

王世界,杨晶,马贺,等. 基于线粒体质量控制系统观察六味地黄丸对老龄小鼠的神经保护作用[J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 24-34.

Wang SJ, Yang J, Ma H, et al. Neuroprotective effect of liuweidihuangwan on aged mice based on the mitochondrial quality control system [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 24-34.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.004

基于线粒体质量控制系统观察六味地黄丸对老龄小鼠的神经保护作用

王世界¹, 杨晶¹, 马贺¹, 王璐瑶¹, 张紫娟², 苏运芳¹, 张振强^{1*}

(1.河南中医药大学中医药科学院, 郑州 450046; 2.河南中医药大学医学院, 郑州 450046)

【摘要】 目的 观察六味地黄丸对老龄小鼠海马区线粒体质量控制系统的影响及神经保护机制。方法 将50只20月龄C57BL/6J老龄小鼠按照每组10只进行随机分组,包括模型组,六味地黄丸低、中、高剂量组,多奈哌齐组,另选10只3月龄C57BL/6J野生小鼠为正常组。各组给药60d后,进行行为学实验,免疫荧光检测胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- α)的表达,透射电镜观察线粒体的健康程度及自噬小体的数量,Western blot检测线粒体质量控制系统相关蛋白。结果 高剂量组与模型组比较,行为学实验结果显示六味地黄丸可以提高小鼠的学习记忆能力,增强运动能力,减轻焦虑;免疫荧光实验显示GFAP、TNF- α 表达下降,电镜观察发现正常线粒体数量增多;Western blot实验结果显示PTEN诱导激酶1(PTEN induced putative kinase 1, PINK1)、帕金蛋白(PARKIN)、自噬相关3号染色体基因(autophagy related 3, ATG3)、自噬相关7号染色体基因(autophagy related 7, ATG7)、微管相关蛋白1轻链3B(microtubule-associated protein 1 light chain 3 β , LC3 β)、线粒体融合蛋白2(mitochondrial fusion protein 2, MFN2)、线粒体内源发动蛋白1(optic atrophy 1, OPA1)、线粒体转录因子A(recombinant transcription factor A, mitochondrial, TFAM)、 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α , PGC-1 α)蛋白的表达上升,泛素结合蛋白1(sequestosome protein 1, P62)、线粒体动力相关蛋白1(dynammin-related protein 1, DRP1)、TNF- α 蛋白的表达下降。结论 六味地黄丸可以提高小鼠的认知学习能力,减轻小鼠海马区的神经炎症,改善线粒体质量控制系统。

【关键词】 六味地黄丸; 脑老化; 线粒体质量控制系统; 神经炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0024-11

Neuroprotective effect of liuweidihuangwan on aged mice based on the mitochondrial quality control system

WANG Shijie¹, YANG Jing¹, MA He¹, WANG Luyao¹, ZHANG Zijuan², SU Yunfang¹, ZHANG Zhenqiang^{1*}

(1. Academy of Chinese Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China.

2. School of Medical Sciences, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046)

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of liuweidihuangwan on the mitochondrial quality control system in the hippocampus of aged mice and its neuroprotective mechanism. **Methods** Fifty 20-month-old C57BL/6J mice were randomly divided into five groups with 10 mice in each group, including a model group liuweidihuangwan low, medium,

【基金项目】 河南省高校科技创新团队支持计划资助(21HIRTSTHN026); 河南省科技攻关项目(212102310314, 222102310280)。

【作者简介】 王世界(1993—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中西医结合防治神经退行性疾病。E-mail: m19503851263@163.com

【通信作者】 张振强(1971—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合防治神经退行性疾病。E-mail: zzqkyc@hactcm.edu.cn

and high dose groups, donepezil group. Ten 3-month-old C57BL/6J mice were selected as the normal group. After 60 days of treatment, behavioral tests were carried out. Immunofluorescence was used to assess TNF- α and GFAP expression. Transmission electron microscopy was used to observe mitochondria and the number of autophagosomes. Proteins of the mitochondrial quality control system were assessed by Western blot. **Results** Compared with the model group, behavioral tests showed that liuwe dihuangwan improved learning and memory abilities, enhanced the exercise ability, and reduced anxiety. Immunofluorescence showed decreases in TNF- α and GFAP expression. Transmission electron microscopy showed that the number of normal mitochondria was increased. PINK1, PARKIN, ATG3, ATG7, LC3B, MFN2, OPA1, TFAM, and PGC-1 α protein expression was upregulated in the high-dose group, while P62, DRP1, and TNF- α protein expression was downregulated. **Conclusions** Liuwe dihuangwan improves the cognitive learning ability of mice, reduces neuroinflammation in the hippocampus, and improves the quality control system of mitochondria.

[Keywords] liuwe dihuangwan; brain aging; mitochondrial quality control system; neuroinflammation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

在脑衰老的进程中,线粒体功能障碍是重要的特征之一^[1]。线粒体质量控制系统是维持线粒体网络健康的重要机制,主要包括线粒体的融合分裂、线粒体自噬和线粒体生物发生等动态过程^[2]。脑衰老过程中海马神经元线粒体丰度下降,线粒体损伤增多,线粒体质量控制系统难以维持平衡,导致能量生成减少,氧化应激水平上升^[3]。线粒体损伤又会引起下游相关促炎因子的增加,引发机体内慢性炎症^[4]。因此,改善线粒体质量控制系统、减轻神经炎症是抗脑老化的重要研究思路之一。

在脑衰老过程中,经常伴随着肾精的不足^[5]。肾藏精,精生髓,髓能充脑以补益脑髓,故肾精的盛衰,直接影响着脑髓的盈亏^[6]。因此,通过补益肾精,可以增强滋润、濡养人体各脏腑形体官窍,进而延缓脑衰老。六味地黄丸出自宋代钱乙的《小儿要证直诀》,由熟地黄、山药、山茱萸、茯苓、泽泻和牡丹皮六味药组成,具有滋阴补肾、填精益髓的功效。本研究基于线粒体质量控制系统为靶点,模拟老龄化小鼠“肝脾肾亏虚”模型,探讨六味地黄丸改善学习记忆障碍和线粒体损伤作用机制,从而为六味地黄丸防治脑衰老提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

20 月龄雄性 C57BL/6J 自然衰老小鼠和 3 月龄雄性 C57BL/6J 小鼠购自杭州子源实验动物科技有限公司[SCXK(浙)2019-0004]。20 月龄,雌性, C57BL/6J 自然衰老小鼠, SPF 级, 50 只, 体重(25 \pm 3)g; 3 月龄, 雄性, C57BL/6J 小鼠, SPF 级, 10 只, 体重(25 \pm 3)g。小鼠饲养在河南中医药大学实验动物中心[SYXK(豫)2020-0004], 基本条件: 室温 22~26 $^{\circ}$ C, 湿度 40%~60%, 白天光照 12 h, 晚上关灯

12 h。饲料购自河南环宇禾康生物科技有限公司(GB 14924.3-2010), 饮水小鼠自由获取。所有实验经河南中医药大学实验动物伦理委员会审核并批准(DWLL201907311), 并按照实验动物的 3R 原则给予关怀。

1.2 主要试剂与仪器

六味地黄丸(规格每 8 丸相当于饮片 3 g, 国药准字 Z41022128, 批号 200137, 仲景宛西制药股份有限公司); 多奈哌齐(规格每片 5 mg, 国药准字 H20050978, 批号 1911068, 苏州卫材药业有限公司); PINK(ER1706-27)、PARKIN(ET1702-60)均购于杭州华安生物技术有限公司; TNF- α (ab6671)、TNF- α (ab1793)、ATG3(ab108251)、ATG7(ab133528)、P62(ab91526)、LC3B(ab48394)、MFN2(ab124773)、OPA1(ab42364)、TFAM(ab138351)、PGC-1 α (ab191838)、驴抗兔荧光二抗(ab150073)、驴抗小鼠荧光二抗(ab150107)均购于 abcam 公司; DRP1(D6C7)购于 Cell Signaling; β -actin(BM0627)、GFAP(BA0056)、Western blot 兔二抗(BM3894)、Western blot 鼠二抗(BA1050)均购于 BOSTER; DAPI(G1012-100ML)购于 Servicebio。

全自动酶标仪(美国 Thermo 公司, 型号: 1510); 全自动冷冻切片机(德国 Leica 公司, 型号: CM1950); 垂直电泳仪(上海天能科技有限公司, 型号: VE-180); 冷冻离心机(美国 Thermo 公司, 型号: Fresco21); 正置荧光显微镜(Carl Zeiss AG, 型号: Axioscope 5); 透射电镜(日本电子株式会社, 型号: JEM-1400); Morris 水迷宫(深圳瑞沃德生命科技有限公司, 型号: 63031); Y 迷宫(深圳瑞沃德生命科技有限公司, 型号: 63041); 旷场(深圳瑞沃德生命科技有限公司, 型号: 63006); 冷冻超薄切片机(德国 Leica 公司, 型号: EM UC7)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及给药

将 50 只 20 月龄 C57BL/6J 自然衰老小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 即模型组(model), 低、中、高剂量六味地黄丸治疗组(low dose、medium dose、high dose); 正常组(control) 为 10 只 3 月龄小鼠多奈哌齐组(donepezil)。六味地黄丸药液按照浓度 0.68、1.36、2.72 g/(kg·d) 分别灌胃给低、中、高剂量治疗组, 多奈哌齐药液按照浓度 0.75 mg/(kg·d) 灌胃给药, 正常组和模型组等量蒸馏水灌胃给药, 每天 1 次, 持续 60 d (给药剂量按照人与动物体表面积换算成等效剂量)。

1.3.2 行为学实验

所有小鼠均参与行为学实验。小鼠灌胃结束后, 开始 Morris 水迷宫实验。每只小鼠在每天固定时间接受训练, 实验者将小鼠面向池壁从象限的中点处放入水中, 每象限训练 1 次。水迷宫实验共有 6 d 时间, 水迷宫的前 5 d 为定位航行实验, 在固定的时间里, 将小鼠置于每一个象限的中点位置, 作为小鼠的落水点, 记录小鼠找到平台的时间。在 60 s 的时间内, 小鼠找到平台, 则停止计时, 时间记录为逃避潜伏期。超过 60 s, 则记为 60 s。第 6 天为空间探索实验, 去掉台子, 将台子对面象限作为小鼠的落水点, 实验系统记录 60 s 内小鼠穿过原来台子位置的次数及台子所在象限停留的时间。采用 Smart 3.0 软件进行小鼠在水迷宫中的定位和追踪。

Y 迷宫实验共做 1 d, 需保证外周环境安静, 无干扰。Y 迷宫是由 3 个大小相同的臂组成, 三个臂可标记为①、②、③, 放入小鼠时, 将小鼠放在 3 个臂的交汇处 (每次实验结束后, 都需用 75% 的酒精擦拭, 防止异味残留, 干扰实验)。小鼠在 Y 迷宫里所用时间为 5 min, 实验系统记录小鼠进臂顺序及进臂次数。根据小鼠的进臂次数及准确的进臂顺序, 计算出小鼠的自发交替率 (自发交替率 (%) = [(自发交替次数)/(总进臂次数-2)] × 100%)。

旷场实验共做 3 d, 每天 1 次。在每天的固定时间里, 依次将小鼠放在立体方格的中心区域, 开始追踪 (每次实验结束后, 都需用 75% 的酒精进行擦拭, 防止异味残留, 影响实验)。在外周环境安静, 无干扰的实验条件下, 小鼠在旷场里所用时间为 5 min, 实验系统记录小鼠的理毛次数、运动总距离、中心区域停留的时间。

1.3.3 Western blot 实验

行为学实验结束后每组随机挑选 3 只小鼠断头

处理, 取新鲜海马组织, 加入裂解液, 在低温高速离心机里离心, 得到组织上清液, 测定上清液的浓度; 加入 5×buffer, 高温 10 min, 使组织蛋白变性; 配置凝胶, 加入计算好的样; 电泳、转膜, 使蛋白转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶里封闭 2 h; 一抗封闭过夜, TBST 清洗一抗多次, 二抗孵育 2 h, TBST 清洗二抗多次, 加入显影液, 使用显影仪对条带进行显影。使用 Image J 对条带进行分析, 评估条带的统计学意义。

1.3.4 免疫荧光实验

从各组小鼠里每组随机挑选 4 只小鼠, 对小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠溶液进行麻醉, 取小鼠全脑, 放到体积分数为 4% 甲醛固定液试管里; 将脑组织换到蔗糖溶液里, 直至脑组织沉入底部; 将脑组织, 加入包埋剂, 冷凝后, 进行切片处理; 取脑片进行清洗, 封闭液进行封闭; 一抗孵育过夜, PBS 清洗多次, 二抗孵育 1.5 h, PBS 清洗多次; 加入 DAPI, PBS 清洗多次; 取出脑片, 进行贴片, 加入淬灭剂封片, 避光风干处理; 显微镜拍片、观察。图片荧光强度分析用 Image J 软件。

1.3.5 透射电镜观察小鼠海马区线粒体的形态结构的变化

从各组小鼠里每组随机挑选 3 只小鼠, 处死后迅速取海马组织, 置于体积分数为 1% 锇酸里固定 2 h, 组织酒精梯度脱水处理, 组织丙酮脱水处理, 环氧树脂对组织进行包埋, 再烘箱聚合, 干燥过夜, 利用超薄切片机对组织进行切片。每组随机抽取海马组织样本, 透射电镜下观察线粒体的健康程度及自噬小体的数量。30 000 倍数视野下每组随机选取 5~8 个视野, 计算正常线粒体与损毁线粒体的数量及自噬小体的数量。

1.4 统计学方法

本实验所获数据均采用 GraphPad Prism 9.0 统计学软件进行统计分析, 并以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行表示, Morris 水迷宫实验的各组小鼠逃避潜伏期的比较, 采用双因素方差进行分析, 其余各组之间的比较采用单因素方差进行分析, 并以 $P < 0.05$ 表示各组之间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 六味地黄丸可以提高老龄小鼠学习记忆能力、提高运动能力、降低焦虑

2.1.1 水迷宫实验

与正常组相比, 模型组在实验第 4、5 天小鼠逃

避潜伏期缩短 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), 穿越目标的次鼠减少 ($P < 0.01$), 在目标象限停留的时间减少 ($P < 0.05$), 具有统计学意义; 高剂量组与模型组比较, 水迷宫实验的第 4、5 天小鼠逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), 穿越目标的次数增多 ($P < 0.01$), 目标象限停留的时间延长 ($P < 0.001$), 具有统计学意义; 多奈哌齐组与模型组比较, 水迷宫实验的第 4、5 天小鼠逃避潜伏期缩短 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), 穿越目标的次数增多 ($P < 0.05$), 目标象限停留的时间延长 ($P < 0.01$), 具有统计学意义。表明六味地黄丸可以改善小鼠的空间学习记忆能力 (图 1)。

2.1.2 Y 迷宫实验

与正常组相比, 模型组的自发交替率下降 ($P < 0.01$), 具有统计学意义; 与模型组相比, 中剂量组、多奈哌齐组自发交替率增加 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), 具有统计学意义; 各给药组进臂总次数无统计学意义 ($P > 0.05$)。表明六味地黄丸能够改善小鼠的空间工作记忆能力 (图 2)。

2.1.3 旷场实验

与模型组比较, 低、中、高剂量组、多奈哌齐组理毛次数增多 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$), 具有统计学意义; 低、中、高剂量组、多奈哌齐组的移动总距离增加 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P <$

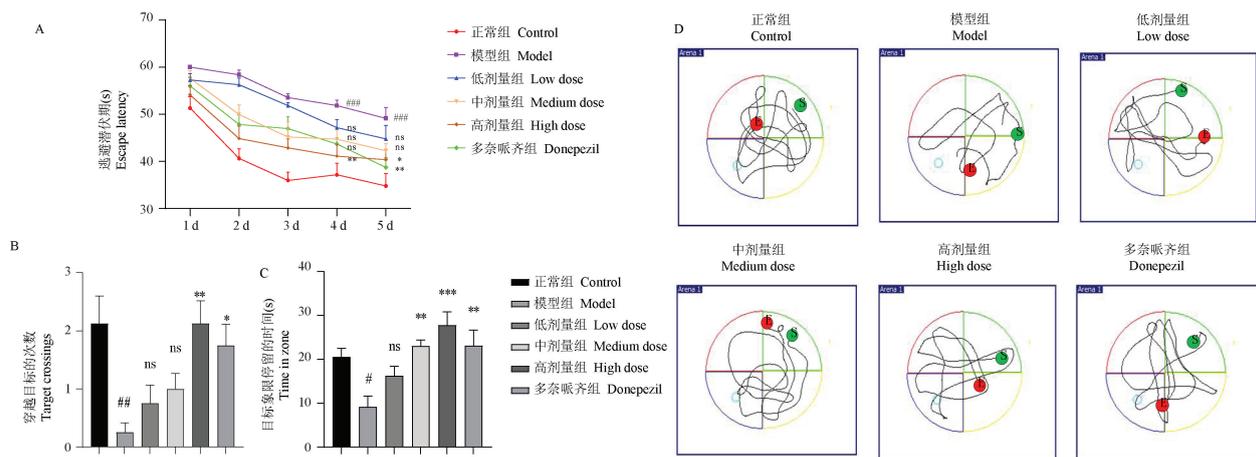
0.001 、 $P < 0.001$), 具有统计学意义; 中、高剂量组、多奈哌齐组中心区域停留的时间延长 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$), 具有统计学意义。表明六味地黄丸可以改善小鼠的运动能力和降低焦虑 (图 3)。

2.2 六味地黄丸降低老龄小鼠海马组织炎症因子的表达

免疫荧光结果显示, 与正常组相比, 模型组 GFAP、TNF- α 平均荧光强度增加 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), 具有统计学意义; 低、中、高剂量组、多奈哌齐组与模型组比较 GFAP ($P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.05$), TNF- α ($P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$) 的表达量均降低, 具有统计学意义; Western blot 结果显示, 低、中、高剂量组、多奈哌齐组与模型组比较, TNF- α 的表达量均降低 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$), 具有统计学意义。结果表明六味地黄丸可以降低小鼠海马区炎症因子的表达 (图 4)。

2.3 六味地黄丸可以增加自噬小体的数量及提高线粒体自噬的能力

透射电子显微镜下观察各组自噬小体的数量, 结果发现, 与正常组相比, 模型组自噬小体数量较少 ($P < 0.05$), 具有统计学意义; 与模型组相比, 高剂量组、多奈哌齐组的自噬小体的数量增加较多 ($P <$

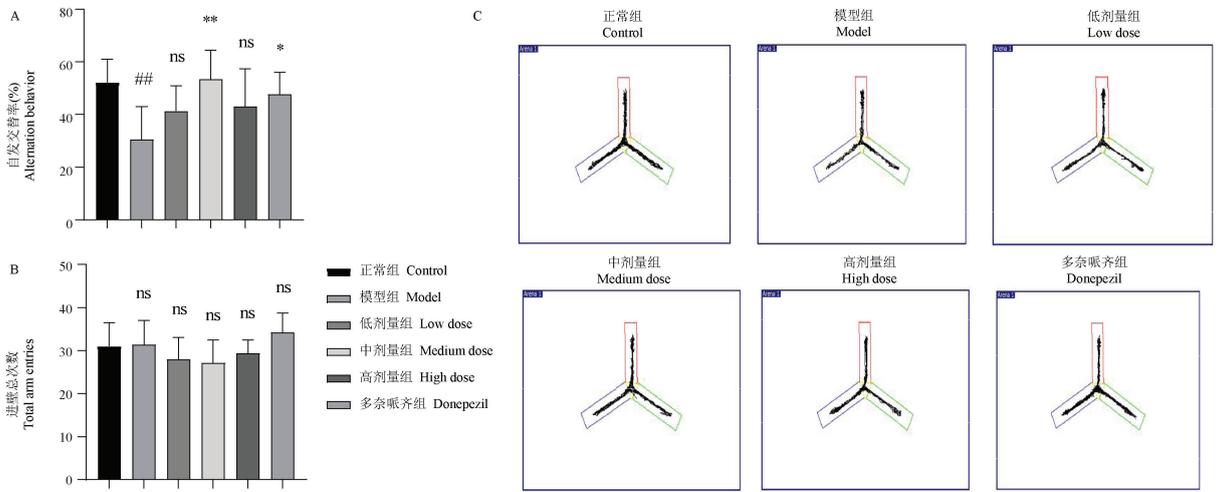


注: A: 六味地黄丸和多奈哌齐对各组小鼠 MWM 的逃避潜伏期影响; B: 六味地黄丸和多奈哌齐对各组小鼠穿越目标的次数影响; C: 六味地黄丸和多奈哌齐对各组小鼠在目标象限停留的时间影响; D: 各组小鼠水迷宫轨迹图。与正常组比较, $\#P < 0.05$, $\#\#\#P < 0.01$, $\#\#\#\#P < 0.001$; 与模型组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

图 1 六味地黄丸对小鼠学习记忆能力的影响 ($n = 10$)

Note. A, Effect of liuwei dihuangwan and donepezil on the escape latency of MWM in mice of each group. B, Effects of liuwei dihuangwan and donepezil on the times of crossing targets in mice of each group. C, Effects of liuwei dihuangwan and donepezil on the time of mice staying in the target quadrant in each group. D, Water maze trajectories of mice in each group. Compared with control group, $\#P < 0.05$, $\#\#\#P < 0.01$, $\#\#\#\#P < 0.001$. Compared with model group, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

Figure 1 Effect of liuwei dihuangwan on learning and memory ability of mice

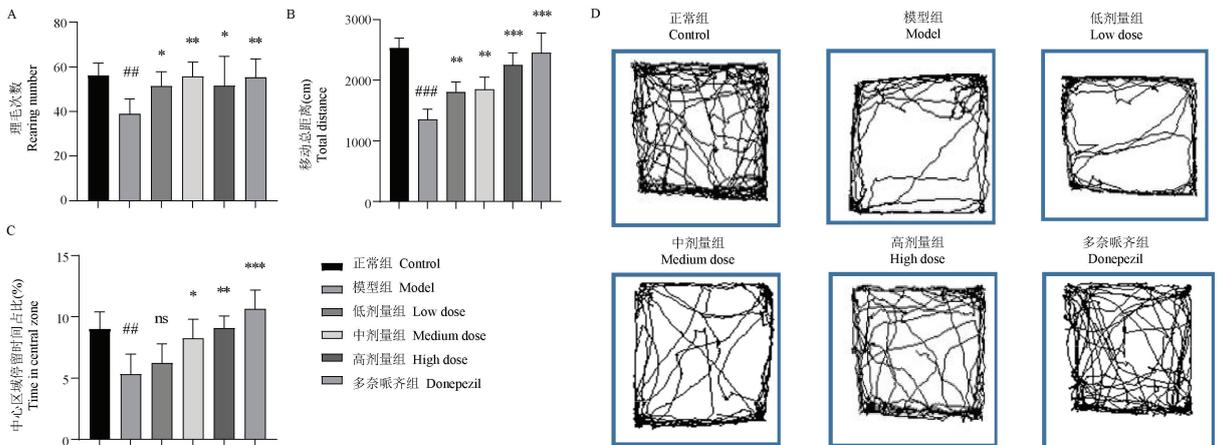


注:A:六味地黄丸和多奈哌齐对小鼠自发自交替率的影响;B:六味地黄丸和多奈哌齐对小鼠进臂总次数的影响;C:各组小鼠的Y迷宫轨迹图。与正常组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图2 六味地黄丸对小鼠空间工作记忆能力的影响($n=10$)

Note. A, Effect of liuwei dihuangwan and donepezil on spontaneous alternation rate in mice. B, Effects of liuwei dihuangwan and donepezil on the total number of arm entries in mice. C, Y maze trajectory of each group of mice. Compared with control group, ## $P<0.01$. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 2 Effects of liuwei dihuangwan on spatial working memory in mice



注:A:六味地黄丸和多奈哌齐对小鼠理毛次数的影响;B:六味地黄丸和多奈哌齐对小鼠运动总距离的影响;C:六味地黄丸和多奈哌齐对小鼠在中心区域停留时间的影响;D:各组小鼠的旷场轨迹图。与正常组比较,## $P<0.01$,### $P<0.001$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

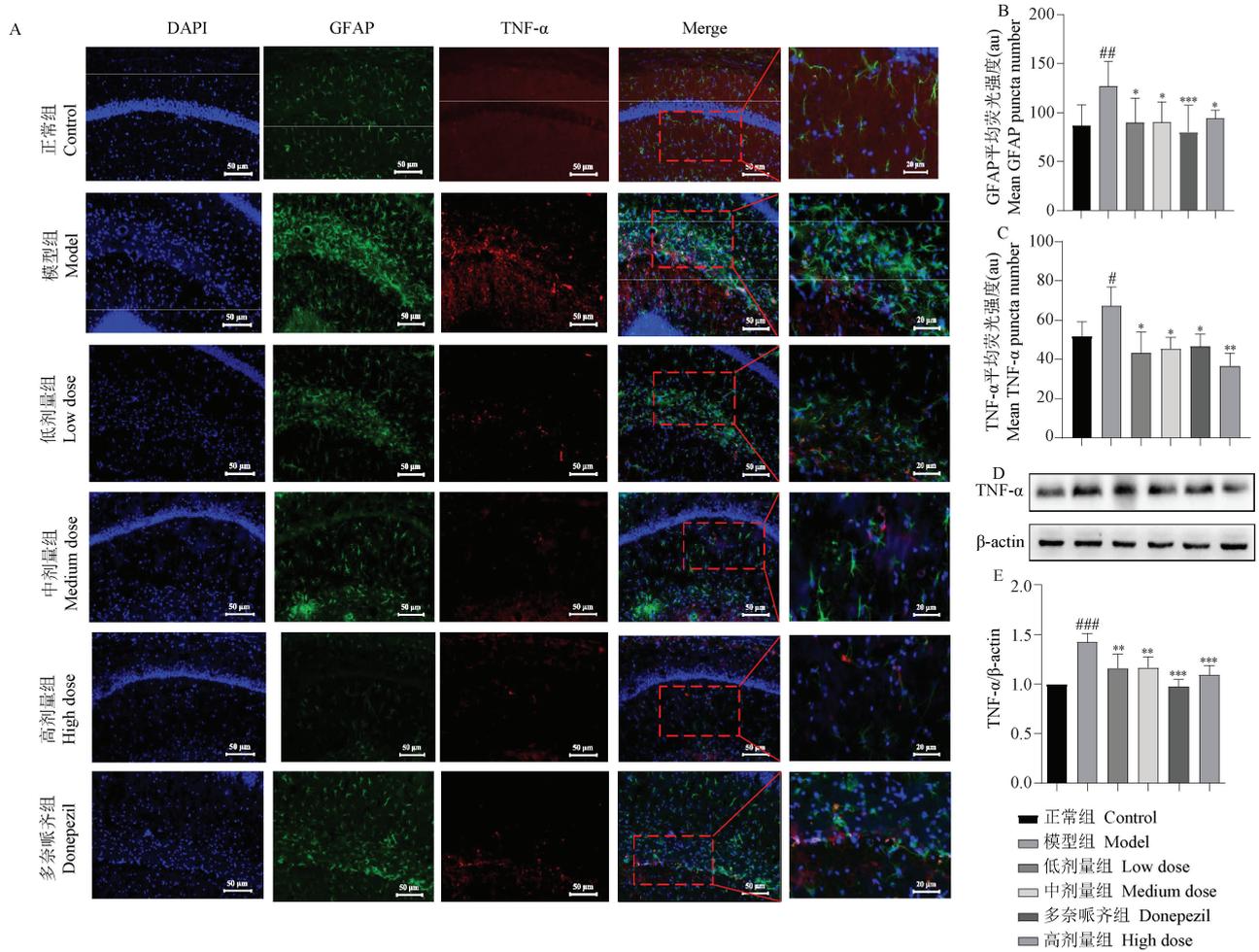
图3 六味地黄丸对小鼠运动能力及焦虑的影响($n=10$)

Note. A, Effect of liuwei dihuangwan and donepezil on the times of hair dressing in mice. B, Effects of liuwei dihuangwan and donepezil on the total distance of exercise in mice. C, Effects of liuwei dihuangwan and donepezil on the residence time in the central region of mice. D, Open field trajectory of mice in each group. Compared with control group, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$. Compared with model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 3 Effects of liuwei dihuangwan on exercise ability and anxiety in mice

0.05),具有统计学意义;Western blot 结果显示,与正常组相比,模型组 PINK1、PARKIN、ATG3、ATG7、LC3B 表达下降($P<0.001$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.001$),P62 表达升高($P<0.05$),具有统

计学意义;与模型组相比,PINK1 低、中、高剂量组、多奈哌齐组表达升高($P<0.01$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$),具有统计学意义;PARKIN 高剂量组、多奈哌齐组表达升高($P<0.05$ 、 $P<0.01$),具有统计学



注:A:GFAP与TNF-α免疫荧光共定位表达,绿色荧光为GFAP阳性表达,红色荧光为TNF-α阳性表达,蓝色荧光为DAPI阳性表达;B:各组小鼠海马区GFAP的荧光强度;C:各组小鼠海马区TNF-α的荧光强度;D:各组小鼠海马区TNF-α蛋白表达情况;E:TNF-α/β-actin相对蛋白表达量统计图。与正常组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$,^{###} $P < 0.001$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$,^{***} $P < 0.001$ 。

图 4 六味地黄丸对老龄小鼠海马组织炎症因子表达的影响 ($n = 4$)

Note. A, GFAP and TNF-α colocalization expression of immunofluorescence, green fluorescence is GFAP positive expression, red fluorescence is TNF-α positive expression, blue fluorescence was DAPI positive expression. B, Fluorescence intensity of GFAP in hippocampus of mice in each group. C, TNF-α in hippocampus of mice in each group fluorescence intensity. D, TNF-α in hippocampus of mice in each group protein expression. E, TNF-α/β-actin statistic diagram of relative protein expression. Compared with control group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$.

Figure 4 Effect of liuweidi Huangwan on the expression of inflammatory factors in hippocampus of aged mice

意义;ATG3 高剂量组、多奈哌齐组表达升高 ($P < 0.001$, $P < 0.001$), 具有统计学意义;ATG7 中、高剂量组、多奈哌齐组表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$), 具有统计学意义;P62 低、中、高剂量组、多奈哌齐组表达升高 ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.001$), 具有统计学意义;LC3B 低、中、高剂量组、多奈哌齐组表达升高 ($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$), 具有统计学意义。结果表明六味地黄丸可以增加自噬小体的数量, 并且可以提高线粒体自噬 (图 5)。

2.4 六味地黄丸可以减轻老龄小鼠海马组织线粒体损伤、提高线粒体融合分裂能力

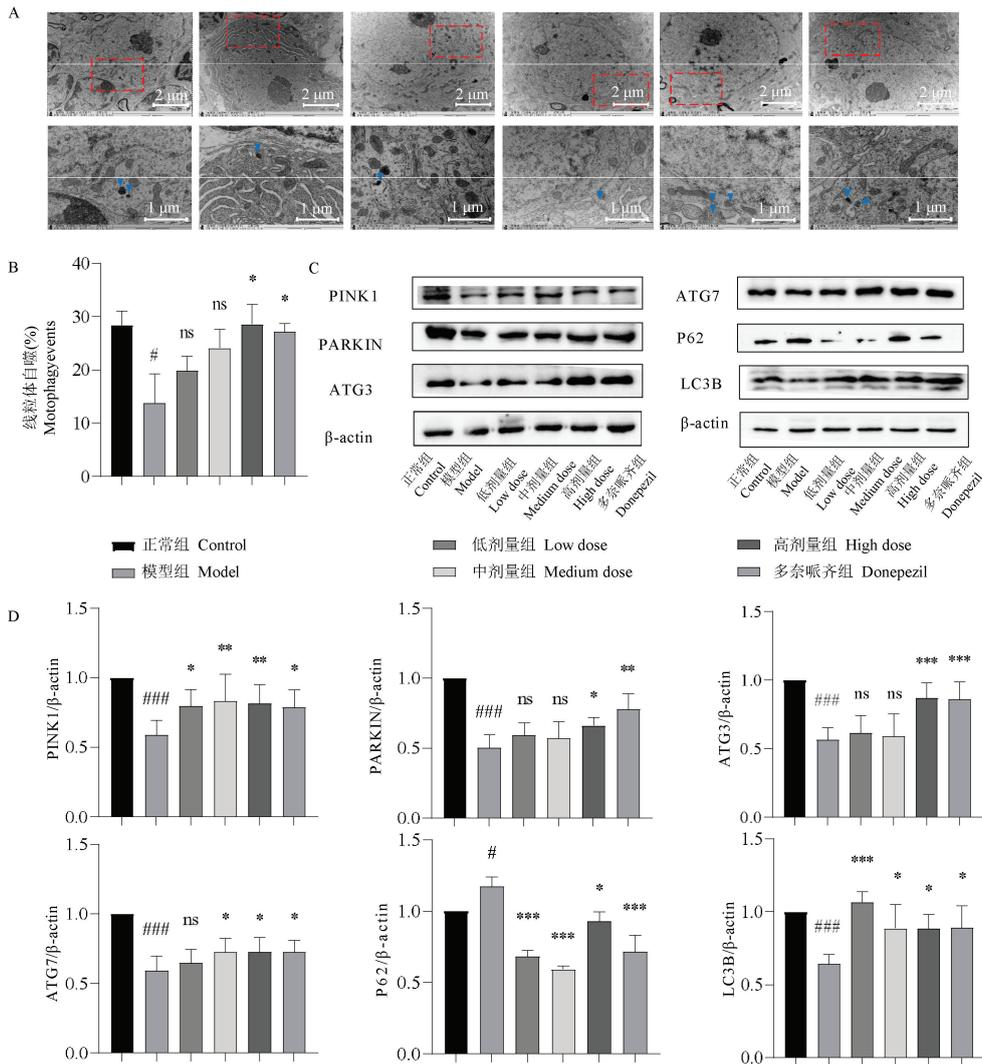
电镜下观察线粒体的损伤状况, 结果发现: 与正常组相比, 模型组受损伤的线粒体数量较多 ($P < 0.05$), 具有统计学意义; 与模型组相比, 低、中、高剂量组和多奈哌齐组的线粒体健康程度较好, 受损伤的线粒体少 ($P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.01$), 具有统计学意义; Western blot 检测线粒体融合分裂蛋白的表达, 实验结果显示, 与正常组相比, 模型组 MFN2、OPA1 表达下降 ($P < 0.001$, $P < 0.01$),

DRP1 表达升高 ($P < 0.05$), 具有统计学意义; 与模型组相比, 低、中、高剂量组、多奈哌齐组的 MFN2 表达升高 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$), 具有统计学意义; 低、中、高剂量组、多奈哌齐组的 OPA1 表达升高 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.05$), 具有统计学意义; 与模型组相比, 低、中、高剂量组、多奈哌齐组的 DRP1 表达降低 ($P < 0.001$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$), 具有统计学意义。结果表明六味

地黄丸可以减轻线粒体损伤, 显著提高线粒体的融合分裂能力(图 6)。

2.5 六味地黄丸可以提高老龄小鼠海马组织线粒体生物发生的能力

Western blot 检测结果如图 7 所示, 与正常组相比, 模型组 TFAM、PGC-1 α 表达下降 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$), 具有统计学意义; 与模型组相比, 低、高剂量组、多奈哌齐组的 TFAM 表达升高 ($P < 0.01$ 、 $P <$



注:A:透射电子显微镜下各组小鼠海马组织中的自噬小体(蓝色箭头所指为自噬小体);B:自噬小体的量化统计;C:线粒体自噬相关蛋白的条带;D:线粒体自噬相关蛋白的统计分析。与正常组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

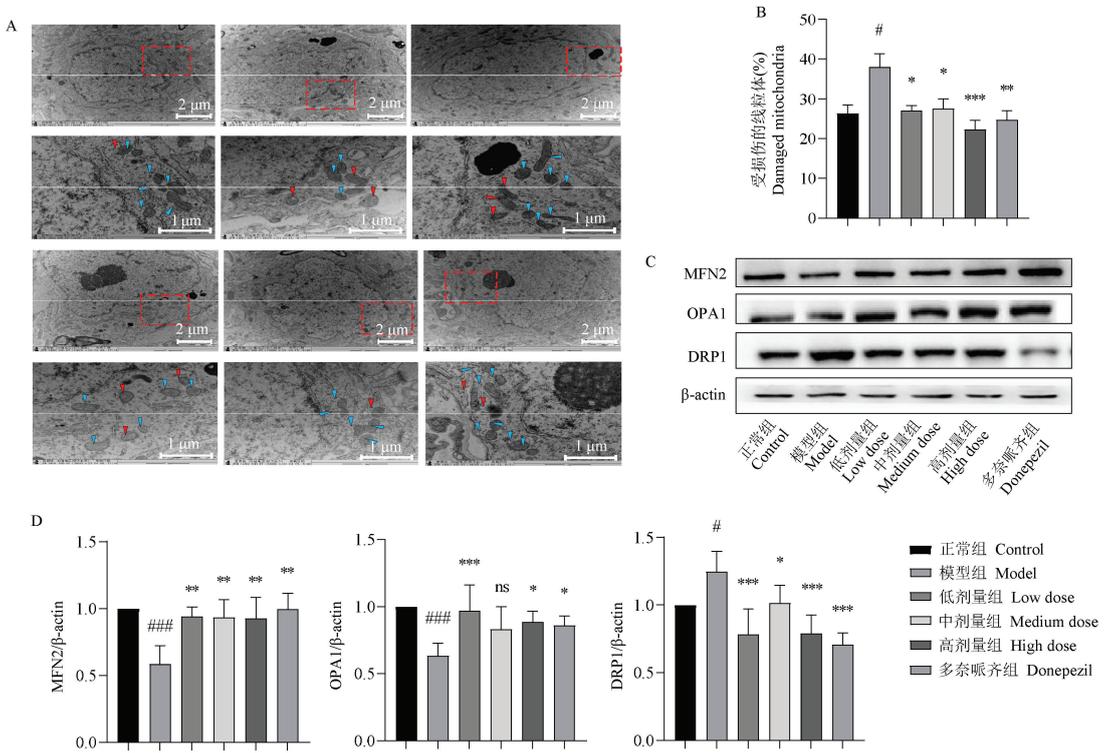
图 5 六味地黄丸对老龄小鼠海马组织自噬小体的数量及线粒体自噬相关蛋白表达的影响($n = 3$)

Note. A, Autophagosome in hippocampal tissues of each group of mice under transmission electron microscopy (The blue arrows point to autophagosome). B, Quantitative statistics of autophagosome. C, Bands of mitochondrial autophagy-related proteins. D, Statistical analysis of mitochondrial autophagy-related proteins. Compared with control group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$. Compared with model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 5 Effects of liuweidi Huangwan on the number of autophagosome in hippocampal tissue and the expression of mitochondrial autophagy-related proteins in aged mice

0.05、 $P < 0.05$), 具有统计学意义; 低、中、高剂量组、多奈哌齐组的 PGC-1 α 表达升高 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、

$P < 0.001$ 、 $P < 0.01$), 具有统计学意义。结果表明, 六味地黄丸可以显著提高线粒体的生物发生能力。

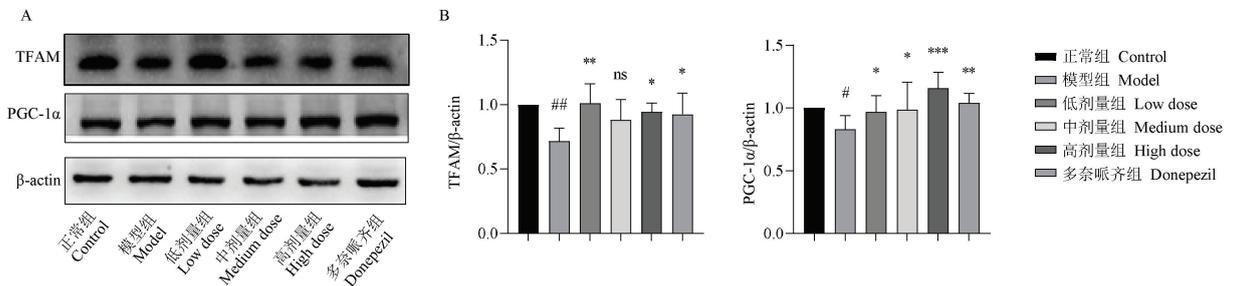


注: A:透射电子显微镜下各组的线粒体的形态(红色箭头所指为受损线粒体,蓝色箭头所指为健康线粒体); B:各组小鼠受损伤线粒体的量化统计; C:线粒体融合分裂相关蛋白的条带; D:线粒体融合分裂相关蛋白的量化统计。与正常组比较, $\#P < 0.05$, $###P < 0.001$; 与模型组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

图6 六味地黄丸对老龄小鼠海马组织线粒体形态及融合分裂相关蛋白表达的影响 ($n=3$)

Note. A, Morphology of mitochondria in each group under transmission electron microscopy (The red arrow point to damaged mitochondria, and the blue arrow point to healthy mitochondria). B, Quantitative statistics of damaged mitochondria in mice in each group. C, Bands of mitochondrial fusion division-associated proteins. D, Quantitative statistics of mitochondrial fusion and division-related proteins. Compared with control group, $\#P < 0.05$, $###P < 0.001$. Compared with model group, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

Figure 6 Effects of liuweidi huangwan on mitochondrial morphology and fusion division-related protein expression in hippocampal tissues of aged mice



注: A:线粒体生物发生相关蛋白的条带; B:线粒体生物发生相关蛋白的量化统计。与正常组比较, $\#P < 0.05$, $##P < 0.01$; 与模型组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

图7 六味地黄丸对老龄小鼠海马组织线粒体生物发生相关蛋白表达的影响 ($n=3$)

Note. A, Bands of mitochondrial biogenesis-related proteins. B, Quantitative statistics of mitochondrial biogenesis-related proteins. Compared with control group, $\#P < 0.05$, $##P < 0.01$. Compared with model group, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

Figure 7 Effects of liuweidi huangwan on the expression of mitochondrial biogenesis-related proteins in hippocampal tissues of aged mice

3 讨论

脑衰老是机体大环境和脑局部微环境的改变,导致脑组织、生理功能发生不可逆的退行性改变,表现为学习记忆和运动功能减退、脑萎缩等^[7]。随着人体的脑衰老,病理改变以海马神经元线粒体丰度下降,线粒体损伤增多,导致能量生成减少,氧化应激水平为主要表现^[8]。此外,损伤的线粒体会导致促凋亡因子及炎症因子的表达升高,影响衰老脑的认知功能^[9]。在目前对脑衰老的研究中,发现减轻线粒体的损伤,改善线粒体质量控制系统,可以在一定程度上缓解脑衰老的进程^[10]。

脑衰老在传统中医医学文化里,是由多种因素造成的,诸如:肾精不足致衰、脾胃虚弱致衰、阴阳失调致衰、津液不足致衰、痰浊血瘀致衰等理论,其中“肾衰”是导致人体脑衰老的最为认可的因素^[11]。《医学正传》曰:肾气盛则延寿,肾气衰则寿夭。可知,在古时候,中医就意识到肾在人体衰老过程中扮演着重要角色。人体步入老年,脏腑亏虚,气血不足,先天之精耗损严重,肾精不得则上冲于脑,则脑失所养,故肝脾肾虚则脑髓无以化生,从而引发脑衰老。六味地黄丸是传统中医药里面的一味经典名方,具有补肝肾、益精血,强筋骨的作用,可以有效地“补肾”^[12]。现代药理学研究表明,六味地黄丸具有免疫调节、抗衰老、抗氧化、改善肾功能、保护神经等现代药理作用^[13-14]。本实验通过选择六味地黄丸干预老龄小鼠,观察六味地黄丸对老龄小鼠认知功能的影响、小鼠海马区神经炎症和线粒体质量控制系统的影 响,探究其中多靶点、多途径的治疗逻辑与可能存在的分子生物学联系。

本实验首先通过行为学实验证实六味地黄丸能够改善自然衰老小鼠的空间学习记忆能力。实验结果表明六味地黄丸各治疗组小鼠的空间学习记忆能力明显优于模型组小鼠的空间学习记忆能力。此外,通过旷场实验发现六味地黄丸也能够明显改善老龄小鼠的运动能力和焦虑情绪。有研究表明传统中医补肾填精药方可以改善衰老引起的认知功能障碍和提高学习记忆能力^[15]。随后,我们进一步探讨六味地黄丸对认知能力改善的生物学机制。

在脑衰老的过程中,会有大量的炎症因子产生,伴随着炎症因子的积聚和星形胶质细胞的大量激活、积聚,又会加速脑衰老^[16-17]。研究表明星形

胶质细胞在生理状态下可以分泌一些神经营养因子和细胞因子,调节神经元功能^[18]。但同时激活的星形胶质细胞不仅有神经保护作用,它们也破坏神经细胞并促进多种神经退行性疾病的发生^[19]。这表明星形胶质细胞在调控脑部的神经炎症方面,发挥着重要作用。伴随着脑部星形胶质细胞的大量激活,大量的炎症因子也会被释放出来,脑部促炎因子的释放,会进一步对神经元细胞造成损害。本实验通过检测炎症因子 TNF- α 在老龄小鼠海马区的表达以及星形胶质细胞的激活状态发现,经过六味地黄丸干预后,炎症因子 TNF- α 的表达量降低,星形胶质细胞激活减少,从而表明六味地黄丸可以缓解脑内神经炎症的失衡和脑内神经炎症对神经系统的损坏。

线粒体质量控制系统是生物维持机体线粒体稳态的重要机制,其主要包括线粒体融合分裂、线粒体自噬和线粒体生物发生三个方面^[20]。线粒体生物发生与线粒体自噬可以促进线粒体的生成与分解,线粒体融合分裂可以修复受损的线粒体,三者共同维持线粒体数量和质量的稳定^[21]。线粒体质量控制系统受到破坏,一方面表现为线粒体的形态、结构、数量、功能发生改变^[22];另一方面表现为抗氧化能力、炎症反应、自噬障碍、磷酸化修饰等病理发生过程^[23]。有研究表明,年龄与线粒体质量控制系统破坏密切相关,老年脑海马组织神经元线粒体丰度下降,线粒体损伤增多,导致能量生成减少,氧化应激水平上升^[24]。此外,损伤的线粒体也会导致促凋亡因子及炎症因子的表达升高,损伤脑的认知功能^[25]。

线粒体的融合分裂是在多种蛋白质的精确配合下协同进行的,过程高度保守,融合与分裂之间保持动态平衡,这种动态平衡对于线粒体维持自身的形态、功能和分布很重要^[26]。线粒体的融合主要包含两个步骤,即由 MFN 介导的外膜融合和由 OPA1 介导的内膜融合。相邻的两个线粒体实现外膜和内膜的融合,从而变成一个呈纤维状延伸和网络状结构的线粒体^[27]。DRP1 是目前发现的唯一的线粒体分裂蛋白,多数的线粒体分裂都需要 DRP1 蛋白的参与,DRP1 可以通过不同的方式被激活来驱动线粒体分裂。实验结果显示六味地黄丸提高了线粒体融合蛋白 MFN2、OPA1 的表达,降低了 DRP1 的表达^[28]。提示六味地黄丸可能通过改善线粒体融合分裂的能力,保护神经元,抗脑衰老。

自噬即“自己吃自己”是细胞吞噬自身的错误折叠蛋白和破损细胞器,并将其包裹进囊泡,与溶酶体结合,形成自噬溶酶体,降解其吞噬的内容物,以此满足能量代谢的需求和细胞器的更新^[29]。线粒体自噬是自噬的一种,是线粒体质量控制系统的重要组成部分,是由 PINK1-PARKIN 介导的清除细胞内损伤细胞器或者多余细胞的过程^[30]。PINK1 是受损线粒体的分子传感器,是线粒体自噬的“启动子”,可以触发线粒体自噬的起始信号,并将 PARKIN 募集至线粒体。PARKIN 是线粒体自噬信号的“增强子”,可以将线粒体外膜上的线粒体蛋白 MFN1、MFN2、VDAC1 泛素化,并进一步扩大自噬信号。线粒体外膜上的蛋白泛素化后,线粒体外膜会积聚大量包括 P62 在内的受体蛋白,LC3B 蛋白与泛素化的受损线粒体结合,自噬小体与溶酶体结合,受损线粒体被降解^[31]。我们的实验结果显示六味地黄丸可以提高 PINK1、PARKIN、ATG3、ATG7、LC3B 线粒体自噬蛋白的表达,降低 P62 的表达。自噬小体可以直观地表达一个细胞的自噬水平,是衡量细胞自噬能力的有效标准。在透射电子显微镜的观察下发现,与模型组相比,低、中、高剂量组自噬小体的数量均多于模型组,这说明六味地黄丸可以提高细胞内的自噬小体的数量。以上实验结果表明六味地黄丸可能通过 PINK1-PARKIN 信号通路,影响相关线粒体自噬蛋白的表达,提高神经元细胞的线粒体自噬水平,保护神经元,抗脑衰老。

线粒体生物发生是指线粒体前体的生长和分化,是为满足能量供应而刺激新的线粒体产生,增加细胞线粒体质量和数量的过程^[32]。新生的线粒体在细胞内运转一段时间后,其功能会有不同程度的下降,两个甚至多个线粒体发生融合的时候,会共享线粒体内部的资源,维持线粒体正常运转的同时极大地节省了资源^[33]。融合的线粒体如果线粒体功能出现故障,线粒体会开始分裂,不能用的线粒体会被分裂出去,还能继续用的线粒体继续融合,不能用的线粒体会被自噬等途径分解成氨基酸重新利用^[34]。线粒体融合分裂与线粒体自噬都是为了让线粒体更好地执行其的任务;线粒体生物发生。PGC-1 α 是目前被认为最重要的线粒体生物合成调节因子,是维持神经元存活和突触传递的关键因素^[35]。TFAM 是一种核编码因子,可转运到线粒体,与线粒体 DNA 的 D 环结合,激活其复制和转录^[36]。TFAM 是由 PGC-1 α 通过与 NRFs 共活化而

调控的^[37]。以上研究表明 PGC-1 α 和 TFAM 在线粒体生物发生过程中发挥了重要作用。Western blot 实验结果显示:六味地黄丸各剂量组可以提高 PGC-1 α 和 TFAM 的表达,提示六味地黄丸可能通过改善线粒体生物发生抗脑衰老。

综合以上实验结果,本实验通过六味地黄丸干预老龄小鼠,探究六味地黄丸对老龄小鼠脑老化诱发的神经退行性病变的保护作用。证明了六味地黄丸可以减轻老龄小鼠海马区的神经炎症,调节线粒体的质量控制系统,进而改善老龄小鼠的学习记忆能力,从而为六味地黄丸应用于衰老引起的神经退行性疾病的治疗提供理论和实验依据。

参考文献:

- [1] Schmid ET, Pyo JH, Walker DW. Neuronal induction of BNIP₃-mediated mitophagy slows systemic aging in *Drosophila* [J]. Nat Aging, 2022, 2(6): 494-507.
- [2] Eldeeb MA, Thomas RA, Ragheb MA, et al. Mitochondrial quality control in health and in Parkinson's disease [J]. Physiol Rev, 2022, 102(4): 1721-1755.
- [3] Blinkouskaya Y, Caçoilo A, Gollamudi T, et al. Brain aging mechanisms with mechanical manifestations [J]. Mech Ageing Dev, 2021, 200: 111575.
- [4] Chung KW, Dhillon P, Huang S, et al. Mitochondrial damage and activation of the STING pathway lead to renal inflammation and fibrosis [J]. Cell Metab, 2019, 30(4): 784-799.
- [5] 张博, 李炎, 黄树明. “肾通于脑”理论的科学实质探析 [J]. 辽宁中医杂志, 2022, 49(1): 62-64.
- [6] 高巴东, 邓洋洋, 王重一, 等. “肾-骨-髓-脑”相关性及其临床意义 [J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36(6): 44-47.
- [7] Montine TJ, Cholerton BA, Corrada MM, et al. Concepts for brain aging: resistance, resilience, reserve, and compensation [J]. Alzheimers Res Ther, 2019, 11(1): 22.
- [8] Mertens J, Reid D, Lau S, et al. Aging in a dish: iPSC-derived and directly induced neurons for studying brain aging and age-related neurodegenerative diseases [J]. Annu Rev Genet, 2018, 52: 271-293.
- [9] van Horsen J, van Schaik P, Witte M. Inflammation and mitochondrial dysfunction: a vicious circle in neurodegenerative disorders? [J]. Neurosci Lett, 2019, 710: 132931.
- [10] Nabi SU, Khan A, Siddiqui EM, et al. Mechanisms of mitochondrial malfunction in Alzheimer's disease: new therapeutic hope [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 4759963.
- [11] 邱朝阳, 刘萍, 霍青. 基于“肾藏精, 精舍志”论帕金森认知障碍病机 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(5): 593-595.
- [12] 李彬. 六味地黄丸的药理分析及临床应用研究 [J]. 智慧健康, 2022, 8(33): 186-190.

- [13] 刘妍, 王蕾. 六味地黄及金匱肾气方的现代药理研究进展 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(11): 996-998.
- [14] 吴梅艳, 李平. 六味地黄丸的药理作用及临床运用综述 [J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(9): 1023-1025.
- [15] 毛蕾, 张玉莲. 补肾填精中药治疗老年性痴呆 [J]. 吉林中医药, 2010, 30(5): 394-396.
- [16] Linnerbauer M, Wheeler MA, Quintana FJ. Astrocyte crosstalk in CNS inflammation [J]. *Neuron*, 2020, 108(4): 608-622.
- [17] Walker KA, Basisty N, Wilson DM 3rd, et al. Connecting aging biology and inflammation in the omics era [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(14): e158448.
- [18] Zhang YP, Li YY, Zhang C, et al. Interleukin-10 attenuates behavioral, immune and neurotrophin changes induced by chronic central administration of interleukin-1 β in rats [J]. *Neuroimmunomodulation*, 2022, 29(4): 380-390.
- [19] Endo F, Kasai A, Soto JS, et al. Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease [J]. *Science*, 2022, 378(6619): eadc9020.
- [20] Ng MYW, Wai T, Simonsen A. Quality control of the mitochondrion [J]. *Dev Cell*, 2021, 56(7): 881-905.
- [21] Liu L, Li Y, Wang J, et al. Mitophagy receptor FUNDC1 is regulated by PGC-1 α /NRF1 to fine tune mitochondrial homeostasis [J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(3): e50629.
- [22] Rosina M, Ceci V, Turchi R, et al. Ejection of damaged mitochondria and their removal by macrophages ensure efficient thermogenesis in brown adipose tissue [J]. *Cell Metab*, 2022, 34(4): 533-548.
- [23] Picca A, Calvani R, Coelho-Junior HJ, et al. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and neuroinflammation: intertwined roads to neurodegeneration [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(8): 647.
- [24] Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 44879-44905.
- [25] Marchi S, Guilbaud E, Tait SWG, et al. Mitochondrial control of inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(3): 159-173.
- [26] Toda C, Kim JD, Impellizzeri D, et al. UCP₂ regulates mitochondrial fission and ventromedial nucleus control of glucose responsiveness [J]. *Cell*, 2016, 164(5): 872-883.
- [27] Gao S, Hu J. Mitochondrial fusion: the machineries in and out [J]. *Trends Cell Biol*, 2021, 31(1): 62-74.
- [28] Quiles JM, Gustafsson ÅB. The role of mitochondrial fission in cardiovascular health and disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2022, 19(11): 723-736.
- [29] Kim KH, Lee MS. Autophagy—a key player in cellular and body metabolism [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(6): 322-337.
- [30] Nguyen TN, Padman BS, Lazarou M. Deciphering the molecular signals of PINK1/parkin mitophagy [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(10): 733-744.
- [31] Geisler S, Holmström KM, Skujat D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(2): 119-131.
- [32] Li PA, Hou X, Hao S. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration [J]. *J Neurosci Res*, 2017, 95(10): 2025-2029.
- [33] Adebayo M, Singh S, Singh AP, et al. Mitochondrial fusion and fission: the fine-tune balance for cellular homeostasis [J]. *FASEB J*, 2021, 35(6): e21620.
- [34] Ding Q, Qi Y, Tsang SY. Mitochondrial biogenesis, mitochondrial dynamics, and mitophagy in the maturation of cardiomyocytes [J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2463.
- [35] Han B, Jiang W, Liu H, et al. Upregulation of neuronal PGC-1 α ameliorates cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Theranostics*, 2020, 10(6): 2832-2848.
- [36] Li Y, Yang Q, Chen H, et al. TFAM downregulation promotes autophagy and ESCC survival through mtDNA stress-mediated STING pathway [J]. *Oncogene*, 2022, 41(30): 3735-3746.
- [37] Wojewoda M, Duszyński J, Szczepanowska J. NARP mutation and mtDNA depletion trigger mitochondrial biogenesis which can be modulated by selenite supplementation [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(8): 1178-1186.

[收稿日期]2022-10-31