

Synapsin1 磷酸化参与开心散改善 A β 诱发的小鼠记忆障碍*

张 博¹, 黄树明^{1**}, 徐红丹², 刘学伟³

(1. 黑龙江中医药大学中医药研究院 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学/佳木斯学院 佳木斯 154007; 3. 齐齐哈尔医学院/药学院 齐齐哈尔 161006)

摘要:目的 观察开心散(Kaixin-San, KXS)对 β 淀粉样蛋白(amyloid β , A β)所致小鼠记忆障碍的影响并探索其突触前膜机制。方法 将小鼠随即分为3组,对照组、模型组(A β 组)及开心散组(A β /KXS组)。A β 组和A β /KXS组小鼠侧脑室注入5 μ L的A β 1-42(1 μ M),对照组注射等体积生理盐水。A β /KXS组于实验开始前7天连续灌胃开心散(0.15 g \cdot kg⁻¹)。采用Morris水迷宫和新奇事物认知方法评价各组小鼠学习记忆能力,电生理学测定高频刺激后第一分钟的PS振幅,蛋白质免疫印迹(Western-blot)法检测各组小鼠海马突触前膜突触蛋白1(Synapsin1, SYN1)及磷酸化突触蛋白1(phospho-SYN1, p-SYN1)的蛋白表达水平。结果 Morris水迷宫结果表明,与对照组比较,A β 组小鼠逃避潜伏期明显延长($P < 0.05$),穿越平台次数明显减少($P < 0.05$);与A β 组比较,A β /KXS组小鼠逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$),穿越平台次数明显增加($P < 0.05$)。新奇事物认知,与对照组比较,A β 组小鼠对C物体的探索偏好指数b明显降低($P < 0.05$);与A β 组比较,A β /KXS组小鼠探索偏好指数b明显增加($P < 0.05$)。电生理学测定,与对照组相比,A β 组小鼠PS振幅降低($P < 0.05$);与A β 组相比,A β /KXS组小鼠PS振幅明显增加($P < 0.05$)。且A β /KXS组小鼠海马区p-SYN1/SYN1灰度比值明显增加($P < 0.05$)。结论 开心散增加突触前膜Synapsin1磷酸化可能是开心散改善A β 诱发小鼠记忆障碍的机制之一。

关键词:开心散 突触前膜 突触蛋白1 记忆障碍

doi: 10.11842/wst.20190722004 中图分类号: R969 文献标识码: A

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的中枢神经系统退行性疾病,已成为世界生命科学领域的难题之一^[1]。 β 淀粉样蛋白(amyloid β , A β)是AD发病的关键环节^[2],其可溶性的寡聚体具有极强的神经毒性并引发一系列级联反应^[3-4],但目前尚无切实可行的治疗AD的对策。

开心散(Kaixin-San, KXS)始见于唐代《备急千金

要方》,由“远志、人参、茯苓、石菖蒲”组成,具有“主好忘”之功。大量研究证实开心散能够改善动物的学习记忆能力,但目前关于开心散改善记忆障碍的研究多从抗氧化、保护神经元、抑制乙酰胆碱酯酶等角度出发^[5],缺乏关键的内在机制的研究,而本实验从内在机制角度出发进行研究,以深入阐明开心散改善记忆能力的作用机制。突触可塑性是学习记忆的电生理学

收稿日期:2019-07-22

修回日期:2019-12-13

* 国家自然科学基金委员会青年科学基金项目(81603321):基于突触后膜受体调控的开心散改善A β 所致突触可塑性抑制的机制研究,负责人:张博;黑龙江省教育厅普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目(UNPYSCT-2017216):基于AMPA受体调控的开心散改善记忆障碍的机制研究,负责人:张博;黑龙江省科技厅自然科学基金(H2016072):开心散改善A β 所致记忆障碍的突触机制研究,负责人:张博;黑龙江中医药大学科研基金项目(2015bs04):开心散改善神经元信息传递可塑性的突触后膜机制研究,负责人:张博。

** 通讯作者:黄树明,教授,博士生导师,主要研究方向:中医药防治脑老化的机制研究。

基础,是记忆形成的关键,其形成过程需要突触前膜和突触后膜相关机制的共同参与,即突触前膜递质释放和(或)突触后膜反应的敏感性。我们课题组前期研究证实开心散可改善A β 诱发的突触可塑性抑制^[6],且在突触后膜机制方面,谷氨酸受体2蛋白介导了这一过程^[7],但对于突触前膜机制尚未见到相关的报道,而本研究将重点锚定在突触前膜机制上。突触蛋白(Synapsin, SYN)是突触囊泡功能调节的重要蛋白,其是否磷酸化极大的影响突触后膜囊泡递质的释放率,同时递质释放是突触前膜相关受体蛋白发生功能和结构改变的基础,因此为探讨开心散改善突触可塑性抑制的机制,本实验通过观察开心散对模型小鼠行为学,突触前膜递质释放效率及突触前膜磷酸化突触蛋白1(phospho-SYN1, p-SYN1)和突触蛋白1(Synapsin1, SYN1)蛋白表达的影响,明确开心散影响学习记忆能力的突触前膜分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

10周龄雌性ICR小鼠(30 \pm 5 g),购自黑龙江中医药大学,许可证号:SCXK(黑)2008-004。常规饲养在SPF级环境中,温度为24 \pm 2 $^{\circ}$ C,湿度为55 \pm 5%,12 h昼夜交替。所有动物实验均按照科技部发布的《实验动物福利伦理指南》执行,且经黑龙江中医药大学动物实验伦理委员会批准。

1.2 药物与试剂

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)、茯苓(*Poria cocos* (Schw.) Wolf)、远志(*Polygala tenuifolia* Willd.)、石菖蒲(*Acorus tatarinowii* Schott)均购自北京同仁堂药店,并由黑龙江中医药大学药学王喜军教授鉴定。人参、茯苓、远志、石菖蒲按3:3:2:2比例组成。依据课题组前期提取工艺的研究结果,即以浸出物收率总皂苷为质量控制的主要指标,根据正交设计及方差分析,确定最佳提取工艺为用10倍量的60%乙醇回流提取3次,每次1.5 h,合并提取液,滤过,药液浓缩至相对密度为1.10(60 $^{\circ}$ C)的清膏,减压(真空度为0.06-0.075 MPa)于60 $^{\circ}$ C干燥箱内干燥至恒重,粉碎成细粉,冻存,备用。此工艺条件下浸出物收率为27.6%,总皂苷含量为5.26%。

A β 1-42 (Sigma, A9810),全蛋白提取试剂盒(Solarbio, BC3710),BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云

天, P0012S), SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(Solarbio, P1200),兔源SYN1一抗(Bioss, bs-3501R),兔源p-SYN1 (Ser9) (Bioss, bs-3289R), β -actin (Bioss, bs-0061R),辣根酶标记山羊抗兔二抗(中杉金桥, ZB-2301),超敏ECL发光液(MA0186,大连美仑生物技术有限公司)。

1.3 实验仪器

Morris水迷宫(安徽淮北正华生物仪器设备有限公司),刺激电极(SNEX100同轴双极金属电极, KOPF公司),记录电极,放大器(DAM80, World Precision Instruments),刺激输出装置(SS-104J, NIHON KOHDEN),电刺激隔离器(SEN-80203, NIHON KOHDEN),数据获取装置(Digidata 1440A, Molecular Device),双目万向支架体视显微镜(ZX-0745-1W, 深圳市众寻光学仪器有限公司),稳压电源(DJW-1000, 上海全力电器有限公司),自动酶标检测仪(Thermo Fisher), Western-blot仪器包括电源,电泳槽,转膜仪及凝胶成像系统均来自BioRad公司。

1.4 模型制备及给药

小鼠随机分为3组,即对照组,模型(A β)组和开心散(A β /KXS)组。小鼠经戊巴比妥钠45 mg \cdot kg $^{-1}$ 腹腔注射麻醉后,固定于小鼠脑立体定位仪上,头部备皮,消毒手术区皮肤,沿头部正中中线做1 cm-1.5 cm切口,暴露前囟及人字沟,剥离骨膜。参照《小鼠脑立体定位图谱》^[8]定位侧脑室,在前囟后1 mm,中线旁开1.75 mm,用骨钻在颅骨上钻孔,暴露硬脑膜,微量注射器垂直脑表面进针1.8 mm,向单侧脑室缓慢注入5 μ L A β 1-42(浓度为500 μ M的A β 1-42用生理盐水稀释成浓度为1 μ M),进针5 min,留针5 min,以防液体溢出。对照组在相同位置注射等体积生理盐水。A β 及A β /KXS组均在侧脑室注射A β 1-42。A β /KXS组小鼠于造模前7天给予开心散灌胃0.2 mL(0.15 g \cdot kg $^{-1}$),对照组及A β 组给予等体积生理盐水灌胃,每日一次,持续至电生理学测试当天。因预实验中通过行为学实验对开心散低、中、高剂量组小鼠进行了学习记忆能力检测,发现开心散中、高剂量组小鼠学习记忆能力得到改善,也就是开心散中剂量即为有效剂量,因此本实验选用开心散中剂量,即0.15 g \cdot kg $^{-1}$ 的剂量进行实验。

1.5 观察指标

1.5.1 Morris水迷宫实验

造模前、后分别对各组小鼠进行测试,将基础智力和体力不合格者予以剔除。水迷宫测试分为两部分:①定位航行实验:将平台放在第 I 象限中间,在每个象限(4个象限)固定一点面向水池池壁将小鼠放入水中,每个象限各测试一次,每次测试 60 s。若小鼠在 60 s 之内尚未找到平台,则将小鼠引导至平台上并使其在平台上停留 10 s,若小鼠在 60 s 之内找到平台,也使其在平台上停留 10 s,方结束一次训练,如此训练 5 天。第 5 天训练时小鼠找到水下平台的时间即逃避潜伏期。②空间探索实验:第 5 天训练结束后,将平台移走,2 h 后将每组小鼠从固定象限(第 II 象限)的一点放入水中,记录每只小鼠在 60 s 内穿越平台的次数。

1.5.2 新奇事物认知实验

小鼠在鼠笼适应 5 min 后,将 2 个体积基本不同的不同物体(A、B)放入鼠笼,分别观察并记录小鼠在 10 min 内对 A、B 进行探索的时间,计算探索偏好指数 $a(\%) = [(B/A + B)] \times 100$ 。实验室保持安静,避免强光刺激。24 h 后,将物体(A)和新物体(C)放入笼中,分别观察并记录小鼠对 A、C 进行探索的时间,计算探索偏好指数 $b(\%) = [(C/A + C)] \times 100$ 。

1.5.3 电生理学测定

将已麻醉的小鼠固定于小鼠脑立体定位仪上,用骨钻分别于刺激及记录电极处钻孔备用,实验中用电热毯维持动物体温于 37℃。记录电极采用玻璃微电极,内充满生理盐水,电极尖端内径以电极电阻小于 3 M 欧姆为准;刺激电极采用同轴双极金属电极。突触后电位的记录选择研究海马突触可塑性常用 perforant pathway (PP) 一齿状核(dentate gyrus, DG)通路,实验时利用微推进装置将电极插入预定的刺激/记录部位。测定 PP-DG 通路突触后电位时,电极插入后刺激电极的尖端定位在海马 perforant pathway 侧枝处,坐标为 Bregma 后 4.5 mm、中线右侧旁开 3.0 mm,深度为皮层下 1.5-2.0 mm;记录电极尖端定位在 DG 区分子层,坐标为 Bregma 后 2.1 mm、中线右侧旁开 1.5 mm,深度为皮层下 1.75-2.25 mm;参考电极固定于后头部皮肤表面。放大器滤过低于 10 Hz 及高于 3 kHz 的波。

基础电刺激强度以诱发场兴奋性突触后电位(field excitatory postsynaptic potential, fEPSP)最大振幅的 30% 作为基准。待基线记录稳定 15 min 后,给予 1 串 100 个脉冲组成的高频刺激(100 Hz, 1 sec),然后观察并记录电刺激后第一分钟的 fEPSP 锋电位

表 1 开心散对模型小鼠学习记忆能力的影响(n=10)

组别	逃避潜伏期/s	穿越平台次数
对照组	24.39 ± 4.52	5.30 ± 1.25
Aβ组	34.83 ± 6.03*	1.80 ± 0.79*
Aβ/KXS组	22.38 ± 5.79#	4.00 ± 1.41#

注:与对照组相比,* $P < 0.05$;与 Aβ组相比,# $P < 0.05$ 。

(population spike, PS)振幅,数据以 PS 振幅的百分比表示。

采用 Clampex 10.2 软件记录 fEPSP 波形。记录完成后,用 Clampfit 10.2 软件分析上述记录到的波形获得并处理数据,数据以 $(\bar{x} \pm S.E.)$ 表示。

1.5.4 突触前膜 p-SYN1 和 SYN1 蛋白含量检测

将前期电生理实验结束冻存的各组刺激侧小鼠海马组织冰上裂解,离心取上清液。BCA 蛋白浓度绘制标准蛋白曲线,测定各组小鼠海马组织的蛋白浓度,依据测定的蛋白浓度按比例向各组组织中加入 4 × 上样缓冲液,煮沸,离心。配制 8% 分离胶和 5% 浓缩胶,每孔上样 20 μg 制备好的蛋白样品。上层胶 70 V,电泳 30 min,下层胶 110 V,电泳 1 h。湿转仪外部置于冰水中,100 V 湿转 2 h, TBST 缓冲液洗 5 min × 1 次。室温封闭液封闭 1 h, p-SYN1 和 SYN1 一抗(1:500)4℃孵育过夜, TBST 缓冲液洗 5 min × 5 次。二抗(1:5000)室温孵育 1 h, TBST 缓冲液洗 5 min × 5 次。ECL 发光液室温孵育 1 min,凝胶成像系统曝光成像并进行体积分析。

1.6 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件分析,数据以均数 ± 标准差 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。多组数据差异性检验用单因素方差分析,组间比较用 *post-hoc* 检验,以 $P < 0.05$ 为统计学差异显著。

2 结果

2.1 开心散对模型小鼠学习记忆能力的影响

2.1.1 水迷宫实验

水迷宫定位航行试验第 5 天,记录各组逃避潜伏期和穿越平台次数如图 1,实验结果见表 1。结果显示,与对照组相比较,Aβ组小鼠逃避潜伏期明显延长($P < 0.05$),穿越平台次数明显减少($P < 0.05$),说明 Aβ损伤了小鼠的学习记忆能力。与 Aβ组相比较,Aβ/KXS组小鼠逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$),穿越平台次数明显增加($P < 0.05$),说明开心散改善了小鼠的学

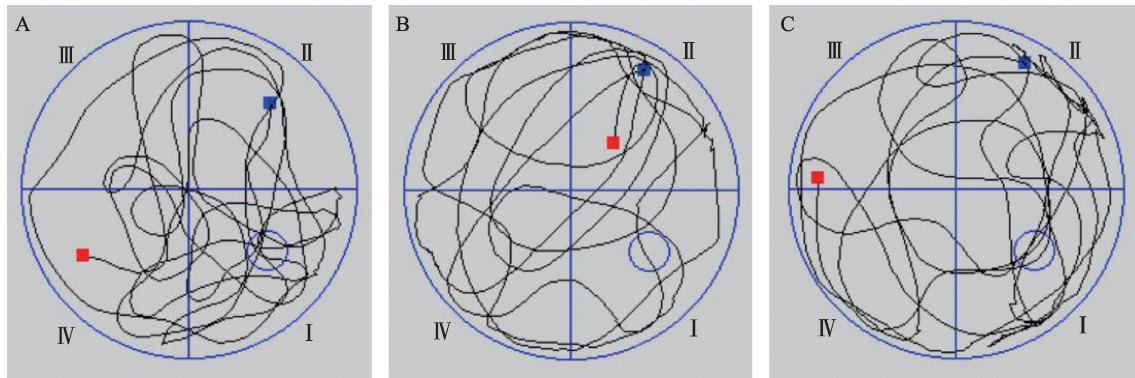


图1 各组小鼠水迷宫空间探索实验运动轨迹示意图

注:A. 对照组小鼠运动轨迹图示;B. Aβ组小鼠运动轨迹图示;C. Aβ/KXS组小鼠运动轨迹图示; I, II, III, IV 分别代表第 I, II, III, IV 象限; 蓝色方块代表小鼠放入位置, 红色方块代表小鼠运动终止位置; 第 I 象限蓝圆圈代表平台被移除前的位置。

表2 开心散对模型小鼠学习记忆能力的影响 (n=10)

组别	探索偏好指数 a (%)	探索偏好指数 b (%)
对照组	51.04 ± 1.72	62.76 ± 1.85
Aβ组	49.86 ± 1.60	50.46 ± 1.28*
Aβ/KXS组	50.16 ± 1.58	59.96 ± 1.49#

注:与对照组相比,* P < 0.05; 与 Aβ组相比,# P < 0.05.

表3 开心散对模型小鼠突触前膜递质释放效率的影响

组别	振幅 (%)
对照组	258.83 ± 25.39
Aβ组	91.83 ± 24.19*
Aβ/KXS组	296.35 ± 48.74#

注:与对照组相比,* P < 0.05; 与 Aβ组相比,# P < 0.05.

习记忆能力,提示开心散可改善 Aβ 诱发的记忆障碍。

2.1.2 新奇事物认知实验

新奇事物认知训练当天及 24 h 后,记录各组小鼠探索偏好指数,分别为探索偏好指数 a 及探索偏好指数 b,实验结果见表 2。结果显示,训练当天 Aβ 组与对照组的探索偏好指数 a 及 Aβ/KXS 组与 Aβ 组的探索偏好指数比较,均无统计学差异 (P > 0.05)。24 小时后,放入新物体 C 后,与对照组比较,Aβ 组小鼠对 C 物体的探索偏好指数 b 明显降低 (P < 0.05),即 Aβ 组小鼠对物体 A 和 C 的探索时间接近。而与 Aβ 组比较,Aβ/KXS 组小鼠探索偏好指数 b 明显增加 (P < 0.05),即 Aβ/KXS 组小鼠对物体 C 的探索时间明显增加。说明 Aβ 损伤了小鼠的学习记忆能力,而开心散改善了 Aβ 所致的记忆损害。

2.2 开心散对模型小鼠突触前膜递质释放效率的影响

fEPSP 波形稳定基础记录 15 min 后,给予一串高

频刺激所诱发 PS 振幅增加的第一分钟,间接反映的就是突触前膜递质释放效率,见表 3。电生理学实验结果显示,与对照组 (n = 20) 相比,Aβ 组小鼠 PS 振幅降低 (P < 0.05),与 Aβ 组 (n = 6) 相比,Aβ/KXS 组 (n = 7) 小鼠 PS 振幅明显增加 (P < 0.05),说明 Aβ 抑制了突触前膜递质释放效率,而开心散可改善 Aβ 对突触前膜递质释放效率的抑制作用。

2.3 开心散对模型小鼠海马突触前膜蛋白 SYN1 及 p-SYN1 表达的影响

Western-blot 结果显示,Aβ 组小鼠海马 p-SYN1 表达下降,且 p-SYN1/SYN1 灰度比值为 0.31 ± 0.04,与对照组 (0.56 ± 0.09) 比较,数值明显降低 (P < 0.05),说明 Aβ 抑制了 SYN1 磷酸化,提示磷酸化的 SYN1 (Ser9) 可能参与了 Aβ 对小鼠海马突触可塑性的抑制。Aβ/KXS 组小鼠海马 p-SYN1 表达相对增多,且 p-SYN1/SYN1 灰度比值为 0.58 ± 0.05,与 Aβ 组相比较,比值明显升高 (P < 0.05),说明开心散增加了 SYN1 的磷酸化,且逆转了 Aβ 所致的 p-SYN1/SYN1 的比值下降,提示开心散可能通过促进 SYN1 磷酸化进而改善 Aβ 诱发的突触可塑性抑制从而改善学习记忆能力 (见图 2)。而在图中 SYN1 显示的双条带可能与其具有至少 2 个亚型有关。

3 讨论

AD 患者的临床表现之一即记忆力减退,而 Aβ 是其发病的关键,具有神经毒性,严重损害患者记忆和认知功能。目前建立 AD 动物模型的方法有很多包括转基因动物、Aβ 脑内注射等^[9-10,11,12],以模拟与 AD 患者病理表现相似的脑内 Aβ 聚集,进而研究 AD 的发病机

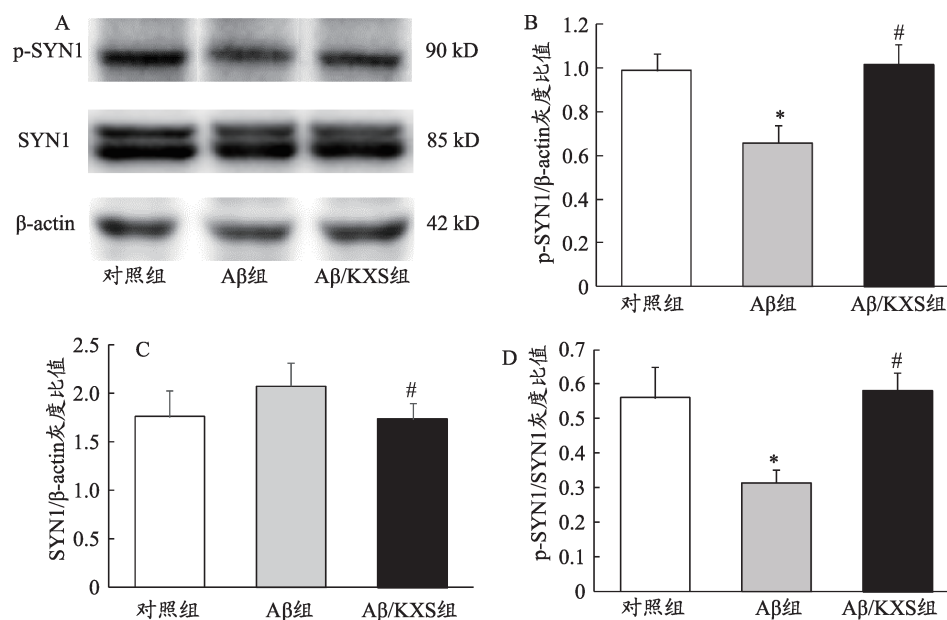


图2 突触前膜p-SYNI及SYNI蛋白表达的Western-blot结果

注:A. 各组小鼠p-SYNI及SYNI蛋白表达的曝光图示;B. 各组小鼠p-SYNI/β-actin灰度值的统计学比较;C. 各组小鼠SYNI/β-actin灰度值的统计学比较;D. 各组小鼠p-SYNI/SYNI灰度值的统计学比较($\bar{x} \pm s, n=6$);*: $P < 0.05$, vs 对照组;#: $P < 0.05$, vs Aβ组。

制。截至目前,通过复制AD模型动物已有大量行为学实验结果证实Aβ可损伤AD模型动物的学习记忆功能^[13],并通过多个环节起作用^[14-15],而Aβ脑内注射是目前研究最多,应用最广泛的AD动物模型造模方法,故本实验采用Aβ脑内注射的造模方法复制AD动物模型。本实验通过两种行为学检测方法共同证实,在基础智力无差异的情况下,Aβ所致AD模型小鼠的学习记忆能力较对照组小鼠明显下降,表明Aβ能够损伤学习记忆能力,该实验结果与文献报道相一致。

中药复方具有多因素,多靶点,多途径的作用特点,因此在治疗AD上具有独特的优势。经方开心散中以人参、茯苓,大补元气,滋补脾肾,淡渗利湿,维护先后天之本;远志、菖蒲安神定志,化痰祛邪以开窍,从而达到益气扶正,化痰祛邪的治疗目的。临床研究发现开心散变化方能有效改善AD患者认知功能方面的临床症状^[16],且大量实验通过行为学研究发现开心散具有改善模型动物记忆障碍的作用^[9-10,17],本研究通过多种行为学方法亦证实,在各组小鼠基础智力无差异的情况下,Aβ/KXS组小鼠的学习记忆能力较Aβ组小鼠有所改善,说明开心散可改善Aβ诱发的小鼠记忆障碍,这与前期研究结果相一致^[7]。

尽管大量实验表明开心散可提高AD模型动物记忆力,且可通过多途径治疗AD,但关于开心散对突触

信息传递功能可塑性的影响报道较少,仅日本学者于1994年报道开心散可促进大鼠海马齿状核长时程增强(long-term potentiation, LTP)的形成,从而改善乙醇所致记忆障碍模型大鼠学习缺陷^[18],而其也证明开心散复方各组分药物中人参和茯苓起到了增强海马LTP的作用^[19]。但开心散对AD模型动物LTP的影响及其影响LTP的机制未见报道,然而我们课题组前期研究证实开心散可改善AD模型动物突触可塑性^[7]。

突触之间信息传递主要是由突触前末梢突触囊泡所释放的递质介导,SYN是突触囊泡中含量最为丰富的跨膜蛋白,其含有多个亚型,其中SYNI在突触小泡移动方面起主要作用,同时SYN也是突触囊泡的特异性标志蛋白,是突触囊泡功能调节的最重要的分子之一并参与递质释放^[20]。通常情况下突触囊泡由突触蛋白锚定于细胞骨架丝上,当轴浆内Ca²⁺浓度升高时,引发一系列反应,促使突触蛋白Ser9位点发生磷酸化,进而与骨架丝结合力减弱,突触囊泡游离,促进递质释放^[21-22]。递质大量释放后,相关递质与突触后膜受体结合,启动突触后膜机制,增强突触可塑性^[23]。突触可塑性是学习记忆的电生理学基础^[24],突触可塑性的发生主要涉及突触前膜机制和突触后膜机制,课题组前期的研究结果发现在开心散改善Aβ诱发的突触可塑性抑制的过程中,突触后膜相关机制起到重要作

用^[7],但突触前膜机制并不清楚。因此本实验通过电生理学方法间接测定了突触前膜递质释放效率,如果开心散对突触前膜递质释放效率有影响,那么本研究将采用 Western-blot 法重点检测突触前膜 p-SYN1 (Ser9)和SYN1 蛋白表达的改变。

实验结果显示在给予高频刺激第1分钟,即强直后增强期,A β 组小鼠PS振幅明显降低,说明A β 抑制了突触前膜递质释放,而开心散组小鼠PS振幅明显升高,说明开心散能够改善A β 对突触前膜递质释放效率的抑制。因此我们进行了Western-blot实验,结果显示A β 组小鼠海马p-SYN1表达降低,且p-SYN1/SYN1比值明显下降,说明A β 降低了突触前膜SYN1的磷酸化水平,这与前人研究结果不一致,可能与在体实验的影响因素较复杂有关^[25]。而给予开心散灌胃的小鼠海马p-SYN1表达增加,且p-SYN1/SYN1比值

升高,说明开心散能够增加SYN1的磷酸化水平,逆转A β 诱发的p-SYN1/SYN1比值下降,提示开心散可能通过促进SYN1磷酸化,增加递质释放,从而减轻A β 所致的突触可塑性抑制。同时,实验发现A β /KXS组小鼠海马SYN1表达水平较A β 组减少,这可能与开心散可以降低A β 引发突触前膜递质释放紊乱带来的损害有关^[25]。

综上,开心散通过增加SYN1磷酸化蛋白表达进而改善A β 诱发的突触可塑性抑制,可能是开心散改善A β 所致小鼠记忆障碍的机制之一。然而,突触前膜含有多种涉及到突触传递的因子,机制也较为复杂,本研究仅发现突触前膜的SYN1及其磷酸化参与开心散改善A β 所致突触可塑性抑制,但详细的突触前膜机制有待进一步研究。

参考文献

- Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, 2018, 25(1): 59-70.
- Pospich S, Raunser S. The molecular basis of Alzheimer's plaques. *Science*, 2017, 358(6359): 45-46.
- Grochowska KM, Yuanxiang P, Bär J, et al. Posttranslational modification impact on the mechanism by which amyloid- β induces synaptic dysfunction. *EMBO Rep*, 2017, 18(6): 962-981.
- Zeiger W, Vetrivel KS, Buggia-Prévoit V, et al. Ca²⁺ influx through store-operated Ca²⁺ channels reduces Alzheimer disease β -amyloid peptide secretion. *J Biol Chem*, 2013, 288(37): 26955-26966.
- 张博,黄树明. 开心散治疗老年性痴呆的研究进展. *中药药理与临床*, 2013, 29(3): 193-196.
- 黄树明,任丽民,李健英,等. 开心散改善A β 1-42所致在体小鼠海马LTP抑制的实验研究. *中医药信息*, 2013, 30(6): 61-63.
- Zhang B, Li Y, Liu JW, et al. Postsynaptic GluR2 Involved in Amelioration of A β -Induced Memory Dysfunction by KAIXIN-San Through Rescuing Hippocampal LTP in Mice. *Rejuvenation Research*, 2019, 22(2): 131-137.
- PaxinosGeorge, Keith B.J. Franklin. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. *Second edition. USA: Academic Press, Figure 51-52.*
- 周高超,王华,王祎丹,等. 开心散对D-半乳糖致衰老小鼠非酶糖基化和自由基的抑制作用研究. *时珍国医国药*, 2008, 19(6): 1400-1401.
- 卞慧敏,郭海英,黄玉芳,等. 开心散对四种动物模型记忆功能的影响. *中国实验方剂学杂志*, 1999, 5(5): 51-53.
- 高冰冰,徐淑萍,刘新民,等. 开心散与去茯苓开心散改善拟AD动物学习记忆作用比较. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(7): 57-62.
- Nishiyama N, Zhou Y, Saito H. Ameliorative effects of chronic treatment using DX-9386, a traditional Chinese prescription, on learning performance and lipid peroxide content in senescence accelerated mouse. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(11): 1481-1484.
- Balducci C, Beeg M, Stravalaci M, et al. Synthetic amyloid- β oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(5): 2295-2300.
- Zhao P, Qian X, Nie Y, et al. Neuropeptide S Ameliorates Cognitive Impairment of APP/PS1 Transgenic Mice by Promoting Synaptic Plasticity and Reducing A β Deposition. *Front Behav Neurosci*, 2019, 13: 138.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(11): 6448-6453.
- 方央,王丽娟,郭忠伟,等. 开心益智饮辨证加味治疗阿尔茨海默病30例观察. *浙江中医杂志*, 2017, 52(12): 882-883.
- Nishiyama N, Zhou Y, Takashina K, et al. Effects of DX-9386, a traditional Chinese preparation, on passive and active avoidance performances in mice. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(11): 1472-1476.
- Zhang Y, Saito H, Nishiyama N, et al. Effects of DX-9386, a traditional Chinese medicinal prescription, on long-term potentiation in the dentate gyrus in rat. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(10): 1337-1340.
- Smriga M, Saito H, Nishiyama N. Hoelen (Poria Cocos Wolf) and ginseng (Panax Ginseng C. A. Meyer), the ingredients of a Chinese prescription DX-9386, individually promote hippocampal long-term potentiation in vivo. *Biol Pharm Bull*, 1995, 18(4): 518-522.
- Kleber J, Chen YC, Michels B, et al. Synapsin is required to "boost" memory strength for highly salient events. *Learn Mem*, 2015, 23(1): 9-20.
- 李叶菲,张晓醒,段树民. 突触囊泡循环研究进展. *生理学报*, 2015,

- 67(6): 545–560.
- 22 Cesca F, Baldelli P, Valtorta F, *et al.* The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity. *Progress in Neurobiology*, 2010, 91(4): 313–348.
- 23 Park P, Kang H, Sanderson TM, *et al.* On the Role of Calcium-Permeable AMPARs in Long-Term Potentiation and Synaptic Tagging in the Rodent Hippocampus. *Front Synaptic Neurosci*, 2019, 11: 4.
- 24 Sacktor TC, Fenton AA. What does LTP tell us about the roles of CaMKII and PKM ζ in memory? *Mol Brain*, 2018, 11(1): 77.
- 25 Marsh J, Bagol SH, Williams RSB, *et al.* Synapsin I phosphorylation is dysregulated by beta-amyloid oligomers and restored by valproic acid. *Neurobiol Dis*, 2017, 106: 63–75.

Synapsin1 Phosphorylation Involved in Kaixin-San Improving Memory Dysfunction Induced by A β in Mice

Zhang Bo¹, Huang Shuming¹, Xu Hongdan², Liu Xuewei³

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, 150040, China; 2. Jiamusi College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Jiamusi, 154007, China; 3. School of Pharmacy, Qiqihar Medical College, Qiqihar, 161006, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Kaixin-San (KXS) on memory impairment induced by A β in mice and explore its presynaptic membrane mechanism. Methods ICR mice were then divided into three groups: model group (A β group) and Kaixin-San group (A β /KXS group). The mice were injected with 5 μ L of A β 1–42 (1 μ M) into lateral ventricles, while the control group was injected with saline of equal volume. In A β /KXS group, KXS (0.15 g·kg⁻¹) was continuously administered 7 days before the the experiment. Morris water maze and novelty cognitive method were used to evaluate the learning and memory abilities of mice in each group. The PS amplitude in the first minute after high frequency stimulation was measured by electrophysiology. Western-blot was used to detect the expression of presynaptic synapsin 1 (SYN1) and phosphorylated synapsin 1 (p-SYN1) in the electrophysiological experiment. Results Compared with the control group, the escape latency of mice in group A β was significantly prolonged ($P < 0.05$), and the number of times crossing the platform was significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with A β group, the escape latency of mice in group A β /KXS was significantly shortened ($P < 0.05$), and the number of times crossing the platform was significantly increased ($P < 0.05$) in Morris water maze test. Compared with the control group, the exploratory preference index b of mice in group A β was significantly lower ($P < 0.05$); compared with group A β , the exploratory preference index b of mice in group A β /KXS was significantly higher ($P < 0.05$) in novelty cognitive method. Compared with the control group, the PS amplitude of mice in group A β was decreased ($P < 0.05$), and the PS amplitude of mice in group A β /KXS was increased significantly ($P < 0.05$). The gray scale ratio of p-SYN1/SYN1 in hippocampus of mice in A β /KXS group increased significantly ($P < 0.05$). Conclusion The increase of p-SYN1 expression in presynaptic membrane by KXS may be one of the mechanisms of KXS in improving memory dysfunction induced by A β in mice.

Keywords: Kaixin-San, presynaptic membrane, Synapsin 1, memory dysfunction

(责任编辑: 闫 群, 责任译审: 钱灵姝)