

血栓通对阿尔茨海默症模型小鼠认知功能及神经异常兴奋性的作用及其机制研究

刘慧¹⁾, 严国纪¹⁾, 吴嘉²⁾, 王丹¹⁾, 习杨彦彬¹⁾, 李珊珊²⁾

(1)昆明医科大学神经科学研究院;

2)基础医学院实验教学中心, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 探究血栓通 [主要有效成分为三七皂苷 (*panax notoginseng*, PNS)] 对阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 模型小鼠认知功能及神经兴奋性的影响, 并探讨其潜在分子机制。 **方法** 用 APP/PS1 小鼠作为 AD 研究动物模型, 在小鼠淀粉样蛋白尚未检测到阶段 (2 月龄) 开始每日以 60 mg/kg 对血栓通组 (APP/PS1+PNS) 行灌胃给药, 每日 1 次, 连续给药 6 个月 (给药至 8 月龄); 对照组小鼠予同体积的 0.9% 氯化钠 (APP/PS1+vehicle) 灌胃处理, 同月龄野生型小鼠予 0.9% 氯化钠灌胃处理作为正常对照组 (WT+ vehicle), 每组各 15 只。6 个月后, 新物体识别实验、Morris 水迷宫实验检测小鼠的认知功能; EEG 脑电检测、Western blot、细胞表面生物素化试验以检测各组小鼠皮质与海马中 BACE1 的活性、Nav1.1 α 的分布、表达以及 Nav β 2 的表达与酶解情况 (Nav β 2 的酶解片段 Nav β 2 full length 及 Nav β 2-CTF 表达检测)。 **结果** 新物体识别实验显示, 与对照组 APP/PS1 小鼠相比, 血栓通给药后 APP/PS1 小鼠的辨别指数 (discrimination index, DI) 上升 ($P < 0.05$); Morris 水迷宫检测结果发现, 血栓通灌胃 6 个月后小鼠在探索实验中逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05$), 撤除平台后在目标象限停留时间增加 ($P < 0.05$)、穿梭平台次数增加 ($P < 0.05$); EEG 脑电检测结果发现, 血栓通给药后减少了 APP/PS1 小鼠棘波放电出现的频率 ($P < 0.05$)。血栓通给药后显著降低了 BACE1 蛋白水平的表达 ($P < 0.05$), 而全长片段 Nav β 2 的蛋白水平显著上升 ($P < 0.05$), 并纠正了 Nav1.1 α 在神经元内外的异常分布 ($P < 0.05$)。 **结论** 血栓通可以改善 AD 模型小鼠的学习记忆能力、纠正大脑异常兴奋性, 其作用机制可能与抑制 BACE1 的活性从而减少 Nav β 2 由 APP/PS1 诱导的过度酶解, 纠正皮质、海马神经元 Nav1.1 α 的异常表达与分布, 调节神经元的兴奋性有关。

[关键词] 血栓通; 阿尔茨海默症; 认知功能; BACE1; Nav β 2 酶解; Nav1.1 α 分布

[中图分类号] R741.05 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)02-0023-09

Effects and Mechanisms of Xueshuantong on the Cognitive Function and Abnormal Neural Excitability in Mice with Alzheimer's Disease

LIU Hui¹⁾, YAN Guoji¹⁾, WU Jia²⁾, WANG Dan¹⁾, XI YANGYanbin¹⁾, LI Shanshan²⁾

(1) Institute of Neuroscience; 2) Experimental Teaching Center, Basic Medical College, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To explore the possible effects and the underlying molecular mechanisms of xueshuantong [The main active component is *panax notoginseng* (PNS)] on the cognitive function and neural excitability of mice with Alzheimer's disease (AD). **Methods** The APP/PS1 mice were used as an animal model for AD research, at the stage when amyloid protein was not detected in mice (2 months of age). Mice in the

[收稿日期] 2023-10-15

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2023Y0608); 云南省科技厅基础研究专项基金资助项目 (202101AT070001)

[作者简介] 刘慧 (2000~), 女, 云南曲靖人, 医学学士, 在读本科生。

[通信作者] 习杨彦彬, E-mail: xiyangyanbin@kmmu.edu.cn; 李珊珊, E-mail: 94186610@qq.com

xueshuantong group (APP/PS1+PNS) were administered by gavage once a day at a dose of 60 mg/kg for six months (for 8 months of age). The mice of the control group were given 0.9% sodium chloride (APP/PS1+Vehicle) intragastric treatment of the same volume, while the wild-type mice of the same age were given 0.9% sodium chloride intragastric treatment as the normal control group (WT+Vehicle) (15 mice in each group, $n=15$). After six months, the cognitive function of the mice was evaluated by the Novel Object Recognition (NOR) task and Morris Water Maze (MWM) test. The activity of BACE1, the distribution and expression of Nav1.1 α , as well as the expression and enzymatic hydrolysis of Nav β 2 (Nav β 2 full-length and Nav β 2-CTF fragments) in cortex and hippocampus were detected by EEG, Western blot and cell surface biotinylation assay, respectively. **Results** The NOR task showed that compared with the mice in the APP/PS1+Vehicle group, the Discrimination index (DI) of mice in the APP/PS1 group was significantly increased after xueshuantong administration ($P < 0.05$). The MWM test found that, the escape latency of the mice in the xueshuantong group was shortened followed six months in gastric administration ($P < 0.05$), while the stay time in the target quadrant and the number of platforms significantly increased ($P < 0.05$) after the removal of the platform. The results of EEG recording showed that xueshuantong reduced the frequency of spike-wave discharges in APP/PS1 mice ($P < 0.05$). Furthermore, xueshuantong significantly reduced the expression of BACE1 ($P < 0.05$). In the APP+PNS group, the expression of Nav β 2 full-length was increased ($P < 0.05$), as well as corrected the abnormal distribution of Nav1.1 α inside and outside of neurons ($P < 0.05$). **Conclusion** Treatment with xueshuantong can significantly improve the learning and memory ability and correct the abnormal excitability of the brain in AD model mice. The mechanism may be related to the inhibition of BACE1 activity, the reduction of APP/PS1-induced excessive enzyme digestion of Nav β 2, the correction of the abnormal expression and distribution of Nav1.1 α in cortical and hippocampal neurons, as well as the subsequent regulation of neuronal excitability.

[**Key words**] Xueshuantong; Alzheimer's disease; Cognition; BACE1; The enzymolysis of Nav β 2; The distribution of Nav1.1 α

阿尔茨海默病(alzheimer's disease, AD)是最典型的痴呆症形式, 预计老年人的发病率将进一步呈指数级增长, 导致全球近 4700 万人患病^[1]。AD 的特征是认知能力的逐渐下降, 这将会对患者的家庭和卫生保健系统造成沉重的负担。研究人员一直在试图寻找可能有助于减缓 AD 进展的药物治疗方法。然而到目前为止的结果并不令人满意^[1]。因此, 开发治疗 AD 的新药成为当务之急。

血栓通是一种临床上常用于预防和治疗缺血性疾病的中药制剂, 其有效成分主要为三七皂苷^[2]。研究表明, 血栓通能够在抗心肌梗死、抗血栓形成、抗脑缺血/再灌注损伤、抗氧化和改善微循环障碍等方面发挥作用^[3-7]。作为血栓通的主要成分, 三七皂苷在多种疾病中的治疗作用也被广泛报道^[8-12]。研究表明, 血栓通在 AD 动物模型中具有神经保护作用^[13]。血栓通在 AD 早期通过提高超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化酶的活性来对抗氧化应激损伤^[14], 也可通过调控 α 和 β 2 种分泌酶来减少 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta_{1-40}$ 沉积从而减少淀粉前体蛋白

(amyloid precursor protein, APP)产生^[15]。然而在 AD 小鼠模型中血栓通是否通过调节神经元兴奋性发挥神经元保护作用尚不清楚。

在本课题组之前的研究中证实, Nav β 2 的编码基因 SCN2B 可能与快速老化小鼠额叶和海马的老化进程密切相关^[16]; SCN2B 下调 60.68% 通过增加海马神经元棘突的数量, 显著改善转基因小鼠海马依赖性的空间认知记忆并且有利于易化海马神经元的长时程电势^[16]; 在 AD 动物海马中 Nav- β 2 增龄性表达上调的同时还存在显著的功能异常, 表现为 Nav β 2 过度降解(由 BACE1 及 γ -secretase)及促使钠离子通道蛋白功能亚基 Nav1.1 α 发生异常的细胞内转位, Nav β 2 knockdown 部分纠正了 APP/PS1 转基因鼠海马和额叶皮质中 Nav β 2 的异常状态, 扭转了 Nav β 2 的过度降解及异常的 Nav1.1 α 细胞内转位, 部分恢复了 APP/PS1 转基因鼠海马神经元的电兴奋性, 并显著改善转基因小鼠学习记忆能力, 促使 APP 向非淀粉样酶解途径进展^[17-18]。这些研究结果确定了 SCN2B 在脑老化认知功能障碍发生中的作用; 而血栓通用药后可以显著逆转 SCN2B 在快速老化小鼠大脑组

织中的增龄性表达上调^[16]。综上所述,结合文献报道及前期研究工作,笔者推测血栓通的抗脑老化作用可能与对学习记忆功能脑区 Nav β 2 的表达调控相关,本文围绕此论点展开研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 2月龄的 C57BL/6J 小鼠(野生型, WT 小鼠)购自昆明医科大学实验动物中心, APP/PS1 转基因小鼠购自美国杰克逊实验室。小鼠均分笼饲养与 21℃~25℃ 的转基因动物房内,相对湿度 50%~60%,光照时间为 12 h/12 h 昼夜交替,饲料与饮水正常供给。本研究通过昆明医科大学伦理委员会批准进行实验动物护理和相关操作,伦理批号: Kmmu20190024。手术过程中采用异氟烷诱导麻醉。

1.1.2 药品来源 血栓通为云南植物药业有限公司生产的注射液,主要成分为 PNS,总苷含量 >70% (Rb1 >30%, Rg1 >20%, R1 >5%),批号: Z53020135,规格: 100 mg/2 mL 每支。

1.2 动物分组

APP/PS1 转基因小鼠被随机分成两组,每组 15 只,药物治疗组用灭菌医用 0.9% 氯化钠按 5 mg/mL 配制,以 60 mg/kg 对血栓通组(APP/PS1+PNS)行灌胃,每日 1 次,连续 6 个月给药。对照组小鼠予同体积的 0.9% 氯化钠(APP/PS1+Vehicle)灌胃处理,同月龄野生型小鼠予 0.9% 氯化钠灌胃处理作为正常对照组(WT+Vehicle)。

1.3 新物体识别实验

连续给药 6 个月后,进行新物体识别实验(硬件及分析软件均购自上海欣软信息科技有限公司),评估小鼠对新物体任务的记忆。使用一个 40 cm×40 cm×40 cm 的透明塑料盒作为实验仪器,全程摄像头记录。实验持续 3 d。实验第 1 天为小鼠适应阶段,将小鼠放入仪器进行实验前的环境适应,时间为 5 min,在此时间内小鼠可以自由的探索实验环境,此时环境不放置任何物体。第 2 天,在仪器内放置两个完全相同的物体,将小鼠从同一位置放入仪器,进行 5 min 的探索。第 3 天,一个新物体作为仪器中一个物体的替代品,再将小鼠从相同位置放入仪器,进行 5 min 的探索,并记录小鼠探索新物体和原有旧物体所花费的时间。计算每只小鼠的物体辨别指数(discrimination index, DI)。DI = (探索新奇物体的

时间-探索熟悉物体的时间)/(探索新奇物体的时间+探索熟悉物体的时间)×100%。

1.4 Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫由 1 个圆形池(直径 100 cm,深 50 cm)组成,里面充满了(24±1)℃ 以及 20 cm 深的白水。Morris 水迷宫按文献描述进行^[16]。所有的小鼠都进行 1 个初步的预实验,让它们能够适应水,并让它们踩上 1 个白色的平台(隐藏在水面下),这样可排除小鼠因游泳能力不足或视力障碍而不能找到平台干扰实验结果。预实验是在常规测试的前 1 天进行。在这个实验中,小鼠被放置在水中游 60 s,然后被放置在 1 个淹没在水下的白色平台上停留 1~2 s。预实验结束后是为期 5 d 的学习训练,隐藏的平台被放置在 1 个不同的位置。小鼠从入水至发现隐藏的水下白色平台所需的时间被记录为逃逸潜伏期,并连续记录 5 d。在训练第 6 天的探针实验中,平台被移除,在 60 s,记录小鼠在目标象限中花费的时间百分比、在目标象限中游泳路径和通过目标平台的次数,以及在这四个象限内所花费的时间和游泳的总距离,以评估它们对平台位置的记忆。用头顶摄像机跟踪动物,数据用动物行为视频分析系统进行分析(上海欣软信息科技有限公司)。

1.5 脑电图检测

对于脑电图(electroencephalogram, EEG)记录,研究中使用了使用聚酰亚胺微电极阵列(PBM 阵列)的高分辨率小鼠脑电图。根据文献进行电极植入、脑电图记录、数据采集和分析方法操作^[17, 19-20],并进行了一些改良。麻醉电极麻醉后将小鼠固定在立体定向仪器上,然后记录脑电图。首先,切开头皮中部 2 cm 暴露颅骨,确定颅骨和颅点。根据小鼠脑图谱,这些点是小鼠大脑表面可识别的电极位置。在小鼠脑立体定位仪的指引下将电极植入海马(AP-2.1 mm, ML-1.5 mm, DV-1.5 mm),其中植入 1 个裸露尖端的三导线电极(直径 1.0 mm),由 3 根裸露尖端的聚酰亚胺涂层的导线组成,用于接地和参考的微螺钉分别固定在小脑上方的枕骨上。植入微电极的小鼠予术后 5~7 d 的时间恢复。记录当天,信号采集在小鼠的笼子中进行,从上午 10 时至 11 时采集自由移动小鼠的脑电图信号。将连接器连接到一个多通道的脑电图放大器系统,并收集神经电信号。由记录电极收集到的原始记录信号被放大器放大 1000 倍。模拟信号由 CEDMicro1401 数据采集系统以 1 kHz 的采样频率进行数字化,记录每 30 s 生成

一次功率谱密度(power spectral densities, PSDs),以计算在 > 6 Hz(高频)的持续时长(高频时间)。信号处理确保整数值代表每 30 s 内 Hz 的主导频率(dominant frequency, DF)。以 30 s 为 1 个记录周期,每只小鼠每 30 s 计算 1 次,收集计算每只小鼠在总记录时间(1 h)的平均 DF。高频时间的计算方法是用 $DF > 6$ Hz 将 30 s 总周期相加,然后除以每个小鼠记录的总时间^[17, 20]。

1.6 Western blot

脑电图记录(1 周后),小鼠颈椎脱位。取出大脑,浸泡在冷磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。一半的大脑用于免疫印迹,其余的用于细胞表面生物素化检测。对于 Western blot 分析,脑组织分别使用预冷的裂解缓冲液(碧云天生物技术公司)在冰上匀浆。匀浆液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下以 r/min 。使用 BCA 试剂(Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany)方法定量蛋白质。在 4%~12%的凝胶上,用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量的蛋白质并转移到硝化纤维素膜上,将硝化纤维素膜转移到封闭液中,室温封闭 1 h,封闭后将膜放入 $1 \times \text{TBST}$ 中清洗 10 min。随后,与抗 BACE1 (1:1000; Cat. No. ab2077; Abcam), Nav1.1 α (1:800; Cat. No. ASC-001; Alomone), 或 Nav β 2 (1:500; Cat. No. ASC-007; Alomone) 一抗进行孵育。GAPDH (1:800; Cat. No. Sc-365062; Santa Cruz, Delaware, CA, USA) 作为内参对照。随后将膜与适当的二抗在 $20 \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h。用辣根过氧化物酶偶联的抗兔抗体检测 Nav1.1 α 和 Nav β 2 (1:2000; Cat. No. PI-1000; Vector Laboratories, Inc), GAPDH 检测采用过氧化物酶偶联的抗小鼠二抗 (1:1000; Cat. No. PI-2000; Vector Laboratories, Inc)。采用增强化学发光试剂(碧生物技术研究所,上海,中国)进行蛋白质定量。使用 Bio-Rad 凝胶成像系统 (ChemiDocTM XRS+; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) 及分析软件 v4.6.6 (Bio-Rad 实验室公司) 对目标蛋白带进行密度分析,以量化蛋白表达水平。

1.7 细胞表面生物素化实验

将剩余的脑组织放入冰冷的 Krebs 溶液中,该溶液中含有先前描述的^[20]修饰成分(计量单位为 mmol/L): 120 氯化钠、4.5 氯化钾、1.5 磷酸氢二钾、10 葡萄糖、1.5 硫酸镁、26 碳酸氢钠和 1.5 氯化钙。细胞表面生物素化和细胞表面 Nav1.1 α 的检测步骤按文献报道进行^[17, 20]。使用中微子亲和素琼脂糖珠(美国皮尔斯)拉下生物素化蛋白质,将生物素化的细胞表面蛋白与琼脂糖

珠结合,用于进行细胞外表达分析。其余含有非生物素化蛋白的裂解液用于检测 Nav1.1 α 的细胞内蛋白。用 SDS-PAGE 样品缓冲液在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 60 min 进行洗脱,并通过 SDS-PAGE 分析,然后进行如上所述的 Western blot 检测。

1.8 统计学处理

使用 SPSS19.0 Windows 软件包进行统计分析。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。2 组间的比较采用 Student's t 检验。采用方差分析(ANOVA)和 Bonferroni 事后检验来评估多组间的统计学差异。Morris 水迷宫分析采用双向重复测量(RM)方差分析,然后采用 Tukey 检验。新物体识别实验数据采用双向方差分析进行分析。脑电图数据采用单因素方差分析,然后对配对组(Two tailed, 双尾组)进行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血栓通对 APP/PS1 小鼠认知功能障碍的影响

采用 Morris 水迷宫实验和新物体识别实验,评价血栓通对 APP/PS1 小鼠学习记忆功能的影响。双向重复测量方差结果显示, WT+ Vehicle、APP/PS1+ Vehicle 和 APP/PS1+PNS 组中小鼠的逃逸潜伏期随着时间的推移而逐渐缩短。2 月龄小鼠逃逸潜伏期各组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。然而,与年龄匹配的 WT 小鼠相比,8 月龄 APP/PS1 小鼠花了更多的时间来寻找隐藏的平台,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1A。在去除平台后的探针实验中,各组 2 月龄小鼠在目标平台穿梭次数、目标象限花费的时间和目标象限的路径百分比方面差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1B, 图 1C, 图 1D。与同月龄 WT 小鼠相比,8 月龄 APP/PS1 小鼠在目标象限的时间缩短,目标平台穿梭的次数减少,在目标象限的路径百分比降低。血栓通处理部分改善了 APP/PS1 小鼠的空间学习记忆能力($P < 0.05$),见图 1B, 图 1C, 图 1D。

从新物体识别实验中获得的 DI 显示,2 月龄的 WT 和 APP/PS1 小鼠在探索新物体方面无显著差异($P > 0.05$),见图 2B。与年龄匹配的 WT 小鼠相比,8 月龄 APP/PS1 小鼠在探索新物体上花费的时间更少($P < 0.05$),见图 2B。血栓通治疗增加了 APP/PS1 组探索新对象的时间(APP/PS1+PNS vs. APP/PS1+Vehicle, $P < 0.05$),见图 2A, 2B。综上所述,血栓通是一种改善 AD 转基因小鼠空间学习和记忆丧失的有益药物,见图 1, 图 2。

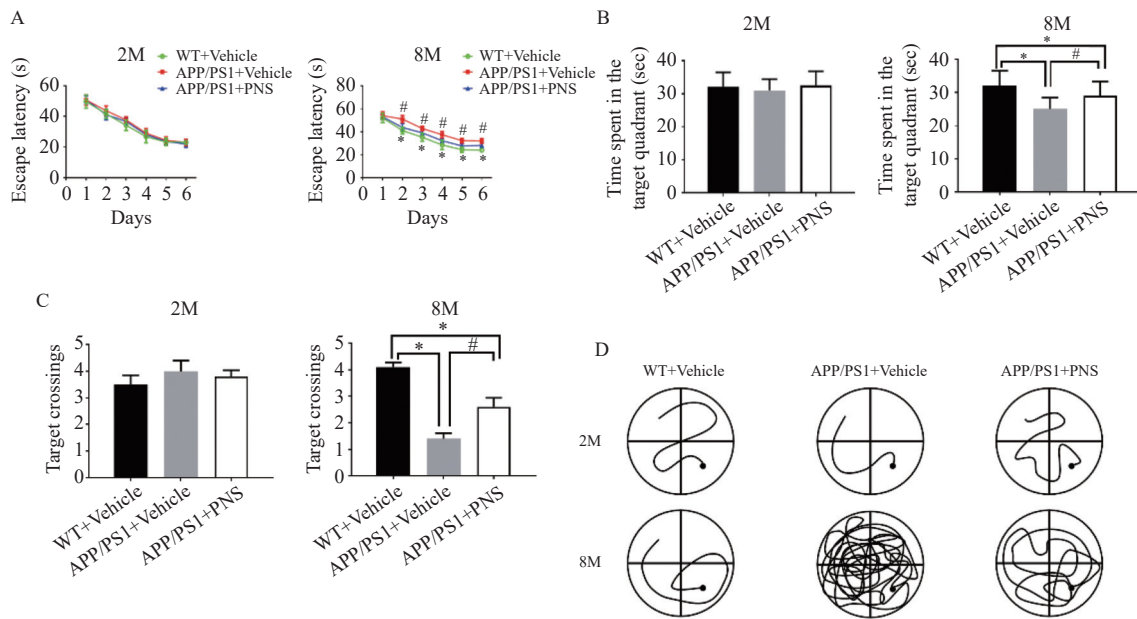


图 1 Morris 水迷宫任务显示血栓通对 APP/PS1 小鼠空间学习记忆变化的影响

Fig. 1 Morris water maze task shows the effect of xueshuantong on spatial learning and memory changes in APP/PS1 mice

A: 各组小鼠在训练期间从第 1 天到第 6 天的逃避潜伏期; B: 探针实验测试期间在目标象限所花费的时间; C: 探针实验中在目标平台的穿梭次数; D: 探针实验中 APP/PS1 小鼠的游泳路径。(x̄ ± s, n=15), *P < 0.05 vs. WT+Vehicle, #P < 0.05 vs. APP/PS1+PNS.

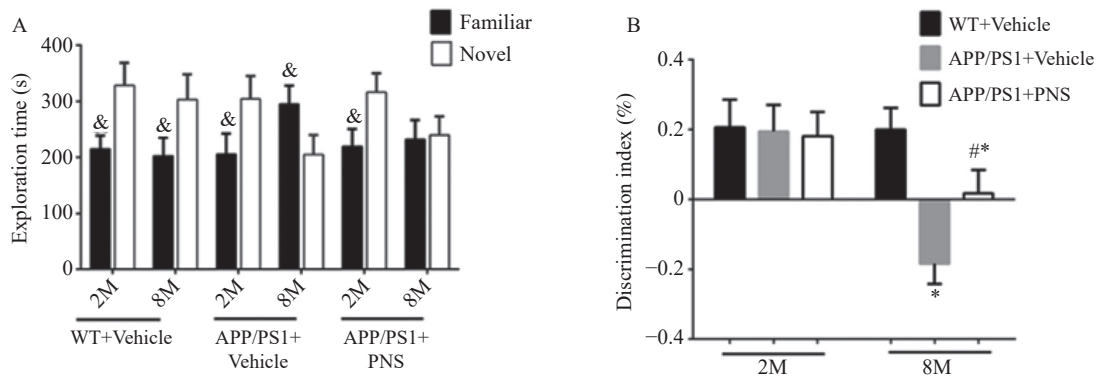


图 2 血栓通对 APP/PS1 小鼠新物体识别任务的影响

Fig. 2 Effect of xueshuantong on novel object recognition task in APP/PS1 mice

A: APP/PS1 小鼠对熟悉物体和新物体的探索时间的比较; B: 从不同的组中获得的 DI 指数。(x̄ ± s, n=15), *P < 0.05 vs. WT+Vehicle, #P < 0.05 vs. APP/PS1+PNS, &P < 0.05 vs. Novel.

2.2 血栓通对 APP/PS1 小鼠神经元兴奋性的影响

为了研究血栓通对 APP/PS1 小鼠异常神经元高兴奋性的影响, 本研究对不同处理的 WT 小鼠和 APP/PS1 小鼠进行了脑电图记录。根据 EEG 记录结果显示, 与相同月龄的 WT 小鼠比较, 8 月龄 APP/PS1 小鼠神经活动出现明显异常, 棘波放电 (spike-wave discharges, SWDs) 增加, 见图 3。然而, 用血栓通处理的 8 月龄 APP/PS1 小鼠表现出下降的神经元兴奋性, 但没有达到年龄匹配的 WT 小鼠的水平, 见图 3。

这些结果表明, 血栓通处理改善了 APP/PS1 突变诱导的神经元高兴奋性。

2.3 血栓通对 APP/PS1 小鼠体内 BACE1 和 Nav 表达水平的影响

本研究探讨了血栓通改善认知功能、下调神经元兴奋性的机制。本研究评估了神经元兴奋性的维护者 Nav 蛋白家族成员和 BACE1 在各组小鼠额叶皮质及海马区的表达情况。结果发现, 血栓通处理显著降低了 APP/PS1 小鼠皮质和海马中 BACE1 的表达 (APP/PS1+PNS vs. APP/PS1+Vehicle, P < 0.05), 见图 4A-4B。同时, 在血栓通处理的 APP/PS1 小鼠中检测到 Nav β 2 全长片段增加, Nav β 2-CTF 片段减少 (APP/PS1+PNS vs. APP/PS1+Vehicle, P < 0.05), 见图 4C-4D。这

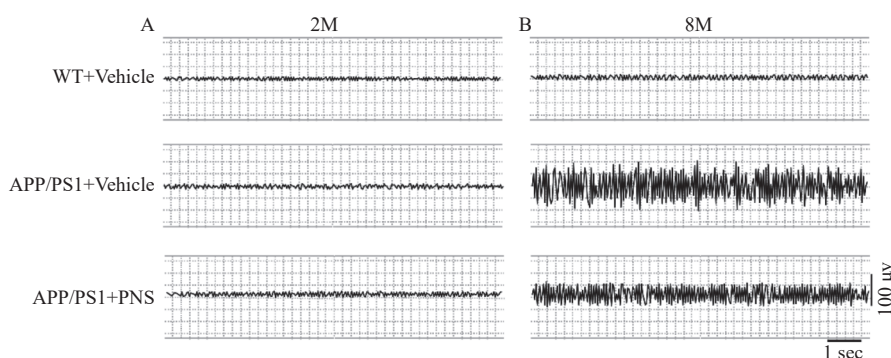


图 3 通过 EEG 记录检测血栓通给药诱导的神经元高兴奋性改善和异常神经活动

Fig. 3 Detection of improved neuronal hyperexcitability and abnormal neural activity induced by xueshuantong administration by EEG recordings

A: 2月龄各组小鼠的 EEG 记录情况; B: 8月龄各组小鼠的 EEG 记录情况。

些结果还表明, 血栓通对皮质或海马中 Nav1.1 α 的细胞外和细胞内异常分布进行了纠正 (APP/PS1+PNS vs. APP/PS1+Vehicle, $P < 0.05$), 见图 4E-4H。

综上所述, 血栓通诱导的神经元兴奋性的减轻可能与 Nav β 2 切割的减少有关, 从而部分逆转了 Nav1.1 α 在皮质或海马中的异常分布。

3 讨论

本研究结果显示血栓通(主要有效成分三七皂苷)给药后显著改善了 APP/PS1 小鼠学习、空间记忆功能并减轻了神经元的异常高兴奋性。结合前人的研究报道: APP/PS1 小鼠皮质裂解液中 BACE1 表达水平、Nav β 2 降解片段 (Nav β 2-CTF) 以及 Nav1.1 α 的表达和分布发生异常^[20], 作者推测: 血栓通改善 AD 小鼠的认知功能和神经元高兴奋性可能与对 Nav 通道的表达调控有关。

临床上以颅内/脑出血为特点^[21]的常见脑损伤, 通常发展为认知缺陷的症状^[22]。而前人的研究表明, 通过结合抗炎、抗血栓和抗凋亡特性, PNS 在治疗伴有认知障碍的神经系统疾病中具有显著优势^[7-8, 23]。已有研究报道, 使用血栓通可减少急性脑出血患者的炎症反应, 增加血肿吸收, 并改善行为功能^[12]。在本研究中, 作者发现血栓通可能有助于改善认知功能缺陷和恢复 AD 诱导的神经元损伤。通过研究, 作者发现, 血栓通改善了 APP/PS1 突变引发的学习记忆障碍并降低了神经元的过度兴奋性。

Nav 家族蛋白在神经元动作电位的发放、正常电兴奋性的维持中起到了主导作用, 其家族成员的表达异常、活性改变势必会诱导神经元电兴

奋性发生异常, 引发一系列的病理改变。在先前的研究中, 作者发现, 与 4 月龄(正常)快速老化小鼠相比, SCN2B (Nav β 2 的编码基因) 在 8、12 月龄加速老化的小鼠皮质额叶中表达上调, 血栓通用药后显著下调了 8、12 月龄快速老化小鼠脑内衰老相关基因 SCN2B (Nav β 2 的编码基因) 的水平, 诱导了学习记忆行为的改善^[16], 此结果提示 Nav β 2 在小鼠脑老化进程中发挥了重要作用, 而血栓通有可能通过对 Nav β 2 的靶向调控发挥神经保护作用。另有研究表明, Nav1.1 α 水平的升高与小鼠的认知缺陷有关^[20]; 而 Nav β 2 knockdown 可以扭转 Nav β 2 的过度降解及异常的 Nav1.1 α 细胞内转位, 部分恢复 APP/PS1 转基因鼠海马神经元的电兴奋性并显著改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆能力^[17-18]。在本研究中, 发现血栓通抑制了 APP/PS1 小鼠脑内 BACE1 的活性, 从而减少了 Nav β 2 的过度降解, 纠正了 Nav1.1 α 的异常表达与分布。此结果提示, 血栓通在 APP/PS1 小鼠模型中发挥的神经保护作用与 Nav 蛋白调控的神经元高兴奋性的恢复有关, 即血栓通通过调节钠通道的表达, 从而纠正了 AD 小鼠的异常神经元兴奋性并改善了 AD 小鼠的认知功能损伤。

有趣的是, 本研究还发现了血栓通用药后显著抑制了淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 代谢关键酶 BACE1 的活性。鉴于 BACE1 抑制可以有效减少 APP 毒性代谢产物 A β 的产生, 近年来, BACE1 酶抑制剂的使用为 AD 提供了有价值的治疗策略^[24-26]。而有研究证实, Nav β 2 作为 BACE1 的新发现底物, 具有与 APP 类似的代谢途径, 可能参与到了 AD 的致病过程^[27]。本研究结果发现, 血栓通处理显著抑制了 BACE1 的活性、减少了 Nav β 2 的裂解, 也纠正了 Nav1.1 α

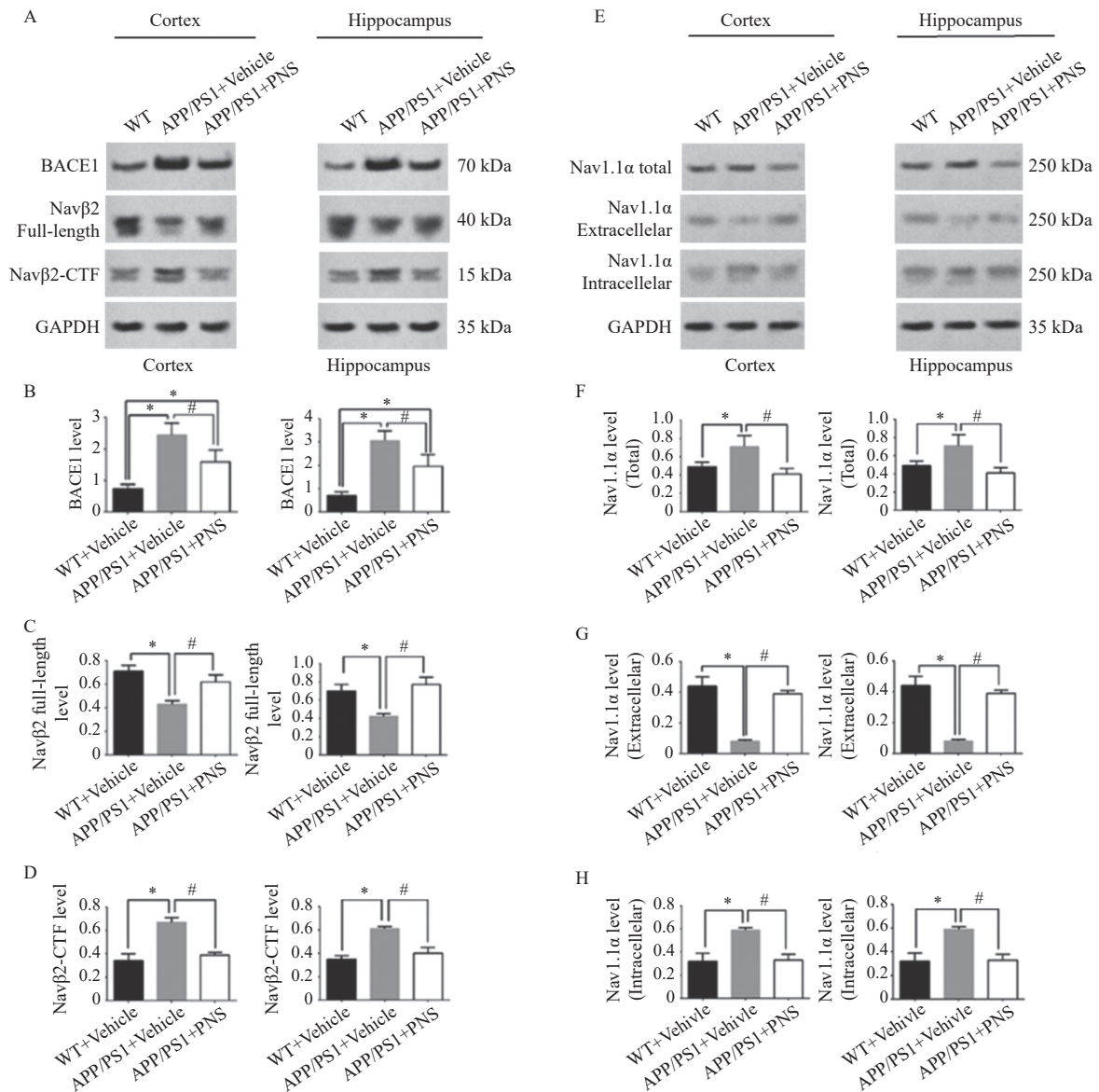


图 4 血栓通改变 APP/PS1 小鼠中 Nav1.1 α 的分布和 Nav β 2 的裂解

Fig. 4 Xueshuantong alters Nav1.1α distribution and Navβ2 cleavage in APP/PS1 mice

A: 各组小鼠额叶皮层和海马中 BACE1、Nav β 2 全长、Nav β 2-CTF 的蛋白电泳图; B: 各组小鼠额叶皮层和海马中 BACE1 的蛋白表达比较; C: 各组小鼠额叶皮层和海马中 Nav β 2 全长的蛋白表达比较; D: 各组小鼠额叶皮层和海马中 Nav β 2-CTF 的蛋白表达比较; E: 各组小鼠额叶皮层和海马中的 Nav1.1 α 的总量、细胞外 Nav1.1 α 和细胞内 Nav1.1 α 的蛋白电泳图; F: 各组小鼠额叶皮层和海马中 Nav1.1 α 总量的蛋白表达比较; G: 各组小鼠额叶皮层和海马中细胞外 Nav1.1 α 的蛋白表达比较; H: 各组小鼠额叶皮层和海马中细胞外 Nav1.1 α 的蛋白表达比较。(x̄ ± s, n=15), *P<0.05 vs. WT+ Vehicle, #P<0.05 vs. APP/PS1 + PNS。

的异常分布, 部分恢复了神经元异常的兴奋性。此结果提示血栓通可能有希望成为治疗 AD 的药物之一, 其作用机制可能通过抑制 BACE1 介导的 Nav β 2 异常酶解、维持 Nav 通道的稳定性, 从而恢复了神经元的正常电兴奋性。

综上所述, 本研究结果表明, 血栓通改善了神经元异常过度兴奋, 显著促进了 AD 小鼠的神经元修复和改善记忆功能, 此作用与 Nav 蛋白的调节有关。

[参考文献]

[1] Grossberg G T, Tong G, Burke A D, et al. Present Algorithms and future treatments for Alzheimer's disease. [J] Journal of Alzheimer's Disease, 2019, 67(4): 1157-1171.
 [2] 王高端, 陈姿羽, 吴辉, 等. 基于网络药理学和实验验证的血栓通改善缺血性脑微循环障碍作用机制研究[J]. 药学报, 2022, 57(7): 2077-2086.
 [3] Liu L, Zhang Q, Xiao S, et al. Inhibition of shear-induced

- platelet aggregation by xueshuantong via targeting piezo1 channel-mediated Ca^{2+} signaling pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 606245.
- [4] Han S, Chen Y, Wang J, et al. Anti-thrombosis effects and mechanisms by xueshuantong capsule under different flow conditions[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10(FEB): 35.
- [5] Zhang J, Guo F, Zhou R, et al. Proteomics and transcriptome reveal the key transcription factors mediating the protection of Panax notoginseng saponins (PNS) against cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Phytomedicine*, 2021, 92: 153613.
- [6] Peiran L, Ying L, Mingzhuo Z, et al. The development of a Panax notoginseng medicinal liquor processing technology using the response surface method and a study of its anti-oxidant activity and its effects on mouse melanoma B16 cells[J]. *Food & Function*, 2017, 8(11): 4251-4264.
- [7] Han J Y, Li Q, Ma Z Z, et al. Effects and mechanisms of compound Chinese medicine and major ingredients on microcirculatory dysfunction and organ injury induced by ischemia/reperfusion[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2017, 177: 146-173.
- [8] Zhong L, Zhou X L, Liu Y S, et al. Estrogen receptor α mediates the effects of notoginsenoside R1 on endotoxin-induced inflammatory and apoptotic responses in H9c2 cardiomyocytes[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(1): 119-126.
- [9] Lee C Y, Hsieh S L, Hsieh S, et al. Inhibition of human colorectal cancer metastasis by notoginsenoside R1, an important compound from Panax notoginseng[J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(1): 399-407.
- [10] Li W, Wu Y, Wan M, et al. Simultaneous determination of three saponins in human plasma after oral administration of compound danshen dripping pills by LC-MS/MS and its application in a pharmacokinetic study[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 169: 254-259.
- [11] Jian W, Yu S, Tang M, et al. A combination of the main constituents of Fufang Xueshuantong Capsules shows protective effects against streptozotocin-induced retinal lesions in rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 182: 50-56.
- [12] Gao L, Zhao H, Liu Q, et al. Improvement of hematoma absorption and neurological function in patients with acute intracerebral hemorrhage treated with Xueshuantong[J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2012, 323(1-2): 236-240.
- [13] Li Z, Li H, Zhao C H, et al. Protective effect of notoginsenoside R1 on an APP/PS1 mouse model of Alzheimer & aposs disease by up-regulating insulin degrading enzyme and inhibiting A β accumulation[J]. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, 2015, 14(3): 360-369.
- [14] Huang J L, Xin J, Xin T, et al. Neuroprotective properties of panax notoginseng saponins via preventing oxidative stress injury in SAMP8 mice[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 2017: 8713561.
- [15] Huang J, Wu D, Wang J, et al. Effects of Panax notoginseng saponin on α , β , and γ secretase involved in A β deposition in SAMP8 mice[J]. *Neuroreport*, 2014, 25(2): 89-93.
- [16] Xi Y, Yan B, Wang Y C, et al. Sodium channel voltage-gated beta 2 plays a vital role in brain aging associated with synaptic plasticity and expression of COX5A and FGF-2[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2): 955-967.
- [17] Tao H, Xiao Z, Rui M, et al. Nav β 2 knockdown improves cognition in APP/PS1 mice by partially inhibiting seizures and APP amyloid processing[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(59): 99284-99295.
- [18] Hu T, Li S S, Lu M N, et al. Neuroprotection induced by Nav beta 2-knockdown in APP/PS1 transgenic neurons is associated with NEP regulation[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2019, 20(2): 2002-2011.
- [19] Lee M, Kim D, Shin H S, et al. High-density EEG recordings of the freely moving mice using polyimide-based microelectrode[J]. *Journal of Visualized Experiments Jove*, 2011(47): 2562.
- [20] Corbett B F, Leiser S C, Ling H, et al. Sodium channel cleavage is associated with aberrant neuronal activity and cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Journal of Neuroscience*, 2013, 33(16): 7020-7026.
- [21] Sheena LP, Regan, Phil G, et al. Growth hormone during in vitro fertilization in older women modulates the density of receptors in granulosa cells, with improved pregnancy outcomes[J]. *Fertility and Sterility*, 2018, 110(7): 1298-1310.

- [22] Huang Y, Guo B, Shi B, et al. Chinese herbal medicine xueshuantong enhances cerebral blood flow and improves neural functions in Alzheimer's disease mice[J]. *Journal of Alzheimers Disease*, 2018, 63(3): 1089–1107.
- [23] Liu H, Liang J P, Li P B, et al. Core bioactive components promoting blood circulation in the traditional chinese medicine compound xueshuantong capsule (CXC) based on the relevance analysis between chemical HPLC fingerprint and in vivo biological effects[J]. *Plos One*, 2014, 9(11): e112675.
- [24] Cheret C, Willem M, Fricker F R, et al. Bace1 and Neuregulin-1 cooperate to control formation and maintenance of muscle spindles[J]. *Embo Journal*, 2013, 32(14): 2015–2028.
- [25] Filser S, Ovsepian S V, Masana M, et al. Pharmacological inhibition of BACE1 impairs synaptic plasticity and cognitive functions[J]. *Biological Psychiatry*, 2015, 77(8): 729–739.
- [26] Zhu K, Xiang X, Filser S, et al. Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 inhibition impairs synaptic plasticity via seizure protein 6[J]. *Biological Psychiatry*, 2016, 83(5): 428–437.
- [27] Wong H K, Sakurai T, Oyama F, et al. Beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(24): 23009–23017.

版权声明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文, 作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意编辑部上述声明。

《昆明医科大学学报》编辑部