

酸枣仁汤对 APP/PS1 模型小鼠海马神经元保护作用及 PI3K/Akt 信号通路的影响

吴丹¹, 赖碧璇¹, 王政喻¹, 牛绮萱¹, 蔡元钦³, 龙清华^{1,2*}

(1. 湖北民族大学 医学部, 湖北 恩施 445000;

2. 湖北民族大学 风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北 恩施 445000;

3. 云南中医药大学, 云南 昆明 650000)

摘要 探讨酸枣仁汤(SZRD)通过磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路抑制 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax)/Bcl-2/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)介导的细胞凋亡从而改善 APP/PS1 小鼠海马神经元损伤的机制。使用 GEO 数据库筛选阿尔茨海默病差异表达基因(DEGs),利用 R 语言对 DEGs 进行 KEGG 和 GO 富集分析。将 30 只 6 月龄 APP/PS1 模型小鼠随机分为 APP/PS1 组、酸枣仁汤低剂量组(12.96 g·kg⁻¹)和酸枣仁汤高剂量组(25.92 g·kg⁻¹),10 只 6 月龄雄性 C57BL/6J 小鼠作为空白组。给药组分别给予相应药物灌胃,持续 28 d。灌胃结束后,利用 Morris 水迷宫检测小鼠的学习记忆能力;尼氏染色检测神经元的数量;免疫组化检测海马神经元标志物特异性核蛋白(NeuN)的数量和海马神经元 Aβ 沉积情况;Western blot 法检测小鼠海马组织中 PI3K/Akt 通路蛋白及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、剪切的 caspase-3(cleaved-caspase-3)、caspase-3 的表达水平。结果显示,差异基因分析筛选出 686 个 DEGs,GO 富集分析显示其与突触功能、神经递质等生物学过程相关;KEGG 富集分析主要涉及神经活性、PI3K/Akt 等信号通路。动物实验显示,与 APP/PS1 组相比,酸枣仁汤低剂量组、酸枣仁汤高剂量组小鼠学习记忆水平显著提高,神经元数量显著增加,Aβ 沉积显著减少,海马组织中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Bcl-2 蛋白表达均明显上升,Bax、cleaved-caspase-3/caspase-3 蛋白表达均显著下降。综上所述,酸枣仁汤可能通过 PI3K/Akt 信号通路调控 Bax/Bcl-2/caspase-3 介导的细胞凋亡,从而改善 APP/PS1 小鼠海马神经元损伤,提高其认知水平。

关键词 酸枣仁汤; APP/PS1 小鼠; PI3K/Akt 通路; 神经元凋亡

Protective effects of Suanzaoren Decoction on hippocampal neuron and its influence on PI3K/Akt signaling pathway in APP/PS1 transgenic mice

WU Dan¹, LAI Bi-xuan¹, WANG Zheng-yu¹, NIU Qi-xuan¹, CAI Yuan-qin³, LONG Qing-hua^{1,2*}

(1. Medical School, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China; 2. Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of Rheumatic Diseases, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China;

3. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650000, China)

[Abstract] This study explored the mechanism by which Suanzaoren Decoction (SZRD) ameliorates hippocampal neuronal damage in APP/PS1 mice by inhibiting Bax/Bcl-2/caspase-3-mediated apoptosis through the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / protein kinase B (Akt) signaling pathway. Differentially expressed genes (DEGs) in Alzheimer's disease (AD) were screened using the GEO database, and KEGG and GO enrichment analyses were performed using R software. Thirty 6-month-old APP/PS1 transgenic mice were randomly assigned to three groups: APP/PS1 group, low-dose SZRD group (12.96 g·kg⁻¹), and high-dose SZRD group (25.92 g·kg⁻¹), while ten age-matched male C57BL/6J mice served as the blank control group. The

收稿日期 2025-08-27

基金项目 国家自然科学基金青年科学基金项目(82204964); 中国博士后科学基金面上项目(2025M773957); 湖北省中医药管理局中医药科研面上项目(ZY2025M001)

通信作者 * 龙清华, E-mail: 287201413@qq.com

作者简介 吴丹, E-mail: 1263105609@qq.com

treatment groups received SZRD by gavage for 28 consecutive days. Following treatment, spatial learning and memory were assessed using the Morris water maze test. Neuronal numbers were evaluated by Nissl staining. Immunohistochemistry (IHC) was used to detect neuron-specific nuclear protein (NeuN) and assess amyloid- β ($A\beta$) deposition in hippocampal neurons. Western blot was performed to measure the expression levels of PI3K/Akt pathway proteins and apoptosis-related markers, including Bcl-2, Bax, caspase-3, and cleaved-caspase-3 in hippocampal tissues. Bioinformatics analysis identified 686 DEGs, with GO enrichment linked to synaptic function and neurotransmitter transport, and KEGG pathways including neuroactive ligand-receptor interaction and PI3K/Akt signaling. *In vivo* experiments showed that, compared with APP/PS1 mice, both low- and high-dose SZRD groups exhibited improved learning and memory, increased neuronal numbers, and decreased $A\beta$ deposition. Furthermore, hippocampal levels of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, and Bcl-2 were upregulated, while Bax and cleaved-caspase-3/caspase-3 levels were downregulated. In conclusion, SZRD may improve hippocampal neuronal damage and cognitive function in APP/PS1 mice by regulating Bax/Bcl-2/caspase-3-mediated apoptosis through the PI3K/Akt signaling pathway.

[Key words] Suanzaoren Decoction; APP/PS1 mice; PI3K/Akt pathway; neuronal apoptosis

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20250930.701

阿尔茨海默病(AD)是一种以进行性认知功能障碍为主要特征的神经退行性疾病,其主要病理特征包括2种,即 β -淀粉样蛋白($A\beta$)沉积形成老年斑和过度磷酸化的Tau蛋白聚集形成的神经元纤维结(NFTs),大脑发生病理改变进而引起神经元凋亡^[1]。AD是全球第五大死亡原因,据预测,到2030年,全球AD患者人数将达到8200万,对公共卫生安全产生重大且日益严重的威胁^[2]。因此,AD的治疗成为亟待解决的重要问题。但目前对AD复杂致病机制的研究仍然有限,也未能发现能够有效阻止AD进展的药物。

研究表明,大脑海马中 $A\beta$ 的沉积会影响线粒体功能和神经炎症因子释放,这些病理改变会进一步导致神经元凋亡^[3]。因此减少细胞凋亡对缓解AD进展具有重要意义。细胞凋亡与PI3K/Akt信号通路相关,磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)通路是一种重要的细胞存活途径,在调节神经元生长、凋亡及受损神经元修复和存活方面起着重要作用,与AD等神经退行性疾病密切相关^[4]。B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)/Bcl-2/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)信号通路介导的细胞凋亡与AD关系密切,激活PI3K/Akt信号通路能够抑制其介导的细胞凋亡^[5]。因此,通过药物激活PI3K/Akt信号通路,抑制细胞凋亡过程可能成为缓解AD进展的重要途径。

酸枣仁汤由酸枣仁、川芎、知母、茯苓、炙甘草5味药组成,具有养血安神、安神益智的功效,该方出自《金匱要略》,已被证明对治疗失眠、抑郁症和AD等疾病有明显疗效。前期研究已经证实,酸枣仁汤

能够改善APP/PS1小鼠突触丢失和神经元损伤,从而减缓AD的病理进程^[6-9]。然而,由于酸枣仁汤成分复杂,其通过调控PI3K/Akt信号通路来抑制 $A\beta$ 沉积诱导神经元凋亡机制仍缺乏深入研究。因此,本研究旨在探讨酸枣仁汤对PI3K/Akt信号通路的调控作用,并进一步阐明其在神经元凋亡调节中的潜在机制。

1 材料

1.1 数据来源 从基因表达综合数据库(GEO)下载AD数据集(GSE122063和GSE138260)。GSE122063数据集包括136个样[56个AD样本、36个缺血性痴呆(VaD)样本和44个健康对照样本],GSE138260数据集包括36个样本(17个AD样本和19个健康对照样本)。GSE122063作为训练集,GSE138260作为验证集。

1.2 动物 6月龄SPF雄性APP/PS1转基因模型小鼠30只,6月龄雄性C57BL/6J小鼠10只,体重(30±2)g,饲养于湖北民族大学风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室,动物所在房间温度22~25℃,相对湿度50%~60%,房间内设有独立通风系统,给予实验动物良好的生活环境。本实验已获得湖北民族大学实验动物伦理委员会批准,并严格按照要求进行操作,伦理审批号2024080。

1.3 药物及试剂 酸枣仁汤由酸枣仁30g(批号250101261)、茯苓6g(批号241203601)、川芎6g(批号241201121)、知母9g(批号241004641)、炙甘草3g(批号241102081)组成,购于康美药业股份有限公司。按照人与小鼠药物剂量等效换算和课题组之前的研究^[7-9],将药物分成2个剂量,分别为酸

枣仁汤低剂量(12.96 g·kg⁻¹)、酸枣仁汤高剂量(25.92 g·kg⁻¹)。煎煮完毕,放置 4 ℃ 备用。

PI3K、磷酸化 PI3K(p-PI3K)、Akt 购自美国 Immunoway Biotechnology 公司,批号分别为 T40115F、YP0765、YT0185; Bcl-2、Bax、caspase-3、剪切的 caspase-3(cleaved-caspase-3)、 β -actin 购自美国 AB-clonal Biotechnology 公司,批号分别为 A0214、A19654、A19684、A20777、AC026; 磷酸化 Akt(p-Akt) 购自沈阳万类生物科技有限公司,批号为 WLP001; 辣根过氧化物酶(HRP) 标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 抗体购自雅酶生物科技(上海)股份有限公司,批号为 LF102。

1.4 仪器 Morris 水迷宫(中国医学科学院药物研究所,型号 SA201); 多功能酶标仪(美国 ThermoFisher 公司,型号 51119080); Image Quant Las4000 成像分析仪(美国 GE 公司,型号 9702022); 电泳转膜一体机(武汉塞维尔生物技术有限公司,型号 SPW-DSE); 光学显微镜(日本 Olympus 公司,型号 CX31)。

2 方法

2.1 差异基因筛选 使用 R 语言将 GSE122063 数据集中 VaD 样本相关数据去除,只保留 AD 样本和健康对照样本数据。使用 Limma R 包进行差异表达分析。参考既往研究^[1], 确定 $P_{\text{adj}} < 0.05$ 且 $\log_2(\text{fold change}) > 1$ 为本研究差异表达基因(DEGs)的筛选标准,使用 R 语言 ggplot2 包和 pheatmap 包分别绘制火山图和热图,以展示 DEGs 的表达。

2.2 对 DEGs 进行富集分析 使用 R 语言 cluster-Profiler 包对 DEGs 进行基因本体论(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。最后使用 R 语言 enrichplot 包和 ggplot2 包对富集分析结果进行可视化。

2.3 动物分组及给药 所有造模小鼠适应性喂养 1 周。随后将 APP/PS1 转基因小鼠随机分为 APP/PS1 组、酸枣仁汤低剂量组和酸枣仁汤高剂量组,每组 10 只。10 只同批次 C57BL/6J 小鼠用作空白组。低、高剂量组分别给予 12.96、25.92 g·kg⁻¹ 酸枣仁汤灌胃,空白组和 APP/PS1 组给予同等体积的生理盐水灌胃,持续 28 d。

2.4 Morris 水迷宫检测 灌胃结束后进行 Morris 水迷宫测试^[2]。小鼠连续 5 d 接受训练:每天从各象限贴壁入水,记录 60 s 内找到水下平台的逃避潜

伏期;若未找到,则引导至平台停留 15 s。第 7 天移除平台,小鼠从平台对角象限入水,记录 60 s 内穿越原平台次数及目标象限停留时间,以评估空间记忆水平。

2.5 样本采集 Morris 水迷宫检测结束后,小鼠禁食 1 d,断头,冰袋上剥离全脑,尼氏染色、免疫组化所用的标本利用 4% 多聚甲醛进行固定,分离海马于 EP 管中,其余标本放入 -80 ℃ 冰箱保存备用。

2.6 尼氏染色观察海马中神经元数量 将固定在 4% 多聚甲醛的小鼠脑部进行切片包埋,包埋后依次放入二甲苯和乙醇进行脱蜡、脱水处理,再将处理过的切片放入尼氏溶液中染色 20 min,纯水冲洗切片 5 min,将切片放入梯度乙醇进行脱水处理,处理后将切片放入二甲苯进行透明,中性树胶封固,显微镜下观察切片,用 ImageJ 软件进行海马区神经元阳性数量的计算。

2.7 免疫组化检测海马中神经元特异性核蛋白(NeuN)阳性细胞 石蜡包埋的脑组织切片被切割成 5 μm 。脱蜡和抗原修复后,加入一抗 NeuN(1:300 稀释度)并在恒温摇床中在 4 ℃ 下孵育过夜。PBS 洗涤后,加入 HRP 标记的第二抗体在室温下孵育 1 h。清洁后,将载玻片脱水,暴露于 DAB 显色液中,蒸馏水终止显色后,用苏木素复染细胞核,盐酸乙醇分化,氨水返蓝。随后,切片依次通过梯度乙醇脱水、二甲苯透明,最后用中性树胶封固。对切片进行成像,并使用 ImageJ 软件对海马区 NeuN 阳性(胞核棕色)细胞计数。

2.8 免疫组化染色检测海马中 $A\beta$ 沉积情况 石蜡包埋的脑组织切片被切割成 5 μm 。脱蜡和抗原修复后,将一抗 $A\beta$ (1:400 稀释度),并在恒温摇床中在 4 ℃ 下孵育过夜。PBS 洗涤后,加入 HRP 标记的第二抗体在室温下孵育 1 h。PBS 洗涤后,将载玻片脱水,暴露于 DAB 显色液中,蒸馏水终止显色后,用苏木素复染细胞核,盐酸乙醇分化,氨水返蓝。随后,依次对切片通过梯度乙醇脱水、二甲苯透明,最后用中性树胶封固。对切片进行成像,并使用 ImageJ 量化 $A\beta$ 的面积。

2.9 蛋白免疫印迹法检测蛋白表达水平 迅速称取 -80 ℃ 保存的 100 mg 海马组织,冰上解冻后加入含 PMSF 的 RIPA 裂解液,4 ℃ 匀浆。匀浆液于 4 ℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 25 min,取上清液进行 BCA 蛋白浓度测定,剩余上清液加入 5 $\times$ 上样缓冲液,煮

沸 10 min 变性, -20 °C 保存备用。随后制备 SDS-PAGE 凝胶, 将样本加入凝胶孔中, 进行电泳、转膜、封闭、加入稀释后的一抗 [PI3K (1:1 000)、p-PI3K (1:1 000)、Akt (1:1 000)、p-Akt (1:1 000)、Bcl-2 (1:1 000)、Bax (1:1 000)、cleaved-caspase-3 (1:1 000)、caspase-3 (1:1 000)、 β -actin (1:100 000)], 4 °C 摇床孵育过夜。次日回收一抗, TBST 进行洗膜, 洗膜结束后加入二抗 (1:10 000), 常温下摇床孵育 1 h, 弃二抗, 再次使用 TBST 洗膜, 洗膜结束后滴加 ECL 显影液进行显影, 并用 ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值。

2.10 统计分析 运用统计软件 SPSS 26.0 分析实验数据。实验数据均用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 Shapiro-Wilk 检验和 Levene 检验对实验数据进行正态性和方差齐性分析。若符合正态分布则采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 方差齐性时多组间两两比较采用最小显著性差异法 (LSD), 方差不齐时多组间两两比较采用 Tamhane's T2 法。不

符合正态分布, 则采用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 DEGs 的筛选 GSE122063 数据集共筛选出 686 个 DEGs, 与空白组相比, AD 组有 230 个差异基因上调和 456 个差异基因下调。热图和火山图展示了 DEGs 在 AD 组和正常健康组之间的表达差异, 见中国知网本文增强出版附加材料。

3.2 DEGs 富集分析 为了明确 AD-DEGs 的功能, 进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 功能富集分析结果显示, 生物过程 (BP) 主要富集于神经信号的传导、突触功能和神经递质等过程; 细胞组分 (CC) 主要富集于突触、囊泡运输和神经元等结构; 分子功能 (MF) 主要与神经递质受体活性、突触后神经递质活性和门控通道活性等功能密切相关, 见图 1A。KEGG 富集分析结果显示, DEGs 主要富集于神经活性受体-配体相互作用、胆碱能突触和 PI3K/Akt 等通路, 见图 1B。

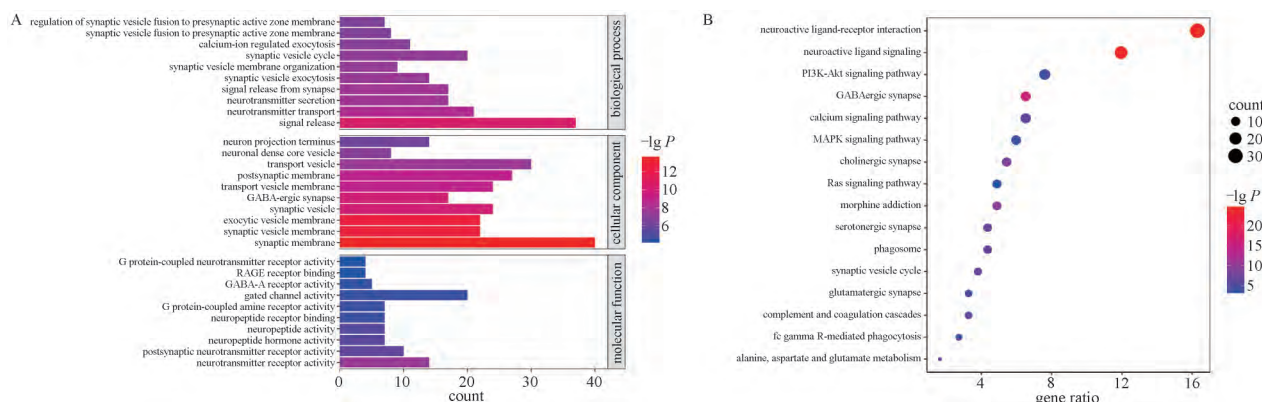


图 1 GO 功能 (A) 和 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig.1 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis

3.3 酸枣仁汤对 APP/PS1 模型小鼠学习记忆功能的影响 Morris 水迷宫结果显示, 与空白组相比, APP/PS1 组小鼠逃避潜伏期显著增加, 穿越平台次数和目标象限停留时间均明显减少; 与 APP/PS1 组相比, 酸枣仁汤低、高剂量组小鼠逃避潜伏期均显著减少, 穿越平台次数和目标象限停留时间均显著增加, 见图 2、表 1。

3.4 酸枣仁汤对 APP/PS1 小鼠海马神经元病理损伤的影响 采用尼氏染色定量 APP/PS1 小鼠海马神经元, 结果显示, 与空白组相比, APP/PS1 组小鼠

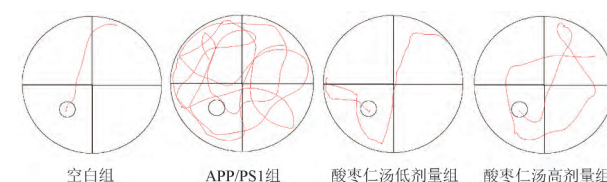


图 2 各组小鼠在定位航行实验中的代表性游泳轨迹

Fig.2 Representative swimming paths of mice in each group during positioning navigation test

海马 CA1 区和 CA3 区神经元间隙增加、细胞排列紊乱, 神经元数量显著减少; 与 APP/PS1 组相比, 酸枣

表 1 各组小鼠水迷宫实验分析($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Analysis of water maze test of mice in each group($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	逃避潜伏期 /s	穿越平台次数	目标象限停留时间 /s	游泳总路程 /cm
空白	—	20.50±3.40	5.00±1.70	20.41±4.58	235.68±9.84
APP/PS1	—	32.00±5.44 ¹⁾	2.40±1.08 ¹⁾	9.79±5.01 ¹⁾	249.57±19.79
酸枣仁汤	12.96	22.47±2.43 ³⁾	4.30±1.89 ²⁾	19.21±7.51 ³⁾	230.15±14.81
	25.92	23.92±3.43 ³⁾	4.20±1.55 ²⁾	18.81±4.98 ³⁾	232.82±15.52

注:与空白组相比¹⁾ $P<0.01$;与 APP/PS1 组相比²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表 2~5 同)。

仁汤低剂量组小鼠海马 CA1 区神经元排列紊乱情况得到改善,且数量显著增加;与 APP/PS1 组相比,酸枣仁汤高剂量组小鼠海马 CA1 区和 CA3 区神经元数量显著增加,见图 3、表 2。

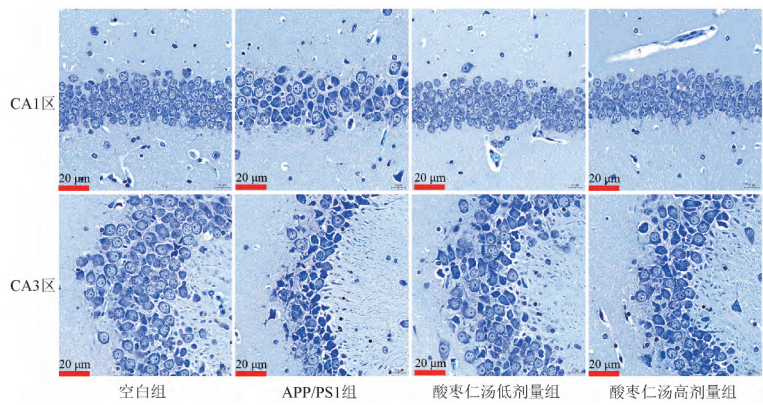


图 3 各组小鼠海马 CA1 与 CA3 区 Nissl 染色

Fig.3 Nissl staining in the CA1 and CA3 region of the hippocampus of mice in each group

表 2 各组小鼠 Nissl 染色检测($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Nissl staining detection of mice in each group($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	CA1 区神经元数量 /个	CA3 区神经元数量 /个
空白	—	74.67±5.51	49.33±9.71
APP/PS1	—	23.33±3.77 ¹⁾	19.00±9.64 ¹⁾
酸枣仁汤	12.96	60.33±14.57 ³⁾	28.00±6.08
	25.92	55.67±18.68 ²⁾	40.00±4.36 ²⁾

采用 NeuN 的免疫组织化学来标记神经元,结果显示,与空白组相比,APP/PS1 组小鼠海马 CA1 区和 CA3 区 NeuN 阳性神经元数量显著减少;与 APP/PS1 组相比,酸枣仁汤低剂量组小鼠海马 CA1 区和 CA3 区 NeuN 阳性神经元数量显著增加;与 APP/PS1 组相比,酸枣仁汤高剂量组小鼠海马 CA1 区 NeuN 阳性神经元数量显著增加,见图 4、表 3。

3.5 酸枣仁汤对 APP/PS1 小鼠海马 A β 沉积的影响 与空白组相比,APP/PS1 组小鼠海马有显著 A β 沉积;与 APP/PS1 组相比,酸枣仁汤低、高剂量组小鼠海马 A β 沉积显著减少,见图 5、表 4。

3.6 酸枣仁汤通过激活 PI3K/Akt 通路抑制 Bax/Bcl-2/caspase-3 介导的细胞凋亡 Western blot 检测显示,与空白组相比,APP/PS1 组小鼠海马中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达水平均显著下降;与 APP/PS1 组相比,酸枣仁汤低剂量组、高剂量组小鼠海马中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达水平均显著升高。在凋亡相关蛋白方面,与空白组相比,APP/PS1 组小鼠海马中 Bcl-2 蛋白表达水平下降,Bax、cleaved-caspase-3/caspase-3 蛋白表达水平均显著上升;与 APP/PS1 组相比,酸枣仁汤低剂量组小鼠海马中 Bcl-2 蛋白表达水平显著上升,Bax、cleaved-caspase-3/caspase-3 蛋白表达水平均显著下降;与 APP/PS1 组相比,酸枣仁汤高剂量组小鼠海马中 Bax、cleaved-caspase-3/caspase-3 蛋白表达水平均显著下降,见图 6、表 5。

4 讨论

酸枣仁汤有效成分复杂,因此需明确酸枣仁汤抗 AD 的潜在化合物。本课题组前期采用 LC-MS/MS 检测 SZRD 提取物的有效成分,发现 SZRD 提

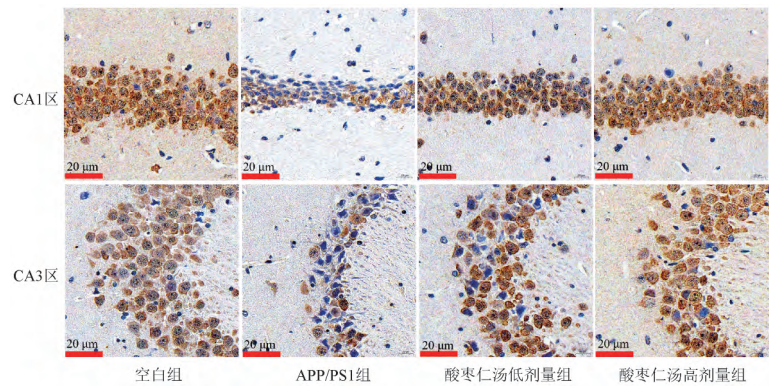


图 4 各组小鼠海马组织 NeuN 免疫组化检测

Fig.4 Immunohistochemical detection of NeuN in hippocampal tissue in mice of each group

表 3 各组小鼠 NeuN 阳性表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Positive expression of NeuN in mice of each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	CA1 区 NeuN 阳性表达 /个	CA3 区 NeuN 阳性表达 /个
空白	—	76.33±17.79	68.67±6.81
APP/PS1	—	20.33±1.53 ¹⁾	15.33±3.51 ¹⁾
酸枣仁汤	12.96	55.00±8.72 ³⁾	32.00±7.21 ²⁾
	25.92	46.67±8.39 ²⁾	28.67±12.10

取物中的 spinosin、6''-feruloylspinosin 和 mangiferin 表现出抗 AD 作用^[6]。研究表明,spinosin 通过抑制 Aβ 产生和增强 Nrf2/HO-1 通路来改善 AD 神经元丢失^[13]。研究表明,6''-feruloylspinosin 可以通过激活线粒体吞噬相关的 Pink1/Parkin 途径减轻秀丽隐杆线虫 AD 模型中 Aβ 诱导的细胞毒性、Aβ 沉积和细胞凋亡^[14]。此外,mangiferin 被证实具有抗氧化、

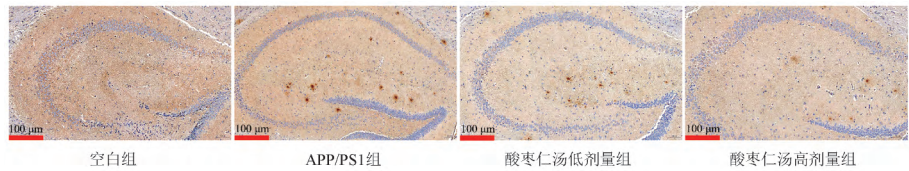


图 5 各组小鼠海马组织 Aβ 免疫组化检测

Fig.5 Aβ immunohistochemistry was performed of mouse hippocampal tissues in each group

表 4 各组小鼠 Aβ 阳性面积定量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Quantification of Aβ positive areas of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Aβ 阳性面积占比 /%
空白	—	1.80±1.81
APP/PS1	—	27.65±7.09 ¹⁾
酸枣仁汤	12.96	6.87±4.17 ³⁾
	25.92	15.47±9.85 ²⁾

抗炎、线粒体保护及抗凋亡的多重药理作用,在 AD 模型中展现出显著的神经保护潜力^[15]。综上所述,这些研究表明 SZRD 是一种潜在的抗 AD 药物。

AD 是一种与细胞衰老相关的神经退行性疾病,以认知功能障碍、记忆力下降及日常行为能力下降等症状为特征^[16]。Morris 水迷宫是学习与记忆

研究的首选经典实验^[12,17-18],因此,本研究采用 Morris 水迷宫评估酸枣仁汤对 APP/PS1 小鼠学习记忆水平的影响,与 APP/PS1 组相比,低、高剂量酸枣仁汤均能缩短逃避潜伏期,延长目标象限停留时间和增加穿越平台次数,表明酸枣仁汤能够改善小鼠认知功能,增强学习记忆水平。

海马是学习记忆中枢,海马神经元受损是导致 AD 患者学习记忆能力下降的直接原因,因此减少神经元损伤是恢复其记忆认知功能的一种重要治疗手段^[19]。尼氏小体是神经细胞中合成神经递质及肽类神经调质的颗粒,对维持神经元稳态起着重要作用,在神经元出现损伤时会减少甚至消失,但在其恢复过程中又会增多^[20-21],可作为评价神经元数量的指标。本研究采用尼氏染色、免疫组化染色标记

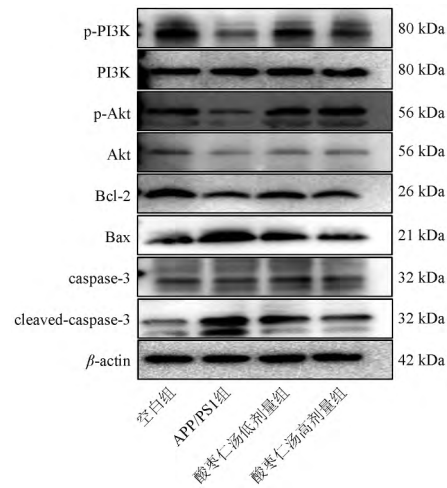


图 6 小鼠海马中 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax、caspase-3、cleaved-caspase-3 蛋白条带
Fig. 6 Bands of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, Bcl-2, Bax, caspase-3, and cleaved-caspase-3 protein in the hippocampus of mice

表 5 各组小鼠海马中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Bcl-2/Bax、cleaved-caspase-3/caspase-3 蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 5 Expression of p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, Bcl-2/Bax, and cleaved-caspase-3/caspase-3 proteins in the hippocampus of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	cleaved-caspase-3/caspase-3
空白	—	1.00±0.04	1.01±0.09	1.00±0.75	1.00±0.48	1.00±0.05
APP/PS1	—	0.56±0.03 ¹⁾	0.61±0.08 ¹⁾	0.68±0.54 ¹⁾	1.81±0.28 ¹⁾	1.71±0.03 ¹⁾
酸枣仁汤	12.96	0.91±0.05 ³⁾	0.94±0.13 ³⁾	0.87±0.96 ²⁾	1.12±0.20 ³⁾	1.06±0.08 ³⁾
	25.92	0.84±0.18 ²⁾	0.93±0.10 ³⁾	0.75±0.59	0.95±0.50 ³⁾	1.13±0.10 ³⁾

与张力蛋白同源物(PTEN)使PI3K产物PIP3去磷酸化为PIP2,从而阻断Akt向细胞膜募集,未被激活的Akt丧失抗细胞凋亡能力,使促凋亡蛋白Bax、cleaved-caspase-3释放增加,抗凋亡蛋白Bcl-2释放减少,从而诱导AD的发生发展^[27-28]。本研究发现酸枣仁汤能够上调PI3K/Akt通路蛋白的表达,从而抑制促凋亡蛋白Bax、cleaved-caspase-3的表达、促进抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,减少神经元凋亡。

综上所述,酸枣仁汤可改善APP/PS1模型小鼠的认知损伤以及海马神经元损伤,其机制与激活PI3K/Akt信号通路从而调控Bax/Bcl-2/caspase-3介导的细胞凋亡相关。本研究为酸枣仁汤治疗AD提供了基础数据,也为相关临床实践提供了一定参考。

利益冲突 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

[1] GENG J, LIU W, XIONG Y, et al. Andrographolide sulfonate improves Alzheimer-associated phenotypes and mitochondrial

海马神经元,结果显示,APP/PS1组小鼠海马中神经元排列松散,且数量减少,而低、高剂量酸枣仁汤在不同程度上能改善APP/PS1模型小鼠海马神经元损伤,但整体酸枣仁汤低剂量组效果更好,与之前研究结果一致^[7-9]。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡,对维持机体稳态起着至关重要的作用^[22-23]。Aβ沉积形成的老年斑是AD重要的病理特征,与认知功能障碍呈正相关^[24],因此减少Aβ沉积对抑制细胞凋亡具有重要作用。PI3K/Akt信号通路是胞内重要的信号转导通路,在调控细胞存活、增殖、生长、代谢和迁移等基本生命活动中扮演核心角色。研究表明,PI3K/Akt信号通路被激活后,可以抑制促凋亡蛋白Bax、cleaved-caspase-3的表达水平,上调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平,从而增强细胞存活能力^[25-26]。相反,Aβ沉积会抑制PI3K/Akt信号通路,上调的磷酸酶

dysfunction in APP/PS1 transgenic mice [J]. Biomed Pharmacother,2018,97: 1032.
[2] ZHANG X X, TIAN Y, WANG Z T, et al. The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention [J]. J Prev Alzheimers Dis, 2021,8(3): 313.
[3] WANG C, HAO J, LIU X, et al. Isoforsythiaside attenuates Alzheimer's disease via regulating mitochondrial function through the PI3K/AKT pathway [J]. Int J Mol Sci,2020,21(16): 5687.
[4] ZHENG M, LIU Z, MANA L, et al. Shenzhiling oral liquid protects the myelin sheath against Alzheimer's disease through the PI3K/Akt-mTOR pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 278: 114264.
[5] KUMARI S, DHAPOLA R, REDDY D H. Apoptosis in Alzheimer's disease: insight into the signaling pathways and therapeutic avenues [J]. Apoptosis,2023,28(7/8): 943.
[6] LONG Q, LI T, ZHU Q, et al. SuanZaoRen decoction alleviates neuronal loss, synaptic damage and ferroptosis of AD via activating DJ-1/Nrf2 signaling pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024,323: 117679.
[7] 龙清华,朱麒行,麦合丽娅·艾斯卡尔,等.酸枣仁汤通过激活AMPK/SIRT1/PGC-1α信号通路改善阿尔茨海默病模型小鼠

- 线粒体功能障碍 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(7): 1256.
- [8] LONG Q H, WU Y G, HE L L, et al. Suan-Zao-Ren Decoction ameliorates synaptic plasticity through inhibition of the $A\beta$ deposition and JAK2/STAT3 signaling pathway in AD model of APP/PS1 transgenic mice [J]. Chin Med, 2021, 16(1): 14.
- [9] 龙清华, 丁莉, 赵宾宾, 等. 酸枣仁汤通过抑制 APP/PS1 双转基因小鼠海马神经炎症发挥神经保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(20): 1.
- [10] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069.
- [11] YIN L, XIAO L, GAO Y, et al. Comparative bioinformatical analysis of pancreatic head cancer and pancreatic body/tail cancer [J]. Med Oncol, 2020, 37(5): 46.
- [12] MONTAG D, PELZ L, RATHJEN F G. Lack of the Ig cell adhesion molecule BT-IgSF (IgSF11) induced behavioral changes in the open maze, water maze and resident intruder test [J]. PLoS ONE, 2023, 18(1): e0280133.
- [13] YANG S, XIE Z, PEI T, et al. Salidroside attenuates neuronal ferroptosis by activating the Nrf2/HO1 signaling pathway in $A\beta_{1-42}$ -induced Alzheimer's disease mice and glutamate-injured HT22 cells [J]. Chin Med, 2022, 17(1): 82.
- [14] YANG T, ZHAO X, ZHANG Y, et al. 6'-Feruloylspinosin alleviated beta-amyloid induced toxicity by promoting mitophagy in *Caenorhabditis elegans* (GMC101) and PC12 cells [J]. Sci Total Environ, 2020, 715: 136953.
- [15] FENG S T, WANG Z Z, YUAN Y H, et al. Mangiferin: a multipotent natural product preventing neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's disease models [J]. Pharmacol Res, 2019, 146: 104336.
- [16] ROSTAGNO A A. Pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1): 107.
- [17] 卓晨琳, 梅峥嵘, 袁中文, 等. 阿魏酸对创伤性脑损伤小鼠的神经保护作用 [J]. 今日药学, 2020, 30(3): 181.
- [18] 毛剑琴, 张誉丹, 曾楚华, 等. 固本健脑液对阿尔茨海默病大鼠学习记忆及睡眠时相的影响 [J]. 世界中医药, 2022, 17(24): 3491.
- [19] KIM T A, SYTY M D, WU K, et al. Adult hippocampal neurogenesis and its impairment in Alzheimer's disease [J]. Zool Res, 2022, 43(3): 481.
- [20] LI J, WEN P Y, LI W W, et al. Upregulation effects of tanshinone II_A on the expressions of NeuN, Nissl body, and I κ B and downregulation effects on the expressions of GFAP and NF- κ B in the brain tissues of rat models of Alzheimer's disease [J]. Neuroreport, 2015, 26(13): 758.
- [21] BLOMGREN K, LEIST M, GROG L. Pathological apoptosis in the developing brain [J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 993.
- [22] RAJESH Y, KANNEGANTI T D. Innate immune cell death in neuroinflammation and Alzheimer's disease [J]. Cells, 2022, 11(12): 1885.
- [23] 王静, 朱康琳, 倪新强, 等. 基于 Bcl-2/Bax/caspase-3 通路探讨熟地黄对注意缺陷多动障碍大鼠纹状体神经元凋亡的影响 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(3): 750.
- [24] BAI R, GUO J, YE X Y, et al. Oxidative stress: the core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease [J]. Ageing Res Rev, 2022, 77: 101619.
- [25] WANG Y, YE X, SU W, et al. Diosmin ameliorates inflammation, apoptosis and activates PI3K/AKT pathway in Alzheimer's disease rats [J]. Metab Brain Dis, 2024, 39(7): 1405.
- [26] 蔡元钦, 向阳, 龙清华, 等. 苘蓉散对阿尔茨海默病大鼠神经元细胞凋亡和 Bax/Bcl-2/caspase3 信号通路的影响 [J]. 中成药, 2025, 47(4): 1128.
- [27] CAI Y, WANG X, XIANG Y, et al. *Codonopsis pilosula* polysaccharides alleviate neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress-activated PERK-ATF4-CHOP signaling in APP/PS1 mice [J]. J Alzheimers Dis, 2025, 106(1): 317.
- [28] YOSSEF R R, AL-YAMANY M F, SAAD M A, et al. Neuroprotective effects of vildagliptin on drug induced Alzheimer's disease in rats with metabolic syndrome: role of hippocampal klotho and AKT signaling pathways [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 889: 173612.

责任编辑 陈瑜