

### 【基础研究】

通信作者:周峥宇(1998-),女,河南南阳人,硕士研究生在读,主要从事神经内科疾病的诊治工作;E-mail:zhouzhengyude@163.com

puerarin intervention group were treated with 0.1, 0.2 and 0.24 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin, respectively. The drosophila in the AD model group and normal control group were treated with ultrapure water containing 24 g · L<sup>-1</sup> yeast. On the 21<sup>st</sup> day of intervention, the climbing height of drosophila in each group was detected by tube climbing experiment. According to the climbing height of drosophila, the 0.20 mmol · L<sup>-1</sup> was determined as the optimal concentration of puerarin; the survival days of drosophila in the normal control group, AD model group and 0.20 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin intervention group were recorded; the expression level of Aβ in brain tissues of drosophila in the three groups was determined by enzyme-linked immunosorbent assay, and the area of Aβ plaque in brain tissue of drosophila in the three groups was determined by immunofluorescence. **Results** The climbing height of drosophila in the AD model group, 0.10 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin intervention group, 0.20 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin intervention group and 0.24 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin intervention group was significantly lower than that in the normal control group ( $P < 0.05$ ). The climbing height of drosophila in the 0.10 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin intervention group, 0.20 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin intervention group and 0.24 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin intervention group was significantly higher than that in the AD model group ( $P < 0.05$ ). The climbing height of drosophila in the 0.20 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin group was significantly higher than that in the 0.10 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin group and 0.24 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the climbing height of drosophila between the 0.10 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin group and 0.24 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin group ( $P > 0.05$ ). The median survival time of drosophila in the AD model group and 0.20 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin intervention group was significantly shorter than that in the normal control group, and the median survival time of drosophila in the 0.20 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin intervention group was significantly longer than that in the AD model group ( $P < 0.05$ ). The expression level of Aβ in brain tissue of drosophila in the AD model group and 0.20 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin intervention group was significantly higher than that in the normal control group, and the expression level of Aβ in brain tissue of drosophila in the 0.20 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin intervention group was significantly lower than that in the AD model group ( $P < 0.05$ ). The ratio of area of Aβ plaques in brain tissue of drosophila in the AD model group and 0.20 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin intervention group was significantly higher than that in normal control group, and the ratio of area of Aβ plaques in brain tissue of drosophila in the 0.20 mmol · L<sup>-1</sup> puerarin intervention group was significantly lower than that in the AD model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Puerarin can play a neuroprotective role for drosophila with AD by reducing Aβ level and inhibiting Aβ deposition in brain tissue, which can improve the crawling ability and prolong the life of AD drosophila.

**Key words:** Alzheimer's disease; Aβ transgenic drosophila; puerarin; amyloid β-protein

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是最常见的中枢神经系统退行性疾病, 其病理学特征是 β 淀粉样蛋白 (amyloid β-protein, Aβ) 异常沉积<sup>[1-2]</sup>, 细胞内磷酸化的微管 Tau 蛋白螺旋化聚集形成的神经原纤维缠结<sup>[3-4]</sup> 及神经元丢失<sup>[1,5]</sup>。AD 的主要临床表现是进行性记忆能力减退、语言障碍、行为障碍、认知功能障碍等。国际阿尔茨海默症协会 (Alzheimer's Disease International, ADI) 发布的《2019 全球阿尔茨海默症报告: 对痴呆的态度》中指出, 2019 年全世界有超过 5 000 万人患有 AD 或其他类型的痴呆, 这一数值预计 2050 年将达到 1.52 亿。关于 AD 的发病机制有多种假说, 包括 β 淀粉样蛋白级联假说<sup>[6]</sup>、胆碱能假说、Tau 蛋白假说、神经免疫炎症假说、氧化应激假说、基因突变假说等, 但其具体发病机制尚不清楚, 且尚无特效治疗药物。葛根素有生津止渴升阳的作用, 目前研究已证实, 葛根素具有逆转 Aβ 诱导的神经损伤等活性, 对 AD 模型大鼠的认知功能具有改善作用<sup>[7-8]</sup>, 但其作用机制仍不十分明确。因此, 本研究利用经典的 GAL4/UAS 系统构建 AD 果蝇模型, 探究葛根素对其神经保护作用及机制, 以期葛根素在临床 AD 治疗中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 选择北极型突变 Aβ42 (arctic mutation Aβ42, UAS-Aβ42arc)、p [ Gal4 ] A307、W1118 共 3 种品系的黑腹果蝇, 均由中国科学院上海高等研究院黄福德教授惠赠。将果蝇放入装有用 1 300 mL 蒸馏水、11.2 g 琼脂粉、30.00 g 酵母粉、77.70 g 玉米粉、63.20 g 葡萄糖、31.62 g 蔗糖配制成的培养基的锥形瓶中, 置于恒温培养箱中培养, 设置湿度 60%, 温度 25 ℃, 保种的果蝇每 20 d 更换 1 次培养基。

**1.2 试剂与仪器** 葛根素购自美国 Merck 公司, 免疫染色封闭液、免疫荧光染色一抗稀释液、免疫荧光染色二抗稀释液、Alexa Fluor 555 二抗购自上海碧云天生物技术有限公司, Triton-X100、1 × 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS)、抗荧光衰减封片、抗荧光衰减封片剂、体积分数 4% 组织细胞固定液购自北京索莱宝科技有限公司, 6E10 一抗购自美国 BioLegend 公司, 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国 Sigma 公司, 人 Aβ42 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, 碳酸氢钠、甲酸、氢

氧化钠购自西陇科学股份有限公司,蛋白酶抑制剂 cocktail 购自美国 Bimake 公司;纯水超系统购自美国 Millipore 公司,恒温培养箱、烘箱购自南宁精密仪器仪表公司,体式显微镜购自日本 Nikon 公司,电子秤购自方瑞公司,制冰机购自斯科茨曼制冰系统(上海)有限公司,CO<sub>2</sub> 麻醉板购自北京健乃喜生物技术有限公司,电磁炉购自美的集团有限公司,高速冷冻离心机购自美国贝克曼库尔特公司,共聚焦显微镜购自德国 Leica 公司,多功能酶标仪购自瑞士 Tecan 公司。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 果蝇杂交** 选择生长良好具有较多即将羽化蛹的培养瓶,清除瓶内成蝇,利用 CO<sub>2</sub> 麻醉,收集羽化 6 h 内的雌蝇为处女蝇,放入培养瓶观察 3 d,确保雌蝇未受精。构建 GAL4/UAS 系统的 Aβ<sub>42</sub>arc 转基因果蝇:将携带逃跑通路 p[Gal4]A307 表达的处女蝇(15~20 只)与 UAS-Aβ<sub>42</sub>arc 雄蝇(5~10 只)放于装有果蝇培养基的锥形瓶中杂交,于杂交第 7 天时清空培养瓶中的亲本,收集子一代果蝇标记为 Aβ<sub>arc</sub> 果蝇。将 p[Gal4]A307 处女蝇与 W1118 雄蝇杂交,收集子一代为正常对照组。

**1.3.2 实验动物分组和处理** 取 Aβ<sub>arc</sub> 果蝇随机分为 AD 模型组、0.10 mmol·L<sup>-1</sup> 葛根素干预组、0.20 mmol·L<sup>-1</sup> 葛根素干预组、0.24 mmol·L<sup>-1</sup> 葛根素干预组。0.10 mmol·L<sup>-1</sup> 葛根素干预组、0.20 mmol·L<sup>-1</sup> 葛根素干预组、0.24 mmol·L<sup>-1</sup> 葛根素干预组分别用终浓度为 0.10、0.20、0.24 mmol·L<sup>-1</sup> 葛根素按 24 g·L<sup>-1</sup> 的比例添加酵母,混均后用移液器均匀地打在果蝇的培养基表面,AD 模型组及正常对照组用含 24 g·L<sup>-1</sup> 酵母的超纯水均匀打在培养基表面,每日 1 次,培养基每 3 d 更换 1 次,至第 21 天进行爬管能力检测。

**1.3.3 果蝇爬管能力的检测** 取正常对照组、AD 模型组、0.10 mmol·L<sup>-1</sup> 葛根素干预组、0.20 mmol·L<sup>-1</sup> 葛根素干预组、0.24 mmol·L<sup>-1</sup> 葛根素干预组果蝇进行爬管能力检测。果蝇爬管实验检测时间点根据果蝇成长情况选用羽化后日龄 21 d 的雄蝇为目的果蝇。应用果蝇爬管能力检测仪(中国科学院上海高等研究院黄福德教授设计)进行实验,装置包括 1 个矩形的金属框架(长 32 cm,宽 5 cm,高 12 cm),框架内可放置 10 个果蝇爬行管(直径 2.4 cm,高 10.0 cm),下方有电机、计时器,通过杠杆原理,升高及下降上方的金属框架,1 次驱动可产生 4 次升降,将果蝇置于管底,间隔 1 min 后进行下一次驱动,利用果蝇负趋地性来测试爬行能力,之后使用果蝇爬管分析软件 RflyDetection 2.0 进行统计。每管果蝇测试 3 次,以上实验独立重复 3 次,统

计果蝇跌落至管底后 21 s 时所爬行高度。根据葛根素 0.10、0.20、0.24 mmol·L<sup>-1</sup> 浓度组果蝇爬管能力,确定 0.20 mmol·L<sup>-1</sup> 为葛根素最适浓度,进行果蝇寿命、脑组织中 Aβ 含量及斑块面积测定实验。

**1.3.4 果蝇寿命监测** 取正常对照组、AD 模型组、0.20 mmol·L<sup>-1</sup> 葛根素干预组果蝇各 80 只均平均分到 4 个培养瓶,每瓶 20 只,置于 25℃ 的恒温培养箱中培养,空气湿度控制在 60% 左右,3 d 更换 1 次培养基,同时记录果蝇死亡情况,直至果蝇全部死亡。瓶壁保持干燥,防止果蝇沾粘至死。

### 1.3.5 ELISA 法检测果蝇脑组织中 Aβ 蛋白表达

按照人 Aβ<sub>42</sub> ELISA 试剂盒产品说明书,对标准品进行连续稀释,将人 Aβ<sub>42</sub> 标准品重构为 1 ng·L<sup>-1</sup>。分别取正常对照组、AD 模型组、0.20 mmol·L<sup>-1</sup> 葛根素干预组各 25 只果蝇,将果蝇头放入 Ep 管中,添加 50 μL 含 1×蛋白酶抑制剂的 ELISA 标准样品稀释液,彻底均质化,室温孵育 4 h,将匀浆在 4℃ 下 16 000×g 离心 20 min,取上清液。检测时取 3 μL 上清液,用 PBS 稀释 20 倍,每孔滴加 50 μL,设置空白对照孔;每孔加入 50 μL 人 Aβ<sub>42</sub> 检测抗体溶液,空白对照孔除外,室温下振荡孵育 3 h;吸出溶液,用 1×PBS 洗涤 4 次,之后加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记抗兔 IgG,空白对照孔除外,室温下孵育 30 min,将溶液吸出,用 1×PBS 洗涤 4 次。加入 100 μL 色原体,室温下避光孵育 30 min,最后加入 100 μL 终止液,混合均匀,检测 450 nm 处的吸光度值,绘制标准曲线: $y=0.0029x+0.0454$ ,  $R^2=0.9901$ ,根据标准曲线计算果蝇脑组织中 Aβ 表达水平。

### 1.3.6 免疫荧光法检测果蝇脑组织中 Aβ 斑块面积

分别取正常对照组、AD 模型组、0.20 mmol·L<sup>-1</sup> 葛根素干预组 3 只果蝇,将果蝇放置在添加体积分数 4% 组织固定液的 Ep 管中 3 h,之后应用含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline containing Tween-20, PBST)洗 3 次,每次 15 min。体式显微镜下剥出果蝇脑组织, PBST 清洗 3 次,每次 15 min。免疫染色封闭液封闭 30 min,滴加一抗 6E10(滴度 1:100),4℃ 过夜孵育, PBST 洗 3 次,每次 15 min,滴加 Alexa Fluor555 二抗(滴度 1:500)孵育 2 h, PBST 洗 3 次,每次 15 min。用微量移液枪将脑组织吸出置于载玻片上,滴加抗荧光衰减封片剂,盖上盖玻片,指甲油封片,应用共聚焦显微镜观察并计算脑组织中 Aβ 斑块面积占比。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法 *t* 检验;应用 log-rank 检验进行生

存分析,应用 GraphPad Prism 7 软件绘制生存曲线;  
 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 5 组果蝇爬管能力比较** 正常对照组、AD 模型组、 $0.10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组、 $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组、 $0.24\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇爬管高度分别为  $(6.82 \pm 0.43)$ 、 $(1.86 \pm 0.27)$ 、 $(3.14 \pm 0.16)$ 、 $(4.20 \pm 0.21)$ 、 $(3.56 \pm 0.20)\text{ cm}$ 。5 组间果蝇爬管高度比较差异有统计学意义 ( $F = 139.620, P < 0.05$ );AD 模型组、 $0.10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组、 $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组、 $0.24\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇爬管高度显著低于正常对照组, $0.10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组、 $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组、 $0.24\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇爬管高度显著高于 AD 模型组, $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇爬管高度显著高于  $0.10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组和  $0.24\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); $0.10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组与  $0.24\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇爬管高度比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

**2.2 正常对照组、AD 模型组和  $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇寿命比较** 结果见图 1。正常对照组、AD 模型组、 $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇的中位生存期分别为 48.0、27.0、40.5 d,AD 模型组、 $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇的中位生存期显著短于正常对照组, $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇的中位生存期显著长于 AD 模型组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

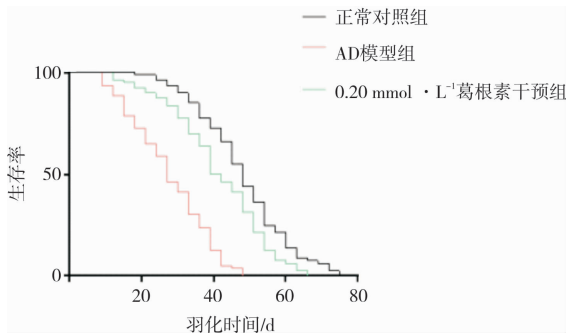
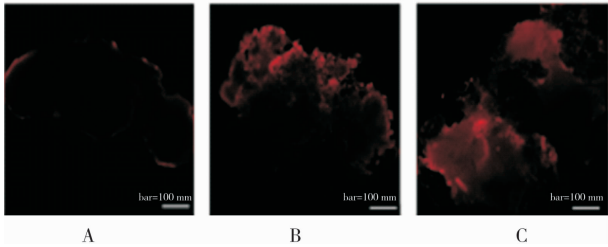


图 1 正常对照组、AD 模型组和  $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇寿命

Fig.1 Lifespan of drosophila in the normal control group, AD model group and  $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  puerarin intervention group

**2.3 正常对照组、AD 模型组和  $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇脑组织中  $\text{A}\beta$  表达水平比较** 正常对照组、AD 模型组、 $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇脑组织中  $\text{A}\beta$  表达水平分别为  $(0.00 \pm 0.00)$ 、 $(44.83 \pm 3.42)$ 、 $(29.73 \pm 2.44)\text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ,3 组果蝇脑组织中  $\text{A}\beta$  表达水平比较差异有统计学意义 ( $F = 265.540, P < 0.05$ );AD 模型组、 $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇脑组织中  $\text{A}\beta$  表达水平显著高于正常对照组, $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇脑组织中  $\text{A}\beta$  表达水平显著低于 AD 模型组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.4 正常对照组、AD 模型组和  $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇脑组织中  $\text{A}\beta$  斑块面积占比比较** 结果见图 2。正常对照组、AD 模型组、 $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇脑组织中  $\text{A}\beta$  斑块面积占比分别为  $(0.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(3.25 \pm 0.74)\%$ 、 $(1.04 \pm 0.22)\%$ 。3 组间果蝇脑组织中  $\text{A}\beta$  斑块面积占比比较差异有统计学意义 ( $F = 72.360, P < 0.05$ );AD 模型组、 $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇脑组织中  $\text{A}\beta$  斑块面积占比显著高于正常对照组, $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇脑组织中  $\text{A}\beta$  斑块面积占比显著低于 AD 模型组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



A: 正常对照组;B:AD 模型组;C: $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组。  
图 2 正常对照组、AD 模型组和  $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  葛根素干预组果蝇脑组织中  $\text{A}\beta$  斑块 (免疫荧光染色)  
Fig.2  $\text{A}\beta$  plaques in the brain tissue of drosophila in the normal control group,AD model group and  $0.20\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  puerarin intervention group (immunofluorescence staining)

3 讨论

AD 是最常见的神经退行性疾病之一,近年来其发病率呈升高趋势,但其发病机制尚不明确,尚无特效药,且我国人口基数大,老龄化加剧,因此,防治 AD 及新药研发显得尤为重要。中药的研发有其独特的优势,同时也存在着诸多不稳定性因素,因此,确定中药有效成分及剂量是 AD 创新性药物研发的

重中之重。

研究证实,葛根素可保护 AD 模型大鼠 A $\beta$  损伤的神经元细胞、抑制脑内神经元凋亡,改善认知功能和空间记忆功能<sup>[9-13]</sup>。但大多数研究均是针对大鼠、小鼠及细胞,关于葛根素对 AD 果蝇的神经保护作用的研究报道较少。黑腹果蝇为动物模型,具有繁殖周期短,基因简单,与人类基因同源,易于培养,经济实惠,便于分子标记和表型标记等优势。驱动子 A307 在逃跑通路表达,可使 A $\beta$  在果蝇的神经元胞体和轴突内沉积,使神经肌肉接头的突触能力下降,导致果蝇行为学表型恶化和脑内 A $\beta$  斑块沉积加剧。应用 UAS-A $\beta$ 42arc 转基因果蝇与携带逃跑通路启动的 p[Gal4]A307 果蝇杂交可构建 AD 果蝇模型<sup>[14]</sup>。

果蝇爬管能力是果蝇模型实验中常用检测指标,利用负趋地性,反映果蝇运动能力,可用来评估葛根素对 AD 果蝇的神经保护效果<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,AD 模型组、0.10 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组、0.20 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组、0.24 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组果蝇爬管高度显著低于正常对照组,0.10 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组、0.20 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组、0.24 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组果蝇爬管高度显著高于 AD 模型组,0.20 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组果蝇爬管高度显著高于 0.10 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组和 0.24 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组,0.10 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组与 0.24 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组果蝇爬管高度比较差异无统计学意义;说明 AD 模型果蝇的运动能力显著降低,而葛根素可显著改善 AD 果蝇的运动能力,其中 0.20 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素对 AD 模型果蝇的运动能力的改善作用最明显。因此,选择 0.20 mmol · L<sup>-1</sup>为葛根素最适浓度,进行后续果蝇寿命、果蝇脑组织中 A $\beta$  含量及斑块测定实验。

AD 果蝇实验中果蝇寿命是重要的评估指标,AD 通常会导致动物模型存活时间减少,因此,观察果蝇的生存时间可以判断药物对果蝇发挥神经保护的效果。本研究结果显示,AD 模型组和 0.20 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组果蝇的中位生存期显著短于正常对照组,0.20 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组果蝇的中位生存期显著长于 AD 模型组;说明 AD 模型果蝇存在神经损伤,其寿命明显缩短,葛根素可在一定程度上对 AD 果蝇产生神经保护作用,从而延长 AD 果蝇的寿命。

A $\beta$  相对分子质量为 4 000,具有神经毒性,可诱导神经细胞损伤,是典型 AD 的病理特征之一。A $\beta$

由 APP 水解产生,依照氨基酸特性所组成,可呈单体亦可呈聚合体存在,其中寡聚体尤为重要,目前 A $\beta$  被认为是造成 AD 认知障碍及神经损伤的主要因素;其低分子量寡聚体的主要二级结构  $\beta$  折叠,易折叠成  $\beta$ -片层结构,增加细胞神经毒性<sup>[16-18]</sup>。A $\beta$  作为 AD 的重要指标,是诊断及治疗中不可替代的标准之一。本研究结果显示,AD 模型组、0.20 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组果蝇脑组织中 A $\beta$  表达水平显著高于正常对照组,0.20 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组果蝇脑组织中 A $\beta$  表达水平显著低于 AD 模型组;AD 模型组、0.20 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组果蝇脑组织中 A $\beta$  斑块面积占比显著高于正常对照组,0.20 mmol · L<sup>-1</sup>葛根素干预组果蝇脑组织中 A $\beta$  斑块面积占比显著低于 AD 模型组;证实 AD 的发病与脑组织中 A $\beta$  的形成和沉积而产生神经毒性相关,而葛根素可以通过减少 AD 果蝇脑组织中 A $\beta$  含量和抑制 A $\beta$  在脑组织中的沉积,从而产生神经保护作用。

综上所述,葛根素可通过减少 AD 果蝇脑组织中 A $\beta$  含量和抑制 A $\beta$  沉积来发挥神经保护作用,从而提高 AD 果蝇运动能力,延长 AD 果蝇寿命。

参考文献:

[1]

LIMA D,HACKE A C M,INABA J,*et al.* Electrochemical detection of specific interactions between apolipoprotein E isoforms and DNA sequences related to Alzheimer's disease[J]. *Bioelectrochemistry*, 2019,133:107447.

[2]

MAMUN A A,UDDIN M S,MATHEW B,*et al.* Toxic tau: structural origins of tau aggregation in Alzheimer's disease[J]. *Neural Regen Res*, 2020,15(8):1417-1420.

[3]

MENG T,LIN S,ZHUANG H,*et al.* Recent progress in the role of autophagy in neurological diseases[J]. *Cell Stress*, 2019,3(5):141-161.

[4]

ROMEO M A,FAGGIONI A,CIRONE M. Could autophagy dysregulation link neurotropic viruses to Alzheimer's disease[J]. *Neural Regen Res*, 2019,14(9):1503-1506.

[5]

ZENG Q,LUO X,LI K,*et al.* Distinct spontaneous brain activity patterns in different biologically-defined alzheimer's disease cognitive stage: a preliminary study[J]. *Front Aging Neurosci*, 2019,11:350.

[6]

UDDIN M S,KABIR M T,TEWARI D,*et al.* Emerging signal regulating potential of small molecule biflavonoids to combat neuropathological insults of Alzheimer's disease[J]. *Sci Total Environ*, 2020,700:134836.

[7]

张林,方德宇,柳春,等. 基于蛋白质组学研究葛根素逆转 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 损伤 SH-SY5Y 细胞的机制[J]. 中国中药杂志, 2021,46(14):3650-3659.

ZHANG L,FANG D Y,LIU C,*et al.* Mechanism of puerarin reversing SH-SY5Y cells injury induced by A $\beta$ <sub>1-42</sub> based on proteomics[J]. *China J Chin Mat Med*, 2021,46(14):3650-3659.

[8] 葛剑,王勇,陈谦学,等. 葛根素对噪声慢性应激大鼠行为学及脑内记忆相关蛋白表达的影响[J]. 医药导报,2021,40(5):592-597.  
GE J,WANG Y,CHEN Q X,*et al.* Effects of puerarin on the behaviors and expression of memory-related proteins in chronic noise stressed rats[J]. *Herald Med*,2021,40(5):592-597.

[9] FRANCIS R,MCGRATH G,ZHANG J,*et al.* Aph-1 and pen-2 are required for notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation[J]. *Dev Cell*,2002,3(1):85-97.

[10] LIN F,XIE B,CAI F,*et al.* Protective effect of puerarin on  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons[J]. *Arzneimittelforschung*,2012,62(4):187-193.

[11] 张林,方德宇,赵丹玉,等. 葛根素的 SH-SY5Y 细胞摄取及其改善  $A\beta_{1-42}$  诱导细胞损伤的研究[J]. 中华中医药学刊,2021,39(7):54-57.  
ZHANG L,FANG D Y,ZHAO D Y,*et al.* Study on uptake of puerarin by SH-SY5Y cells and improvement of cell damage induced by  $A\beta_{1-42}$  [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2021, 39(7):54-57.

[12] 庞广福,李海,解继胜,等. 葛根素联合乌圆补血口服液对阿尔茨海默病大鼠模型的治疗效果[J]. 时珍国医国药,2019,30(5):1064-1066.  
PANG G F,LI H,XIE J S,*et al.* The puerarin consociation of Wuyuan Buxue oral liquid on rat model of Alzheimer's disease treatment[J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*,2019,30(5):1064-1066.

[13] 赖奕奕,方坚松,方淑环. 中医药调控代谢治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2022,24(1):176-182.  
LAI Y Y,FANG J S,FANG S H. Research progress in the treatment of alzheimer's disease by regulating metabolism with traditional chinese medicine [J]. *World Sci Tech-Mod Tradit Chin Med*,2022,24(1):176-182.

[14] 韩萌,马萍丽,叶春艳,等. 阿尔茨海默病果蝇模型中  $A\beta$  毒性的长度依赖性[J]. 中国老年学杂志,2015,35(5):1315-1317.  
HAN M,MA P L,YE C Y,*et al.* The toxicity of  $\beta$ -amyloid peptide depends on its length in transgenic drosophila model of Alzheimer's disease [J]. *Chin J Gerontol*,2015,35(5):1315-1317.

[15] 高聪芬,牛春东,王利祥,等. 昆虫瞬时感受器电位 (TRP) 通道研究进展[J]. 南京农业大学学报,2017,40(5):769-779.  
GAO C F,NIU C D,WANG L X,*et al.* Advances in insect transient receptor potential (TRP) channels[J]. *J Nanjing Agricult Univ*, 2017,40(5):769-779.

[16] 郝秀萍,武林芝. 突变和修饰  $\beta$  淀粉样蛋白与阿尔茨海默病[J]. 生物化学与生物物理进展,2022,49(1):100-112.  
HAO X P,WU L Z. Mutant and modified amyloid  $\beta$  peptides and Alzheimer's disease [J]. *Progress Biochem Biophys*, 2022, 49(1):100-112.

[17] 李全,张健,王琪,等. 中药对阿尔茨海默病  $\beta$ -淀粉样蛋白抑制作用的实验研究进展[J]. 时珍国医国药,2021,32(5):1214-1216.  
LI Q,ZHANG J,WANG Q,*et al.* Advances in experimental research on the inhibitory effect of traditional Chinese medicine on  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease [J]. *Lishizhen Med Mat Med Res*,2021,32(5):1214-1216.

[18] 宋成洁,王敏,汤韞韦,等. ISIB 对  $A\beta_{1-42}$  诱导的 SH-SY5Y 细胞的神经保护作用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2019,39(12):1712-1715.  
SONG C J,WANG M,TANG Y Y,*et al.* The neuroprotective effect of ISIBon SH-SY5Y cells induced by  $A\beta_{1-42}$  [J]. *J Nanjing Med Univ (Sci Ed)*, 2019,39(12):1712-1715.

( 本文编辑:周二强 )

( 上接第 512 页 )

[8] TROUTIER A,LADAVIÉRE C.An overview of lipid membrane supported by colloidal particles [J]. *Adv Colloid Interface Sci*, 2007,133(1):1-21.

[9] KOPECKA J,CAMPIA I,OLIVERO P,*et al.* A LDL-masked liposomal-doxorubicin reverses drug resistance in human cancer cells [J]. *J Control Release*,2011,149(2):196-205.

[10] HAO Y,ZHENG C,WANG L,*et al.* Tumor acidity-activatable manganese phosphate nanoplatfrom for amplification of photodynamic cancer therapy and magnetic resonance imaging[J]. *Acta Biomater*,2017,62:293-305.

[11] DAI Y,XU C,SUN X,*et al.* Nanoparticle design strategies for enhanced anticancer therapy by exploiting the tumour microenvironment[J]. *Chem Soc Rev*,2017,46(12):383-3852.

[12] WANG L,NIU M,ZHENG C,*et al.* A Core-shell nanoplatfrom for synergistic enhanced sonodynamic therapy of hypoxic tumor via cascaded strategy[J]. *Adv Healthc Mater*,2018:1800819.

[13] WANG L,HU Y,HAO Y,*et al.* Tumor-targeting core-shell structured nanoparticles for drug procedural controlled release and cancer sonodynamic combined therapy [J]. *J Control Release*, 2018,286:74-84.

[14] AL-TWEIGERI T,ALSAYED A,ALAWADI S,*et al.* A multi-center prospective phase II trial of neoadjuvant epirubicin, cyclophosphamide, and 5-fluorouracil (FEC100) followed by cisplatin-docetaxel with or without trastuzumab in locally advanced breast cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016, 77 (1): 147-153.

[15] LU W L,LI H X,QIAN B Y,*et al.* The clinical characteristics and prognosis of chinese early stage breast cancer patients;a retrospective study[J]. *Breast J*,2010,16(3):331-333.

( 本文编辑:孟 月 )