

β -细辛醚对 *APP^{swe}/PS1^{dE9}* 双转基因小鼠脑组织中差异蛋白表达的影响

郭莉莉^{1,2*}, 王豫君³, 敖俊文³, 郭艳丽²

1. 贵阳中医学院第二附属医院病理科, 贵阳 550002
2. 贵阳市第一人民医院病理科, 贵阳 550002
3. 贵州医科大学基础医学院病理学教研室, 贵阳 550004

[摘要] **目的** 观察 β -细辛醚对 *APP^{swe}/PS1^{dE9}* 双转基因小鼠脑组织中差异蛋白表达的调节作用, 探讨其对阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 的治疗作用机制。 **方法** 实验动物分为正常对照组 (C57BL/6J 小鼠)、模型组 (*APP^{swe}/PS1^{dE9}* 小鼠) 和 β -细辛醚治疗组 (*APP^{swe}/PS1^{dE9}* 小鼠), 每组 10 只。 β -细辛醚治疗组用灌胃方法给药, 正常对照组和模型组给予等量生理盐水, 历时 90 d。用 Morris 水迷宫行为学方法测试小鼠学习记忆能力, 用免疫组织化学方法检测小鼠脑组织中 β -淀粉样前体蛋白 (APP) 的表达。用同位素标记相对和绝对定量 (iTRAQ) 技术对小鼠脑组织进行蛋白质组学分析, 用蛋白质印迹法鉴定差异蛋白 H2A、H2B 的表达。 **结果** 与模型组小鼠比较, 经 β -细辛醚治疗后, 小鼠的逃避潜伏期和第一次穿越平台时间缩短 ($P < 0.05$), 平台穿越次数增多 ($P < 0.05$), APP 的表达减少 ($P < 0.05$), 差异蛋白组蛋白 H2A 1-H、H2B 2-E 和 H2B 1-F/J/L 的表达水平下降 ($P < 0.05$)。 **结论** β -细辛醚能够介入到组蛋白的修饰过程而起到治疗作用, 这可能是其改善 β -淀粉样肽毒性所致学习记忆能力下降的机制之一。

[关键词] 阿尔茨海默病; β -细辛醚; 双转基因小鼠; 组蛋白类; 蛋白质修饰

[中图分类号] R 749.16 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)10-1286-07

Effect of β -asarone on differential protein expression in brain tissue of *APP^{swe}/PS1^{dE9}* double transgenic mice

GUO Li-li^{1,2*}, WANG Yu-jun³, AO Jun-wen³, GUO Yan-li²

1. Department of Pathology, The Second Hospital Affiliated to Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550002, Guizhou, China
2. Department of Pathology, The First People's Hospital of Guiyang, Guiyang 550002, Guizhou, China
3. Department of Pathology, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of β -asarone on differential protein expression in brain tissue of *APP^{swe}/PS1^{dE9}* double transgenic mice, and to explore its mechanism in treatment of Alzheimer disease (AD). **Methods** The animals were divided into normal control group (C57BL/6J mice), model group (*APP^{swe}/PS1^{dE9}* mice) and β -asarone treatment group (*APP^{swe}/PS1^{dE9}* mice), with ten mice in each group. In a period of 90 days, the mice in β -asarone treatment group were administered with β -asarone by intragastric gavage (15 mg/[kg · d]), and the mice in normal control and model groups were administered with equal doses of normal saline. The learning and memory abilities of mice were detected by Morris water maze test. The expression of β -amyloid precursor protein (APP) in brain tissues was detected by immunohistochemistry. Proteomics analysis of brain tissues was performed by isobaric tags for relative and absolute quantification (iTRAQ). The expression of differential protein H2A and H2B was identified by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the escape latency and the first latency time required to find the escaped platform of mice in the β -asarone treatment group were significantly shortened ($P < 0.05$), the across-platform times were significantly increased ($P < 0.05$), the expression of APP was significantly decreased ($P < 0.05$), and the

[收稿日期] 2017-07-31 **[接受日期]** 2017-09-12

[基金项目] 国家自然科学基金(30870986), 贵州省科教青年英才培养工程项目[黔省专合字(2012)197号], 贵州省科学技术基金[黔科合J字(2012)2091号]. Supported by National Natural Science Foundation of China (30870986), Project of Cultivating Young Talents of Science and Education in Guizhou Province ([2012] No. 197), and Science and Technology Fund Project of Guizhou Province ([2012] No. 2091).

[作者简介] 郭莉莉, 博士, 副主任医师。

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 0851-88576009, E-mail: 958165448@qq.com

expressions of H2A 1-H, H2B 2-E and H2B 1-F/J/L were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** β -Asarone plays a therapeutic role by intervening the modification of histone, which might be one of the mechanisms to improve learning and memory abilities injured by the toxicity of β -amyloid peptide.

[Key words] Alzheimer disease; β -asarone; double transgenic mice; histones; protein modification

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(10): 1286-1292]

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 作为一种最常见的痴呆类型, 是中枢神经系统最具毁损性的疾病之一, 其治疗药物虽较多, 但并未获得满意的疗效。在 AD 发病机制的众多假说中, 最受关注的“ β 淀粉样肽 (β -amyloid peptide, $A\beta$) 级联假说”认为 $A\beta$ 在 AD 发病过程中发挥核心作用^[1], 是各种原因诱发 AD 的共同通路, 其引起的一系列神经毒性反应导致神经细胞功能紊乱和死亡, 引发痴呆。建立以 $A\beta$ 为靶点的治疗策略来指导药物研究, 通过对 $A\beta$ 及其相关蛋白的研究深入揭示 AD 发病机制并找到有效的治疗方法是当前研究热点。

从抑制 $A\beta$ 的产生到对抗 $A\beta$ 的毒性, 中药具有多途径、多靶点、多层次的神经保护作用^[2], 但其治疗机制仍未明确。通过调节差异蛋白治疗疾病, 显示可能性的分子及疗效基础成为当前发展中医中药的热点课题。中药石菖蒲为天南星科多年生草本植物石菖蒲的干燥根茎, 其味辛性温, 具有化湿开胃、开窍豁痰、醒神益智的功效^[3], 是 AD 治疗的常用中药, 其公认的药理活性成分 β -细辛醚具有较好的益智和脑保护作用。本实验以 $A\beta$ 毒性相关的转基因动物模型为载体进行比较蛋白质组学研究, 运用可视化方法识别小鼠脑组织中成对样本的差异表达蛋白, 观察 β -细辛醚通过调节关键蛋白改善小鼠学习记忆能力的疗效, 从蛋白质水平寻找可能的药靶蛋白, 为临床研究提供可靠的实验资料和理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与药物 3 个月龄的 $APP_{swe}/PS1dE9$ 双转基因小鼠 40 只, 3 个月龄的同背景品系 C57BL/6J 小鼠 10 只, 雌雄各半, 由中国医学科学院实验动物所遗传中心提供, 许可证号: SCXK (京)2013-2002。动物实验经贵阳市第一人民医院动物伦理委员会批准, 在 SPF 级实验室分笼分性别

饲养, 每笼 5 只, 普通繁殖饲料饲养。

实验用 β -细辛醚为中药石菖蒲的提取物, 由南京广润生物制品有限公司提供 (批号: GR-133-20141223), 经高效液相色谱 (HPLC) 法鉴定纯度大于 95%。

1.2 主要仪器与试剂 ELx800UV 型酶标仪 (美国 BioTek 公司); HPLC 仪 (美国 Agilent 公司); UltiMate-3000 纳升液相色谱仪 (美国 Dionex 公司); Q-Exactive 质谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司); UMAX PowerLook 2100XL-USB 扫描仪 (美国 UMAX 公司); Eppendorf Centrifuge 5417R 型离心机 (德国 Eppendorf 公司); 同位素标记相对和绝对定量 (isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ) 试剂盒 (iTRAQ[®] Reagent-8Plex Multiplex Kit, 美国 Applied Biosystem 公司); Strata-X C₁₈ 除盐柱、SCX 强阳离子交换柱 (SCX 100A) 购自美国 Phenomenex 公司; DMS-2 型 Morris 水迷宫系统 (中国医学科学院药物研究所)。多克隆兔抗组蛋白 H2A 和 H2B 抗体、 β 淀粉样前体蛋白 (β -amyloid precursor protein, APP) 免疫组化一抗购自英国 Abcam 公司; 抗 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体、抗 IgG 抗体 (辣根过氧化物酶标记)、预染蛋白相对分子质量标准蛋白及可曝光标准蛋白等购自美国 Sigma 公司。

1.3 动物分组及给药方法 实验动物分为 5 组: 正常对照组, 模型组, β -细辛醚高、中、低剂量治疗组, 每组 10 只。模型组为 $APP_{swe}/PS1dE9$ 双转基因小鼠; 正常对照组为同背景品系 C57BL/6J 小鼠; β -细辛醚高、中、低剂量治疗组为 $APP_{swe}/PS1dE9$ 双转基因小鼠, 药物剂量根据患者临床用量的等效剂量和动物体表面积折算而得。对各组小鼠进行灌胃给药, β -细辛醚高、中、低剂量组的给药剂量分别为 15、10、5 mg/(kg·d), 正常对照组和模型组给予等量生理盐水, 历时 90 d。

1.4 学习记忆能力测试 用 Morris 水迷宫行为学方法进行学习记忆能力检测,历时 5 d。第 1~4 天进行定向航行实验,记录 60 s 内大鼠从不同象限入水到爬上平台(固定于第 1 象限)所需时间(即逃避潜伏期),每天连续测试 4 次,连续 4 d,取其平均值。第 5 天撤去平台,进行空间探索实验,记录大鼠第 1 次穿越原平台时间及 1 min 内穿过原平台位置的次数。根据测试结果,选择疗效显著的剂量组作为后续实验的治疗组。

1.5 动物处理 所有组别在治疗结束后次日进行 Morris 水迷宫测试,测试 24 h 后将各组小鼠断颈处死,用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗干净后,小心剥离脑组织,称量后迅速于冰盘上沿矢状缝将脑组织一切为二。取左侧脑组织置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存用于蛋白质组学检测。将右侧脑组织沿正矢状面片开,厚度为 0.2 cm,放入 4%多聚甲醛溶液中浸泡固定用于组织学检查;其余脑组织置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存用于指标检测。

1.6 免疫组织化学染色检测小鼠脑组织中 APP 的表达 取材后用常规方法进行石蜡包埋,取 $5\text{ }\mu\text{m}$ 厚度切片,用免疫组织化学法(EnVision 二步法)染色,一抗为 APP 兔多克隆抗体,1:150 稀释,以试剂公司提供已知阳性片作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。用 DAB 显色后在光镜下观察。综合考虑切片中阳性细胞所占观察细胞数的百分比和阳性细胞着色强度两项指标,随机选取小鼠大脑皮质 8 个高倍视野($\times 400$)进行计算,半定量判定结果。阳性细胞所占比例:阳性细胞数 $\leq 10\%$ 记 1 分,11%~50%记 2 分,51%~75%记 3 分, $> 75\%$ 记 4 分;阳性细胞着色强度:细胞无色记 0 分,淡黄色记 1 分,棕黄色记 2 分,棕褐色记 3 分。这两项指标的总积分在 4 分以上者代表阳性表达。

1.7 iTRAQ 技术分析鉴定差异蛋白 提取各组动物脑组织总蛋白,行还原烷基化和酶解消化处理,每组样本消化的全部肽段分别用 iTRAQ 试剂标记,利用二维液相色谱串联质谱(2D-LC-MS)技术,经过 HPLC 肽段分离后,用 Strata-X C_{18} 反相色谱除盐纯化肽段,采用 Q-Exactive 质谱仪检测肽段信号。质谱扫描完毕后,将得到的原始质谱文件转换成质谱峰文件,质谱数据用 PD (Thermo Proteome

Discoverer 1.3) 软件进行数据库检索,与数据库中的序列进行搜索匹配,并对质谱数据进行过滤筛选和质量控制,从 UniProt_2015_mus 数据库中获取可信的蛋白质定性信息,并通过报告基团对组织样本的蛋白质进行定量分析。

1.8 生物信息学分析 基于 iTRAQ 定量比值,利用 95%置信区间法则计算蛋白质差异是否具有统计学意义,并通过差异倍数筛选出差异存在统计学意义的蛋白质作为后续分析的备选。通过 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 软件对差异蛋白质进行通路分析及富集分析,采用 KOBAS 2.0 软件对比蛋白质的相似序列并进行通路注释,得到蛋白质参与的生物通路。

1.9 小鼠脑组织组蛋白 H2A、H2B 的蛋白表达水平鉴定 用玻璃匀浆器将各组小鼠脑组织在冰上匀浆,提取总蛋白,定量后用蛋白质印迹法检测组蛋白 H2A 和 H2B 的表达水平,聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至 PVDF 膜上印迹显色,分别加入一抗(H2A 和 H2B, 1:2 000; β -actin, 1:1 000)和二抗(1:6 500)孵育后曝光显影,定影。以 β -actin 蛋白作为内参照,用 LabWorks 软件对图像进行灰度分析,结果以组蛋白 H2A 和 H2B 条带与 β -actin 条带灰度的百分比值作为 H2A 和 H2B 蛋白的相对表达量。

1.10 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的比较采用 *t* 检验和秩和检验,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 学习记忆能力测定 定向航行和空间探索实验结果显示,模型组小鼠的学习记忆能力下降,经 β -细辛醚治疗后学习记忆能力有所回升。与模型组比较,高剂量治疗组小鼠逃避潜伏期的时间和第 1 次穿越平台时间缩短($P < 0.05$),平台穿越次数增多($P < 0.05$),中、低剂量治疗组小鼠未见明显改善($P > 0.05$),故选取高剂量组作为后续实验的治疗组。见图 1、2。

2.2 小鼠脑组织中 APP 的表达 免疫组织化学染色可见阳性染色位于细胞膜和(或)细胞质,呈棕黄色(图 3)。与正常对照组[(1.30 \pm 0.30)分]相比,

模型组小鼠脑组织中 APP 的表达升高[(5.60 ± 0.28)分, $P < 0.05$];与模型组相比, β -细辛醚治疗组小鼠脑组织中 APP 的表达减少[(3.20 ± 0.26)分, $P < 0.05$].

2.3 蛋白质谱鉴定及表达差异分析 实验通过选取差异倍数为 1.2 倍并与 $P \leq 0.05$ 相结合进行差异蛋白质的筛选。结果显示,与正常对照组相比,模型组中有 59 种蛋白质表达上调、35 种蛋白质表达下调;与模型组相比, β -细辛醚治疗组中有 37 种蛋白质表达上调、107 种蛋白质表达下调。

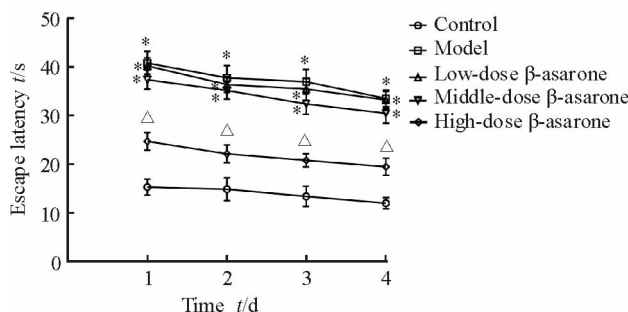


图 1 各组小鼠的逃避潜伏期时间

Fig 1 Escape latency of mice in each group

* $P < 0.05$ vs control group; $\triangle P < 0.05$ vs model group. $n = 10, \bar{x} \pm s$

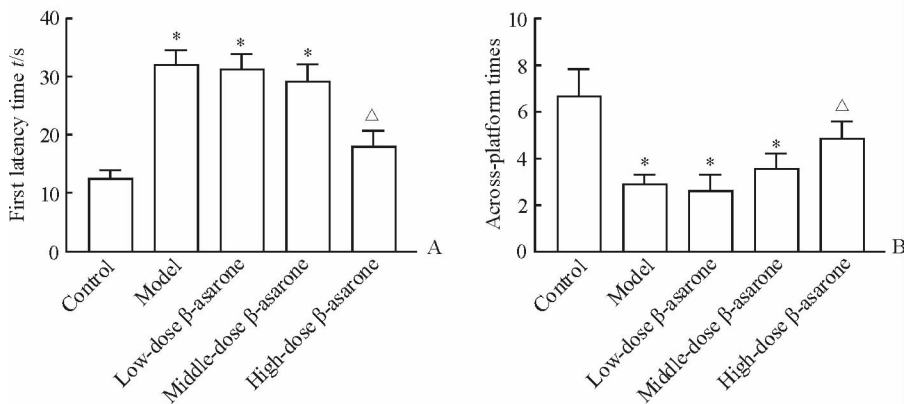


图 2 各组小鼠的第 1 次穿越平台时间(A)和穿越次数(B)

Fig 2 First latency time required to find the escape platform (A) and across-platform times (B) of mice in each group

* $P < 0.05$ vs control group; $\triangle P < 0.05$ vs model group. $n = 10, \bar{x} \pm s$

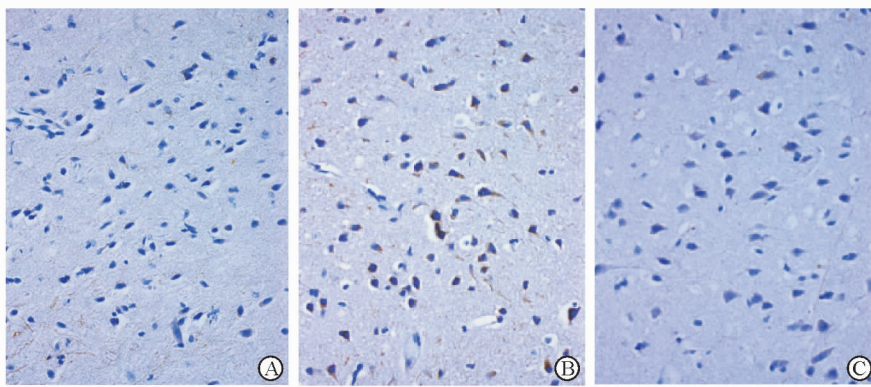


图 3 各组小鼠脑组织中 APP 的表达

Fig 3 Expression of APP in brain tissues of mice in each group

A: Control group; B: Model group; C: β -Asarone treatment group. APP: β -Amyloid precursor protein. EnVision immunohistochemical staining. Original magnification: $\times 40$

2.4 KEGG 数据库通路富集结果 以 $P < 0.05$ 为筛选标准,经过富集分析,模型组与正常对照组的差异蛋白主要参与了 13 条通路(表 1), β -细辛醚治疗组与模型组的差异蛋白主要参与了 10 条通路(表 2)。进一步比对模型组和 β -细辛醚治疗组的通路调控结果,发现可信度最高的 1 条共同通路,即 systemic lupus erythematosus, 匹配到 3 个基因转

录翻译的差异蛋白质,分别是组蛋白 H2A 1-H 型(Q8CGP6)、H2B 2-E 型(Q64524)、H2B 1-F/J/L 型(P10853)。其中,模型组与正常对照组相比,组蛋白 H2A 1-H 型、H2B 2-E 型、H2B 1-F/J/L 型表达上调(分别为 1.219、1.617、1.385);经过 β -细辛醚治疗后,上述 3 个蛋白的表达下降(分别为 0.652、0.738、0.747)。

表 1 模型组与正常对照组的差异蛋白参与的 13 条通路

Tab 1 Thirteen pathways associated with differential proteins in model and control groups

No.	Pathway ID	Pathway description	Protein
1	mmu04974	Protein digestion and absorption	P11087, P14231, Q6PIE5, Q01149
2	mmu04976	Bile secretion	P55088, P14231, Q6PIE5, O88343
3	mmu04973	Carbohydrate digestion and absorption	P14231, Q6PIE5, Q61290
4	mmu05322	Systemic lupus erythematosus	Q8CGP6, Q64524, P10853, Q9JI91
5	mmu04964	Proximal tubule bicarbonate reclamation	P14231, Q6PIE5, O88343
6	mmu04978	Mineral absorption	P14231, Q6PIE5, O08997
7	mmu04971	Gastric acid secretion	P14231, Q6PIE5, P11881, Q9JM63
8	mmu04022	Cyclic guanosine monophosphate-protein kinase G signaling pathway	P14231, Q6PIE5, P11881, P51881, Q61290
9	mmu04972	Pancreatic secretion	P14231, Q6PIE5, O88343, P11881
10	mmu04911	Insulin secretion	P14231, Q6PIE5, P60879, Q61290
11	mmu04918	Thyroid hormone synthesis	P14231, Q6PIE5, P11881
12	mmu04726	Serotonergic synapse	O55017, P11881, P12023, Q61290
13	mmu04930	Type 2 diabetes mellitus	O55017, Q61290

The parts in boldface are common pathways and proteins regulated in both model and β -asarone treatment groups

表 2 β -细辛醚治疗组与模型组的差异蛋白参与的 10 条通路

Tab 2 Ten pathways associated with differential proteins in model and β -asarone treatment groups

No.	Pathway ID	Pathway description	Protein
1	mmu03010	Ribosome	P12970, P63276, Q9DB15, P62858, Q6ZWN5, Q9CR57, P47963, P62242, P62900, P62270, Q9D8E6, P51410, P14148, P62852, P62082
2	mmu05322	Systemic lupus erythematosus	Q64524, Q9QZQ8, P27661, Q8CGP6, Q8CCK0, P0C0S6, P02301, P10853
3	mmu05034	Alcoholism	Q64524, P35438, Q9DAS9, P63213, Q9QZQ8, P27661, Q8CGP6, B2RSH2, Q8CCK0, P0C0S6, P02301, P10853
4	mmu05410	Hypertrophic cardiomyopathy	P58774, P58771, O08532, P48678, P21107
5	mmu05414	Dilated cardiomyopathy	P58774, P58771, O08532, P48678, P21107
6	mmu00190	Oxidative phosphorylation	Q9CR21, P97450, Q06185, P56394, Q9CQH3, P63082, Q3UIU2, P03911, Q9D855
7	mmu05014	Amyotrophic lateral sclerosis	P35438, P08553, P08551, P19246
8	mmu00910	Nitrogen metabolism	P28651, P13634
9	mmu04610	Complement and coagulation cascades	P07758, P22599
10	mmu04260	Cardiac muscle contraction	P58774, P58771, O08532, Q9D855, P21107

The parts in boldface are common pathways and proteins regulated in both model and β -asarone treatment groups

2.5 组蛋白 H2A 和 H2B 的蛋白表达鉴定结果 蛋白质印迹分析检测结果显示,与正常对照组相比,模型组小鼠脑组织中组蛋白 H2A 和 H2B 的蛋白表达水平升高($P < 0.05$),经 β -细辛醚治疗后二者明显下降($P < 0.05$),见图 4。

3 讨论

AD 以老年斑和神经原纤维缠结为主要病理学改变,老年斑的核心物质 $A\beta$ 随着浓度升高引发神经毒性的环形事件,最终导致记忆力减退与认知功能障碍。APP 通过蛋白酶解途径裂解形成 $A\beta$,其

与早老素 1(presenilin 1, PS1)均是 AD 的重要相关蛋白质,在 AD 的病理进程中发挥重要作用。APP_{swe}/PS1dE9 双转基因痴呆小鼠模型是利用 APP_{swe} 转基因小鼠与 PS1 转基因小鼠杂交建立^[4],也是 $A\beta$ 毒性相关的痴呆动物研究模型之一。该模型在 3 个月龄开始即出现逃避潜伏和空间探索的记忆能力缺陷。本研究以 β -细辛醚[15 mg/(kg · d)]对 3 个月龄 APP_{swe}/PS1dE9 双转基因模型小鼠连续灌胃 90 d 后进行 Morris 水迷宫行为学测试和脑组织 APP 检测,证实经过药物处理,缩短了模型小鼠的逃避潜伏期和穿越平台时间,并增加了小鼠的平

台穿越次数,降低了 APP 的表达,显示出 β -细辛醚在改善小鼠学习记忆能力和减少 A β 沉积方面的积极作用(考虑到药物本身的毒性作用,又是长期给药,在剂量设定上有所保留,药物处理的中、低剂量治疗组未显示出有统计学意义的学习记忆能力改

善)。为进一步明确药物产生疗效的物质基础,本研究进行了差异蛋白的检测和验证,发现 β -细辛醚调控了 systemic lupus erythematosus 通路中组蛋白 H2A 1-H 型、H2B 2-E 型和 H2B 1-F/J/L 型蛋白的表达。

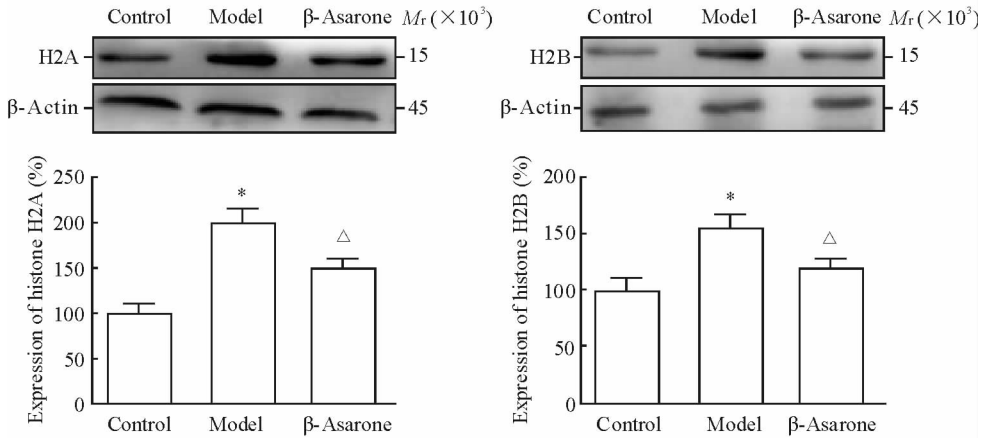


图 4 各组小鼠脑组织中组蛋白 H2A 和 H2B 的表达水平

Fig 4 Expression of histone H2A and H2B in brain tissues of mice in each group

* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

组蛋白是存在于真核生物核内构成染色体的基本结构蛋白,包括 H2A、H2B、H3、H4 和 H1,由前 4 型各 2 分子构成八聚体成为核小体核心,H1 作为连接分子位于核小体之间调节其在 DNA 高级结构的装配。组蛋白 N 末端保守且易发生转录后修饰,修饰的方式和数量不同可产生不同的表观遗传学信息。组蛋白修饰参与广泛的神经生物学过程,包括中枢神经系统发育、记忆的形成、星形胶质细胞源性和脑源性神经营养因子的转录,以及各种神经系统疾病如 AD 等。AD 患者海马组织中组蛋白 H2A 变体 H2AX 丝氨酸磷酸化水平升高,与 DNA 损伤有关^[5],H2B 的泛素化则在 DNA 复制与修复、基因表达及转录调控过程中起重要作用^[6],同时,组蛋白的修饰可通过相互之间的促进和抑制形成修饰级联来发挥作用。本实验结果显示,与正常对照组相比,模型小鼠脑组织中组蛋白 H2A 1-H、H2B 2-E 和 H2B 1-F/J/L 型的表达上调,经 β -细辛醚治疗后上述组蛋白表达均降低,提示 β -细辛醚可能介入组蛋白修饰过程而起到治疗作用。

值得一提的是,组蛋白的乙酰化与 AD 的发生发展关系密切,AD 患者脑内总组蛋白的乙酰化修饰显著增加,促进多个基因的转录活性^[7];在 APP 剪切酶 BACE1 与 PS1 等基因的启动子区域组蛋白

发生乙酰化有利于促进 A β 的形成^[8-9],通过乙酰化过程调节脑内 A β 的含量并影响 A β 的神经毒性作用。组蛋白的乙酰化过程主要由组蛋白乙酰化转移酶(HATs)与组蛋白去乙酰化酶(HDACs)动态调节,乙酰化可激活基因的转录活性,去乙酰化则可沉默或抑制基因转录^[10]。AD 患者早期出现内嗅皮质与海马 CA1 区的 I 类去乙酰化酶 HDAC2 表达增加,这 2 个区域也是 AD 患者脑组织受损最早、最严重的区域^[11-12];II 类去乙酰化酶 HDAC6 表达降低可降低 tau 蛋白在 Thr²³¹ 位点的磷酸化水平,从而调节 tau 磷酸化蛋白向异常蛋白包涵体聚集^[13];SIRT1 作为第 III 类 HDACs,对神经保护、突触可塑和学习记忆起重要作用,可通过与不同的非组蛋白和组蛋白的相互作用来完成不同的功能^[14]。研究表明,AD 患者顶叶皮质中 SIRT1 显著减少,与 A β 和 tau 蛋白的异常沉积相关^[15];AD 小鼠模型中出现 SIRT1 过表达,可以激活编码解聚素和金属蛋白酶 10(ADAM10) α 分泌酶的基因,从而减少 A β 的产生和老年斑的形成;SIRT1 还能够调节 Notch 通路从而修复神经元损伤^[16]。目前,HDACs 成为较为理想的 AD 药物干预靶点,HDACs 抑制剂也是研究较为广泛的针对 AD 表观遗传的治疗措施。当然, β -细辛醚是否可以产生 HDACs 抑制剂的作用需

要进一步研究。

AD的发生由遗传因素和环境因素共同决定,遗传因素包括基因突变等传统意义的遗传信息和表观遗传学信息,表观遗传信息的改变是可以逆转的,在早期治疗指导上有重要意义。本研究通过比对APP^{swE}/PS1^{dE9}双转基因小鼠模型脑组织中的差异蛋白质并进行通路富集的分析,寻找到β-细辛醚产生疗效的重要靶标蛋白,即:组蛋白H2A 1-H型、H2B 2-E型和H2B 1-F/J/L型。提示β-细辛醚可能通过调节上述3种蛋白参与表观遗传修饰方面作用降低Aβ毒性,改善学习记忆能力;同时表明药物的治疗作用可以存在于早期干预的环节,提供了β-细辛醚抗痴呆疗效的新信息。

[参考文献]

[1] HARDY J, SELKOE D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics[J]. Science, 2002, 297: 353-356.

[2] 李娜. 基于“Aβ级联假说”的中药治疗阿尔茨海默病研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31: 1714-1720.

[3] 陈新俊, 程黎晖. 石菖蒲的药理作用和临床应用探讨[J]. 中草药, 2007, 38: 附1-附3.

[4] WANG D M, YANG Y J, ZHANG L, ZHANG X, GUAN F F, ZHANG L F. Naringin enhances CaMK II activity and improves long-term memory in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14: 5576-5586.

[5] MYUNG N H, ZHU X, KRUMAN I I, CASTELLANI R J, PETERSEN R B, SIEDLAK S L, et al. Evidence of DNA damage in Alzheimer disease: phosphorylation of histone H2AX in astrocytes[J]. Age (Dordr), 2008, 30: 209-215.

[6] SHEMA E, TIROSH I, AYLON Y, HUANG J, YE C, MOSKOVITS N, et al. The histone H2B-specific ubiquitin ligase RNF20/hBRE1 acts as a putative tumor suppressor through selective regulation of gene expression[J]. Genes Dev, 2008, 22: 2664-2676.

[7] NARAYAN P J, LILL C, FAULL R, CURTIS M A, DRAGUNOW M. Increased acetyl and total histone levels in post-mortem Alzheimer's disease brain[J].

Neurobiol Dis, 2015, 74: 281-294.

[8] LU X, DENG Y, YU D, CAO H, WANG L, LIU L, et al. Histone acetyltransferase p300 mediates histone acetylation of PS1 and BACE1 in a cellular model of Alzheimer's disease [J/OL]. PLoS One, 2014, 9: e103067. doi: 10.1371/journal.pone.0103067.

[9] MARQUES S C, LEMOS R, FERREIRO E, MARTINS M, DE MENDONÇA A, SANTANA I, et al. Epigenetic regulation of BACE1 in Alzheimer's disease patients and in transgenic mice [J]. Neuroscience, 2012, 220: 256-266.

[10] BERGER S L. The complex language of chromatin regulation during transcription [J]. Nature, 2007, 447: 407-412.

[11] GUAN J S, HAGGARTY S J, GIACOMETTI E, DANNENBERG J H, JOSEPH N, GAO J, et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity[J]. Nature, 2009, 459: 55-60.

[12] GRÄFF J, REI D, GUAN J S, WANG W Y, SEO J, HENNIG K M, et al. An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain[J]. Nature, 2012, 483: 222-226.

[13] DING H, DOLAN P J, JOHNSON G V. Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau[J]. J Neurochem, 2008, 106: 2119-2130.

[14] BONDA D J, LEE H G, CAMINS A, PALLÀS M, CASADESUS G, SMITH M A, et al. The sirtuin pathway in aging and Alzheimer disease: mechanistic and therapeutic considerations [J]. Lancet Neurol, 2011, 10: 275-279.

[15] JULIEN C, TREMBLAY C, EMOND V, LEBBADI M, SALEM N Jr, BENNETT D A, et al. Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2009, 68: 48-58.

[16] DONMEZ G, WANG D, COHEN D E, GUARENTE L. SIRT1 suppresses β-amyloid production by activating the α-secretase gene ADAM10 [J]. Cell, 2010, 142: 320-332.

[本文编辑] 商素芳