

基于 CREB/Bcl-2 信号通路探究当归芍药散改善 A β 诱导的胆碱能神经元凋亡的作用机制

李 泽, 尹 芳, 杨 苗, 于文静, 罗荣司庆, 周金勇, 李 平, 宋祯彦*, 成绍武*

湖南中医药大学 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 探究当归芍药散对 β 淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 诱导的胆碱能神经元损伤的保护作用及相关机制。方法 以 30 μ mol/L A β ₂₅₋₃₅ 诱导基底前脑胆碱能神经元损伤模型, 给予 2.5%、5.0% 和 10.0% 当归芍药散含药血清进行干预, 采用 MTT 法检测细胞存活率; TUNEL 法和碘化丙啶 (PI) /Hoechst 荧光双染检测神经元凋亡情况; 采用胆碱乙酰转移酶 (choline acetyltransferase, ChAT) /磷酸化环磷腺苷效应元件结合蛋白 (phosphorylated cAMP-response element binding protein, p-CREB) 和 ChAT/剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 荧光双染检测当归芍药散对胆碱能神经元的抗凋亡情况; 采用 Western blotting 法检测 CREB/B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 信号通路相关蛋白的表达情况。结果 5.0% 和 10.0% 当归芍药散含药血清可显著增加 A β 诱导的胆碱能神经元存活率 ($P < 0.01$), 改善 A β 诱导的胆碱能神经元凋亡 ($P < 0.01$), 降低 Caspase-3 活化水平 ($P < 0.01$); 10% 当归芍药散含药血清能逆转 A β 诱导 p-CREB 水平的降低 ($P < 0.01$), 增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达 ($P < 0.05$)。结论 当归芍药散可能通过 CREB/Bcl-2 信号通路改善 A β 诱导的胆碱能神经元凋亡。

关键词: 当归芍药散; β 淀粉样蛋白; 胆碱能神经元; 细胞凋亡; 环磷腺苷效应元件结合蛋白; B 淋巴细胞瘤 2

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)08-2376-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.08.014

Mechanism of Danggui Shaoyao San on ameliorating A β -induced apoptosis of cholinergic neurons based on CREB/Bcl-2 signaling pathway

LI Ze, YIN Fang, YANG Miao, YU Wen-jing, LUO Rong-si-qing, ZHOU Jin-yong, LI Ping, SONG Zhen-yan, CHENG Shao-wu

Hunan Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To study the protective effect and mechanism of Danggui Shaoyao San (当归芍药散, DSS) on amyloid β -protein (A β)-induced cholinergic neuron injury. **Methods** Basal forebrain neuron injury model was induced by 30 μ mol/L A β ₂₅₋₃₅, 2.5%, 5.0% and 10.0% DSS containing serum were given for intervention, MTT assay was used to detect cell survival rate; TUNEL and PI/Hoechst fluorescence staining were used to detect neuronal apoptosis; Choline acetyltransferase (ChAT)/phosphorylated cAMP-response element binding protein (p-CREB) and ChAT/cleaved cysteine-aspartate protease-3 (Caspase-3) fluorescence double staining were used to detect the anti-apoptotic effect of DSS on cholinergic neurons; Western blotting was used to detect the expressions of CREB/B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) signaling pathway related proteins. **Results** DSS serum (5.0% and 10.0%) significantly increased the cell survival rate of A β -injured cholinergic neurons ($P < 0.01$), improved A β -induced apoptosis ($P < 0.01$) and decreased activation level of Caspase-3 ($P < 0.01$). DSS serum (10%) reversed A β -induced decrease in p-CREB level ($P < 0.01$) and increased expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 ($P < 0.05$). **Conclusion** DSS may ameliorate A β -induced apoptosis of cholinergic neurons through CREB/Bcl-2 signaling pathway.

收稿日期: 2021-12-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774129); 国家自然科学基金资助项目 (82004184); 湖南省教育厅科研基金重点项目 (21A0241); 2019 年湖湘高层次人才聚集工程-创新人才 (2019RS1064); 2021 年度湖南省大学生创新创业训练计划项目 (S202110541049)

作者简介: 李 泽, 硕士, 研究方向为中西医结合神经退行性疾病防治研究。E-mail: 769428761@qq.com

*通信作者: 宋祯彦, 硕士, 高级实验师, 主要从事中西医结合神经退行性疾病防治研究。E-mail: songzhenyan2013@hnu.cn
成绍武, 博士, 教授, 研究方向为中西医结合防治神经退行性疾病。E-mail: scheng@hnu.cn

Key words: Danggui Shaoyao San; amyloid β -protein; cholinergic neuron; apoptosis; cAMP-response element binding protein; B-cell lymphoma 2

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种与年龄相关的神经退行性疾病, 其特征为记忆力的进行性丧失和高级认知功能的恶化。目前, 导致 AD 进行性记忆丧失的具体机制仍不清楚^[1]。在许多关于 AD 发病机制的假说中, 胆碱能假说是唯一将记忆丧失与特定神经元联系在一起的假说。基底前脑胆碱能神经元是记忆功能的基础, 无论是 β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 富集的老年斑和神经原纤维缠结的特征性改变, 还是突触的炎症, 最终都会汇集到 AD 广泛的基底前脑胆碱能神经元丢失^[2]。环磷腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 是参与大脑发育、神经存活和神经发生的主要转录因子, 大量的研究发现 CREB 介导的信号通路在记忆的形成过程和 AD 的发展过程中发挥重要作用^[3]。研究发现, 激活 CREB 途径能抑制胆碱能神经元凋亡, 改善 AD 大鼠的记忆障碍^[4]。针对胆碱能系统的 AD 药物干预也主要作用于 CREB 相关通路^[5], 美国食品和药物管理局批准的 AD 胆碱酯酶抑制剂类药物如多奈哌齐、利斯的明等能增加乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 水平, 但它们的疗效相对较低, 且存在呕吐、腹泻、头晕等不良反应^[6]。当归芍药散出自张仲景《金匮要略》, 经临床验证其是治疗 AD 的有效方剂^[7-8], 实验研究证明该方可通过抑制神经炎症、抑制神经元凋亡、抗氧化等途径发挥神经保护作用, 并能改善 AD 动物模型的认知功能障碍^[9-12]。已有研究表明, 该方的君药当归提取物当归多糖可通过激活脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF/酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinase B, TrkB) /CREB 途径提高 Ach 和胆碱乙酰转移酶 (choline acetyltransferase, ChAT) 水平改善 AD 大鼠的记忆障碍^[13]。本研究以 A β ₂₅₋₃₅ 诱导基底前脑神经元构建 AD 细胞模型, 探究当归芍药散含药血清对 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的胆碱能神经元损伤的保护作用及机制

1 材料

1.1 动物

SPF 级妊娠 SD 大鼠 5 只, 体质量 380~420 g, 7 周龄; SPF 级雄性 SD 大鼠 10 只, 体质量 220~260 g, 5 周龄, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限

公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2013-0004。动物饲养于湖南中医药大学实验动物中心, 室内温度 20~24 °C, 相对湿度 35%~45%, 室内光线 12 h 明暗交替。动物实验通过湖南中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 LL-2020071501)。

1.2 药品与试剂

A β ₂₅₋₃₅ (批号 A4559)、Forskolin (批号 F6886)、ChAT 鼠抗 (批号 MAB5270)、山羊抗兔二抗 (批号 AP132P)、山羊抗鼠二抗 (批号 AP124) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; MTT (批号 M8180)、胰蛋白酶-EDTA 消化液 (批号 T1320) 购自北京索莱宝科技有限公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 D806645) 购自上海麦克林生化科技有限公司; B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 兔抗 (批号 ab194583) 购自英国 Abcam 公司; 剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 兔抗 (批号 9661)、CREB 兔抗 (批号 9197)、p-CREB 兔抗 (批号 9198)、 β -actin 鼠抗 (批号 3700) 购自美国 CST 公司; 驴抗鼠荧光二抗 Alexa Fluor 488 (批号 A-10680)、驴抗兔荧光二抗 Cy3 (批号 A10520)、Hoechst 33258 (批号 H1398)、红色荧光碘化丙啉 (PI) 染料 (批号 P1304MP) 购自美国 Invitrogen 公司; Triton X-100 (批号 9002-93-1)、5 $\times$ 上样缓冲液 (批号 P0015L) 购自碧云天公司; RIPA 裂解液 (批号 01408/504074) 购自康为世纪生物科技有限公司; ProLong™玻璃抗淬灭封片剂 (含 NucBlue™染色剂, 批号 P36983)、BCA 蛋白定量分析试剂盒 (批号 NCI3227CH) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 仪器

ChemiDoc XRS+化学发光凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司); Medifuge™小型台式离心机、Series 8000 WJ CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Cytation3 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); A1+共聚焦激光显微镜 (日本 Nikon 公司); AxioVert.A1 倒置荧光显微镜 (德国 Zeiss 公司)。

2 方法

2.1 当归芍药散含药血清制备

按照本课题组前期研究方法, 当归芍药散采用水提法进行提取, 通过旋转蒸馏浓缩和冻干制备冻

干粉并进行质量控制,以阿魏酸、芍药苷、藁本内酯、白术内酯 I 和乙酰泽泻醇 B 为对照品鉴定当归芍药散冻干粉主要成分含量,当归芍药散提取液中阿魏酸、芍药苷、藁本内酯、白术内酯 I 和乙酰泽泻醇 B 的质量分数分别为 148.2、5320、400.7、7.2 和 26.7 mg/kg^[14]。100 g 生药制备冻干粉为 12.6 g,根据动物体质量配制质量浓度为生药 2 g/mL (冻干粉 0.252 g/mL) 的口服液。取雄性 SD 大鼠 10 只随机分为当归芍药散含药血清组和对照组,每组 5 只,当归芍药散含药血清组大鼠 ig 当归芍药散口服液(生药 24 g/kg),对照组 ig 等体积蒸馏水,1 次/d,连续 7 d,末次给药 2 h 后 ip 10%水合氯醛(3.5 mL/kg)麻醉,暴露腹主动脉,用负压采血管采集全血 5 mL 至无抗凝剂的普通采血管中,静置过夜,3000 r/min 离心 10 min,收集上清,经 0.22 μm 滤膜滤过,−80 °C 冻存备用。

2.2 胆碱能神经元的提取

原代胆碱能神经元取自胚胎期 16~18 d 的 SD 大鼠,妊娠大鼠 ip 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后,断头处死。取出胚胎,解剖分离基底前脑,放入解离缓冲液中(HBSS、10 mmol/L HEPES、1%青霉素/链霉素)。组织用 0.25%胰蛋白酶消化 15 min 后,加入脱氧核糖核酸酶/胰蛋白酶抑制剂溶液研磨分解,台盼蓝筛选活细胞。神经元以 $1.5 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度于培养皿中培养。培养液含有 2% B-27 和 1% 青霉素/链霉素,培养环境 37 °C、5% CO₂。以 5 μmol/L 阿糖胞苷作用 48 h 抑制非神经元细胞生长。

2.3 Aβ 诱导胆碱能神经元模型的构建

Aβ₂₅₋₃₅ 用 PBS 溶液配制成 100 mg/mL 的母液,于 37 °C 老化 48 h。提取基底前脑神经元细胞培养 7 d 后,在含有不同浓度 Aβ₂₅₋₃₅ (15、30、60 μmol/L) 的培养基中培养 16 h,构建 Aβ 诱导模型。

2.4 MTT 检测细胞存活率

胆碱能神经元以 $5 \times 10^3/\text{孔}$ 接种于 96 孔板中,设置对照组、模型组和当归芍药散(2.5%、5.0%、10.0%)组,模型组给予 30 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 处理 16 h,各给药组在构建 Aβ 诱导模型后,分别加入 2.5%、5.0%、10.0%当归芍药散含药血清处理 24 h,对照组加入不含药物的培养基。吸弃孔中培养液,每孔加入含 5 mg/mL MTT 的 DMEM 培养基,同时设置调零孔,继续培养 4 h,弃去培养液,每孔加入 100 μL DMSO,摇匀后采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

2.5 神经元凋亡的测定

胆碱能神经元以 $5 \times 10^4/\text{孔}$ 接种于 12 孔板中,模型组用 30 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 处理 16 h,当归芍药散(5%、10%)组在构建 Aβ 诱导模型后,分别加入 5%、10%当归芍药散含药血清处理 24 h。吸弃培养液,用预冷的含 5%冰醋酸的甲醇于 4 °C 固定 45 min, PBS 洗涤 3 次,用 3%牛血清白蛋白于室温封闭 1 h;用 Hoechst 33258 和 PI 染色以及 TUNEL 检测细胞凋亡。采用 A1+共聚焦激光显微镜和 AxioVert.A1 倒置荧光显微镜观察细胞凋亡特征并拍照。

2.6 当归芍药散含药血清对 Aβ 诱导的胆碱能神经元 Caspase-3 活化的影响

2.6.1 免疫荧光检测胆碱能神经元 ChAT 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达 在 12 孔板中放置圆形盖玻片,接种 5×10^4 个细胞使细胞爬片,模型组用 30 μmol/L Aβ₂₅₋₃₅ 处理 16 h,5%、10%当归芍药散组在构建 Aβ 诱导模型后,分别加入 5%、10%当归芍药散含药血清处理 24 h。按“2.5”项下方法固定细胞并封闭,PBS 清洗 3 次,分别加入 ChAT 鼠抗(1:100)和 cleaved Caspase-3 兔抗(1:200),4 °C 孵育过夜,PBS 清洗 3 次,分别加入驴抗鼠荧光二抗 Alexa Fluor 488 (1:600)、驴抗兔 Cy3 (1:600),室温孵育 1 h;PBS 洗涤 3 次,从孔板中捞出圆形盖玻片,反向扣于载玻片上,用抗淬灭封片剂封片固定,采用 A1+共聚焦激光显微镜观察和拍照。

2.6.2 图像获取与计数 ChAT/Caspase-3 双染色免疫荧光实验采用基底前脑细胞重复培养 3 次。对于每次重复,每个条件至少分析 2 个玻片。细胞计数时,每张玻片随机获得 10 个目标区域(20×物镜,每个视野含有约 40~50 个细胞)。不同阶段 A1+共聚焦激光显微镜观察,每个通道采集参数设置(增益、曝光时间、激光强度)保持固定。计数具有完整的细胞核、共定位胞质 cleaved Caspase-3 和 ChAT 的细胞。最终结果显示 cleaved Caspase-3 阳性细胞与 ChAT 阳性神经元或 ChAT 阴性神经元的百分比。

2.6.3 Western blotting 检测胆碱能神经元 cleaved Caspase-3 蛋白表达 按“2.6.1”项下方法分组并处理细胞,收集细胞,加入含蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液匀浆,4 °C 孵育 30 min,4 °C、12 000 r/min 离心 20 min,取上清。用 BCA 蛋白定量分析试剂盒测定上清液的总蛋白含量。加入 5×上样缓冲液,

100 °C 金属浴 20 min, 使蛋白变性, 于 -80 °C 保存。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶, 于室温封闭 1 h; 分别加入兔抗 cleaved Caspase-3 (1:1000) 和鼠抗 β -actin (1:5000), 4 °C 孵育过夜; 吸弃一抗, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 孵育对应二抗, 37 °C 孵育 1 h; 吸弃二抗, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入显影液, 采用凝胶成像仪成像分析。

2.7 当归芍药散含药血清对 A β 诱导的胆碱能神经元 CREB/Bcl-2 通路相关蛋白表达的影响

2.7.1 免疫荧光检测胆碱能神经元 ChAT 和 p-CREB 蛋白表达 在 12 孔板中放置圆形盖玻片, 接种 5×10^4 个细胞使细胞爬片, 模型组用 30 μ mol/L A β_{25-35} 处理 16 h, Forskolin 组和 10% 当归芍药散组在构建 A β 诱导模型后, 分别加入 10 μ mol/L Forskolin、10% 当归芍药散含药血清处理 24 h。吸弃培养液, 用预冷的含 5% 冰醋酸的甲醇于 4 °C 固定 45 min, PBS 洗涤 3 次, 用 3% 牛血清白蛋白于室温封闭 1 h; PBS 清洗 3 次, 分别加入 ChAT 鼠抗 (1:100) 和 p-CREB 兔抗 (1:200), 4 °C 孵育过夜, PBS 清洗 3 次, 分别加入驴抗鼠荧光二抗 Alexa Fluor 488 (1:600)、驴抗兔 Cy3 (1:600), 室温孵育 1 h; PBS 洗涤 3 次, 从孔板中捞出圆形盖玻片, 反向扣于载玻片上, 用抗淬灭封片剂封片固定, 采用 A1+ 共聚焦激光显微镜观察和拍照。

2.7.2 Western blotting 检测胆碱能神经元 p-CREB、CREB 和 Bcl-2 蛋白表达 按“2.7.1”项下方法分组并处理细胞, 提取细胞总蛋白, 蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶, 于室温封闭 1 h; 分别加入鼠抗 p-CREB (1:1000)、兔抗 CREB (1:1000)、兔抗 Bcl-2 (1:1000) 和鼠抗 β -actin (1:5000), 4 °C 孵育过夜; 吸弃一抗, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 孵育对应二抗, 37 °C 孵育 1 h; 吸弃二抗, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入显影液, 采用凝胶成像仪成像分析。

2.8 统计数据

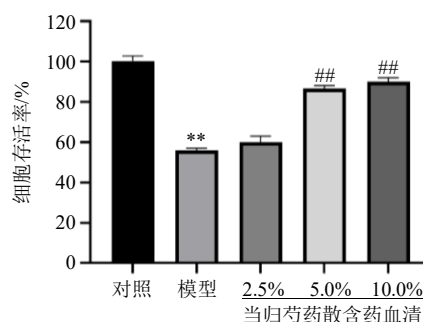
采用 SPSS 26.0 软件进行采用单因素方差分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 当归芍药散含药血清对 A β 诱导的胆碱能神经元细胞存活率的影响

采用 MTT 检测不同浓度 A β_{25-35} (15、30、60

μ mol/L) 作用于胆碱能神经元细胞的存活率, 细胞存活率分别为 82%、51%、40%, 因此选取 30 μ mol/L A β_{25-35} 作为 A β 诱导胆碱能神经元损伤模型浓度。当归芍药散含药血清对 A β 损伤胆碱能神经元细胞存活率的影响如图 1 所示, 2.5%、5.0%、10.0% 当归芍药散作用于 A β 损伤胆碱能神经元的细胞存活率分别为 60%、87% 和 92%, 与模型组相比, 5.0%、10.0% 当归芍药散组胆碱能神经元细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$), 提示当归芍药散能够提升 A β 损伤胆碱能神经元的细胞存活率, 且呈剂量相关性。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures

图 1 当归芍药散含药血清对 A β 诱导的胆碱能神经元细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

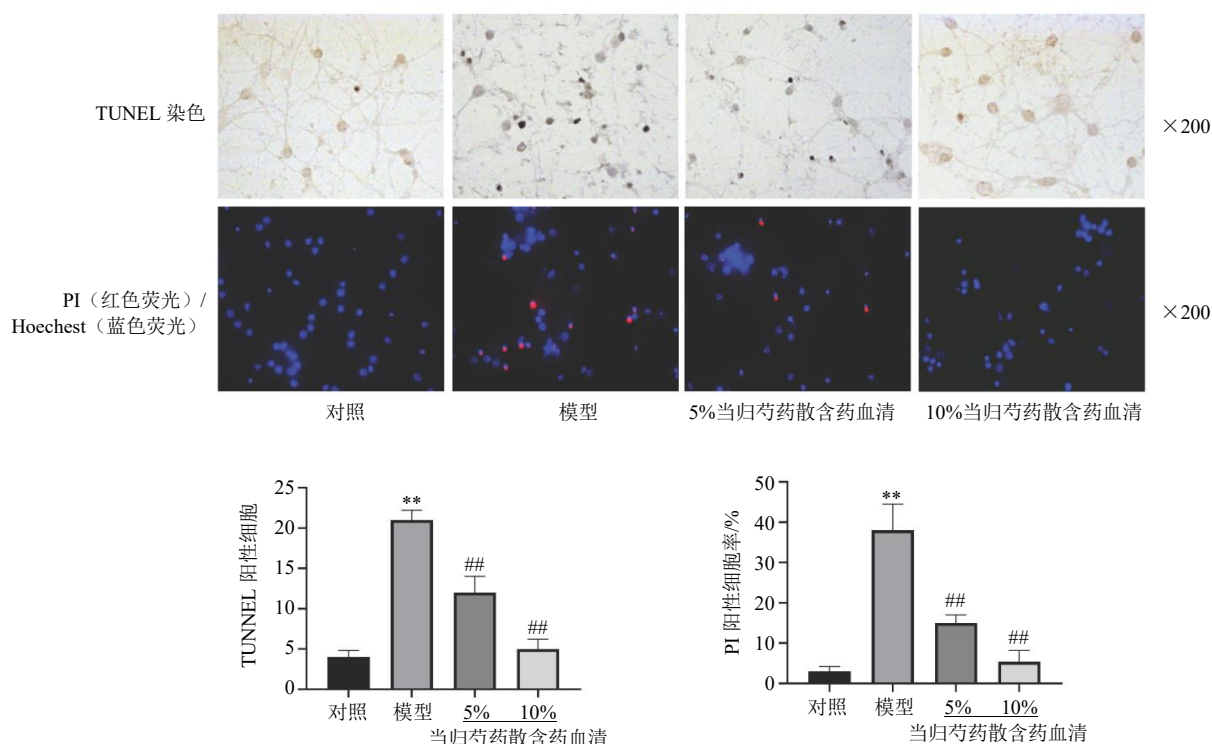
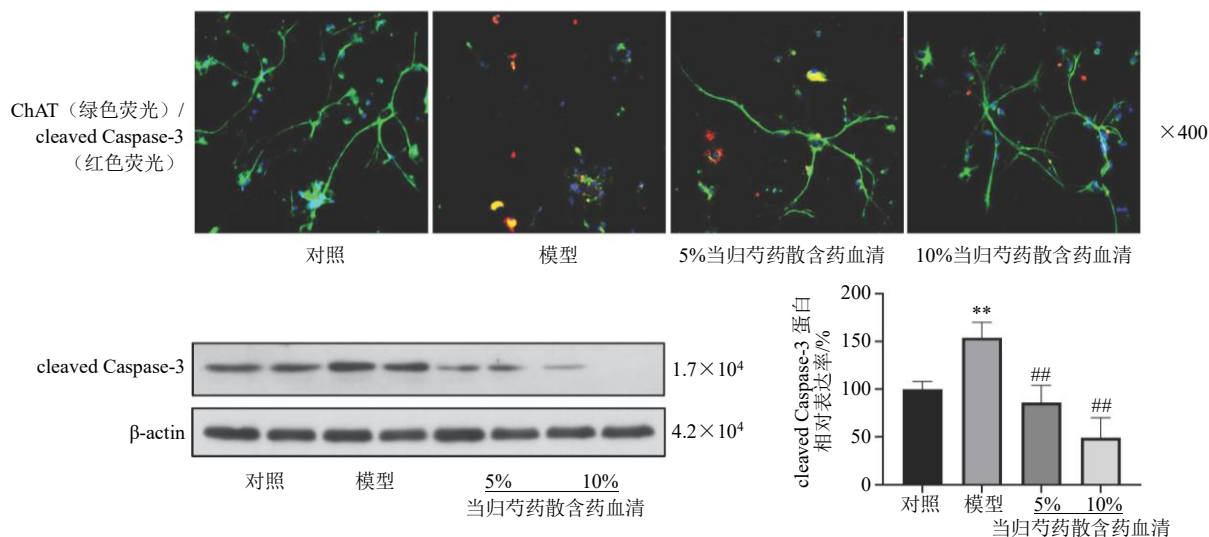
Fig. 1 Effect of Danggui Shaoyao San serum on cell viability of A β -induced cholinergic neurons ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 当归芍药散含药血清改善 A β 诱导的神经元凋亡

TUNEL 染色和 PI/Hoechst 细胞凋亡染色结果见图 2, 与模型组相比, 5%、10% 当归芍药散能够明显减少神经细胞凋亡数 ($P < 0.01$), PI 阳性细胞率也显著降低 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性, 表明当归芍药散含药血清能抑制 A β 诱导的神经元凋亡。

3.3 当归芍药散含药血清对 A β 诱导的胆碱能神经元 Caspase-3 活化的影响

为了进一步明确当归芍药散是否对胆碱能神经元凋亡有抑制作用, 采用胆碱能神经元标志物 ChAT 与凋亡标志物 cleaved Caspase-3 进行免疫荧光双染。如图 3 所示, A β 毒性作用下基底前脑神经元 ChAT 表达明显减少, 神经元相连的胞体崩解破碎, cleaved Caspase-3 表达明显增加; 给予当归芍药散含药血清干预后, 神经元形态结构趋于完整, ChAT 表达明显增加, cleaved Caspase-3 表达明显减少。进一步检测了基底前脑神经元 cleaved Caspase-3 表达情况, 结果如图 3 所示, 与对照组相比, 模

图 2 当归芍药散含药血清改善 $A\beta$ 诱导的神经元凋亡Fig. 2 Danggui Shaoyao San serum improved $A\beta$ -induced cholinergic neuronal apoptosis图 3 当归芍药散含药血清减少 $A\beta$ 诱导的胆碱能神经元 cleaved Caspase-3 蛋白表达Fig. 3 Danggui Shaoyao San serum reduced cleaved Caspase-3 protein expression in $A\beta$ -induced cholinergic neurons

型组促凋亡蛋白 cleaved Caspase-3 表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 5%、10% 当归芍药散含药血清能够显著降低 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 且呈剂量相关性。

3.4 当归芍药散含药血清通过 CREB/Bcl-2 通路抑制 $A\beta$ 诱导的胆碱能神经元凋亡

ChAT/p-CREB 荧光双染结果如图 4 所示, $A\beta$ 毒性作用下基底前脑神经元胞体内 p-CREB 表达明

显减少, 给予腺苷酸环化酶激动剂 Forskolin 后 p-CREB 表达显著增加, 10% 当归芍药散含药血清组 p-CREB 表达显著增加, 与 Forskolin 效果类似。进一步检测 CREB/Bcl-2 通路相关蛋白表达情况, 发现与对照组相比, 模型组 p-CREB 和 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, Forskolin 和 10% 当归芍药散含药血清组 p-CREB 和 Bcl-2 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。

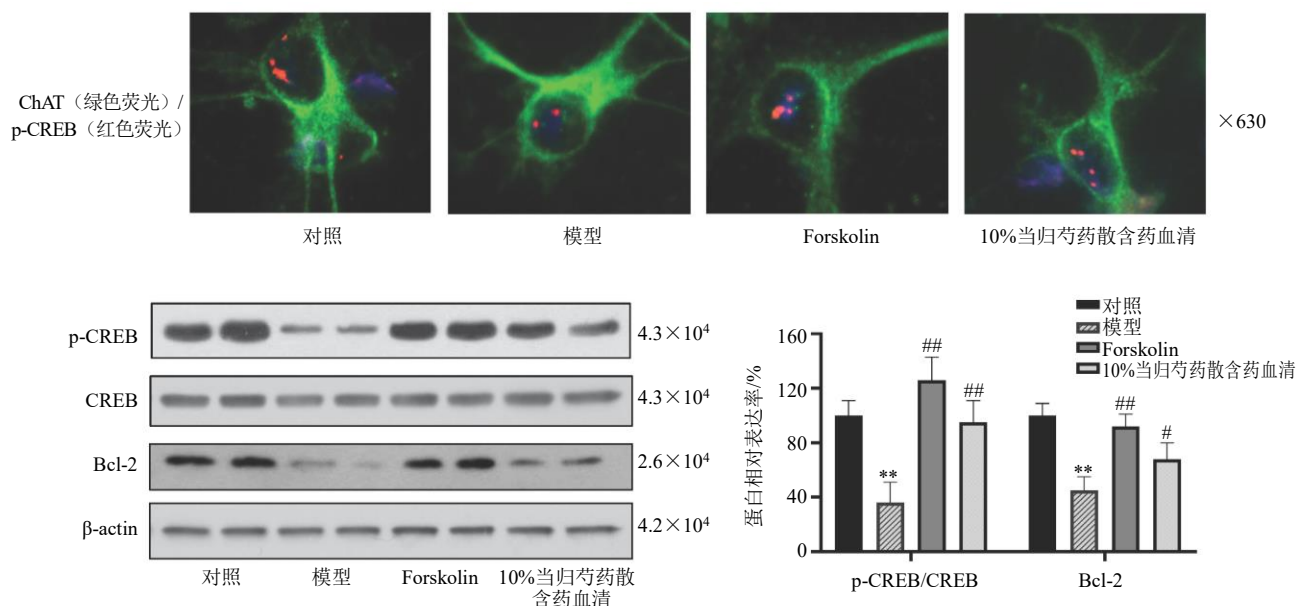


图 4 当归芍药散含药血清对 A β 诱导的胆碱能神经元 CREB/Bcl-2 通路的影响

Fig. 4 Effect of Danggui Shaoyao San serum on CREB/Bcl-2 pathway of A β -induced cholinergic neurons

4 讨论

中药含药血清是方剂药理学细胞实验常用的媒介,当归芍药散全方由当归、芍药、川芎、茯苓、白术和泽泻 6 味中药组成,其中主要药效成分有单萜苷类成分芍药苷和芍药内酯苷,机酸类成分阿魏酸、三萜类成分 24-乙酰泽泻醇 A 和 24-乙酰泽泻醇 B,以及白术内酯 I 和茯苓酸。本课题组前期已有研究用 HPLC-MS/MS 技术测定当归芍药散提取物和含药血清中阿魏酸、芍药苷和茯苓酸的含量,用于该方提取物及含药血清的质量控制^[15],并验证了当归芍药散含药血清具有减少氧化损伤、抗神经元凋亡和神经保护作用^[10-11]。因此,本研究以此为基础来验证当归芍药散含药血清改善 A β 诱导的胆碱能神经元凋亡的作用机制。

越来越多的证据表明 A β 的过度积累是导致 AD 的最重要的病理事件,A β 具有直接的神经毒性,同时 A β 的过度沉积会引起神经元炎症反应间接损害神经元,最终表现为神经元凋亡^[16]。胆碱能功能障碍是 AD 患者记忆加工障碍的主要原因之一。ACh 是一种神经递质,在组织内迅速被胆碱酯酶破坏。在神经细胞中,ACh 由胆碱和乙酰辅酶 A 在 ChAT 的催化作用下合成,ChAT 是参与 ACh 合成的关键胆碱能标记物^[17]。研究认为,人体内 ACh 含量增多与阿尔兹海默病的症状改善显著相关,ACh 的维持对正常功能至关重要,AD 患者中 ChAT 的缺陷和酶活性降低会导致大脑中 ACh 水平显著降

低^[18]。过表达 ChAT 的人类神经干细胞可以通过释放 ACh 恢复胆碱能神经元功能,同时能恢复小胶质细胞功能,减少 A β 沉积,从而改善 AD 动物的认知功能^[19]。本研究结果表明,A β 毒性作用下可显著降低基底前脑神经元 ChAT 蛋白表达,同时诱发神经元凋亡,提示所观察到的神经元凋亡是胆碱能功能障碍所致。而当归芍药散含药血清可明显减轻 A β 介导的胆碱能功能障碍,发挥与腺苷酸环化酶激活剂 Forskolin 类似的作用。

CREB 介导的转录可由膜受体刺激并激活细胞内通路将信号传递到细胞核来启动,被认为是学习和记忆所需的分子开关,CREB 磷酸化被认为是导致转录激活的原因,可产生脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 等细胞因子,在突触可塑性和认知功能中起关键作用^[20]。CREB 磷酸化过程受损是神经退行性疾病的一个已知病理因素,通过促进凋亡的过程触发海马和皮层神经元的丢失^[21]。CREB 的抑制会影响各种记忆测试中的行为表现。相反,CREB 的过度表达抑制了神经细胞凋亡,并通过激活 CREB/神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 信号通路恢复胆碱能和抗凋亡活性,从而改善东莨菪碱毒性所致的小鼠认知功能障碍^[22]。因此在与认知相关的大脑区域中通过药物干预诱导 CREB 磷酸化,可能成为开发治疗 AD 药物的新途径。Bcl-2 的上游启动子区域有 1 个 CREB 结合位点,该位点已被证明是由 CREB 的激

活引起 B 细胞活化来挽救细胞凋亡, 说明 CREB/Bcl-2 通路具有抗凋亡作用^[23]。本研究结果显示, 当归芍药散含药血清显著增加了 CREB 在基底前脑神经元的磷酸化水平。此外, 与对照组相比, 当归芍药散含药血清治疗后基底前脑神经元抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达显著增加, 凋亡相关蛋白 cleaved Caspase-3 的表达显著降低。TUNEL 染色实验表明, 当归芍药散含药血清治疗后, 基底前脑神经元凋亡明显减少。这些结果表明当归芍药散含药血清可能通过激活 CREB 磷酸化和 CREB/Bcl-2 通路抑制神经元凋亡, 从而发挥胆碱能神经元保护作用。

综上, 本研究证明了当归芍药散含药血清对 A β 所致基底前脑神经元胆碱能系统损伤具有保护作用, 其机制可能是激活 CREB/Bcl-2 信号通路和抑制凋亡相关通路, 从而对胆碱能系统发挥保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Scheltens P, Blennow K, Breteler M M B, et al. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2016, 388(10043): 505-517.
- [2] Hampel H, Mesulam M M, Cuello A C, et al. Revisiting the cholinergic hypothesis in Alzheimer's disease: Emerging evidence from translational and clinical research [J]. *J Prev Alz Dis*, 2018: 1-14.
- [3] Amidfar M, de Oliveira J, Kucharska E, et al. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Life Sci*, 2020, 257: 118020.
- [4] Wang K, Sun W M, Zhang L L, et al. Oleanolic acid ameliorates A β ₂₅₋₃₅ injection-induced memory deficit in Alzheimer's disease model rats by maintaining synaptic plasticity [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2018, 17(5): 389-399.
- [5] Sharma K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (review) [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(2): 1479-1487.
- [6] Glinz D, Gloy V L, Monsch A U, et al. Acetylcholinesterase inhibitors combined with memantine for moderate to severe Alzheimer's disease: A meta-analysis [J]. *Swiss Med Wkly*, 2019, 149: w20093.
- [7] Fu X, Wang Q H, Wang Z B, et al. Danggui-Shaoyao-San: New hope for Alzheimer's disease [J]. *Aging Dis*, 2015, 7(4): 502-513.
- [8] Kim Y, Cho S H. Danggui-Shaoyao-San for dementia: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine*, 2020, 99(4): e18507.
- [9] 李富周, 贺春香, 余婧萍, 等. 当归芍药散改善 APP_{swE}/PS1 Δ E9 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.
- [10] 贺春香, 余婧萍, 李富周, 等. 当归芍药散含药血清对 A β ₁₋₄₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞周期和凋亡的影响 [J]. 中成药, 2020, 42(11): 2875-2882.
- [11] 余婧萍, 贺春香, 成绍武, 等. 当归芍药散通过调控 NF- κ B 炎性通路改善 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] 宋祯彦, 夏小芳, 王玉珂, 等. 当归芍药散通过调控 NLRP3/Caspase-1 信号通路抑制 AD 大鼠神经炎症的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(19): 1-8.
- [13] Du Q, Zhu X Y, Si J R. *Angelica* polysaccharide ameliorates memory impairment in Alzheimer's disease rat through activating BDNF/TrkB/CREB pathway [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2020, 245(1): 1-10.
- [14] Song Z Y, Li F Z, He C X, et al. In-depth transcriptomic analyses of LncRNA and mRNA expression in the hippocampus of APP/PS1 mice by Danggui-Shaoyao-San [J]. *Aging*, 2020, 12(23): 23945-23959.
- [15] 宋祯彦, 何攀, 李富周, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定当归芍药散提取物和含药血清中 3 种活性成分含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(1): 92-99.
- [16] Gallardo G, Holtzman D M. Amyloid- β and tau at the crossroads of Alzheimer's disease [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1184: 187-203.
- [17] Grossberg S. Acetylcholine neuromodulation in normal and abnormal learning and memory: Vigilance control in waking, sleep, autism, *Amnesia* and Alzheimer's disease [J]. *Front Neural Circuits*, 2017, 11: 82.
- [18] Stanciu G D, Luca A, Rusu R N, et al. Alzheimer's disease pharmacotherapy in relation to cholinergic system involvement [J]. *Biomolecules*, 2019, 10(1): 40.
- [19] Park D, Choi E K, Cho T H, et al. Human neural stem cells encoding ChAT gene restore cognitive function via acetylcholine synthesis, A β elimination, and neuroregeneration in APP_{swE}/PS1 Δ E9 mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 3958.
- [20] Scott B R. Cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation: A mechanistic marker in the development of memory enhancing Alzheimer's disease therapeutics [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(6): 705-714.
- [21] Gong Y H, Chen J J, Jin Y Z, et al. GW9508 ameliorates cognitive impairment via the cAMP-CREB and JNK pathways in APP_{swE}/PS1 Δ E9 mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Neuropharmacology*, 2020, 164: 107899.
- [22] Sohn E, Lim H S, Kim Y J, et al. *Elaeagnus glabra* f. oxyphylla attenuates scopolamine-induced learning and memory impairments in mice by improving cholinergic transmission via activation of CREB/NGF signaling [J]. *Nutrients*, 2019, 11(6): 1205.
- [23] Wilson B E, Mochon E, Boxer L M. Induction of bcl-2 expression by phosphorylated CREB proteins during B-cell activation and rescue from apoptosis [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(10): 5546-5556.

[责任编辑 李亚楠]