

基于 miR - 190b/PHLPP1/AKT/FOXO3a 通路探究补中益气汤对自身免疫性甲状腺炎模型小鼠海马神经元异常自噬的影响

刘晓炜^{1,2}, 高天舒³

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847; 2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300381;

3. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110032)

摘要:目的 基于 miR - 190b/Pleckstrin 同源结构域和富亮氨酸重复蛋白磷酸酶(Pleckstrin homology domain leucine - rich repeat protein phosphatase, PHLPP1)/蛋白激酶 B(Protein kinase B, AKT)/叉形头转录因子 O 亚型 3a(Forkhead BoxO3a, FOXO3a) 通路探究补中益气汤对自身免疫性甲状腺炎(Autoimmune thyroiditis, AIT)模型小鼠海马神经元异常自噬的影响。方法 50 只雌性 NOD. H - 2^{h4} 小鼠随机分为空白对照组(CG 组)、模型组(MG 组)、补中益气汤低、中、高剂量组(BG - 1、BG - 2、BG - 3 组), 每组 10 只。通过猪甲状腺球蛋白诱导法建立 AIT 模型, 造模成功后, BG - 1、BG - 2、BG - 3 组分别予 2.73、8.19、24.57 g/kg · d 补中益气汤中药灌胃, CG 组、MG 组予等量蒸馏水灌胃, 每灌胃 6 d 休息 1 d, 连续 8 周。Morris 水迷宫实验检测小鼠空间学习记忆能力; 酶联免疫吸附测定法(Enzyme - linked immunosorbent assay, ELISA)检测小鼠血清三碘甲状腺原氨酸(Triiodothyronine, T₃)、四碘甲状腺原氨酸(Tetraiodothyronine, T₄)、促甲状腺激素(Thyroid stimulating hormone, TSH)、甲状腺球蛋白抗体(Thyroglobulin antibody, TgAb)水平; 苏木素伊红(Hematoxylin eosin, HE)染色法观察小鼠甲状腺组织形态变化; 透射电子显微镜观察小鼠海马神经元超微结构; 免疫荧光染色法观察小鼠脑组织海马 CA1 区 LC3 阳性表达; 逆转录聚合酶链式反应(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT - PCR)法检测小鼠海马组织 miR - 190b - 5p、PHLPP1 mRNA 表达; Wes 全自动蛋白印迹定量分析系统检测小鼠海马组织 Beclin1、LC3、P62、PHLPP1、AKT、p - AKT、FOXO3a、p - FOXO3a 蛋白水平; 双荧光素酶报告基因实验验证 miR - 190b - 5p 与 PHLPP1 靶向关系。结果 与 CG 组比较, MG 组小鼠逃避潜伏期明显延长($P < 0.01$), 穿越平台次数和目标象限停留时间均显著降低($P < 0.01$); 血清 TgAb 含量显著升高($P < 0.01$); 甲状腺滤泡大小不等, 滤泡内间质有大量淋巴细胞浸润; 海马神经元结构受损, 出现自噬小体; 海马 CA1 区 LC3 平均荧光强度增加($P < 0.01$); 海马组织 Beclin1、LC3、PHLPP1、FOXO3a 蛋白表达水平增高, P62、p - AKT/AKT、p - FOXO3a/FOXO3a 蛋白表达水平降低($P < 0.01$); 海马组织 miR - 190b - 5p 水平降低, PHLPP1 mRNA 水平增高($P < 0.01$)。与 MG 组相比, 中药各组可使小鼠逃避潜伏期显著缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$), 穿越平台次数和目标象限停留时间增加($P < 0.01$); 血清 TgAb 水平显著降低($P < 0.01$); 甲状腺滤泡上皮细胞结构较为完整, 淋巴细胞浸润情况明显缓解; 海马神经元细胞形态结构恢复, 自噬小体减少; 海马 CA1 区 LC3 平均荧光强度均降低($P < 0.01$); 小鼠海马组织 Beclin1、LC3、PHLPP1、FOXO3a 蛋白表达水平降低, P62、p - AKT/AKT、p - FOXO3a/FOXO3a 蛋白表达水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 海马组织 miR - 190b - 5p 水平升高, PHLPP1 mRNA 水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。双荧光素酶实验验证 PHLPP1 是 miR - 190b - 5p 的靶向调控分子。结论 补中益气汤可能通过调控 miR - 190b/PHLPP1/AKT/FOXO3a 信号通路改善 AIT 小鼠海马神经元异常自噬, 从而减轻海马神经元损伤, 缓解认知功能损伤。

关键词: 自身免疫性甲状腺炎; 认知损伤; 补中益气汤; 自噬; miR - 190b; PHLPP1/AKT/FOXO3a

中图分类号: R289.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-7717(2025)12-0060-12

Exploring Effect of Buzhong Yiqi Decoction(补中益气汤) on Abnormal Autophagy of Hippocampal Neurons in Autoimmune Thyroiditis Model Mice Based on miR - 190b/PHLPP1/AKT/FOXO3a Pathway

LIU Xiaowei^{1,2}, GAO Tianshu³

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China;

2. The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China;

3. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning, China)

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82174359, 81874441); 沈阳市临床医学研究中心项目(沈科发[2018]75号); 天津中医药大学第一附属医院“拓新工程”基金科研项目(院 ZZ2024011)

作者简介: 刘晓炜(1995 -), 女, 山东淄博人, 医师, 博士, 研究方向: 中医防治内分泌及代谢性疾病。

通讯作者: 高天舒(1967 -), 男, 辽宁沈阳人, 主任医师, 博士研究生导师, 博士, 研究方向: 中医防治内分泌及代谢性疾病。E-mail: gaotianshu67@163.com。

Abstract: *Objective* To explore the effect of Buzhong Yiqi Decoction(补中益气汤) on abnormal autophagy of hippocampal neurons in autoimmune thyroiditis(AIT) model mice based on the miR-190b/Pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase(PHLPP1)/protein kinase B(AKT)/Forkhead BoxO3a(FOXO3a) pathway. *Method* Fifty female NOD.H-2^{h4} mice were randomly divided into blank control group(CG group), model group(MG group), low, medium and high dose groups of Buzhong Yiqi Decoction(BG-1, BG-2, BG-3 groups), with 10 mice in each group. The AIT model was established through pig thyroglobulin induction method. After successful modeling, the BG-1, BG-2 and BG-3 groups were given 2.73, 8.19 and 24.57 g/(kg·d) Buzhong Yiqi Decoction by gavage, respectively. The CG and MG groups were given an equal amount of distilled water by gavage, with a rest of 1 day every 6 days for 8 consecutive weeks. Morris water maze experiment was used to test the spatial learning and memory abilities of mice. Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) was used to detect the levels of serum triiodothyronine(T₃), tetraiodothyronine(T₄), thyroid stimulating hormone(TSH) and thyroglobulin antibody(TgAb) in mice. Hematoxylin eosin(HE) staining method was used to observe the morphological changes of mouse thyroid tissue. Transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructure of hippocampal neurons in mice. Immunofluorescence staining was used to observe the positive expression of LC3 in the hippocampal CA1 region of mouse brain tissue. Reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) was used to detect the expressions of miR-190b-5p and PHLPP1 mRNA in mouse hippocampal tissue. The Wes fully automated Western blot quantitative analysis system detected the protein levels of Beclin1, LC3, P62, PHLPP1, AKT, p-AKT, FOXO3a and p-FOXO3a in mouse hippocampal tissue. The dual luciferase reporter gene experiment confirmed the targeting relationship between miR-190b-5p and PHLPP1. *Results* Compared with those of the CG group, the escape latency of MG group was significantly prolonged($P < 0.01$), and the number of crossing platforms and target quadrant residence time were significantly reduced($P < 0.01$). The serum TgAb content significantly increased($P < 0.01$). The size of thyroid follicles varies, and there was a large amount of lymphocyte infiltration in the stroma of follicles and damaged hippocampal neuronal structure with the appearance of autophagosomes. The average fluorescence intensity of LC3 in hippocampal CA1 region increased($P < 0.01$). The expression levels of Beclin1, LC3, PHLPP1 and FOXO3a proteins in hippocampal tissue increased, while the expression levels of P62, p-AKT/AKT and p-FOXO3a/FOXO3a proteins decreased($P < 0.01$). The miR-190b-5p level in hippocampal tissue decreased, while the PHLPP1 mRNA level increased($P < 0.01$). Compared with the MG group, the BG-1, BG-2 and BG-3 groups significantly shortened the escape latency of mice($P < 0.05$, $P < 0.01$), and increased the number of times they crossed the platform and the target quadrant residence time($P < 0.01$). The structure of thyroid follicular epithelial cells was relatively intact, and the infiltration of lymphocytes significantly improved. The morphology and structure of hippocampal neurons recovered, and autophagosomes decreased. The average fluorescence intensity of LC3 in hippocampal CA1 region decreased($P < 0.01$). The expression levels of Beclin1, LC3, PHLPP1 and FOXO3a proteins in mouse hippocampal tissue decreased, while the expression levels of P62, p-AKT/AKT and p-FOXO3a/FOXO3a proteins increased($P < 0.05$, $P < 0.01$). The miR-190b-5p level in hippocampal tissue increased, while the PHLPP1 mRNA level significantly decreased($P < 0.05$, $P < 0.01$). The dual luciferase assay confirmed that PHLPP1 was a targeted regulatory molecule of miR-190b-5p. *Conclusion* Buzhong Yiqi Decoction may improve abnormal autophagy in hippocampal neurons of AIT mice by regulating the miR-190b/PHLPP1/AKT/FOXO3a signaling pathway, thereby reducing hippocampal neuronal damage and alleviating cognitive dysfunction.

Keywords: autoimmune thyroiditis; cognitive impairment; Buzhong Yiqi Decoction(补中益气汤); autophagy; MiR-190b; PHLPP1/AKT/FOXO3a

自身免疫性甲状腺炎(Autoimmune thyroiditis, AIT)是一种常见的器官特异性自身免疫性疾病,以甲状腺淋巴细胞浸润和血清中特异性甲状腺自身抗体主要是甲状腺过氧化物酶抗体(Thyroid peroxidase antibody, TPOAb)及甲状腺球蛋白抗体(Thyroglobulin antibody, TgAb)的升高为主要特征。AIT发病率逐年增高,我国成人甲状腺自身抗体阳性总体患病率为14.19%^[1]。自身免疫甲状腺炎相关类固醇激素反应性脑病(Steroid responsive encephalopathy associated with autoimmune thyroiditis, SREAT)源于 Lord Brain 在1966年首次报道的一例以卒中样发作、精神错乱为主要表现病例,被认为是AIT累及中枢神经系统所致的最严重并发症^[2],其发病机制未明。近年来多项研究表明即使在甲功正常AIT患者中仍然存在着广泛的脑功能障碍、认知功能损伤,主要表现为总体认知功能、持

续注意力、执行能力、语音流畅性、焦虑抑郁评分等明显下降^[3-4]。糖皮质激素是SREAT的治疗首选,但综合考虑药物长期应用的获益风险比,并不适宜在AIT轻度认知损伤患者中推广应用^[5]。目前,有效改善AIT认知损伤的药物尚未发现。

神经元自噬是造成神经元细胞受损的主要原因之一,现阶段已在认知障碍类疾病研究中取得突破性进展,与阿尔茨海默病、帕金森病、糖尿病认知功能障碍及血管性痴呆等疾病的发生密切相关^[6-9],但在AIT模型中未见报道。课题组前期临床研究发现补中益气汤加减治疗甲功正常AIT轻度认知损伤者可明显降低其甲状腺自身抗体水平,提高蒙特利尔认知评估量表评分,改善认知功能^[10];实验研究证实该方可通过上调海马miRNA132、miRNA212水平,调节BDNF及Trkb表达,激活细胞外蛋白调节激酶ERK1/2,或通过调节Th17/Treg轴相关

因子表达,减轻微血管炎症,从而改善甲状腺相关认知损伤^[11-12]。本研究以 NOD. H-2^{h4} 转基因小鼠为研究对象,基于细胞自噬途径,从 miR-190b/Pleckstrin 同源结构域和富亮氨酸重复蛋白磷酸酶(Pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase, PHLPP1)/蛋白激酶 B(Protein kinase B, AKT)/叉头转录因子 O 亚型 3a(Forkhead BoxO3a, FOXO3a) 自噬信号通路为切入点,探讨补中益气汤改善 AIT 致认知损伤的潜在机制。

1 材料

1.1 动物 种鼠为美国 Jackson 实验室引进的 NOD. H-2^{h4} 小鼠(品系号:004447,动物合格证编号:2211A01937),体质量 20~25 g,6~8 周龄。于辽宁中医药大学动物实验中心 SPF 级实验室进行交配繁育饲养[实验单位使用许可证号:SYXK(辽)2013-0009],饲养环境适宜。本实验经辽宁中医药大学伦理委员会批准,伦理审查编号:21000042022105。

1.2 实验药品及制备 补中益气汤(参照李东垣《内外伤辨惑论·卷中》):黄芪 18 g(批号:22202191),甘草 9 g(批号:2109111),人参 6 g(批号:2203281),升麻 6 g(批号:2204291),柴胡 6 g(批号:2112013),陈皮 6 g(批号:2211293),当归 3 g(批号:2208102),白术 9 g(批号:2205102)。上述中药饮片,购于辽宁中医药大学附属医院中药局,经辽宁中医药大学附属医院高天舒教授鉴定,符合 2020 年版《中华人民共和国药典》要求。按国家炮制标准进行炮制后,原药材加 5 倍量双蒸水,煎煮 2 次,合并滤液,100 °C 恒温水浴加热浓缩,浓缩配成含生药浓度为 2.0 g/mL 的汤剂。

1.3 试剂 猪甲状腺球蛋白(Pig thyroglobulin, pTg, 货号 QA052105,安徽酷尔生物工程有限公司);弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, CFA, 货号 F5881,美国 Sigma 公司);弗氏不完全佐剂(Freund's incomplete adjuvant, IFA, 货号 F5506,美国 Sigma 公司);小鼠三碘甲状腺原氨酸(Triiodothyronine, T₃)酶联免疫吸附测定法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、小鼠四碘甲状腺原氨酸(Tetraiodothyronine, T₄)ELISA 试剂盒、小鼠促甲状腺激素(Thyroid stimulating hormone, TSH)ELISA 试剂盒、小鼠甲状腺球蛋白抗体(Thyroglobulin antibody, TgAb)ELISA 试剂盒(货号 EU0403、EU0402、EM1433、EM1402,武汉菲恩生物科技有限公司);苏木素伊红(Hematoxylin eosin, HE)染色试剂盒(货号 C0105S,上海碧云天生物技术有限公司);Beclin 1 Polyclonal antibody、LC3 Polyclonal antibody、P62、SQSTM1 Polyclonal antibody、PHLPP Polyclonal antibody、AKT Polyclonal antibody、Phospho-AKT(Ser473) Polyclonal antibody、FOXO3A Polyclonal antibody、Beta Actin Polyclonal antibody(货号 11306-1-AP、14600-1-AP、18420-1-AP、22789-1-AP、10176-2-AP、28731-1-AP、10849-1-AP、81115-1-RR,武汉三鹰生物技术有限公司);Phospho-FOXO3A(Ser253) Antibody(货号 AF3020,美国 Affinity Biosciences 公司);兔抗检测试剂盒、蛋白质分离试剂盒(货号 DM-001, SM-W, 美国 Protein Simple 公司);双荧光素酶报告基因检测试剂盒(货号 RG027,上海碧云天生物技术有限公司)。

1.4 仪器 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司),光学显微镜(德国 Leica 公司),PCR 仪(美国 Applied Biosystems

公司),全自动蛋白分析系统(美国 Protein Simple 公司),倒置荧光显微镜(德国 ZEISS 公司),动物运动轨迹跟踪系统(荷兰 NOLDUS),透射电子显微镜(日本 HITACHI 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模和给药 将 50 只 8 周龄雌性 NOD. H-2^{h4} 小鼠采用随机数字表法分为 5 组:空白对照组(CG 组)、模型组(MG 组)、补中益气汤低、中、高剂量组(BG-1、BG-2、BG-3 组),每组 10 只。参照既往文献^[13-15],选用 pTg(25 μg/只)联合弗氏佐剂多点(背部、颈部、尾部)皮下注射免疫诱导法进行 AIT 造模。MG、BG-1、BG-2、BG-3 组小鼠予 pTg-CFA 乳化剂皮下多点注射行初次免疫,2 周后再予等体积 pTg-IFA 乳化剂行加强免疫,4 周后建立 AIT 动物模型。同时用磷酸盐缓冲液(PBS)代替 pTg 处理的小鼠作为 CG 组。AIT 模型建立后进行灌胃给药处理。小鼠按人体公斤体质量(g/kg)每日用药量的 9.1 倍计算^[16],相当于人的等效剂量,得出 BG-2 组给药量为 8.19 g/(kg·d),BG-1 组和 BG-3 组给药量分别设为 2.73 g/(kg·d)和 24.57 g/(kg·d),CG 组及 MG 组每日灌服等体积双蒸水,各组每日灌服 1 次,每灌胃 6 d,休息 1 d,连续 8 周。

2.2 Morris 水迷宫实验检测小鼠空间学习记忆能力 包括 5 d 的定位航行实验和 1 d 的空间探索实验。(1)定位航行实验:将水迷宫水池等分为 4 个象限,把平台置于第四象限(目标象限)。将小鼠头朝池壁分别从 4 个象限放入水中,记录其在 60 s 内找到平台的时间(即逃避潜伏期),并停留 10 s;60 s 内未找到平台的小鼠记逃避潜伏期为 60 s,并引导其到达平台停留 10 s。(2)空间探索实验:第 6 天把平台撤除,将小鼠由目标象限的对侧放入水中,记录小鼠在 60 s 内穿越原平台区域次数及在目标象限停留时间。

2.3 ELISA 检测小鼠血清 T₃、T₄、TSH、TgAb 水平 按照 50 mg/kg 标准腹腔注射 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉,摘眼球取血,3000 r/min,4 °C,15 min 离心分离血清。严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

2.4 HE 染色法观察小鼠甲状腺组织形态变化 麻醉后处死小鼠,冰上取甲状腺组织放入 4% 多聚甲醛固定,经脱水、透明、包埋,制作石蜡切片。切片经脱蜡、水化后,用苏木精、伊红染液进行染色,再经脱水、透明后,用中性树脂胶封片,于光学显微镜下观察甲状腺组织形态学变化。

2.5 透射电子显微镜观察小鼠海马神经元超微结构 冰上分离海马组织,切割成 1 mm³ 大小组织块,置于 2.5% 戊二醛预固定,1% 锇酸再固定,经室温脱水、包埋后行超薄切片(厚度 70 nm),醋酸铀和枸橼酸铅溶液染色,于透射电子显微镜下观察海马神经元超微结构。

2.6 免疫荧光染色法观察小鼠脑组织海马 CA1 区 LC3 阳性表达 冰上取脑组织制备石蜡切片,经脱蜡、水化、抗原修复、5% 血清封闭后,滴加 LC3 抗体(1:250)孵育过夜,洗涤后滴加 FITC 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:250)避光孵育,洗涤后滴加 DAPI 染液复染细胞核,PBS 洗涤 3 次,避光封片,荧光显微镜下观察并采集图像。

2.7 逆转录聚合酶链式反应(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)法检测小鼠海马组织 miR-190b-5p、PHLPP1 mRNA 表达 采用 Trizol 法提取小鼠海马组织总

RNA, 逆转录得到 cDNA, 以 U6 和 β -actin 分别作为 miR-190b-5p、PHLPP1 内参完成 PCR 扩增(反应条件: 95 °C、1 min, 95 °C、15 s, 60 °C、30 s, 72 °C、1 min, 共 40 个循环)。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各组基因相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列	片段长度/ (bp)
miR-190b-5p	F: ACACCTCCAGCTGGGTGATATGTTTGATATT R: TGGTGTCTGTTGGAGTCC	66
PHLPP1	F: CCAGTGAACCGATGGACAAGA R: CTCCTGAAAGTATCAAAGCAGA	213
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA R: AACGCTTCACGAATTTGCGT	136
β -actin	F: GTGACGTTGACATCCGTAAGA R: GTAACAGTCCGCTAGAAGCAC	287

2.8 Wes 全自动蛋白印迹定量分析系统检测小鼠海马组织 Beclin1、LC3、P62、PHLPP1、AKT、p-AKT、FOXO3a、p-FOXO3a 蛋白水平 采用 RIPA 裂解液裂解并提取小鼠海马组织总蛋白, BCA 试剂盒测定蛋白浓度。不同样品上样量均为 4.5 μ L(包括 5 \times Master Mix 0.9 μ L, 待检样品与 0.1 \times Sample Buffer 合为 3.6 μ L), 95 °C、5 min 变性。样品制备完毕, 按照样品、封闭液、一抗、二抗、发光液及清洗缓冲液的顺序分别加入板内, 机器自检后分别放入毛细管芯及板子, 设计板子布局, 开始检测, 150 min 完成检测, 进行结果分析。

2.9 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-190b-5p 与 PHLPP1 靶向关系 构建 PHLPP1 野生型与突变型质粒, 即 PHLPP1 3' UTR-WT、PHLPP1 3' UTR-MT, 在 293T 细胞中将其分别与 miR-190b-5p mimic 与 NC mimic 共转染, 即分为 PHLPP1 WT + NC mimics 组、PHLPP1 WT + miR-190b-5p 组、PHLPP1 MT + NC mimics 组、PHLPP1 MT + miR-190b-5p 组。双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测各组细胞荧光素酶活性。

2.10 统计分析 采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较若满足正态分布且方差齐时采用单因素方差分析; 不满足正态分布或方差不齐时采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组小鼠血清 T_3 、 T_4 、TSH、TgAb 水平 与 CG 组比较, MG 组小鼠血清 TgAb 含量显著升高 ($P < 0.01$), 证明 AIT 造模成功。与 MG 组比较, 中药各剂量组 (BG-1、BG-2、BG-3 组) 小鼠血清 TgAb 水平显著降低 ($P < 0.01$), 其中以 BG-2 组降低效果最为明显。与 MG 组相比, 其余各组小鼠血清 T_3 、 T_4 、TSH 水平差异无统计学意义。见图 1。

3.2 各组小鼠甲状腺组织形态 CG 组甲状腺滤泡上皮细胞结构完整, 大小均一, 形态呈圆形或长扁形, 排列紧密, 无淋巴细胞浸润。MG 组甲状腺滤泡大小不等, 滤泡上皮细胞呈长立方形, 多数滤泡腔内充满胶质, 少数滤泡腔内胶质不均匀分布, 滤泡分散排列, 滤泡内间质有大量淋巴细胞浸润, 进一步证明 AIT 模型成功。中药各剂量组 (BG-1、BG-2、BG-3 组) 甲状腺滤泡上皮细胞结构较为完整, 胶质含量减少, 且甲状腺淋巴细胞浸润情况均较 MG 组明显缓解, 其中 BG-2 组相较于于

BG-3 组、BG-1 组甲状腺组织淋巴细胞浸润面积均明显降低。见插页 XIII 图 2。

3.3 各组小鼠空间学习记忆能力 与 CG 组相比, MG 组小鼠逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.01$), 穿越平台次数和目标象限停留时间均显著降低 ($P < 0.01$), 证明 AIT 小鼠空间学习记忆能力减退。与 MG 组相比, 中药各剂量组 (BG-1、BG-2、BG-3 组) 小鼠逃避潜伏期均显著缩短 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 穿越平台次数和目标象限停留时间增加, 其中 BG-2 组增加最为显著 ($P < 0.01$)。见插页 XIII 图 3。

3.4 各组小鼠海马神经元超微结构 CG 组小鼠海马组织神经元超微结构良好, 线粒体结构清晰且完整, 基质密度均匀, 胞膜连续完整, 粗面内质网结构完整, 细胞质状态清晰, 无明显自噬小体的出现。MG 组小鼠海马组织神经元结构受损, 线粒体数目减少, 基质有空泡, 出现许多双层膜的液泡状结构, 内含胞浆成分的自噬小体。与 MG 组相比, 中药各剂量组 (BG-1、BG-2、BG-3 组) 小鼠海马神经元细胞形态结构恢复, 线粒体数量增多, 基质丰富, 自噬小体减少。见插页 XIII 图 4。

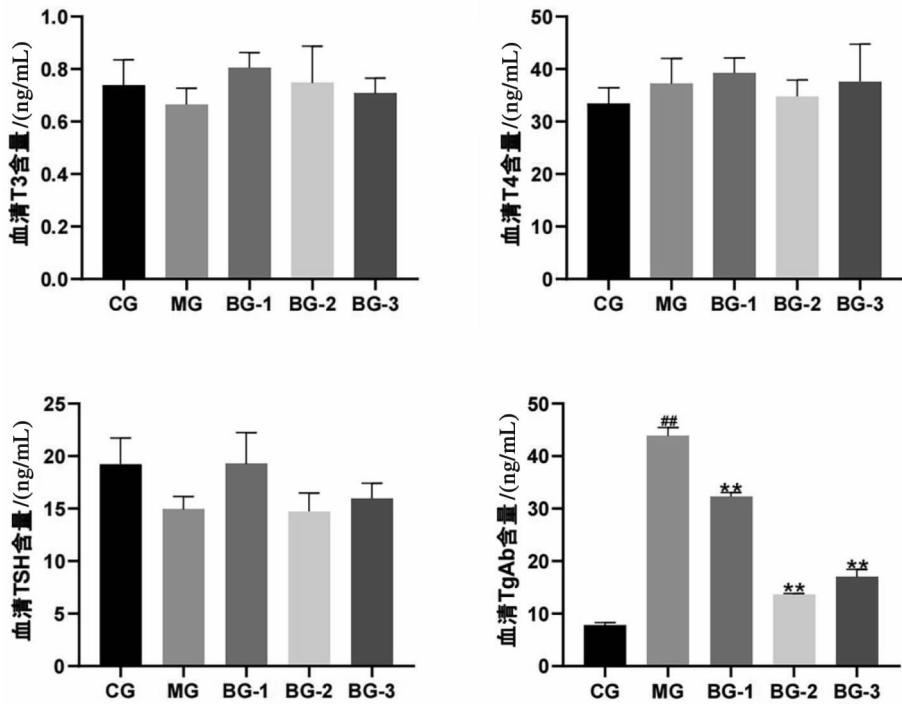
3.5 各组小鼠海马 LC3 蛋白阳性表达情况 与 CG 组相比, MG 组小鼠海马 CA1 区 LC3 平均荧光强度增加 ($P < 0.01$)。与 MG 组比较, 中药各剂量组 (BG-1、BG-2、BG-3 组) 小鼠海马 CA1 区 LC3 平均荧光强度均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见插页 XXV 图 5。

3.6 各组小鼠海马组织 Beclin1、LC3、P62 蛋白表达水平 与 CG 组相比, MG 组小鼠海马组织 Beclin1、LC3 蛋白表达水平增高, P62 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$)。与 MG 组比较, 中药各剂量组 (BG-1、BG-2、BG-3 组) 小鼠海马组织 Beclin1、LC3 蛋白表达水平降低, P62 蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 6。

3.7 各组小鼠海马组织 PHLPP1/AKT/FOXO3a 信号通路相关蛋白表达水平 与 CG 组相比, MG 组小鼠海马组织 PHLPP1、FOXO3a 蛋白表达水平增高, p-AKT/AKT、p-FOXO3a/FOXO3a 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$)。与 MG 组比较, 中药各剂量组 (BG-1、BG-2、BG-3 组) 小鼠海马组织 PHLPP1、FOXO3a 蛋白表达水平均降低, p-AKT/AKT、p-FOXO3a/FOXO3a 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中仅 BG-1 组在 PHLPP1 蛋白表达及 BG-1、BG-3 组在 p-AKT/AKT 蛋白表达水平上与 MG 组差异无统计学意义 ($P = 0.8$)。见图 7。

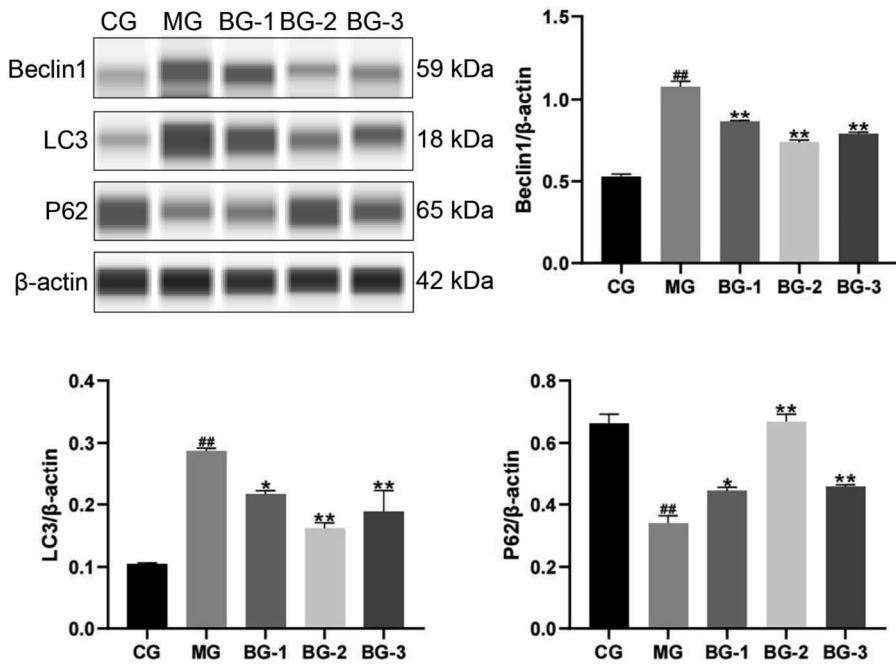
3.8 各组小鼠海马组织 miR-190b-5p、PHLPP1 mRNA 表达 与 CG 组相比, MG 组小鼠海马组织 miR-190b-5p 水平降低, PHLPP1 mRNA 水平增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与 MG 组比较, 中药各剂量组 (BG-1、BG-2、BG-3 组) 小鼠海马组织 miR-190b-5p 水平升高, PHLPP1 mRNA 水平显著降低, 其中以 BG-2 组改变更为显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 8。

3.9 miR-190b-5p 与 PHLPP1 靶向关系的预测与验证 使用 TargetScan 数据库进行预测得到的 miR-190b-5p 和 PHLPP1 之间的结合位点见图 9。采用双荧光素酶报告实验对两者预测的靶向关系进行验证。与 PHLPP1-WT 共转染后, miR-190b-5p mimic 组双荧光素酶活性较 miR-NC 组显著降低 ($P < 0.01$); 与 PHLPP1-MT 共转染后, miR-190b-5p



注:##与CG组比较, $P < 0.01$; * *与MG组比较, $P < 0.01$ 。

图1 各组小鼠甲状腺功能及抗体水平($n=6, \bar{x} \pm s$)



注:##与CG组比较, $P < 0.01$; *与MG组比较, $P < 0.05$; * *与MG组比较, $P < 0.01$ 。

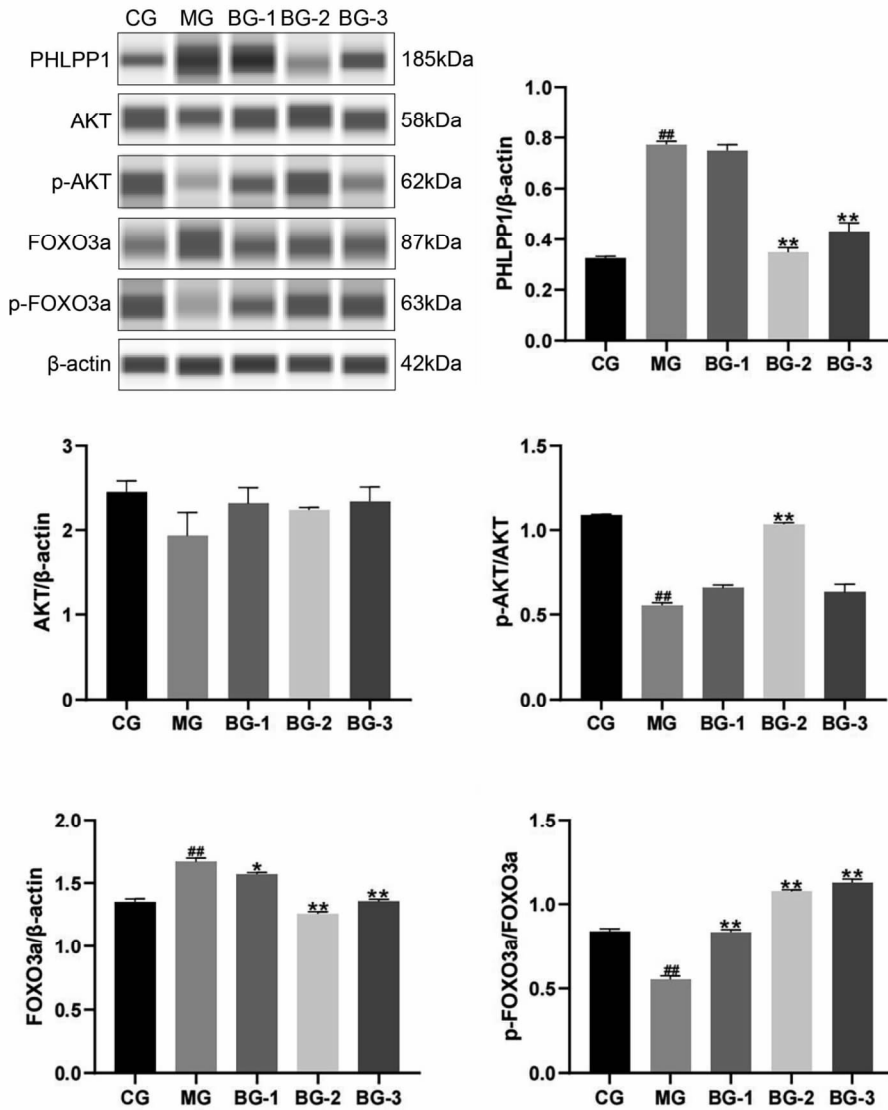
图6 各组小鼠海马组织 Beclin1、LC3、P62 蛋白表达水平

mimic 组与 miR - NC 组双荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P = 0.99$)。表明 miR - 190b - 5p 和 PHLPP1 具备靶向调节的关系。见图 10。

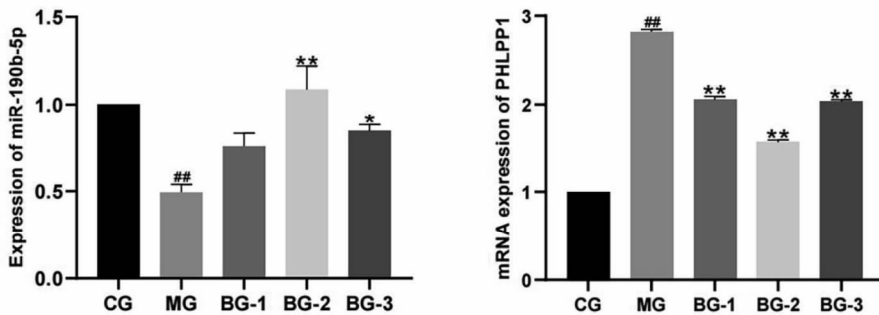
4 讨论

AIT 致认知损伤归属中医“癭病”合并“善忘”“健忘”范畴。《灵枢·本神》云“脾藏营,营舍意”,脾气健运则精微化生有源,清气上行,髓海充盈,人体思维活动敏捷、记而不忘,认知功能正常^[17]。AIT 机体脾气亏虚,水谷精微匮乏,升清无力,

脑髓失养,加之痰瘀内生,闭阻脑窍,则“脾失藏意”,认知损伤。补中益气汤是“补中益气,健运中焦”之经典方,该方以黄芪为君,人参、炙甘草、白术为臣,旨在健运中焦元气,以资气血化生之源;佐以升麻、柴胡升提下陷之中气,陈皮理气和胃,当归养血合营,全方共奏助脾藏营、和营舍意之功。课题组前期对补中益气汤治疗 AIT 的疗效及机制进行了广泛深入研究^[18-20],本研究再次证明了补中益气汤可减轻 AIT 小鼠甲状腺淋巴细胞浸润,降低血清 TgAb 水平,并且表明该方亦可有



注:##与CG组比较, $P < 0.01$; *与MG组比较, $P < 0.05$; **与MG组比较, $P < 0.01$ 。
图7 各组小鼠海马组织 PHLPP1/AKT/FOXO3a 信号通路相关蛋白表达水平($n = 3, \bar{x} \pm s$)



注:##与CG组比较, $P < 0.01$; *与MG组比较, $P < 0.05$; **与MG组比较, $P < 0.01$ 。
图8 各组小鼠海马组织 miR-190b-5p, PHLPP1 mRNA 表达水平($n = 3, \bar{x} \pm s$)

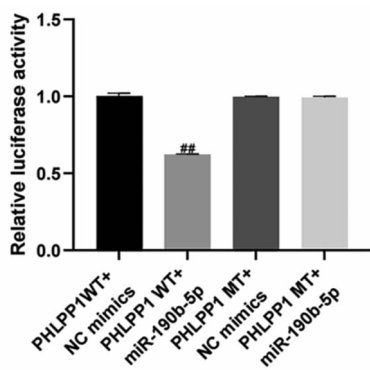
PHLPP1 3'UTR(230-237): 5'...UAACUUCUUUCCUAACAUAUCA...3'
miR-190b-5p: UUGGUUAUAGUUUGUAUAGU

图9 miR-190b-5p 和 PHLPP1 的预测结合位点

效改善 AIT 小鼠的空间学习和记忆功能。

细胞自噬是指细胞在自噬相关基因的调控下,利用溶酶体降解自身细胞质蛋白及其受损细胞器的过程^[21]。细胞自噬是

一把“双刃剑”,生理状态下的基础自噬对维持细胞内稳态及细胞产物的合成、降解及循环利用等具有重要作用;病理状态下的异常自噬可导致代谢应激,细胞成分过度降解甚至细胞死亡等。自噬过程受多种自噬相关蛋白(如 Beclin1、LC3、P62 等)的调节和控制,自噬小体的形成是判断自噬发生的“金标准”^[22-23]。本研究表明 AIT 小鼠海马神经元细胞超微结构损



注:##与 PHLPP1 WT + NC mimics 组比较, $P < 0.01$ 。

图10 双荧光素酶报告实验检测 miR-190b-5p 和

PHLPP1 相互作用

伤且存在神经元异常自噬,海马组织 Beclin1、LC3 蛋白表达水平增高,P62 蛋白表达水平降低;经补中益气汤治疗后神经元自噬程度减轻,神经元结构恢复,海马组织 Beclin1、LC3 蛋白表达水平降低,P62 蛋白表达水平升高,提示补中益气汤可能通过改善海马神经元自噬治疗 AIT 认知损伤。

PHLPP1 是一种可以特异性地将磷酸化激活的 AKT 脱磷酸化而失去蛋白激酶活性的新型蛋白磷酸酶^[24]。目前研究发现 PHLPP1 信号传导在调节多种神经生理作用中至关重要,包括神经元活性、神经保护、神经元凋亡、记忆形成和长期记忆的巩固等,同时也在阿尔茨海默病、癫痫、帕金森病和其他神经退行性疾病中发挥重要作用^[25-29]。CHEN 等证实 PHLPP1 的缺失可以增强神经元中 AKT 的激活,并显著提高缺血损伤后神经元细胞存活率,抑制 PHLPP1 可能是一种保护大脑免受缺血性损伤的治疗方法^[30]。LIU 等表明 PHLPP1 过度表达会损害海马神经元突触可塑性和海马依赖性学习^[31]。FOXO3a 作为转录调节因子在调节细胞自噬中具有重要的作用,FOXO3a 的磷酸化水平是影响其介导自噬基因转录的重要因素,而 AKT 是 FOXO3a 的上游磷酸化激酶,可调控其关键残基 Ser253 的磷酸化水平来阻止 FOXO3a 进入细胞核发挥调控效应^[32]。miR-190b 与人类多种中枢神经系统疾病存在诸多关联,其表达上调可减轻神经元损伤,抑制神经炎症,减少神经元凋亡,改善认知^[33-35]。miR-190b 可以特异性结合 PHLPP1 mRNA 的 3'-UTG 位点,使 AKT 的脱磷酸化作用减弱,FOXO3a 磷酸化增加,进而导致其不能进入细胞核,引发 FOXO3a 介导的自噬效应蛋白 Beclin1 的水平降低,自噬水平降低。本研究发现补中益气汤治疗可使 AIT 小鼠海马组织 PHLPP1、FOXO3a 蛋白表达水平降低,p-AKT/AKT、p-FOXO3a/FOXO3a 蛋白表达水平升高,miR-190b-5p 表达上调,并且双荧光素酶报告实验证实 miR-190b-5p 可靶向调控 PHLPP1 基因,表明补中益气汤可能通过调节 miR-190b 靶向 PHLPP1/AKT/FOXO3a 信号通路,从而改善 AIT 小鼠海马神经元异常自噬。

综上所述,补中益气汤可能通过调控 miR-190b/PHLPP1/AKT/FOXO3a 信号通路改善 AIT 小鼠海马神经元异常自噬,从而减轻海马神经元损伤,可能是补中益气汤治疗 AIT 致认知损伤的潜在机制之一。本研究从新的视角丰富了“脾藏意”的理论内涵,为中医“从脾论治”AIT 相关认知损伤提供了新的治疗策略与实验依据,但本病发病机制复杂,未来仍需进一步探索。

参考文献

- [1] LI Y, TENG D, BA J, et al. Efficacy and safety of long-term universal salt iodization on thyroid disorders: epidemiological evidence from 31 provinces of mainland China [J]. *Thyroid*, 2020, 30(4): 568-579.
- [2] BRAIN L, JELLINEK E H, BALL K. Hashimoto's disease and encephalopathy [J]. *Lancet*, 1966, 2(7462): 512-514.
- [3] LEYHE T, MÜSSIG K, WEINERT C, et al. Increased occurrence of weaknesses in attention testing in patients with Hashimoto's thyroiditis compared to patients with other thyroid illnesses [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2008, 33(10): 1432-1436.
- [4] DJUROVIC M, PEREIRA A M, SMIT J W A, et al. Cognitive functioning and quality of life in patients with Hashimoto thyroiditis on long-term levothyroxine replacement [J]. *Endocrine*, 2018, 62(1): 136-143.
- [5] WALISZEWSKA-PROSÓŁ M, EJMA M. Hashimoto encephalopathy - still more questions than answers [J]. *Cells*, 2022, 11(18): 2873.
- [6] SHIROTANI K, WATANABE K, HATTA D, et al. Alterations of ATG4A and LC3B in neurons derived from Alzheimer's disease patients [J]. *Genes Cells*, 2023, 28(4): 319-325.
- [7] LIZAMA B N, CHU C T. Neuronal autophagy and mitophagy in Parkinson's disease [J]. *Mol Aspects Med*, 2021, 82: 100972.
- [8] HU Y, XU J, WANG J, et al. DPP-4 inhibitors suppress tau phosphorylation and promote neuron autophagy through the AMPK/mTOR pathway to ameliorate cognitive dysfunction in diabetic mellitus [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2023, 14(18): 3335-3346.
- [9] LIU B, TANG J, ZHANG J, et al. Autophagy activation aggravates neuronal injury in the hippocampus of vascular dementia rats [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(13): 1288-1296.
- [10] 申晴. 益气化痰活血方对甲功正常 AIT 致轻度认知功能损伤患者的疗效观察 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2023.
- [11] 陈巍, 马贤德, 武跃华, 等. 基于 microRNA132/212 调控 BDNF/Trkb-ERK1/2 信号通路探讨补中益气汤+二陈汤对 SCH 大鼠记忆能力的影响机制 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(12): 102-105, 281.
- [12] 陈雪莹, 高天舒. 补中益气汤对自身免疫性甲状腺炎模型小鼠海马微血管结构及 Th17/Treg 轴相关细胞因子水平的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2024, 35(1): 25-29.
- [13] WANG F, CAI Y J, MA X, et al. Synaptic loss in a mouse model of euthyroid Hashimoto's thyroiditis: possible involvement of the microglia [J]. *BMC Neurosci*, 2022, 23(1): 25.
- [14] WANG N, SUN Y, YANG H, et al. Hashimoto's thyroiditis induces hippocampus-dependent cognitive alterations by impairing astrocytes in euthyroid mice [J]. *Thyroid*, 2021, 31(3): 482-493.
- [15] CAI Y J, WANG F, CHEN Z X, et al. Hashimoto's thyroiditis induces neuroinflammation and emotional alterations in euthyroid mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 299.
- [16] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算 [J]. *江西医学院学报*, 1997(4): 41.
- [17] 杨丽, 王彩霞. 《黄帝内经》脾藏意主思的研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(9): 1152-1154.
- [18] 刘晓琳, 段志园, 高天舒. 益气化痰活血方治疗甲功正常自身免疫性甲状腺炎临床疗效观察 [J]. *辽宁医学杂志*, 2021, 35(2): 61-63.
- [19] 杨潇, 王智民, 曹慧敏, 等. 基于 miR-155/SOCS1/STAT3 轴探讨补中益气汤含药血清对 AIT 小鼠 Th17 细胞分化影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(12): 153-157.
- [20] 杨潇, 宋国, 曹慧敏, 等. 基于 miR-125a-3p/IL-23R/Th17 轴探讨补中益气汤含药血清对 AIT 小鼠作用的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(12): 2865-2868.

基于气味的不同等级天麻辨状论质机制及其定性识别模型构建

张昊娟¹,周成惠²,虞小静¹,王嘉唯¹,吴志强¹,姚秉韬¹,裴志东¹,张慧¹

(1. 辽宁中医药大学药学院,辽宁 大连 116600;2. 阿克苏地区药品检验所,新疆 阿克苏 842008)

摘要:目的 以气味为研究对象,揭示天麻“气浓者为佳”的辨状论质标准的科学内涵。方法 采用高效液相色谱法与福林酚比色法分别测定53批天麻中9个单体成分及多酚的含量,并借助电子鼻技术定量样品气味值,采用双变量相关法分析二者之间的相关性。以气味的量化特征值为指标,采用化学计量学方法,建立不同等级天麻基于气的品质评价定性识别模型。结果 天麻素、原儿茶酸、对羟基苯甲醛、香兰素、巴利森昔B、多酚均与天麻气味呈正相关,不同等级的天麻能够用PCA和DFA模型区分开。结论 天麻的“气”越浓,则含有的上述药效成分的含量越高,从而揭示了天麻“气浓者为佳”的辨状论质机制,建立了基于气味客观量化识别不同等级天麻的定性模型,为天麻药材的质量评价奠定基础。

关键词:天麻;辨状论质;电子鼻;气味

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1673-7717(2025)12-0067-07

Qualitative Identification Mechanism of Different Grades of Tianma (Gastrodiae Rhizoma) Based on Odor and Construction of Its Qualitative Identification Model

ZHANG Haojuan¹, ZHOU Chenghui², YU Xiaojing¹, WANG Jiawei¹, WU Zhiqiang¹, YAO Bingtao¹, PEI Zhidong¹, ZHANG Hui¹

(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, Liaoning, China;

2. Aksu Drug Inspection Institute, Aksu 842008, Xinjiang, China)

基金项目:国家自然科学基金项目(82173935);辽宁省教育厅面上项目(LJKZ0893, LJKMZ20221312);辽宁省教育厅重点攻关项目(JYTZD2023198)

作者简介:张昊娟(1999-),女,山西孝义人,硕士,研究方向:中药质量评价与创新药物。

通讯作者:张慧(1970-),女,吉林通化人,教授,博士,研究方向:中药质量评价和创新药物。E-mail: syyyycs@163.com。

裴志东(1970-),男,辽宁沈阳人,副教授,硕士,研究方向:中药质量、药事管理。E-mail: pzd87586078@163.com。

- [21] MIZUSHIMA N, LEVINE B, CUERVO A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451(7182):1069-1075.
- [22] ARIOS A R, LAHIRI V, LEI Y, et al. A perspective on the role of autophagy in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(12):166262.
- [23] ESKELINEN E L, REGGIORI F, BABA M, et al. Seeing is believing; the impact of electron microscopy on autophagy research [J]. *Autophagy*, 2011, 7(9):935-956.
- [24] BAFFI T R, COHEN-KATSENELSON K, NEWTON A C. PHLPPing the script: emerging roles of PHLPP phosphatases in cell signaling [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2021, 61:723-743.
- [25] MALLICK A, SHARMA M, DEY C S. Emerging roles of PHLPP phosphatases in the nervous system [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2022, 123:103789.
- [26] BOONYING W, JOSELIN A, HUANG E, et al. Pink1 regulates FKBP5 interaction with AKT/PHLPP and protects neurons from neurotoxin stress induced by MPP [J]. *J Neurochem*, 2019, 150(3):312-329.
- [27] SHIMIZU K, PHAN T, MANSUY I M, et al. Proteolytic degradation of SCOP in the hippocampus contributes to activation of MAP kinase and memory [J]. *Cell*, 2007, 128(6):1219-1229.
- [28] SHIMIZU K, MACKENZIE S M, STORM D R. SCOP/PHLPP and its functional role in the brain [J]. *Mol Biosyst*, 2010, 6(1):38-43.
- [29] WEI X E, ZHANG F Y, WANG K, et al. Assembly of the FKBP51- PHLPP2 - AKT signaling complex in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Brain Res*, 2014, 1566:60-68.
- [30] CHEN B, VAN WINKLE J A, LYDEN P D, et al. PHLPP1 gene deletion protects the brain from ischemic injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33(2):196-204.
- [31] LIU Y, SUN J, WANG Y, et al. Deleting both PHLPP1 and CANP1 rescues impairments in long-term potentiation and learning in both single knockout mice [J]. *Learn Mem*, 2016, 23(8):399-404.
- [32] 黄坚毅, 王进, 黄燕宁, 等. FOXO3 相关信号途径影响细胞自噬的研究进展 [J]. *医学综述*, 2019, 25(7):1249-1254.
- [33] SUN Q, WANG S, CHEN J, et al. MicroRNA-190 alleviates neuronal damage and inhibits neuroinflammation via Nlrp3 in MPTP-induced Parkinson's disease mouse model [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12):23379-23387.
- [34] JIANG C, DONG N, FENG J, et al. MiRNA-190 exerts neuroprotective effects against ischemic stroke through Rho/Rho-kinase pathway [J]. *Pflugers Arch*, 2021, 473(1):121-130.
- [35] SHAN L, MA D, ZHANG C, et al. miRNAs may regulate GABAergic transmission associated genes in aged rats with anesthetics-induced recognition and working memory dysfunction [J]. *Brain Res*, 2017, 1670:191-200.

基于 miR - 190b/PHLPP1/AKT/FOXO3a 通路探究补中益气汤对自身免疫性甲状腺炎模型小鼠海马神经元异常自噬的影响

(正文见 60 - 67 页)

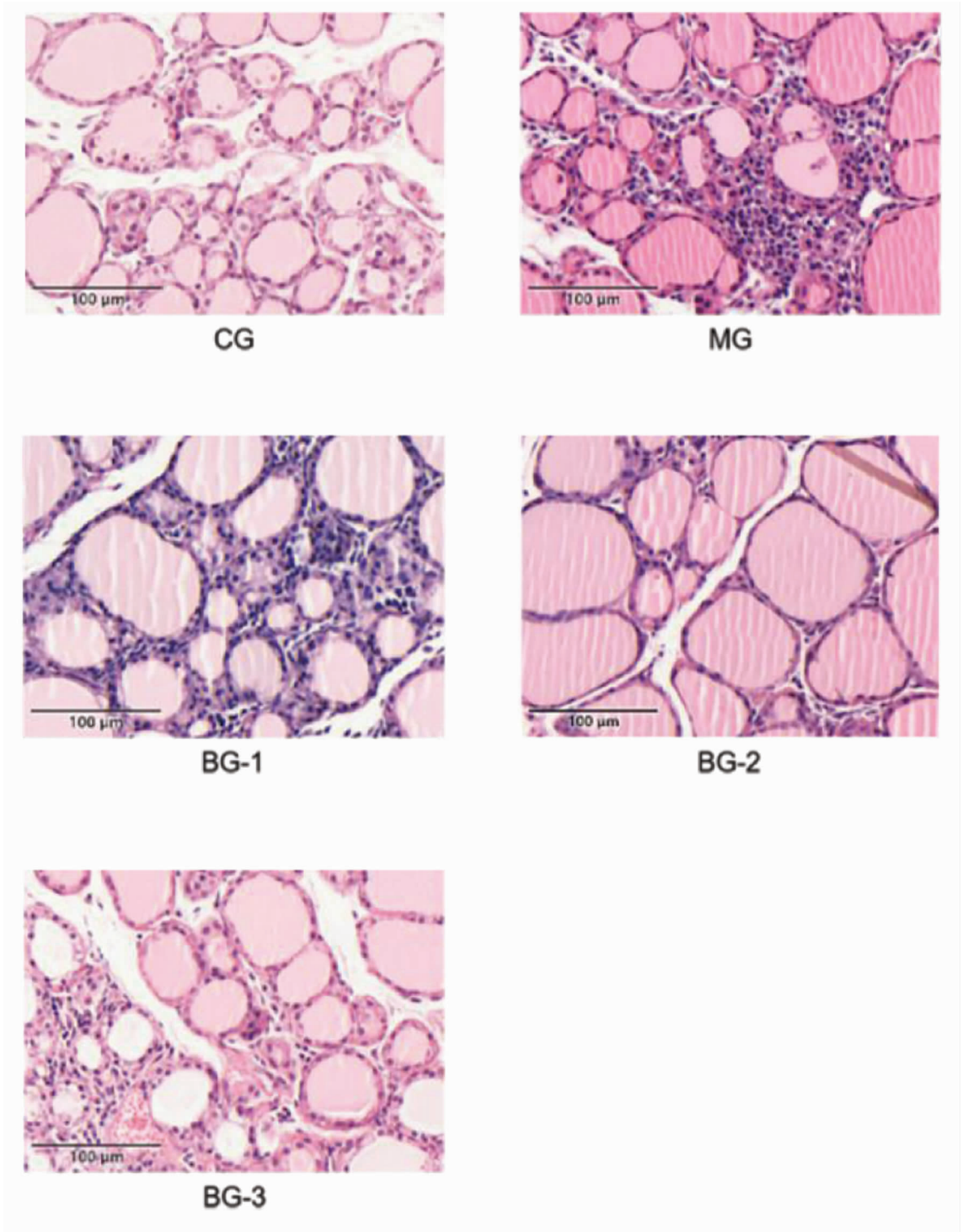
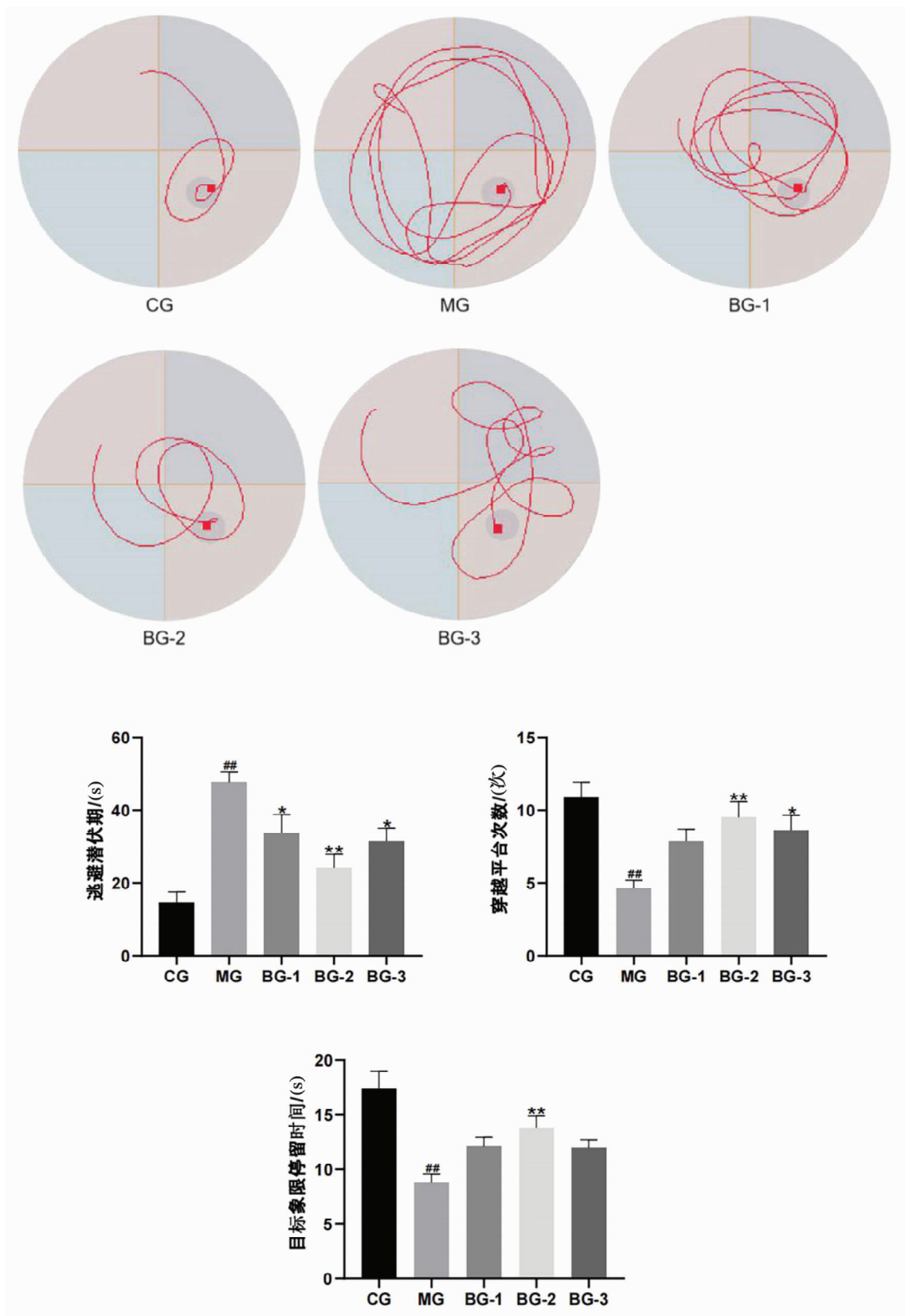


图2 各组小鼠甲状腺组织形态(HE, ×400)



注:##与CG组比较, $P < 0.01$; *与MG组比较, $P < 0.05$; **与MG组比较, $P < 0.01$ 。

图3 各组小鼠 Morris 水迷宫实验结果($n = 8, \bar{x} \pm s$)

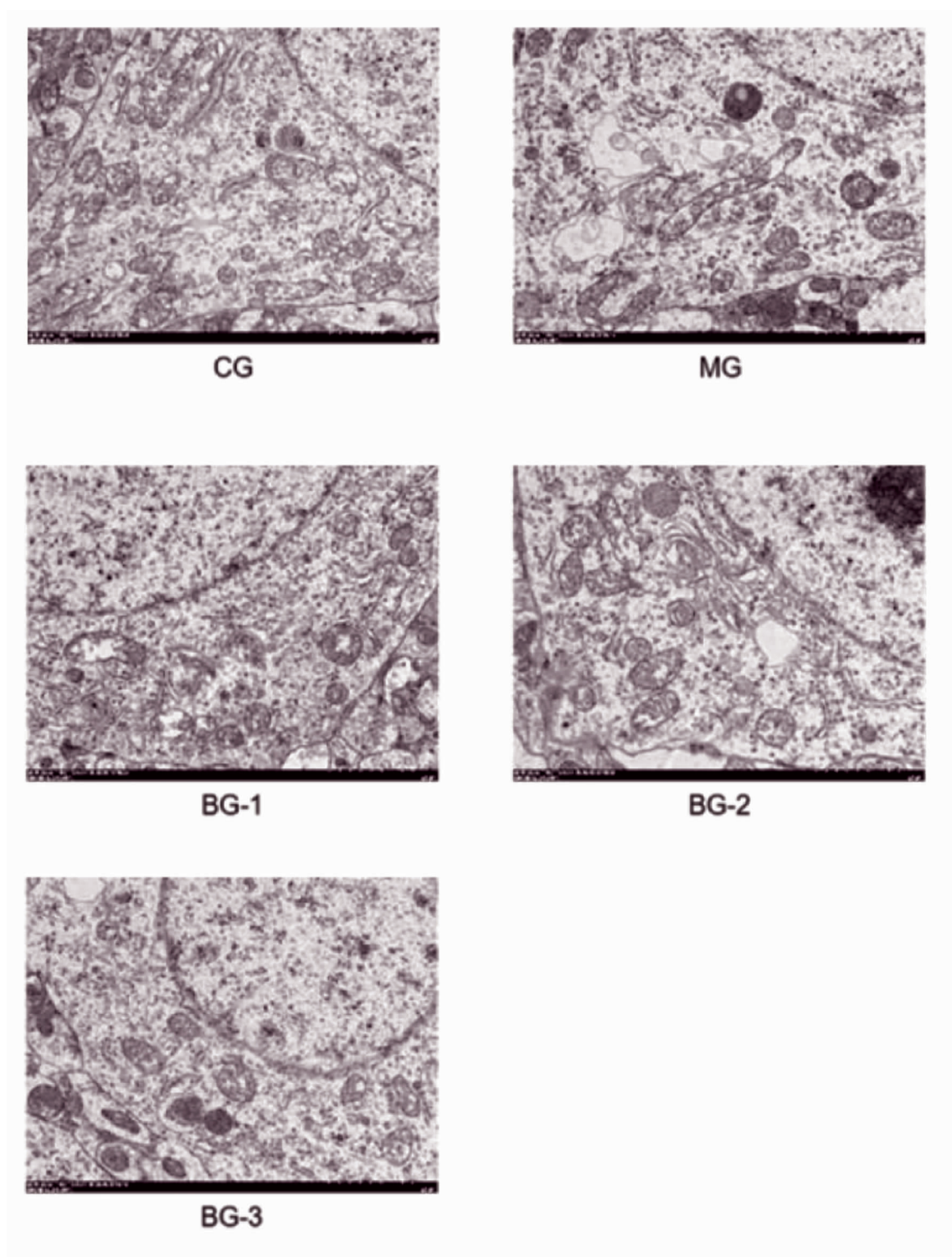
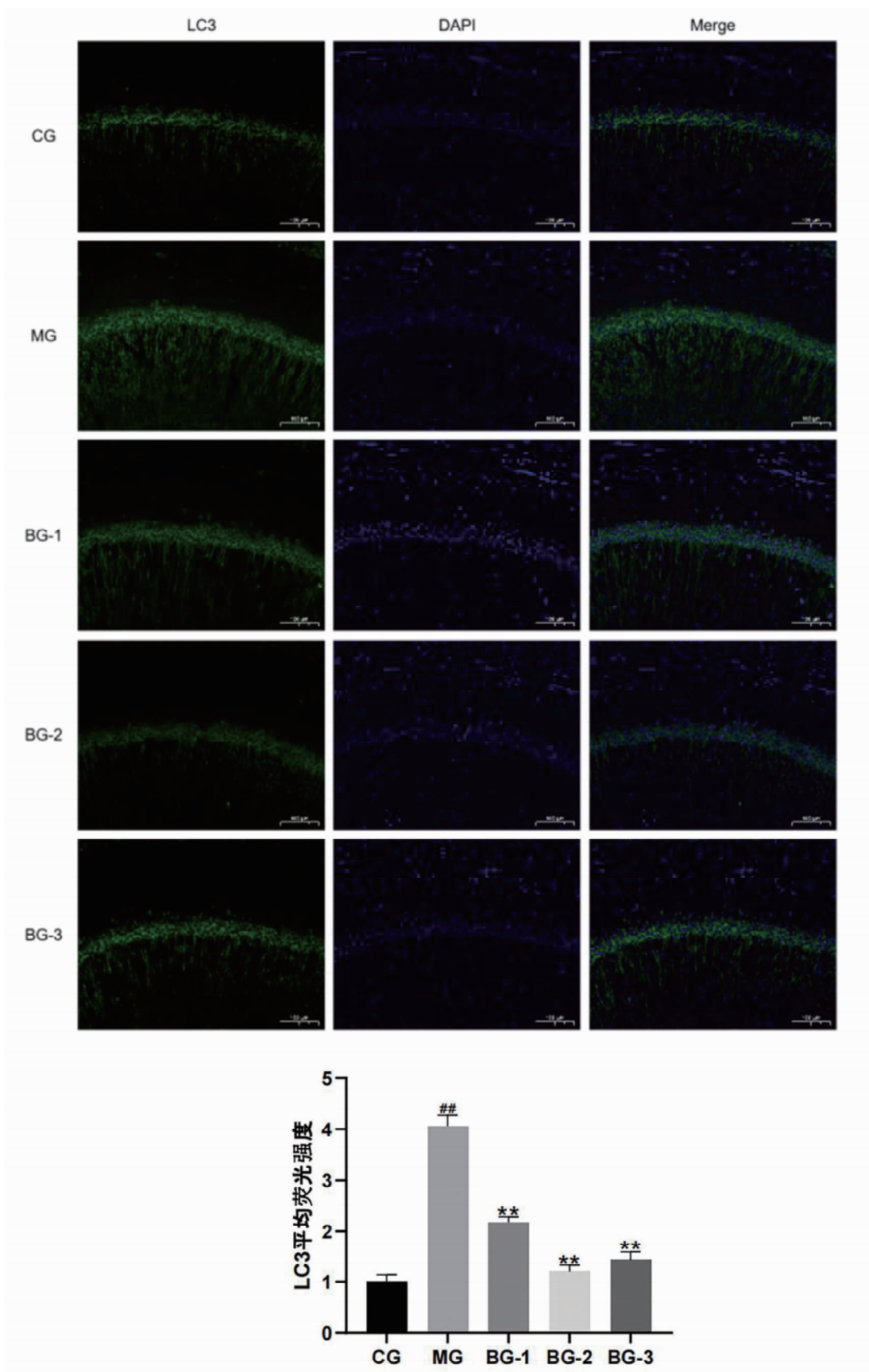


图4 各组小鼠海马CA1区神经元超微结构(透射电镜, ×8000)



注:##与CG组比较, $P < 0.01$; *与MG组比较, $P < 0.01$ 。
图5 各组小鼠海马CA1区LC3平均荧光强度($n = 3, \bar{x} \pm s$)