

沙利度胺对阿尔茨海默病秀丽隐杆线虫模型的改善作用及机制[△]

方亚影^{1*}, 阎茹玉¹, 李玉贤¹, 吴宿慧^{2#}, 李寒冰², 李根林²(1.河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 2.河南中医药大学河南省仲景方药健康衰老产业工程研究中心, 郑州 450046)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)11-1324-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.11.08



摘要 目的 研究沙利度胺对阿尔茨海默病(AD)线虫模型的改善作用及机制。方法 以BR5270品系秀丽隐杆线虫(以下简称“线虫”)为AD模型动物, BR5271品系线虫为对照。利用基础慢反应实验研究沙利度胺(0.5、2.0、6.0、15.0 mg/mL)对BR5270品系线虫运动能力的影响; 利用寿命实验研究沙利度胺(0.5、2.0、6.0、15.0 mg/mL)对BR5270品系线虫寿命的影响; 利用短期、长期学习记忆实验研究沙利度胺(0.5、2.0、6.0 mg/mL)对BR5270品系线虫学习记忆能力的影响; 采用实时荧光定量聚合酶链式反应技术研究沙利度胺(0.5、2.0、6.0 mg/mL)对BR5270品系线虫体内磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路相关基因(*Age-1*、*Akt-1*、*Gsk-3*)和钙蛋白酶同源基因(*Clp-1*)的mRNA表达的影响。结果 经沙利度胺干预后, BR5270品系线虫30 s内的摆动次数显著增加(0.5 mg/mL组除外), 10%最大寿命显著延长(仅0.5 mg/mL组), 短期、长期学习指数均显著升高(仅6.0 mg/mL组), 体内*Age-1*、*Akt-1*基因(0.5、2.0 mg/mL组除外) mRNA表达水平均显著升高, *Gsk-3*(0.5 mg/mL组除外)、*Clp-1*基因mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 沙利度胺可改善AD线虫模型的运动障碍, 并延长其寿命, 增强其学习记忆能力; 具体作用机制可能与激活PI3K/Akt信号通路和抑制钙蛋白酶有关。

关键词 沙利度胺; 秀丽隐杆线虫; 阿尔茨海默病; 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B信号通路

Improvement effects and mechanism of thalidomide on Alzheimer's disease model of *Caenorhabditis elegans*

FANG Yaying¹, YAN Ruyu¹, LI Yuxian¹, WU Suhui², LI Hanbing², LI Genlin²(1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. Henan Engineering Research Center of Zhang Zhongjing's Formula Medicine Health and Aging Industry, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the improvement effects and mechanism of thalidomide on Alzheimer's disease (AD) model of *Caenorhabditis elegans*. **METHODS** In this study, the BR5270 strain of *C. elegans* was used as AD model and BR5271 strain as the control. The effects of thalidomide (0.5, 2.0, 6.0, 15.0 mg/mL) on the motility of BR5270 strains of *C. elegans* were studied by the basal slowing response assay; the effects of thalidomide (0.5, 2.0, 6.0, 15.0 mg/mL) on the survival time of BR5270 strain of *C. elegans* were studied by life assay; the effects of thalidomide (0.5, 2.0, 6.0 mg/mL) on learning and memory ability of BR5270 strain of *C. elegans* were studied by short-term and long-term learning and memory assay. RT-PCR technology was used to study the effects of thalidomide (0.5, 2.0, 6.0 mg/mL) on mRNA expression of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signal pathway related genes (*Age-1*, *Akt-1*, *Gsk-3*) and calpain homologous gene (*Clp-1*) in BR5270 strain of *C. elegans*. **RESULTS** After the intervention of thalidomide, oscillation times of BR5270 strain of *C. elegans* increased significantly within 30 s (except for 0.5 mg/mL group), and the 10% of maximum life span was prolonged significantly (only 0.5 mg/mL group); the short-term and long-term learning indexes were improved significantly (only 6.0 mg/mL group); mRNA expression of *Age-1* and *Akt-1* (except for 0.5, 2.0 mg/mL groups) were increased significantly, mRNA expression of *Gsk-3* (except for 0.5 mg/mL group) and *Clp-1* were decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSIONS** Thalidomide can ameliorate the dyskinesia of AD model of *C. elegans*, prolong the lifespan of this strain, and enhance its learning and memory ability. Its mechanism of action may be related to activation of PI3K/Akt signaling pathway and inhibition of calpain.

[△] 基金项目:河南省科技发展计划项目(No.212102310347)
* 硕士研究生。研究方向:药物活性。E-mail: 710279109@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:中药药理学。
电话:0317-65962746。E-mail: iwusuhui@163.com

KEYWORDS thalidomide; *Caenorhabditis elegans*; Alzheimer's disease; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signal pathway

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的渐行性中枢神经系统退行性疾病,患者大脑中普遍呈现脑组织萎缩、老年斑、神经元纤维缠结等病理特征^[1]。全球AD患者正逐年递增,目前临床上也缺乏能有效治疗AD的药物^[2]。

沙利度胺是一种新型的免疫调节药和抗炎药,可抑制单核细胞和巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),从而减少淀粉样蛋白的形成;其还能抑制白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)和IL-6等炎症因子的产生^[3]。相关研究发现,上述炎症因子可参与Tau蛋白的过度磷酸化,加快Tau蛋白病理形成的过程^[4-5]。

Tau蛋白的病理变化与AD患者认知能力下降有较强烈的相关性。Tau蛋白的正常生理功能是与微管蛋白结合,以维持细胞骨架的稳定性^[6]。糖原合成激酶 3β (glycogen synthase kinase 3β , GSK- 3β)是磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)和蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)的下游底物,其活化后可导致Tau蛋白过度磷酸化,从而使Tau蛋白大量沉积并形成缠结,进而破坏神经元的生理功能^[7-8]。相关研究发现,激活PI3K/Akt途径可改善神经元细胞凋亡^[9]。

秀丽隐杆线虫(以下简称“线虫”)因其生命周期短、神经系统结构简单、遗传信息清晰和易于获得大量个体模型等优点,常被用于神经退行性疾病的相关研究^[10]。BR5270品系线虫体内可表达人源Tau蛋白,具有加速Tau蛋白聚集的特点,使其从成年第1天起就出现明显的神经元功能障碍;BR5271品系线虫体内表现出抗Tau蛋白聚集的特点,常作为BR5270品系线虫的对照^[11]。另外,相关研究发现,线虫体内PI3K和Akt的同源基因是Age-1和Akt-1^[12-13]。基于此,本研究以BR5270品系线虫为AD模型,研究沙利度胺改善线虫体内Tau蛋白毒性及提高线虫学习记忆能力的作用及机制,以期沙利度胺治疗AD提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有HVE-50型高压蒸汽灭菌锅(日本Hirayama公司),DL-CJ-2ND I型洁净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司),LY03-200型生化培养箱(上海龙跃仪器设备有限公司),Nano Drop One C 2000型微量紫外分光光度计、Fresco 21型低温离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司),Quant Studio 7 Flex型逆转录聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Applied Biosystems公司),Gel Doc XR⁺型自动凝胶成像系统(美国Bio Rad公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用主要药品与试剂有沙利度胺片(常州制药厂有限公司,批号19031332,规格50 mg/片),二甲基

亚砷(DMSO,天津市风船化学试剂科技有限公司,批号20210415),蛋白胨、琼脂粉(北京奥博星生物技术有限公司,批号分别为20190126、20191030),酵母浸粉(美国Oxoid公司,批号分别为1267856-03),Trizol试剂(美国Ambion Life公司,批号204202),TB Green[™] Premix Ex Taq[™] II、PrimeScript[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser(日本Takara公司,批号分别为RR820A、RR047A)。Gsk-3、Age-1、Akt-1、Clp-1基因(钙蛋白酶的同源基因)的引物由深圳华大基因科技有限公司设计并合成(PCR引物序列及扩增产物长度见表1)。其余试剂为实验室常用规格,水为纯净水。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
actin-1	上游引物:ACGACGAGTCCGGCCATCC	103
	下游引物:GAAAGCTGGTGGTACGATGGTT	
Gsk-3	上游引物:TGCACGCTTCCATCTGGTA	91
	下游引物:CACATCACCCTGTTCGTTG	
Age-1	上游引物:ATGTTTCTTCAATTGGCTGG	81
	下游引物:GAACGGACACCATCATAAGAC	
Akt-1	上游引物:TTCGAGCAAAGCCTAAGGA	81
	下游引物:ATAACATTGTCCGCTGCATCC	
Clp-1	上游引物:TTAGAGATAAGGTCGGTGGC	119
	下游引物:ATTTCCACCACCCGAAACCT	

1.3 动物

线虫(品系包括BR5270、BR5271)均购自美国线虫中心(<https://cgc.umn.edu>),大肠埃希菌*Escherichia coli* OP50尿嘧啶合成缺陷菌株由北京生命科学研究所以董梦秋教授课题组惠赠。

2 方法与结果

2.1 线虫的培养及同期化处理

2.1.1 NGM培养基的制备 称取氯化钠0.60 g、蛋白胨0.50 g、琼脂粉3.40 g,加入5 mg/mL胆固醇溶液200 μ L和纯水200 mL,经高压蒸汽灭菌(121 $^{\circ}$ C, 15 min)后,依次加入浓度均为1 mol/L的MgSO₄溶液和CaCl₂溶液各200 μ L、1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH=6.0) 5 mL,摇匀后倒板,加入100 μ L大肠埃希菌溶液(由于线虫以大肠埃希菌为食,故后续将其称为“食物”)涂布均匀,于37 $^{\circ}$ C培养箱中培养8~12 h,备用。

2.1.2 线虫的同期化处理 将2种线虫(BR5270、BR5271品系)置于含有食物的NGM培养基上培养(16 $^{\circ}$ C条件下)。挑取处于产卵期的线虫于含有食物的NGM培养基上,培养4 h后,移除线虫,保留虫卵;继续孵育虫卵至产卵期,即得同期化的亲代线虫,再将亲代线虫继续培养至产卵期,保留虫卵,即得同时期的虫卵^[14]。

2.2 沙利度胺对BR5270品系线虫的毒性预实验

取BR5270品系线虫,按“2.1.2”项下方法进行同期化处理,分为溶剂对照组(1% DMSO)和沙利度胺不同质量浓度组(10、25、50、100 mg/mL),每组20条,并设

3个平行。将线虫置于含不同药物的NGM培养基(含食物)上,于16℃条件下恒温培养24h后,记录各组线虫的死亡数量。结果显示,溶剂对照组和沙利度胺10mg/mL组线虫无死亡;当沙利度胺给药质量浓度增加至25mg/mL时开始有线虫死亡,死亡数为(1.67±0.58)条;沙利度胺给药质量浓度为50、100mg/mL时,线虫死亡数分别为(5.00±1.00)、(17.34±2.52)条。这提示沙利度胺对线虫的毒性随着质量浓度的增加而增强。因此,为了避免线虫毒理学特征的出现,本研究将沙利度胺最大给药质量浓度定为15mg/mL。

2.3 BR5270品系线虫的基础慢反应实验

BR5270品系线虫由于Tau蛋白的聚集,表现为从成年第1天开始就运动不协调、运动神经元轴突缺损^[11],因此,通过测定线虫的摆动次数,可探究沙利度胺对BR5270品系线虫运动能力的影响。按“2.1.2”项下方法将BR5271、BR5270品系线虫进行同期化处理,然后于16℃条件下培养24h后,将BR5271品系线虫作为对照组,BR5270品系线虫分为空白组(不加药物)和沙利度胺不同质量浓度组(0.5、2.0、6.0、15.0mg/mL),每组30条,并设3个平行。将线虫置于含不同药物的NGM培养基(含食物)上,于16℃条件下培养至成年(培养5d)后,测定各组线虫30s内的摆动次数^[15]。采用GraphPad Prism 8.0.2统计软件作图,以SPSS 24.0统计软件分析实验数据,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验(方差齐时)或Dunnett's *T3*多重比较(方差不齐),检验水平 $\alpha=0.05$ (下同)。结果显示,与空白组比较,对照组与沙利度胺2.0、6.0、15.0mg/mL组线虫在30s内的摆动次数均显著增加($P<0.01$)。结果见表2。

表2 沙利度胺对BR5270品系线虫摆动次数的影响($\bar{x} \pm s, n=30$)

组别	摆动次数/次	组别	摆动次数/次
对照组	18.85±1.42 ^a	沙利度胺2.0mg/mL组	14.25±0.64 ^a
空白组	10.70±1.30	沙利度胺6.0mg/mL组	14.75±1.12 ^a
沙利度胺0.5mg/mL组	12.00±1.30	沙利度胺15.0mg/mL组	15.65±1.23 ^a

a:与空白组比较, $P<0.01$

2.4 BR5270品系线虫的寿命实验

BR5270品系线虫由于Tau蛋白聚集,其生存时间比BR5271品系线虫短^[11],10%最大寿命可反映药物对线虫生存时间的影响^[16],因此,通过分析线虫的10%最大寿命和生存率曲线,可探讨沙利度胺是否能延长BR5270品系线虫的寿命。按“2.3”项下方法将BR5271、BR5270品系线虫进行同期化处理及分组、给药,并设3个平行,于16℃条件下进行培养。每隔24h观察线虫的生存状态,并记录线虫的死亡数量,直至各组线虫全部死亡,计算各组线虫10%最大寿命^[15]。线虫死亡的判断标准:将线虫拾取器用酒精灯烧热后,轻触线虫并观察线虫是否

有反应,如果没有反应则判断为死亡^[16]。结果显示,与空白组比较,对照组和沙利度胺0.5mg/mL组线虫的10%最大寿命显著延长($P<0.01$),且两者的生存率曲线也整体高于空白组;沙利度胺其余各组的10%最大寿命差异无统计学意义。后续实验的给药周期比寿命实验短,故将沙利度胺给药质量浓度设置为0.5、2.0、6.0mg/mL。结果见表3、图1。

表3 沙利度胺对BR5270品系线虫寿命的影响($\bar{x} \pm s, n=30$)

组别	10%最大寿命/d	组别	10%最大寿命/d
对照组	24.11±0.782 ^a	沙利度胺2.0mg/mL组	20.33±1.323
空白组	19.67±1.000	沙利度胺6.0mg/mL组	20.44±1.509
沙利度胺0.5mg/mL组	23.22±1.093 ^a	沙利度胺15.0mg/mL组	19.89±0.928

a:与空白组比较, $P<0.01$

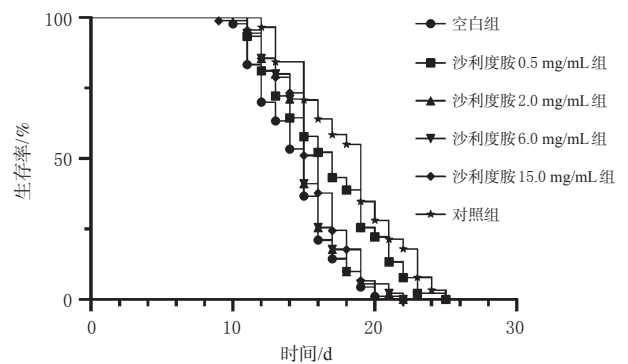


图1 各组线虫的生存率曲线

2.5 BR5270品系线虫的短期学习记忆能力实验

BR5270品系线虫的学习指数与短期学习记忆能力呈正相关,因此,通过测定各组BR5270品系线虫的学习指数,可探究沙利度胺是否能改善BR5270品系线虫的短期学习记忆能力^[17]。按“2.1.2”项下方法将BR5270品系线虫进行同期化处理,然后将虫卵于16℃培养4d后,分为空白组、溶剂对照组(1%DMSO)、沙利度胺不同质量浓度组(0.5、2.0、6.0mg/mL),每组800条,继续培养48h后,各组取200条线虫置于不含食物的NGM培养基上进行趋化性测试(趋化性测定板制备如图2所示),记录每组线虫训练前的趋化指数(CI_{Naive})^[17]。将各组剩余线虫进行短期学习记忆丁酮训练(如图3所示),再转移至含有食物的NGM固体培养基上进行培养,分别于培养0、0.5、1.5h时,每组各取200条线虫进行趋化性测试,并记录各时间点的趋化指数(CI_{0h} 、 $CI_{0.5h}$ 、 $CI_{1.5h}$),再计算各时间点的学习指数[学习指数= $CI_{0h} - CI_{Naive}$ (或 $CI_{0.5h} - CI_{Naive}$,或 $CI_{1.5h} - CI_{Naive}$)],实验重复3次^[18]。结果显示,与空白组比较,沙利度胺6.0mg/mL组线虫的短期学习指数在培养0、0.5、1.5h时均显著升高($P<0.01$);其余给药组该指数差异无统计学意义,详见表4、图4。

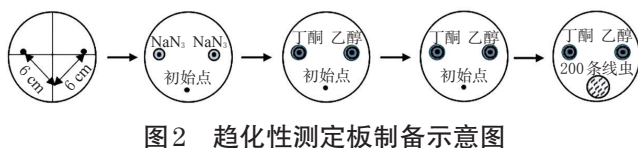


图2 趋化性测定板制备示意图

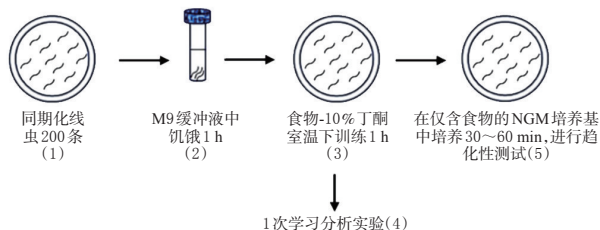
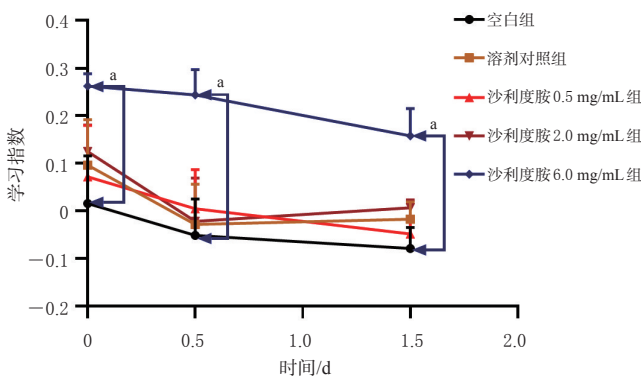


图3 短期学习记忆丁酮训练示意图

表4 各组线虫短期记忆趋化指数的检测结果($\bar{x} \pm s$, $n=200$)

组别	训练前	训练后		
		0 h	0.5 h	1.5 h
空白组	0.130 ± 0.077	0.150 ± 0.122	0.080 ± 0.094	0.050 ± 0.054
溶剂对照组	0.020 ± 0.102	0.110 ± 0.117	-0.010 ± 0.103	0.000 ± 0.045
沙利度胺0.5 mg/mL组	0.150 ± 0.053	0.220 ± 0.132	0.150 ± 0.100	0.100 ± 0.040
沙利度胺2.0 mg/mL组	0.080 ± 0.052	0.200 ± 0.068	0.060 ± 0.111	0.080 ± 0.020
沙利度胺6.0 mg/mL组	-0.090 ± 0.084	0.170 ± 0.032	0.150 ± 0.065	0.060 ± 0.070



a: 与空白组比较, $P < 0.01$

图4 沙利度胺对BR5270品系线虫短期学习指数的影响

2.6 BR5270品系线虫长期学习记忆能力实验

将BR5270品系线虫按“2.5”项下方法进行同期化处理 and 分组(每组1 000条),培养48 h后,各组取200条线虫置于不含食物的NGM培养基上进行趋化性测试(每组平行3个平板),记录每组线虫训练前的趋化指数(CI_{Naive})。将各组剩余线虫进行长期学习记忆能力丁酮训练(如图5所示)^[17]。最后一次训练完成后,将线虫转移至含食物的NGM培养基上进行培养,分别于培养0、16、24、40 h时,每组取200条线虫进行趋化性测试,并记录各时间点的趋化指数(CI_{0h} 、 CI_{16h} 、 CI_{24h} 、 CI_{40h}),再按“2.5”项下公式计算各时间点的学习指数。结果显示,与空白组比较,沙利度胺6.0 mg/mL组线虫的长期学习指数在培养0、16 h时均显著升高($P < 0.01$);其余给药组该指数差异无统计学意义,详见表5、图6。

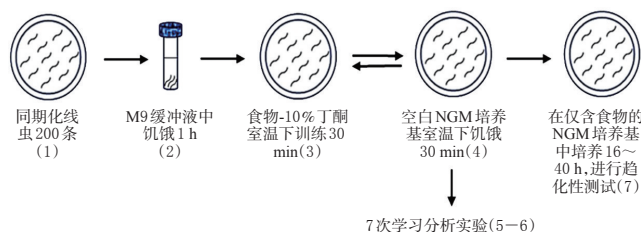
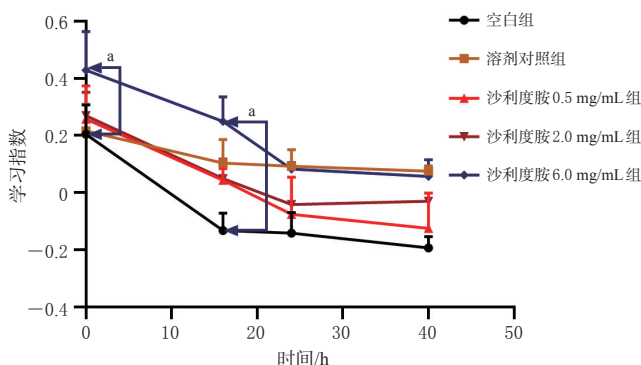


图5 长期学习记忆丁酮训练示意图

表5 各组线虫长期记忆趋化指数的检测结果($\bar{x} \pm s$, $n=200$)

组别	训练前	训练后			
		0 h	16 h	24 h	40 h
空白组	0.130 ± 0.110	0.340 ± 0.125	0.000 ± 0.075	-0.010 ± 0.088	-0.060 ± 0.047
溶剂对照组	-0.080 ± 0.129	0.140 ± 0.114	0.030 ± 0.101	0.020 ± 0.070	0.000 ± 0.022
沙利度胺0.5 mg/mL组	0.090 ± 0.868	0.350 ± 0.143	0.140 ± 0.050	0.020 ± 0.160	-0.030 ± 0.151
沙利度胺2.0 mg/mL组	0.030 ± 0.003	0.300 ± 0.100	0.080 ± 0.084	-0.010 ± 0.013	0.000 ± 0.004
沙利度胺6.0 mg/mL组	-0.030 ± 0.098	0.400 ± 0.166	0.220 ± 0.105	0.050 ± 0.027	0.030 ± 0.072



a: 与空白组比较, $P < 0.01$

图6 沙利度胺对BR5270品系线虫长期学习指数的影响

2.7 BR5270品系线虫体内Gsk-3、Age-1、Akt-1、Clp-1基因mRNA的表达水平检测

将BR5270品系线虫按“2.5”项下方法进行同期化处理 and 分组,继续培养48 h后,采用低温Trizol法提取各组线虫的总RNA,再按相应试剂盒说明书方法进行反转录得到cDNA。以cDNA为模板,进行实时荧光定量PCR反应。反应体系为:cDNA模板1 μ L, TB Green™ Premix Ex Taq™ II 10 μ L, ROX Reference Dye II 0.4 μ L, 上、下游引物各0.8 μ L, RNase free water 7 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性15 s,52 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共40个循环。以actin-1基因为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算Gsk-3、Age-1、Akt-1、Clp-1基因mRNA的表达水平。实验重复3次。结果显示,与空白组比较,沙利度胺各质量浓度组线虫体内Age-1、Akt-1基因(沙利度胺0.5、2.0 mg/mL组除外)的mRNA表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),Gsk-3(沙利度胺0.5 mg/mL组除外)、Clp-1基因的mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表6。

表6 各组线虫体内 *Age-1*、*Akt-1*、*Gsk-1*、*Clp-1* 基因 mRNA 表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	<i>Age-1</i>	<i>Akt-1</i>	<i>Gsk-3</i>	<i>Clp-1</i>
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
溶剂对照组	1.05±0.02 ^a	0.98±0.03	0.96±0.06	1.00±0.06
沙利度胺0.5 mg/mL组	1.07±0.01 ^a	1.03±0.05	0.83±0.07	0.89±0.05 ^a
沙利度胺2.0 mg/mL组	1.13±0.01 ^a	1.16±0.02	0.73±0.02 ^b	0.75±0.01 ^a
沙利度胺6.0 mg/mL组	1.25±0.01 ^a	1.29±0.03 ^b	0.67±0.01 ^b	0.64±0.04 ^a

a: 与空白组比较, $P < 0.05$; b: 与空白组比较, $P < 0.01$

3 讨论

本研究使用的BR5270品系线虫属于 *Tau* 转基因线虫模型, 人源 *Tau* 蛋白聚集片段由于 *K280* 基因的缺失增强了 *Tau* 蛋白的聚集倾向, 使该品系线虫的毒性急剧增加, 表现为从成年第1天开始就运动不协调、轴突缺损、运动能力严重受损等^[11]。BR5271品系线虫由于具有抗 *Tau* 蛋白聚集的特点, 常作为BR5270品系线虫的对照组^[11]。本研究的基础慢反应实验结果显示, 沙利度胺可以明显增加BR5270品系线虫的摆动次数, 这提示其可以改善线虫因 *Tau* 蛋白聚集而导致的运动能力受损。寿命实验结果显示, 低剂量(0.5 mg/mL)的沙利度胺可显著延长BR5270品系线虫的10%最大寿命, 这提示沙利度胺能较好地缓解该品系线虫因 *Tau* 蛋白聚集而导致的毒性作用。

丁酮是一种带有气味的挥发性物质, 在缺乏食物时, 给予线虫食物并将其暴露于丁酮气味中, 线虫会根据丁酮气味寻找食物, 因此可将其用来研究线虫的学习记忆能力^[18]。一般情况下, 对线虫进行长期记忆训练的持续时间应大于16 h, 短期记忆训练的持续时间则应小于2 h^[19-20]。本研究结果显示, 经沙利度胺(6.0 mg/mL)干预后, BR5270品系线虫短期学习指数和长期学习指数(培养0、16 h时)均显著升高, 长期学习指数(24、40 h)与空白组相比有升高, 但无显著性差异, 这可能与长期学习记忆能力从培养16 h后开始下降有关, 与Amano等^[20]的研究结论一致。这提示沙利度胺可改善BR5270品系线虫短期和长期的学习记忆能力。

过度磷酸化的 *Tau* 蛋白与微管脱离后, 可积累形成神经元纤维缠结, 从而造成突触结构的可塑性损伤以及神经元的变性和凋亡, 进而引发AD^[21]。GSK-3 β 是诱导 *Tau* 蛋白磷酸化的主要蛋白激酶, 其在线虫体内的同源基因为 *Gsk-3*^[22]。在PI3K/Akt信号通路中, PI3K(线虫体内的同源基因为 *Age-1*)被激活后可活化Akt(线虫体内的同源基因为 *Akt-1*)的功能, 活化后的Akt又可抑制GSK-3 β 的活性, 进而减少 *Tau* 蛋白的异常磷酸化^[23]。本研究结果显示, 沙利度胺可显著升高BR5270品系线虫体内 *Age-1*、*Akt-1* 基因(0.5、2.0 mg/mL的沙利度胺除外) mRNA 表达水平, 显著降低 *Gsk-3* 基因 mRNA 表达水平(0.5 mg/mL的沙利度胺除外), 这提示沙利度胺可能是通过活化PI3K/Akt信号通路来减少 *Tau* 蛋白的异

常磷酸化。另外有研究发现, *Tau* 蛋白与突触后致密蛋白95(postsynaptic density-95, PSD-95)相互作用后, 可使Ca²⁺通过 *N*-甲基-D-天冬氨酸(*N*-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)受体大量流入细胞, 从而激活钙蛋白酶并引发线粒体功能障碍, 最终诱导神经细胞凋亡^[24]。在线虫体内钙蛋白酶的同源基因是 *Clp-1*^[25]。本研究结果显示, 沙利度胺可显著降低BR5270品系线虫体内 *Clp-1* 基因 mRNA 表达水平, 这提示沙利度胺可能是通过抑制钙蛋白酶来减轻 *Tau* 蛋白诱导的神经细胞凋亡。

综上所述, 沙利度胺可改善AD线虫模型的运动障碍, 并延长其寿命, 增强其学习记忆能力; 具体作用机制可能与激活PI3K/Akt信号通路和抑制蛋白酶有关。本研究结果也初步证实沙利度胺抗AD的作用, 可为沙利度胺治疗AD提供实验依据。

参考文献

- [1] 牛芬溪, 谢硕, 刘悦, 等. 能量合成障碍在阿尔茨海默病发病中的作用[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(8): 1042-1046.
- [2] 李楠, 许均瑜. 蛋白质组学对于阿尔茨海默病诊断标记物筛选的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(5): 1108-1114.
- [3] 林美珍, 祝美术, 张丽丽, 等. 沙利度胺的药理机制及临床新应用[J]. 海峡药学, 2017, 29(10): 81-83.
- [4] 原野, 余姊阳, 邵思迈, 等. 星形胶质细胞对阿尔茨海默病的双向作用[J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(6): 133-138.
- [5] BOLÓS M, PEREA J R, AVILA J. Alzheimer's disease as an inflammatory disease[J]. Biomol Concepts, 2017, 8(1): 37-43.
- [6] 张海波, 林爱花, 宫平, 等. 神经炎症对阿尔茨海默病中 *Tau* 蛋白的影响[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(19): 2245-2252.
- [7] REGAN P, WHITCOMB D J, CHO K. Physiological and pathophysiological implications of synaptic tau[J]. Neuroscientist, 2017, 23(2): 137-151.
- [8] RAI S N, DILNASHIN H, BIRLA H, et al. The role of PI3K/Akt and ERK in neurodegenerative disorders[J]. Neurotox Res, 2019, 35(3): 775-795.
- [9] XU X T, ZHANG A W, ZHU Y T, et al. MFG-E8 reverses microglial-induced neurotoxic astrocyte (A1) via NF- κ B and PI3K-Akt pathways[J]. J Cell Physiol, 2018, 234(1): 904-914.
- [10] 唐晓丽, 杨依, 刘悦, 等. 秀丽隐杆线虫模型在阿尔茨海默病研究中的应用[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(3): 317-321.
- [11] FATOUROS C, PIR G J, BIERNAT J, et al. Inhibition of tau aggregation in a novel *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy mitigates proteotoxicity[J]. Hum Mol Genet, 2012, 21(16): 3587-3603.

- [12] 刘赫男.富氢水的制备及丁酸梭菌延长秀丽线虫寿命的机制研究[D].合肥:安徽医科大学,2020.
- [13] WANG S C, TENG X X, WANG Y, et al. Molecular control of arsenite-induced apoptosis in *Caenorhabditis elegans*: roles of insulin-like growth factor-1 signaling pathway[J]. Chemosphere, 2014, 112:248-255.
- [14] DOSTAL V, LINK C D. Assaying β -amyloid toxicity using a transgenic *C. elegans* model[J]. J Vis Exp, 2010 (44):2252.
- [15] WANG C, SAAR V, LEUNG K L, et al. Human amyloid β peptide and tau coexpression impairs behavior and causes specific gene expression changes in *Caenorhabditis elegans*[J]. Neurobiol Dis, 2018, 109(Pt A):88-101.
- [16] 阎茹玉,吴宿慧,方亚影,等.原人参二醇延缓衰老及抗氧化应激作用的机制研究[J].中药药理与临床,2022,38(1):56-62.
- [17] KAUFFMAN A, PARSONS L, STEIN G, et al. *C. elegans* positive butanone learning, short-term, and long-term associative memory assays[J]. J Vis Exp, 2011(49):2490.
- [18] 王凤娟,方亚影,吴宿慧,等.东莨菪碱诱导秀丽线虫痴呆模型的特点探析[J].中药药理与临床,2021,37(1):207-211.
- [19] STEIN G M, MURPHY C T. *C. elegans* positive olfactory associative memory is a molecularly conserved behavioral paradigm[J]. Neurobiol Learn Mem, 2014, 115:86-94.
- [20] AMANO H, MARUYAMA I N. Aversive olfactory learning and associative long-term memory in *Caenorhabditis elegans*[J]. Learn Mem, 2011, 18(10):654-665.
- [21] NAM S C. Role of tau, a microtubule associated protein, in *Drosophila* photoreceptor morphogenesis[J]. Genesis, 2016, 54(11):553-561.
- [22] AN J H, VRANAS K, LUCKE M, et al. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(45):16275-16280.
- [23] KIM D Y, JUNG S Y, KIM T W, et al. Treadmill exercise decreases incidence of Alzheimer's disease by suppressing glycogen synthase kinase-3 β expression in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. J Exerc Rehabil, 2015, 11(2):87-94.
- [24] BANO D, ANKARCRONA M. Beyond the critical point: an overview of excitotoxicity, calcium overload and the downstream consequences[J]. Neurosci Lett, 2018, 663:79-85.
- [25] 叶培武.线虫多巴胺神经元间的内在差异介导人源 TRPM2 引起 ADE 选择性丢失[D].杭州:浙江大学,2020.
- (收稿日期:2021-12-24 修回日期:2022-03-23)
(编辑:唐晓莲)

(上接第1323页)

- [8] HE C M, CHENG Z H, CHEN D F. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in *Sophora tonkinensis* by LC/MS and HPLC[J]. Chin J Nat Med, 2013, 11(6):690-698.
- [9] 韩馥蔓,王莉鑫,陈影,等. HPLC同时测定山豆根中7种生物碱及3种黄酮的含量[J].中国中药杂志,2016,41(24):4628-4634.
- [10] 黄峥蕊.基于有效性和安全性的中药山豆根质量控制方法研究[D].西安:西安理工大学,2021.
- [11] 缪剑华,姚彩云,宋志军,等.山豆根羽扇豆烷醇的用途:CN108836968A[P]. 2018-11-20.
- [12] 缪剑华,周小雷,闫炳雄,等.用于治疗肿瘤的化合物组合及用途:CN108853119A[P]. 2018-11-23.
- [13] 杨强,邱时,战晓宁,等.基于“关键成分-效应靶点-核心通路”关联网络分析的三妙丸治疗类风湿性关节炎分子机制研究[J].中国现代中药,2020,22(10):1661-1667.
- [14] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. J Comput Chem, 2010, 31(2):455-461.
- [15] 王双双,高毅,李敏,等.不同剂量黄芩提取物对牙周膜干细胞增殖、凋亡、周期的影响研究[J].中药药理与临床,2021,37(5):64-68.
- [16] CHEN Y P, CHAN A T C, LE Q T, et al. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Lancet, 2019, 394(10192):64-80.
- [17] 邹俐,赵焕君,李娜,等.山豆根的本草考证及毒性分析[J].现代中医药,2021,41(5):19-23.
- [18] 陈磊,刘怡,张宏桂,等.三叶豆紫檀苷在大鼠体内代谢的初步研究[J].中药新药与临床药理,2012,23(2):174-177.
- (收稿日期:2021-12-09 修回日期:2022-03-21)
(编辑:唐晓莲)