

山茱萸多糖对D-半乳糖致衰老大鼠学习记忆能力及Klotho/Akt信号通路的影响

欧 芹, 张鹏霞, 范慧晗, 刘泰佐
(佳木斯大学基础医学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:目的 探讨山茱萸多糖对D-半乳糖致衰老大鼠学习记忆能力及Klotho/Akt信号通路的影响。方法 采用D-半乳糖腹腔注射法制备Wistar大鼠脑老化模型,然后给予不同剂量山茱萸多糖观察大鼠学习记忆能力、 β -半乳糖苷酶活性、Klotho、Akt、FoxO3a、Mn-SOD等指标变化。结果 与模型组比较,山茱萸多糖中、高剂量组学习记忆能力提高($P<0.01$),Klotho、Mn-SOD、FoxO3a mRNA表达升高($P<0.01$),Klotho、Mn-SOD蛋白表达升高($P<0.01$),而Akt mRNA表达降低($P<0.01$)。结论 山茱萸多糖可提高脑老化模型大鼠学习记忆能力,其机制与提高海马组织中Klotho通路相关分子表达,激活下游靶分子Mn-FoxO3a和Mn-SOD表达有关,进而改善大鼠的学习记忆能力。

关键词:山茱萸多糖;脑老化;Klotho;Akt;FoxO3a;Mn-SOD

中图分类号:R285.5

文献标志码:B

文章编号:1001-1528(2022)05-1641-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.05.050

社会人口老龄化的进程促使对延缓衰老、提高老年人群生存质量的研究不断进行。对衰老相关基因研究发现,Klotho基因突变导致多个早衰样表型出现,包括短寿命、动脉硬化等;而过表达可对小鼠寿命有明显的延长^[1-2]。尽管Klotho的遗传突变导致多种衰老相关疾病^[3-5],但相关的研究都明确地显示Klotho基因只在小鼠、大鼠和人类的有限组织中表达。Klotho的表达可受许多因素的调节,表达后在维持细胞代谢平衡等方面发挥作用。山茱萸多糖(cornel polysaccharid, COP)可显著提高小鼠抗氧化能力、免疫力、增强细胞活力、影响细胞周期调控因子作用;还可改善衰老脑组织老化程度以及抗休克的作用^[5-6]。本课题组前期研究发现,含山茱萸多糖血清可调节细胞周期运行,发挥抗人二倍体成纤维细胞衰老作用;水煎剂和山茱萸多糖均可通过抗氧化、提高衰老大鼠学习记忆能力^[7]。本实验主要探究山茱萸多糖提高脑老化模型大鼠学习记忆能力是否与调节Klotho及其下游底物Akt、FoxO3a、Mn-SOD的表达有关,为脑老化的干预提供一个新的靶点和新的药物。

1 材料与方法

1.1 动物 Wistar大鼠60只,清洁级,雌雄各半,体重220~240 g,购自佳木斯大学实验动物中心,实验动物生产许可证号SCXK(黑)2013004。所有大鼠适应性喂养1周后进行实验。

1.2 试剂与药物 山茱萸多糖(宁波德康生物制品有限公司,批号20120110),硫酸-苯酚法测定多糖含量为75.8%。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;Klotho抗体、Mn-SOD抗体(武汉博士德生物工程有限公司); β -

半乳糖苷酶活性试剂盒(上海润裕生物科技有限公司);D-半乳糖(上海澄绍生物科技公司);Trizol、DEPC、RT-PCR试剂盒、DNA maker[宝生物工程(大连)有限公司]。

1.3 造模及分组 大鼠随机分为2组,正常组10只,脑老化造模组50只,造模大鼠腹腔注射60 mg/kg 5% D-半乳糖氯化钠溶液,连续6周,进行Y迷宫筛查,检测15次,较正常组正确次数下降15%~30%的大鼠为造模成功。将造模成功的48只脑老化模型大鼠随机分为4组,即模型组及山茱萸多糖低、中、高剂量组。

1.4 给药 从第7周起,山茱萸多糖低、中、高剂量组分别灌胃给予山茱萸多糖水溶液50、100、200 mg/kg,正常组和模型组灌胃给予等容量蒸馏水,连续6周。

1.5 样本采集 最后1次给药后,次日用Morris水迷宫检测大鼠定位航行和空间探索能力,结束后,乙醚麻醉后断头处死,取脑组织并分离海马,用于检测Klotho、Mn-SOD、Akt、FoxO3a表达;剩余脑组织制备成10%匀浆液,用于检测 β -半乳糖苷酶活性。

1.6 Morris水迷宫法检测大鼠学习记忆能力 参考文献[8]报道,第1~5天,Morris水迷宫水下1 cm放置圆形平台,从远离平台象限处放下大鼠,记录大鼠到达平台时间,为逃避潜伏期。如果大鼠2 min没有到达平台,需放置于平台30 s,系统自动跟踪记录大鼠活动轨迹,每天进行1次。第6天,进行空间探索实验,撤除平台,记录120 s大鼠穿过原平台的次数、原平台象限游泳的时间和距离,反映记忆能力。

收稿日期:2020-08-16

基金项目:黑龙江省教育厅面上项目(12521531)

作者简介:欧 芹(1963—),女,教授,从事中药抗衰老分子机制的研究。Tel:(0454) 8618756, E-mail: ouqin216@163.com

1.7 RT-PCR 法检测 *Klotho*、*Akt*、*FoxO3a*、*Mn-SOD* mRNA 表达 根据试剂盒说明书进行操作,使用凝胶图像成像系统 (Tanon-2500R) 分析 mRNA 表达, *GAPDH* 作为内参,以目的基因与内参基因比值表示目的基因相对表达量。

1.8 免疫组化法检测 *Klotho*、*Mn-SOD* 蛋白表达 海马组织切片脱蜡至水,双氧水处理阻断内源性过氧化物酶后,微波热修复,山羊血清封闭,加入一抗、二抗,DAB 显色,棕黄色为阳性表达。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析阳性染色区域光密度值。

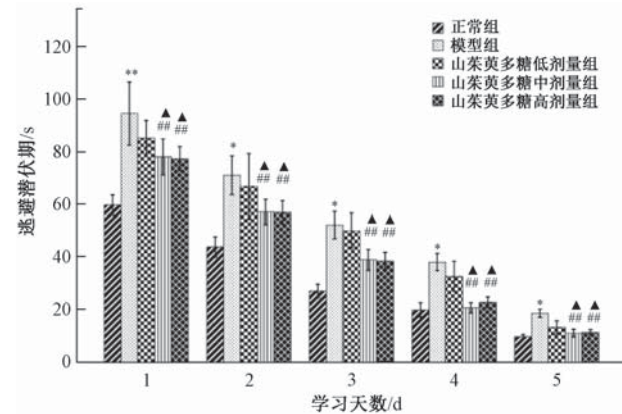
1.9 邻硝基苯法检测 β -半乳糖苷酶活性 根据试剂盒说明书检测 β -半乳糖苷酶活性,总蛋白质检测采用考马斯亮蓝法。

1.10 统计学分析 通过 SPSS 13.0 统计软件进行处理,数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 山茱萸多糖对脑老化大鼠学习记忆能力的影响 与正常组比较,模型组和山茱萸多糖各剂量组大鼠学习第 1 天,逃避潜伏期延长 ($P < 0.01$),随着学习天数增加,大鼠逃避潜伏期缩短,但与正常组比较仍有显著差异 ($P < 0.05$);山茱萸多糖中、高剂量组大鼠逃避潜伏时间短于模型组

($P < 0.01$) 和低剂量组 ($P < 0.05$),见图 1。给药结束后,检测各组大鼠的空间探索能力,以跨越平台区次数、有效象限游泳时间比和有效象限游泳路程比代表空间探索能力,结果见表 1,模型组大鼠空间探索能力低于正常组 ($P < 0.01$);而各剂量山茱萸多糖均能提高脑老化大鼠空间探索能力 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),中、高剂量效果优于低剂量 ($P < 0.05$)。



注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与山茱萸多糖低剂量组比较,▲ $P < 0.05$ 。

图 1 山茱萸多糖对脑老化大鼠逃避潜伏期的影响

表 1 山茱萸多糖对脑老化大鼠空间探索能力的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	跨越平台次数/次	原象限时间比/%	原象限游泳路程比/%
正常组	10	6.00 $\pm$ 2.79	56.76 $\pm$ 10.33	48.97 $\pm$ 8.55
模型组	12	2.30 $\pm$ 1.68**	20.82 $\pm$ 9.52**	26.35 $\pm$ 7.43**
山茱萸多糖低剂量组	12	3.38 $\pm$ 2.05#	30.48 $\pm$ 6.01##	30.49 $\pm$ 8.11#
山茱萸多糖中剂量组	12	4.78 $\pm$ 2.56##▲	41.25 $\pm$ 9.66##▲	35.33 $\pm$ 8.56##▲
山茱萸多糖高剂量组	12	4.16 $\pm$ 2.45##▲	40.75 $\pm$ 8.89##▲	38.26 $\pm$ 9.07##▲

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与山茱萸多糖低剂量组比较,▲ $P < 0.05$ 。

2.2 山茱萸多糖对脑老化大鼠脑组织 β -半乳糖苷酶活性的影响 与正常组比较,模型组大鼠脑组织 β -半乳糖苷酶活性升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,山茱萸多糖各剂量组大鼠脑组织 β -半乳糖苷酶活性均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且中、高剂量效果优于低剂量组 ($P < 0.01$),见表 2。

表 2 山茱萸多糖对脑老化大鼠 β -半乳糖苷酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	β -半乳糖苷酶活性/ (U·mg prot ⁻¹)
正常组	10	0.855 $\pm$ 0.064
模型组	12	2.141 $\pm$ 0.230**
山茱萸多糖低剂量组	12	1.973 $\pm$ 0.226#
山茱萸多糖中剂量组	12	1.386 $\pm$ 0.144##▲
山茱萸多糖高剂量组	12	1.413 $\pm$ 0.121##▲

注:与正常组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与山茱萸多糖低剂量组比较,▲ $P < 0.01$ 。

2.3 山茱萸多糖对脑老化大鼠海马 *Klotho*、*Akt*、*FoxO3a*、*Mn-SOD* mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠海马 *Klotho*、*FoxO3a*、*Mn-SOD* mRNA 表达降低 ($P < 0.01$),*Akt* mRNA 表达升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,山茱萸多

糖各剂量组大鼠海马 *Klotho*、*FoxO3a*、*Mn-SOD* mRNA 表达均升高 ($P < 0.01$),山茱萸多糖中、高剂量组大鼠海马 *Akt* mRNA 表达降低 ($P < 0.01$),且中、高剂量效果优于低剂量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 2、表 3。

2.4 山茱萸多糖对脑老化大鼠海马组织中 *Klotho*、*Mn-SOD* 蛋白表达的影响 如图 3、表 4 所示,与正常组比较,模型组大鼠海马组织 *Klotho*、*Mn-SOD* 蛋白表达降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,山茱萸多糖各剂量组大鼠海马组织 *Klotho*、*Mn-SOD* 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 讨论

脑功能的退行性改变是衰老的最重要变化之一,由于海马与学习记忆功能密切相关,可作为衰老时脑功能退行性改变研究的较理想靶区。本研究中发现,脑老化模型大鼠海马神经细胞排列紊乱、细胞密度减少,细胞出现空泡等,模型大鼠出现学习记忆能力下降和衰老相关的 β -半乳糖苷酶活性增强,模拟了脑老化的典型变化。*Klotho* 在调控衰老及年龄相关性疾病的发展中有非常关键的作用,最近的研究已经确定 *FoxO3a* 在脑、心脏、肾脏和脾脏中的水平尤为丰富,在调节机体衰老中发挥作用^[9-10]。本研究结

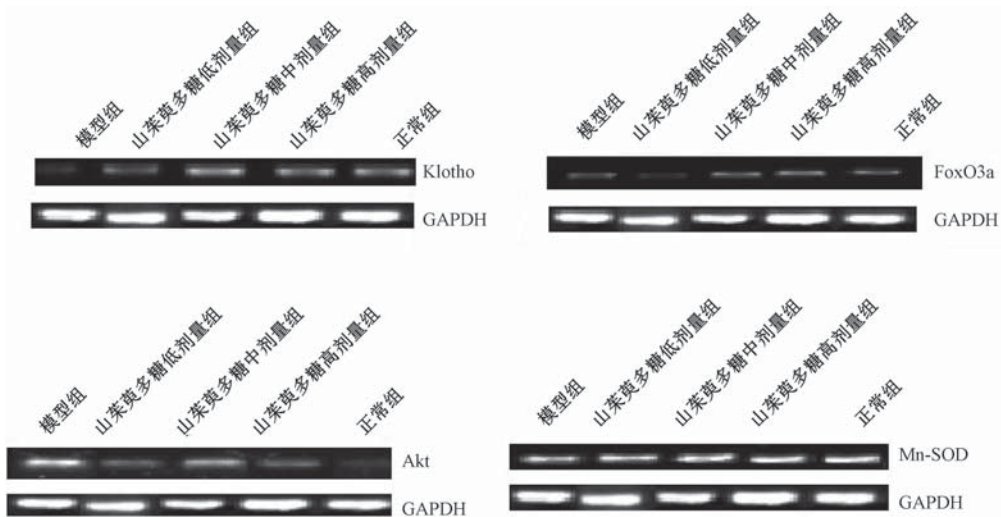


图 2 各组大鼠海马 *Klotho*、*Akt*、*FoxO3a*、*Mn-SOD* mRNA 的表达

表 3 山茱萸多糖对脑老化大鼠海马 *Klotho*、*Akt*、*FoxO3a*、*Mn-SOD* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	<i>Klotho</i> /GAPDH	<i>Akt</i> /GAPDH	<i>FoxO3a</i> /GAPDH	<i>Mn-SOD</i> /GAPDH
正常组	10	0.83±0.08	0.22±0.04	0.60±0.03	0.87±0.045
模型组	12	0.34±0.07**	0.63±0.01**	0.23±0.06**	0.29±0.10**
山茱萸多糖低剂量组	12	0.44±0.05##	0.56±0.03	0.39±0.04##	0.44±0.08##
山茱萸多糖中剂量组	12	0.68±0.06##▲	0.48±0.08##▲	0.49±0.03##	0.67±0.15##▲
山茱萸多糖高剂量组	12	0.53±0.18##▲	0.51±0.01##▲	0.46±0.08##	0.43±0.09##

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$;与山茱萸多糖低剂量组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

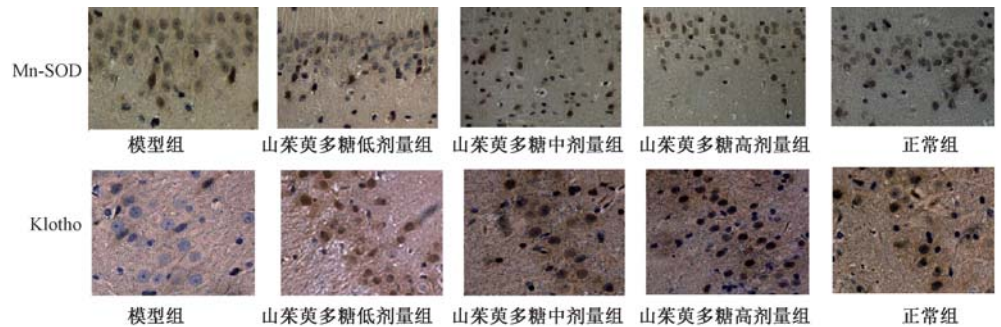


图 3 各组大鼠海马组织中 *Klotho*、*Mn-SOD* 蛋白的表达 ($\times 400$)

表 4 山茱萸多糖对脑老化大鼠海马组织中 *Klotho*、*Mn-SOD* 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	OD_{Klotho}	OD_{Mn-SOD}
正常组	10	0.56±0.04	0.50±0.03
模型组	12	0.32±0.03**	0.19±0.02**
山茱萸多糖低剂量组	12	0.36±0.04#	0.35±0.04##
山茱萸多糖中剂量组	12	0.43±0.05##	0.41±0.06##▲
山茱萸多糖高剂量组	12	0.40±0.08##	0.39±0.04##

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.05$,## $P<0.01$;与山茱萸多糖低剂量组比较,▲ $P<0.05$ 。

果表明,山茱萸多糖通过上调 *Klotho* 下游分子 *Mn-SOD* 的表达,改善脑细胞的功能。这种作用可能是脑衰老时,海马组织中 *Klotho* 的表达减少,降低了其对 *Akt* 表达、*FoxO3a* 磷酸化的抑制作用,而使衰老大鼠胞质中的 *FoxO3a* 增多,影响了 *FoxO3a* 从细胞质向胞核的转位,从而使 *Mn-SOD* 表达降低,最终使过氧化产物增多并累积,导致脑功

能紊乱和减退。虽然 *Klotho* 抑制衰老的具体机制目前尚不明确,但从 *INS/IGF-1* 通路的一系列关键下游靶点 *Akt*、*FoxO3a* 和 *Mn-SOD* 的表达结果来分析,衰老大鼠的学习记忆能力的减退与 *INS/IGF-1* 下游的 *Klotho*、*Akt*、*Fox3a* 和 *Mn-SOD* 的调节有关^[11-12]。

本实验研究结果表明,山茱萸多糖能够改善衰老大鼠的学习记忆能力,而且这种改善与其对 *Klotho* 及其下游信号分子的调节有关。山茱萸多糖可通过上调 *Klotho* 的表达,增加其对 *Akt* 的抑制作用,减少 *FoxO3a* 的磷酸化,促使 *FoxO3a* 进入细胞核结合在 *SOD* 顺式调节元件上,进而促进 *Mn-SOD* 的表达,提高超氧阴离子自由基的清除,使自由基及其连锁反应产物造成的组织损伤降低,而改善脑老化造成的细胞功能障碍。但是, *Klotho* 的作用只是衰老时学习记忆的减退机制的其中之一,山茱萸多糖改善学习记忆能力的其他途径和机制还有待于不断的完善和进一步的研究。

参考文献:

- [1] Behera R, Kaur A, Webster M R, et al. Inhibition of age-related therapy resistance in melanoma by rosiglitazone-mediated induction of Klotho[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(12): 3181-3190.
- [2] 杨莎莎, 周利. Klotho通过激活PI3K/AKT通路抑制肾小球系膜细胞内质网应激介导的细胞凋亡研究[J]. *四川医学*, 2019, 40(10): 1010-1016.
- [3] Xuan N T, Hai N V. Changes in expression of Klotho affect physiological processes disease, and cancer[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(1): 3-8.
- [4] Xu Y C, Sun Z J. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging[J]. *Endocr Rev*, 2015, 36(2): 174-193.
- [5] 郭煜晖, 胡大军, 陈静, 等. 衰老相关基因Klotho的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(3): 759-761.
- [6] 欧芹, 朱贵明. 山茱萸多糖延缓衰老作用的研究[J]. *老年医学与保健*, 2011, 17(6): 332-334.
- [7] 金红, 欧芹, 王迪迪, 等. 山茱萸多糖对衰老模型大鼠学习记忆能力影响的研究[J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(12): 1467-1469.
- [8] 陈罗西, 郭玲玲, 李亮. Morris圆形水迷宫的应用及其相关检测指标分析[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 10(8): 55-57.
- [9] 林玲, 刘国良, 孙曼利. 海马CA1区5-HT_{1A}受体调控PTSD大鼠空间记忆的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(1): 98-103.
- [10] Shi M J, Flores B, Gilings N, et al. α Klotho mitigates progression of Akt to CKD through activation of autophagy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(8): 2331-2345.
- [11] 韩香, 黄曙, 季国忠. Klotho生物学功能与Insulin/IGF-1通路关系的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(2): 111-115.
- [12] Kenyon C. The first long-lived mutants: discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2011, 366(1561): 9-16.

基于网络药理学研究黄芩清热除痹胶囊治疗骨关节炎的分子机制

周巧^{1,2}, 刘健^{1,3*}, 郭锦晨¹, 黄旦¹

(1. 安徽省中医药科学院中医风湿病防治研究所, 安徽合肥 230038; 2. 安徽中医药大学第二附属医院, 安徽合肥 230061; 3. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽合肥 230031)

摘要:目的 运用网络药理学研究黄芩清热除痹胶囊治疗骨关节炎的分子机制。方法 通过TCMSP数据库检索出黄芩清热除痹胶囊所含主要的化学成分;通过TCMSP、SEA、GeneCards、OMIM、Drugbank、PharmGkb、TTD数据库查出中药各成分作用靶点基因及骨关节炎相关基因靶点;筛选出两者交集基因,将交集基因集输入到Cytoscape 3.2.1软件BisoGenet插件,获得PPI网络,筛选核心靶点基因,再构建黄芩清热除痹胶囊活性成分-潜在靶点-疾病网络展示图;对核心靶点基因进行基因本体(GO)分子功能及基因组百科全书(KEGG)分析;采用Autodock-vina软件对活性成分与靶点进行分子对接。结果 筛选得到黄芩清热除痹胶囊治疗骨关节炎的活性成分202个和有效靶点基因115个。GO富集分析显示靶点基因主要参与了细胞对氧化应激的反应、活性氧、凋亡信号通路的调节、老化等生物过程。KEGG信号通路主要包括p53信号通路、HIF-1信号通路、Toll样受体信号通路、Th17细胞分化、PI3K-Akt信号通路、TNF信号通路等161条信号通路。分子对接显示,黄芩清热除痹胶囊中黄芩、栀子、薏苡仁、威灵仙中药活性成分与核心靶点均具有较好的结合能力。结论 黄芩清热除痹胶囊可以通过参与活性氧、氧化应激、转录因子、细胞凋亡等生物过程来发挥治疗骨关节炎的作用。

关键词:黄芩清热除痹胶囊;骨关节炎;分子机制;网络药理学

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)05-1644-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.05.051

收稿日期: 2021-02-21

基金项目:科技部国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(2018YFC1705204);国家自然科学基金面上项目(81973655);全国中医药创新骨干人才培养项目(国中医药人教函[2019]128);安徽省重点研究与开发计划项目(201904a07020004);安徽省自然科学基金项目(2008085QH386);安徽省第12批“115”创新团队项目(皖人才办[2019]1);安徽现代中医内科应用基础与开发研究省级实验室项目(2016080503B041);安徽省名中医刘健工作室建设项目(中医药发展秘[2018]11);新安医学教育部重点实验室项目(2020xayx10);安徽中医药大学2019年度校级科研项目(2019fyyb21)

作者简介:周巧(1992—),女,硕士,住院医师,研究方向为中医药防治风湿病。Tel: 13739240816, E-mail: 780149795@qq.com

*通信作者:刘健(1964—),男,博士,主任医师,研究方向为中医药防治风湿病。Tel: 13955109537, E-mail: liujianahzy@126.com

网络出版日期: 2021-04-09

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210409.1350.004.html>