

## GJ-4对冈田酸诱发小鼠学习记忆障碍的神经保护作用 and 机制研究

杨 杨<sup>#</sup>, 盛婵娟<sup>#</sup>, 臧彩霞, 尚俊美, 鲍秀琦, 张 丹<sup>\*</sup>

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

**摘要:** GJ-4是从中药栀子中提取出的藏红花色素类活性成分, 前期研究发现GJ-4对A $\beta$ 诱发的小鼠学习记忆障碍具有明显的改善作用。本实验采用小鼠侧脑室注射冈田酸(okadaic acid, OA)建立记忆损伤模型(实验中所有操作均获得中国医学科学院北京协和医学院实验动物伦理委员会的批准, 批准号: 00000318), 探讨GJ-4对Tau蛋白过度磷酸化引起神经元病变的改善作用及其机制。小鼠OA侧脑室注射后, 连续16天灌胃给予GJ-4。结果显示, GJ-4可显著改善OA诱发的小鼠学习记忆障碍, 同时减少小鼠海马区神经元尼氏小体的丢失。GJ-4可提高蛋白磷酸酶2A (protein phosphatase 2A, PP2A)活性并抑制糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )表达, 进而降低Tau蛋白Ser396、Thr231和Ser404位点的磷酸化水平。进一步研究发现, GJ-4还可降低OA小鼠脑内氧化应激水平和海马星形胶质细胞活化介导的神经炎症而抑制神经元凋亡, 最终发挥改善小鼠学习记忆障碍的作用。以上研究表明, GJ-4具有开发成为治疗阿尔茨海默症新药的良好前景。

**关键词:** 阿尔茨海默症; GJ-4; Tau蛋白; 冈田酸; 神经炎症

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)12-3628-09

## Neuroprotective and mechanistic study of GJ-4 on okadaic acid-induced memory impairment in mice

YANG Yang<sup>#</sup>, SHENG Chan-juan<sup>#</sup>, ZANG Cai-xia, SHANG Jun-mei, BAO Xiu-qi, ZHANG Dan<sup>\*</sup>

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** GJ-4 is crocin enrichments extracted from *Gardenia jasminoides* J. Ellis, and our previous studies have shown that GJ-4 significantly improved learning and memory impairment induced by A $\beta$  in mice. Herein, a memory deficit model was developed by injecting okadaic acid (OA) into the lateral ventricle of mice, and the neuroprotection and underlying mechanism of GJ-4 on neuronal injury caused by Tau hyperphosphorylation were investigated. The Animal Care & Welfare Committee, Institute of Materia Medica, CAMS & PUMC has approved all procedures (No. 00000318). GJ-4 at different doses was intragastric administration to mice for 16 days. Step-down test and Morris water maze test showed that GJ-4 could significantly improve OA-induced memory impairment in mice, and reduced the loss of Nissl bodies in the hippocampus of mice. GJ-4 could also decrease the phosphorylation level of Tau protein at Ser396, Thr231 and Ser404 via increasing protein phosphatase 2A (PP2A) activity and inhibiting glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) activity. Besides, further researches indicated that GJ-4 could inhibit the level of oxidative stress in the brain of OA mice, reduce neuronal apoptosis and inhibit the neuroinflammation mediated by activation of astrocytes in the hippocampus of mice, and eventually achieve its

收稿日期: 2023-10-26; 修回日期: 2023-11-07.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82204369); 北京市自然科学基金资助项目(7232260); 中国医学科学院医学科学创新基金资助项目(2022-I2M-2-001, 2021-I2M-1-028, 2021-012M-028); 中国医学科学院中央高校基本科研业务资助项目(3332022046); 遵义医科大学基础药理教育部重点实验室资助课题(JZ-2023-11).

<sup>#</sup>共同第一作者.

\*通讯作者 Tel: 86-10-63165178, E-mail: danzhang@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1201

effects in improving learning and memory impairment in mice. According to these findings, we anticipated that GJ-4 might be a potential therapeutic drug for Alzheimer's disease.

**Key words:** Alzheimer disease; GJ-4; Tau protein; okadaic acid; neuroinflammation

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种与年龄相关的慢性中枢神经系统退行性疾病, 临床上主要表现为记忆障碍、认知功能障碍以及人格和行为等的改变。AD 的主要神经病理特征是  $\beta$ -淀粉样蛋白 ( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ ) 聚集沉积形成的老年斑 (senile plaques, SPs) 和异常磷酸化的 Tau 蛋白形成的神经元纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)<sup>[1]</sup>。AD 发病机制较为复杂, 与遗传和环境因素密切相关, 如 A $\beta$  异常沉积、Tau 蛋白过度磷酸化、氧化应激、神经炎症等均可促进 AD 的发生发展<sup>[2]</sup>。其中 Tau 蛋白过度磷酸化在 AD 发病中的作用受到密切关注, Tau 蛋白富集在神经元的轴突中, 是参与微管组装和维持微管正常功能的重要物质<sup>[3]</sup>。在 AD 患者脑中, 可见 Tau 蛋白异常磷酸化而形成的 NFTs, 其正常功能丧失而造成认知功能缺陷, 且 NFTs 与痴呆程度呈正相关<sup>[4]</sup>。研究发现, Tau 蛋白的异常磷酸化早于痴呆症状的出现, 且在 AD 发展的中后期 Tau 蛋白的减少能够减弱 A $\beta$  对神经元的毒性损伤<sup>[5]</sup>。因此, Tau 蛋白的异常磷酸化在 AD 的发生发展中发挥非常重要的作用。

目前, 临床上治疗 AD 的药物种类和数量都较少, 主要是乙酰胆碱酯酶抑制剂、谷氨酸受体拮抗剂和一些抗炎制剂, 这些药物都只针对某一特定靶点, 且只能改善某些临床症状, 不能阻止疾病退行性的发展进程, 且存在较严重的不良反应, 临床上对于 AD 的治疗一直没有有效的手段。因此, 基于多靶点作用的药物研发或许成为 AD 药物研发的一种新途径。GJ-4 是从栀子中提取出来的藏红花色素类活性成分, 前期研究结果显示 GJ-4 可通过抑制神经炎症而改善 A $\beta$  所致的小鼠学习记忆障碍<sup>[6]</sup>。而 GJ-4 能否抑制 Tau 蛋白异常磷酸化的作用尚不明确, 本实验采用小鼠侧脑室一次性

注射冈田酸 (okadaic acid, OA) 来建立 AD 模型, 旨在探究 GJ-4 对 AD 小鼠学习记忆障碍的改善作用, 并对相关机制进行探讨。

## 材料与方法

**GJ-4 的提取** 中药栀子由亳州市坤源医药有限公司提供, 将风干的栀子果实用 60% 乙醇加热回流 3 次。然后将粗提取物悬浮在 H<sub>2</sub>O 中, 并通过大孔树脂用乙醇:H<sub>2</sub>O (0:100-30:70-50:50-70:30-95:5) 梯度洗脱。70% 乙醇洗脱部分通过 HPLC-DAD 在 440 nm 处鉴定为藏红花色素类活性成分。在减压下蒸发水提取物以进行冷冻干燥, 得到 GJ-4 粉末, 其指纹图谱见图 1<sup>[7]</sup>。

**实验动物** SPF 级雄性 ICR 小鼠, 体重 20~22 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 合格证号: SCXK (京) 2019-0008。于室温 24~25 °C、50%~60% 相对湿度下屏障级动物房饲养, 保持 12 h 昼夜节律, 实验过程中动物自由进食进水。实验中所有操作均获得中国医学科学院北京协和医学院实验动物伦理委员会的批准 (批准号: 00000318)。

**小鼠侧脑室注射 OA 模型的建立、分组及给药** 小鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (50 mg·kg<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich 公司, 11715-100G) 麻醉, 固定于脑立体定位仪上, 剔除头部皮毛, 切开小鼠头部皮肤, 暴露前囟和人字中缝, 以前囟为坐标原点, 在相对坐标为前囟后 2 mm、中线左侧 2 mm 处用颅钻打孔, 以不伤及脑膜为宜, 用微量注射器在硬脑膜下 2 mm 处注射 OA (Sigma-Aldrich 公司, 07760-50UG) 2  $\mu$ L (每只 75 ng), 在 2 min 内注射完, 停针 5 min, 以 1 mm·min<sup>-1</sup> 的速度缓慢拔出注射针, 缝合切口<sup>[8]</sup>。假手术组于相对坐标为前囟后 2 mm、中线

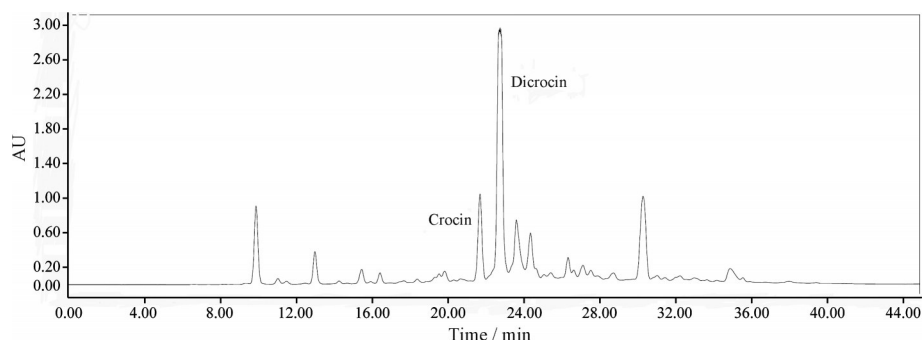


Figure 1 Major peaks in the crocin-rich fraction identified in HPLC-ELSD at 440 nm

左侧 2 mm, 硬脑膜下 2 mm 处注射 2  $\mu$ L 含 10% DMSO 的生理盐水, 方法同 OA 模型组。手术后 24 h, 待小鼠意识恢复, 将小鼠随机分为假手术组、OA 模型组、GJ-4 组 (12.5、25、50、100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )、多奈哌齐组 (5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 卫材药业有限公司), 每组 20 只。各给药组小鼠灌胃给予相应剂量的 GJ-4 及多奈哌齐, 假手术组和 OA 模型组小鼠灌胃给予相应剂量的 0.5% 羧甲基纤维素钠 (sodium carboxymethylcellulose, CMC-Na), 每天 1 次, 连续给药 16 天。

### 小鼠学习记忆能力测试

**跳台实验** 小鼠给予 GJ-4 第 7 天进行跳台学习训练, 即给药 2 h 后将小鼠放入跳台仪内, 自由活动 2 min 熟悉隔间内环境, 然后接通电源通以 36 V 交流电, 小鼠受刺激后跳到平台上躲避, 在平台上稳定不动 5 min, 学会躲避刺激。24 h 后于给药后 2 h, 将小鼠按照前一天的方向和角度放到安全平台上, 然后通电, 记录各组小鼠第一次跳下安全平台的时间, 记为潜伏期, 以及 5 min 内小鼠跳下平台的次数, 记为错误次数。若小鼠停留在安全平台的时间超过 5 min, 其潜伏期以 5 min 计算。

**Morris 水迷宫实验** 小鼠给予 GJ-4 第 9 天通过 Morris 水迷宫实验进一步检测小鼠学习记忆和空间定位能力。前 7 天为定位航行实验, 将小鼠面朝池壁随机从一个象限中间位置轻轻放入水中, 避免应激和小鼠头部浸入水中, 同时记录小鼠 90 s 内找到安全平台的潜伏期, 并让其在平台上停留 30 s, 然后取出用毛巾擦干放回笼中。若小鼠在 90 s 内未找到安全平台, 则将其引导到安全平台上并停留 30 s, 潜伏期记为 90 s。第 2 天按逆时针放入下一个象限中间, 依次进行。第 8 天进行空间探索实验, 撤去安全平台, 随机选择一个邻位象限将小鼠头朝池壁放入水中, 记录小鼠 90 s 内的游泳轨迹、首次穿越目标的时间和穿越目标的次数, 进行统计分析。实验流程图如图 2 所示。

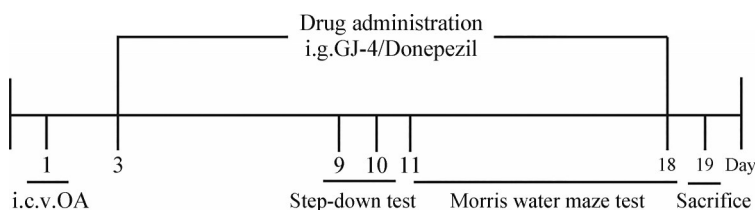
**尼氏染色及免疫组织化学染色** 末次行为学实验结束 24 h 后, 小鼠脑进行灌流固定, 固定完成后, 进行石蜡切片的制备、切片、贴片、烤片及脱蜡。蒸馏水冲

洗后, 将脑片置于 1% 甲苯胺蓝 60  $^{\circ}\text{C}$  恒温染色 40 min, 用蒸馏水洗净后分别置于浓度梯度为 70%、80%、95% 及 100% 乙醇中脱水, 再用二甲苯透明, 后用中性树脂胶封片。用正置显微镜 (日本 Nikon 公司) 观察海马尼氏小体并拍照, 采用 Image-pro plus 统计尼氏小体数量。

组织切片滴加一定比例稀释的胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 一抗 (Abcam 公司, ab7260), 切片平放于湿盒内 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。PBST 漂洗 3 次后, 加入辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的兔二抗 (武汉爱博泰克生物有限公司, AS014) 室温孵育 50 min。PBST 漂洗后加入新鲜配制的 DAB 显色液, 显微镜下观察以控制显色时间, 颜色为棕黄色时用蒸馏水冲洗切片终止显色。然后用苏木精染液复染细胞核, 在 70%、80%、95% 及 100% 浓度梯度的乙醇中脱水, 再用二甲苯透明, 中性树脂胶封片。用正置显微镜观察海马并拍照, 利用 Image-pro plus 统计 GFAP 阳性细胞数量。

**小鼠海马和皮层组织生化测定** 末次行为学后, 取小鼠大脑, 匀浆, 制备组织匀浆液, 分别用丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 测定小鼠海马和皮层中 MDA、GSH 的含量和 SOD 的活性。所有操作均按照试剂盒的说明进行。

**实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)** 用 TransZol Up Plus RNA Kit 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司, ER501-01-V2) 提取小鼠海马组织中的 RNA, 再将其逆转录成 cDNA, 用 TransStart Tip Green qPCR Super Mix 试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司, AQ141-01) 对 GFAP、白介素 (interleukin, IL)-6、IL-10、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、caspase 3、caspase 9 和 GAPDH 基因的特异性引物扩增, 进行 qPCR 转录分析。以上引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 序列如表 1<sup>[8]</sup> 所示。qPCR 操作如下: 引物 3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min, 加入 RNase-free water, 震荡混匀得到 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的引物。使用前将



**Figure 2** Experimental procedure. Mice were microinjected with OA on day 1 and administered with GJ-4/donepezil on day 3 for 16 days, and sacrificed on day 19. Mice were tested by step-down test on day 10 and Morris water maze test for 8 days from 11<sup>th</sup> to 18<sup>th</sup> day. OA: Okadaic acid

100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  引物用 RNase-free water 稀释至 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。取八联排管, 每孔按照说明书上的量, 依次加入上游引物、下游引物、2 $\times$  TransStart Tip Green qPCR SuperMix、Passive Reference Dye (50 $\times$ )、模板和 RNase-free water, 混匀放置于 ABI Prism 7900 (ABI 公司) 中采用三步法进行反应测定。利用  $C_t$  值来计算求出  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值对数据进行分析。

**Table 1** Experiment related primer sequences<sup>[8]</sup>. GFAP: Glial fibrillary acidic protein; IL: Interleukin; COX2: Cyclooxygenase-2

Gene	Primer sequence
GFAP	Forward 5'-TCCTGGAACAGCAAAACAAG-3'
	Reverse 5'-CAGCCTCAGGTTGGTTCAT-3'
IL-6	Forward 5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3'
	Reverse 5'-AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG-3'
IL-10	Forward 5'-GAATTCCTGGGAGAGAAGC-3'
	Reverse 5'-TTCTCACAGGGGAGAAATCG-3'
COX-2	Forward 5'-GAAGTGGGGGTTTAGGATCATC-3'
	Reverse 5'-CCTTTCACCTTCGGATAACCA-3'
Caspase 9	Forward 5'-AGCCAGATGCTGTCCCATAC-3'
	Reverse 5'-CAGGAGACAAAACCTGGGAA-3'
Caspase 3	Forward 5'-CCACTCCCAGTCATTCCTTTAGTG-3'
	Reverse 5'-ATGGACAACAACGAAACCTCCGTG-3'
GAPDH	Forward 5'-TTCCCGTTCAGCTCTGGG-3'
	Reverse 5'-CCCTGCATCCACTGCTGC-3'

**蛋白免疫印迹实验 (Western blot)** 按 RIPA 裂解液 (1 $\times$ , 上海生工生物工程股份有限公司, C500005): 蛋白磷酸酶抑制剂 (100 $\times$ , 北京索莱宝科技有限公司, P1260): 蛋白酶抑制剂 (50 $\times$ , TargetMol 公司, C0001) = 97:1:2 的比例配制组织裂解液, 按 1  $\mu\text{L}$  组织裂解液裂解 1 mg 组织的比例, 在冰浴条件下研磨裂解小鼠海马组织。然后进行 Western blot, 用 10% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质, 再将蛋白质转移到 0.45  $\mu\text{m}$  聚偏二氟乙烯膜 (PVDF, Millipore 公司, IPVH00010) 上。加入 p-Tau (Ser396、Thr231、Ser404) (武汉爱博泰克生物有限公司, AP0163、AP0053、AP1378)、Tau (Cell Signaling Technology 公司, 43894)、蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A, Cell Signaling Technology 公司, 43894)、p-PP2A (Tyr307, Becton, Dickinson and Company, 610555)、糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ , 武汉爱博泰克生物有限公司, A2081)、p-GSK-3 $\beta$  (武汉爱博泰克生物有限公司, AP0039)、cleaved-caspase 3 (Cell Signaling Technology 公司, 43894)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS, Abcam 公司, ab178945) 一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育。然后与相应的 HRP 偶联二抗室温孵育 2 h。洗净后滴加发光液使用 LAS4000 化学发光系统 (GE 公司) 进行检测, 用 Gel-Pro 软件分析条带灰度。

**统计学分析** 实验结果用 SPSS19.0 进行统计分析。行为学实验数据以均值  $\pm$  标准误 (mean  $\pm$  SEM) 表示, 其余实验数据均以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。不同组间的差异比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 然后用 LSD-SNK 检验。以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 结果

### 1 GJ-4改善OA诱发的AD小鼠学习记忆障碍

本实验于 GJ-4 给药第 7 天开始进行跳台学习和测试, 结果显示模型组小鼠与假手术组小鼠相比跳下平台的潜伏期显著缩短, 错误次数显著增加, 给予 GJ-4 50 和 100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  治疗后小鼠跳下平台的潜伏期明显延长, 错误次数显著减少, 且具有一定的剂量效应关系 (图 3A、B)。

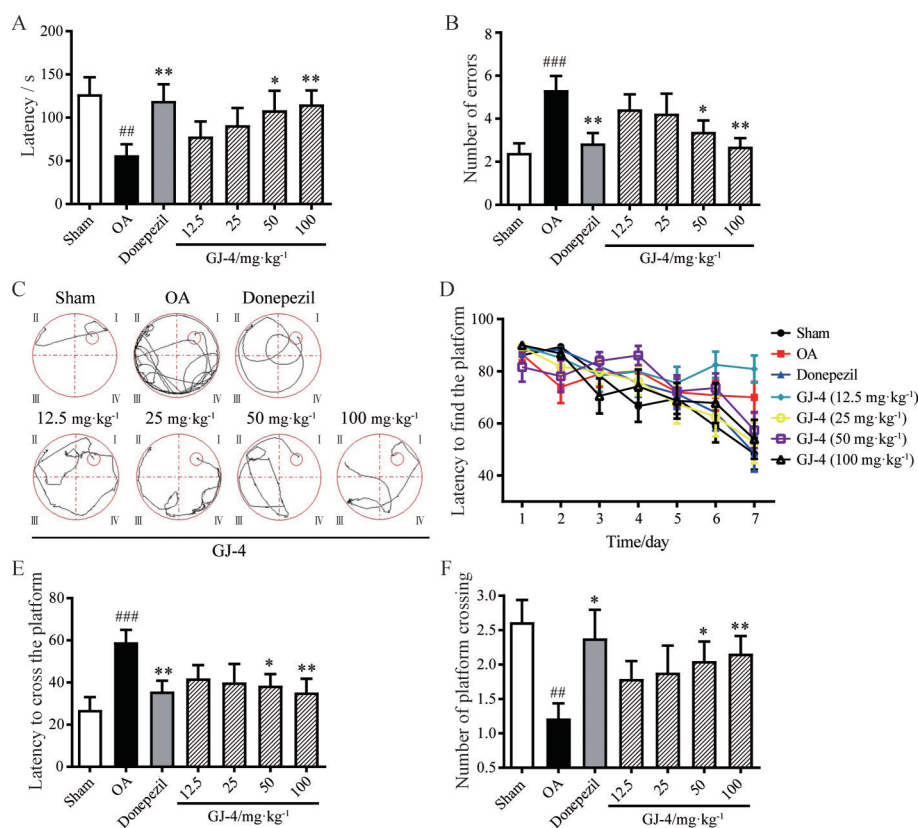
于 GJ-4 给药第 9~15 天进行 Morris 水迷宫的定位航行实验, 第 16 天进行 Morris 水迷宫空间探索实验。结果显示, 在定位航行实验中, 随着训练时间的延长, 模型组小鼠与假手术组小鼠相比找到平台的潜伏期逐渐延长, 第 7 天时游泳轨迹明显延长, 学习记忆出现障碍; 给予 GJ-4 治疗后小鼠找到平台的时间缩短, 学习记忆能力增强 (图 3C、D)。在第 8 天空间探索实验中, 模型组小鼠首次穿越平台的时间显著延长, 穿越平台的次数显著减少, GJ-4 各剂量组小鼠找到平台的潜伏期和穿越平台的次数分别呈剂量依赖性地缩短和提高, 50 和 100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  GJ-4 组小鼠学习记忆能力显著提高, 给予阳性药多奈哌齐后小鼠找到平台的潜伏期也显著缩短且穿越目标象限的次数显著提高 (图 3E、F)。

### 2 GJ-4改善OA诱发的AD小鼠海马神经元损伤

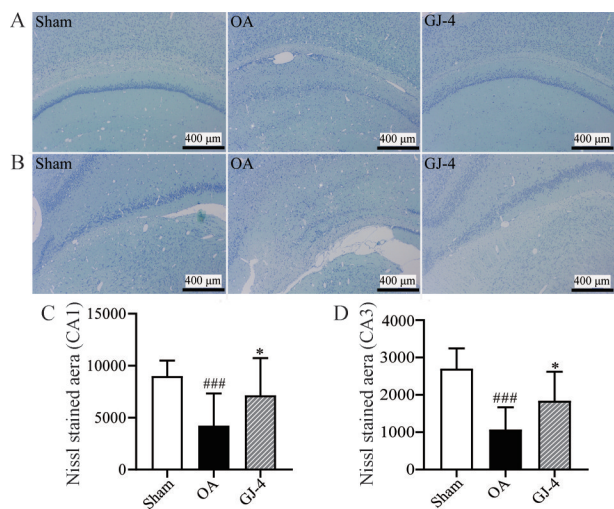
尼氏体是神经元中合成多种结构蛋白、神经递质等重要生命物质的场所。本实验采用尼氏染色的方法, 观察小鼠海马中尼氏体的形态及数目, 以评价 GJ-4 对小鼠海马神经元的保护作用。结果显示, 侧脑室注射 OA 后小鼠海马 CA1 和 CA3 区尼氏体大量丢失, 尼氏小体变小, 正常形态被破坏 (图 4A、B), CA1 和 CA3 区阳性细胞面积均显著降低 (图 4C、D)。连续 16 天给予 GJ-4 100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  后, 小鼠海马 CA1 和 CA3 区尼氏体丢失明显减少, 形态部分恢复 (图 4A、B), 阳性细胞的面积也显著增加 (图 4C、D), 提示 GJ-4 能够减少 OA 所导致的小鼠海马神经元损伤。

### 3 GJ-4抑制AD小鼠海马Tau蛋白过度磷酸化、提高PP2A活性并抑制GSK-3 $\beta$ 的激活

本实验通过 Western blot 检测小鼠海马中 Tau 蛋白磷酸化水平, 发现侧脑室注射 OA 后 AD 模型组小鼠海马 Tau 蛋白 Ser396、Thr231、Ser404 位点磷酸化水平与



**Figure 3** GJ-4 improved learning and memory deficits in OA-injected Alzheimer's disease (AD) mice. A: Latency of step-down test; B: Number of errors of step-down test; C: Representative paths to find the platform in Morris water maze test; D: Latency of mice to find the platform in Morris water maze test; E: Latency of mice to cross the platform in Morris water maze test; F: Number of platform crossing in Morris water maze test.  $n = 20$ , mean  $\pm$  SEM. <sup>##</sup> $P < 0.01$ , <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs sham operated mice; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs OA-injected mice



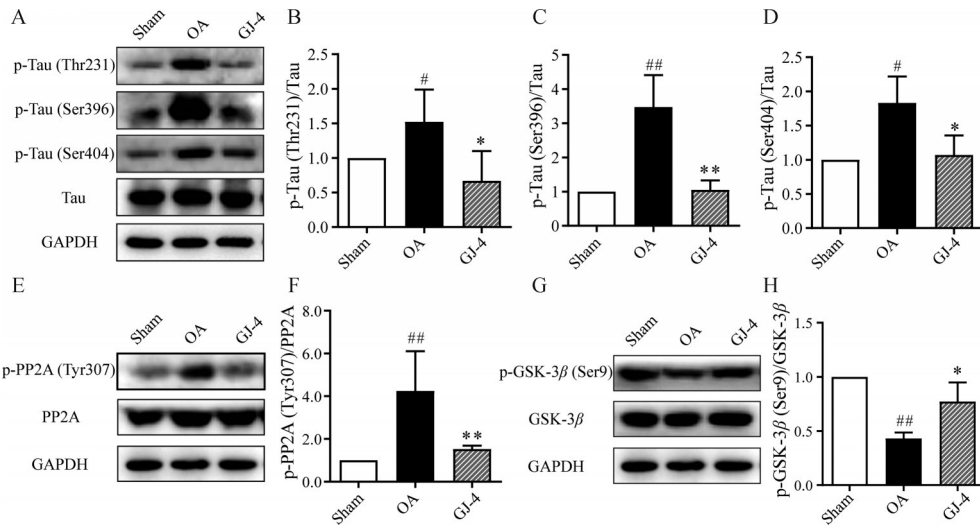
**Figure 4** GJ-4 attenuated neuronal injury induced by OA injection in mice. A, B: Nissl staining in CA1 (A) and CA3 (B) of hippocampus (40 $\times$ ); C, D: Statistical analysis of Nissl staining in the hippocampus of CA1 (C) and CA3 (D) in mice.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs sham operated mice; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs OA-injected mice. GJ-4: 100 mg·kg<sup>-1</sup>

假手术组相比均显著增加, 100 mg·kg<sup>-1</sup> GJ-4可显著抑制 Tau蛋白以上3个位点的磷酸化(图5A~D)。OA是

PP2A活性的强抑制剂<sup>[9,10]</sup>, 因此本研究检测小鼠海马PP2A Tyr307位点的磷酸化水平来反映PP2A的活性。结果表明, OA模型组小鼠海马p-PP2A (Tyr307) 表达量较假手术组小鼠显著增加, 提示PP2A活性被抑制。100 mg·kg<sup>-1</sup> GJ-4给药可显著抑制p-PP2A (Tyr307) 表达, 逆转OA引起的PP2A活性的抑制作用(图5E、F)。GSK-3 $\beta$ 的激活可促进Tau蛋白的释放和磷酸化, 加剧Tau蛋白的神经毒性作用<sup>[11]</sup>。Western blot结果显示, 模型组小鼠海马GSK-3 $\beta$  Ser9磷酸化水平明显降低, 给予GJ-4 100 mg·kg<sup>-1</sup>治疗后, GSK-3 $\beta$ 该位点的磷酸化水平显著提高, 即GJ-4可抑制GSK-3 $\beta$ 的激活(图5G、H)。以上结果表明, GJ-4可通过激活PP2A和抑制GSK-3 $\beta$ 而降低Tau蛋白的磷酸化水平。

#### 4 GJ-4抑制OA所致AD小鼠脑内的氧化应激反应

侧脑室注射OA可诱发小鼠脑内过度氧化应激反应, 脂质过氧化反应中降解产物MDA的含量、体内抗氧化剂和自由基清除剂GSH的含量及抗氧化酶SOD的活性可反映机体氧化应激水平<sup>[12,13]</sup>, 故本实验通过测定上述指标观察侧脑室注射OA诱导的AD小鼠皮层和海马内氧化应激水平。研究发现, OA模型组小



**Figure 5** Effects of GJ-4 on the phosphorylation of Tau, PP2A and GSK-3 $\beta$  in the hippocampus of OA-injected mice. A: Representative images of p-Tau (Thr231), p-Tau (Ser396), p-Tau (Ser404) and Tau in hippocampus; B–D: Statistical analysis of p-Tau (Thr231, B), p-Tau (Ser396, C), p-Tau (Ser404, D) expression; E: Representative images of p-PP2A (Tyr307) and PP2A in hippocampus; F: Statistical analysis of p-PP2A (Tyr307) expression; G: Representative images of p-GSK-3 $\beta$  (Ser9) and GSK-3 $\beta$  in hippocampus; H: Statistical analysis of p-GSK-3 $\beta$  (Ser9) expression.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs sham operated mice; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs OA-injected mice. GJ-4: 100 mg·kg $^{-1}$ . PP2A: Protein phosphatase 2A; GSK-3 $\beta$ : Glycogen synthase kinase-3 $\beta$

鼠皮层和海马中MDA的含量明显升高, GSH的含量和T-SOD的活性显著降低, 灌胃给药GJ-4 100 mg·kg $^{-1}$ 后, 小鼠大脑皮层中MDA的含量明显降低, GSH的含量有增加的趋势, 但无统计学差异, T-SOD的活性明显升高; GJ-4也显著抑制了OA引起的小鼠海马内MDA的含量升高, 明显提高GSH的含量及T-SOD的活性(图6)。上述结果提示, GJ-4可抑制OA所诱导的小鼠皮层和海马内氧化应激反应。

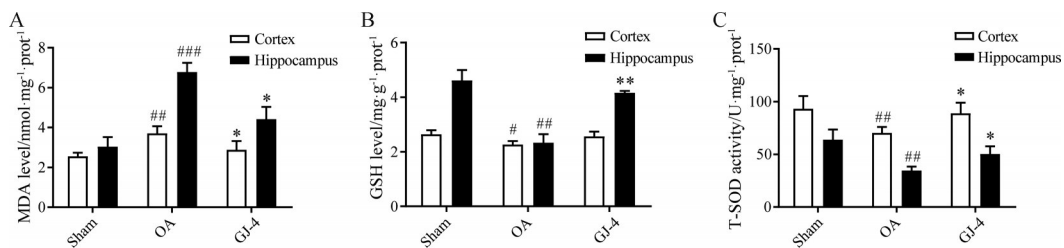
### 5 GJ-4抑制OA诱导的AD小鼠海马神经元凋亡

本实验采用qPCR检测小鼠海马中caspase 3和caspase 9 mRNA的表达水平, 并通过Western blot检测小鼠海马cleaved-caspase 3的表达量以评价caspase 3的活化程度, 以此来评估小鼠海马内神经元凋亡情况。侧脑室注射OA后模型组小鼠海马内caspase 3和caspase 9 mRNA的表达量显著增加, GJ-4可抑制caspase 3 mRNA的表达, caspase 9 mRNA的表达也在

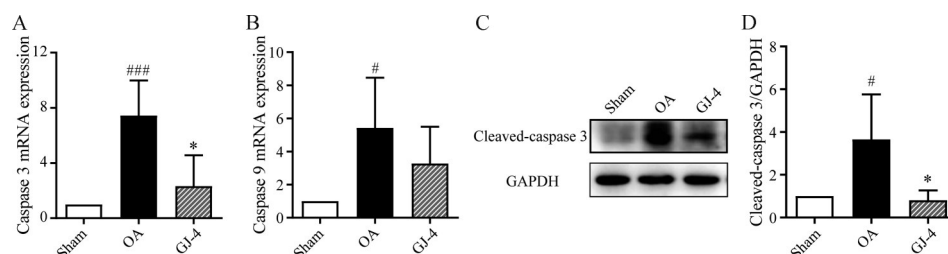
一定程度上被GJ-4抑制, 但无统计学差异(图7A、B)。OA模型组小鼠海马中cleaved-caspase 3的表达也明显提高, 100 mg·kg $^{-1}$  GJ-4能明显抑制cleaved-caspase 3的表达, 提示caspase 3的活性被GJ-4抑制(图7C、D)。

### 6 GJ-4抑制OA诱导的AD小鼠海马炎症反应

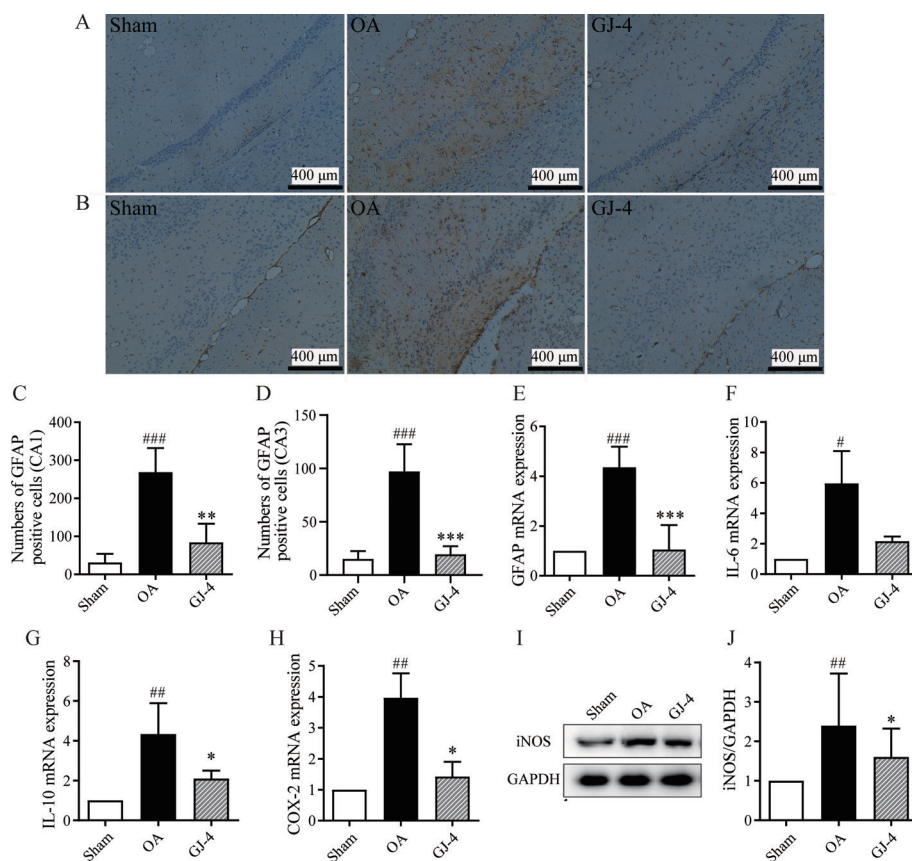
GFAP是星形胶质细胞活化标志物, 中枢神经系统中星形胶质细胞的过度激活可介导神经炎症的发生, 促进促炎因子IL-6、IL-10的释放以及炎症蛋白COX-2、iNOS的表达, 有研究表明GFAP可作为AD的潜在生物标志物<sup>[4]</sup>。采用免疫组化的方法研究小鼠海马内星形胶质细胞活化情况, 发现OA致使小鼠海马CA1和CA3区GFAP的表达显著增加, 提示星形胶质细胞被激活, GJ-4可有效抑制星形胶质细胞的激活, 表现为GFAP阳性细胞数目显著减少, 纤维丝状物的减少(图8A~D)。qPCR结果表明, 模型组小鼠GFAP mRNA的表达显著升高, 100 mg·kg $^{-1}$  GJ-4可抑制



**Figure 6** GJ-4 attenuated oxidative stress in the cortex and hippocampus of OA-injected mice. A: The content of MDA; B: The content of GSH; C: The activity of T-SOD.  $n = 12$ ,  $\bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs sham operated mice; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs OA-injected mice. GJ-4: 100 mg·kg $^{-1}$ . MDA: Malondialdehyde; GSH: Glutathione; SOD: Superoxide dismutase



**Figure 7** Effects of GJ-4 on caspase 3 and caspase 9 mRNA expression and cleaved-caspase 3 protein expression in the hippocampus of mice. A: Caspase 3 mRNA expression; B: Caspase 9 mRNA expression; C: Representative images of cleaved-caspase 3 in hippocampus; D: Statistical analysis of cleaved-caspase 3 expression.  $n = 4, \bar{x} \pm s$ . <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs sham operated mice; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  vs OA-injected mice. GJ-4: 100 mg·kg<sup>-1</sup>



**Figure 8** GJ-4 suppressed neuroinflammation in the hippocampus of OA-injected mice. A, B: Representative images of GFAP positive cells in CA1 (A) and CA3 (B) of hippocampus (40×); C, D: Statistical analysis of GFAP positive cells [CA1 (C) and CA3 (D)]; E–H: GFAP (E), IL-6 (F), IL-10 (G), and COX-2 (H) mRNA expression; I: Representative images of iNOS in hippocampus; J: Statistical analysis of iNOS expression.  $n = 4, \bar{x} \pm s$ . <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ , <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs sham operated mice; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs OA-injected mice. GJ-4: 100 mg·kg<sup>-1</sup>

GFAP mRNA 的表达 (图 8E), 模型组小鼠海马中 IL-6、IL-10、COX-2 mRNA 的表达均升高, 100 mg·kg<sup>-1</sup> GJ-4 能显著抑制 IL-10 和 COX-2 的表达, 对 IL-6 的表达也有抑制作用, 但无统计学差异 (图 8F~H)。对小鼠海马 iNOS 表达检测结果显示, OA 模型小鼠 iNOS 的表达明显升高, 100 mg·kg<sup>-1</sup> GJ-4 可明显抑制 iNOS 的表达 (图 8I、J)。以上结果表明, GJ-4 可抑制 OA 诱导的 AD 小鼠海马内由星形胶质细胞活化介导的神经炎症。

## 讨论

AD 是一种与年龄密切相关的神经退行性疾病<sup>[15]</sup>。Tau 蛋白病理学假说是目前比较公认的 AD 发病机制之一<sup>[16]</sup>。Tau 蛋白的过度磷酸化直接导致 Tau 蛋白聚集成配对螺旋样纤维 (paired helical filaments, PHFs)。PHFs 是 NFTs 的主要成分, 使微管解体, 诱导神经元死亡, 从而导致 AD 的发生<sup>[17]</sup>。Tau 蛋白的磷酸化与磷酸酯酶有关, 研究发现 PP2A 可使 Tau 蛋白多个异常苏氨

酸和丝氨酸磷酸化位点去磷酸化,并可使PHFs解体而恢复Tau蛋白的正常功能<sup>[18,19]</sup>。OA是一种单羧酸聚醚类毒素,对PP2A和PP1有较强的选择性抑制作用<sup>[20]</sup>。PP2A失活或活性降低是引起Tau蛋白过度磷酸化的主要原因,OA还能激活GSK-3 $\beta$ ,加剧Tau蛋白过度磷酸化<sup>[21,22]</sup>。因此,本实验采用侧脑室注射OA诱发AD小鼠模型来评价GJ-4的神经保护作用。跳台和Morris水迷宫实验结果显示OA可导致小鼠学习记忆障碍,这与之前的报道结果<sup>[8]</sup>一致。GJ-4能明显延长AD小鼠跳台实验的潜伏期,降低错误次数,并显著缩短AD小鼠在水迷宫实验中找到平台的时间以及增加穿越目标的次数,提示GJ-4可改善其学习记忆障碍。尼氏染色发现,GJ-4可减少尼氏小体的丢失,保护神经元,减轻OA引起的神经元损伤。OA刺激可提高Tau蛋白Thr231、Ser396和Ser404位点磷酸化水平,并提高PP2A Tyr307位点的磷酸化水平,OA还可激活GSK-3 $\beta$ ,而GJ-4通过提高PP2A并抑制GSK-3 $\beta$ 的活性进而降低Tau蛋白的磷酸化水平。以上实验结果表明,GJ-4对Tau蛋白过度磷酸化引起的小鼠学习记忆障碍有一定的治疗作用。

越来越多的证据表明,氧化应激在AD的进展中起着至关重要的作用<sup>[23]</sup>。研究发现,OA能够诱发氧化还原失衡并促进自由基生成,造成神经元受损进而导致学习记忆障碍<sup>[24]</sup>。MDA是细胞膜上脂质过氧化反应的最重要的产物之一,具有细胞毒性,可引起神经元死亡<sup>[25,26]</sup>。在本研究中,侧脑室注射OA后小鼠皮层和海马MDA水平显著升高,GJ-4治疗可逆转这种增加,这与GJ-4对神经元损伤的保护作用是一致的。为抵抗氧化应激的损伤,细胞生成一系列抗氧化剂,如SOD、过氧化氢酶和GSH等防止自由基引起的损伤<sup>[27]</sup>。本实验发现GJ-4能够显著提高T-SOD的活性,增加GSH的含量,这表明GJ-4抑制OA引起的小鼠海马和皮层的过度氧化应激可能是其发挥神经保护作用的重要机制之一。

神经元凋亡是AD的发病机制之一<sup>[28]</sup>。Caspase家族介导的凋亡途径在细胞功能障碍和神经元凋亡过程中起主导作用,caspase 3和caspase 9是细胞凋亡过程中主要的启动子,在AD患者脑中均出现caspase 3和caspase 9的激活<sup>[29,30]</sup>。研究发现,侧脑室注射OA能显著提高大鼠脑中caspase 3和caspase 9的表达<sup>[31]</sup>。在本研究中,侧脑室注射OA后小鼠海马区cleaved-caspase 3表达显著增加,caspase 3和caspase 9 mRNA表达水平均显著增加,结果与上述报道一致。GJ-4能降低cleaved-caspase 3的表达,抑制其活化并能下调caspase 3和caspase 9 mRNA的表达。以上结果表明,

GJ-4改善侧脑室注射OA小鼠学习记忆的障碍的机制可能与其抑制神经元凋亡有关。

神经炎症被认为是AD神经退行性病变过程中的关键因素<sup>[32]</sup>。胶质细胞是神经系统中除神经元外的第二大类细胞,发挥连接支持、参与修复、分配营养和吞噬的作用,与学习记忆能力密切相关<sup>[33]</sup>。研究发现,大鼠侧脑室注射OA可引起炎症细胞因子的表达增加、亚硝酸盐总量的变化和iNOS的高表达<sup>[34]</sup>。此外,OA诱导的神经炎症和氧化应激主要与星形胶质细胞激活有关,GFAP是星形胶质细胞异常激活的标志物<sup>[35]</sup>。在本实验中,小鼠侧脑室注射OA后出现明显的神经炎症反应,GJ-4可抑制炎症因子IL-6、IL-10的释放,减少炎症蛋白iNOS和COX-2的表达,同时能够显著降低GFAP的表达,即抑制星形胶质细胞的过度活化。GJ-4抑制GFAP的作用可能与其抑制神经炎症和氧化应激均有关系,表明抗神经炎症也是GJ-4治疗AD的重要机制。

综上所述,GJ-4对小鼠侧脑室注射OA引起的学习记忆障碍有明显的改善作用,并可通过提高PP2A酶活性,抑制GSK-3 $\beta$ 的激活而降低Tau蛋白的过度磷酸化。同时,GJ-4还可抑制氧化应激、神经元凋亡和神经炎症的发生。总之,GJ-4可通过多种机制和多途径改善AD小鼠的学习记忆障碍,具有开发成治疗AD新药的良好前景。

**作者贡献:** 杨杨负责药效学实验及论文撰写;盛婵娟进行机制研究及数据分析;臧彩霞、尚俊美参与药效学实验;鲍秀琦、张丹负责实验设计及论文修改。

**利益冲突:** 所有作者声明本文无任何利益冲突。

## References

- [1] Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, et al. Alzheimer disease [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 13, 7: 34.
- [2] Khan S, Barve KH, Kumar MS. Recent advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease [J]. Curr Neuropharmacol, 2020, 18: 1106-1125.
- [3] El Mammeri N, Dregni AJ, Duan P, et al. Microtubule-binding core of the Tau protein [J]. Sci Adv, 2022, 8: eabo4459.
- [4] Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, et al. Mutation-specific functional impairments in distinct Tau isoforms of hereditary FTDP-17 [J]. Science, 1998, 282: 1914-1917.
- [5] Bloom GS. Amyloid- $\beta$  and Tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis [J]. JAMA Neurol, 2014, 71: 505-508.
- [6] Zang CX, Bao XQ, Li L, et al. The protective effects of *Gardenia jasminoides* (Fructus Gardenia) on amyloid- $\beta$ -induced mouse cognitive impairment and neurotoxicity [J]. Am J Chin

- Med, 2018, 46: 389-405.
- [7] Ni Y, Li L, Zhang W, et al. Discovery and LC-MS characterization of new crocins in *Gardeniae Fructus* and their neuroprotective potential [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65: 2936-2946.
- [8] Rajasekar N, Dwivedi S, Tota SK, et al. Neuroprotective effect of curcumin on okadaic acid induced memory impairment in mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 715: 381-394.
- [9] Kamat PK, Rai S, Swarnkar S, et al. Molecular and cellular mechanism of okadaic acid (OKA)-induced neurotoxicity: a novel tool for Alzheimer's disease therapeutic application [J]. *Mol Neurobiol*, 2014, 50: 852-865.
- [10] Arribas RL, Viejo L, Bravo I, et al. C-Glycosides analogues of the okadaic acid central fragment exert neuroprotection *via* restoration of PP2A-phosphatase activity: a rational design of potential drugs for Alzheimer's disease targeting tauopathies [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 251: 115245.
- [11] Song L, Oseid DE, Wells EA, et al. The interplay between GSK3 $\beta$  and Tau Ser262 phosphorylation during the progression of Tau pathology [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 11610.
- [12] Liu Y, Uras G, Onuwaje I, et al. Novel inhibitors of AChE and A $\beta$  aggregation with neuroprotective properties as lead compounds for the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 235: 114305.
- [13] Túnez I, Muñoz Mdel C, Feijóo M, et al. Protective melatonin effect on oxidative stress induced by okadaic acid into rat brain [J]. *J Pineal Res*, 2003, 34: 265-268.
- [14] Benedet AL, Milà-Alomà M, Vrillon A, et al. Differences between plasma and cerebrospinal fluid glial fibrillary acidic protein levels across the Alzheimer disease continuum [J]. *JAMA Neurol*, 2021, 78: 1471-1483.
- [15] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397: 1577-1590.
- [16] Chang CW, Shao E, Mucke L. Tau: enabler of diverse brain disorders and target of rapidly evolving therapeutic strategies [J]. *Science*, 2021, 371: eabb8255.
- [17] Sinsky J, Pichlerova K, Hanes J. Tau protein interaction partners and their roles in Alzheimer's disease and other tauopathies [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 9207.
- [18] Gong CX, Lidsky T, Jerzy W, et al. Phosphorylation of microtubule-associated protein Tau is regulated by protein phosphatase 2A in mammalian brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 5535-5544.
- [19] Martin L, Latypova X, Wilson CM, et al. Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: the leading role of PP2A [J]. *Ageing Res Rev*, 2013, 12: 39-49.
- [20] Bialojan C, Takia A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics [J]. *Biochem J*, 1988, 256: 283-290.
- [21] Lim YW, Yoon SY, Choi JE, et al. Maintained activity of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  despite of its phosphorylation at serine-9 in okadaic acid-induced neurodegenerative model [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 395: 207-212.
- [22] Lauretti E, Dincer O, Praticò D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867: 118664.
- [23] Singh A, Kukreti R, Saso L, et al. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases [J]. *Molecules*, 2019, 24: 1583.
- [24] Yi KD, Covey DF, Simpkins JW. Mechanism of okadaic acid-induced neuronal death and the effect of estrogens [J]. *J Neurochem*, 2009, 108: 732-740.
- [25] Tang JJ, Huang LF, Deng JL, et al. Cognitive enhancement and neuroprotective effects of OABL, a sesquiterpene lactone in 5 $\times$  FAD Alzheimer's disease mice model [J]. *Redox Biol*, 2022, 50: 102229.
- [26] Gustaw-Rothenberg K, Kowalczyk K, Stryjecka-Zimmer M. Lipids' peroxidation markers in Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2010, 10: 161-166.
- [27] Cakir M, Duzova H, Tekin S, et al. ACA, an inhibitor phospholipases A2 and transient receptor potential melastatin-2 channels, attenuates okadaic acid induced neurodegeneration in rats [J]. *Life Sci*, 2017, 176: 10-20.
- [28] Kumari S, Dhapola R, Reddy DH. Apoptosis in Alzheimer's disease: insight into the signaling pathways and therapeutic avenues [J]. *Apoptosis*, 2023, 28: 943-957.
- [29] Li MW, Ona VO, Guégan C, et al. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model [J]. *Science*, 2000, 288: 335-339.
- [30] Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure [J]. *Science*, 2002, 298: 789-791.
- [31] Kamat PK, Tota S, Shukla R, et al. Mitochondrial dysfunction: a crucial event in okadaic acid (ICV) induced memory impairment and apoptotic cell death in rat brain [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2011, 100: 311-319.
- [32] Al-Ghraiyyah NF, Wang J, Alkhalifa AE, et al. Glial cell-mediated neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 10572.
- [33] Stogsdill JA, Ramirez J, Liu D, et al. Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis [J]. *Nature*, 2017, 551: 192-197.
- [34] Tiwari V, Chopra K. Attenuation of oxidative stress, neuroinflammation, and apoptosis by curcumin prevents cognitive deficits in rats postnatally exposed to ethanol [J]. *Psychopharmacology*, 2012, 224: 519-535.
- [35] Patani R, Hardingham GE, Liddelow SA. Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration [J]. *Nat Rev Neurol*, 2023, 19: 395-409.