

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003364

胡黄连苷 II 通过增强自噬改善 A β 模型小鼠的学习和记忆功能李兆伦¹, 杜烨鸿¹, 王茂菊¹, 何彦¹, 石岫屿¹, 田秋云¹, 范业鹏¹, 任风鸣², 董志芳¹

(1. 重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 认知发育与学习记忆障碍转化医学重庆市重点实验室, 重庆 400014; 2. 重庆中医药学院药物种植研究所, 重庆 408435)

【摘要】目的:探究胡黄连苷(picroside II, Picr II)对体内外阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)模型的学习和记忆功能及自噬相关机制。**方法:**通过 Western blot 检测在 Picr II (12.5~400 $\mu\text{mol/L}$) 对 AD 细胞模型中 β -淀粉样前体蛋白(β -amyloid precursor protein, APP)、 β -位点淀粉样前体蛋白切割酶 1(β -site APP-cleaving enzyme 1, BACE1)、早老素蛋白 1(presenilin 1, PS1)和 APP 羧基末端片段(carboxyl terminal fragment of β -amyloid precursor protein, CTF)蛋白表达影响, 以及 Picr II 和氯喹(Chloroquine, CQ)(50 $\mu\text{mol/L}$)或巴佛洛霉素(bafilomycin A1, BafA1)(10 $\mu\text{mol/L}$)共处理后对 APP、BACE1、PS1、C99、螯合体 1(sequestosome 1, p62)、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)、泛素化蛋白的表达影响; 利用免疫荧光分析自噬通量; 后期构建 β -淀粉蛋白(amyloid β , A β)模型小鼠, 分为 WT+PBS 组、WT+Picr II 组、A β +PBS 组和 A β +Picr II 组(20 mg/kg), 通过 Morris 水迷宫实验验证小鼠学习和记忆功能, 并检测小鼠海马蛋白中 P62 与 LC3 蛋白水平。**结果:**Western blot 显示:与对照组相比, Picr II (50 $\mu\text{mol/L}$)可显著降低 APP(60.46 ± 7.97 , $P=0.049$)及相关代谢产物蛋白水平, 并降低 P62(65.31 ± 3.51 %, $P=0.041$)水平, 增加 LC3 II [162.01 ± 12.24 %, $P<0.001$]水平, 并且在 CQ 作用下, Picr II 可降低 P62 [147.24 ± 10.69 %, $P<0.001$]及 LC3 水平 [826.23 ± 39.18 %, $P<0.001$]; 自噬通量分析显示:与对照组相比, Picr II 增加总荧光数(23.24 ± 1.50 , $P<0.001$)和红色荧光数(3.52 ± 0.33 , $P<0.001$); 行为学结果显示:与 WT+A β 组相比, A β +Picr II 组学习($F=17.25$, $P<0.001$)与记忆能力($F=6.627$, $P<0.001$)提高, 且小鼠海马蛋白中 A β +Picr II 组 P62 降低 [176.66 ± 11.47 %, $P=0.023$], LC3 II 升高 [81.20 ± 3.69 %, $P<0.001$]。**结论:**Picr II 可通过促进自噬体-溶酶体融合和提高自噬通量增强自噬, 从而促进 A β 清除并改善其引起的学习和记忆障碍。

【关键词】阿尔茨海默病; β -淀粉蛋白; 胡黄连苷 II; 自噬; 认知**【中图分类号】**R72**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2023-09-07Picroside II improves A β -induced learning and memory deficits in mice by enhancing autophagyLi Zhaolun¹, Du Yehong¹, Wang Maoju¹, He Yan¹, Shi Xiuyu¹, Tian Qiuyun¹, Fan Yepeng¹, Ren Fengming², Dong Zhifang¹

(1. Pediatric Research Institute, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Translational Medical Research in Cognitive Development and Learning and Memory Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University; 2. Chongqing Institute of Medicinal Plant Cultivation, Chongqing College of Traditional Chinese Medicine)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of picroside II (Picr II) on learning and memory functions in Alzheimer's disease (AD) model *in vivo* and *in vitro* and autophagy-related mechanisms. **Methods:** Western blot was used to observe the effect of Picr II (12.5–400 $\mu\text{mol/L}$) on the expression of β -amyloid precursor protein (APP), β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1), presenilin 1 (PS1), and carboxyl-terminal fragment of β -amyloid precursor protein (CTF) in the cell model of AD; after co-

作者介绍: 李兆伦, Email: 416649057@qq.com,

研究方向: 认知障碍相关神经系统疾病发病机制。

通信作者: 董志芳, Email: zfdong@cqmu.edu.cn。

基金项目: 重庆医科大学未来医学青年创新计划资助项目(编号: W0044)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20231102.1430.008>
(2023-11-02)treatment with Picr II and chloroquine (CQ) (50 $\mu\text{mol/L}$) or bafilomycin (BafA1) (10 $\mu\text{mol/L}$), its effect on the expression of APP, BACE1, PS1, C99, sequestosome 1 (P62), microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), and ubiquitinated proteins in cells was observed; immunofluorescence assay was used to analyze autophagic flux. Then a mouse model of A β was established, and the mice were divided into WT+PBS group, WT+Picr II group, A β +PBS

group, and A β +Pier II group (20 mg/kg). The Morris water maze test was used to verify the learning and memory functions of A β model mice, and the protein expression levels of P62 and LC3 in the hippocampus of mice were measured. **Results:** Western blot showed that compared with the control group, Pier II (50 μ mol/L) significantly reduced the protein expression levels of APP[(60.46 \pm 7.97)%, $P=0.049$] and related metabolites, and it also reduced the expression level of P62[(65.31 \pm 3.51)%, $P=0.041$] and increased the expression level of LC3 II [(162.01 \pm 12.24)%, $P<0.001$]; with the action of CQ, Pier II could reduce the expression levels of P62[(147.24 \pm 10.69)%, $P<0.001$] and LC3 II [(826.23 \pm 39.18)%, $P<0.001$]. The analysis of autophagic flux showed that compared with the control group, Pier II increased the total number of fluorescent dots (23.24 \pm 1.50, $P<0.001$) and the number of red dots (3.52 \pm 0.33, $P<0.001$). The behavioral analysis showed that compared with the WT+A β group, the A β +Pier II group had significant increases in learning ability ($F=17.25$, $P<0.001$) and memory ability ($F=6.627$, $P<0.001$), as well as a significant reduction in P62[(176.66 \pm 11.47)%, $P=0.023$] and a significant increase in LC3 II [(81.20 \pm 3.69)%, $P<0.001$]. **Conclusion:** Pier II can enhance autophagy by promoting autophagosome-lysosome fusion, thereby promoting the clearance of A β and improving A β -induced learning and memory deficits.

【Key words】Alzheimer's disease; A β ; picroside II; autophagy; cognition

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种神经退行性疾病,影响着全球数千万人,特别是老年群体。AD 的重要特征之一是大脑中淀粉样蛋白- β (amyloid β , A β) 肽的积累,其被认为是在 AD 发病机制中起着关键作用^[1-3]。A β 是由 β 位点 APP 裂解酶 1 (β -site APP-cleaving enzyme 1, BACE1) 和 早老蛋白 1 (presenilin 1, PS1) 依次裂解淀粉样前体蛋白 (β -amyloid precursor protein, APP) 产生的^[4]。BACE1 在 N 端切割 APP 产生 APP 羧基末端片段 (carboxyl terminal fragment of β -amyloid precursor protein, CTF), 然后通过 γ 分泌酶进一步处理并释放 A β 。有证据表明, A β 的过度产生和大脑中 A β 的清除受损是 AD^[5-7] 发展和进展的关键因素。因此,提高 A β 清除率是预防和治疗 AD^[8-9] 的一种很有前景的方法。另外, APP 及其相关代谢蛋白如 BACE1、PS1、CTF、C99 因其能代表 AD 的病理转归,所以对这些进行蛋白水平检测显得尤为重要。自噬是一个重要的细胞生理性过程,它通过降解和回收受损或不必要的细胞成分,帮助维持细胞内稳态^[10]。大量研究表明,自噬在 AD 动物模型和 AD 患者体内的自噬功能受到破坏。在 A β 斑块出现之前,自噬空泡会在营养不良的神经元突起、神经元树突和轴突中积累^[11-12]。同时,自噬的增强即 P62 蛋白水平的降低与 LC3 的水平升高可抑制几乎所有 APP 裂解产物的降解,从而减少 A β 的积累^[13-14],并最终改善 AD 的认知障碍^[15]。因此,提高自噬能力可能是治疗 AD 的一种潜在方法。胡黄连苷 II (picroside II, Pier II) 是从胡黄连中提取的天然产物成分之一,已被证明具有多种药理特性,包括抗炎、抗氧化和神经保护作用^[16-18]。越来越多的证据表明, Pier II

可通过抑制 ERK 1/2 的激活和 TLR 4、NF- κ B、TNF- α 、Rac-1 和 Nox2 的表达,发挥抗炎、抗氧化和抗细胞凋亡的作用,从而对脑缺血损伤起到保护作用^[19-20]。此外, Pier II 已被证明可以明显改善 AICD₃ 诱导的学习和记忆功能障碍,并减少与氧化毒性相关的组织学变化^[21]。然而, Pier II 对 AD 学习和记忆功能的影响和作用目前暂无报道,其潜在治疗作用的机制仍不清楚。在本研究中,我们通过体外和体内实验探究了 Pier II 对自噬功能低下的 A β 模型小鼠的神经保护作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 细胞干预与培养

稳定表达人瑞典 APP 695 (N2A-APP) 的小鼠神经母细胞瘤细胞 (从中国上海复旦大学钟春玖教授处获得) 培养在含 90% DMEM (11960044, Gibco, 美国)、10% FBS (10099, Gibco, 美国) 和 100 μ g/mL G418 (11811031, Gibco, 美国) 的培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

Pier II、氯喹 (Chloroquine, CQ) (C6628, Sigma, 中国)、巴佛洛霉素 A1 (BafA1) (88899-55-2, Selleck, 中国) 和 Mg132 (M8699-1MG, Sigma, 中国) 按所需浓度溶于 PBS。将 Pier II、CQ、BafA1 和 Mg132 按所需浓度溶于的 PBS。Mg132 干预组分为 CTR 组、CTR+Pier II 组、CTR+ Mg132 组、Pier II +Mg132 组 ($n=3$); CQ 干预组分为 CTR 组、CTR+Pier II 组、CTR+CQ 组、Pier II +CQ 组 ($n=4$); BafA1 干预组分为 CTR 组、CTR+Pier II 组、CTR+BafA1 组、Pier II +BafA1 组 ($n=3$)。

1.2 细胞活性测定

将 N2A-APP 细胞接种于 96 孔板中,用浓度递增 (0、12.5、25、55、50、100、200 和 400 μ mol/L) 的 Pier II 处理 ($n=4$)。24 h 后,在每个孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液,然后在 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 4 h。随后,使用酶标仪 (HY-K0301-100T, MCE,

美国)测定 450 nm 波长处的吸光度。细胞存活率%=(实验孔吸光度-空白孔吸光度)/(对照孔吸光度-空白孔吸光度)。

1.3 蛋白免疫印迹

用 4 ℃ 的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗脑组织或细胞,并在冰上裂解 15 min。离心(12 000 r/min, 15 min, 4 ℃)后,收集上清液。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(BCA, Thermo Fisher, 美国)测定蛋白质浓度。每个样品中取 30 mg 蛋白质放入 5 × 上样缓冲液中,在 95 ℃ 下煮沸 5 min。等量蛋白质样品通过 12.5% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(ISEQ00010, Millipore, 美国)上。PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,以减少非特异性背景。目标蛋白包括 APP(1:1 000 来自加拿大温哥华英属哥伦比亚大学的宋伟宏教授)、BACE1(1:1 000, 5606S, CST, 美国)、PS1(1:1 000, ab76083, Abcam, 美国)、GAPDH(1:1 000, arg10112, Grigobio, 中国)、泛素化抗体(anti-ubiquitin)(1:1 000, 10201-2-AP, proteintech, 中国)、P62(1:1 000, 18420-1-AP, proteintech, 中国)和 LC3 A/B(1:1 000, 12741, CST, 美国)。然后用兔/鼠二抗(1:3 000, Perkin-Elmer, 中国)在 37 ℃ 下孵育 2 h。所有数据均以 CTR 组进行标准化处理。

1.4 自噬通量分析

利用 mCherry-GFP-LC3B 构建自噬双荧光质粒来评估自噬通量。简而言之,用 lipofectamine 3000(L3000008, invitrogen, 美国)在 6 孔板中转染 mCherry-GFP-LC3B 24 h。经 Picr II (50 μmol/L) 处理 24 h、CQ (50 μmol/L) 处理 6 h 或 EBSS 处理 1 h 后,用 4% 多聚甲醛(PFA)(158127, Sigma, 美国)固定细胞于细胞爬片,然后用抗荧光淬灭剂密封细胞爬片。非 EBSS 干预组分为 Ctr 组($n=25$), Picr II 组($n=34$), Ctr+CQ 组($n=42$), Picr II +CQ 组($n=56$), EBSS 干预组分为 Ctr 组($n=25$), Picr II 组($n=30$), Ctr+CQ 组($n=25$), Picr II +CQ 组($n=35$)。所有细胞图像均使用尼康 90i 荧光显微镜拍摄。通过从三个重复组中计数 25 个以上的细胞确认 GFP-LC3 和 mCherry-LC3 荧光点的数量,从而量化自噬。

1.5 动物

6~8 周的 C57BL/6 雄性小鼠(25~30 g)(北京维通利华实验动物技术有限公司)被饲养在由重庆医科大学附属儿童医院动物实验中心提供的标准实验条件下,饲养条件为自动温控湿的 12 h 光/暗自动循环环境下的饲养笼内,老鼠可以随意获得食物和水。将动物随机分配到不同的治疗组,包括 WT+PBS($n=20$)、WT+Picr II ($n=19$)、Aβ+PBS($n=20$)和 Aβ+Picr II ($n=21$),四组均进行侧脑室立体定位注射。WT+Picr II 和 Aβ+Picr II 组在立体定位注射后的第 1 天,进行腹腔注射 Picr II [20 mg/(kg·d)], WT+PBS 组和 Aβ+PBS 组腹腔注射相同体积的 PBS,连续注射 2 周。各组小鼠在腹腔注射后均无局部反应及死亡。

1.6 实验试剂

Aβ₁₋₄₂ 肽(A9810, Sigma, 中国)首先溶解于六氟异丙醇(HFIP)(AG968, Sigma, 中国)中,并在室温下放置 60 min。

然后将得到的单体肽溶解在二甲亚砜(DMSO)(D2650, Sigma, 中国)中达到 1 mmol/L 的浓度。然后用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释溶液至 100 μmol/L,最后在 4 ℃ 下孵育 48 h,形成低聚物。将 Picr II (39012-20-9, 中国成都曼斯特生物技术有限公司)用 PBS 稀释至 10 mg/mL。

1.7 Aβ 立体定位注射

侧脑室注射 Aβ₁₋₄₂ 是一种常用的复制 AD 的病理生理学的实验方法^[22]。将 C57 小鼠随机分为四组:WT+PBS 组($n=20$)、WT+Picr II 组($n=19$)、Aβ+PBS 组($n=19$)和 Aβ+Picr II 组($n=22$),通过吸入异氟烷(2%~3%)对小鼠进行麻醉后,剔去小鼠头颅部位的毛发,将小鼠头部固定在立体定位装置上,且大脑处于水平位置。用聚维酮碘溶液消毒头皮,沿中线切开暴露头骨。以 0.5 μL/min 的速度注射 2.5 μL 的 Aβ₁₋₄₂ (100 μmol/L)于侧脑中,目标坐标为前囟的后方-0.5 mm、外侧+1.1 mm 和腹侧-3.0 mm, WT+PBS 组和 WT+Picr II 组分别注射等量磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)于侧脑室。注射器静置 5 min,以便液体完全扩散吸收。小心取下注射器并缝合头皮后,将小鼠放回笼子进行复温。后续对 WT+Picr II 和 Aβ+Picr II 组小鼠进行水迷宫实验,根据 5 d 学习期小鼠到达平台所在的时间长短进行统计,以判断造模是否成功。各组小鼠在立体定位注射 Aβ 后均无局部反应及死亡。

1.8 Morris 水迷宫实验

腹腔注射 Picr II 2 周后,对小鼠进行 Morris 水迷宫实验。实验在一个直径为 150 cm、高 50 cm 的圆形水池中进行,水温保持在 21~22 ℃。在水池的第三象限中间放置一个直径为 10 cm 的平台,水位保持在平台上方 1 cm 处。水池的背景用无毒涂料涂成白色,以增强对比度,从而使安装在水池中点上方的摄像机能够精确记录小鼠的动作。水池周围放置了淡蓝色的帘子,并贴上 3 个远处的视觉提示点。在进行空间训练的前 1 天,让小鼠在没有平台的水池中自由游动 120 s 以适应环境。随后,小鼠连续五天进行后天训练,每天 4 次。在每次试验中,如果小鼠未能在 120 s 内找到平台,就会被引导到平台上,并允许小鼠在平台上停留 20 s。ANY-maze 系统(Stoelting, 美国)自动记录并计算小鼠逃逸时间、学习期轨迹和实验期轨迹等实验数据。所有数据均以 WT+PBS 组进行标准化处理。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 软件(20.0 版)进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 *t* 检验、单因素或多因素方差分析来评估结果。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

本研究得到重庆医科大学附属儿童医院实验动物伦理委员会的审查批准(CHCMU-IACUC20210114017)。

2 结果

2.1 Picr II 抑制 N2A-APP 细胞中的 APP 加工

首先使用 CCK-8 试剂盒检测了 Picr II 对 N2A-APP 细胞

存活率的影响,浓度范围为 0 至 400 $\mu\text{mol/L}$,持续 24 h ($F=0.282, P=0.939$;图 1A)。此外,还研究了 Picr II 对 N2A-APP 细胞中 APP 处理的影响。结果显示,APP 的表达量减少,且在 50 $\mu\text{mol/L}$ 处时最为明显且稳定 $[(60.46 \pm 7.97)\%, P=0.049$;图 1B~C]。同时,在浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 Picr II 处理下,BACE1 表达量减少(50 $\mu\text{mol/L}: P=0.030$;100 $\mu\text{mol/L}: P=0.007$;图 1D)。此外,Picr II 处理也导致 PS1 在浓度为 50、100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 N2A-APP 细胞中表达下降(50 $\mu\text{mol/L}: P=0.049$;100 $\mu\text{mol/L}: P=0.017$;200 $\mu\text{mol/L}: P=0.039$;图 1E),且 N2A-APP 细胞中的 CTF 表达水平在 Picr II 梯度浓度范围为 25 $\mu\text{mol/L}$ 至 400 $\mu\text{mol/L}$ 时下降,50 $\mu\text{mol/L}$ 处时最为明显且稳定 ($P=0.044$;图 1F)。这些数据表明,Picr II 通过影响 N2A-APP 细胞中的 APP 处理,减少 A β 的生成。

2.2 Picr II 通过自噬溶酶体途径减少 APP 的加工

真核生物有两大蛋白质降解系统,即泛素蛋白酶体系统(UPS)和自噬溶酶体途径(ALP)^[23-24]。为了阐明 UPS 可能参与了所观察到的 APP 处理过程的减少,本课题组使用 MG132(10 $\mu\text{mol/L}$)来抑制蛋白酶体。结果显示,无论是否与 MG132 共处理,Picr II 对 N2A-APP 细胞中泛素的总水平都没有明显影响(图 2A)。这些结果表明,Picr II 可能不通过 UPS 通路影响 APP 加工。为了探索 Picr II 是否可以通过 ALP 影响 APP 的加工过程,本课题组使用了常见的自噬抑制剂 CQ。结果表明,Picr II 处理的 N2A-APP 细胞中 APP、BACE1 和 PS1 的表达均有所下降(图 2B)。而 CQ 处理会增加 APP 的表达($P=0.837$;图 2D)、BACE1 ($P=0.002$;图 2E)和 PS1 ($P<0.001$;图 2F),而 Picr II 可逆转此效果(APP: $P=$

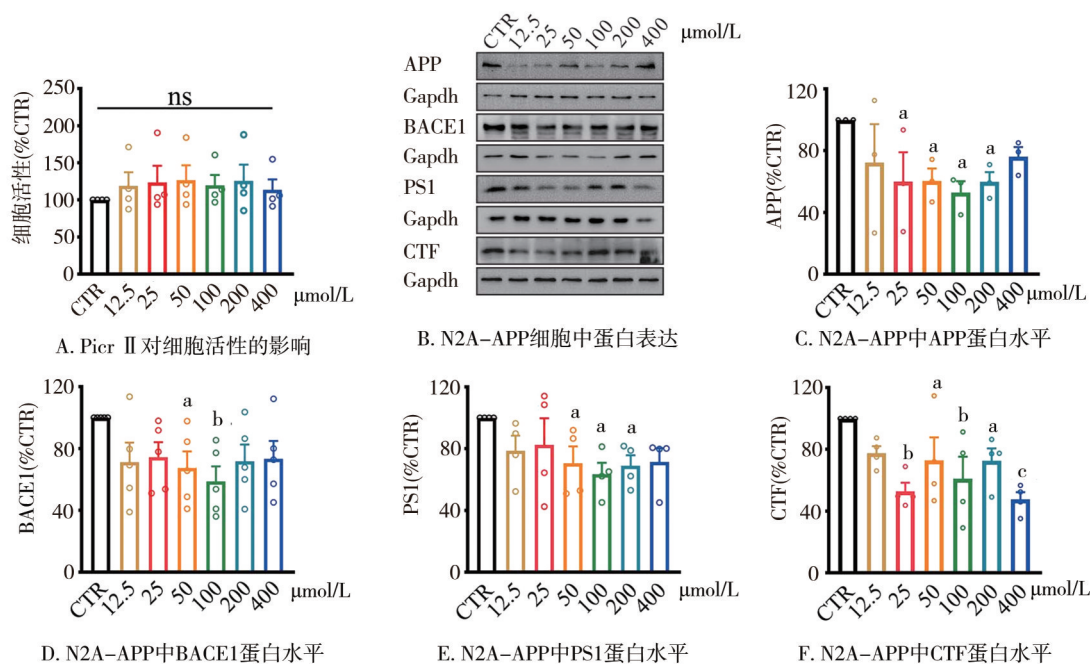
0.007)、BACE1: $P=0.011$ 、PS1: $P=0.001$)(图 2D~F)。为了进一步研究 Picr II 在自噬中的作用,本课题组使用了 BafA1,这是一种自噬体-溶酶体融合和溶酶体降解的强效抑制剂。结果显示,Picr II 无法逆转 BafA1 提高 APP ($P=0.091$;图 2G~C)、BACE1 ($P=0.257$;图 2H)和 PS1 ($P=0.645$;图 2I)的蛋白水平,表明 Picr II 可能通过自噬溶酶体途径而不是泛素-蛋白酶体途径抑制 APP 的加工,并且 Picr II 可一定程度逆转 CQ 对自噬的抑制作用。

2.3 Picr II 可改善 N2A-APP 细胞的自噬通量

有研究表明,Picr II 能改善 CQ 对自噬溶酶体途径的抑制作用。因此,本课题组检测了自噬相关蛋白 P62 和 LC3 II 水平,结果显示,Picr II 在使得 P62 表达显著降低(50 $\mu\text{mol/L}: P=0.041$;图 3A 和 3B),并且,与对照组相比,经梯度浓度为 12.5 $\mu\text{mol/L}$ ~400 $\mu\text{mol/L}$ 的 Picr II 干预后,N2A-APP 细胞中的 LC3 II 明显升高(50 $\mu\text{mol/L}: P<0.001$;图 3C)并且 LC3 I 表达水平也有显著升高(50 $\mu\text{mol/L}: P<0.001$;图 3D)。这些结果表明,Picr II 可通过增加 AD 模型细胞的自噬通量来改善受损的自噬功能。基于实验结果的显著性稳定性,在随后的研究中采用了 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Picr II 浓度作为后续实验浓度。

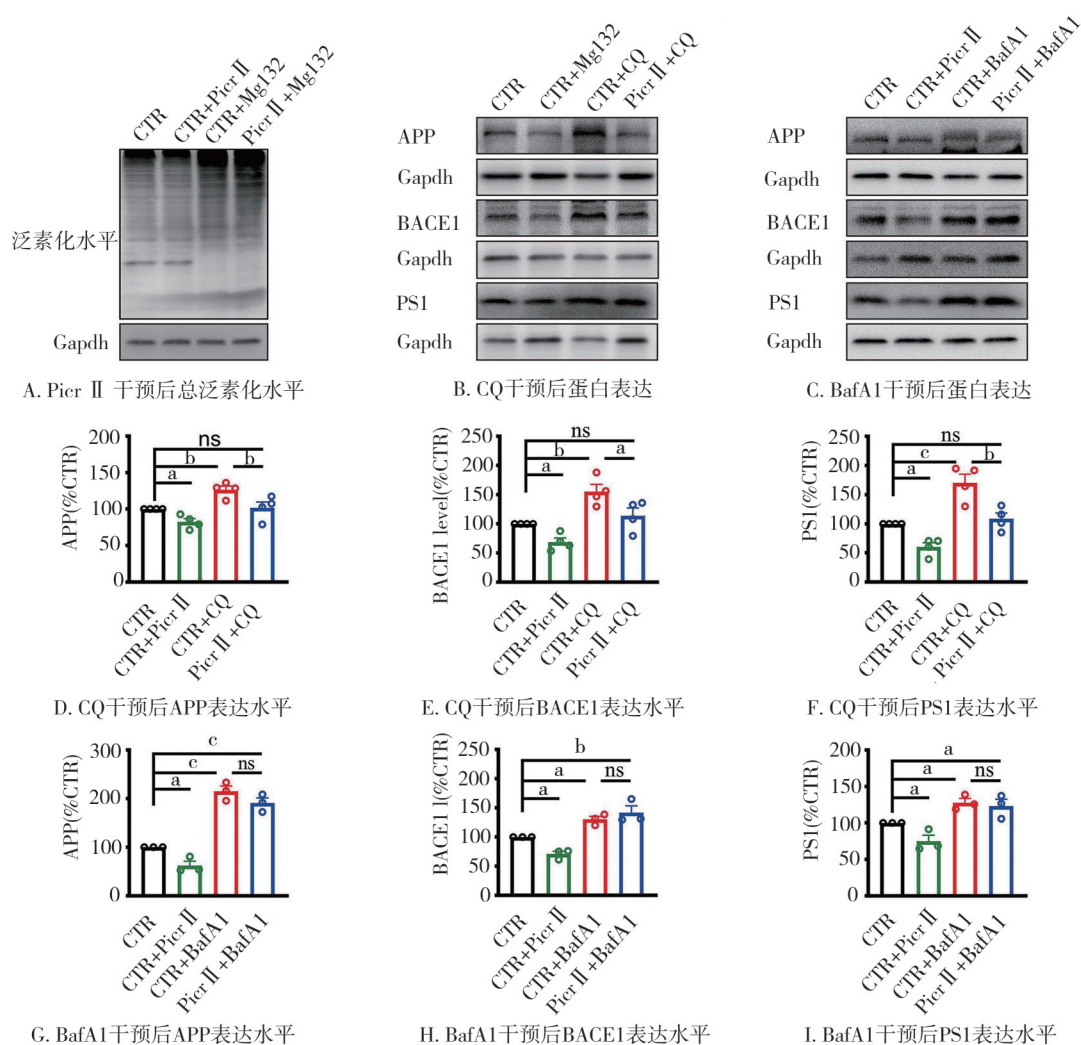
2.4 Picr II 消除了 CQ 对 N2A-APP 细胞自噬的抑制作用

为了研究 Picr II 影响自噬溶酶体途径的机制,本课题组使用 CQ 抑制自噬溶酶体途径,并检测了 Picr II 干预的 N2A-APP 细胞中自噬相关蛋白 P62 和 LC3 II 的表达。结果显示,P62 表达量明显减少($P=0.035$;图 4A)而在 CQ 干预后的 N2A-APP 细胞中观察到的表达显著增加($P<0.001$;图 4B),后在 Picr II 作用下恢复至正常水平($P<0.001$;图 4B)。同时,Picr II



注: a, 与 CTR 组比较, $P<0.05$; b, 与 CTR 组比较, $P<0.01$; c, 与 CTR 组比较, $P<0.001$

图 1 Picr II 对 N2A-APP 细胞蛋白表达的影响



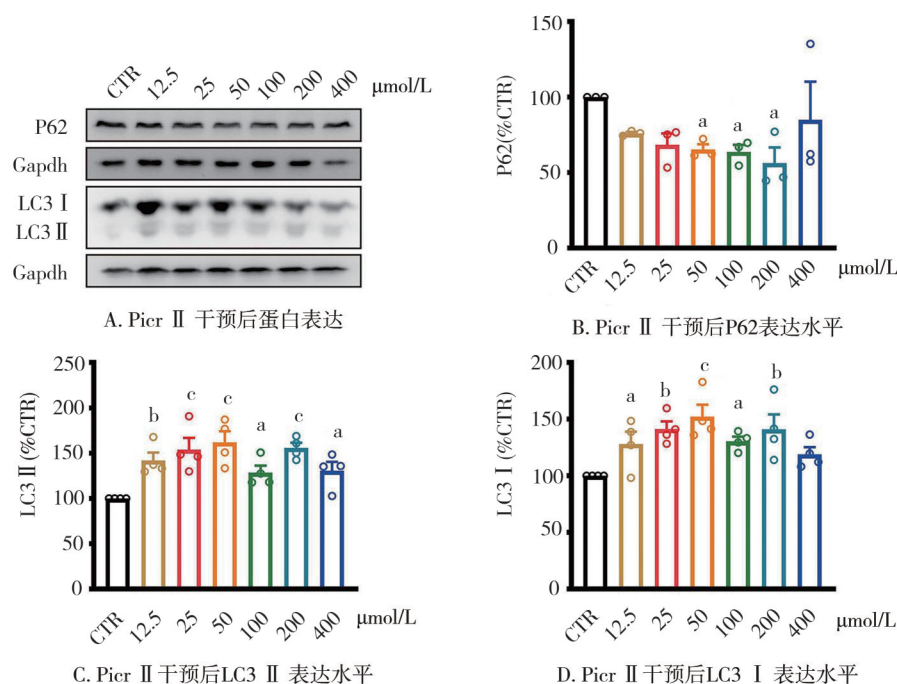
注:a,与 CTR 组比较, $P<0.05$;b:与 CTR 组比较, $P<0.01$;c:与 CTR 组比较, $P<0.001$

图 2 Pier II 通过自噬溶酶体途径抑制 APP 的加工($\bar{x} \pm s$)

干预的 N2A-APP 细胞中 LC3 II 水平明显升高($P=0.008$;图 4C),而在 CQ 的影响下,LC3 II 表达量的增加更为明显($P<0.001$;图 4C)。值得注意的是,Pier II 的作用下不仅降低了 LC3 II 水平($P<0.001$;图 4C),同时也使 LC3 I 水平降低($P=0.017$;图 4D)。这些结果表明,Pier II 可逆转 CQ 对自噬的抑制作用,从而使 APP 产物经自噬溶酶体途径偏向性增强。

为了进一步研究 Pier II 在自噬溶酶体途径中的确切作用,本研究使用 mCherry-GFP-LC3 进行了荧光测定。这种检测方法以 mCherry 荧光在酸性区室中更稳定,而 GFP 荧光会被迅速淬灭为原理。因此,自噬通量的增加会增加黄色(mCherry 和 GFP)和红色(仅 mCherry)荧光点数量。相反,阻止自噬体与溶酶体融合或抑制溶酶体降解(导致溶酶体 pH 值升高)只会增加黄色点的数量^[25-27]。将 LC3-mCherry-GFP 瞬时转染到 N2A-APP 细胞中,发现在 Pier II 的干预下,增加了荧光点的总体数量($P=0.022$;图 4E~G),并且红色荧光点也增多($P=0.001$;图 4E~G),而黄色荧光点数量保持不变

($P=0.736$;图 4E~G)。在 CQ 干预的情况下可增加总荧光点的数量($P<0.001$;图 4G)和黄色荧光点数量($P<0.001$;图 4G),但减少了红色荧光点数量($P=0.035$;图 4G)(红色荧光点约占 LC3 总数的 17%)。然而,在 CQ 存在的情况下加入 Pier II 可逆转这种效应($P<0.001$;图 4G)(约占 LC3 总数中红色荧光点的 56%),并增加总荧光点数($P<0.001$;图 4G)。此外,课题组用 EBSS 干预细胞使其自噬通量增加后,荧光点总数($P<0.001$;图 4I~J)、红色荧光总数($P<0.001$;图 4I~J)和黄色点状细胞总数($P=0.005$;图 4I~J)(约占 LC3 红点总数的 68%)均大幅增加,这种情况可以被 CQ 抑制,表现为红色荧光点数量减少($P=0.001$;图 4I~J)(约占 LC3 红点总数的 21%)。然而,无论是否经过 CQ 干预的 N2A-APP 细胞,Pier II 均会增加未经 EBSS 处理($P<0.001$;图 4G~H)和经 EBSS 处理($P=0.037$;图 4I~J)后的红色荧光点数量(分别约占 LC3 总点数的 57% 和 68%)。这些结果表明,Pier II 有可能抵消 CQ 对自噬的抑制作用(图 4I~J)。



注:a,与CTR组比较, $P<0.05$;b:与CTR组比较, $P<0.01$;c:与CTR组比较, $P<0.001$

图3 Picir II 对N2A-APP细胞自噬的影响($\bar{x} \pm s$)

2.5 Picir II 可改善A β 模型小鼠的认知障碍

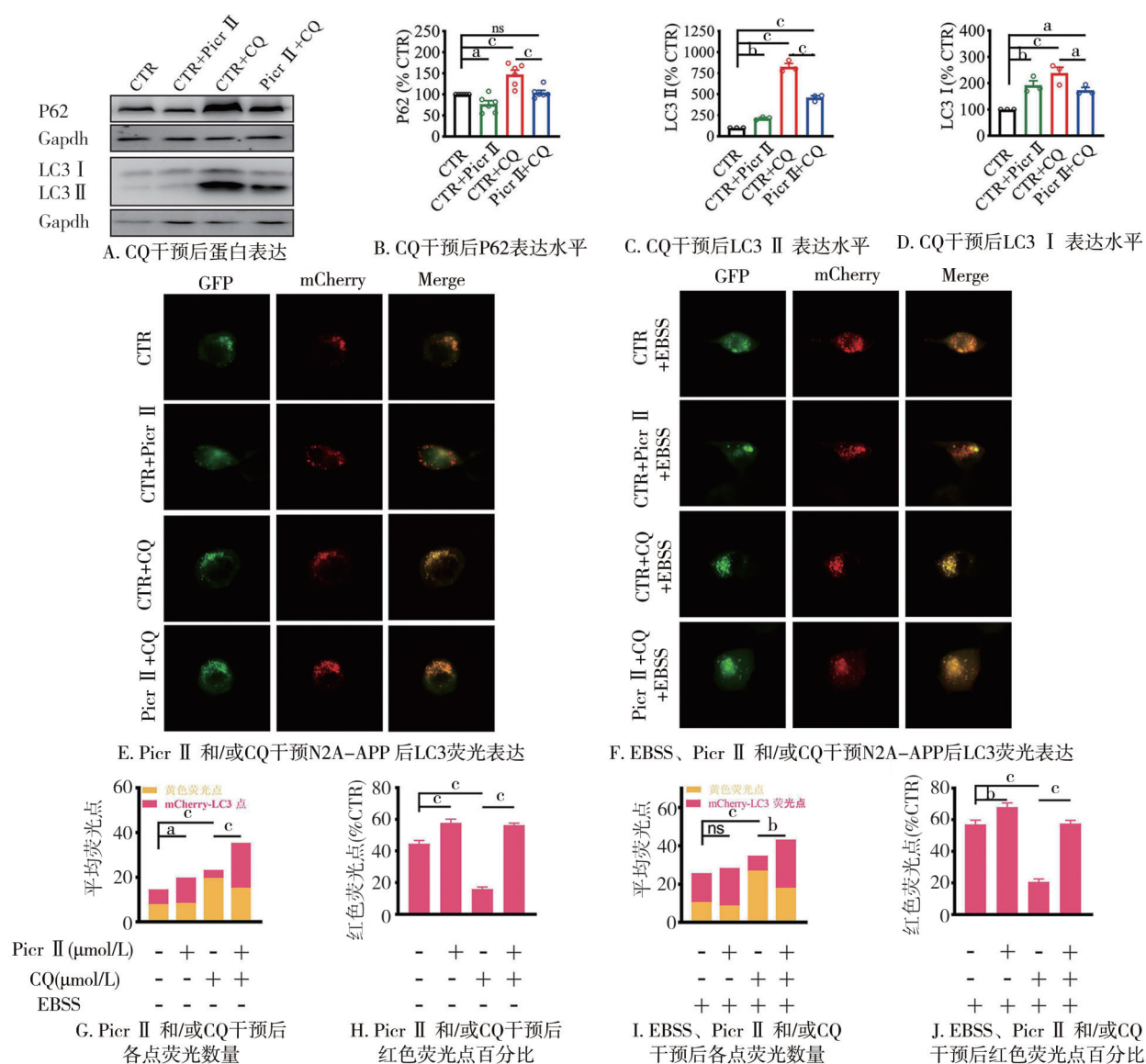
通过腹腔注射给予小鼠Picir II 2周后,进行小鼠Morris水迷宫实验,以评估Picir II对海马依赖的空间学习和记忆的影响。本研究结果表明,与WT+PBS组相比,A β 处理组小鼠的学习能力明显受损,表现为逃逸潜伏期显著增加($P<0.001$;图5A),而Picir II处理组小鼠的逃逸潜伏期显著减少($P<0.001$;图5B)。然而,Picir II对WT+PBS组的逃逸潜伏期并没有影响($P=0.688$;图5B)。此外,在实验过程中,本研究发现经A β 处理的小鼠穿越平台的次数明显低于WT+PBS组($P=0.009$;图5C),而与A β 模型小鼠相比,Picir II治疗后的小鼠进入平台的次数更多($P<0.001$;图5D)。这些结果表明,Picir II可改善A β 治疗小鼠下降的认知能力。此外,本研究还评估了小鼠海马中自噬相关蛋白P62和LC3 II的表达。结果显示,Picir II不影响P62($P=0.294$;图5E)、LC3 II($P=0.251$;图5F)和LC3 I($P=0.218$;图5G)的水平。然而,A β 模型的小鼠P62的表达明显高于WT组($P=0.003$;图5E),而LC3 II的表达水平($P=0.046$;图5F)和LC3 I($P=0.005$;图5G)明显减少。用Picir II处理后,P62($P=0.023$;图5E)的表达增加,LC3 II($P<0.001$;图5F)和LC3 I($P<0.001$;图5G)显著增加。因此,这些结果再次证实了之前的结论,即Picir II可改善AD模型小鼠的自噬功能。

3 讨论

目前的研究发现,Picir II可通过自噬溶酶体途径而非泛素-蛋白酶体途径抑制APP的加工并缓解

A β 模型小鼠记忆力减退。此外,课题组还发现Picir II可通过增加自噬通量,促进自噬体与溶酶体的融合从而提高自噬能力。

AD进展的初始事件是A β 的过度沉积,而A β 是由 β -分泌酶和 γ -分泌酶依次裂解APP产生的^[28]。因此,本研究检测了Picir II对APP及其代谢产物的影响,包括APP、BACE1、PS1和CTF,发现在Picir II干预后APP及其代谢产物均减少,表明Picir II可以减少APP及其代谢产物的代谢。先前的研究表明,APP可通过泛素-蛋白酶体系统和自噬-溶酶体途径降解^[29-30]。泛素-蛋白酶体系统是真核细胞中降解折叠错误或异常修饰蛋白质的核心控制系统^[31-32]。然而,当本研究用Picir II和蛋白酶体抑制剂MG132共处理N2A-APP细胞时,我们观察到总泛素化水平没有明显变化,这表明泛素-蛋白酶体系统可能并没有参与Picir II抑制代谢APP的过程。最近,Picir II在糖氧剥夺条件下的SH-SY5Y细胞中通过增加LC3进而增强自噬功能^[33],而P62蛋白水平降低的同时,LC3的水平升高代表着自噬水平的增强,这与本研究结果相似。此外,本研究结果表明,Picir II处理不仅会增加LC3 II的表达,还会降低P62的表达,从而导致APP及其裂解产物的降解,从而改善A β 模型小鼠的学习认知能力和记忆



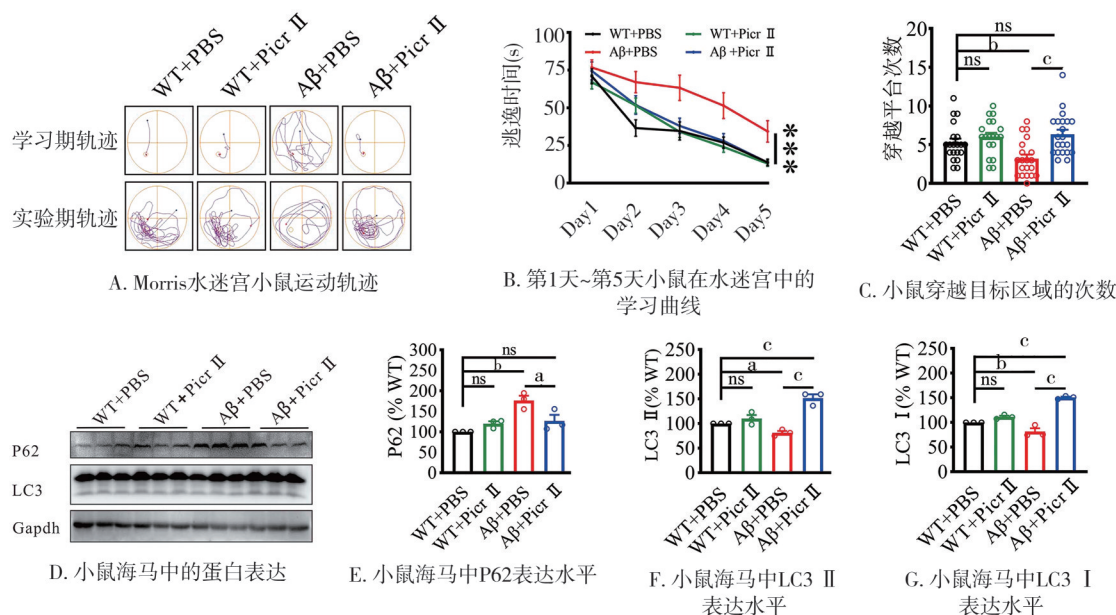
注: a, $P < 0.05$; b, $P < 0.01$; c, $P < 0.001$

图 4 Pier II 对 CQ 处理的 N2A-APP 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$)

功能。值得注意的是, LC3 II 和 LC3 I 的比率通常被用作自噬活性的指标。因此, LC3 II 与 LC3 I 比值的增加通常被解释为自噬活性的增加。然而, LC3 抗体检测的抗原表位位于 LC3 的 N 端, 因此对 LC3 II 的亲合力较高。同时, LC3 II 是由 LC3 I 与磷脂酰乙醇胺(PE)脂化形成的, 这是自噬体形成的一个重要过程。因此, 与简单比较 LC3 II 和 LC3 I 或仅比较 LC3 I 相比, LC3 II 可提供有关自噬活性程度的更准确信息^[34-35]。在本研究中, 证明了 Pier II 能够增加 LC3 II 的表达, 这表明它能增强自噬。另外, Pier II 处理或 CQ 干预后, LC3 II 的表达的增加可能与不同的作用机制有关。CQ 可抑制自噬体与溶酶

体的融合, 从而阻碍自噬的最后阶段, 导致降解产物在自噬体内积累, 进而导致 LC3 II 水平的增加^[36]。而 Pier II 可促进 LC3 的转录或加速自噬体与溶酶体的融合, 从而增强自噬作用, 导致自噬作用增强而非抑制, 进而提高 LC3 II 的水平。此外, Pier II 可能会通过 CQ 阻断的溶酶体途径, 从而在一定程度上消除 CQ 对自噬的抑制作用。是因为 CQ 正是通过阻断自噬体与溶酶体的融合(这是自噬降解的关键步骤)来阻碍自噬的, 因此很难绕过这一机制^[37]。因此, Pier II 有可能减轻 CQ 对自噬的抑制作用, 导致自噬通量增加和 LC3 II 水平下降。

除了 LC3 II 的增加外, 使用 Pier II 干预 N2A-



注:a, $P < 0.05$; b, $P < 0.01$; c, $P < 0.001$

图5 Picr II 对Aβ小的体内模型的影响($\bar{x} \pm s$)

APP后还观察到LC3 I 的增加。这种增加可能是由于抑制了自噬-溶酶体融合或溶酶体降解的下降,与CQ或BafA1的作用类似。尽管如此,Picr II 处理后P62的减少以及LC3-mCherry-GFP检测中红色和黄色点的增加表明,Picr II 是增强自噬功能,而不是抑制自噬功能。LC3 I 增加的一个可能的解释是,LC3本身的转录量很高,而LC3的转化却得到了促进。这种现象并不罕见,因为EBSS诱导的饥饿会增加溶酶体和自噬相关基因(包括LC3 I 和LC3 II)的表达,从而增强自噬功能^[38]。然而,要确定Picr II 处理后LC3 I 增加的潜在机制还需要进一步研究。

CQ和BafA1是广泛被使用的抑制自噬的药物,但它们通过不同的机制发挥作用^[39]。CQ最初被认为是通过破坏液泡H⁺ATP酶来提高溶酶体pH值并阻止自噬体-溶酶体融合。然而,最近的研究发现,CQ是通过损害自噬体-溶酶体融合而不是降低溶酶体酸度来抑制自噬通量的^[40]。相比之下,BafA1是一种更有效的自噬抑制剂,它不仅能降低溶酶体酸度,还能破坏自噬体与赖氨酸体的融合。本研究结果表明,Picr II 能逆转CQ的功能,但不能逆转BafA1的功能。此外,mCherry-GFP-LC3自噬通量分析结果表明,Picr II 可增强自噬体-溶酶体融合,而不影响溶酶体酸度,这一点可以改善CQ诱导的红色点的减少得到证明。然而,要全面阐明Picr II

与CQ之间相互作用的机制也需要进一步的研究。

总之,本研究结果表明,Picr II 有可能通过促进自噬体-溶酶体融合和提高自噬通量来增强自噬,从而促进Aβ的清除和Aβ引起的认知障碍。基于这些结果,Picr II 可作为一种潜在的AD治疗药物。

参 考 文 献

- [1] DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease[J]. Mol Neurodegener, 2019, 14(1): 1-18.
- [2] Chen XY, Holtzman DM. Emerging roles of innate and adaptive immunity in Alzheimer's disease[J]. Immunity, 2022, 55(12): 2236-2254.
- [3] Cho Y, Bae HG, Okun E, et al. Physiology and pharmacology of amyloid precursor protein[J]. Pharmacol Ther, 2022, 235: 108122.
- [4] Das U, Scott DA, Ganguly A, et al. Activity-induced convergence of APP and BACE-1 in acidic microdomains via an endocytosis-dependent pathway[J]. Neuron, 2013, 79(3): 447-460.
- [5] Sun L, Zhou R, Yang G, et al. Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the *in vitro* production of Aβ42 and Aβ40 peptides by γ-secretase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(4): E476-E485.
- [6] Zhang HQ, Wei W, Zhao M, et al. Interaction between aβ and tau in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Int J Biol Sci, 2021, 17(9): 2181-2192.
- [7] Morello D. (proto)-oncogènes, croissance cellulaire et développement[J]. Reprod Nutr Dévelop, 1988, 28(6B): 1687-1698.
- [8] Sevigny J, Ping CA, Bussière T, et al. The antibody aducanumab reduces Aβ plaques in Alzheimer's disease[J]. Nature, 2016, 537(7618): 50-56.

- [9] Jin WS, Shen LL, Bu XL, et al. Peritoneal dialysis reduces amyloid- β plasma levels in humans and attenuates Alzheimer-associated phenotypes in an APP/PS1 mouse model[J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 134(2):207–220.
- [10] Li W, He PC, Huang YG, et al. Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances[J]. *Theranostics*, 2021, 11(1):222–256.
- [11] Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, et al. Macroautophagy—a novel β -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease[J]. *J Cell Biol*, 2005, 171(1):87–98.
- [12] Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, et al. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2005, 64(2):113–122.
- [13] Son SM, Jung ES, Shin HJ, et al. $A\beta$ -induced formation of autophagosomes is mediated by RAGE-CaMKK β -AMPK signaling[J]. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(5):1006.e11–1006.e23.
- [14] Lee JH, Yang DS, Goulbourne CN, et al. Faulty autolysosome acidification in Alzheimer's disease mouse models induces autophagic build-up of $A\beta$ in neurons, yielding senile plaques[J]. *Nat Neurosci*, 2022, 25(6):688–701.
- [15] Caccamo A, De Pinto V, Messina A, et al. Genetic reduction of mammalian target of rapamycin ameliorates Alzheimer's disease-like cognitive and pathological deficits by restoring hippocampal gene expression signature[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(23):7988–7998.
- [16] Pandit S, Shitiz K, Sood H, et al. Expression pattern of fifteen genes of non-mevalonate (MEP) and mevalonate (MVA) pathways in different tissues of endangered medicinal herb *Picrorhiza kurroa* with respect to picrosides content[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(2):1053–1063.
- [17] Stuppner H, Wagner H. New cucurbitacin glycosides from *Picrorhiza kurroa*[J]. *Planta Med*, 1989, 55(6):559–563.
- [18] Kuusisto E, Salminen A, Alafuzoff I. Early accumulation of p62 in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: possible role in tangle formation[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2002, 28(3):228–237.
- [19] Wang TT, Zhai L, Guo YL, et al. Picroside II has a neuroprotective effect by inhibiting ERK1/2 activation after cerebral ischemic injury in rats[J]. *Clin Exp Pharma Physio*, 2015, 42(9):930–939.
- [20] Guo YL, Xu XY, Li Q, et al. Anti-inflammation effects of picroside 2 in cerebral ischemic injury rats[J]. *Behav Brain Funct*, 2010, 6:43.
- [21] Li T, Liu JW, Zhang XD, et al. The neuroprotective effect of picroside II from hu-Huang-Lian against oxidative stress[J]. *Am J Chin Med*, 2007, 35(4):681–691.
- [22] Lorenzo A, Yankner BA. Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(25):12243–12247.
- [23] Boland B, Yu WH, Corti O, et al. Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of ageing[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(9):660–688.
- [24] Schmidt MF, Gan ZY, Komander D, et al. Ubiquitin signalling in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic opportunities[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(2):570–590.
- [25] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research[J]. *Cell*, 2010, 140(3):313–326.
- [26] Rubinsztein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, et al. In search of an “autophagometer”[J]. *Autophagy*, 2009, 5(5):585–589.
- [27] Klionsky D, Abeliovich H, Agostinis P, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes[J]. *Autophagy*, 2008, 4:151–175.
- [28] Du YH, Du YX, Zhang Y, et al. MKP-1 reduces $A\beta$ generation and alleviates cognitive impairments in Alzheimer's disease models[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4:58.
- [29] Gong B, Chen F, Pan Y, et al. SCFFbx2-E3-ligase-mediated degradation of BACE1 attenuates Alzheimer's disease amyloidosis and improves synaptic function[J]. *Aging Cell*, 2010, 9(6):1018–1031.
- [30] Viswanathan J, Haapasalo A, Böttcher C, et al. Alzheimer's disease-associated ubiquitin-1 regulates presenilin-1 accumulation and aggresome formation[J]. *Traffic Cop Den*, 2011, 12(3):330–348.
- [31] Pohl C, Dikic I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy[J]. *Science*, 2019, 366(6467):818–822.
- [32] Wang Y, Lew D. Le, *Autophagy and Ubiquitin-Proteasome System* [J]. *Advances In Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1206:527–550.
- [33] Wang TT, Zhu L, Liu HL, et al. Picroside II protects SH-SY₅Y cells from autophagy and apoptosis following oxygen glucose deprivation/reoxygen injury by inhibiting JNK signal pathway[J]. *Anat Rec*, 2019, 302(12):2245–2254.
- [34] Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(6):349–364.
- [35] Kim KH, Lee MS. Autophagy—a key player in cellular and body metabolism[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(6):322–337.
- [36] Stempels FC, Janssens MH, Ter Beest M, et al. Novel and conventional inhibitors of canonical autophagy differently affect LC3-associated phagocytosis[J]. *FEBS Lett*, 2022, 596(4):491–509.
- [37] Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion[J]. *Autophagy*, 2018, 14(8):1435–1455.
- [38] Liu XC, Meng L, Li X, et al. Regulation of FN₁ degradation by the p62/SQSTM1-dependent autophagy-lysosome pathway in HNSCC[J]. *Int J Oral Sci*, 2020, 12:34.
- [39] Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Levine B, et al. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(7):487–511.
- [40] Ferreira PMP, Sousa RWR, Ferreira JRO, et al. Chloroquine and hydroxychloroquine in antitumor therapies based on autophagy-related mechanisms[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 168:105582.

(责任编辑:周一青)