基于 α CaMK II-CREB-BDNF 信号通路研究调心方对 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠学习记忆和突触可塑性的影响

王晓雯¹, 钱红¹, 沈春娟¹, 李燕军¹, 袁海新^{1*}, 王健^{2*}

1 上海市第五康复医院, 上海 201699;

2 上海中医药大学康复医学院, 上海 201203

* 通信作者: 王健, E-mail: wangjiantcm@126.com; 袁海新, E-mail: haixin0104@126.com

收稿日期: 2020-04-03; 接受日期: 2020-05-20

基金项目: 上海市自然科学基金项目(13ZR1439700); 上海市松江区新一轮医学重点学科建设项目(ZK2019A09)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.04010

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

摘要 **目的:** 观察调心方对 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马 CA1 区长时程增强(LTP)、海马区 α 钙/钙调素依赖激酶 II (α CaMK II)、环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)、脑源性神经营养因子(BDNF)、突触后致密物 95(PSD-95)mRNA 和蛋白表达的影响, 从 α CaMK II-CREB-BDNF 信号通路的角度探讨调心方改善 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠学习记忆和突触可塑性的作用机制。**方法:** 选择 54 只 3 月龄 APP/PS1 雄性小鼠, 采用随机数字表法分为模型组、调心方组、多奈哌齐组, 每组 18 只, 另设同月龄同品系 18 只 C57/BL6 雄性野生型小鼠为正常组。参照药理试验中动物与人体间的等效剂量换算标准进行折算, 多奈哌齐组和调心方组均按照人的等效剂量(体质量: 60 kg)折算出药物剂量。正常组和模型组给予等量的生理盐水, 剂量 10 mL/(kg·d); 多奈哌齐组给予盐酸多奈哌齐灌胃, 剂量为 0.05 mg/(kg·d), 调心方组给予调心方颗粒灌胃, 剂量为 0.057 g/(kg·d); 4 组小鼠于 3 月龄时进行灌胃给药处理, 1 次/d, 连续灌胃 3 个月。采用电生理技术在离体海马脑片上诱导 4 组小鼠海马 CA1 区 LTP; 采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测 4 组小鼠海马 α CaMK II、CREB、BDNF、PSD-95 mRNA 表达情况; 采用免疫印迹(WB)法检测 4 组小鼠海马 p- α CaMK II、p-CREB、BDNF、PSD-95 蛋白表达情况。**结果:** ① 电生理结果: 在 0.1~0.7 mA 刺激强度下, 4 组小鼠海马 I/O 曲线斜率无明显差异, 差异无统计学意义($P>0.05$)。在 20~250 ms 刺激间隔下, 4 组小鼠的 PPF 易化无明显差异, 差异无统计学意义($P>0.05$)。在第 50~60 min 稳定期内, 与模型组比较, 调心方组小鼠诱导的 LTP 中 fEPSP 斜率明显提高($P<0.05$)。② RT-qPCR 结果: 与正常组比较, 模型组小鼠海马 α CaMK II、CREB、BDNF 和 PSD-95 mRNA 表达均明显降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$); 与模型组比较, 调心方组小鼠海马 α CaMK II、CREB、BDNF 和 PSD-95 mRNA 表达均明显增加, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。③ Western blot 法检测结果: 与正常组比较, 模型组小鼠海马 p- α CaMK II、p-CREB、BDNF 和 PSD-95 蛋白表达均明显减少, 差异具有统计学意义($P<0.05$); 与模型组比较, 调心方组小鼠海马的 p- α CaMK II、p-CREB、BDNF 和 PSD-95 的蛋白表达均明显增加, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论:** 调心方能够改善 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马 CA1 区 LTP、提高 PSD-95 mRNA 和蛋白的表达, 从而改善 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠学习记忆功能和突触可塑性, 其作用机制可能与其上调海马 α CaMK II-CREB-BDNF 信号通路水平有关。

关键词 阿尔茨海默病; 调心方; 突触可塑性; 学习记忆; α 钙/钙调素依赖激酶 II; 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白; 脑源性神经营养因子; 信号通路

引用格式: 王晓雯, 钱红, 沈春娟, 等. 基于 α CaMK II-CREB-BDNF 信号通路研究调心方对 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠学习记忆和突触可塑性的影响[J]. 康复学报, 2020, 30(4): 299-306.

WANG X W, QIAN H, SHEN C J, et al. Effect of Tiaoxin recipe on memory learning and synaptic plasticity in APP/PS1 double transgenic Alzheimer's disease mice based on α CaMK II-CREB-BDNF signal pathway [J]. Rehabilitation Medicine, 2020, 30(4): 299-306.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.04010

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种不可逆转的中枢神经系统退行性疾病。目前,全世界范围内有超过5 000万AD患者,到2050年,预计将有15 000万AD患者^[1]。AD的主要发病人群为60岁以上的老年人,其患病率随人口老龄化日益增加。在我国60岁以上人群的患病率为0.53%~5.67%,85岁以上为20%~50%^[2]。AD的临床特征是隐匿起病,早期主要出现近期记忆力减退,随着病情的发展,视空间、计算力、语言、运动神经系统功能均可出现障碍,在后期甚至出现妄想、错觉、焦虑、抑郁等精神症状,不仅对老年人的日常生活能力造成了严重的影响,也给照料者和社会带来了沉重的负担^[3]。目前有许多研究进行AD治疗药物研发,据不完全统计正在研发/已研发的药物有200多种,但其中99%药物因中期结果无效或副作用不能耐受等原因导致失败^[4],仅有极少数药物被批准用于治疗AD,而这些药物只能控制症状,并无法改变疾病的进程。如多奈哌齐就是临床上治疗轻中度AD的常用药物^[5],它是一种可逆性的乙酰胆碱酶抑制剂,能有效改善认知功能。

近年来,随着中医学对AD防治的深入研究,发现中医药在AD的防治方面有着明显的优势。林水森教授^[6]结合多年临床经验提出轻中度AD患者以心气虚证为主,治疗宜从心入手,研究发现调心方能有效改善氧化损伤型类AD大鼠空间记忆能力和神经元钙稳态^[7]。本课题组前期研究发现,经过调心方治疗后,APP/PS1双转基因小鼠的学习获取能力和空间记忆保持能力均明显提高^[8]。但有关于其具体的作用机制还未明确。APP/PS1双转基因小鼠能够模仿AD的病理变化,常被用于AD和神经退行性病变的神经生物学研究^[9]。 α CaMK II-CREB-BDNF信号通路是形成及维持空间学习记忆能力和长时程增强(long-term potentiation, LTP)的重要信号通路之一^[10]。本研究基于 α CaMK II-CREB-BDNF信号通路探讨调心方改善AD学习记忆和突触可塑性的具体作用机制,选择采用3月龄APP/PS1双转基因小鼠为AD病理模型,通过电生理技术诱导小鼠海马CA1区LTP,实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)法检测小鼠海马区 α 钙/钙调素依赖激II(α calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, α CaMK II)、环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cyclic AMP response element binding protein, CREB)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor,

BDNF)、突触后致密物95(postsynaptic density protein-95, PSD-95)mRNA表达;采用Western blot法检测p- α CaMK II、p-CREB、BDNF、PSD-95蛋白表达。

1 实验材料

1.1 实验动物

选取SPF级3月龄APP/PS1双转基因雄性小鼠54只,体质量(25.22 ± 1.71)g,按照随机数字表法将APP/PS1雄性小鼠分为模型组、多奈哌齐组、调心方组。另设同月龄同品系同月龄C57/BL6雄性野生型小鼠18只为正常组,体质量(30.49 ± 1.59)g。以上实验动物均由南京大学模式动物研究所提供,品系编号为D00268,许可证号:SCXK(苏)2015-0001。动物实验在上海中医药大学动物实验中心进行,实验过程中动物饲养和操作严格遵循实验动物伦理学准则。

1.2 主要仪器与试剂

超薄切片机(德国Leica公司);全波长酶标仪、梯度PCR仪(美国Thermo公司);伯乐电泳仪、伯乐宽式水平电泳槽、转印电泳槽(美国BIO RAD公司);水浴锅、隔水式恒温培养箱(上海精密实验设备公司);化学发光成像仪(上海天能公司)。Trizol、随机引物(美国Invitrogen公司);RIPA、PMSF、BCA试剂盒、PBS、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、5X loading buffer、SDS-PAGE电泳液、Western转膜液(上海碧云天生物技术公司);BDNF抗体、p-CREB(S133)抗体、p- α CaMK II(T286)抗体、GAPDH抗体、PSD95抗体(英国Abcam公司); α CaMK II- α 、CREB、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)(美国CST公司)。

1.3 主要药物

调心方颗粒(江苏江阴天江药业有限公司),其成分主要包括党参、石菖蒲、桂枝、甘草、白芍、龙骨、远志等;盐酸多奈哌齐(江苏豪森药业股份有限公司,生产批号:H20030472)。

2 实验方法

2.1 干预方法

参照药理试验中动物与人体间的等效剂量换算标准进行折算,多奈哌齐组和调心方组均按照人的等效剂量(体质量:60 kg)折算出药物剂量。正常组和模型组给予等量生理盐水10 mL/(kg·d);多奈哌齐组给予盐酸多奈哌齐灌胃,剂量为0.05 mg/(kg·d);

调心方组给予调心方颗粒灌胃,剂量为 $0.057 \text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})^{[11]}$;4 组小鼠于 3 月龄时进行灌胃给药处理,1 次/d,连续灌胃 3 个月。

2.2 取材

2.2.1 脑片制备 4 组各随机选取 5 只小鼠,于小鼠腹腔注射 20% 的水合氯醛,待小鼠麻醉后,快速断头,取出脑组织移至 $95\%\text{O}_2+5\%\text{CO}_2$ 混合气饱和的人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 中, ACSF 溶液温度为 $0\text{ }^\circ\text{C}$,放置 1 min。去除前脑和小脑,用胶水将剩余脑组织块粘在切片台上。用振动切片机冠状切取海马脑片,海马脑片大小为 $400\text{ }\mu\text{m}$,放入 $34\text{ }^\circ\text{C}$ 的孵育槽中孵育 0.5 h,然后放在 $(25\pm 1)\text{ }^\circ\text{C}$ 持续通入 $95\%\text{O}_2+5\%\text{CO}_2$ 混合气饱和的 ACSF 溶液中 $2\sim 8\text{ h}$ 。

2.2.2 脑组织样本制备 4 组各随机选取 7 只小鼠,将小鼠腹腔注射 20% 的水合氯醛,待小鼠麻醉后,快速断头,取出脑组织移置 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 的冰盒上,迅速剥离左右两侧海马置于 EP 管中,储存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内,以待 RT-qPCR 和 Western blot 检测备用。

2.3 指标检测

2.3.1 离体海马 CA1 区 LTP 诱导 待脑片孵育结束后,在显微镜下将脑片移进记录槽中,使用 $32\sim 34\text{ }^\circ\text{C}$ 的 $95\%\text{O}_2+5\%\text{CO}_2$ 混合气饱和的 ACSF 溶液持续灌流,速度为 $3\text{ mL}/\text{min}$,在海马 CA1 区记录兴奋性突触后电位。具体步骤如下:① 确定海马 CA1 区:显微镜下确定海马的 CA1 区。② 准备刺激电极、记录电极:选择 1 个单级钨丝的微电极刺激作为刺激电极,尖端直径 $1\sim 2\text{ }\mu\text{m}$,尖端暴露长度为 $15\sim 40\text{ }\mu\text{m}$;记录电极为玻璃管记录电极,ACSF 溶液充满玻璃管,电阻 $1\sim 5\text{ M}\Omega$,将其放在 CA1 区的同一层。③ 刺激海马 CA1 区:将刺激电极放在海马 CA1 区 stratum radium 层,刺激 Shaffer collateral 纤维,以 0.033 Hz 频率, $100\text{ }\mu\text{s}$ 波宽,每隔 30 s 给 1 个刺激,刺激强度为 $0.1\sim 0.7\text{ mA}$ 。④ 记录场兴奋性突触后电位:每给 1 个刺激记录 1 个场兴奋性突触后电位 (field excitatory postsynaptic potential, fEPSP),以 30% fEPSP 最大刺激强度为基线,记录 30 min;在前 30 min 基础 fEPSP 曲线保持稳定后, LTP 应用 100 Hz 高频刺激 (high frequency stimulation, HFS) 诱导 1 s, LTP 诱发成功后持续记录 60 min,选择其中的第 50~60 min 的 fEPSP 平均斜率观察 LTP 水平。LTP 是在强直刺激下诱发的突触传递功能长时间增强现象,反映了突触传递效能的持久变化^[12]。⑤ 绘制刺激强度-反应曲线:以刺激强度为横坐标,

fEPSP 斜率为纵坐标,绘制刺激强度-反应曲线 (input-output curve, I/O), I/O 曲线能够反映神经环路的基本突触传递特性。⑥ 观察短时程突触可塑性:在海马 Schaffer 侧枝 CA1 区的突触通路上,从 $20\sim 250\text{ ms}$ 双脉冲刺激间隔的双脉冲易化 (paired pulse facilitation, PPF) 即短时程的突触可塑性。在 30% fEPSP 最大刺激强度的刺激下,一般会产生前后 2 个突触后兴奋电位,后 1 个 fEPSP 斜率/前 1 个 fEPSP 斜率就是 PPF 值。它可通过观察突触后的反应来推测突触前神经递质的释放情况。以上数据采用 Clampfit 软件进行分析。

2.3.2 海马 CA1 区 α CaMK II、CREB、BDNF 和 PSD-95 mRNA 含量检测 采用 RT-qPCR 法检测海马 α CaMK II、CREB、BDNF 和 PSD-95 mRNA 的含量。4 组小鼠各随机选取 4 个海马组织,采用 Trizol 法提取总 RNA,使用酶标仪检测总 RNA 的浓度和纯度,光密度 (optical density, OD) 比值可以判断 RNA 纯度, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 在 $1.8\sim 2.0$ 之间,表示 RNA 纯度较好。RNA 纯度测定后,利用 cDNA 合成试剂盒将 $2\text{ }\mu\text{g}$ RNA 逆转录为 cDNA。PCR 扩增条件: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 2 min,需执行 1 个循环。先 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s,后 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 10 s,需执行 45 个循环。循环结束后缓慢升温,生成各基因的溶解曲线。采用 GAPDH 作为内参基因,利用荧光定量 PCR 仪对目的基因 α CaMK II、BDNF、CREB、PSD-95 进行定量检测。使用 PCR 系统软件,观察溶解和扩增曲线,记录各组目的基因的 Ct 值,相对定量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法。引物由 NCBI Primer-blast 设计,序列参照 Gene Bank 数据库中的基因序列,由苏州金唯智公司合成。序列为:① BDNF:上游 $5'-\text{GGTATCCAAAGGCCAACTGA}-3'$;下游 $5'-\text{CTTATGAATCGCCAGCCAAT}-3'$ 。② CREB:上游 $5'-\text{CAGACAACCAGCAGAGTGGA}-3'$,下游 $5'-\text{GGGCTAATGTGGCAATCTGT}-3'$ 。③ GAPDH:上游 $5'-\text{AGGTCGGTGTGAACGGATTTC}-3'$,下游 $5'-\text{TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA}-3'$ 。④ PSD-95:上游 $5'-\text{CTATGAGACGGTGACGCAGA}-3'$,下游 $5'-\text{CGGGAGGAGACAAAGTGGA}-3'$ 。⑤ α CaMK II:上游 $5'-\text{CAGCCACTGTATCCAGCAGA}-3'$,下游 $5'-\text{GAGGCCAGCAACAGATTCTC}-3'$ 。

2.3.3 海马 CA1 区 p- α CaMK II、p-CREB、BDNF 和 PSD-95 蛋白含量检测 采用 Western blot 法检测海马 p- α CaMK II、p-CREB、BDNF 和 PSD-95 的蛋白含量。4 组随机选取 3 个在 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中储存的海马组织,按蛋白提取试剂盒上操作要求提取蛋

白,使用 BCA 法测定各组蛋白浓度。绘制标准曲线,计算出 4 组样本的蛋白浓度,使用 RIPA 裂解液将各组蛋白定容至等体积,浓度为 $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$,在 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中煮沸 10 min ,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。经过 SDS-PAGE 凝胶配制、凝胶电泳、转膜、蛋白印迹后,进行图像分析。所有条带均采用 Al-Phaview SA 软件进行处理分析。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。计量

资料用 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,数据符合正态分布且方差齐时,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;方差不齐用 Wilcoxon 秩和检验。重复测量数据用重复测量方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 4 组小鼠海马 CA1 区 LTP 比较

见图 1。

注:A 为正常组;B 为模型组;C 为多奈哌齐组;D 为调心方组。与正常组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。
Note: A is normal group; B is model group; C is Donepezil group; D is Tiaoxin formula group. Compared with the normal group, 1) $P<0.05$; Compared with the model group, 2) $P<0.05$.

图 1 4 组海马 CA1 区 LTP 图

Figure 1 LTP figure of hippocampal CA1 in four groups

3.2 4 组小鼠海马区 $\alpha\text{CaMK II}$ 、CREB、BDNF 和 PSD-95 mRNA 表达比较

见表 1、图 2。

表 1 4 组海马 $\alpha\text{CaMK II}$ 、CREB、BDNF、PSD-95 mRNA 表达比较 $(\bar{x}\pm s)$

Table 1 Comparison of $\alpha\text{CaMK II}$, CREB, BDNF, PSD-95 mRNA expression in the hippocampus in four groups $(\bar{x}\pm s)$

组 别	<i>n</i>	$\alpha\text{CaMK II}$	CREB	BDNF	PSD-95
正常组	4	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.29	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.34
模型组	4	$0.58\pm 0.07^{1)}$	$0.63\pm 0.00^{1)}$	$0.51\pm 0.11^{1)}$	$0.62\pm 0.05^{1)}$
多奈哌齐组	4	$0.93\pm 0.08^{2)}$	0.88 ± 0.19	$0.91\pm 0.27^{2)}$	$1.00\pm 0.07^{2)}$
调心方组	4	$0.91\pm 0.07^{2)}$	$0.96\pm 0.09^{2)}$	$0.94\pm 0.03^{2)}$	$0.94\pm 0.11^{2)}$

注:与正常组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。
Note: Compared with the normal group, 1) $P<0.05$; Compared with the model group, 2) $P<0.05$.

注:A 为正常组;B 为模型组;C 为多奈哌齐组;D 为调心方组。与正常组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。
Note: A is normal group; B is model group; C is Donepezil group; D is Tiaoxin formula group. Compared with the normal group, 1) $P<0.05$; Compared with the model group, 2) $P<0.05$.

图 2 4 组小鼠海马区 α CaMK II、CREB、BDNF 和 PSD-95 mRNA 表达比较

Figure 2 Comparison of α CaMK II, CREB, BDNF and PSD-95 mRNA expression in the hippocampus in four groups

3.3 4 组小鼠海马区 p- α CaMK II、p-CREB、BDNF 和 PSD-95 的蛋白表达比较

见表 2、图 3、图 4。

表 2 4 组海马区 p- α CaMK II、p-CREB、BDNF 和 PSD-95 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Comparison of p- α CaMK II, p-CREB, BDNF and PSD-95 protein expression in the hippocampus in four groups ($\bar{x}\pm s$)

组 别	n	p- α CaMKII	p-CREB	BDNF	PSD-95
正常组	3	1.00 $\pm$ 0.20	1.00 $\pm$ 0.10	1.00 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.12
模型组	3	0.47 $\pm$ 0.06 ¹⁾	0.66 $\pm$ 0.08 ¹⁾	0.65 $\pm$ 0.09 ¹⁾	0.58 $\pm$ 0.08 ¹⁾
多奈哌齐组	3	0.46 $\pm$ 0.06	0.90 $\pm$ 0.03 ²⁾	0.86 $\pm$ 0.09 ²⁾	0.85 $\pm$ 0.07 ²⁾
调心方组	3	0.86 $\pm$ 0.14 ²⁾	0.95 $\pm$ 0.11 ²⁾	0.90 $\pm$ 0.09 ²⁾	0.92 $\pm$ 0.09 ²⁾

注:与正常组比较,1) $P<0.05$;与模型组比较,2) $P<0.05$ 。
Note: Compared with the normal group, 1) $P<0.05$; Compared with the model group, 2) $P<0.05$.

4 讨 论

中医学将 AD 归于“呆病”“郁证”“癡证”等范畴,对于 AD 不同阶段的病机、治则、治法尚未达成共识。AD 主要临床表现为认知功能障碍,有研究发现 AD 的基本病机为:心气虚衰,气不生神,为本虚;痰滞瘀阻,蒙蔽神窍为标实。根据“缓则治其本”“治病必求于本”的原则,从“心”入手,调心气可以治疗 AD。调心方中党参功擅补心气,安神增智为君;桂枝温通血脉,振奋心阳为臣;石菖蒲安神益智,开窍为佐;远志通窍豁痰,增智为使。诸药配伍具有益心气化痰开窍之功效^[13]。有临床研究显示,调心方能

够改善轻、中、重度 AD 患者的认知功能和日常生活能力,通过提高后扣带回与脑功能区的连接,从而达到改善脑功能的作用^[14]。有基础研究发现,调心方可以抑制神经细胞凋亡、乙酰胆碱的水解、胶质细胞激活、Tau 蛋白的过度磷酸化、A β 寡聚体的生成,减轻神经炎症反应、抗氧化应激等多个靶点和途径,从而达到改善 AD 发生、发展的作用。但有关于调心方是如何改善 AD 患者学习记忆能力的具体作用机制还不够明确,因此本研究尝试基于 α CaMK II-CREB-BDNF 信号通路探讨调心方对 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠学习记忆和突触可塑性的影响,以期探讨调心方改善 AD 患者学习记忆

注: A 为正常组; B 为模型组; C 为多奈哌齐组; D 为调心方组。
Note: A is normal group; B is model group; C is Donepezil group; D is Tiaoxin formula group.
图 3 4 组海马区 p-αCaMK II, p-CREB, BDNF 和 PSD-95 的蛋白条带显影

Figure 3 Protein band development on p-αCaMK II, p-CREB, BDNF and PSD-95 protein expression of the hippocampus in four groups

能力的具体作用机制提供依据。
4.1 调心方能够改善 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马突触可塑性

LTP、PPF、I/O 是突触功能可塑性的 3 个重要电生理指标。本研究结果显示, 4 组分组效应和刺激强度效应均无明显区别; 分组和刺激时间因素无明显的交互作用; 在 0.1~0.7 mA 刺激强度下, 4 组小鼠海马 I/O 曲线斜率无明显区别; 在 50、100、200、250 ms 的不同刺激间隔下, 4 组 PPF 易化无明显区别。这说明 APP/PS1 小鼠海马 LTP 的损伤与基本突触传递和突触前神经递质释放无关, APP/PS1 双转基因小鼠的基本突触传递效能无发生障碍, 这提示 6 月龄的 APP/PS1 小鼠海马 LTP 的损伤与基本突触传递和突触前神经递质释放无关。第 50~60 min 的海马 fEPSP 斜率组间比较结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠 fEPSP 斜率明显降低, 提示模型组小鼠海马 LTP 受损。与模型组比较, 调心方组 fEPSP 斜率

注: A 为正常组; B 为模型组; C 为多奈哌齐组; D 为调心方组。与正常组比较, 1) $P<0.05$; 与模型组比较, 2) $P<0.05$ 。
Note: A is normal group; B is model group; C is Donepezil group; D is Tiaoxin formula group. Compared with the normal group, 1) $P<0.05$; Compared with the model group, 2) $P<0.05$.

图 4 4 组海马区 p-αCaMKII, p-CREB, BDNF 和 PSD-95 的蛋白表达比较
Figure 4 Comparison of p-αCaMK II, p-CREB, BDNF and PSD-95 protein expression of the hippocampus in four groups

均明显提高。这说明调心方可改善 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠 LTP 的抑制, 改善其突触传递效能, 从而提高突触可塑性, 改善学习记忆能力。这与 ROLLAND 等^[15]发现突触可塑性与神经系统的发育、损伤、修复及学习记忆等密切相关的研究结果一致。
此外, 本研究还发现, 与正常组比较, 6 月龄的 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马 PSD-95 蛋白和

mRNA 表达明显降低; 与模型组比较, 调心方组小鼠海马区的 PSD-95 mRNA 和蛋白表达明显提高。这说明 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠脑内有突触可塑性受损的现象, LTP 受到抑制; 经过调心方治疗后 PSD-95 的蛋白活性和基因表达明显提高, LTP 抑制得到改善, 突触可塑性提高, 从而改善学习和记忆能力。突触后致密物在突触可塑性中具有重要作

用, PSD-95 蛋白通过与突触后致密区多种蛋白分子的相互作用, 起到了调节突触可塑性的功能, 它在 LTP 的形成及维持过程、突触可塑性、学习记忆等方面具有关键性的作用^[16]。APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马 PSD-95 蛋白活性明显降低, PSD-95 异常表达会导致 LTP 受到抑制, 进而诱发突触可塑性发生改变, 使 AD 小鼠出现依赖海马的学习记忆功能的缺陷, 这与魏鹏^[17]的研究结果一致。

4.2 调心方能够调节 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马 α CaMK II-CREB-BDNF 信号通路水平

α CaMK II 通过 Thr286 位点自身磷酸化成为活化状态, 它的激活是其突触功能调节及学习记忆的结构基础^[18], 是 LTP 形成的重要介质, 对实现信息的储存具有重要作用。Ca²⁺进入细胞内与 CaM 结合形成 Ca²⁺-CaM, 能够活化 CaMKI, 磷酸化后的 α CaMK II 可以直接活化 CREB^[19]。CREB 是 LTP 产生的重要调节因子, CREB 缺失会导致 LTP 出现明显损伤^[20], 它位于 133 位点的丝氨酸残基(Ser133)的磷酸化对多种与学习记忆相关的基因转录起着重要作用。BDNF 是 CREB 的经典下游靶基因, 其基因启动子区域含有 CRE 序列, CREB 可与 CRE 序列结合, 引起 BDNF 的转录增加^[21], BDNF 是 LTP 和突触传递重要的调节器之一, 在突触可塑性、长时记忆的形成等方面起到重要作用。

本研究结果显示, 与正常组比较, 模型组海马 p- α CaMK II、p-CREB、BDNF 蛋白水平和 α CaMK II、CREB 和 BDNF mRNA 明显降低, 这与模型组 PSD-95 表达、LTP 受到抑制的结果相互印证; 与模型组比较, 调心方组海马 p- α CaMK II、p-CREB、BDNF 蛋白水平和 α CaMK II、CREB 和 BDNF mRNA 表达明显提高。这提示, 调心方组能有效改善 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马 α CaMK II-CREB-BDNF 信号通路水平。调心方可能通过激活 α CaMK II, 上调了 α CaMK II 的磷酸化蛋白水平及 α CaMK II mRNA 表达, 进而激活其下游的 CREB, 使得 CREB 磷酸化水平及 CREB mRNA 表达增加, 促进其下游 BDNF 的基因转录和蛋白合成, 提高 BDNF mRNA 和 BDNF 蛋白表达; BDNF 表达增加可在 α CaMK II 的翻译过程中上调 PSD-95 磷酸化水平, 引起 TrkB 对 BDNF 的敏感性增加, 从而激活 CREB-BDNF 信号通路, 使突触可塑性发生改变, 提高 LTP, 从而改善突触可塑性及学习记忆能力。这与 ESCOBAR 等^[22-23]等研究结果一致。

5 小 结

调心方能够改善 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠海马 CA1 区 LTP、提高 PSD-95 mRNA 和蛋白的表达, 从而改善 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠学习记忆功能和突触可塑性, 其作用机制可能与其上调海马 α CaMK II-CREB-BDNF 信号通路水平有关。

参考文献

- [1] ANAND A, PATIENCE A A, SHARMA N, et al. The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer's disease: a comprehensive review [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 815: 364-375.
- [2] 叶杰, 于晓丽, 王妍, 等. 家族性遗传预防对降低阿尔茨海默病老年患者发病率的影响[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(24): 6049-6052.
- [3] BAUCKNEHT M, PICCO A, NOBILI F, et al. Amyloid positron emission tomography and cognitive reserve [J]. World J Radiol, 2015, 7(12): 475-483.
- [4] 孙蓉, 宋绍霏, 张通. 阿尔茨海默病药物治疗的现状与展望[J]. 中国临床保健杂志, 2020, 23(2): 153-156.
- [5] 岳姣姣. 盐酸多奈哌齐在阿尔茨海默病治疗中的应用研究[J]. 中国医药指南, 2017, 15(15): 49-50.
- [6] 王健, 林水森. “心肾同治”阿尔茨海默病的思考[J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(9): 22-23.
- [7] 石辉, 原丽, 张军, 等. APPswe/PS1dE9 双转基因阿尔茨海默病模型小鼠的行为学及病理学特征研究[J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(4): 499-506.
- [8] 王晓雯, 邓海燕, 王健, 等. 环磷酸腺苷效应元件结合蛋白/脑源性神经营养因子信号通路在调心方改善 APP/PS1 小鼠学习记忆中的作用[J]. 中国康复理论与实践, 2018, 24(1): 11-16.
- [9] 张琳, 刘金洁, 赵艳, 等. 丁苯酞干预 APP/PS1 转基因小鼠(阿尔茨海默病模型)的认知功能[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(19): 3025-3030.
- [10] SATO T, TERAMOTO T, TANAKA K I, et al. Effects of ovariectomy and calcium deficiency on learning and memory of eight-arm radial maze in middle-aged female rats [J]. Behav Brain Res, 2003, 142(1/2): 207-216.
- [11] 邢三丽, 申定珠, 陈川, 等. 调心方对阿尔茨海默病模型鼠学习记忆能力及 p62 表达水平的影响[J]. 中国中医急症, 2016, 25(1): 45-47.
- [12] 刘若兰, 沈沉, 沈晓燕, 等. 电针对阿尔茨海默病大鼠海马谷氨酸受体相互作用蛋白 1、2 表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2016, 22(4): 413-416.
- [13] 王健, 林水森, 周如倩, 等. 调心方治疗阿尔茨海默氏病的临床研究[J]. 北京中医药大学学报, 2002, 25(3): 51-53.
- [14] 俞璐, 林水森, 周如倩, 等. 中医辨证治疗轻中度阿尔茨海默病的随机对照试验[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(7): 766-776.
- [15] ROLLAND W B, LEKIC T, KRAFFT P R, et al. Fingolimod reduces cerebral lymphocyte infiltration in experimental models of rodent intracerebral hemorrhage [J]. Exp Neurol, 2013, 241: 45-55.

- [16] 王姗姗,赵佳惠,张训乐,等. 越鞠丸对侧脑室注射链脲佐菌素诱导的学习记忆损伤小鼠模型的神经保护作用[J]. 实用药物与临床,2019,22(11):1125-1130.
- [17] 魏鹏. 姜黄素对AD小鼠突触相关蛋白Shank1、PSD95表达的影响[D]. 北京:北京中医药大学,2013:5-6.
- [18] RODRIGUES S M, FARB C R, BAUER E P, et al. Pavlovian fear conditioning regulates Thr286 autophosphorylation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II at lateral amygdala synapses [J]. J Neurosci, 2004, 24(13):3281-3288.
- [19] 张玉琴,樊李明,王宏运,等. 栝楼桂枝颗粒对神经元兴奋性毒性损伤后钙信号通路的影响[J]. 中国现代应用药学,2019,36(11):1317-1321.
- [20] 杨晓婷,齐诗仪,林桑,等. 针刺足三里穴对端粒酶基因敲除小鼠海马齿状回BDNF-CREB信号通路的影响[J]. 康复学报,2019,29(4):37-42.
- [21] GE L, LIU L W, LIU H S, et al. Resveratrol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior, neuroinflammatory response, and CREB/BDNF signaling in mice [J]. Eur J Pharmacol, 2015, 768:49-57.
- [22] ESCOBAR M L, FIGUEROA-GUZMAN Y, GOMEZPALACIOS-CHJETNAN A. In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor [J]. Brain Res, 2003, 991(1):274-279.
- [23] 陈兰芳,张学君,林栋,等. 电针长强穴对FMR1基因敲除小鼠海马CA1区PSD-95、CREB蛋白表达的影响[J]. 康复学报,2015,25(4):18-21,26.

Effect of Tiaoxin Recipe on Memory Learning and Synaptic Plasticity in APP/PS1 Double Transgenic Alzheimer's Disease Mice based on α CaMK II-CREB-BDNF Signal Pathway

WANG Xiaowen¹, QIAN Hong¹, SHEN Chunjuan¹, LI Yanjun¹, YUAN Haixin^{1*}, WANG Jian^{2*}

¹ The Fifth Rehabilitation Hospital of Shanghai, Shanghai 201699, China;

² School of Rehabilitation Science, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

*Correspondence: WANG Jian, E-mail: wangjiantcm@126.com; YUAN Haixin, E-mail: haixin0104@126.com

ABSTRACT Objective: To observe the effects of Tiaoxin recipe on long-term potentiation (LTP) in hippocampal CA1 region, hippocampal alpha calcium/calmodulin-dependent kinase II (α CaMK II), cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB), brain derived neurotrophic factor (BDNF), postsynaptic density 95 (PSD-95) mRNA and protein expression in hippocampal CA1 region of APP/PS1 double transgenic mice. To explore the mechanism of Tiaoxin recipe in improving memory learning and synaptic plasticity in APP/PS1 double transgenic AD mice from the point of view of α CaMK II-CREB-BDNF signal pathway. **Methods:** A total of 54 3-month-old APP/PS1 male mice were randomly divided into the model group, the Tiaoxin recipe group and the Donepezil group according to the method of random number table, with 18 cases in each group. Another 18 C57/BL6 male wild type mice of the same age and the same strain were set as the normal group. According to the conversion standard of equivalent dose between animal and human in pharmacological test, the drug dose was converted according to human equivalent dose (body mass: 60 kg) in Donepezil group and Tiaoxin recipe group. The mice in the normal group and the model group were given the same amount of normal saline 10 mL/(kg·d), the Donepezil group was given Donepezil hydrochloride at a dose of 0.05 mg/(kg·d), and the Tiaoxin recipe group was given Tiaoxin recipe granules by gastric perfusion at a dose of 0.057 g/(kg·d). The mice in the four groups were given intragastric administration at the age of three months, once a day for three months. Electrophysiological technique was used to induce LTP in hippocampal CA1 region of four groups of mice in vitro. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of α CaMK II, CREB, BDNF and PSD-95 mRNA in hippocampal hippocampus of mice in four groups, and Western blotting (WB) was used to detect the expression of paired p- α CaMK II, p-CREB, BDNF and PSD-95 in hippocampus of four groups of mice. **Results:** ① Electrophysiological results: under the intensity of 0.1-0.7 mA stimulation, there was no significant difference in the slope of hippocampal I/O curve among the four groups ($P>0.05$). Under the interval of 20-250ms stimulation, there was no significant difference in PPF facilitation among the four groups ($P>0.05$). During the 50-60 min stable period, compared with the model group, the slope of fEPSP in the LTP induced by Tiaoxin recipe group was significantly higher than that in the model group ($P<0.05$). ② RT-qPCR results: compared with the normal group, the expressions of α CaMK II, CREB, BDNF and PSD-95 mRNA in the hippocampus of the model group were significantly lower, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Compared with the model group, the expressions of α CaMK II, CREB, BDNF and PSD-95 mRNA in the hippocampus of the Tiaoxin recipe group were significantly higher, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). ③ Western blot assay results: Compared with the normal group, the expressions of p- α CaMK II, p-CREB, BDNF and PSD-95 protein in the hippocampus of the model group were significantly lower, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). compared with the model group, the expressions of p- α CaMK II, p-CREB, BDNF and PSD-95 prote in in the hippocampus of mice in Tiaoxin recipe group were significantly increased, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** Tiaoxin recipe can improve the LTP of hippocampal CA1 region of APP/PS1 double transgenic AD mice, increase the expression of PSD-95 mRNA and protein, improve the memory learning function and synaptic plasticity of APP/PS1 double transgenic AD mice, and its mechanism may be related to its up-regulation of hippocampal α CaMK II-CREB-BDNF signal pathway.

KEY WORDS Alzheimer's disease; Tiaoxin recipe; synaptic plasticity; learning and memory; alpha calcium/calmodulin-dependent protein kinase II; cyclic adenosine monophosphate response element binding protein; brain-derived neurotrophic factor; signaling pathway

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2020.04010