



在线全文

肝豆补肾汤通过SIRT3/FOXO3 α 通路调节褪黑素合成 改善Wilson病模型TX小鼠认知障碍*

王路瑶¹, 吴丽敏², 王婷婷¹, 房新如¹, 蒋真真¹, 岳怡珂¹, 赵丹¹, 刘千琢¹, 韩辉^{1 Δ}

1. 安徽中医药大学第一附属医院(合肥 230031); 2. 中国科学技术大学附属第一医院(合肥 230001)

【摘要】目的 褪黑素已被证明具有神经保护作用,本研究旨在观察铜沉积对Wilson病(Wilson disease, WD)模型TX小鼠认知功能的影响,以及肝豆补肾汤(Gandou Bushen Decoction, GDBSD)对Wilson病模型TX小鼠褪黑素合成及松果体功能的影响及作用机制。**方法** 30只纯合TX小鼠随机分为3组,每组10只:WD组、GDBSD组、二巯丁二酸(dimercaptosuccinic acid, DMSA)组。取10只DL小鼠作为正常对照组(NC组)。使用HE染色、ELISA、流式细胞术和蛋白质印迹等方法检测松果体组织结构和铜含量、氧化应激和细胞凋亡相关标志物、血清褪黑素含量的变化。**结果** 与NC组相比,WD组小鼠学习认知能力下降($P < 0.05$),松果体组织结构受损,松果体组织中铜含量、活性氧占比和线粒体损伤率升高($P < 0.01$),褪黑素和氧化应激相关标志物水平改变($P < 0.05$),促凋亡蛋白Bax、Caspase-3的表达水平上升,抗凋亡蛋白Bcl-2表达减少($P < 0.01$)。使用肝豆补肾汤及DMSA后,SIRT3/FOXO3 α 信号通路被激活,松果体组织铜含量下降,氧化应激、细胞凋亡等损伤情况被改善,学习记忆能力好转($P < 0.05$)。**结论** 肝豆补肾汤可通过抑制松果体氧化应激和细胞凋亡减轻Wilson病铜沉积引起的小鼠认知障碍,其分子机制与调节SIRT3/FOXO3 α 信号通路有关。

【关键词】 Wilson病 认知障碍 肝豆补肾汤 褪黑素 松果体

Gandou Bushen Decoction Ameliorates Cognitive Impairment in Wilson Disease Model TX Mice by Regulating Melatonin Synthesis via the SIRT3/FOXO3 α Pathway WANG Luyao¹, WU Limin², WANG Tingting¹, FANG Xinru¹, JIANG Zhenzhen¹, YUE Yike¹, ZHAO Dan¹, LIU Qianzhuo¹, HAN Hui^{1 Δ} . 1. The First Affiliated Hospital, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 2. The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001, China

Δ Corresponding author, E-mail: hanhuidocor2022@163.com

[Abstract] Objective Melatonin has been shown to have neuroprotective effects. This study is aimed at observing the effects of copper deposition on cognitive function in a toxic milk (TX) mouse model of Wilson disease (WD), and investigating the effects and mechanisms of action of Gandou Bushen Decoction (GDBSD) on melatonin synthesis and pineal function in the WD model mice. **Methods** A total of 30 homozygous TX mice were randomly assigned to 3 groups ($n = 10$ in each group), including a WD group, a GDBSD group, and a dimercaptosuccinic acid (DMSA) group. A total of 10 DL mice were included in the normal control (NC) group. The structure and copper content of pineal gland tissues, oxidative stress and apoptosis-related markers, and serum melatonin levels were evaluated using hematoxylin-eosin (HE) staining, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), flow cytometry, and Western blot. **Results** Compared with the NC group, the WD group exhibited decreased learning and cognitive abilities ($P < 0.05$), damaged pineal gland structure, increased copper content, reactive oxygen species (ROS) levels, and mitochondrial damage rate in the pineal gland ($P < 0.01$), altered levels of melatonin and oxidative stress-related markers ($P < 0.05$), upregulated expression levels of pro-apoptotic proteins Bax and Caspase-3, and decreased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 ($P < 0.01$). After treatment with GDBSD and DMSA, the SIRT3/FOXO3 α signaling pathway was activated, the copper content in the pineal gland was reduced, and oxidative stress and apoptosis-related damages were improved, leading to an improvement in learning and memory abilities ($P < 0.05$). **Conclusion** GDBSD can alleviate cognitive impairments in WD mice caused by pineal gland copper deposition by inhibiting oxidative stress and apoptosis in the pineal gland. The underlying molecular mechanism is associated with the regulation of the SIRT3/FOXO3 α signaling pathway.

[Key words] Wilson disease Cognitive impairment Gandou Bushen Decoction Melatonin Pineal gland

* 国家自然科学基金(No. 82374212、No. 81971446、No. 81673811)、安徽省科技厅临床专项转化项目(No. 202204295107020044)和安徽省教育厅重点项目(No. 2022AH050523)资助

Δ 通信作者, E-mail: hanhuidocor2022@163.com

出版日期: 2025-01-20

Wilson病(Wilson disease, WD), 又名肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration, HLD), 是由基因ATP7B突变导致的常染色体隐性遗传的铜代谢障碍性疾病^[1]。铜沉积可直接影响中枢神经系统, 主要累及双侧基底节、丘脑和脑干等, 而铜性肝损害还可导致脑结构的形态和生理改变^[2-3]。认知功能障碍是WD的常见神经系统表现。大量研究显示, 铜沉积会对认知功能造成损伤^[4], 可能的机制包括诱导线粒体功能障碍、细胞凋亡、神经炎症、自噬及铁死亡等等^[5-7]。然而, 目前关于WD伴认知障碍的发生机制的研究还远远不够。

松果体是一个重要的神经内分泌器官, 通过释放褪黑素, 对生殖、内分泌系统以及生物节律都表现出明显的调节作用^[8-9]。松果体的主要作用是响应来自视交叉上核的神经输入, 以高度昼夜节律的方式产生褪黑素(melatonin, MT), 传播昼夜节律的信息, 从而将外部世界与身体的生化和生理内部需求相结合^[10]。研究证实, 在多种神经疾病中存在着松果体体积及褪黑素浓度的下降^[11-13]。褪黑素除了具有镇静催眠、抑制性腺、调整生物钟等功能之外, 还有强大的抗氧化及清除自由基的能力, 可保护线粒体及膜脂质免受氧化损伤, 维持神经胶质细胞功能等^[14]。研究证实, 铜诱导的神经元线粒体功能障碍是引起认知障碍的关键因素之一^[15]。铜沉积会影响松果体吲哚胺的合成, 而褪黑素可以阻止铜对N-乙酰基转移酶的抑制作用^[16]。然而, 关于褪黑素在Wilson病伴认知功能障碍中的具体作用目前尚不明确。

《黄帝内经》中有言: “肾主骨, 生髓, 通于脑”。这揭示了肾在人体生命活动中的核心地位, 其与精、气、血、阴、阳等生命要素紧密相连。若肾精亏虚, 髓海亦显不足, 进而导致元神失养, 健忘症状频发。WD患者存在认知功能损害, 作为我院自主研发的院内制剂, 肝豆灵片已明确显示出在改善WD患者临床症状方面的显著疗效^[17-19]。肝豆补肾汤(Gandou Bushen Decoction, GDBSD)是在祛痰化瘀之肝豆灵的基础上, 加用滋补肾脏的药物, 意在培补肾元, 使肾精充沛, 从而滋养全身脏腑, 气血运行有力, 津液输布顺畅, 化痰祛瘀, 清窍通络, 使邪去正安。现代研究也证实, 杜仲、菟丝子、熟地黄、淫羊藿及枸杞子对认知功能障碍具有一定的改善作用^[20-24]。我院前期研究表明, 湿热内蕴证仅为WD部分病程阶段的证候特征, 而痰瘀互结证则贯穿WD的整个病程^[25]。目前, 临床上常用铜络合剂促进尿液中铜的排泄, 而锌盐可降低肠道铜的吸收^[26]。中药对肝豆状核变性有较好的疗效, 而且其副作用小, 可以长期使用^[27]。本研究结合松果体其生理特性及“肾生髓通脑”理论, 通过动物实验探讨肝豆补肾汤

在WD伴认知功能障碍的作用及机制, 对体内褪黑素稳态在疾病治疗中的作用进行深入探究, 为中医药防治WD伴认知功能障碍提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

30只C3He-ATP7b^{lox}小鼠购自美国Jackson实验公司, 体质量(19 $\pm$ 5) g, 10只DL同系对照小鼠为正常对照组。实验过程在保证动物够用的前提下, 使用较少的动物。各组小鼠使用独立通气鼠笼, 于SPF级实验室中饲养, 动物房温度18~20℃, 湿度50%~60%, 自由采食, 饮水。小鼠喂养至60~90日龄后进行分组及给药。本实验通过合肥综合性国家科学中心大健康研究院实验动物福利与伦理委员会审查(IHM-AP-2024-051), 遵从动物实验3R原则。

1.2 主要实验药品

肝豆补肾汤为安徽中医药大学第一附属医院(安徽省中医院)院内制剂肝豆灵片(皖药制字: Z20050071)加中药颗粒剂熟地黄、当归、益母草、杜仲、枸杞子、菟丝子、淫羊藿组成, 颗粒剂由广东一方制药提供。二巯丁二酸(dimercaptosuccinic acid, DMSA)胶囊: 0.25 g/胶囊, (上海新亚药业有限公司生产, 国药准字: H10940167), 以上药物均购自安徽中医药大学第一附属医院。

1.3 主要试剂与仪器

苏木素染液、伊红染液(ebiogo); 铜离子、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒(中国南京建成生物工程研究院); SIRT3(Sirtuin-3)抗体(Bioss), FOXO3 α (Forkhead box O3 α)抗体、Bax(Bcl2-associated X)抗体、Caspase-3(Cysteine aspartate specific protease-3)抗体(Abcam); Bcl-2(B-cell lymphoma-2)、SOD2、 β -actin抗体(Zsbio); 小鼠褪黑素(中国武汉基因美科技有限公司); 线粒体膜电位试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。酶标仪(雷杜); 超薄切片机(德国Lerica); 数码相机(德国蒙斯特); 流式细胞仪(贝克曼); 离心机(上海和欣科教设备有限公司)。

1.4 造模、分组及给药

30只TX小鼠随机分为3组(每组10只): WD组、GDBSD组、DMSA组。根据《药理实验方法学》人体与动物的表面积比率换算给药剂量。GDBSD组: 取肝豆灵片15片与颗粒剂熟地黄10 g、当归10 g、益母草10 g、杜仲10 g、枸杞子10 g、菟丝子6 g、淫羊藿6 g共同捣碎, 融于100 mL

温水中溶解稀释, 每只小鼠按1.5 g/(kg·d)剂量灌胃给药, DMSA组: 用100 mL温水溶解3粒DMSA胶囊粉末, 每只小鼠按0.16 g/(kg·d)剂量给药。对照组和WD组每天早晨灌胃同体积的生理盐水, 每只小鼠0.2 mL/(10 g·d), 连续28 d。

于水迷宫实验次日清晨, 通过腹腔注射1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后, 从腹主动脉采集血液, 离心取血清保存于-80 °C的冰箱以备进行ELISA测定。随后取出松果体, 将其快速放入5%戊二醛固定液(4 °C冷却)、制备石蜡切片, 并取部分新鲜松果体组织入流式细胞仪测ROS及JC-1。

1.5 Morris水迷宫实验

于安徽中医药大学新安医学研究中心动物行为研究室进行了Morris水迷宫实验, 主要用于进行小鼠空间记忆、学习等方面的研究。在实验结束前一周做了水迷宫实验。在实验开始的第1天, 放置可视平台, 使其接受记忆训练。第2~6天, 将之前的可视平台置于水下, 以进行逃逸实验。于实验第7天进行平台移除穿越实验, 观察并记录小鼠的游泳轨迹、目标平台逃逸潜伏期以及60 s内跨越目标平台所在象限的次数等。

1.6 HE染色

将新鲜松果体组织固定在体积分数为4%多聚甲醛液中, 固定时间为24~48 h, 之后取出并进行流水冲洗; 进行两次梯度乙醇脱水, 随后二甲苯透明化处理两次, 各处理30 min、15 min; 石蜡包埋; 制厚度为4 μm的连续切片, 并将其与多聚赖氨酸包覆在玻片上干燥备用。石蜡片脱蜡, 梯度乙醇脱水, 苏木素浸片2~5 min, 分化, 碳酸锂溶液中返蓝数秒; 于伊红染液中2 min浸染; 常规脱水、透明、封片; 于显微镜下观察松果体组织形态学变化。

1.7 透射电镜

将1 mm³组织固定到2.5%戊二醛中6~12 h, 随后用PBS进行冲洗。置于1%锇酸中固定1~2 h; 进行梯度乙醇脱水处理, 分别在环氧丙烷和环氧丙烷: 环氧树脂(1:1)的溶液中浸泡30 min和1.5 h, 然后将样本包埋在纯环氧树脂中, 分别放入45 °C和72 °C的烤箱中烘烤12 h和24 h。随后取出包埋块进行修剪, 进行超薄切片(片厚70 nm); 双染、冲洗; 使用透射电镜观察和拍摄图像。观察松果体中线粒体、粗面内质网等细胞器的结构、形态。

1.8 络合比色法检测小鼠松果体内铜含量

根据铜离子检测试剂盒说明书, 将双蒸水、标准品和组织上清液加入到96孔板中。用全自动酶标仪, 设置主波长600 nm, 辅助波长700 nm, 检测吸光值。

1.9 ELISA检测血清褪黑素含量

褪黑素浓度按150、100、50、25、12.5 pg/mL加样; 加

酶, 除空白孔外每孔50 μL; 温育, 37 °C、30 min; 配液, 用于后续洗涤; 显色, 显色剂AB分别各50 μL; 终止测定, 根据标准品浓度曲线计算样品中MT水平。

1.10 氧化指标的测定

根据试剂盒说明书, 使用试剂盒进行检测。使用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度(A值), 通过标准曲线计算样品中MDA、GSH浓度和CAT、SOD、GSH-Px活性。

1.11 松果体组织ROS含量

收集细胞并调整细胞浓度至 $(1 \sim 10) \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 。加入活性氧荧光探针(DCFH-DA, 10 μmol/L), 37 °C孵育20 min, 每隔3~5 min混匀一下, 使探针和细胞充分作用, 并设置不染色的细胞作为阴性细胞对照。用PBS洗细胞两次, 去除未进入细胞内的活性氧荧光探针。上流式细胞检测ROS。

1.12 线粒体跨膜电位

取新鲜松果体组织研磨成细胞混悬液, 离心获得细胞沉淀; 用PBS洗涤两次, 取10~60万细胞, 重悬于0.5 mL培养基中; 用500 μL JC-1染色工作液将细胞重悬, 37 °C下培养箱孵育20 min; 收集细胞, 用JC-1染色缓冲液洗涤、重悬; 使用流式细胞仪分析JC-1阳性/阴性细胞百分率。

1.13 蛋白质印迹分析

取约0.1 g的松果体组织样本, 加入RIPA细胞裂解液600 μL, 用于提取蛋白质; 将收集到的蛋白样本通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶分离; 将分离后的蛋白质转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上进行印迹; 用Western洗涤液漂洗膜5 min, 然后用含有5%脱脂奶粉的Western封闭液在室温下封闭1 h; 参考说明书, 与抗SOD2、Bax、Caspase-3和Bcl-2蛋白的一抗孵育过夜, 然后用洗涤液(PBST)洗涤3次; 按照二抗说明书的指导, 与相应的二抗在室温下孵育1.2 h, 然后用洗涤液(PBST)洗涤3次; 采用ECL发光试剂盒检测蛋白印迹。通过扫描X射线胶片并使用ImageJ软件分析蛋白质水平。

1.14 统计学方法

本研究采用统计软件GraphPad Prism 10.1进行数据分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐则多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用Bonferroni检验。方差不齐时, 采用Dunnetts T3法进行多组间比较。若数据不符合正态分布, 则采用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝豆补肾汤对Wilson病模型TX小鼠认知功能的影响

如表1、图1所示, 在隐藏平台实验中, WD组小鼠的

表 1 各组小鼠逃逸潜伏期时间、穿越目标象限次数、总路程
Table 1 Escape latency time, number of trips across the target quadrant, and total distance travelled by mice in each group

Group	n	Target platform escape latency/s	Target quadrant escape latency/s	Number of crossings of the target quadrant	Total swimming distance/cm
NC	10	11.18±6.06	6.18±3.94	6.20±1.10	1031.44±178.20
WD	10	42.37±10.21 [#]	18.04±4.89 [#]	3.00±0.71 [#]	815.00±91.01 [#]
GDBSD	10	22.96±7.47 [*]	10.69±4.52 [*]	5.00±1.22	977.46±106.80 [*]
DMSA	10	18.70±7.73 [*]	5.75±3.31 [*]	6.60±1.95 [*]	1156.38±137.77 [*]

[#] $P < 0.05$, vs. NC group; ^{*} $P < 0.05$, vs. WD group. WD: Wilson disease; GDBSD: Gandou Bushen decoction.

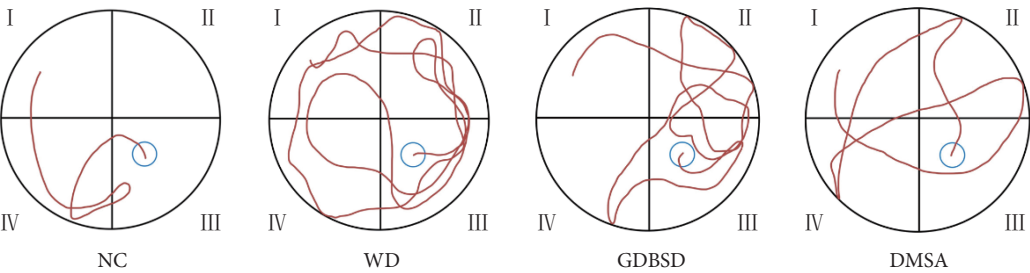


图 1 隐蔽平台实验中具有代表性的小鼠跟踪轨迹
Fig 1 Representative mouse tracking trajectories in the concealed platform experiment

目标平台逃逸潜伏期比NC组高278.91%，目标象限逃逸潜伏期比NC组高191.94%，进入目标象限的次数比NC组少51.61%，总游泳路径长度则少了20.93% ($P < 0.05$)，以上结果说明铜沉积引起了小鼠的学习记忆障碍。而补充了肝豆补肾汤及DMSA后，与WD组相比，肝豆补肾汤组小鼠的目标平台逃逸潜伏期下降了45.82%，目标象限逃逸潜伏期下降了40.74% ($P < 0.05$)。DMSA组与WD组相比目标平台逃逸潜伏期下降了55.87%，目标象限逃逸潜伏期下降了68.14%，进入目标区域的次数及总游泳路径长度均有所提升，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。这些结果表明肝豆补肾汤和DMSA排铜治疗均可减轻铜沉积引起的小鼠认知障碍。

2.2 肝豆补肾汤对Wilson病模型TX小鼠松果体组织病理学影响

HE染色发现，NC组松果体细胞排列密集，细胞核明显，染色加深，胞浆着色淡，细胞膜完整。大多数胶质细胞为梭形或星状，形状规整，有明显的核仁，未见明显的细胞损害。相比之下，WD组小鼠的松果体细胞数目减少，细胞边界模糊，细胞体积较小、排列无序、松散，空泡化变性增多，细胞核固缩，同时胶质细胞减少。说明铜沉积对松果体造成了组织结构上的损伤。GDBSD组及DMSA组松果体细胞排列轻度紊乱，少量核固缩，与WD组相比，细胞数目增多，空泡变性减少，形态恢复效果较好(图2)。

2.3 肝豆补肾汤对Wilson病模型TX小鼠松果体超微结构的影响

电镜下观察了松果体组织的线粒体凋亡情况，发现NC组松果体细胞形态规则，染色质分布均匀，胞浆内细

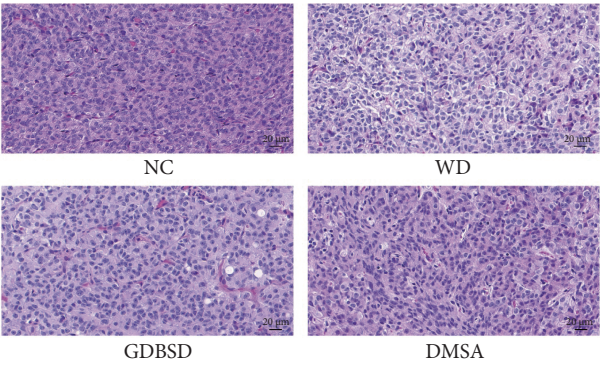


图 2 HE染色观察TX小鼠松果体组织形态变化 (×400)
Fig 2 Morphological changes in the pineal gland tissues of TX mice observed by HE staining (×400)

胞器丰富，可见结构清晰的线粒体及溶酶体。WD组细胞胞浆内细胞器减少，线粒体数量减少，大量线粒体出现明显的肿胀变形，空泡化，线粒体嵴断裂。与WD组相比，GDBSD组及DMSA组细胞胞浆内细胞器增多，正常线粒体数量增加，线粒体肿胀、嵴断裂、固缩情况好转 ($P < 0.05$) (表2、图3)。

2.4 肝豆补肾汤对Wilson病模型TX小鼠松果体铜含量的影响

使用络合比色法对松果体中铜含量进行检测，发现与NC组相比，WD组松果体铜含量升高(图4A)，而使用肝豆补肾汤及DMSA后，松果体组织中铜含量均降低，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 肝豆补肾汤对Wilson病模型TX小鼠血清褪黑素的影响

ELISA法检测各组小鼠血清褪黑素水平，结果显示，

表 2 各组小鼠松果体组织线粒体损伤率

Table 2 Rate of mitochondrial damage in the pineal tissues of mice in each group

Group	n	Mitochondrial damage rate/%
NC	10	17.18±4.55
WD	10	49.16±7.84 [#]
GDBSD	10	27.45±6.94 [*]
DMSA	10	21.84±6.42 [*]

[#] $P < 0.05$, vs. NC group; ^{*} $P < 0.05$, vs. WD group. All abbreviations are explained in the first footnote to Table 1.

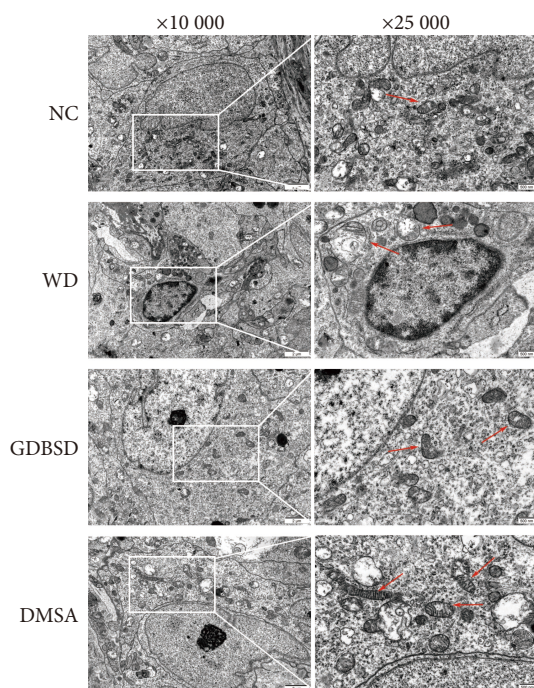


图 3 各组小鼠松果体电镜下超微结构变化

Fig 3 Electron microscopic observation of ultrastructural changes in the pineal gland of mice in each group

Red arrows point to mitochondria.

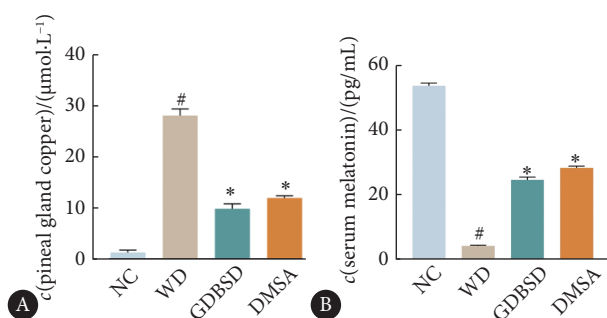


图 4 各组小鼠松果体铜含量及血清褪黑素

Fig 4 Pineal copper content and serum melatonin level in the mice in each group

A, Pineal gland copper content ($n = 5$); B, serum melatonin concentration ($n = 6$). [#] $P < 0.05$, vs. NC group; ^{*} $P < 0.05$, vs. WD group.

WD组小鼠血清褪黑素较NC组小鼠降低($P < 0.01$),这与之前观察到的松果体组织结构受损的征象相符合。使用肝豆补肾汤及DMSA之后,如图4B所示,GDBSD组和DMSA组小鼠的血清褪黑素水平均较WD组升高($P < 0.01$),显示肝豆补肾汤及铜整合剂DMSA均可改善WD模型TX小鼠血清褪黑素的水平。

2.6 肝豆补肾汤对Wilson病模型TX小鼠松果体组织ROS的影响

为了测定线粒体功能,进一步使用细胞流式术检测了松果体组织中ROS的含量。如图5结果显示,NC组小鼠松果体组织中ROS占比为77.62%;WD组小鼠松果体组织中的ROS占比为92.83%,与NC组相比增多($P < 0.01$);DMSA组及肝豆补肾汤组小鼠松果体组织中的ROS占比分别为84.01%和80.57%,与WD组相比,DMSA组及肝豆补肾汤组松果体组织中ROS含量下降($P < 0.01$)。

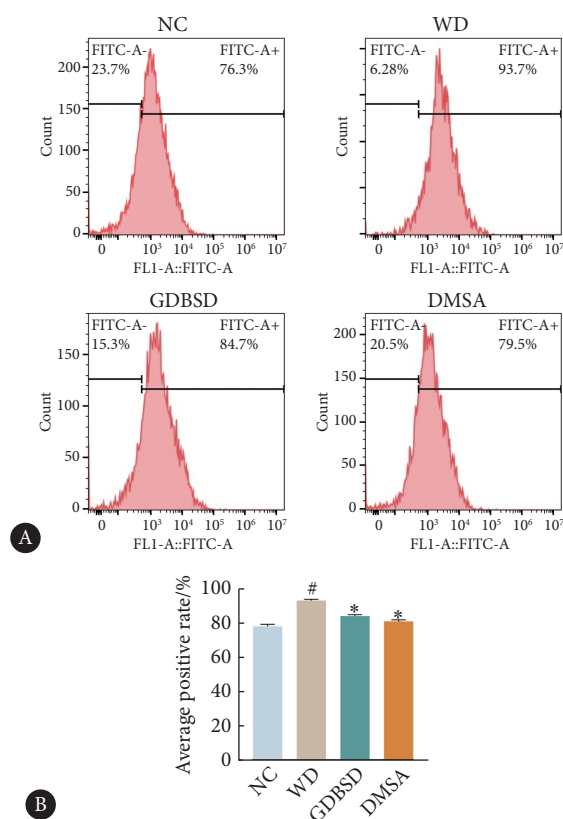


图 5 流式细胞术测定细胞内ROS水平

Fig 5 Intracellular ROS levels determined by flow cytometry

A, Levels of ROS expressed in the pineal gland as determined by flow cytometry; B, quantitative analysis of the mean ROS fluorescence level ($n = 3$).

[#] $P < 0.01$, vs. NC group; ^{*} $P < 0.01$, vs. WD group.

2.7 肝豆补肾汤对Wilson病模型TX小鼠松果体组织线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位检测结果(图6)显示,NC组线粒体损

伤率为59.9%, WD组为85.6%, 与NC组相比上升($P < 0.01$)。而肝豆补肾汤及DMSA组的线粒体损伤率与WD相比则降低($P < 0.01$)。

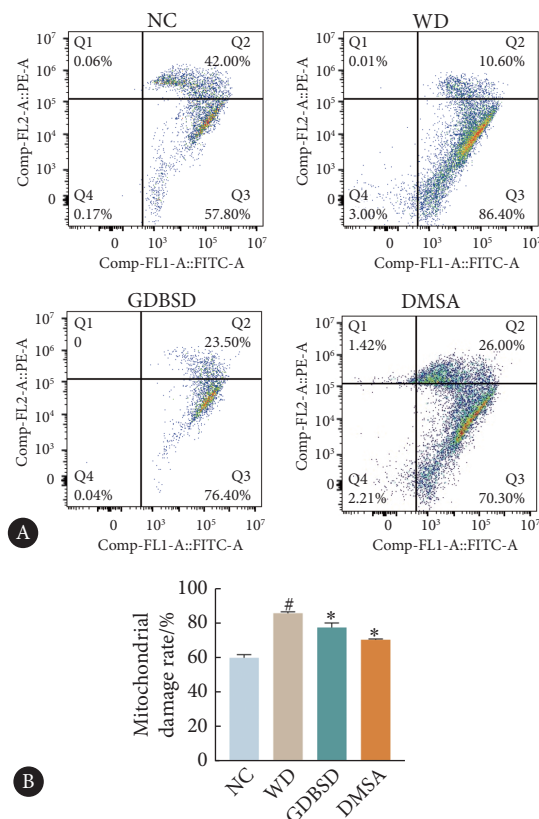


图6 小鼠松果体线粒体膜电位

Fig 6 Mitochondrial membrane potential of the pineal gland of the mice
A, Dot plot of mitochondrial membrane potential; B, mitochondrial damage rate ($n = 3$). # $P < 0.01$, vs. NC group; * $P < 0.01$, vs. WD group.

2.8 肝豆补肾汤对Wilson病模型TX小鼠松果体组织SIRT3/FOXO3α通路的影响

Western blot结果(图7)显示, WD组小鼠松果体组织中SIRT3蛋白受到抑制, 其下游的FOXO3α蛋白的表达也随之降低($P < 0.05$), 而在使用肝豆补肾汤及DMSA药物后, SIRT3蛋白、FOXO3α蛋白表达增强($P < 0.05$)。

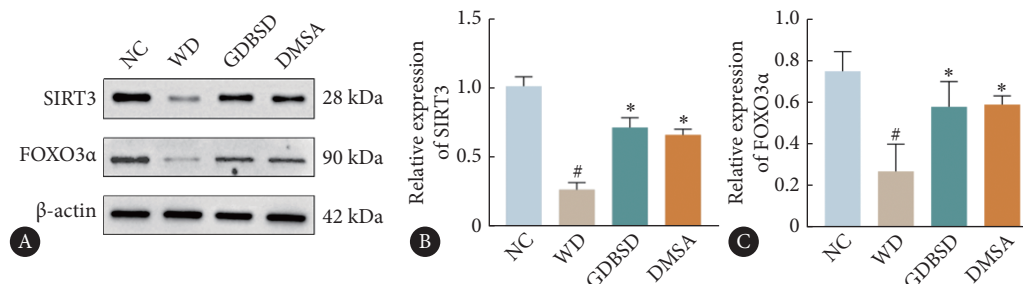


图7 蛋白质印迹检测各组SIRT3和FOXO3α蛋白表达

Fig 7 Western blot was performed to determine the protein expressions of SIRT3 and FOXO3α in each group

A, Original protein bands; B, SIRT3; C, FOXO3α ($n = 3$). # $P < 0.05$, vs. NC group; * $P < 0.05$, vs. WD group.

2.9 肝豆补肾汤Wilson病模型TX小鼠松果体组织氧化应激标志物的影响

蛋白质印迹检测SOD2蛋白水平显示, 与NC组相比, WD组小鼠松果体组织中SOD2蛋白表达水平降低($P < 0.01$)(图8A、8B)。MDA水平升高, SOD、CAT、总GSH、GSH-Px水平下降($P < 0.05$); 使用肝豆补肾汤及DMSA药物干预后, 小鼠松果体中SOD2蛋白表达水平升高, MDA水平下降, SOD、CAT、总GSH、GSH-Px水平升高($P < 0.05$)(图8C~8G)。

2.10 肝豆补肾汤对Wilson病模型TX小鼠松果体凋亡蛋白的影响

为了验证肝豆补肾汤是否能减轻松果体组织细胞凋亡水平, 进行了蛋白质印迹实验。如图9所示, 与NC组相比, WD组小鼠松果体中促凋亡蛋白Bax、Caspase-3的表达水平上升, 抗凋亡蛋白Bcl-2表达减少($P < 0.05$); 使用肝豆补肾汤药物干预后, 促凋亡蛋白Bax、Caspase-3表达水平下降, 抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平上升($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 Wilson病和铜沉积损害TX小鼠空间学习记忆功能

过量的铜沉积在身体各个部位是肝豆状核变性的特征性表现。而小鼠脑组织中这种过量的铜积累会诱导小鼠学习记忆障碍, 并通过氧化损伤和细胞凋亡诱导脑组织病理损伤^[2]。二巯丁二酸为金属螯合剂, 可与多种重金属形成络合物排出体外, 常用于治疗重金属中毒, 包括铅、汞、镉和铜引起的中毒。研究表明, 使用二巯丁二酸进行排铜治疗可以减少大脑中的金属沉积, 从而改善相应的神经系统症状^[28]。本研究通过Morris水迷宫行为学实验观察WD模型TX小鼠的空间记忆与学习能力以及肝豆补肾汤的作用。在Morris水迷宫试验中, WD组小鼠存在明显的学习记忆障碍, 而补充DMSA及肝豆补肾汤后, 小鼠穿越目标象限次数及路径长度均增加, 目标象限逃逸潜伏期和平台逃逸潜伏期减少。实验数据表明,

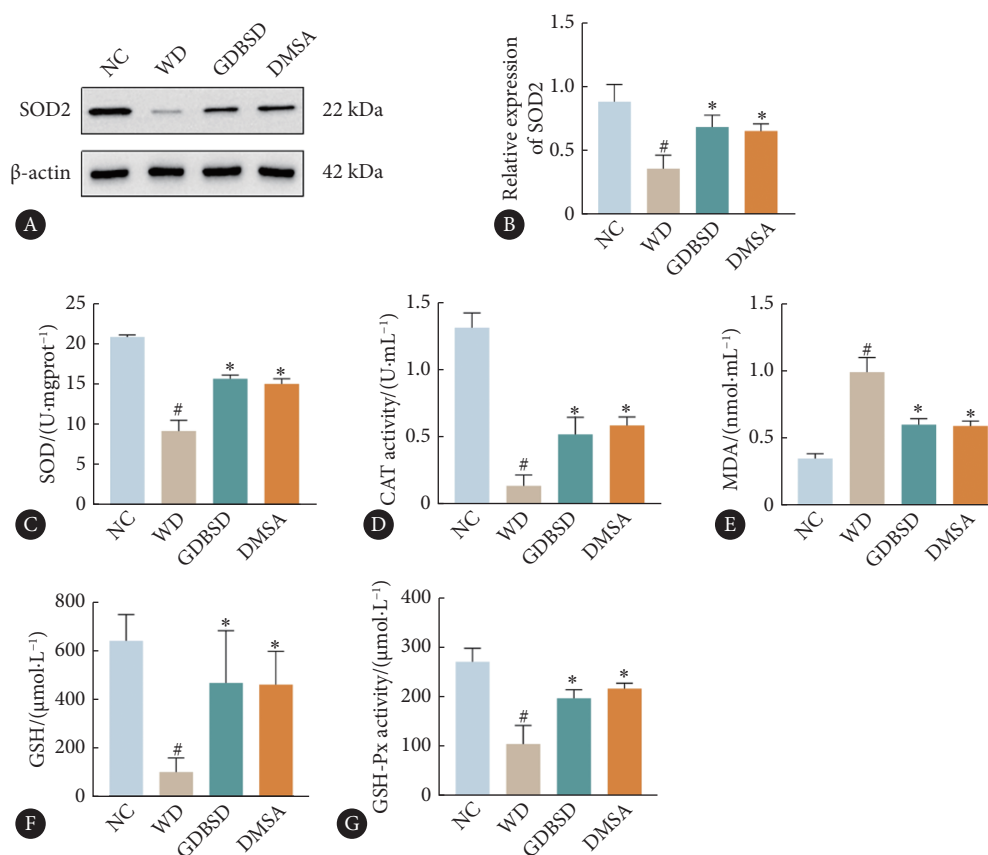


图 8 小鼠松果体氧化应激标志物

Fig 8 Markers of oxidative stress in the mouse pineal gland

A, Original protein bands of SOD2 protein; B, relative intensity of SOD2 ($n = 3$); C, SOD; D, CAT activity; E, MDA; F, GSH; G, GSH-Px activity ($n = 6$).

[#] $P < 0.05$, vs. NC group; ^{*} $P < 0.05$, vs. WD group.

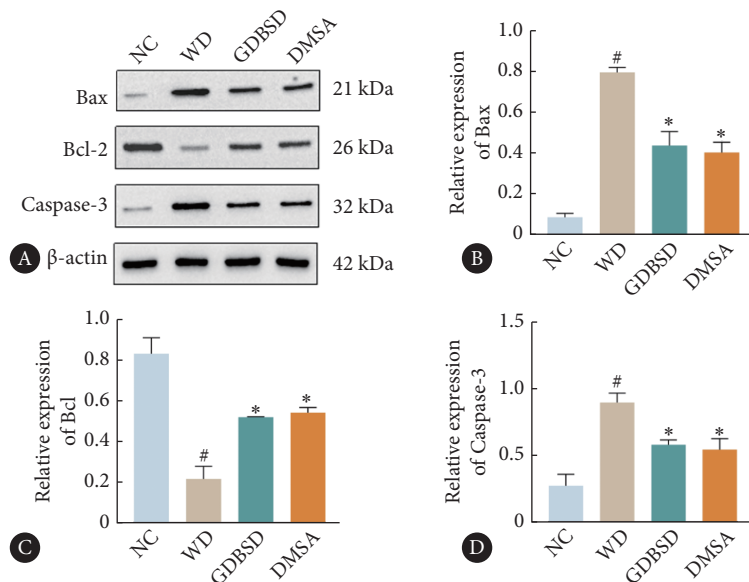


图 9 小鼠松果体细胞凋亡标志物

Fig 9 Apoptosis markers in the mouse pineal gland

A, Original protein bands; B, Bax protein; C, Bcl-2 protein; D, Caspase-3 protein. $n = 3$. [#] $P < 0.05$, vs. NC group; ^{*} $P < 0.05$, vs. WD group.

铜沉积引起了WD模型TX小鼠的学习记忆障碍,而补充DMSA或者肝豆补肾汤有助于预防或治疗这种缺陷。

3.2 肝豆补肾汤改善Wilson病模型TX小鼠褪黑素水平

基于行为学实验结果,为了探究铜引起WD模型

TX小鼠认知障碍的损伤机制,以及DMSA和肝豆补肾汤的保护作用,本研究对松果体组织进行观察。通过HE染色发现,WD铜沉积造成松果体组织一定程度的损伤,这与行为学实验结果相符合。此外,在电镜下发现,WD组小鼠松果体组织中线粒体出现大量肿胀,线粒体损伤率明显上升。

松果体功能障碍与神经发生受损有关,并可能导致大脑的记忆丧失^[29]。国内外多项研究显示,褪黑素的调节能力在多种认知功能下降模型中都发挥着重要作用,褪黑素的合成受阻可能是影响认知功能的靶点之一^[30-31]。褪黑素的主要产生部位为松果体组织,其亲脂性质使其很容易穿越细胞膜,并能穿透血脑屏障^[32]。作为一种两亲性分子,褪黑素被证实可以减少活性氧,影响能量代谢,并具有各种神经保护特性,在改善神经发生和突触可塑性方面具有重要作用。在本研究中,WD模型TX小鼠松果体显示出组织结构破坏的征象,褪黑素含量也明显减少。而肝豆补肾汤组以及DMSA组小鼠的血清褪黑素表现出整体上升的趋势,表明排铜或者补充肝豆补肾汤可改善松果体的损伤,促进褪黑素的合成。

3.3 肝豆补肾汤通过SIRT3/FOXO3a通路改善Wilson病模型TX小鼠松果体氧化应激、细胞凋亡

线粒体在促进神经发育过程中起到关键作用,线粒体肿胀是孤立线粒体发生通透性转换的结构变化,可能是由于ROS生成增多^[33]。本研究电镜下发现松果体组织中出现大量线粒体肿胀现象,进一步对松果体组织中的ROS水平进行检测,发现Wilson病模型TX小鼠松果体中ROS水平明显升高。研究证实,铜诱导的ROS产生不仅导致GSH氧化和脂质过氧化,还可以破坏线粒体膜的完整性并打开线粒体膜通透性转换孔^[34]。本研究中WD组小鼠ROS、MDA的水平和JC-1阳性细胞率的上升验证了这一点。

沉默信息调节因子相关酶3(SIRT3)是具有NAD⁺依赖的蛋白去乙酰化酶活性的蛋白家族成员,调节许多关键的细胞过程,在脑中高表达^[35],对氧化应激、线粒体功能、线粒体自噬、焦缩、凋亡^[36]有显著影响。SIRT3作为线粒体内重要的去乙酰化酶,可通过去乙酰化不同的下游蛋白发挥功能并平衡ROS稳态,对线粒体起到调节作用。其中包括在氧化应激中被广泛研究的抗氧化蛋白SOD2和PRDX3(peroxiredoxin 3)^[37-38]。FOXO3a是第一个被SIRT3调节的转录因子,已被证明在氧化应激中发挥着复杂的作用,该因子不仅可以诱导氧化应激状态下细胞的凋亡,还可以抑制氧化应激的发生^[39-40]。本研究结果发现铜沉积对松果体造成了组织病理形态学和超微结构损

伤,并且与NC组相比,WD小鼠松果体中SOD2的表达被抑制,CAT、总GSH和GSH-Px的水平下降,脂质过氧化物MDA的水平增加,这些结果均提示铜沉积诱导了小鼠松果体的氧化损伤。与WD组小鼠相比,肝豆补肾汤治疗后,调节SIRT3及FOXO3a的表达水平明显上升,松果体氧化应激程度得到改善。

褪黑素除了强大的抗氧化能力,还能通过改变Bcl-2及Bax表达来抑制细胞凋亡^[41]。本研究结果显示,与WD组相比,肝豆补肾汤组及DMSA组小鼠松果体中促凋亡蛋白Bax、Caspase-3表达减少,抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平也增加,这也显示出肝豆补肾汤具有改善松果体组织中细胞凋亡水平的能力。

综上所述,本研究结果证明,Wilson病模型TX小鼠松果体组织中过量的铜引起了SIRT3和FOXO3a的表达下降,氧化还原动态平衡被打破,加剧了松果体内线粒体ROS的产生、细胞凋亡和脂质过氧化,褪黑素水平下降,并引起了认知功能障碍。而肝豆补肾汤及DMSA可能通过SIRT3/FOXO3a通路减轻松果体组织氧化应激和细胞凋亡,缓解松果体细胞损伤,调节褪黑素水平,从而对WD伴认知功能障碍起到改善作用。肝豆补肾汤为WD伴认知功能障碍的临床治疗提供了新的途径。但本研究主要集中于肝豆补肾汤对松果体氧化应激损伤和细胞凋亡的保护作用,而对于肝豆补肾汤在WD伴认知功能障碍中的全面作用了解可能存在不足,需要进一步探讨。

* * *

作者贡献声明 王路瑶负责论文构思、正式分析、初稿写作和审读与编辑写作,吴丽敏负责调查研究、提供资源和监督指导,王婷婷负责数据审编、研究方法和审读与编辑写作,房新如负责正式分析、研究方法、软件和可视化,蒋真真负责研究项目管理、数据审编和论文构思,岳怡珂负责调查研究、研究方法、软件和可视化,赵丹负责调查研究、软件和可视化,刘千琢负责调查研究和研究方法,韩辉负责论文构思、经费获取、监督指导和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊。且对将要发表版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution WANG Luyao is responsible for conceptualization, formal analysis, writing--original draft, and writing--review and editing. WU Limin is responsible for investigation, resources, and supervision. WANG Tingting is responsible for data curation, methodology, and writing--review and editing. FANG Xinru is responsible for formal analysis, methodology, software, and visualization. JIANG Zhenzhen is responsible for project administration, data curation, and conceptualization. YUE Yike is responsible for investigation, methodology, software, and visualization. ZHAO Dan is responsible for investigation, software, and visualization. LIU Qianzhuo is responsible for investigation and methodology. HAN Hui is responsible for conceptualization, funding acquisition, supervision, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published

and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] KASZTELAN-SZCZERBINSKA B, CICHOSZ-LACH H. Wilson's disease: an update on the diagnostic workup and management. *J Clin Med*, 2021, 10(21): 5097. doi: 10.3390/jcm10215097.
- [2] ZHANG Y, ZHOU Q, LU L, *et al.* Copper induces cognitive impairment in mice via modulation of cuproptosis and CREB signaling. *Nutrients*, 2023, 15(4): 972. doi: 10.3390/nu15040972.
- [3] GROMADZKA G, ANTOS A, SORYSZ Z, *et al.* Psychiatric symptoms in Wilson's disease-consequence of *ATP7B* gene mutations or just coincidence?-Possible causal cascades and molecular pathways. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(22): 12354. doi: 10.3390/ijms252212354.
- [4] WANG X, SHAO N, ZHANG X, *et al.* Ferulic acid activates SIRT1-mediated ferroptosis signaling pathway to improve cognition dysfunction in Wilson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2023, 19: 2681-2696. doi: 10.2147/NDT.S443278.
- [5] WANG X, CHEN H, ZHANG X, *et al.* Therapeutic targets and natural product screening for cognitive impairments associated with ferroptosis in Wilson's disease. *Am J Chin Med*, 2024, 52(8): 2423-2452. doi: 10.1142/S0192415X24500927.
- [6] DONG J, XIANG G, XIA X, *et al.* Aberrant copper metabolism and hepatic inflammation cause neurological manifestations in a mouse model of Wilson's disease. *J Neuroinflammation*, 2024, 21(1): 235. doi: 10.1186/s12974-024-03178-5.
- [7] DONG J, WANG X, XU C, *et al.* Inhibiting NLRP3 inflammasome activation prevents copper-induced neuropathology in a murine model of Wilson's disease. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 87. doi: 10.1038/s41419-021-03397-1.
- [8] FERRO M, MORANTE I, NISHINO F A, *et al.* Melatonin influence on miRNA expression in sperm, hypothalamus, pre-frontal cortex and cerebellum of Wistar rats. *PLoS One*, 2025, 20(1): e0312403. doi: 10.1371/journal.pone.0312403.
- [9] TCHEKALAROVA J, KRUSHOVLIEVA D, IVANOVA P, *et al.* The role of melatonin deficiency induced by pinealectomy on motor activity and anxiety responses in young adult, middle-aged and old rats. *Behav Brain Funct*, 2024, 20(1): 3. doi: 10.1186/s12993-024-00229-y.
- [10] KORF H W, Von GALL C. Mouse models in circadian rhythm and melatonin research. *J Pineal Res*, 2024, 76(5): e12986. doi: 10.1111/jpi.12986.
- [11] SONG J. Pineal gland dysfunction in Alzheimer's disease: relationship with the immune-pineal axis, sleep disturbance, and neurogenesis. *Mol Neurodegener*, 2019, 14(1): 28. doi: 10.1186/s13024-019-0330-8.
- [12] ÇIÇEK F, UÇAR İ, SEBER T, *et al.* Investigation of the relationship of sleep disorder occurring in fibromyalgia with central nervous system and pineal gland volume. *Acta Neuropsychiatr*, 2024: 1-8. doi: 10.1017/neu.2024.49.
- [13] VUKOVIĆ M, NOSEK I, BOBAN J, *et al.* Pineal gland volume loss in females with multiple sclerosis. *Front Neuroanat*, 2024, 18: 1386295. doi: 10.3389/fnana.2024.1386295.
- [14] WANG Z, ZHOU F, DOU Y, *et al.* Melatonin alleviates intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury in rats via suppressing apoptosis, inflammation, oxidative stress, DNA damage, and mitochondria injury. *Transl Stroke Res*, 2018, 9(1): 74-91. doi: 10.1007/s12975-017-0559-x.
- [15] TASSONE G, KOLA A, VALENSIN D, *et al.* Dynamic interplay between copper toxicity and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Life (Basel)*, 2021, 11(5): 386. doi: 10.3390/life11050386.
- [16] PARMAR P, DAYA S. The effect of copper on (3H)-tryptophan metabolism in organ cultures of rat pineal glands. *Metab Brain Dis*, 2001, 16(3/4): 199-205. doi: 10.1023/a:1012545112031.
- [17] WEN Y, ZHAO C, CHEN J, *et al.* Gandouling regulates ferroptosis and improves neuroinflammation in Wilson's disease through the LCN2/NLRP3 signaling pathway. *J Inflamm Res*, 2024, 17: 5599-5618. doi: 10.2147/JIR.S465341.
- [18] 梁丰, 董婷, 田丽伟, 等. 肝豆灵片治疗瘀瘀互结型肝豆状核变性脂代谢异常的随机对照试验及相关性分析. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(12): 121-128. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20241592.
- LIANG F, DONG T, TIAN L W, *et al.* Randomized controlled trial and correlation analysis of Gandouling tablet in treatment of abnormal lipid metabolism of Wilson's disease with turbid phlegm and blood stasis. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(12): 121-128. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20241592.
- [19] ZHANG J, TANG L L, LI L Y, *et al.* Gandouling tablets inhibit excessive mitophagy in toxic milk (TX) model mouse of Wilson disease via pink1/parkin pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 3183714, doi: 10.1155/2020/3183714.
- [20] 刘彦宏, 武凤, 于修芳, 等. 杜仲提取物通过HPG轴对APP/PS1小鼠学习认知功能的影响. *中药材*, 2022, 45(8): 1964-1968. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2022.08.033.
- LIU Y H, WU F, YU X F, *et al.* Effects of *Eucommia ulmoides* extract on learning and cognitive functions in APP/PS1 mice via the HPG axis. *J Chin Med Mater*, 2022, 45(8): 1964-1968. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2022.08.033.
- [21] HUANG Y, ZHANG X, CHEN L, *et al.* *Lycium barbarum* ameliorates neural damage induced by experimental ischemic stroke and radiation exposure. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 202, 28(2): 38. doi: 10.31083/j.fbl2802038.
- [22] WANG S, MA J, ZENG Y, *et al.* Icariin, an up-and-coming bioactive compound against neurological diseases: network pharmacology-based study and literature review. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 3619-3641. doi: 10.2147/DDDT.S310686.
- [23] LEE H S, KIM J M, LEE H L, *et al.* *Eucommia ulmoides* leaves alleviate cognitive dysfunction in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis mice through regulating JNK/TLR4 signaling pathway. *Int J Mol Sci*,

- 2024, 25(7): 4063. doi: 10.3390/ijms25074063.
- [24] HU W, ZOU L, YU N, *et al.* Catalpol rescues LPS-induced cognitive impairment via inhibition of NF- κ B-regulated neuroinflammation and up-regulation of TrkB-mediated BDNF secretion in mice. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 3): 117345. doi: 10.1016/j.jep.2023.117345.
- [25] 杨文明, 韩辉, 鲍远程, 等. 中医对肝豆状核变性病因病机及辨证论治的探索. *北京中医药大学学报(中医临床版)*, 2012, 19(4): 6-9. doi: 10.3969/j.issn.1672-2205.2012.04.002.
- YANG W M, HAN H, BAO Y C, *et al.* TCM etiology, pathogenesis and syndrome differentiation and treatment of epatolenticular degeneration. *J Beijing Univ Tradit Chin Med (Clin Med)*, 2012, 19(4): 6-9. doi: 10.3969/j.issn.1672-2205.2012.04.002.
- [26] LUCENA-VALERA A, RUZ-ZAFRA P, AMPUERO J. Wilson's disease: overview. *Med Clin (Barc)*, 2023, 160(6): 261-267. doi: 10.1016/j.medcli.2022.12.016.
- [27] 钱南南, 杨文明, 魏涛华, 等. 肝豆状核变性伏毒阻络病因病机探要. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(12): 133-140. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20221291.
- QIAN N N, YANG W M, WEI T H, *et al.* Etiology and pathogenesis of hepatolenticular degeneration caused by latent toxin blocking collaterals. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(12): 133-140. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20221291.
- [28] 田雪, 徐志强, 董漪, 等. 二巯丁二酸联合硫酸锌与青霉胺治疗儿童肝豆状核变性的效果比较. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(9): 2145-2150. doi: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.09.017.
- TIAN X, XU Z Q, DONG Y, *et al.* Effect of dimercaptosuccinic acid combined with zinc sulfate versus D-penicillamine in treatment of children with Wilson's disease. *J Clin Hepatol*, 2023, 39(9): 2145-2150. doi: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.09.017.
- [29] GEORGIEVA I, TCHEKALAROVA J, NENCHOVSKA Z, *et al.* Melatonin supplementation alleviates impaired spatial memory by influencing A β ₁₋₄₂ metabolism via γ -secretase in the icvA β ₁₋₄₂ rat model with pinealectomy. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(19): 10294. doi: 10.3390/ijms251910294.
- [30] WATANABE K, HATTORI A. Aging-induced memory loss due to decreased N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a melatonin metabolite, in the hippocampus: a potential prophylactic agent for dementia. *Neural Regen Res*, 2025, 20(6): 1705-1706. doi: 10.4103/NRR.NRR-D-24-00379.
- [31] GUPTA B, MALVIYA R, SUNDRAM S, *et al.* Melatonin overexpression in the management of Alzheimer's disease: therapeutic exploration. *Curr Top Med Chem*, 2025 Jan 29. doi: 10.2174/0115680266327614241121050448.
- [32] ZHANG D, XU S, WANG Y, *et al.* The potentials of melatonin in the prevention and treatment of bacterial meningitis disease. *Molecules*, 2021, 26(5): 1419. doi: 10.3390/molecules26051419.
- [33] GIRI A, MEHAN S, KHAN Z, *et al.* Modulation of neural circuits by melatonin in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2024, 397(6): 3867-3895. doi: 10.1007/s00210-023-02939-y.
- [34] VO T T T, PENG T Y, NGUYEN T H, *et al.* The crosstalk between copper-induced oxidative stress and cuproptosis: a novel potential anticancer paradigm. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 353. doi: 10.1186/s12964-024-01726-3.
- [35] LIU J, WANG Y, WANG Z, *et al.* 5-Heptadecylresorcinol, a biomarker for whole grain rye consumption, ameliorates cognitive impairments and neuroinflammation in APP/PS1 transgenic mice. *Mol Nutr Food Res*, 2020, 64(11): e1901218. doi: 10.1002/mnfr.201901218.
- [36] ZHANG J, XIANG H, LIU J, *et al.* Mitochondrial Sirtuin 3: new emerging biological function and therapeutic target. *Theranostics*, 2020, 10(18): 8315-8342. doi: 10.7150/thno.45922.
- [37] 熊凤梅, 蔡玉香, 刘卓, 等. 姜黄素通过调控SIRT3/SOD2信号通路对阿霉素引起心肌细胞毒性的减轻作用. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(5): 1339-1347. doi: 10.13481/j.1671-587X.20240518.
- XIONG F M, CAI Y X, LIU Z, *et al.* Alleviatory effect of curcumin on cardiomyocyte toxicity induced by doxorubicin by regulating SIRT3/SOD2 signaling pathway. *J Jilin Univ (Med Edi)*, 2024, 50(5): 1339-1347. doi: 10.13481/j.1671-587X.20240518.
- [38] WANG Z, SUN R, WANG G, *et al.* SIRT3-mediated deacetylation of PRDX3 alleviates mitochondrial oxidative damage and apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion injury. *Redox Biol*, 2020, 28: 101343. doi: 10.1016/j.redox.2019.101343.
- [39] REITER R J, SHARMA R N, MANUCHA W, *et al.* Dysfunctional mitochondria in age-related neurodegeneration: utility of melatonin as an antioxidant treatment. *Ageing Res Rev*, 2024, 101: 102480. doi: 10.1016/j.arr.2024.102480.
- [40] REITERER M, MILTON S L. Induction of foxo3a protects turtle neurons against oxidative stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2020, 243: 110671. doi: 10.1016/j.cbpa.2020.110671.
- [41] EI-MISSIRY M A, OTHMAN A I, AL-ABDAN M A, *et al.* Melatonin ameliorates oxidative stress, modulates death receptor pathway proteins, and protects the rat cerebrum against bisphenol-A-induced apoptosis. *J Neurol Sci*, 2014, 347(1/2): 251-256. doi: 10.1016/j.jns.2014.10.009.

(2024-10-31收稿, 2025-01-06修回)

编辑 刘 华



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2025 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*