

地黄饮子通过 NDRG2 调节突触可塑性改善 APP/PSI 双转基因小鼠认知功能的作用

玛娜璐璐¹, 梁丽丽¹, 张庆², 袁晓霞^{1*}

1. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830017; 2. 乌鲁木齐市中医医院, 新疆 乌鲁木齐 830002

摘要 目的: 研究地黄饮子对 APP/PSI 双转基因小鼠认知功能的影响, 并探寻其作用机制。方法: 将 45 只雄性 APP/PSI 双转基因小鼠随机分为 5 组, 每组 9 只, 即模型组(给予生理盐水)、盐酸多奈哌齐组(给予盐酸多奈哌齐 $0.84 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、地黄饮子低、中、高剂量组(分别给予地黄饮子 1.25 、 2.5 、 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$); 并将 9 只雄性 C57BL/6J 小鼠作为空白组(给予生理盐水), 连续干预 4 周。4 周后, 采用 Morris 水迷宫实验评估各组小鼠空间学习记忆能力; 尼氏染色观察海马 CA3 区神经元细胞及尼氏小体; 免疫组化(IHC)染色观察海马组织 CA3 区 NDRG2、GFAP; 高尔基染色观察海马组织 CA3 区锥体神经元棘突形态; 免疫荧光染色检测海马组织 CA3 区突触后致密物-95(PSD95)、突触素 SYN 表达; Western blot 检测海马 NDRG2、EAAT1 表达水平。结果: 与模型组比较, 地黄饮子各剂量组 Morris 水迷宫逃避潜伏期减少($P < 0.05$, $P < 0.01$), 目标象限停留时间及目标象限穿越次数均增加($P < 0.05$, $P < 0.01$), 神经元数量、树突分支数及树突棘有所增加, PSD95、SYN 上调($P < 0.05$, $P < 0.01$), GFAP、NDRG2、EAAT1 有所减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 地黄饮子可改善 APP/PSI 双转基因小鼠的认知功能, 其作用机制可能与下调 NDRG2 的表达, 调控星形胶质细胞, 继而下调 EAAT1, 降低突触间隙谷氨酸浓度, 改善突触可塑性, 减轻海马神经元损伤有关。

关键词 地黄饮子; 星形胶质细胞; N-myc 下游调节基因 2; 突触可塑性

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-2392(2026)03-0015-09

DOI: 10.19664/j.cnki.1002-2392.260049

阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)是一种隐匿起病并呈现进行性认知损害的慢性中枢神经系统疾病^[1]。突触可塑性的改变伴随 AD 的发生、发展变化。突触可塑性的持续破坏最初表现为突触数目的减少, 在疾病后期转化为神经元丢失。因此, 推测突触减少是 AD 患者记忆障碍的基础^[2]。随着国内外学者对 AD 的不断深入研究, 越来越多的证据^[3-5]表明星形胶质细胞(Astrocytes, AS)对神经突触可塑性的病理机制发挥重要作用。N-myc 下游调节基因 2(N-myc downstream regulated gene 2, NDRG2)特异性表达于 AS, 有研究^[6-7]表明在 AD 中表达上调, 与 AD 的发生发展密切相关。

中医学对 AD 的研究遵循整体观念理论, 多从五脏入手分析病因病机, 尤其是重视肾-髓-脑之间关系, 肾虚作为 AD 的最基本病机, 贯穿于 AD 的整个病程^[8]。

地黄饮子作为补肾填精防治 AD 的临床常用经典名方, 其疗效确切, 能改善 AD 患者的认知功能障碍, 提高日常生活能力^[9-10]。有关地黄饮子防治 AD 的综述类文献^[11-12]也分析表明, 地黄饮子可通过保护突触功能、调节能量代谢、改善氧化应激和调节脑肠轴等方式改善 AD。尤其是近年来, 地黄饮子围绕突触可塑性的机制研究颇多, 但目前其调控突触可塑性的中间过程机制还尚未明确^[13]。基于以上 NDRG2 与 AS、AS 与突触可塑性以及地黄饮子与突触可塑性之间的关系, 本研究试从 NDRG2 通过星形胶质细胞调节突触可塑性的角度, 探讨地黄饮子治疗 AD 的可能作用机制, 为从肾髓论治 AD 提供实验依据。

1 实验材料

1.1 实验动物

APP/PSI 双转基因雄性小鼠 45 只, 鼠龄 4 个月;

收稿日期: 2025-01-03 修回日期: 2025-09-28

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2021D01C266; 2020D01C174)

作者简介: 玛娜璐璐(1988-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 神经退行性疾病的中西医结合基础研究。

* 通信作者: 袁晓霞(1981-), 女, 博士, 副教授, 主治医师, 研究方向: 中医药防治老年性疾病。

同月龄 C57BL/6J 野生型小鼠 9 只, 许可证号: SCXK (苏) 2020-009。动物饲养于新疆医科大学实验动物中心 SPF 级屏障内, 12 h 明暗交替照明, 室温 (24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 (50 ± 10) %, 给予常规饲料, 正式实验开始前进行 7 d 的适应性喂养。本实验经新疆医科大学动物实验伦理委员会审批通过 (审批编号: IACUC-20230217-22)。

1.2 实验药物

地黄饮子出自刘完素《宣明论方》, 按原方药量制备, 组方: 熟地黄 15 g, 山茱萸 15 g, 肉苁蓉 15 g, 肉桂 15 g, 制附子 15 g, 巴戟天 15 g, 石斛 15 g, 石菖蒲 15 g, 远志 15 g, 茯苓 15 g, 麦冬 15 g, 五味子 15 g, 薄荷 15 g, 生姜 10 g, 大枣 g, 每剂合计 210 g。盐酸多奈哌齐片来源于卫材 (中国) 药业有限公司, 批号 H20050978。

1.3 主要试剂和仪器

高尔基染色固定液 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 G1069); 尼氏染色液 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 G1436); Anti-NDRG2、Anti-GFAP、Anti-EAAT1 (Abcam 公司, 批号 ab174850、ab207165、ab181036); Anti-PSD95、Anti-SYN (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号 20665-1-AP、17785-1-AP); 山羊抗兔二抗 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 A0279)。

水迷宫 (成都泰盟软件有限公司, 型号: WMT-200A); 振动切片机 (莱卡公司, 型号: VT1000S); 全景切片扫描仪 (3DHISTECH 公司, 型号: PANNORAMIC DESK/MIDI/250/1000); 蛋白电泳仪 (北京六一生物技术有限公司, 型号: TE77XP); 荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司, 型号: IX71-A12FL/pH 值)。

2 实验方法

2.1 药物制备

将按剂量称取的地黄饮子中药饮片浸泡于其 8 倍量的蒸馏水中, 2 h 后煎煮, 交替使用武火和文火煎煮 30 min, 并将药液过滤; 共煎煮两次, 合并滤液后, 浓缩成浸膏 (1 g 浸膏相当于 14 g 生药), 4°C 冷藏保存备用。

2.2 分组与给药

将 45 只雄性 APP/PS1 双转基因小鼠随机分为 5 组, 每组 9 只, 即模型组、地黄饮子低、中、高剂量组及盐酸多奈哌齐组, 将 9 只 C57BL/6J 野生型小鼠设为空白组。根据人的临床常规用量换算小鼠的灌胃剂量, 确定地黄饮子中剂量组剂量为 $2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 地黄饮子低、高剂量分别为中剂量的 0.5 倍与 2 倍, 即 $1.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 与 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 盐酸多奈哌齐组

给予 $0.84 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 空白组和模型组则给予等体积的生理盐水, 各组均连续给药 4 周。

2.3 Morris 水迷宫行为学实验观察 APP/PS1 小鼠学习记忆能力

在进行测试时, 水迷宫的水位被设定在平台之上 1 cm 处。为了确保更精确地捕捉小鼠的巡行轨迹, 在水中加入白色食用色素, 并在测试小鼠身上做反光标记。实验分为两个阶段, ①定位航行实验, 小鼠每天分别从四个象限入水进行训练, 每次的入水点保持一致, 且头朝向池壁, 入水即开始记录寻找平台的潜伏期, 小鼠被赋予 60 s 的时间以寻找隐藏平台。若小鼠在规定时间内成功定位平台, 则其潜伏期即为实际所用时间。若未能在 60 s 内找到平台, 则记录潜伏期为 60 s, 并引导小鼠至平台停留 10 s 以进行记忆巩固。连续 5 d 进行此过程, 评估小鼠学习能力。②空间探索实验, 移除平台后, 各组小鼠均在平台对侧象限入水, 仅记录 1 次小鼠 60 s 内穿越原平台所在象限的次数及停留时间, 评估小鼠记忆能力。

2.4 APP/PS1 小鼠脑组织标本制备

Morris 水迷宫空间探索实验结束后, 各组小鼠经腹腔注射 4% 戊巴比妥钠进行麻醉, 并每组随机选取 3 只小鼠不经灌注, 迅速剥离脑组织, 用蒸馏水冲洗表面血液后, 尽快放入高尔基染色液中; 各组剩余 6 只小鼠均用冰生理盐水进行灌注, 断头取脑。其中 3 只用于免疫蛋白测定, 剥离海马组织, 液氮中冻存; 3 只用于尼氏染色、免疫组化染色及免疫荧光测定, 取全脑制成石蜡切片备用。

2.5 尼氏染色观察 APP/PS1 小鼠神经元

对各组小鼠脑组织的石蜡切片进行脱蜡和脱水处理。随后将切片浸入尼氏染液中染色 30 min, 再经蒸馏水冲洗后分化, 最后脱水透明, 中性树胶封片。在显微镜下观察并记录神经元的形态、尼氏体的分布、形态等。

2.6 免疫组化染色观察 APP/PS1 小鼠海马组织 NDRG2、GFAP

对各组小鼠脑组织的石蜡切片进行脱蜡和脱水处理。经抗原修复、加内源性过氧化物酶阻断剂后, 分别滴加一抗 NDRG2 (1:200) 和 GFAP (1:200), 4°C 孵育过夜后, 滴加二抗孵育并用 DAB 显色。显微镜下观察显色情况后, 苏木素复染, 使细胞核着色, 再经蒸馏水冲洗后分化, 最后脱水透明, 中性树胶封片。应用 Image J 软件分析阳性面积比率及染色强度转化, 计算 H-score 评分。

2.7 高尔基染色观察 APP/PS1 小鼠海马组织锥体神

神经元棘突形态

脑组织在高尔基染色液中避光处理 14 d,其间每 2 d 换 1 次新染液,然后将脑组织置于组织处理液(30%蔗糖溶液)中 4 ℃中避光继续处理 3 d,取出进行振动切片(厚度 60 μm),在全景切片扫描仪下观察并采集图像。

2.8 免疫荧光染色检测 APP/PS1 小鼠海马组织 PSD-95、SYN 表达

脱蜡和脱水处理后的各组小鼠脑组织石蜡切片经抗原修复、加内源性过氧化物酶阻断剂后,加入 PSD95 抗体,于 4 ℃条件下孵育过夜。随后滴加 HRP 标记的二抗,并在室温下孵育 50 min。接着滴加 TSA,并在避光条件下于室温下孵育 10 min。经过微波处理后,再次加入 SYN 抗体,并重复 4 ℃孵育过夜及滴加荧光二抗的过程。之后,加入 DAPI 染液,在避光条件下于室温下孵育 10 min。经过自发荧光淬灭处理后,用抗荧光淬灭封片剂封片,在全景切片扫描仪下观察并采集图像。应用 ImageJ 软件分析阳性面积及累积光密度,计算平均光密度。

2.9 Western blot 检测 APP/PS1 小鼠 NDRG2、EAAT1 蛋白表达水平

从各组小鼠海马组织中精确称取 10 mg 样本,执行研磨及裂解步骤以提取总蛋白。采用 BCA 法对蛋白浓度进行定量分析。随后,将蛋白样本进行 SDS-PAGE 电泳分离,并将分离后的蛋白转移至 PVDF 膜上。在室温条件下进行膜封闭处理 2 h,接着加入稀释至 1:2 000 比例的 NDRG2、EAAT1 抗体,于 4 ℃环境下过夜孵育。使用 TBST 缓冲液进行 3 次洗涤后,加入

二抗并室温孵育 1 h,再次用 TBST 缓冲液洗涤 3 次。通过化学发光法进行显影和定影处理,最后利用凝胶成像系统进行扫描、保存图片。所得 NDRG2、EAAT1 蛋白条带图片运用 Image J 计算灰度值,并计算相对表达量,做均值化处理。

2.10 统计方法

数据处理采用 SPSS 26.0 软件,结果以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组数据符合正态分布,采用单因素方差分析进行多组间比较,并结合 LSD 法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。利用 Graph Pad Prism 8.0 软件绘制数据图表。

3 结果

3.1 地黄饮子对 APP/PS1 小鼠学习记忆能力的影响

表 1 显示,与空白组相比,模型组小鼠定位航行实验第 1~5 天逃避潜伏期延长(第 1~2 天 $P < 0.05$,第 3~5 天 $P < 0.01$);与模型组比较,地黄饮子各剂量组及盐酸多奈哌齐组第 1~5 天逃避潜伏期均缩短,但差异性情况不同,第 1~2 天地黄饮子各剂量组差异均无统计学意义($P > 0.05$),第 3~4 天地黄饮子低、中剂量组差异明显($P < 0.05$);第 5 天地黄饮子中、高剂量组差异明显($P < 0.01$, $P < 0.05$);盐酸多奈哌齐组第 1~4 天差异无统计学意义($P > 0.05$),第 5 天差异明显($P < 0.05$),定位航行实验各组 APP/PS1 小鼠代表性轨迹图见图 1。表 2 显示,空间探索实验中,与空白组比较,模型组目标象限停留时间及目标象限穿越次数均明显减少($P < 0.01$);与模型组比较,地黄饮子低、中、高剂量组及盐酸多奈哌齐组目标象限停留时间及目标象限穿越次数均增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 1 地黄饮子对 APP/PS1 小鼠逃避潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
空白组	52.11 ± 5.28	45.06 ± 9.71	39.25 ± 9.00	33.63 ± 8.44	28.86 ± 7.39
模型组	57.25 ± 4.05 ^a	53.19 ± 5.62 ^a	52.43 ± 8.69 ^{aa}	50.33 ± 6.92 ^{aa}	47.43 ± 4.42 ^{aa}
盐酸多奈哌齐组	58.73 ± 4.05	50.35 ± 9.67	46.17 ± 11.29	43.01 ± 11.00	39.71 ± 8.18 ^b
地黄饮子低剂量组	58.20 ± 4.48	51.09 ± 10.30	42.96 ± 9.34 ^b	41.67 ± 9.51 ^b	41.03 ± 6.43
地黄饮子中剂量组	56.59 ± 7.85	47.31 ± 6.59	43.01 ± 8.52 ^b	40.76 ± 12.47 ^b	37.11 ± 10.58 ^{bb}
地黄饮子高剂量组	58.13 ± 4.39	49.84 ± 4.36	46.60 ± 10.92	43.89 ± 8.32	39.67 ± 8.06 ^b

注:与空白组比较,^a $P < 0.05$,^{aa} $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^{bb} $P < 0.01$ 。

表 2 地黄饮子对 APP/PS1 小鼠空间探索能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 9$)

组别	目标象限停留时间/s	目标象限穿越次数/次
空白组	26.99 ± 7.19	6.67 ± 2.78
模型组	6.23 ± 3.68 ^{aa}	2.89 ± 1.76 ^{aa}
盐酸多奈哌齐组	17.21 ± 5.01 ^{bb}	5.89 ± 1.27 ^{bb}
地黄饮子低剂量组	13.40 ± 3.46 ^{bb}	4.67 ± 1.94 ^b
地黄饮子中剂量组	18.19 ± 5.85 ^{bb}	5.89 ± 1.62 ^{bb}
地黄饮子高剂量组	16.88 ± 5.05 ^{bb}	5.44 ± 1.51 ^{bb}

注:与空白组比较,^{aa} $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^{bb} $P < 0.01$ 。

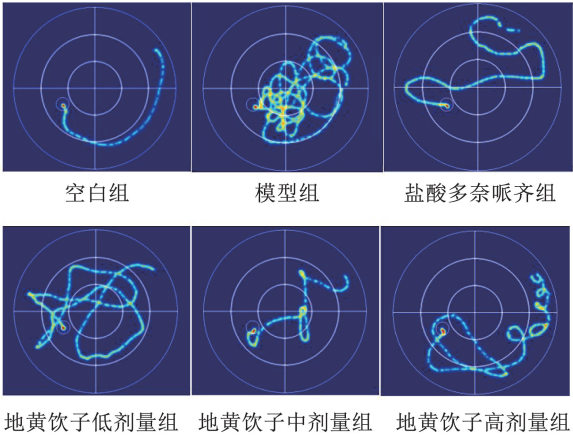


图 1 Morris 水迷宫定位航行实验各组小鼠代表性轨迹图

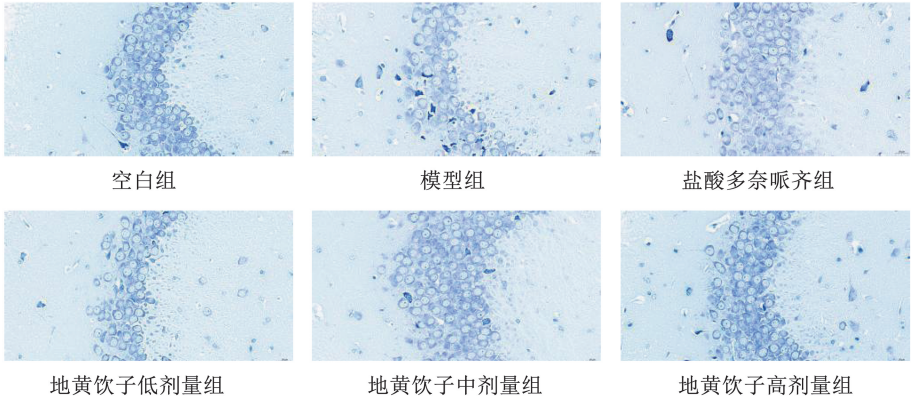


图 2 地黄饮子对 APP/PS1 小鼠海马组织 CA3 区神经元的影响 (×400, n=3)

3.3 地黄饮子对 APP/PS1 小鼠海马组织 CA3 区 NDRG2、GFAP 表达的影响

表 3 显示,与空白组相比,模型组小鼠海马 CA3 区 NDRG2、GFAP 均明显上升,差异具有统计学意义 ($P<0.01$);与模型组比较,地黄饮子中剂量组与盐酸多奈哌齐组的 NDRG2、GFAP 明显减少 ($P<0.05$)。各组小鼠 CA3 区 NDRG2、GFAP 免疫组化染色结果见图 3A、3B。

表 3 地黄饮子对 APP/PS1 小鼠海马组织 CA3 区 NDRG2、GFAP 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	NDRG2	GFAP
空白组	108.43 ± 6.75	100.83 ± 17.19
模型组	175.02 ± 14.87 ^{aa}	176.33 ± 24.72 ^{aa}
盐酸多奈哌齐组	147.67 ± 17.24 ^b	131.08 ± 19.16 ^b
地黄饮子低剂量组	155.42 ± 19.58	145.97 ± 22.22
地黄饮子中剂量组	138.89 ± 19.48 ^b	137.06 ± 22.19 ^b
地黄饮子高剂量组	151.67 ± 7.85	143.93 ± 20.86

注:与空白组比较,^{aa} $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

3.2 地黄饮子对 APP/PS1 小鼠海马组织 CA3 区神经元的影响

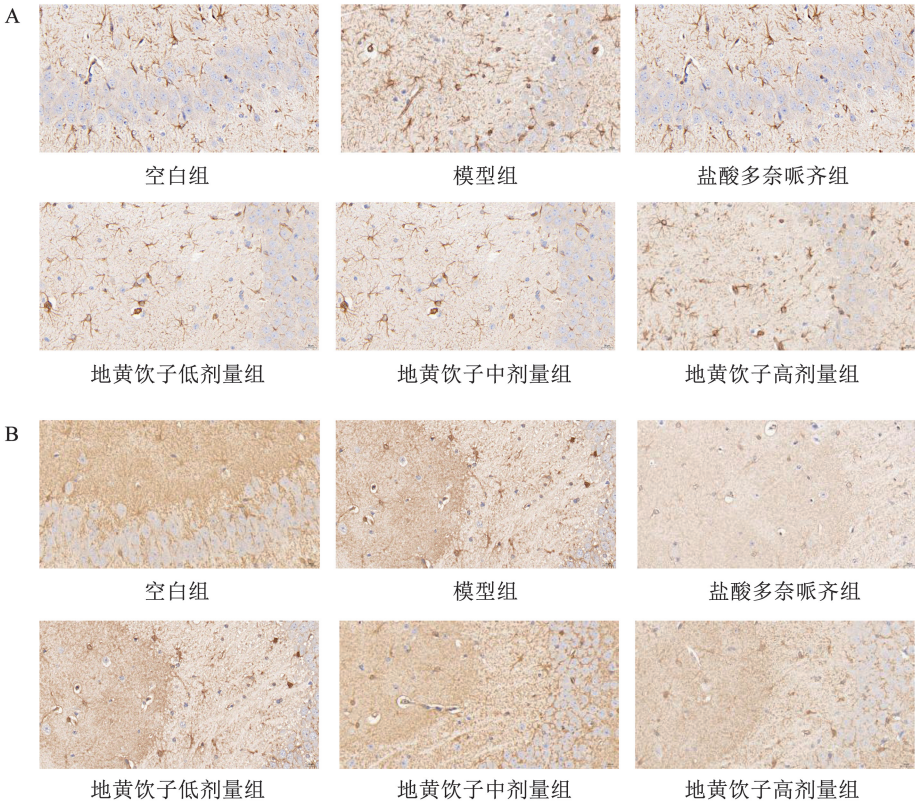
图 2 显示,通过尼氏染色法观察,空白组神经元排列均匀且致密,细胞结构保持完整,细胞核、胞体、轴突均清晰可辨。胞质中尼氏小体分布广泛,排列有序,染色均匀。而模型组的神经元排列较为疏散,层次和数量均有所下降,部分细胞质出现皱缩现象,尼氏小体数量减少且染色不均,同时观察到细胞坏死和核溶解现象。而盐酸多奈哌齐组以及地黄饮子低、中、高剂量组的神经元排列相对整齐,数量有所增加,且细胞结构保持相对完整,尼氏小体也数量较多,以盐酸多奈哌齐组、地黄饮子中、高剂量组更为明显。

3.4 地黄饮子对 APP/PS1 小鼠海马组织高尔基染色锥体神经元棘突形态的影响

图 4 显示,经高尔基染色法处理后,空白组小鼠海马组织 CA3 区域的锥体神经元展现出规则的形态特征,其树突分支和树突棘数量均较为密集;相比之下,模型组小鼠海马 CA3 区域的锥体神经元形态则显示出不规则性,树突分支数量及树突棘数量显著减少。而盐酸多奈哌齐组以及地黄饮子低、中、高剂量组小鼠海马 CA3 区域的树突分支数量及树突棘数量相较于模型组有所增加,形态相对规则,其中地黄饮子各剂量组的改善效果尤为显著。

3.5 地黄饮子对 APP/PS1 小鼠海马组织 PSD95、SYN 免疫荧光染色的影响

表 4 显示,与空白组相比,模型组小鼠海马组织 PSD95、SYN 免疫荧光染色均明显下降,差异具有统计学意义 ($P<0.01$);与模型组比较,地黄饮子中、高剂量组及盐酸多奈哌齐组 PSD95 均有所上升 ($P<0.05$, $P<0.01$),SYN 则地黄饮子中剂量组与盐酸多奈哌齐组上升显著 ($P<0.05$)。各组小鼠海马组织 PSD95、SYN 免疫荧光染色图见图 5。



注:A. 各组小鼠 CA3 区 NDRG2 免疫组化染色图;B. 各组小鼠 CA3 区 GFAP 免疫组化染色图。
图 3 地黄饮子对 APP/PS1 小鼠海马组织 CA3 区 NDRG2、GFAP 表达的影响(× 400, n = 3)

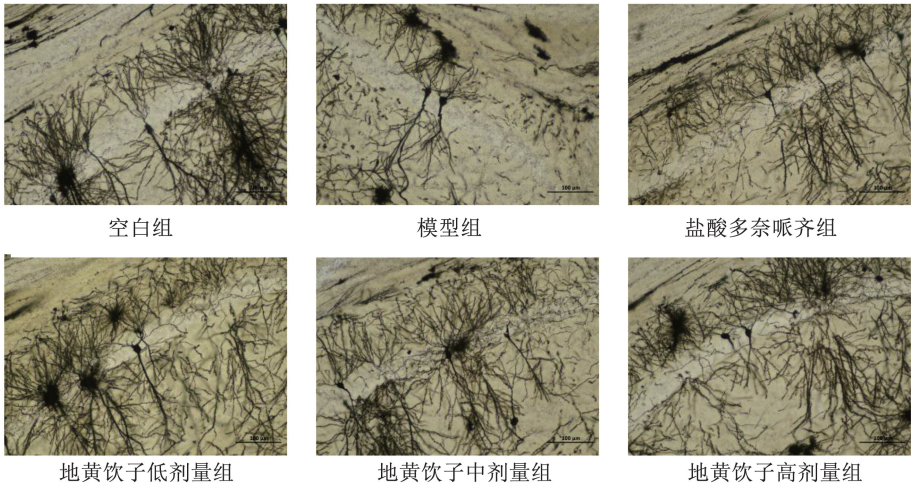


图 4 地黄饮子对 APP/PS1 小鼠海马组织高尔基染色锥体神经元棘突形态的影响(× 200, n = 3)

表 4 地黄饮子对 APP/PS1 小鼠海马组织 PSD95、
SYN 免疫荧光染色的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	PSD95	SYN
空白组	0.193 ± 0.013	0.132 ± 0.027
模型组	0.144 ± 0.008 ^{aa}	0.085 ± 0.012 ^{aa}
盐酸多奈哌齐组	0.167 ± 0.003 ^{bb}	0.115 ± 0.006 ^b
地黄饮子低剂量组	0.154 ± 0.006	0.090 ± 0.006
地黄饮子中剂量组	0.176 ± 0.007 ^{bb}	0.120 ± 0.003 ^b
地黄饮子高剂量组	0.160 ± 0.004 ^b	0.098 ± 0.021

注:与空白组比较,^{aa} $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^{bb} $P < 0.01$ 。

3.6 地黄饮子对 APP/PS1 小鼠海马组织 NDRG2、

EAAT1 蛋白表达的影响

表 5 及图 6 结果显示,与空白组相比,模型组小鼠海马组织 NDRG2、EAAT1 蛋白表达水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,盐酸多奈哌齐组及地黄饮子中、高剂量组小鼠海马组织 NDRG2 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),但地黄饮子低剂量组有所升高($P < 0.01$);与模型组相比,盐酸多奈哌齐组、地黄饮子各剂量组小鼠海马组织 EAAT1 蛋白表达水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

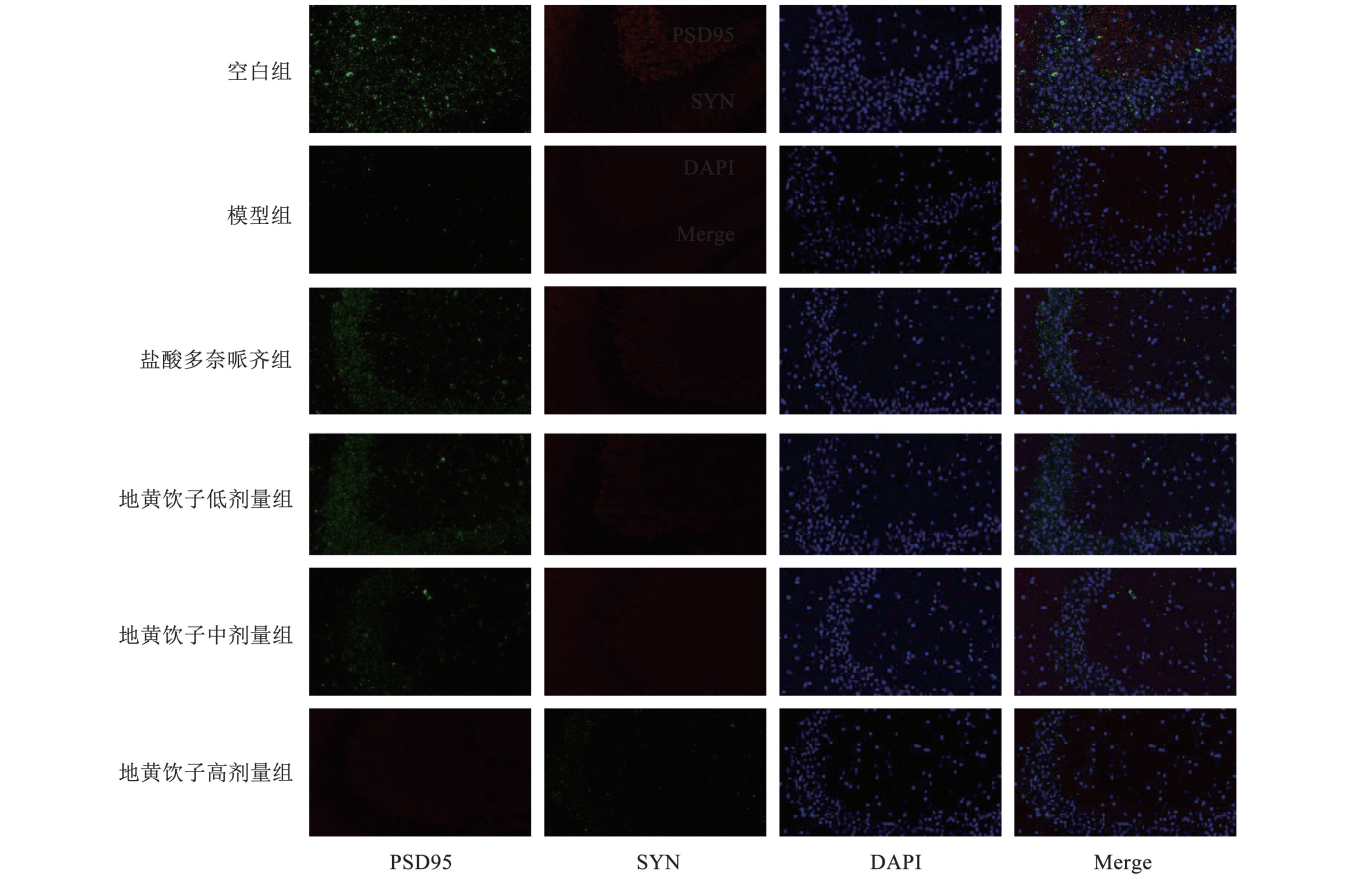


图 5 各组小鼠海马组织 PSD95、SYN 免疫荧光染色图(×40, n = 3)

表 5 地黄饮子对 APP/PS1 小鼠海马组织 NDRG2、EAAT1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	NDRG2	EAAT1
空白组	1.000 ± 0.002	1.000 ± 0.003
模型组	1.074 ± 0.005 ^{aa}	1.168 ± 0.003 ^{aa}
盐酸多奈哌齐组	0.901 ± 0.004 ^{bb}	1.020 ± 0.003 ^{bb}
地黄饮子低剂量组	1.152 ± 0.002 ^{bb}	0.930 ± 0.002 ^{bb}
地黄饮子中剂量组	1.068 ± 0.002 ^b	0.821 ± 0.001 ^{bb}
地黄饮子高剂量组	0.963 ± 0.003 ^{bb}	0.725 ± 0.005 ^{bb}

4 讨论

AD 属于中医“痴呆”“健忘”“呆症”等范畴,其病位在脑。脑以髓为体,以神为用^[14],其与肾的关系极为密切。后世从肾论治脑相关疾病的学术思想深受《灵枢·本神》“肾藏精,精舍志”学说的影响^[15]。肾与脑以经络为中介相连属,肾精充足,经气盛,则肾脑相济,神机灵活^[16];反之,当肾精不足,经气衰时,则髓海空虚,神机迟滞。地黄饮子,具有补肾填精、豁痰开窍之功效,与 AD 的基本病机相契合。

目前 AD 的临床常规治疗药物,主要是乙酰胆碱酯酶抑制剂、兴奋性氨基酸受体拮抗剂等,多是在 AD 的早期对改善症状有一定的作用^[17],作用机制也是多方面的。盐酸多奈哌齐作为乙酰胆碱酯酶抑制剂的典型代表药物,其通过调节突触可塑性改善症状的作用明确的,常被作为 AD 实验研究的对照药物^[18-19],故本实验也同样选择盐酸多奈哌齐作为对照药物。

研究发现,AD 患者早期可出现明显记忆障碍,随着疾病发展会出现空间定向障碍^[20],AD 的动物模型也符合这一空间定向障碍的特征。Morris 水迷宫是由 Richard G. Morris 于 1981 年设计并公布的,以动物的空间定向能力测评学习记忆功能,其原理与人类的空

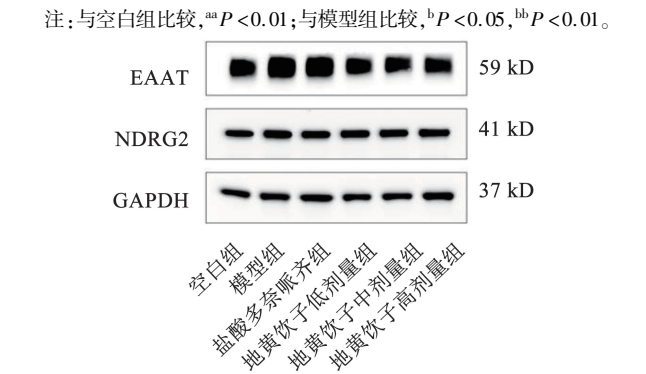


图 6 APP/PS1 小鼠海马组织 NDRG2、EAAT1 蛋白表达印迹图(n = 3)

间导航测试相一致。因此 Morris 水迷宫至今仍是评估 AD 模型动物学习记忆能力及干预方法效果不可或缺实验手段^[21]。神经元是学习记忆的生物学基础,其数量及形态的改变直接影响学习记忆功能。海马 CA3 区的神经元是记忆处理的核心枢纽,是 AD 研究和治疗的重要靶点。本研究显示,APP/PS1 小鼠的 Morris 水迷宫逃避潜伏期延长,目标象限停留时间及目标象限穿越次数减少,神经元、尼氏小体数量下降,伴见细胞坏死和核溶解现象,表明 APP/PS1 小鼠的空间定向能力下降,学习记忆存在障碍;地黄饮子及盐酸多奈哌齐可通过不同程度减少 APP/PS1 小鼠的逃避潜伏期,增加目标象限停留时间及目标象限穿越次数,上调神经元、尼氏小体数量,使空间定向能力增强,学习记忆障碍减轻。

AS 作为神经胶质细胞的一种,广泛存在于脑内,是中枢神经系统中数量最为庞大的细胞种类^[22]。在正常生理条件下,AS 通常保持静默状态,其代谢和分泌活动维持基础水平。但是,在病理条件下,AS 会通过多种机制被激活,转变为反应性 AS,以应对神经系统的损伤^[23]。AS 的激活可促进 AD 的进展,导致 Glu 在突触间隙的异常累积^[24],尤其是会造成 AD 的突触可塑性损伤^[25]。且从结构上分析,AS 具备精细的突触周围突起,它们以动态的方式环绕突触,并与突触前及突触后神经元共同构成了“三重突触”结构^[26]。结构上的紧密联系,也为 AS 影响突触可塑性奠定了基础。

NDRG2 特异性高表达于 AS,在一些中枢神经系统疾病中,如 AD、帕金森、缺血性中风等,NDRG2 对于星形胶质细胞有着至关重要的调节作用^[27-28]。有研究发现,NDRG2 的升高在 AS 被激活时甚至会早于胶质纤维酸性蛋白 (Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP)^[29],因此 NDRG2 含量的变化可以反映 AS 的活性变化^[30]。对于促进 AS 吸收谷氨酸 (Glutamate, Glu) 而言,是不可或缺的条件。它可降低 Glu 引起的兴奋性毒性,并有助于保持突触间 Glu 水平的平衡^[31]。所以,NDRG2 作为突触可塑性的调控因子,参与了调节神经系统的发育^[32]。GFAP 是 AS 内的中间丝蛋白,是公认的 AS 的标志蛋白,GFAP 表达上调的程度代表 AS 增生活跃程度^[33]。所以在 AD 发生时,脑内 GFAP 表达增加,摄取 Glu 能力有所下降,从而引起突触间隙 Glu 大量蓄积,产生兴奋性神经毒性损伤^[34],GFAP 在 AD 患者血清中也被证实表达异常^[35]。兴奋性氨基酸转运体 (Excitatory amino acid transporter, EAAT) 主要是 EAAT1 与 EAAT2,可通过改变 Glu 的浓度来调控突触塑性的变化,EAAT1 (啮齿类

动物同源基因为 GLAST),相对 EAAT2 (啮齿类同源基因为 GLT-1) 来说,在 AD 中的研究较少,但其在 AD 中的作用不容忽视。经研究证实,EAAT1 在正常生理条件下低表达,但在 AD 患者的脑内 EAAT1 会高表达,且与 AS 的 GFAP 高表达有相关性^[36]。本研究显示,APP/PS1 小鼠海马的 AS 中 NDRG2、GFAP、EAAT1 表达量上升,表明 AS 再摄取 Glu 能力受损,会产生 Glu 兴奋性毒性;地黄饮子及盐酸多奈哌齐可通过不同程度下调 APP/PS1 小鼠海马 NDRG2、GFAP、EAAT1,从而促进 AS 对 Glu 的再摄取能力,降低 Glu 在突触间隙浓度,减轻 Glu 的兴奋性毒性。

突触是神经元之间相接触的部分,其结构、功能和强度根据神经活动发生改变的特性或现象即被称为突触可塑性^[37]。突触可塑性损伤和突触丢失是早期认知功能障碍的核心事件^[38]。研究表明,调节突触可塑性是改善学习记忆的重要有效途径^[39],其机制需要不断地探索和研究。突触可塑性功能性的改变早于结构性的改变,如功能性蛋白的变化要早于突触数量的减少。突触后致密蛋白 95 (Postsynaptic density protein 95, PSD95) 作为支架蛋白,通常被视为突触后结构完整性的标志^[40],与突触谷氨酸受体、信号蛋白、黏附分子、细胞骨架蛋白等大量对神经元功能有重要作用的支架蛋白相互作用和调节^[41-42]。在 AD 患者脑中, A β 聚集的同时伴有 PSD95 的减少^[30]。突触功能障碍是 PSD 支架蛋白成分稳态失调的结果^[43]。突触素 (Synaptophysin, SYN) 是一种位于突触囊泡膜上的钙结合蛋白,在钙依赖性神经递质的释放过程中起重要作用,参与囊泡转运和排放^[44]。而树突棘是形成突触的重要部位,其数量可随功能而变化,即表现为突触的可塑性结构的改变^[45]。本研究通过免疫荧光检测及高尔基染色显示,APP/PS1 小鼠海马组织突触关键蛋白 PSD95、SYN 表达下降,CA3 区域的锥体神经元形态则显示出不规则性,树突分支数量及树突棘数量显著减少,提示 APP/PS1 小鼠突触可塑性受损。地黄饮子与盐酸多奈哌齐可不同程度上调 PSD95 及 SYN 的表达,神经元锥体形态相对规则,增加树突分支数量及树突棘数量,从而减轻突触结构的损伤,一定程度恢复突触可塑性。

综上,本研究采用 APP/PS1 小鼠作为阿尔茨海默病 (AD) 模型,表明地黄饮子具有下调海马区 NDRG2、GFAP、EAAT1 蛋白表达的作用。该作用进一步增强了谷氨酸 (Glu) 的再摄取过程,有效降低了突触间隙中 Glu 的浓度,从而减轻了其兴奋性毒性,使 PSD95、SYN 突触相关蛋白的表达下调,因此起到了对突触结

构的保护作用,改善了小鼠的突触可塑性和认知功能。未来研究可进一步解析地黄饮子调控 NDRG2 对 AD 突触可塑性作用的具体分子机制,并探索与现有 AD 中医方药以及“形神共养”模式的协同治疗潜力,为临床转化提供更精准的实验依据。

参考文献:

- [1] 吴圣洁,朱余兵,荆莉. 多奈哌齐治疗阿尔茨海默病导致的窦性心动过缓及文献回顾[J]. 中国新药杂志,2022,31(11):1132-1136.
- [2] 沈雪阳,何亚玲,葛朝明. 环状 RNA 在阿尔茨海默病发病机制中的作用[J]. 中南大学学报(医学版),2022,47(7):960-966.
- [3] 张子冉,胡孜维,田会玲. 从调控星形胶质细胞角度探讨中药治疗阿尔茨海默病的机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2025,27(6):1780-1785.
- [4] 张宁,谢璐霜,刘奇,等. 神经胶质细胞与突触可塑性关系的研究进展[J]. 天津医药,2021,49(12):1340-1344.
- [5] 朱金华,李琳琳,周敏,等. 温胆汤含药血清对 10 mmol/L 谷氨酸条件下星形胶质细胞 PSD-95、GAP-43、JIP-3、Cx-43 表达的影响[J]. 中药药理与临床,2022,38(6):8-13.
- [6] 陶亮. 应激反应基因 NDRG2 在 AD 神经病理损伤中的保护作用与机制研究[D]. 西安:第四军医大学,2017.
- [7] WANG F, ZHONG H, LI X, et al. Electroacupuncture attenuates reference memory impairment associated with astrocytic NDRG2 suppression in APP/PS1 transgenic mice[J]. Mol Neurobiol, 2014, 50(2):305-313.
- [8] 袁玉娇,时晶. 田金洲教授治疗早期痴呆用药规律探讨[J]. 世界中医药,2019,14(11):3073-3078.
- [9] 惠婷,林先萍,刘泓毓. 地黄饮子联合盐酸多奈哌齐片治疗轻中度阿尔茨海默病临床研究[J]. 国际中医中药杂志,2020,42(8):745.
- [10] 张娜,王乐,马涛,等. 地黄饮子对轻度阿尔茨海默病患者认知功能的影响[J]. 中国医药导报,2019,16(35):69-72.
- [11] 孙敏燕,郑琴,魏韶峰,等. 基于五脏一体观探讨中医药治疗阿尔茨海默病机制研究的进展[J]. 辽宁中医杂志,2025,52(7):199-208,225.
- [12] 姚辛敏,关慧波. 经典名方地黄饮子的现代应用研究进展[J]. 黑龙江医药,2025,38(1):71-75.
- [13] 刘宁,韩诚,贺文彬,等. 基于 m6A 甲基化修饰调控突触可塑性探究地黄饮子对阿尔茨海默病认知功能的影响[J]. 中华中医药杂志,2024,39(11):6191-6195.
- [14] 任可乐,孟祥龙,祁晓鸣,等. 基于“肾脑相关”的龟龄集对阿尔茨海默病模型大鼠的作用及其机制研究[J]. 现代药物与临床,2022,37(1):1-10.
- [15] 时晶,倪敬年,刘金民,等. 呆病防治的理论源流[J]. 现代中医临床,2022,29(1):29-33.
- [16] 梁雪松. 基于“肾脑相关”理论探讨五子衍宗丸联合针刺对肾精亏虚证血管性痴呆患者氧化应激水平及认知功能的影响[J]. 辽宁中医杂志,2023,50(5):85-89.
- [17] LIU X Y, WU W, LI X J, et al. The compound (E)-2-(3,4-dihydroxystyryl)-3-hydroxy-4H-pyran-4-one alleviates neuroinflammation and cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Neural Regen Res, 2025, 20(11):3330-3344.
- [18] PANG J, HOU J W, ZHOU Z J, et al. Safower yellow improves synaptic plasticity in APP/PS1 mice by regulating microglia activation phenotypes and BDNF/TrkB/ERK signaling pathway[J]. NeuroMolecular Medicine, 2020, 22:341-358.
- [19] SUN Y, ZHANG H L, LIU R Y, et al. Zexieyin formula alleviates Alzheimer's disease via post-synaptic CaMKII modulating AMPA receptor; involved in promoting neurogenesis to strengthen synaptic plasticity in mice hippocampus[J]. Phytomedicine, 2024, 131:155802.
- [20] 李少创,韩诚,张正,等. 地黄饮子调节海马神经突触可塑性作用机制研究[J]. 山东中医药大学学报,2024,48(3):337-347.
- [21] TIAN H L, DING N, GUO M W, et al. Analysis of learning and memory ability in an Alzheimer's disease mouse model using the Morris water maze[J]. J Vis Exp, 2019(152):152:31736488.
- [22] 黄子珊,张业昊,刘建勋. 天然药物调控星形胶质细胞促进缺血性脑卒中后神经修复的研究进展[J]. 中国药理学通报,2024,40(6):1013-1019.
- [23] 谭信哲,王东岩,董旭,等. 基于星形胶质细胞探讨针刺治疗缺血性脑卒中机制的研究进展[J]. 针灸临床杂志,2024,40(4):105-110.
- [24] 余虹霓,孙梦捷,韩广卉,等. 地黄饮子改善 AD 小鼠星形胶质细胞损伤调节突触结构功能的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(8):27-35.
- [25] 张砺冰,梅应兵,徐鑫梓,等. 黄连解毒汤对星形胶质细胞 ODC1 的影响及其在 APP/PS1 小鼠学习记忆中的潜在作用[J]. 四川中医,2024,42(6):72-77.
- [26] 王亚鑫,赵丽. 星形胶质细胞有氧糖酵解及其产物乳酸在阿尔茨海默病突触可塑性中的作用[J]. 生命科学,2022,34(9):1126-1134.
- [27] LI X, WU X Q, LUO P, et al. Astrocyte-specific NDRG2 gene: functions in the brain and neurological diseases[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(13):2461-2472.
- [28] XU J Y, JI T, LI G C, et al. Lactate attenuates astrocytic inflammation by inhibiting ubiquitination and degradation of NDRG2 under oxygen-glucose deprivation conditions[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1):314.
- [29] ZHANG Q J, SHI R, HAO M H, et al. NDRG2 regulates the formation of reactive astrocyte-derived progenitor cells via Notch signaling pathway after brain traumatic injury in rats[J]. Front Mol Neurosci, 2023, 16:1149683.
- [30] 谭云霞,纪可,刘福贵,等. 安寐丹通过调控星形胶质细胞活性改善睡眠剥夺模型大鼠的学习记忆能力[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(7):18-25.
- [31] YIN A Q, GUO H, TAO L, et al. NDRG2 protects the brain from excitotoxicity by facilitating interstitial glutamate uptake[J]. Transl Stroke Res, 2020, 11(2):214-227.
- [32] 陈涛,熊业城,邓春雷,等. NDRG2 在中枢神经系统疾病中的作用[J]. 生命的化学,2020,40(9):1529-1534.
- [33] 樊振宇,包烨华,张永生,等. 麦粒灸对双转基因 AD 小鼠 GFAP 与 Ab1-42 斑块共定位的影响[J]. 上海针灸杂志,2019,38(11):1283-1289.
- [34] MAHMOUD S, GHARAGOZLOO M, SIMARD C, et al. Astrocytes

- maintain glutamate homeostasis in the CNS by controlling the balance between glutamate uptake and release[J]. *Cells*, 2019, 8(2):184.
- [35] 刘雨莹, 张娇珍, 王宝爱, 等. 阿尔茨海默病患者血清 GFAP、BDNF 及 Hcy 水平与认知功能的相关性[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2023, 31(5):282–285.
- [36] OLIVER W G, JASON H Y, THULANI H, et al. Upregulated excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) expression in the human medial temporal lobe in Alzheimer's disease[J]. *Neuroscience*, 2025, 566: 87–96.
- [37] 何欣然, 孙浩, 秦晓颖, 等. 星形胶质细胞在突触可塑性中的研究进展[J]. *神经损伤与功能重建*, 2022, 17(4):215–217, 233.
- [38] 杨计歌, 李立新, 李中华, 等. 山茱萸醇提物调节 LSD1/PSD95 对 A β 25–35 诱导的阿尔茨海默病小鼠神经损伤保护作用的研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2024, 47(3):352–363.
- [39] ZHANG G J, ZHENG D, YU H, et al. Ginkgo biloba extract ameliorates scopolamine-induced memory deficits via rescuing synaptic damage[J]. *Curr Med Sci*, 2022, 42(3):474–482.
- [40] 雷露, 梅书雅, 吕瑛, 等. 基于 CaMKII/RyR3 通路探讨艾灸对阿尔茨海默病小鼠突触可塑性的影响[J]. *针刺研究*, 2025, 50(10): 1161–1168.
- [41] 胡佳, 许傲雪, 胡锐, 等. CXCL7/CXCR2 轴调控突触可塑性在肥胖相关认知功能障碍中的作用[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(5): 881–886.
- [42] ZHU J W, SHANG Y, ZHANG M J. Mechanistic basis of MAGUK-organized complexes in synaptic development and signalling[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17:209–223.
- [43] 张晶晶, 王亚琦, 王培昌. E3 泛素连接酶在阿尔茨海默病中的作用机制研究进展[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2022, 29(4):325–331.
- [44] 张德松, 徐胜春. 柚皮素对 APP/PS1 转基因小鼠淀粉样斑块沉积和胶质细胞活化的抑制作用[J]. *毒理学杂志*, 2020, 34(1):20–24.
- [45] 张松江, 李龙洋, 高剑峰. 电针对 AD 模型小鼠学习记忆功能和海马突触可塑性的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2022, 38(8): 1447–1453.

Effects of Dihuang Yinzi on Improving the Cognitive Function of APP/PS1 Double Transgenic Mice by Regulating Synaptic Plasticity via NDRG2

MANA Lulu¹, LIANG Lili¹, ZHANG Qing², YUAN Xiaoxia¹

1. *Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China;*

2. *Urumqi Traditional Chinese Medicine Hospital, Urumqi 830002, China*

Abstract Objective: To investigate the effects of Dihuang Yinzi on cognitive function of APP/PS1 double transgenic mice and explore its underlying mechanisms. Methods: Forty-five male APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into 5 groups (9 mice per group): namely the model group (normal saline), the donepezil hydrochloride group (0.84 mg/kg/d), and the low-dose, medium-dose, and high-dose Dihuang Yinzi groups (1.25, 2.5, and 5 g/kg/d, respectively). Additionally, 9 male C57BL/6J mice were used as the blank group (normal saline). All groups were treated continuously for 4 weeks. After 4 weeks, the Morris water maze test was used to evaluate spatial learning and memory abilities in each group. Nissl staining was performed to observe neuronal cells and Nissl bodies in the CA3 region of the hippocampus. Immunohistochemical (IHC) staining was used to observe NDRG2 and GFAP in the CA3 region of the hippocampus. Golgi staining was used to examine the morphology of dendritic spines in pyramidal neurons in the CA3 region of the hippocampus. Immunofluorescence staining was used to detect the expression of postsynaptic density protein-95 (PSD95) and synaptophysin (SYN) in the CA3 region of the hippocampus. Western blot was used to measure the expression of NDRG2 and EAAT1 in the hippocampus. Results: Compared with the model group, the escape latency of the Morris water maze in each dose group of Dihuang Yinzi was reduced, and the residence time in the target quadrant and the number of crossings in the target quadrant were increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The number of neurons, the number of dendritic branches, and dendritic spines were increased. PSD95 and SYN were up-regulated ($P < 0.05$), while GFAP, NDRG2, and EAAT1 were decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Conclusion: Dihuang Yinzi can improve the cognitive function of APP/PS1 double transgenic mice. Its mechanism of action may be related to down-regulating the expression of NDRG2, regulating astrocytes, subsequently down-regulating EAAT1, reducing the concentration of glutamate in the synaptic cleft, improving synaptic plasticity, and alleviating hippocampal neuronal damage.

Key words Dihuang Yinzi; Astrocytes; N-myc downstream regulatory gene 2; Synaptic plasticity