癫痫清颗粒介导线粒体自噬对P301S小鼠tau蛋白的影响Δ

齐　越[1*]，贾　冬[2#]，张艳军[3]，谢　奇[3]，陈桂娟[3]，谭东明[3]，陈二华[3]，丁　旭[3]，殷　紫[3]（1.江苏省徐州医药高等职业学校药学技术系，江苏 徐州　221116；2.辽宁中医药大学附属第二医院药理室，沈阳　110034；3.江苏护理职业学院药学与中药学院，江苏 淮安　223200）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）14-1712-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.14.10

摘　要　目的　研究癫痫清颗粒介导线粒体自噬对P301S小鼠tau蛋白的影响。**方法**　将36只P301S小鼠按体重分为模型组、癫痫清颗粒组（12.48 g/kg）和盐酸多奈哌齐组（阳性对照，1.3 mg/kg），每组12只；另取C57BL6小鼠10只，作为对照组。各药物组小鼠灌胃相应药液，对照组和模型组灌胃等体积水；灌胃体积均为20 mL/kg，每天1次，连续5个月。实验期间，观察各组小鼠的一般状况；末次给药后，借助Y迷宫和Morris水迷宫实验检测小鼠的学习记忆能力；以苏木精-伊红染色法观察其脑组织形态学改变，以尼氏染色法观察其脑组织神经细胞结构和尼氏体数量；以免疫组织化学法检测其脑组织中丝氨酸202/苏氨酸205位点磷酸化tau（简称“AT8”）蛋白的表达水平，Western blot法检测脑组织中线粒体自噬相关蛋白[PTEN诱导激酶1（PINK1）、Parkin、微管相关蛋白1轻链3B（LC3B）、p62]、突触相关蛋白[突触后密度蛋白95（PSD-95）、突触生长蛋白（SYP）、生长相关蛋白43（GAP-43）]的表达水平和tau蛋白的磷酸化水平[以丝氨酸199（Ser199）、Ser202的磷酸化水平表示]。**结果**　模型组小鼠出现毛发变白、体重下降、下肢瘫痪等症状；其脑组织海马结构欠完整，神经细胞膜及细胞结构亦不完整；其自发交替反应率、穿越平台次数、细胞质内尼氏体数量和PINK1、Parkin、LC3B、SYP、GAP-43、PSD-95蛋白的表达水平均较对照组显著降低，游泳潜伏期（第4、5天）、AT8和p62蛋白的表达水平、Ser199和Ser202蛋白的磷酸化水平均较对照组显著升高或延长（$P<0.05$或$P<0.01$）。与模型组比较，各药物组小鼠上述症状和指标均得以显著改善（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论**　癫痫清颗粒可有效改善P301S小鼠的认知功能障碍，作用可能与介导线粒体自噬，减少tau蛋白过度磷酸化，上调脑组织中突触相关蛋白的表达，修复受损神经细胞有关。

关键词　癫痫清颗粒；阿尔茨海默病；线粒体自噬；tau蛋白；突触；神经细胞；学习记忆障碍

Effects of Dianxianqing granules on tau protein in P301S mice by regulating mitophagy

QI Yue[1], JIA Dong[2], ZHANG Yanjun[3], XIE Qi[3], CHEN Guijuan[3], TAN Dongming[3], CHEN Erhua[3], DING Xu[3], YIN Zi[3]（1. Dept. of Pharmaceutical Technology, Xuzhou Pharmaceutical Vocational College of Jiangsu Province, Jiangsu Xuzhou 221116, China; 2. Dept. of Pharmaceutical Technology, the Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China; 3. College of Pharmacy and Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Nursing Vocational College, Jiangsu Huaian 223200, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To study the effects of Dianxianqing granules on the tau protein in P301S mice by regulating mitophagy. **METHODS** Totally 36 P301S mice were randomly divided into model group, Dianxianqing granule group (12.48 g/kg), donepezil hydrochloride group (positive control, 1.3 mg/kg), with 12 mice in each group; another 10 C57BL6 mice were selected as control group. Administration groups were given relevant drug solutions intragastrically, and control group and model group were given constant volume of water intragastrically. The gavage volume was 20 mL/kg, once a day, for consecutive 5 months. During the experiment, the general condition of mice was observed in each group. After the last medication, the learning and memory ability was determined by Y maze test and Morris water maze test; HE staining was used to observe the morphological changes in brain tissue, and Nissl staining was used to observe the structure of neural cells and the number of Nissl bodies in cerebral tissue. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of phospho-tau serine 202/threonine 205 (abbreviated as AT8) in brain tissue. Western blot assay was used to determine the expressions of mitophagy-associated proteins [PTEN-induced putative kinase-1 (PINK1), Parkin, microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B), p62], synaptic-associated proteins [postsynaptic density protein-95 (PSD-95), synaptophysin (SYP), and growth-associated protein-43 (GAP-43)] and the phosphorylation of tau protein [expressed by the phosphorylation levels of serine 199 (Ser199) and Ser202] in brain tissue. **RESULTS** The mice in model group showed symptoms such as white hair, decreased body mass, and lower limb paralysis, with incomplete hippocampal structures in their brain tissue, as well as

Δ**基金项目** 徐州市科技项目（No.KC22134）

＊**第一作者** 教授，博士。研究方向：中药新药药理、神经药理学。E-mail：lnzyxyqy2003@163.com

\# **通信作者** 教授。研究方向：中药新药药理、神经药理学。E-mail：Jiadg2003@126.com

incomplete cell membrane edges and cell structures; the spontaneous alternating response rate, the times of crossing platform, the number of Nissl bodies, the protein expressions of PINK1, Parkin, LC3B, SYP, GAP-43, and PSD-95 were decreased significantly, compared with control group; swimming latency (fourth and fifth day), the protein expressions of AT8 and p62, the phosphorylation levels of Ser199 and Ser202 were increased or lengthened significantly, compared with control group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, the above symptoms and indexes of mice were improved significantly in administration groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Dianxianqing granules can effectively improve cognitive impairment in P301S mice, the mechanism of which may be associated with inducing mitochondrial autophagy, reducing the hyperphosphorylation of tau protein, up-regulating the expression of synaptic-associated proteins in brain tissue, and repairing damaged neural cells.

KEYWORDS Dianxianqing granules; Alzheimer's disease; mitophagy; tau protein; synapse; neural cells; learning and memory disorders

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是一种常见的神经退行性疾病,其临床表现为学习和记忆能力下降,主要病理特征为过度磷酸化的tau蛋白导致细胞内神经纤维缠结形成,从而诱导细胞外老年斑沉积[1]。然而,AD的具体发病机制尚不明确。近期研究结果表明,线粒体损伤可能出现在AD发病早期[1],而线粒体可通过自噬等多种方式进行自身平衡状态的动态调节[2]。研究指出,线粒体自噬即借助自噬小体途径将错误折叠的蛋白和受损的线粒体吞噬、降解[3]。若自噬功能受损,大量毒性蛋白和受损线粒体将会蓄积,导致AD患者或模型动物体内三磷酸腺苷水平下降、神经细胞损伤、突触丢失,从而诱导tau蛋白过度磷酸化[4]。PTEN诱导激酶1(PTEN-induced putative kinase-1,PINK1)是存在于线粒体中的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,Parkin是分布于细胞质中的一种具有连接活性的E3泛素连接酶,线粒体自噬启动后,PINK1/Parkin通路将被激活,从而抑制AD动物模型tau蛋白的过度磷酸化,并逆转其认知缺陷[5]。可见,探索能够通过调控PINK1/Parkin通路来改善线粒体自噬功能的药物可能会为AD的治疗提供新的选择。

目前,临床尚无治疗AD的有效药物,西医以靶向神经递质类药物为主,治疗效果有限;而中药及其复方对AD症状的缓解效果显著[6],故开发中药复方可为AD患者提供更多的候选药物。癫痫清颗粒为辽宁省中医药研究院的中药复方专利药(专利号ZL201110069494),由熟地黄、制何首乌、芍药(白芍)、石菖蒲、柴胡、郁金、知母等10味中药组成,具有填精益智、开窍豁痰、活血祛瘀的功效,主要用于治疗神情淡漠、寡言少语、反应迟钝、善忘等症[7]。研究发现,活性氧的堆积和氧化应激的发生均可导致线粒体损伤[8]。本课题组前期研究结果显示,癫痫清颗粒能通过调节核因子F相关因子2、血红素氧合酶1等途径来抑制氧化应激的发生[9]。基于此,本课题组推测,癫痫清颗粒能够减轻线粒体损伤,调节线粒体稳态,但这种作用能否通过线粒体自噬途径介导尚不明确。为此,本研究以tau蛋白过度磷酸化的P301S小鼠为对象,以线粒体自噬为靶点,初步探讨癫痫清颗粒对AD小鼠的神经保护作用,旨在为AD治疗药物的研发提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括DW-200型脑立体定位仪(成都泰盟科技有限公司)、Neofuge 13R型酶标仪(美国BioTek公司)、ImageQuant 350型凝胶成像系统(美国GE Healthcare公司)、DMI3000 B型光学显微镜(德国Leica公司)等。

1.2 主要药品与试剂

癫痫清颗粒[批号20180310,规格8 g/包(以生药量计)]由辽宁中医药大学附属第二医院提供;盐酸多奈哌齐片(阳性对照药,批号140606A,规格5 mg)购自卫材(中国)药业有限公司;兔源丝氨酸202(serine 202,Ser202)、Ser199、tau-5、β-肌动蛋白(β-actin)多克隆抗体(批号分别为bs-11240R、bs-5417R、bs-20445R、bs-10966R)均购自北京博奥森生物技术有限公司;鼠源丝氨酸202/苏氨酸205位点磷酸化tau(phospho-tau serine 202 and threonine 205,简称"AT8")单克隆抗体(货号MN1020B)购自美国Invitrogen公司;鼠源突触生长蛋白(synaptophysin, SYP)、生长相关蛋白43(growth-associated protein-43, GAP-43)、突触后密度蛋白95(postsynaptic density protein-95,PSD-95)、PINK1单克隆抗体(货号分别为SC17750、SC32290、SC17790、SC517353)均购自美国Santa Cruz公司;鼠源Parkin单克隆抗体(批号4211S)购自美国Cell Signaling Technology公司;鼠源微管相关蛋白1轻链3B(microtubule-associated protein 1 light chain 3B,LC3B)、p62蛋白单克隆抗体(货号分别为ab48394、ab56416)均购自英国Abcam公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号120219200821)购自上海碧云天生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗鼠IgG二抗(批号分别为141987、217903)均购自北京中杉金桥生物技术

有限公司；其余试剂均为国产分析纯，水为蒸馏水。

1.3 实验动物

本研究实验动物包括SPF级C57BL6小鼠10只和特异性较高且可模拟AD发病过程中tau蛋白过度磷酸化的SPF级P301S小鼠36只，4月龄，体重为20～24 g，雌雄各半，由江苏集萃药康生物科技有限公司提供，动物生产许可证号为SCXK（苏）2019-0009。所有小鼠均饲养于环境温度20～23 ℃、相对湿度50%～60%的实验动物中心内，自由摄食、饮水。本研究方案均严格遵循我国动物实验管理相关法规的要求，并经实验所在单位动物伦理委员会审核批准（编号SYYXY2021042501）。

2 方法

2.1 分组与给药

取P301S小鼠36只，按体重分为模型组、癫痫清颗粒组和盐酸多奈哌齐组，每组12只；另取C57BL6小鼠10只，作为对照组。本课题组在前期研究中，多次考察了癫痫清颗粒不同剂量（12.48、6.24、3.12 g/kg）的抗AD作用，发现12.48 g/kg的效果最优[10]，故本研究以12.48 g/kg作为癫痫清颗粒的剂量；同时，参考本课题组前期研究成果[10]，以1.3 mg/kg作为盐酸多奈哌齐的剂量。各药物组小鼠灌胃相应药液（以水为溶剂），对照组和模型组小鼠灌胃等体积水。灌胃体积均为20 mL/kg，每天1次，连续5个月。

2.2 小鼠一般状况观察

实验期间，于每天上午8点观察各组小鼠的一般状况，包括体重、活动度、毛发光泽度及死亡情况等。

2.3 小鼠学习记忆能力检测

末次灌胃后，采用自制实验装置（由3个木质支臂组成）进行Y迷宫实验：将各组小鼠放在支臂的交叉点处，记录8 min内小鼠进入支臂的总次数；同时，以连续进入3个不同支臂作为1次正确交替反应，计算小鼠的自发交替反应率：自发交替反应率＝正确交替反应次数/（进入支臂总次数－2）×100%。

随后，采用自制白色圆桶状装置（直径80 cm、高33 cm，上有摄像头）进行Morris水迷宫实验：操作时，以圆桶中心为原点，将其划分为4个等面积的扇形区域，分别记为第1至第4象限；将一圆形平台置于第1象限扇形区域内的中间位置。桶内装水，水温控制在（23±1）℃并保持水面高于平台1 cm。实验分为适应期、训练期和检测期。适应期为1 d，将各组小鼠腹部朝下，从任意位置放入水中，使其自由游泳，找到平台后使小鼠在平台上停留10 s以适应平台安全区，若小鼠在60 s内仍未寻找到平台，则用木棍将其引导至平台，并使其在平台上停留10 s。训练期为5 d，每天进行2次训练，将小鼠从非平台象限面壁放入水中，使其寻找平台，记录小鼠的游泳潜伏期（即从入水至找到平台的时间），若小鼠在60 s内未能成功登上平台，则将游泳潜伏期记为60 s；同时，应用木棍引导60 s内未成功找到平台的小鼠登上平台，每次训练间隔4 h。检测期为1 d，取出桶内平台装置，将小鼠从目标象限的对侧面壁放入水中，让其自由游泳60 s，记录60 s内小鼠穿越平台次数和游泳速度。

2.4 小鼠脑组织形态学观察

采用苏木精-伊红（HE）染色法进行观察。Morris水迷宫实验结束后，随机选取每组5只小鼠，以3%戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉，快速取出其脑组织并置于4%多聚甲醛中固定24 h；脑组织经常规石蜡包埋后切片（厚度约4 μm），脱蜡、脱水，用HE染色并置于光学显微镜下观察海马结构的完整性及神经细胞膜的连续性。

2.5 小鼠脑组织神经细胞结构及尼氏体数量检测

采用尼氏染色法进行检测。取“2.4”项下各组小鼠脑组织的石蜡切片，常规脱蜡至水；用水冲洗5 min，加入1%甲苯胺蓝染料，室温孵育6 min；用水冲洗3 min，再依次于70%乙醇、95%乙醇、无水乙醇、二甲苯中静置5、5、1、5 min；封片，使用光学显微镜观察神经细胞结构（神经细胞的细胞核为深蓝色的圆形或椭圆形），采用Leica quantity 570图像分析系统进行尼氏体（即神经细胞的细胞质内散在的多角形小块）计数。

2.6 小鼠脑组织中AT8蛋白表达水平测定

采用免疫组织化学法进行测定。取“2.4”项下各组小鼠脑组织的石蜡切片，常规脱蜡至水；置于3%过氧化氢溶液中修复10 min，冷却至室温；以5%牛血清白蛋白封闭，37 ℃下孵育40 min；加入AT8一抗（稀释比例为1∶200），4 ℃下孵育过夜；滴加相应二抗（稀释比例为1∶3 000），37 ℃下孵育30 min；以二氨基联苯胺显色后，再以苏木精复染；脱水，透明，封片，使用光学显微镜观察（细胞内可见棕黄色颗粒即为AT8蛋白表达阳性），采用JEOA 801D形态学图像分析系统计算各组小鼠脑组织中AT8蛋白阳性表达细胞的平均光密度值，并以此表示该蛋白的表达水平。

2.7 小鼠脑组织中自噬、突触相关蛋白表达和tau蛋白磷酸化检测

采用Western blot法进行检测。Morris水迷宫实验结束后，选取每组另4只小鼠，以3%戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉，快速取出脑组织，冰上分离海马组织，加入蛋白裂解液提取蛋白，以BCA法测定蛋白浓度并作变性处理。取变性蛋白适量进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜；用5%脱脂奶粉室温封闭2 h，加入线粒体自噬相关蛋白一抗[PINK1、Parkin、LC3B、p62

（稀释比例分别为1∶400、1∶200、1∶400、1∶500）]、突触相关蛋白一抗[PSD-95、SYP、GAP-43（稀释比例分别为1∶400、1∶1 000、1∶300）]、磷酸化tau一抗[Ser199、Ser202（稀释比例分别为1∶300、1∶200）]和tau-5、β-actin一抗（稀释比例分别为1∶1 000、1∶1 000），4 ℃下孵育过夜；加入相应二抗（稀释比例为1∶3 000），室温下孵育2 h；加入发光液进行曝光后，使用凝胶成像系统成像。使用Image J软件进行灰度值分析，以PINK1、Parkin、LC3B、p62、PSD-95、SYP、GAP-43蛋白与内参蛋白（β-actin）的灰度值比值表示上述蛋白的表达水平，以Ser199、Ser202与tau-5的灰度值比值表示上述蛋白的磷酸化水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 癫痫清颗粒对小鼠一般状况的影响

9月龄的P301S小鼠出现了毛发变白、体重下降、下肢瘫痪、行动缓慢等症状；模型组小鼠死亡3只，盐酸多奈哌齐组和癫痫清颗粒组小鼠各死亡2只。

3.2 癫痫清颗粒对小鼠学习记忆能力的影响

各组小鼠进入支臂总次数比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。与对照组比较，模型组小鼠的自发交替反应率显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，各药物组小鼠的自发交替反应率均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表1。

表1 各组小鼠的Y迷宫实验结果（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	进入支臂总次数	自发交替反应率/%
对照组	10	32.18±2.36	68.42±3.27
模型组	9	31.36±3.05	49.28±4.31[a]
癫痫清颗粒组	10	31.64±2.67	57.34±4.16[b]
盐酸多奈哌齐组	10	32.72±2.95	61.41±5.36[c]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$。

与对照组比较，模型组小鼠第4、5天的游泳潜伏期均显著延长（$P<0.05$），穿越平台次数均显著减少（$P<0.05$）；与模型组比较，各药物组小鼠第4、5天的游泳潜伏期均显著缩短（$P<0.05$），穿越平台次数均显著增加（$P<0.05$）；但各组小鼠的游泳速度比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表2、图1。

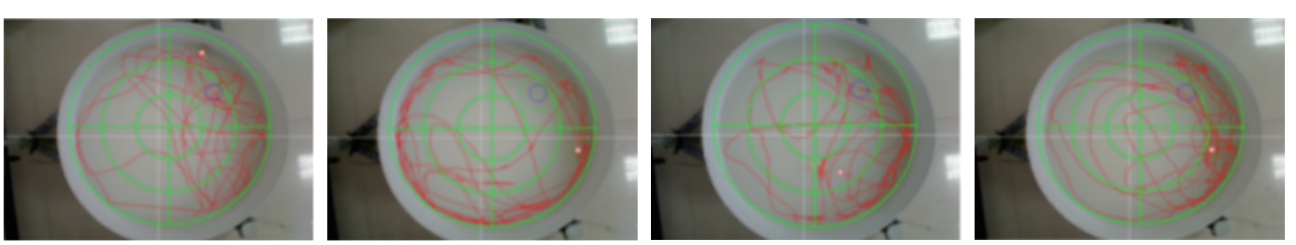
3.3 癫痫清颗粒对小鼠脑组织形态的影响

对照组小鼠的海马结构和神经细胞膜形态均正常。模型组小鼠的海马结构欠完整，神经细胞膜边缘亦不完整，细胞核固缩。经盐酸多奈哌齐和癫痫清颗粒干预后，小鼠的海马结构完整性提升，神经细胞膜相对完整，细胞核边界较清晰。结果见图2。

表2 各组小鼠Morris水迷宫实验结果（$\bar{x}\pm s$）

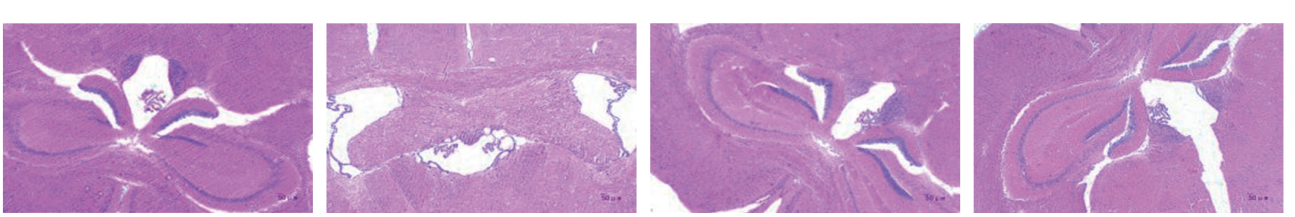
组别	n	游泳潜伏期/s					穿越平台次数	游泳速度/(cm/s)
		第1天	第2天	第3天	第4天	第5天		
对照组	10	42.88±16.88	37.92±15.90	37.92±13.81	30.18±16.16	26.75±9.19	2.74±1.73	25.05±4.23
模型组	9	42.88±16.88	41.48±14.16	41.48±16.55	43.57±18.51[a]	39.12±17.27[a]	1.57±1.21[a]	24.56±4.71
癫痫清颗粒组	10	42.15±16.49	38.93±14.91	38.93±17.31	29.67±12.27[b]	27.96±10.02[b]	2.57±1.60[b]	24.94±3.17
盐酸多奈哌齐组	10	44.35±12.34	40.21±17.10	40.21±10.81	31.32±14.59[b]	27.69±12.39[b]	2.43±1.34[b]	25.99±3.11

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$。



A.对照组　B.模型组　C.盐酸多奈哌齐组　D.癫痫清颗粒组

图1 各组小鼠Morris水迷宫实验轨迹图



A.对照组　B.模型组　C.盐酸多奈哌齐组　D.癫痫清颗粒组

图2 各组小鼠脑组织形态观察显微图（HE染色法，×4）

3.4 癫痫清颗粒对小鼠脑组织神经细胞结构及尼氏体数量的影响

对照组小鼠神经细胞结构清晰、完整、排列整齐，核仁清晰、染色均匀，细胞质内可见丰富的尼氏体。模型组小鼠神经细胞染色变淡且排列松散，细胞结构不完整，核仁不清晰，细胞质内尼氏体数量较对照组显著减少（$P<0.01$）；经盐酸多奈哌齐和癫痫清颗粒干预后，小鼠神经细胞结构较为完整、排列整齐，核仁清晰，细胞质内尼氏体数量均较模型组显著增多（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。结果见表3、图3。

3.5 癫痫清颗粒对小鼠脑组织中AT8蛋白表达水平的影响

与对照组比较，模型组小鼠脑组织中AT8蛋白的表达水平显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各药物组小鼠脑组织中AT8蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表3、图4。

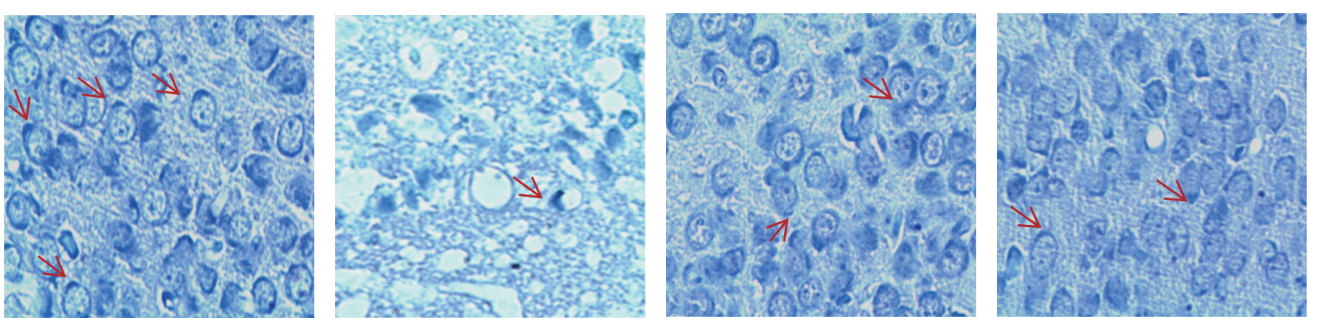
表3 各组小鼠脑组织中尼氏体数量和AT8蛋白表达水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	尼氏体/个	AT8蛋白表达水平
对照组	370.02±25.35	0.41±0.11
模型组	167.62±18.16[a]	1.07±0.09[b]
癫痫清颗粒组	246.43±19.11[c]	0.57±0.08[c]
盐酸多奈哌齐组	298.02±23.15[d]	0.48±0.09[c]

a：与对照组比较，$P<0.01$；b：与对照组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.05$；d：与模型组比较，$P<0.01$。

3.6 癫痫清颗粒对小鼠脑组织中自噬、突触相关蛋白表达及tau蛋白磷酸化的影响

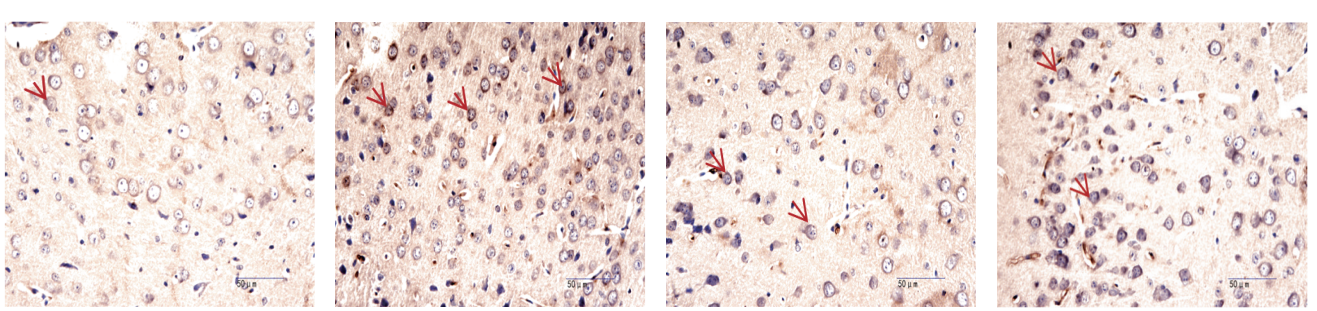
与对照组比较，模型组小鼠脑组织中PINK1、Parkin、LC3B、SYP、GAP-43、PSD-95蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$）；p62蛋白的表达水平和Ser199、Ser202蛋白的磷酸化水平均显著升高（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；与模型组比较，盐酸多奈哌齐和癫痫清颗粒均可显著逆转上述蛋白的表达/磷酸化（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。结果见表4、图5。



A.对照组　B.模型组　C.盐酸多奈哌齐组　D.癫痫清颗粒组

→：尼氏体。

图3 各组小鼠脑组织神经结构及尼氏体观察显微图（尼氏染色法，×40）



A.对照组　B.模型组　C.盐酸多奈哌齐组　D.癫痫清颗粒组

→：AT8蛋白阳性表达细胞。

图4 各组小鼠脑组织中AT8蛋白表达显微图（免疫组织化学法，×20）

表4 各组小鼠脑组织中PINK1、Parkin、LC3B、p62、SYP、PSD-95、GAP-43和Ser199、Ser202蛋白表达/磷酸化水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=4$）

组别	PINK1	Parkin	LC3B	p62	SYP	GAP-43	PSD-95	Ser199	Ser202
对照组	1.31±0.11	1.18±0.12	1.02±0.18	0.32±0.09	0.78±0.10	0.96±0.12	0.84±0.09	0.14±0.04	0.13±0.06
模型组	0.74±0.13[a]	0.53±0.09[a]	0.52±0.11[a]	0.51±0.13[a]	0.39±0.11[a]	0.53±0.11[a]	0.48±0.12[a]	0.82±0.11[b]	0.42±0.07[b]
癫痫清颗粒组	1.28±0.12[c]	1.06±0.08[c]	0.88±0.15[c]	0.38±0.06[c]	0.70±0.09[c]	0.69±0.08[c]	0.63±0.09[c]	0.43±0.07[c]	0.31±0.05[c]
盐酸多奈哌齐组	1.16±0.13[c]	0.94±0.07[c]	0.94±0.16[c]	0.34±0.07[c]	0.77±0.13[c]	0.89±0.12[d]	0.67±0.12[c]	0.35±0.10[d]	0.29±0.09[d]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与对照组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$；d：与模型组比较，$P<0.01$。

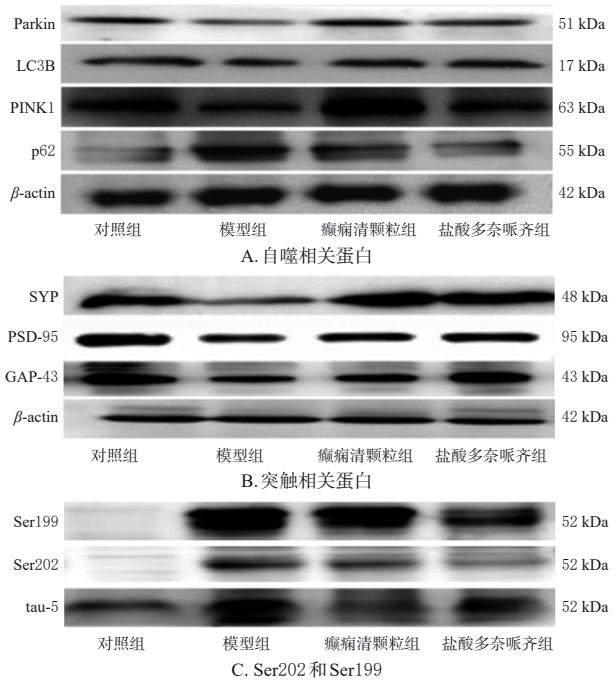


图5　各组小鼠脑组织中 PINK1、Parkin、LC3B、p62、SYP、PSD-45、GAP-43 和 Ser199、Ser202 蛋白表达电泳图

4　讨论

AD的主要临床表现为学习记忆能力下降和认知功能障碍。Y迷宫是评价小鼠短期记忆能力的一种方式，该实验利用了啮齿类动物对未探访区域的好奇心，同时避免了其他实验奖惩制度对小鼠空间识别记忆的影响。本研究结果显示，与对照组比较，P301S小鼠的自发交替反应率显著降低，说明其出现了记忆损伤，空间识别能力有所下降；经癫痫清颗粒干预后，P301S小鼠的空间识别记忆能力明显增强。本研究采用Morris水迷宫实验对P301S小鼠的长期空间学习记忆能力进行了评价，结果显示，癫痫清颗粒可缩短P301S小鼠的游泳潜伏期，增加其穿越平台的次数，且不影响小鼠的游泳速度。

神经细胞的线粒体功能障碍可引起细胞内三磷酸腺苷供应不足和活性氧释放增加，从而造成神经细胞损伤[11]。脑内神经细胞功能状况可通过HE染色法和尼氏染色法评估：当神经细胞功能受损时，神经细胞数量减少，细胞膜边缘破损，细胞核固缩，尼氏体减少或消失[11]。本研究结果显示，癫痫清颗粒可使P301S小鼠脑组织中神经细胞结构得以改善，尼氏体增多，提示该药对P301S小鼠脑组织受损神经细胞有一定的修复作用。由于神经细胞损伤和突触丢失与AD患者认知功能损害密切相关[11]，因此本研究检测了P301S小鼠脑组织中突触相关蛋白的表达情况。结果显示，与对照组比较，模型组小鼠脑组织中突触相关蛋白SYP、GAP-43、PSD-95的表达水平均显著降低；经癫痫清颗粒干预后，小鼠脑组织中上述突触相关蛋白的表达水平均显著升高，提示癫痫清颗粒可上调AD小鼠脑组织中突触相关蛋白的表达，从而促进其突触发育、改善其学习记忆障碍。

AD患者脑组织中的tau蛋白总量多于正常人，且可发生过度磷酸化。当tau蛋白发生过度磷酸化时，其与微管结合的能力减弱，从而导致神经细胞轴突运输受损，突触传递缺陷和功能障碍，神经细胞死亡，使得患者认知能力下降[1]。有研究指出，tau蛋白与AD患者认知功能障碍的关联较为密切[12]。因此，tau蛋白常作为AD的治疗靶点和观测指标。迄今为止，与AD有关的tau蛋白Ser和苏氨酸（threonine，Thr）磷酸化位点已超过30个，其中Ser404、Ser181、Thr231、Ser235、Ser199、Ser202、Thr205等均可作为抗AD研究的潜在靶点[13]。有研究指出，AT8可识别Ser202和Thr205上的双重磷酸化表位，该表位不受Ser199上第3个磷酸基团的影响；同时，AT8对包含人tau序列的Ser199/202或Ser205/208的2个双磷酸基序具有交叉影响[14]，故本研究选取AT8和Ser199、Ser202为指标，评价小鼠体内tau蛋白的磷酸化水平。结果显示，与对照组比较，P301S小鼠脑组织中AT8蛋白的表达水平和Ser199、Ser202蛋白的磷酸化水平均显著升高；经癫痫清颗粒干预后，小鼠脑组织中上述蛋白的表达/磷酸化水平均显著降低。

有证据表明，线粒体损伤可诱导tau蛋白磷酸化，磷酸化的tau蛋白与线粒体外膜的电压依赖型阴离子通道蛋白1相互作用，导致线粒体门控功能障碍，从而加重线粒体损伤[3]，而适度的线粒体自噬可对神经细胞发挥保护作用[15]。有研究指出，LC3B和p62蛋白的表达水平可反映自噬的高低[16]。PINK1/Parkin作为经典的线粒体自噬通路参与了AD患者和不同AD细胞/动物模型的线粒体自噬过程[17]。当线粒体受损时，PINK1可通过自磷酸化激活，并募集Parkin至线粒体外膜，招募泛素蛋白p62启动泛素系统；p62与LC3B结合后形成自噬小体，随后溶酶体包裹自噬小体形成自噬-溶酶体，最终被溶酶体降解，p62也随之降解[18]。有报告指出，激活线粒体自噬可改善PINK1/Parkin缺失导致的AD小鼠认知功能障碍，从而预防、缓解AD的发生、发展[19]。本研究结果表明，P301S小鼠脑组织中PINK1、Parkin、LC3B蛋白的表达较对照组显著下调，Ser199、Ser202蛋白磷酸化水平和AT8、p62蛋白的表达水平均显著升高，提示自噬溶酶体系统受阻，从而可能导致自噬受到抑制，受损线粒体无法得以清除，进一步促使tau蛋白过度磷酸化。经癫痫清颗粒干预后，P301S小鼠脑组织中PINK1、Parkin蛋白的表达均显著上调，LC3B-p62自噬小体被激活，tau蛋白的磷酸化水平显著降低。

综上所述，癫痫清颗粒可有效改善P301S小鼠的认知功能障碍，作用可能与介导线粒体自噬，减少tau蛋白过度磷酸化，上调脑组织中突触相关蛋白的表达，修复受损神经细胞有关。本研究后续将针对能量代谢、选择性自噬等其他线粒体途径，进一步阐释癫痫清颗粒治疗AD的潜在机制。

参考文献

[1] REDDY P H, YIN X L, MANCZAK M, et al. Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease[J]. Hum Mol Genet, 2018, 27(14): 2502-2516.

[2] WANG J N, ZHU S F, LU W P, et al. Varenicline improved laparotomy-induced cognitive impairment by restoring mitophagy in aged mice[J]. Eur J Pharmacol, 2022, 916: 174524.

[3] MORTON H, KSHIRSAGAR S, ORLOV E, et al. Defective mitophagy and synaptic degeneration in Alzheimer's disease: focus on aging, mitochondria and synapse[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 172: 652-667.

[4] KERR J S, ADRIAANSE B A, GREIG N H, et al. Mitophagy and Alzheimer's disease: cellular and molecular mechanisms[J]. Trends Neurosci, 2017, 40(3): 151-166.

[5] FANG E F, HOU Y J, PALIKARAS K, et al. Mitophagy inhibits amyloid-β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease[J]. Nat Neurosci, 2019, 22(3): 401-412.

[6] 张晨曦，董承瑜，胡鑫，等. 中药治疗阿尔茨海默病分子作用机制的研究进展[J]. 中草药，2022，53(13)：4132-4145.

[7] 康凯. 癫痫清颗粒对阿尔茨海默病模型小鼠Tau蛋白磷酸化及Aβ产生的影响[D]. 沈阳：辽宁中医药大学，2017.

[8] KSHIRSAGAR S, SAWANT N, MORTON H, et al. Mitophagy enhancers against phosphorylated tau-induced mitochondrial and synaptic toxicities in Alzheimer disease [J]. Pharmacol Res, 2021, 174: 105973.

[9] 齐越，贾冬，张筠，等. 癫痫清颗粒对海人藻酸致痫大鼠海马内氧化应激及MAPK信号通路的影响[J]. 中国现代医生，2021，59(26)：40-44.

[10] 齐越，李昭，侯侠，等. 癫痫清颗粒改善AD模型小鼠血脑屏障损伤的作用研究[J]. 中国药房，2022，33(9)：1062-1067.

[11] LIU H Q, AN N, WANG L Q, et al. Protective effect of Xingnaojing injection on ferroptosis after cerebral ischemia injury in MCAO rats and SH-SY5Y cells[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 301: 115836.

[12] KIM M S, MUN Y S, LEE S E, et al. Tau acetylation at K280 regulates tau phosphorylation[J]. Int J Neurosci, 2022: 1-5.

[13] OSSENKOPPELE R, VAN DER KANT R, HANSSON O. Tau biomarkers in Alzheimer's disease: towards implementation in clinical practice and trials[J]. Lancet Neurol, 2022, 21(8): 726-734.

[14] TUCKER A E, ALICEA PAUNETO C D M, BARNETT A M, et al. Chronic ethanol causes persistent increases in Alzheimer's tau pathology in female 3xTg-AD mice: a potential role for lysosomal impairment[J]. Front Behav Neurosci, 2022, 16: 886634.

[15] WANG S T, ZHANG K L, YAO Y C, et al. Autophagy and mitochondrial homeostasis during infection: a double-edged sword[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 738932.

[16] 张林，方德宇，柳春，等. 基于蛋白质组学研究葛根素逆转$A\beta_{1-42}$损伤SH-SY5Y细胞的机制[J]. 中国中药杂志，2021，46(14)：3650-3659.

[17] LI J, YANG D M, LI Z P, et al. PINK1/parkin-mediated mitophagy in neurodegenerative diseases[J]. Ageing Res Rev, 2023, 84: 101817.

[18] GLADKOVA C, MASLEN S L, SKEHEL J M, et al. Mechanism of parkin activation by PINK1[J]. Nature, 2018, 559(7714): 410-414.

[19] QUINN P M J, MOREIRA P I, AMBRÓSIO A F, et al. PINK1/PARKIN signalling in neurodegeneration and neuroinflammation[J]. Acta Neuropathol Commun, 2020, 8(1): 189.

（收稿日期：2022-12-27　修回日期：2023-05-18）

（编辑：张元媛）