

基于转录组学探讨酸枣仁皂苷 A 改善阿尔茨海默病小鼠认知功能障碍的机制

王 翠^{1*}, 肖洪贺², 闻彩名², 赵宇萌², 田 雨², 刘 月¹, 杨静娴²

1. 大连市中心医院 神经内科, 辽宁 大连 116089

2. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116620

摘要: **目的** 运用转录组学测序 (transcriptome sequencing, RNA-Seq) 和生物信息学技术对酸枣仁皂苷 A (jujuboside A, JuA) 改善淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP)/早老蛋白 1 (presenilin 1, PS1) 双转基因小鼠认知功能的潜在机制进行分析, 并采用 qRT-PCR 与 Western blotting 实验进行验证。 **方法** 7 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠随机分为模型组及 JuA 低、中、高剂量 (5、10、20 mg/kg, ip) 组和多奈哌齐 (0.65 mg/kg, ig) 组, 每日给药 1 次, 连续 21 d。采用 Morris 水迷宫实验检测小鼠的学习和记忆能力; 苏木素-伊红 (HE)、尼氏染色法检测脑组织病理损伤; RNA-Seq 检测小鼠海马组织差异表达基因, 对差异基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 筛选 JuA 治疗阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 可能干预的信号通路, 并对其中的核心富集基因进行 qRT-PCR 与 Western blotting 实验验证。 **结果** 水迷宫实验结果显示, JuA 组小鼠的学习记忆能力显著高于模型组 ($P < 0.05$ 、 0.01), 高剂量组作用最佳。HE 和尼氏染色结果显示, 与模型组比较, JuA 组小鼠皮层和海马区神经元损伤明显减轻, 尼氏体数量明显增多 ($P < 0.01$), 说明 JuA 对 AD 小鼠脑组织有明显保护作用。RNA-Seq 分析结果显示, 模型组相较于对照组脑中明显上调的基因有 218 个, 下调 123 个; JuA 组相较于模型组明显上调基因有 66 个, 下调 28 个; 模型组中包括葡萄糖激酶 (glucokinase, Gck) 在内的 5 个差异基因经 JuA 干预后表达趋势被逆转。GO 分析发现 JuA 治疗后差异基因主要富集在离子转运调控、细胞骨架、核受体活性等方面。KEGG 通路分析发现 JuA 治疗后主要富集于 2 型糖尿病、细胞黏附因子、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 信号通路; 筛选模型组 vs 对照组、JuA 高剂量组 vs 模型组共同调节的与 JuA 治疗 AD 相关性最高的前 10 条通路, 发现主要集中于代谢疾病和炎症通路; Gck 基因在这些通路上高频出现, 说明其可能是 JuA 干预 AD 的重要靶点之一, qRT-PCR 与 Western blotting 实验也验证了对 Gck 基因的筛选分析结果。 **结论** JuA 能明显减轻 AD 小鼠脑组织病理损伤, 提高学习记忆能力, 其作用机制可能与调控炎症反应与代谢紊乱有关, 其中上调 Gck mRNA 与蛋白表达维持葡萄糖稳态可能是 JuA 抗 AD 的重要机制之一。

关键词: 酸枣仁皂苷 A; 阿尔茨海默病; 认知功能障碍; 转录组学测序; 葡萄糖激酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)24-8094-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.014

Mechanism of jujuboside A on improving cognitive function of mice with Alzheimer's disease based on transcriptomic

WANG Cui¹, XIAO Hong-he², WEN Cai-ming², ZHAO Yu-meng², TIAN Yu², LIU Yue¹, YANG Jing-xian²

1. Department of Neurology, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian 116089, China

2. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116620, China

Abstract: Objective To analyze potential mechanism of jujuboside A (JuA) on improving cognitive function of amyloid precursor protein (APP)/presenilin 1 (PS1) double transgenic mice using transcriptome sequencing (RNA-Seq) and bioinformatics techniques, and verify by qRT-PCR and Western blotting. **Method** Seven month-old APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into model group, JuA low-, medium-, high-dose (5, 10, 20 mg/kg, ip) groups and donepezil (0.65 mg/kg, ig) group. The drug was administered once a day for 21 consecutive days. Morris water maze experiment was used to detect the learning and memory abilities of mice; HE and Nissl staining methods were used to detect pathological damage in brain tissue; RNA-Seq was used to detect the

收稿日期: 2023-07-20

基金项目: 大连市中心医院登峰计划项目 (2022ZZ201); 辽宁省教育厅一般项目 (L201945)

*通信作者: 王 翠 (1972—), 女, 主任医师, 博士, 研究方向为神经变性疾病基础与临床。Tel: 15509850795 E-mail: sjnktg@163.com

differentially expressed genes in mouse hippocampus, gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed on the differentially expressed genes, and the signal pathways that JuA might interfere with Alzheimer disease (AD) were screened, and the core enrichment genes were verified by qRT-PCR and Western blotting.

Results The results of the water maze experiment showed that the learning and memory abilities of mice in JuA group were significantly higher than those of model group ($P < 0.05, 0.01$), and the high-dose group had the best effect. HE and Nissl staining results showed that compared with model group, the neuronal damage in cortex and hippocampus of mice in JuA group mice was significantly reduced, and the number of Nissl bodies was significantly increased ($P < 0.01$), indicating that JuA had a significant protective effect on the brain tissue of AD mice. The results of RNA-Seq analysis showed that 218 genes were significantly up-regulated and 123 genes were down-regulated in model group compared with control group; Compared to model group, 66 genes were significantly upregulated in JuA high-dose group and 28 genes were downregulated; The expression trend of five differential genes including glucokinase (*Gck*) in model group was reversed after JuA intervention. GO analysis found that the differential genes after JuA treatment were mainly enriched in ion transport regulation, cytoskeleton, nuclear receptor activity, etc. KEGG pathway analysis revealed that JuA treatment was mainly enriched in type 2 diabetes, cell adhesion factor, interleukin-17 (IL-17) and transforming growth factor- β (TGF- β) signaling pathways; Screening the top 10 pathways that were jointly regulated by model group vs control group and JuA high-dose group vs model group and had the highest correlation with JuA treatment of AD, found that they mainly focused on metabolic disorders and inflammatory pathway; *Gck* gene appeared frequently in these pathways, indicating that it may be one of the important targets for JuA intervention in AD. qRT-PCR and Western blotting experiments had also verified the screening analysis results.

Conclusion JuA can significantly alleviate the pathological damage of brain tissue in AD mice and improve the ability of learning and memory. Its mechanism may be related to the regulation of metabolic disorders and inflammation related pathways, and the upregulation of *Gck* mRNA and protein expression to maintain glucose homeostasis may be one of the important mechanisms of its anti-AD effect.

Key words: jujuboside A; Alzheimer's disease; cognitive impairment; transcriptome sequencing; glucokinase

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种与衰老相关的渐进性中枢神经系统退行性疾病, 主要临床表现为进行性认知功能障碍、学习记忆能力减退、日常生活能力逐渐丧失等。其典型病理特征为神经元之间 β 淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 沉积形成老年斑、神经元内 Tau 蛋白过度磷酸化形成神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NFT), 以及由此引发的弥漫性炎性坏死病灶和神经元大量死亡。目前关于 AD 的发病机制尚未清楚, 但 A β 聚集被公认为是其核心机制, 具有神经毒性的 A β ₄₂ 聚集形成不溶性淀粉样斑块, 激活胶质细胞产生神经毒性介质和炎症因子, 进而促使神经细胞内斑块形成, 最终损害局部神经元^[1-5]。此外, 慢性炎症性疾病如动脉粥样硬化、肥胖/代谢综合征、2 型糖尿病和重度抑郁等都是 AD 发生发展的危险因素^[6]。AD 的发病机制非常复杂, 目前对其理解还很局限, 因此从不同角度开展对 AD 发病机制和治疗的研究已成为本领域的热点。

中医学认为心藏神、肝藏魂、脾藏意、肾藏精, AD 与五脏中心、肝、脾、肾的功能失调密切相关, 因此中医临床上常以养心安神、补肾填精、益气健脾、平肝开窍来治疗 AD^[7-8]。酸枣仁有养肝宁心、安神生津的功效, 是《中国药典》记载的治疗失眠

最常用的单味中药。研究表明, AD 患者中有 25%~40% 伴有睡眠结构改变^[9], 睡眠障碍可加速 A β 沉积, 影响脑内微环境, 干扰海马神经干细胞活性而抑制神经再生, 从而加重 AD 的病理进程^[10-12]。酸枣仁皂苷 A (jujuboside A, JuA) 是酸枣仁 *Ziziphi Spinosae Semen* 中含量最高的一种皂苷成分, 除具有镇静催眠、抗焦虑、抗抑郁等作用外, 还有抗氧化、抗炎、抗凋亡和神经保护等多种生物活性^[13]。本课题组前期研究及他人研究均已发现, JuA 可抑制 AD 小鼠脑内炎症反应与氧化应激损伤, 促进 A β 清除, 减轻脑组织损伤^[14-15], 并激活内源神经干细胞促进海马神经再生^[16]。以上研究表明 JuA 具备治疗 AD 的潜力, 但其相关作用机制尚不十分清楚。本研究以淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP)/ 早老蛋白 1 (presenilin 1, PS1) 双转基因小鼠作为 AD 模型, 采用转录组学测序 (transcriptome sequencing, RNA-Seq) 技术结合生物信息学方法, 分析 JuA 治疗 AD 的潜在靶基因及相关信号通路, 并予以实验验证, 以阐明 JuA 治疗 AD 的分子机制。

1 材料

1.1 动物

野生型 C57BL/6 小鼠 10 只, 7 月龄 SPF 级

APP/PS1 双转基因小鼠 50 只,购自江苏华创信诺医药科技有限公司,合格证号 SCXK(苏)2020-0009,动物使用许可证号 SYXK(辽)2019-0004,动物实验伦理批准号 YN2022-039-56。动物适应性喂养 1 周,自由进食进水,室温 20~25 °C,相对湿度 40%~60%,每日 12 h 光照维持,昼夜循环。

1.2 药品与试剂

JuA(质量分数为 99.78%,批号 22032904)购自成都普菲德生物科技有限公司;盐酸多奈哌齐片(安理申,国药准字 H20050978,批号 2203026)由卫材(中国)药业有限公司生产;尼氏(Nissl)染色液(批号 C0117)购自碧云天生物技术研究;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号 D006-1-2)购自南京建成生物工程研究所;组织冰冻切片 OCT 包埋剂(批号 4583)购自美国 Sakura 公司;TRIzol 试剂(批号 T101100)购自上海美吉生物医药科技有限公司;三氯甲烷(批号 0706106)购自上海申博化工有限公司;异丙醇(批号 20170901)购自天津市风船化学试剂科技有限公司;RNA 逆转录试剂盒(批号 G592)购自英国 Abcam 公司;qRT-PCR 检测试剂盒(批号 31598800)购自瑞士 Roche 公司;RNA 6000 Nano kit 检测试剂盒(批号 5067-1511)购自美国 Agilent 公司;葡萄糖激酶(glucokinase, Gck)抗体(批号 sc-17819)购自圣克鲁斯生物技术有限公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 bs-40295G-HRP)购自北京博奥森生物技术有限公司;GAPDH 抗体(批号 WL01114)购自万类生物科技有限公司。

1.3 仪器

Ti-s 型倒置荧光显微镜及成像系统(日本尼康公司);HM 525NX 型冰冻切片(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);MS-1 型水迷宫分析系统(成都仪器厂);Illumina HiSeq 6000 型测序仪(美国 Illumina 公司);DW-86L386 型超低温冰箱(青岛海尔集团);5424R 型低温离心机(德国 Eppendorf 公司);CFXconnect qRT-PCR 仪、Power Pac Universal Power Supply 型通用电泳仪、Trans-Blot SD 半干式蛋白转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);5200Multi 型凝胶成像仪(上海天能公司)。

2 方法

2.1 动物分组与给药

APP/PS1 双转基因小鼠 50 只,按体质量随机分为模型组及 JuA 低、中、高剂量组和盐酸多奈哌齐

组,每组 10 只;另取野生型 C57BL/6 小鼠 10 只作为对照组。依据文献报道^[13,17]和本课题组前期研究结果,将 JuA 的给药剂量确定为 5、10、20 mg/kg(ip 给药),1 次/d,连续 21 d;模型组和对照组 ip 等体积生理盐水;多奈哌齐组按人与小鼠等效剂量换算为 0.65 mg/kg(ig 给药),1 次/d,连续 21 d。

2.2 Morris 水迷宫实验

连续给药 21 d 后,采用 Morris 水迷宫实验检测各组小鼠的学习记忆能力。前 5 d 为定位航行实验,第 6 天为空间探索实验。①定向航行实验:将小鼠随机面朝池壁放入水中,其游泳轨迹图由拍摄系统自动采集、分析,将游泳路程和找到平台并在其上停留 15 s 所需时间定义为逃避潜伏期,每天以 4 次训练中潜伏期的平均值作为当日成绩,评估小鼠的学习能力;②空间探索实验:第 6 天撤去平台,选择原平台的对侧作为入水点,记录小鼠在 60 s 内穿越原平台的次数、在原平台所在象限停留时间百分比及第 1 次穿越平台前的游泳距离,评估小鼠的记忆能力。

2.3 脑组织样本处理与 Nissl 染色

水迷宫实验结束后,小鼠 ip 4%水合氯醛麻醉,心脏灌流后取脑,冰冻包埋、-80 °C 速冻,用冰冻切片进行连续冠状切片(10 μm)。将脑切片用 4%多聚甲醛固定 10 min 后,放入 Nissl 染液中,待尼氏体清晰后终止反应;再依次经 70%、100%乙醇脱水 30 s,二甲苯透化 5 min,中性树脂胶封片,显微镜下观察皮层、海马尼氏体的数量。

2.4 HE 染色

将脑片用 4%多聚甲醛固定 10 min 后,置于 50 °C 的苏木素中 5 min,流水洗去残余液体后置于分化液中 10~20 s,用润洗 2 次;放入 0.5%氨水中反蓝 10 s,ddH₂O 再次润洗;放入伊红染液中 3~5 s,ddH₂O 润洗 2 次;用不同浓度乙醇进行梯度脱水后,二甲苯透化 5 min,中性树脂胶封片,在显微镜下观察皮层和海马组织形态变化。

2.5 总 RNA 提取与 RNA-Seq 分析

取对照组、模型组与 JuA 高剂量组小鼠各 3 只,切取脑内海马组织,委托上海派森诺生物科技有限公司进行 RNA 提取与 RNA-Seq 测序。将脑组织切成小块,用 TRIzol 裂解液低温提取总 RNA,质检合格后通过带有 Oligo(dT)的磁珠富集具有 polyA 的 mRNA,以片段化的 mRNA 为模板合成双链 cDNA,随后对 cDNA 进行末端修复、加 A 尾并连

接测序接头；通过 AMPure XP beads 筛选 cDNA，PCR 扩增后，再对 PCR 产物进行纯化处理，最终获得 cDNA 文库。采用 Illumina HiSeq 6000 型测序仪进行测序分析^[18-19]。

2.6 基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析

对转录组测序的原始数据 (raw data) 进行过滤，筛选得到高质量数据信息；用 DESeq v1.20.0 软件研究各组之间的差异表达基因，将条件设置为差异倍数 $|\log_2FC| > 1$ ，显著性 $P < 0.05$ ，对 9 个样品的 mRNA 进行差异表达基因的筛选。为了掌握差异基因所参与的生物学过程、分子功能和细胞组分，使用 GO 数据库对所获得基因进行富集分析；再用 KEGG 进行代谢通路的富集分析，从而获取关键通路信息，并通过 R 语言将相关信息进行可视化分析^[18-19]。

2.7 qRT-PCR 检测基因表达

用 TRIzol 提取海马组织总 RNA，检测其浓度和完整性后按试剂盒说明逆转录成 cDNA，以 GAPDH 为内参基因，定量检测目的基因表达水平。引物序列见表 1。PCR 反应条件：95 °C、3 min，95 °C、15 s，60 °C、1 min，40 个循环；反应完毕使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量，以对筛选出的关键基因表达情况进行验证。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
Gck	F: AAGTCAGCCAGTGAGACAGC
	R: GAGCAAGACCTGAGTGTGCT
CAPDH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	R: GGGGTCGTTGATGGCAACA

2.8 Western blotting 检测蛋白表达

提取各组小鼠海马组织总蛋白，采用 BCA 法测定蛋白浓度；将待测蛋白液上样到 10% SDS-PAGE 凝胶电泳上进行分离，然后转移至 PVDF 膜上，用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后，加入 Gck 一抗，4 °C 孵育过夜；次日，用 TBST 洗膜 3 次，每次 15 min，孵育二抗，TBST 洗膜 3 次，每次 15 min，ECL 化学发光试剂盒显色，凝胶成像仪拍照，用 Image J 软件分析图像灰度值，以 GAPDH 作为内参，计算相应蛋白表达量。

2.9 统计学分析

用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据分析，水迷宫实验中的逃避潜伏期数据采用重复测量双因素方差分析 (Two-way ANOVA)；多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，两组间比较采用双尾学生检验 (Two-tailed Students' test)。细胞计数采用 Image J 软件定量分析。

3 结果

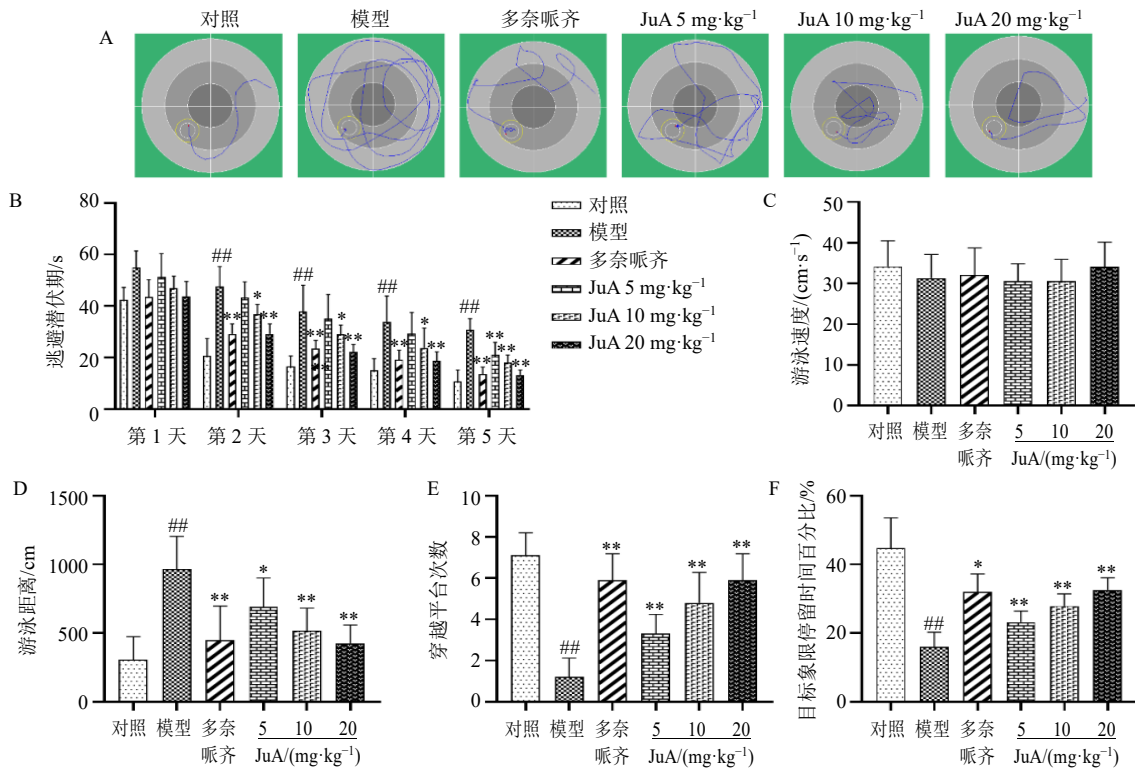
3.1 JuA 提高 AD 小鼠的学习和记忆能力

定位航行实验结果表明 (图 1-A、B)，通过训练后各组小鼠的逃避潜伏期呈逐日下降趋势。与对照组比较，模型组小鼠从第 2 天起逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.01$)；经低、中、高 3 个剂量组的 JuA 治疗后，逃避潜伏期均有不同程度缩短 ($P < 0.05$ 、 0.01)，且随给药剂量的增大作用逐渐增强，其中高剂量组的作用与阳性对照药多奈哌齐组相近。空间探索实验结果显示 (图 1-C~F)，各组小鼠游泳速度无明显差异；与对照组比较，模型组小鼠到达原有平台的游泳距离明显增加 ($P < 0.01$)，穿越平台次数和在目标象限停留时间百分比均显著降低 ($P < 0.01$)，说明模型组小鼠记忆能力明显下降；与模型组比较，JuA 各剂量组小鼠到达原平台的游泳距离均明显缩短 ($P < 0.05$ 、 0.01)，穿越平台次数和停留在目标象限时间百分比明显增多 ($P < 0.01$)，其中 JuA 高剂量组效果最佳。以上结果表明，JuA 能显著改善 AD 小鼠的学习和记忆能力，其高剂量组作用最佳。

3.2 JuA 减轻 AD 小鼠海马与皮层的病理损伤

将小鼠脑切片进行 HE 染色后，置于显微镜下观察分析。如图 2 所示，对照组皮层、海马 CA3 和 DG 区的神经细胞层次清晰、排列整齐、数量多；模型组神经细胞排列松散、数量减少、形态不规则，细胞核皱缩明显，提示模型组神经细胞明显受损；而与模型组比较，JuA 高剂量组神经细胞层次较为清晰，数量增多，胞质丰富，胞核均匀，细胞核固缩明显减轻，说明 JuA 治疗后明显减轻了 AD 小鼠脑组织的病理损伤。

Nissl 染色结果显示，模型组小鼠皮层、海马区的尼氏体数量均较对照组明显减少 ($P < 0.01$)；而 JuA 高剂量组小鼠的上述区域尼氏体数量显著多于模型组 ($P < 0.01$)，说明 JuA 对 AD 小鼠的脑组织具有明显保护作用，显著减轻了 AD 病变对脑内神经元的损伤。



A-定位航行实验(第5天的游泳轨迹图) B-逃避潜伏期 C-游泳速度 D-第1次找到平台前的游泳距离 E-穿越平台次数 F-目标象限停留时间百分比 与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图2、7同
A-positioning navigation experiment (swimming trajectory map on 5 d) B-escape latency C-swimming speed D-swimming distance before finding platform for the first time E-number of times crossing the platform F-target quadrant dwell time percentage ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as figs. 2, 7

图1 JuA对AD小鼠学习和记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effect of JuA on learning and memory abilities of AD mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

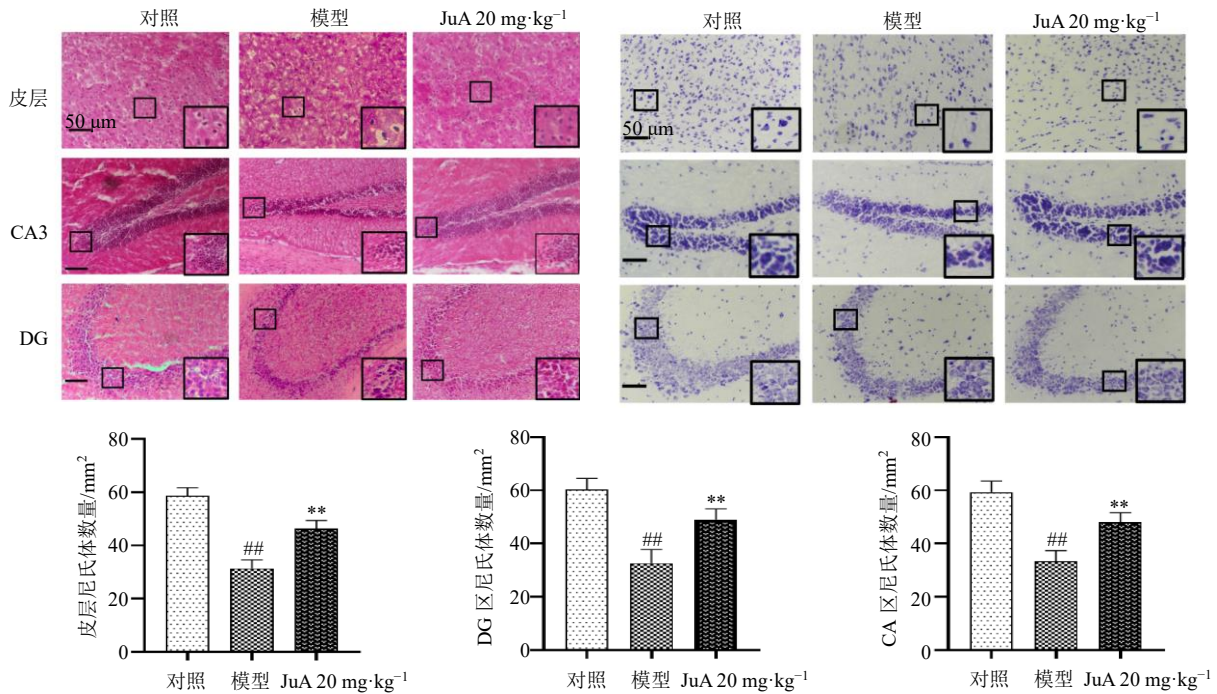


图2 JuA对AD小鼠皮层和海马病理损伤和尼氏体数量的影响 ($\times 10$)

Fig. 2 Effect of JuA on pathological injury and number of Nissl bodies in cortex and hippocampus of mice ($\times 10$)

3.3 RNA-Seq 分析

3.3.1 测序数据质量评估 在所建立的测序文库中, 9 组样本碱基质量超过 Q_{20} 的比例在 98.13% 以上, 超过 Q_{30} 的比例在 94.64% 以上 (表 2), 表明测序结果较好。

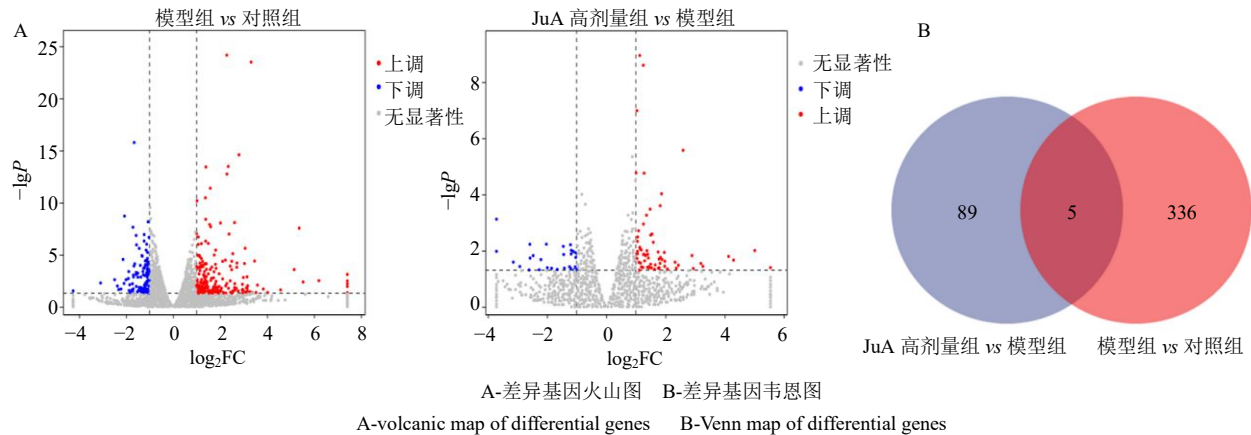
表 2 各组样本 cDNA 文库测序数据质量评估

Table 2 Quality evaluation of cDNA library sequencing data for each group of samples

样品	$Q_{20}/\%$	$Q_{30}/\%$
WT1	98.13	94.64
WT2	98.19	94.83
WT3	98.43	95.36
TG1	98.18	94.79
TG2	98.36	95.28
TG3	98.25	94.95
JuA1	98.22	94.88
JuA2	98.23	94.91
JuA3	98.33	95.15

WT-对照组 TG-模型组

WT-control group TG-model group



A-差异基因火山图 B-差异基因韦恩图
A-volcanic map of differential genes B-Venn map of differential genes

图 3 差异表达基因分析

Fig. 3 Analysis of differentially expressed genes

表 3 JuA 对 AD 小鼠差异基因表达的影响

Table 3 Effect of JuA on differential gene expressions in AD mice

基因标识号	基因	模型组 vs 对照组		JuA 高剂量组 vs 模型组	
		log ₂ FC	P 值	log ₂ FC	P 值
ENSMUSG00000045010	<i>Gm4779</i>	1.722 472 783	0.043 370 228	-2.582 799 014	0.005 946 283
ENSMUSG00000037185	<i>Krt80</i>	-1.630 849 759	0.000 076 580	2.025 988 961	0.005 899 008
ENSMUSG00000020227	<i>Irak3</i>	1.373 594 754	0.002 751 600	-1.185 645 408	0.013 074 798
ENSMUSG00000041798	<i>Gck</i>	-1.606 185 014	0.002 972 582	1.392 304 945	0.039 456 392
ENSMUSG00000063011	<i>Msln</i>	-1.756 633 417	0.025 674 763	1.961 603 026	0.011 580 328

3.4 GO 功能富集分析

为进一步明确 AD 病变及 JuA 治疗 AD 所涉及基因的生物学功能变化, 本研究对模型组相较于对照组选出的 341 个差异基因、JuA 高剂量组相较于

3.3.2 差异表达基因分析 用 DESeq v1.20.0 软件对 RNA-Seq 得到的基因数据进行差异表达分析, 以 $|\log_2FC| > 1$ 、 $P < 0.05$ 为条件进行筛选。结果显示, 与对照组比较, 模型组中共有 341 个差异表达基因, 其中上调 218 个, 下调 123 个; 与模型组比较, JuA 高剂量组中差异表达基因共有 94 个, 其中上调 66 个, 下调 28 个 (图 3)。进一步分析发现, 模型组的 5 个差异基因在 JuA 干预后表达趋势被逆转 (表 3), 包括 *Gck*、白细胞介素-1 受体关联激酶 3 (interleukin-1 receptor associated kinase 3, *Irak3*)、间皮素 (mesothelin, *Msln*)、人角蛋白 (human keratin, *krt80*) 等基因, 说明 JuA 治疗 AD 的机制与调控这些基因表达有关。其中 *Gck* 是葡萄糖代谢的关键限速酶, 其基因突变可引起 2 型糖尿病, 从而增加 AD 的患病风险或加重 AD 病理进展。本结果显示 JuA 可逆转 AD 小鼠 *Gck* 的降低趋势, 使其表达明显升高 ($P < 0.05$), 提示干预葡萄糖代谢可能是 JuA 治疗 AD 的重要机制之一。

模型组的 94 个差异基因进行 GO 功能富集分析, 主要包括生物学过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 富集分析, 并设置 $P < 0.05$ 为筛选标

准。结果显示，模型组 vs 对照组的差异基因功能主要集中在细胞分泌调节、离子通道、分泌颗粒、肽激素结合与受体活性等（图 4）；而 JuA 高剂量组 vs 模型组的差异基因功能主要富集在离子转运、细胞骨架与胞质膜、核受体活性等方面（图 5）。

3.5 KEGG 通路富集分析

利用 KEGG 数据库对模型组 vs 对照组、JuA 高剂量组 vs 模型组的差异表达基因进行功能注释分类、通路富集分析，设置 $P < 0.05$ 为筛选标准，以基因比率（gene ratio）进行排序。如图 6 所示，模

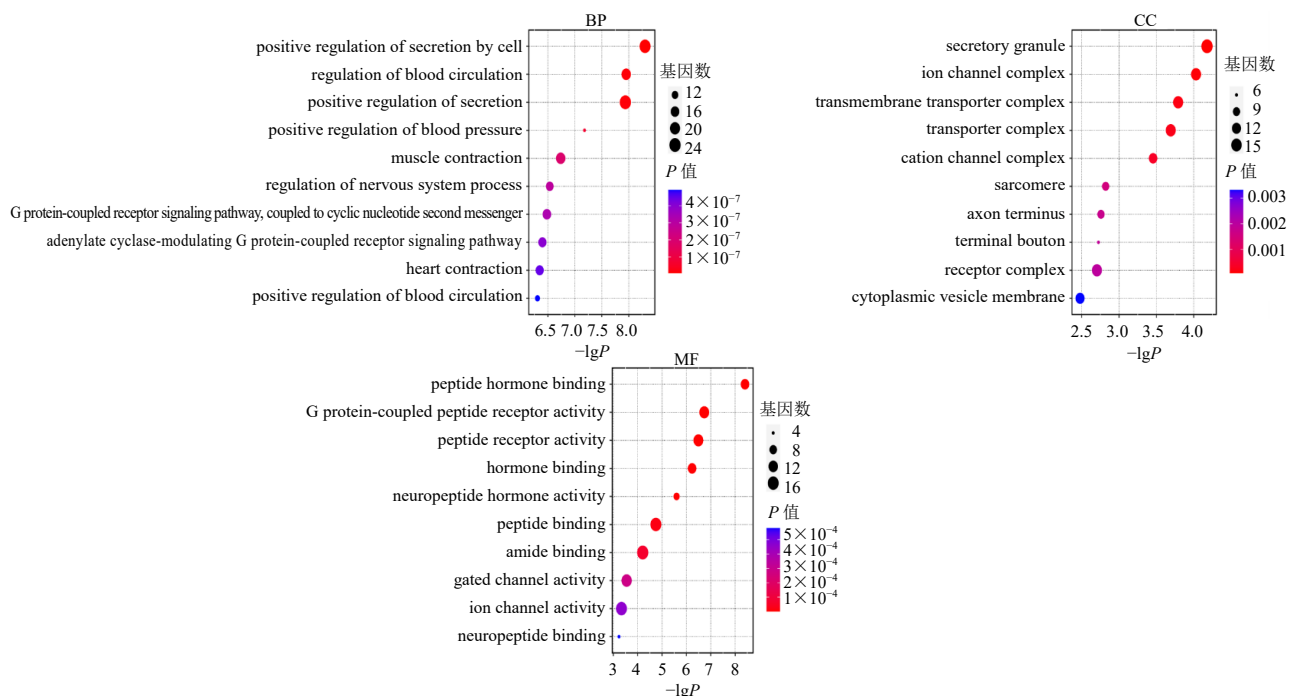


图 4 模型组与对照组比较差异基因 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO function analysis of differential genes between model group and control group

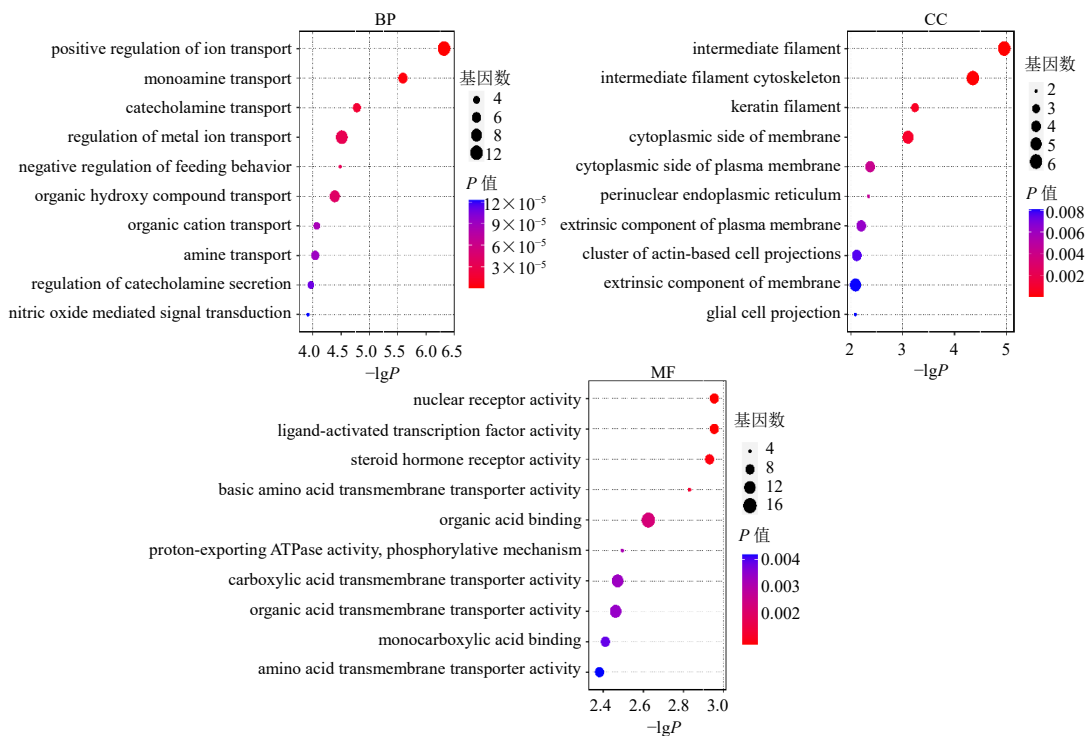


图 5 JuA 高剂量组与模型组比较差异基因 GO 功能富集分析

Fig. 5 GO function analysis of differential genes between JuA high-dose group and model group

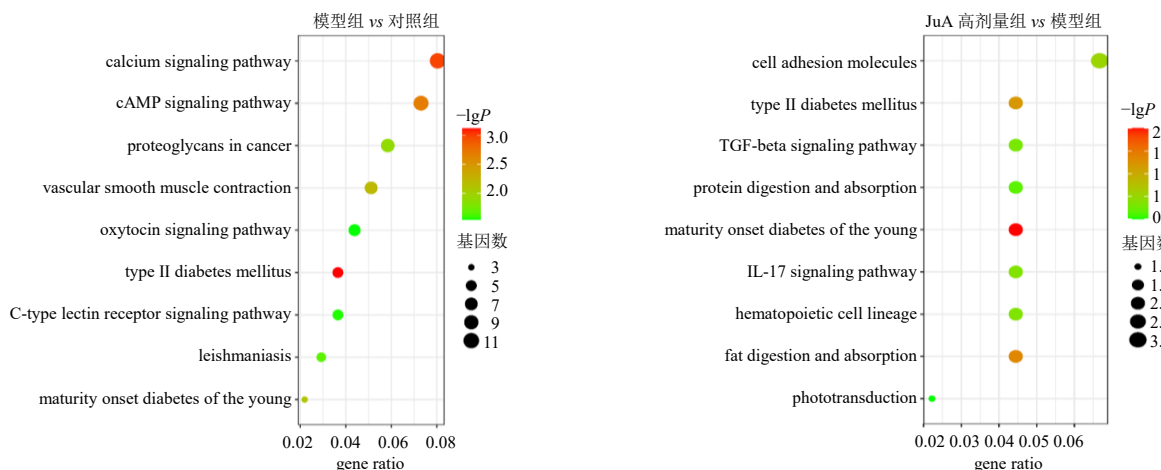


图 6 差异基因的 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 6 Diagram of KEGG enrichment analysis of differential genes

型组 vs 对照组的 341 个差异表达基因主要富集的途径有钙离子信号通路、环磷酸腺苷 (cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, cAMP) 信号通路、2 型糖尿病等, 说明以上通路与 AD 发病密切相关; 对 JuA 高剂量组 vs 模型组的 94 个差异基因进行富集分析, 发现主要涉及 2 型糖尿病、细胞黏附因子、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路和转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) 信号通路上, 说明 JuA 的抗 AD 作用可能与调控糖尿病和炎症相关通路有关。

再以模型组 vs 对照组、JuA 高剂量组 vs 模型组共同调节的信号通路进行比对分析, 共筛选出 88

条通路, 以基因比率 (gene Ratio) 进行排序, 对排名前 10 的通路进行核心富集基因分析。结果显示, 与 JuA 治疗 AD 相关性最高的通路是催乳素信号通路、青少年成熟期糖尿病、脂肪消化吸收、2 型糖尿病、细胞黏附因子、IL-17 信号通路、TGF-β 信号通路等。脂肪与糖代谢的紊乱、炎症免疫反应等正是 AD 发生发展的危险因素^[6], JuA 可通过干预这些危险因素防治 AD。在这些信号通路中 Gck 基因高频出现 (表 4), JuA 逆转了模型组 Gck 的降低, 使其表达明显升高 (表 3), 提示上调 Gck 活性维持葡萄糖稳态, 可能是 JuA 发挥抗 AD 作用的重要机制之一。

表 4 共同调节的通路与核心富集基因

Table 4 Co-regulated pathways and core enrichment genes

通路	模型组 vs 对照组富集基因	JuA 高剂量组 vs 模型组富集基因
催乳素信号通路	<i>Prlr</i> 、 <i>Gck</i>	<i>Elf5</i> 、 <i>Esr2</i> 、 <i>Gck</i>
青少年成熟期糖尿病	<i>Nkx2-2</i> 、 <i>Gck</i> 、 <i>Onecut1</i>	<i>Mafa</i> 、 <i>Gck</i>
脂肪的消化和吸收	<i>Npc1l1</i> 、 <i>Plpp2</i>	<i>Cd36</i> 、 <i>Agpat2</i>
2 型糖尿病	<i>Irs4</i> 、 <i>Hkdc1</i> 、 <i>Gck</i> 、 <i>Prkcd</i> 、 <i>Slc2a4</i>	<i>Mafa</i> 、 <i>Gck</i>
细胞黏附因子	<i>Cd34</i> 、 <i>Cd6</i> 、 <i>Slitrk6</i> 、 <i>Ning1</i>	<i>Cldn1</i> 、 <i>Siglec1</i> 、 <i>Cdh3</i>
IL-17 信号通路	<i>Ptgs2</i> 、 <i>Fosb</i>	<i>Traf5</i> 、 <i>Lcn2</i>
造血细胞谱系	<i>Cd34</i> 、 <i>Cd7</i>	<i>Cd36</i> 、 <i>Mme</i>
TGF-β 信号通路	<i>Igsf1</i>	<i>Dcn</i> 、 <i>Lefty2</i>
蛋白的消化和吸收	<i>Col6a3</i> 、 <i>Col5a1</i>	<i>Col23a1</i> 、 <i>Mme</i>
光传导	<i>Cngb1</i>	<i>Gnat2</i>

3.6 JuA 上调 APP/PS1 小鼠脑内 Gck 基因与蛋白的表达

为进一步验证上述筛选结果, 采用 qRT-PCR 与 Western blotting 对小鼠脑内 Gck 基因与蛋白表达水平进行实验验证。如图 7 所示, 与对照组比较, 模

型组小鼠脑内 Gck mRNA 和蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, JuA 高剂量组 Gck mRNA 和蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$), 与 RNA-Seq 分析结果一致, 说明 JuA 治疗 AD 的机制与上调 Gck 基因与蛋白的表达有关。

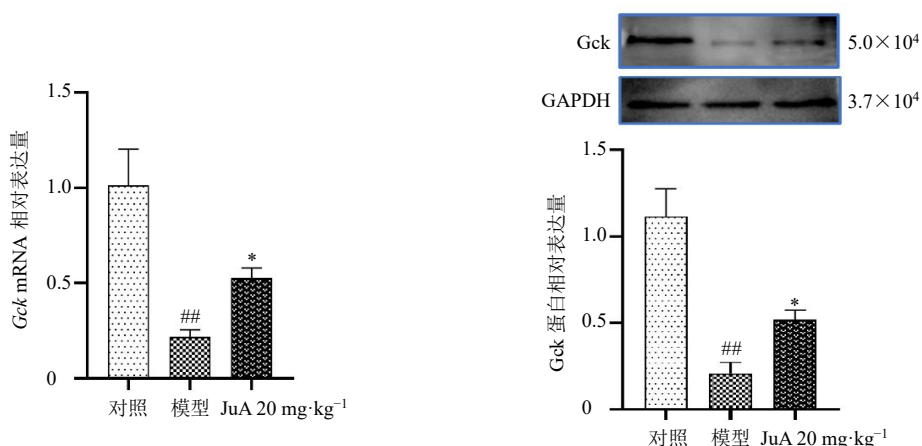


图 7 JuA 对 AD 小鼠脑组织 *Gck* mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of JuA on *Gck* mRNA and protein expressions in brain tissue of AD mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

本实验采用的 APP/PS-1 双转基因小鼠，表达嵌合的 APP 和 PS-1，能很好地模拟人类 AD 脑内的病理变化，已被广泛应用于 AD、淀粉样斑块形成等相关疾病的研究^[20-21]。水迷宫实验检测结果表明，7 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠的学习与记忆能力已明显低于对照组，而 JuA 能剂量相关性提高小鼠的学习记忆能力，其高剂量组作用最佳，与阳性对照药多奈哌齐相当。HE、Nissl 染色结果显示，模型小鼠海马与皮层神经细胞数量减少、形态不规则，核皱缩明显，尼氏体数量减少，说明神经元已明显受损；而经 JuA 治疗后神经元与尼氏体数量明显增加，细胞层次较为清晰，胞质丰富，核固缩减轻，说明 JuA 明显减轻了 AD 小鼠脑组织的病理损伤。以上结果说明 JuA 能有效保护脑组织，显著改善 AD 小鼠认知功能的障碍。

为了进一步探讨 JuA 干预 AD 的分子机制，治疗结束后分别取对照组、模型组和 JuA 高剂量组小鼠的海马组织进行 RNA-Seq 分析。RNA-Seq 是近年发展起来的新一代高通量基因测序技术，能全面快速地获得目标组织或器官所有转录本序列信息，从整体水平研究基因功能及结构，揭示特定的生物学过程以及疾病发生过程中的分子机制^[18-19]。本研究测序分析结果显示，与对照组比较，模型组中共有 341 个差异表达基因；与模型组比较，JuA 高剂量组有 94 个差异基因，模型组的部分差异基因在 JuA 干预后表达趋势被逆转，说明 JuA 可通过调控这些基因的表达治疗 AD。为明确 AD 病变及 JuA 治疗后所涉及基因的生物学功能变化，对模型组筛选出的 341 个差异基因和 JuA 高剂量组的 94 个差

异基因进行 GO 富集分析，结果显示，模型组差异基因的功能主要集中在细胞分泌调节、离子通道、肽激素结合与受体活性等；而 JuA 治疗组的差异基因功能主要富集在离子转运、细胞骨架与胞质膜、核受体活性等方面。对上述差异基因进行 KEGG 信号通路富集分析，结果显示，模型组涉及到钙离子信号通路、cAMP 信号通路、2 型糖尿病等；而 JuA 组涉及 2 型糖尿病、脂肪消化吸收、细胞黏附因子、IL-17 和 TGF- β 信号通路等，说明 JuA 抗 AD 的作用可能与调控代谢紊乱和炎症反应有关。

AD 的发病机制十分复杂，其发生发展通常与慢性炎症相关疾病如动脉粥样硬化、肥胖/代谢综合征和 2 型糖尿病等有关，这些疾病的产生是建立在衰老过程中促炎细胞被激活引起的全身慢性炎症基础之上^[6]。炎症反应的激活可导致血脑屏障通透性增加，小胶质细胞和星形胶质细胞活化，触发淀粉样蛋白斑块和神经原纤维缠结的形成，从而导致突触丧失和神经退行性病变^[6,22-23]。目前关于血清各炎症因子与 AD 发病之间的关系尚未十分明确，但已有研究报道，多种促炎因子如 IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、IL-17、肿瘤坏死因子- α 等与抗炎因子 IL-4、IL-10、IL-37 和 TGF- β 1 等的表达失衡导致的慢性炎症，是引起 AD 的重要因素^[6]。细胞黏附分子 L1 是表达于神经细胞质膜上的跨膜蛋白，参与神经元之间的相互识别和连接，在 AD 海马组织中能有效促进 A β 斑块的清除^[24]。TGF- β 超家族具有神经保护功能，可从多方面拮抗 AD 病理改变，如 TGF- β 1 能促进 A β 的清除、改善 Tau 病理、调节海马神经发生和突触可塑性等，从而改善 AD 认知功能^[25]。

本研究以模型组 vs 对照组、JuA 高剂量组 vs 模

型组共同调节的信号通路进行比对分析,共筛选出 88 条通路,对排名前 10 的通路进行核心富集基因分析,结果显示,与 JuA 治疗 AD 相关性最高的通路是青少年成熟期糖尿病、脂肪消化吸收、2 型糖尿病、细胞黏附因子、IL-17 信号通路和 TGF- β 信号通路,说明 JuA 可通过调控代谢紊乱和炎症反应减轻 AD 病理损伤,抑制 AD 的发生发展。

糖尿病是促进 AD 发生发展的危险因素之一。糖尿病患者脑葡萄糖代谢异常、胰岛素抵抗、晚期糖基化终末产物和炎性小体等加剧了脑内免疫炎症反应和氧化应激损伤,促进了淀粉样斑块和神经原纤维缠结的形成,从而加重了 AD 的病理损伤^[26-27];鉴于糖尿病与 AD 之间的联系和目前缺乏有效治疗 AD 的药物,越来越多的研究集中于用抗糖尿病药物控制或逆转 AD^[28],其中新型降糖药 Gck 激动剂的研发起了广泛注意。Gck 是葡萄糖代谢过程中第 1 个限速酶,能灵敏识别葡萄糖水平改变,适时调控胰岛素及胰高血糖素分泌并促进葡萄糖磷酸化,从而保持葡萄糖的稳态,故 Gck 激动剂有望成为全新抗 2 型糖尿病药物,并对 AD 的防治带来新的希望^[29-30]。本研究差异基因分析结果显示, JuA 干预了 AD 小鼠脑内 *Gck*、*Irak3* 和 *Msln* 等基因,其中 *Gck* 在模型组小鼠脑内显著降低,而 JuA 治疗后 *Gck* 表达明显升高,说明 *Gck* 可能是 JuA 治疗 AD 的重要靶点之一;在与 JuA 治疗 AD 相关性最高的前 10 条通路中, *Gck* 基因高频出现,说明上调葡萄糖激酶活性维持葡萄糖稳态可能是 JuA 发挥抗 AD 作用的机制之一;经 qRT-PCR 与 Western blotting 实验验证,表明 JuA 组 *Gck* mRNA 与蛋白表达均显著高于模型组,结果与 RNA-Seq 分析一致。其他差异基因未在这些通路中高频出现,且与 AD 的相关性目前尚不十分清楚,故有待于下一步进行验证。

综上, JuA 能明显减轻 AD 小鼠脑组织病理损伤,提高小鼠学习和记忆能力,其作用机制可能与调控炎症反应与代谢紊乱有关,其中上调 *Gck* mRNA 与蛋白表达,维持血糖平衡可能是 JuA 治疗 AD 的重要机制之一。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, et al. Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 5541-5554.
- [2] Lee G, Nho K, Kang B, et al. Predicting Alzheimer's

disease progression using multi-modal deep learning approach [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 1952.

- [3] Golub Justin S, Sharma Rahul K, Rippon Brady Q, et al. The association between early age-related hearing loss and brain β -amyloid [J]. *Laryngoscope*, 2020, 131(3): 633-638.
- [4] Dos Santos Picanco L C, Ozela P F, de Fatima de Brito Brito M, et al. Alzheimer's disease: A review from the pathophysiology to diagnosis, new perspectives for pharmacological treatment [J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(26): 3141-3159.
- [5] Wu Y T, Ali G C, Guerchet M, et al. Prevalence of dementia in mainland China, Hong Kong and Taiwan: An updated systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Epidemiol*, 2018, 47(3): 709-719.
- [6] Kosyrev A, Sentyabreva A, Tsvetkov I, et al. Alzheimer's disease and inflammaging [J]. *Brain Sci*, 2022, 12(9): 1237.
- [7] 许湘. 肾虚痰阻与 AD 的关系及补肾化痰益智法治疗 AD 的作用研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.
- [8] 管春燕. 2,3-吡啶酮抗帕金森病性痴呆作用研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2012.
- [9] Guarnieri B, Adorni F, Musicco M, et al. Prevalence of sleep disturbances in mild cognitive impairment and dementing disorders: A multicenter Italian clinical cross-sectional study on 431 patients [J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2012, 33(1): 50-58.
- [10] 游秋云, 姜霞, 黄攀攀, 等. 阿尔茨海默病与睡眠障碍的神经发生关联机制研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(10): 4562-4565.
- [11] Arredondo S B, Valenzuela-Bezani D, Mardones M D, et al. Role of Wnt signaling in adult hippocampal neurogenesis in health and disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 860.
- [12] Benedict C, Cedernaes J, Giedraitis V, et al. Acute sleep deprivation increases serum levels of neuron-specific enolase (NSE) and S100 calcium binding protein B (S-100B) in healthy young men [J]. *Sleep*, 2014, 37(1): 195-198.
- [13] 封洲燕, 郭殿武, 苏松, 等. 酸枣仁皂甙 A 镇静和抗惊厥作用试验 [J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2002, 31(2): 103-106.
- [14] 张睿. 酸枣仁皂苷 A 对脂多糖诱导小胶质细胞炎症发生的作用机制及神经保护作用 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2018.
- [15] Zhang M, Qian C, Zheng Z G, et al. Jujuboside A promotes A β clearance and ameliorates cognitive deficiency in Alzheimer's disease through activating Axl/HSP90/PPAR γ pathway [J]. *Theranostics*, 2018, 8(15): 4262-4278.

- [16] Wang C, Chen J C, Xiao H H, *et al.* Jujuboside a promotes proliferation and neuronal differentiation of APPswe-overexpressing neural stem cells by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2022, 772: 136473.
- [17] 张兵, 朱亚辉, 王孝玉, 等. 酸枣仁皂苷 A 促进大鼠股骨骨折愈合的机制研究 [J]. *浙江医学*, 2021, 43(18): 1953-1957.
- [18] 洗奕宏, 李雅琦, 陈斯琪, 等. 基于 RNA-Seq 技术分析小半夏汤抑制 1-PBG 诱导的大鼠异食癖行为的转录组学特征 [J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(6): 47-52.
- [19] 夏霜莉, 王维, 张冰琳, 等. 天麻总酚抗大鼠脑缺血再灌注损伤的转录组学分析及实验验证 [J]. *中草药*, 2021, 52(5): 1402-1410.
- [20] Gildawie K R, Galli R L, Shukitt-Hale B, *et al.* Protective effects of foods containing flavonoids on age-related cognitive decline [J]. *Curr Nutr Rep*, 2018, 7(2): 39-48.
- [21] 孙承艳, 贾宁, 韩锟. 表没食子儿茶素没食子酸酯对 APP/PS1 转基因小鼠认知功能和海马自噬的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(4): 539-543.
- [22] Holmes C. Review: Systemic inflammation and Alzheimer's disease [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2013, 39(1): 51-68.
- [23] Fakhoury M. Microglia and astrocytes in Alzheimer's disease: Implications for therapy [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16(5): 508-518.
- [24] 胡骏凯. 细胞粘附分子 L1 衍生片段 L1-70 参与阿尔兹海默症 A β 的清除及其机制的研究 [D]. 汕头: 汕头大学, 2021.
- [25] 刘芬, 李湘湘, 邹伟. TGF- β 超家族在阿尔兹海默病中的研究进展 [J]. *生命的化学*, 2023, 43(5): 772-779.
- [26] 陈飞兰, 张清瑜, 孟新玲. 阿尔茨海默病与糖尿病相关性研究 [J]. *新疆中医药*, 2022, 40(2): 83-86.
- [27] 刘睿, 苏恒. 2 型糖尿病与阿尔茨海默症相关关系的研究进展 [J]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2019, 3(16): 6-8.
- [28] 陈凯丽, 李海琦, 王俏丽, 等. 新型降糖药治疗阿尔兹海默病研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(24): 6148-6152.
- [29] 张严乐, 刘娜娜, 段莹利, 等. 葡萄糖激酶激活剂 HMS5552 对 2 型糖尿病大鼠肝葡萄糖激酶和肠胰高血糖素样多肽-1 的调节作用研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(15): 1613-1616.
- [30] 胡玉玺, 陈永收, 任一鑫, 等. 治疗 2 型糖尿病的在研新药: 葡萄糖激酶激动剂 HMS5552 [J]. *临床药物治疗杂志*, 2020, 18(6): 1-5.

[责任编辑 李亚楠]