KHAN S, et al. Unfolding the pleiotropic facades of rosuvastatin in therapeutic intervention of myriads of neurodegenerative disorders[J]. Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology, 2018.
- [7] JEONG A, SUAZO K F, WOOD W G, et al. Isoprenoids and protein prenylation: implications in the pathogenesis and therapeutic intervention of Alzheimer's disease[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2018, 53(3): 279-310.
- [8] ZHOU Y, SURAM A, VENUGOPAL C, et al. Geranylgeranyl

- pyrophosphate stimulates gamma-secretase to increase the generation of Abeta and APP-CTFgamma[J]. *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2008, 22(1): 47-54.
- [9] CHENG S, CAO D, HOTTMAN D A, et al. Farnesyltransferase haploinsufficiency reduces neuropathology and rescues cognitive function in a mouse model of Alzheimer disease[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(50): 35952-35960.
- [10] 陈霖,王艳慧,戚进,等.当归芍药散入血成分的分析及药代动力学研究(英文)[J].*中国天然药物*,2011,9(5):363-368.
- [11] 余婧萍,贺春香,成绍武,等.当归芍药散通过调控 NF- κ B 炎症通路改善 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] WALTERS C E, PRYCE G, DJR H, et al. Inhibition of Rho GTPases with protein prenyltransferase inhibitors prevents leukocyte recruitment to the central nervous system and attenuates clinical signs of disease in an animal model of multiple sclerosis[J]. *Journal of Immunology*, 2002, 168(8): 4087-4094.
- [13] 张赫,郑焱. β 淀粉样蛋白级联假说相关的阿尔茨海默病发病机制及防治策略研究进展[J].*中国医学科学院学报*,2019,41(5):702-708.
- [14] 尹芳,宋祯彦,李富周,等.基于网络药理学研究当归芍药散防治阿尔茨海默病的作用机制[J].*药物评价研究*,2018,41(2):210-215.
- [15] LIN Z, GU J, XIU J, et al. Traditional chinese medicine for senile dementia[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2012, 2012: 692621.
- [16] 杨昕,何明大.中医对老年性痴呆的认识和治疗[J].*中医药导报*,2009,15(8):82-84.
- [17] 周平龙.中医脑病病因概论[J].*陕西中医学院学报*,1996(2):1-4.
- [18] 陈健,张越,王洪兰,等.当归标准汤剂 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量研究[J].*中草药*,2019,50(20):4942-4949.
- [19] 刘敏,任存霞.当归芍药散的实验研究进展[J].*中医药学报*,2019,47(5):117-119.
- [20] 李泽良,曲怀刚,马春媚,等.当归芍药散对 SAM-P8 小鼠空间学习记忆能力的影响[J].*中华行为医学与脑科学杂志*,2009,18(3):223-225.
- [21] 杨从.当归芍药散及拆方对痴呆小鼠学习记忆的影响及机制研究[D]广州:广州中医药大学,2017.
- [22] 刘娟,杨立,张洪.中医药治疗阿尔兹海默病的研究进展[J].*世界中医药*,2016,11(5):932-935.
- [23] 宋祯彦,陈易璇,余婧萍,等.当归芍药散活性成分治疗阿尔兹海默病作用机制的生物网络分析[J].*世界科学技术-中医药现代化*,2018,20(6):834-846.
- [24] 孙华,胡愉,张建民,等.一种对阿尔茨海默病模型小鼠认知和记忆功能具有明显改善作用的中药方剂[J].*中国中药杂志*,2003,28(8):751-754.
- [25] GÖTZ J, BODEA L G, GOEDERT M. Rodent models for Alzheimer disease[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2018, 19(10): 583-598.
- [26] MORRIS G P, CLARK I A, VISSSEL B. Questions concerning the role of amyloid- β in the definition, aetiology and diagnosis of Alzheimer's disease[J]. *Acta Neuropathologica*, 2018, 136(5): 663-689.
- [27] NÄSLUND J, HAROUTUNIAN V, MOHS R, et al. Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline[J]. *JAMA*, 2000, 283(12): 1571-1577.
- [28] PAJAK B, KANIA E, GOŁASZEWSKA A, et al. Preliminary study on clusterin protein (sCLU) expression in PC-12 cells overexpressing wild-type and mutated (Swedish) A β PP genes affected by non-steroid isoprenoids and water-soluble cholesterol[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(6).
- [29] HAMANO T, YEN S H, GENDRON T, et al. Pitavastatin decreases tau levels via the inactivation of Rho/ROCK[J]. *Neurobiology of Aging*, 2012, 33(10): 2306-2320.
- [30] CORDLE A, LANDRETH G. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors attenuate beta-amyloid-induced microglial inflammatory responses[J]. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2005, 25(2): 299-307.
- [31] CHÉRET C, GERVAIS A, LELLI A, et al. Neurotoxic activation of microglia is promoted by a nox1-dependent NADPH oxidase[J]. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2008, 28(46): 12039-12051.
- [32] MANS R A, MCMAHON L L, LI L. Simvastatin-mediated enhancement of long-term potentiation is driven by farnesyl-pyrophosphate depletion and inhibition of farnesylation[J]. *Neuroscience*, 2012, 202: 1-9.
- [33] COLE S L, VASSAR R. Isoprenoids and Alzheimer's disease: a complex relationship[J]. *Neurobiology of Disease*, 2006, 22(2): 209-222.
- [34] ECKERT G P, HOOFF G P, STRANDJORD D M, et al. Regulation of the brain isoprenoids farnesyl- and geranylgeranylpyrophosphate is altered in male Alzheimer patients[J]. *Neurobiology of Disease*, 2009, 35(2): 251-257.