

## · 基础研究 ·

生慧颗粒通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路  
改善阿尔茨海默病小鼠学习记忆能力张旖旎<sup>1, 2, 3</sup> 鲁海菲<sup>1, 2, 3</sup> 王 平<sup>2, 3</sup> 林 丽<sup>2</sup> 尹漾阳<sup>2</sup>

**摘要** **目的** 基于磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路探讨生慧颗粒对阿尔茨海默病 (AD) 小鼠学习记忆能力的影响。**方法** 将 30 只 6 月龄雄性 APP/PS1 双转基因小鼠随机分为模型组、生慧颗粒组 (7.02 g/kg)、多奈哌齐组 (0.65 mg/kg), 每组 10 只; C57BL/6J 小鼠 10 只, 设为对照组, 对照组和模型组均给予等体积生理盐水, 每日 1 次, 连续给药 4 周。采用 Morris 水迷宫检测学习记忆能力, HE 染色观察海马 CA1 区病理形态变化, 免疫组化检测海马 CA1 区 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 和 P-Tau<sub>416</sub> 的表达水平, Western Blot 检测海马区 PI3K/Akt/mTOR 通路蛋白及其磷酸化蛋白和 Beclin 1、p62、LC3 蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠平台潜伏期、游泳总路程增加 ( $P<0.01$ ), 穿越平台次数和目标象限停留时间减少 ( $P<0.01$ ); 海马 CA1 区细胞数量减少、排列疏松, 细胞层次减少; A $\beta$ <sub>1-42</sub> 和 P-Tau<sub>416</sub> 蛋白表达增多 ( $P<0.01$ ); PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p62 蛋白表达水平升高 ( $P<0.01$ ), Beclin 1 蛋白表达水平及 LC3 II/LC3 I 比值降低 ( $P<0.01$ )。与模型组比较, 生慧颗粒组和多奈哌齐组小鼠平台潜伏期、游泳总路程均减少 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), 穿越平台次数和目标象限停留时间均增加 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ); 海马 CA1 区细胞数目均增多, 结构相对完整; p-Tau<sub>416</sub>、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p62 蛋白表达水平均降低 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), Beclin 1 蛋白表达水平上调 ( $P<0.01$ ); 生慧颗粒组 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 蛋白表达水平降低 ( $P<0.01$ )、LC3 II/LC3 I 比值上调 ( $P<0.01$ )。**结论** 生慧颗粒能抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 诱导细胞自噬, 促进 A $\beta$ 、磷酸化 Tau 蛋白清除, 改善 AD 小鼠学习记忆能力。

**关键词** 阿尔茨海默病; 生慧颗粒; 自噬; PI3K/Akt/mTOR; 中药复方

**Shenghui Granules Improve Learning Memory in Alzheimer's Disease Mice by Inhibiting PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway** ZHANG Yi-ni<sup>1, 2, 3</sup>, LU Hai-fei<sup>1, 2, 3</sup>, WANG Ping<sup>2, 3</sup>, LIN Li<sup>2</sup>, and YIN Yang-yang<sup>2</sup> 1 School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan (430070); 2 Institute of Geriatrics, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan (430070); 3 Ministry of Education of Elderly Brain Health of Traditional Chinese Medicine Protection Technology and New Product Development Engineering Center, Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan (430070)

**ABSTRACT** **Objective** To investigate the effect of Shenghui Granules on the learning memory ability of Alzheimer's disease (AD) mice based on the Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **Methods** Thirty six-month-old male APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into the model group, the Shenghui Granules group (7.02 g/kg) and the Donepezil group (0.65 mg/kg), with 10 mice in each group, and 10 C57BL/6J mice were selected as the control group. the drugs were administered once daily for 4 weeks, and both of the control and model groups were given equal volume of saline. Morris water maze was used to test the learning memory ability, HE staining

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (No.82130119)

作者单位: 1. 湖北中医药大学基础医学院 (武汉 430070); 2. 湖北中医药大学老年医学研究所 (武汉 430070); 3. 湖北中医药大学教育部老年脑健康中医药防护技术与新产品研发工程中心 (武汉 430070)

通讯作者: 王 平, Tel: 027-68891262, E-mail: pwang54@aliyun.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20240117.003

was used to observe the pathological morphological changes in hippocampal CA1 area, Immunohistochemistry was used to detect the expression level of  $A\beta_{1-42}$  and P-Tau<sub>416</sub> in hippocampal CA1 area, and Western Blot was used to detect the expression level of PI3K/Akt/mTOR pathway proteins and their phosphorylated proteins and Beclin 1, p62 and LC3 proteins in hippocampal area. **Results** Compared with the control group, mice in the model group showed an increase in platform latency and total swimming distance ( $P<0.01$ ) and a decrease in the number of platform crossings and dwell time in the target quadrant ( $P<0.01$ ); a decrease in the number of cells in the hippocampal CA1 region, a sparse arrangement and a decrease in cellular hierarchy; an increase in the expression of  $A\beta_{1-42}$  and P-Tau<sub>416</sub> proteins ( $P<0.01$ ); an increase in PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR and p62 protein expression levels ( $P<0.01$ ); and a decrease in Beclin 1 protein expression levels and LC3 II / LC3 I ratio ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the platform latency and total swimming distance of mice in the Shenghui Granules group and Donepezil group were reduced ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), and the number of platform crossings and dwell time in the target quadrant were increased ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ); the number of cells in the CA1 area of the hippocampus was increased, with relatively intact structure; the levels of p-Tau<sub>416</sub>, PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR and p62 protein expression were all decreased ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), and the levels of Beclin 1 protein expression were all upregulated ( $P<0.01$ );  $A\beta_{1-42}$  protein expression level was decreased and LC3 II / LC3 I ratio was up-regulated in the Shenghui Granules group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Shenghui Granules inhibits the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, induces cellular autophagy, promotes the clearance of  $A\beta$ , phosphorylated Tau proteins, and improves learning and memory in AD mice.

**KEYWORDS** Alzheimer's disease; Shenghui Granules; autophagy; PI3K/Akt/mTOR; Chinese herbal compound

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是临床常见的中枢神经系统退行性疾病, 是最常见的痴呆类型, 占所有痴呆比重的 60%~70%<sup>[1]</sup>。目前, 全球约有 4.16 亿人处于 AD 连续谱中, 患 AD 约有 3.2 千万人<sup>[2]</sup>。AD 发病率、致残率高, 给社会和患者家庭带来了沉重的经济和照料负担。AD 是全球公共健康面临的一个难题, 但 AD 发病机制十分复杂, 目前尚未完全明确, 寻找可有效延缓和阻止 AD 进展的干预手段仍然是一个挑战。

磷脂酰肌醇 3- 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) / 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路广泛存在于各种神经细胞中, 其激活能够抑制自噬进程, 是自噬调控的主要节点<sup>[3, 4]</sup>。近年来研究发现自噬功能障碍与 AD 存在着密切的关系, 大量证据表明, 自噬失调发生在 AD 患者和动物模型中<sup>[5, 6]</sup>。自噬与 AD 基本病理特点的关系密切, 激活自噬可以加速  $\beta$ -淀粉样蛋白 (Amyloid  $\beta$ -protein,  $A\beta$ ) 的代谢以及减少磷酸化的 Tau 蛋白, 自噬功能障碍会加速 AD 的进展<sup>[7, 8]</sup>。因此, 调控细胞自噬, 已成为防治 AD 的一种重要途径<sup>[9]</sup>。

生慧汤出自《辨证录》<sup>[10]</sup>, 是失眠、健忘同治方。课题组前期研究显示生慧汤能改善 AD 模型动物及睡眠剥夺模型动物的昼夜节律紊乱与认知功

能, 并具有抑制神经炎症、改善突触可塑性等神经保护作用<sup>[11-14]</sup>。然而, 生慧汤是否可以通过调控自噬来减缓 AD 进程, 尚未见报道。本实验采用 APP/PS1 双转基因痴呆小鼠作为 AD 模型, 拟从 PI3K/Akt/mTOR 信号通路研究生慧颗粒改善 AD 小鼠认知功能障碍的作用机制, 为其防治 AD 提供更多的实验依据。

## 材料与方法

1 实验动物 30 只 SPF 级 6 月龄雄性 APP/PS1 双转基因小鼠, 体重 25~30 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 许可证号: SCXK (辽) 2020-0001。10 只相同月龄和遗传背景的空白对照 C57BL/6J 小鼠, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 许可证号: SCXK (辽): 2020-0001。饲养于湖北中医药大学中医药实验中心 SPF 级动物房, 动物实验条件许可证号: SYXK (鄂): 2017-0067, 房内温度 23~25℃, 相对湿度 50%~60%, 动物可自由摄食和饮水, 每日光照 12 h。实验同时获得湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准 [No. (2021) IEC 013 号]。

2 药物 生慧颗粒 (组成: 熟地、山茱萸、远志、酸枣仁、柏子仁、茯神、人参、石菖蒲、白芥子) 购自湖北李时珍医药集团, 规格 18 g/ 袋, 批号: 202112001, 使用时加入超纯水溶解, 浓度为

0.702 g/mL。盐酸多奈哌齐片购自卫材药业有限公司,规格 0.5 g/片,批号: H20070181,采用超纯水进行溶解,现配现用,浓度为 0.065 mg/mL。

**3 主要试剂及仪器** BCA 蛋白浓度测定试剂盒、磷酸酶抑制剂混合物 A、磷酸酶抑制剂混合物 B (上海碧云天生物技术有限公司,货号: P0010S、P1081、P1086), RIPA 裂解液、ECL 化学发光底物试剂盒 (北京白鲨生物技术有限公司,货号: BL504A、BL520B), PMSF、 $\beta$ -actin 抗体 (武汉赛维尔生物科技有限公司,货号: G2008-1ML、GB11001), PVDF 膜 (美国 Millipore 公司,货号: IPVH00010、ISEQ00010); PI3K、Akt、mTOR、Beclin-1、LC3A/LC3B、p62、p-Tau<sub>416</sub> 抗体 (武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号: A4992、A18675、A2445、A21191、A5618、A19700、AP1101); p-PI3K、p-mTOR 抗体 (美国 Affinity 公司,货号: AF3241、AF3309); p-Akt 抗体 (美国 Abcam 公司,货号: ab38449); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (北京中杉金桥生物技术有限公司,货号: ZB-2301); A $\beta$  抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司,货号: 25524-1-AP); 苏木素伊红 (HE) 染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司,货号: G1120), DAB 显色试剂盒 (丹麦 Dako 公司,货号: K5007), 其他试剂均为国产分析纯。

Morris 水迷宫 (安徽正华生物仪器设备有限公司,型号: Morris-ZH); 病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司,型号: RM2016); 脱水机、包埋机、冻台 (武汉俊杰电子有限公司,型号: JJ-12J、JB-P5、JB-L5); 组织摊片机 (浙江金华市科迪仪器设备有限公司,型号: KD-P); 烤箱 (天津市莱玻瑞仪器设备有限公司,型号: GFL-230); 染色机 (意大利 DIAPATH 公司,型号: Giotto); 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司,型号: SpectraMax M5); 电泳仪 (北京六一生物技术有限公司,型号: DYY-7C); 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司,型号: SYSTEM GelDoc XR+); 正置荧光显微镜、成像系统 (日本 Nikon 公司,型号: NIKON ECLIPSE E100、NIKON DS-U3); 扫描仪 (匈牙利 3Dhistech 公司,型号: Panoramic Scan)。

**4 分组及干预方法** 适应性饲养 1 周后,根据 SPSS 26.0 软件生成的随机数字表将 30 只 APP/PS1 双转基因痴呆小鼠随机分为模型组、生慧颗粒组、多奈哌齐组,每组 10 只。将 10 只 C57BL/6J 小鼠设为对照组。

根据课题组前期研究及“人和动物体表面积折算等效剂量比率表”<sup>[12, 15, 16]</sup>, 计算生慧颗粒组和多奈哌齐组的给药剂量。生慧颗粒临床用量为 54 g/d, 多奈哌齐临床用量为 5 mg/d<sup>[16]</sup>, 换算动物给药剂量为: 生慧颗粒组给予生慧颗粒溶液 7.02 g/kg 灌胃, 多奈哌齐组给予多奈哌齐溶液 0.65 mg/kg 灌胃, 相当于 70 kg 成人临床用药剂量的 1 倍。空白组和模型组均给予等体积无菌生理盐水灌胃, 每日 1 次, 持续 4 周。给药结束后, 进行行为学及相关指标测试。

## 5 检测指标及方法

**5.1 行为学检测** 治疗结束后, 参考课题组前期研究采用 Morris 水迷宫实验检测小鼠的学习记忆能力<sup>[16]</sup>。Morris 水迷宫实验包括定位航行实验和空间探查实验, 定位航行实验用平台潜伏期评价小鼠的学习能力, 空间探查实验则用穿越平台次数和目标象限停留时间评价小鼠的空间记忆能力。

**5.2 HE 染色观察** 各组小鼠海马 CA1 区病理形态变化 每组取 3 只小鼠, 完整分离脑组织, 放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 乙醇梯度脱水, 石蜡包埋切片 (4  $\mu$ m), 烤片, 二甲苯脱蜡, 常规 HE 染色, 酒精、二甲苯脱水透明, 风干后中性树脂封片<sup>[17]</sup>, 光镜下观察小鼠海马 CA1 区病理变化。

**5.3 免疫组化检测** 各组小鼠海马 CA1 区 A $\beta$ <sub>1-42</sub>、p-Tau<sub>416</sub> 蛋白表达水平 取各组小鼠海马组织石蜡切片 (4  $\mu$ m), 进行常规脱蜡、抗原修复后, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 封闭液室温封闭 1~2 h, 加入相应兔抗小鼠一抗 (稀释比例均为 1:100), 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 冲洗 3 次, 加入山羊抗兔二抗 (稀释比例为 1:200) 室温孵育 1 h。PBS 水洗后使用 DAB 显色, 贴片晾干后, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。封片后于显微镜下观察<sup>[18]</sup>。使用 Image J 软件对阳性染色进行分析。

**5.4 Western Blot 检测** 各组小鼠海马 CA1 区 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p62、Beclin 1、LC3 蛋白表达水平 取冻存的海马组织, 加入预冷的 RIPA 裂解液以提取海马总蛋白, 置于 4  $^{\circ}$ C 离心机以 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度, 加入 5 $\times$  蛋白缓冲液, 置于 100  $^{\circ}$ C 沸水变性 10 min。依据 SDS-PAGE 凝胶试剂盒说明书制备 6% 分离胶、10% 分离胶、15% 分离胶和 5% 浓缩胶, 依次上样、电泳和转膜。置于 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入 1XTBST 稀释后的兔抗小鼠一抗 PI3K (1:1 500)、p-PI3K (1:1 000)、Akt (1:1 500)、p-Akt (1:1 000)、

mTOR (1:1 000)、p-mTOR (1:500)、Beclin 1 (1:2 000)、LC3A/LC3B (1:1 000)、p62 (1:1 000), 置于 4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 置于 PBS 稀释后的山羊抗兔二抗中, 室温孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。滴加 ECL 显色液, 置凝胶成像仪曝光各组蛋白电泳条带, 用 Image J 软件计算条带灰度值, 以  $\beta$ -actin 为内参蛋白, 以目的蛋白与  $\beta$ -actin 的比值为其相对表达量<sup>[19]</sup>。

6 统计学方法 运用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行处理, 用 Graphpad Prism 8.0.1 和 ImageJ 1.8.0 软件处理图像。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 ShapiroWilk 检验对各组数据进行正态性分析, 符合正态分布的多组间比较采用 One-Way ANOVA, 不符合正态分布则用 Kruskal-Wallis H 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

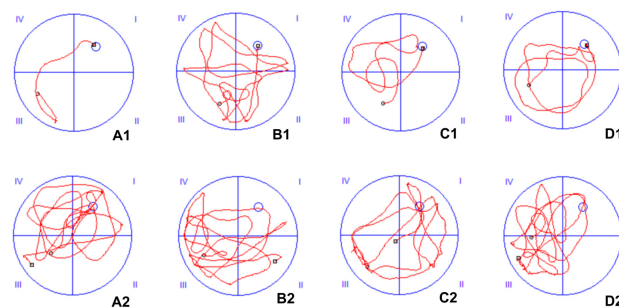
## 结 果

1 各组小鼠一般情况比较 与对照组比较, 模型组小鼠暴躁、易怒, 具有较强的攻击性, 毛发欠光泽且易于脱落。与模型组比较, 生慧颗粒组和多奈哌齐组小鼠暴躁、易怒的状况好转, 攻击性减弱, 毛发有光泽。各组小鼠的饮水及摄食量无明显变化。在干预期间, 各组小鼠均未死亡。

2 各组小鼠行为学检测结果比较 (表 1, 图 1) 定位巡航实验结果显示, 与对照组小鼠比较, 模型组小鼠的平台潜伏期增加, 游泳总路程延长 (P<0.01)。与模型组小鼠比较, 生慧颗粒组及多奈哌齐组小鼠平台潜伏期和游泳总路程降低 (P<0.01)。

空间探索实验结果显示, 与对照组小鼠比较, 模型组小鼠穿越平台次数、目标象限停留时间均减少 (P<0.01)。与模型组小鼠比较, 生慧颗粒组小鼠穿越平台次数、目标象限停留时间均增加 (P<0.01), 多奈哌齐组小鼠穿越平台次数、目标象限停留时间增加 (P<0.05)。与多奈哌齐组小鼠比较, 生慧颗粒组小鼠穿越平台次数增加 (P<0.05)。

3 各组小鼠海马 CA1 区神经元细胞形态结构比较 (图 2) 对照组小鼠海马 CA1 区细胞形态均匀、



注: 1 为水迷宫定位航行实验代表性轨迹图; 2 为空间探索实验代表性轨迹图; A 为对照组; B 为模型组; C 为生慧颗粒组; D 为多奈哌齐组

图 1 各组小鼠 Morris 水迷宫定位航行、空间探索实验代表性轨迹图

排列较整齐, 细胞结构完整, 细胞核完整且清晰可见, 染色均匀。与对照组比较, 模型组小鼠海马 CA1 区细胞数量有所减少、排列疏松, 细胞层次减少, 部分细胞核仁不清, 细胞核肿胀模糊。生慧颗粒组、多奈哌齐组小鼠海马 CA1 区细胞数目相对较多, 排列较为整齐, 结构相对完整, 层次较清晰。

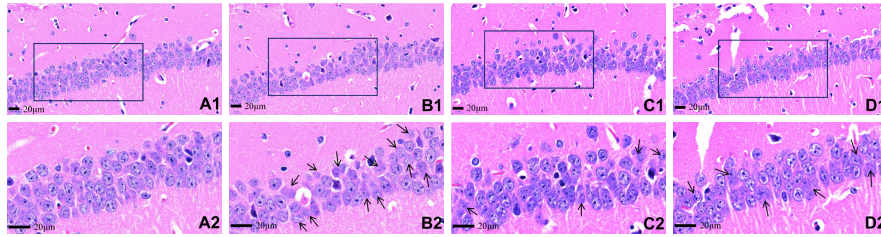
4 各组小鼠海马 CA1 区  $A\beta_{1-42}$ 、p-Tau<sub>416</sub> 表达结果比较 (图 3、4)  $A\beta_{1-42}$ 、p-Tau<sub>416</sub> 免疫组化结果显示, 对照组小鼠海马 CA1 区阳性细胞表达数较少。与对照组比较, 模型组小鼠海马 CA1 区  $A\beta_{1-42}$ 、p-Tau<sub>416</sub> 阳性表达细胞增多 (P<0.01)。与模型组比较, 生慧颗粒组  $A\beta_{1-42}$ 、p-Tau<sub>416</sub> 阳性表达细胞减少 (P<0.01), 多奈哌齐组 p-Tau<sub>416</sub> 阳性表达细胞减少 (P<0.01)。与多奈哌齐组比较, 生慧颗粒组  $A\beta_{1-42}$  阳性表达细胞减少 (P<0.01)。

5 各组小鼠海马通路蛋白 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 及自噬相关蛋白 p62、Beclin 1、LC3 表达水平比较 (图 5、6) 与对照组比较, 模型组 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p62 蛋白表达水平升高 (P<0.01), Beclin 1 蛋白表达水平及 LC3 II/LC3 I 比值降低 (P<0.01)。与模型组比较, 生慧颗粒组 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p62 蛋白表达水平降低 (P<0.01, P<0.05), Beclin 1 蛋白表达水平及 LC3 II/LC3 I 比值上调 (P<0.01);

表 1 各组小鼠 Morris 水迷宫定位巡航能力和空间探索能力比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

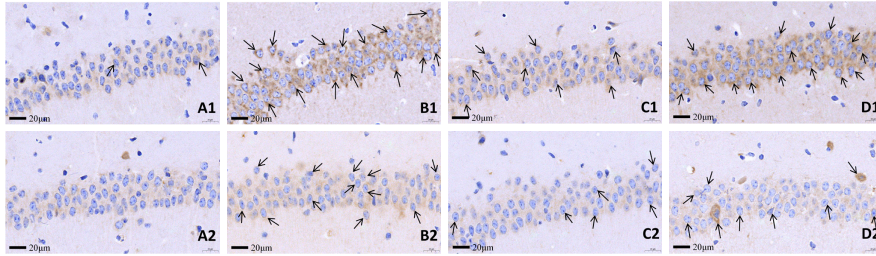
| 组别   | n  | 平台潜伏期 (s)                  | 游泳总路程 (cm)                   | 穿越平台数 (次)                 | 目标象限停留时间 (s)               |
|------|----|----------------------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 对照   | 10 | 9.65 ± 3.09                | 171.33 ± 57.51               | 4.8 ± 0.98                | 26.23 ± 4.50               |
| 模型   | 10 | 43.57 ± 5.82*              | 719.38 ± 96.10*              | 0.9 ± 0.54*               | 13.88 ± 2.15*              |
| 生慧颗粒 | 10 | 18.85 ± 3.70 <sup>△△</sup> | 315.25 ± 83.11 <sup>△△</sup> | 3.9 ± 0.54 <sup>△△▲</sup> | 20.77 ± 3.80 <sup>△△</sup> |
| 多奈哌齐 | 10 | 24.77 ± 5.61 <sup>△△</sup> | 416.33 ± 98.83 <sup>△△</sup> | 3.2 ± 0.75 <sup>△</sup>   | 19.62 ± 4.04 <sup>△</sup>  |

注: 与对照组比较, \*P<0.01; 与模型组比较, <sup>△</sup>P<0.05, <sup>△△</sup>P<0.01; 与多奈哌齐组比较, <sup>▲</sup>P<0.05



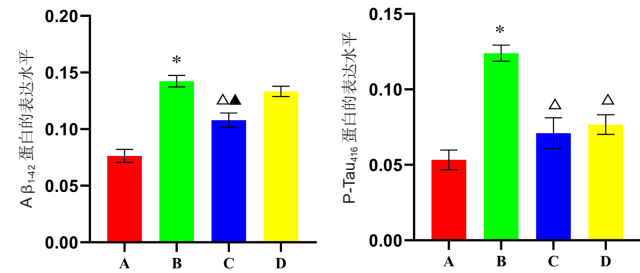
注: A 为对照组; B 为模型组; C 为生慧颗粒组; D 为多奈哌齐组; 2 为 1 中黑框内区域的局部放大; 比例尺为 20  $\mu\text{m}$ ; 箭头所指为细胞核仁不清, 细胞核肿胀模糊的细胞

图 2 各组小鼠海马 CA1 区神经元细胞形态结构 (HE,  $\times 400$ )



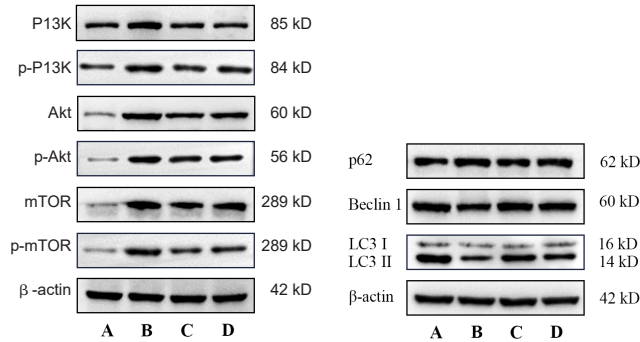
注: 1 为  $\text{A}\beta_{1-42}$  蛋白表达; 2 为  $\text{p-Tau}_{416}$  蛋白表达; A 为对照组; B 为模型组; C 为生慧颗粒组; D 为多奈哌齐组; 比例尺为 20  $\mu\text{m}$ ; 箭头所指为  $\text{A}\beta_{1-42}$ 、 $\text{p-Tau}_{416}$  阳性染色的细胞

图 3 各组小鼠海马 CA1 区  $\text{A}\beta_{1-42}$ 、 $\text{p-Tau}_{416}$  蛋白表达水平 (免疫组化,  $\times 600$ )

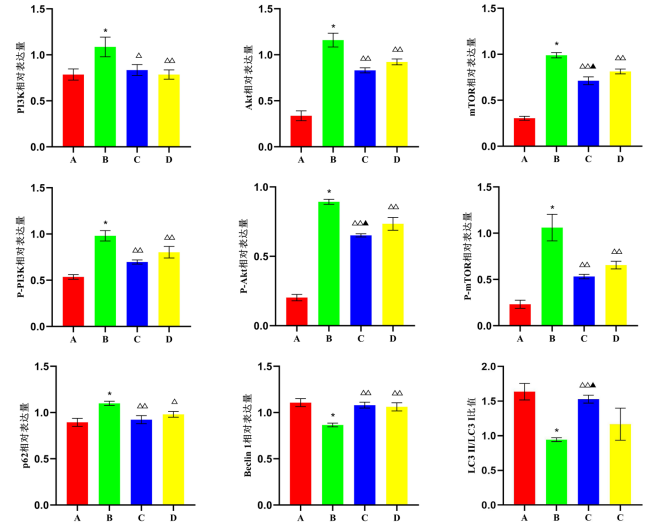


注: A 为对照组; B 为模型组; C 为生慧颗粒组; D 为多奈哌齐组; 与对照组比较,  $*P<0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P<0.01$ ; 与多奈哌齐组比较,  $\Delta P<0.01$

图 4 各组小鼠海马 CA1 区  $\text{A}\beta_{1-42}$ 、 $\text{p-Tau}_{416}$  蛋白平均光密度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )



注: A 为对照组; B 为模型组; C 为生慧颗粒组; D 为多奈哌齐组  
图 5 各组小鼠海马中 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p62、Beclin 1、LC3 蛋白印迹图



注: A 为对照组; B 为模型组; C 为生慧颗粒组; D 为多奈哌齐组; 与对照组比较,  $*P<0.01$ ; 与模型组比较,  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$ ; 与多奈哌齐组比较,  $\Delta P<0.05$

图 6 各组小鼠海马中 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p62、Beclin 1、LC3 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

多奈哌齐组 p-PI3K、PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、p62 蛋白表达水平降低 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), Beclin 1 蛋白表达水平上调 ( $P<0.01$ )。与多奈哌齐组比较, 生慧颗粒组 mTOR、p-Akt 蛋白表达水平下调 ( $P<0.05$ ), LC3 II/LC3 I 比值上调 ( $P<0.05$ )。

## 讨 论

在近几十年的社会经济发展过程中, 中国人口呈现出迅速老龄化的趋势, 根据我国国家统计局 2023 年数据, 我国 60 岁及以上人口为 2.8 亿, 约占总人口的 19.84%<sup>[20]</sup>。作为一种增龄性疾病, AD 的发病率和死亡率高, 目前我国 60 岁以上老年人合并患病率为 3.9%<sup>[21]</sup>, AD 及其他痴呆症是我国人群死亡的第五大原因<sup>[1]</sup>。西药在一定程度上可以改善患者的症状, 但长期疗效尚不理想。中医药在 AD 治疗中具有多靶点、多途径、不良反应小、疗效持久等优点, 可有效延缓病情进展, 并提升患者的生活质量。

AD 在中医学属于“呆病”“痴呆”“健忘”“善忘”等范畴, 病变部位在脑髓, 与心、肝、脾、肾功能失调密切相关, 其中以肾虚为本。病机为髓减脑消、神机失用。生慧颗粒源自生慧汤, 生慧汤由熟地、山茱萸、远志、酸枣仁、柏子仁、茯神、人参、石菖蒲、白芥子组成, 是培元健脑、安神益智的代表方。方中熟地黄、山茱萸补肾填精生髓以治肾水不足, 人参补肾健脾以治脾肾亏虚, 酸枣仁、柏子仁、茯神、远志养心化痰安神以治心神失养, 石菖蒲、白芥子祛痰开窍以治痰蒙脑窍, 全方心肾兼补、益气养血、祛痰开窍, 是痴呆、失眠同治方。

本研究运用 Morris 水迷宫实验评价各组小鼠的认知功能, 发现生慧颗粒连续干预 4 周后, APP/PS1 小鼠平台潜伏期、游泳总路程减少, 穿越平台次数、目标象限停留时间增加, 这说明生慧颗粒可以改善 APP/PS1 小鼠的认知功能。

AD 的主要病理特征是细胞外 A $\beta$  沉积形成的老年斑、胞浆内 Tau 蛋白过度磷酸化形成的神经元纤维缠结以及神经元丢失<sup>[22]</sup>。因此本实验运用 HE 染色观察 APP/PS1 小鼠海马组织结构的变化, 发现生慧颗粒连续干预 4 周后, APP/PS1 小鼠海马 CA1 区神经细胞数目增多, 排列较为整齐, 结构相对完整, 层次较清晰。通过免疫组化检测, 发现生慧颗粒连续干预 4 周后, APP/PS1 小鼠海马 CA1 区 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 和 P-Tau<sub>416</sub> 蛋白表达减少, 说明生慧颗粒可以改善 APP/PS1 小鼠海马的 AD 样病理改变。

PI3K/Akt 信号通路广泛存在于各种类型的细胞中, 是细胞内重要的信号通路, 参与细胞的生长、增殖和分化<sup>[23]</sup>。在神经系统中, 参与调控神经细胞的增殖、分化及自噬、凋亡和突触可塑性<sup>[24]</sup>。PI3K/Akt 信号通路在 AD 发生发展过程中具有重要调控作用, 调控 PI3K/Akt 信号通路可以加速错误折叠蛋白 A $\beta$ 、

磷酸化 Tau 蛋白的清除保护神经系统<sup>[25]</sup>。越来越多的研究也表明中药及其提取物可以通过调控 PI3K/Akt 信号通路, 改善神经损伤, 缓解 AD 病理<sup>[25-27]</sup>。自噬是清除受损蛋白质和细胞器的重要途径, mTOR 是 PI3K/Akt 信号通路的下游靶蛋白, 直接影响细胞自噬。因此本研究运用 Western Blot 检测 PI3K、Akt、mTOR 及其磷酸化蛋白的表达, 发现生慧颗粒连续干预 4 周后, PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 蛋白的表达水平均降低, 说明生慧颗粒可以抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路。

通过调控细胞自噬可以发挥神经保护作用, 为了研究生慧颗粒是否通过调控细胞自噬从而发挥抗 AD 作用, 本研究使用 Western Blot 检测自噬相关蛋白 p62、Beclin 1、LC3, 发现生慧颗粒连续干预 4 周后, p62 蛋白的表达水平降低, Beclin 1 蛋白表达水平和 LC3 II/LC3 I 的值升高。p62 是自噬底物的标记蛋白, 其蛋白含量与自噬水平呈负相关; Beclin 1 是自噬的核心因子, 蛋白含量与自噬水平呈正相关。LC3 是自噬过程的标志物, 当自噬发生时, LC3-I 被活化转变为 LC3-II, 随着自噬体的增多, LC3-II 的聚集量也随之增加, 通常以 LC3 II/LC3 I 的值判断自噬水平的高低。以上结果都表明, 生慧颗粒可以通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活细胞自噬, 发挥神经保护作用。

综上所述, 生慧颗粒可以改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆能力, 其机制与抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 诱导细胞自噬, 促进 A $\beta$ 、磷酸化 Tau 蛋白清除相关。本研究创新之处在于首次从自噬角度探索了生慧颗粒抗 AD 的作用机制, 发现其可以通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导细胞自噬, 为生慧颗粒干预 AD 提供分子生物学依据。不足之处在于缺少体外验证, 对于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路与自噬的关系及抗 AD 的相关机制未进行深入研究。今后将完善相关实验, 进一步探讨生慧颗粒改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力涉及的自噬靶点及其上下游信号通路的调控机制, 为生慧颗粒的临床推广应用提供药理学证据。

**利益冲突:** 本文不存在任何利益冲突。

## 参 考 文 献

- [1] 任汝静, 殷鹏, 王志会, 等. 中国阿尔茨海默病报告 2021[J]. 诊断学理论与实践, 2021, 20(4): 317-337.
- [2] Gustavsson A, Norton N, Fast T, et al. Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum[J]. Alzheimers

- Dement, 2023, 19 (2): 658–670.
- [3] Hasegawa J, Maejima I, Iwamoto R, et al. Selective autophagy: lysophagy[J]. *Methods*, 2015, 75: 128–132.
- [4] 张治楠, 梁丽艳, 连嘉惠, 等. 中枢神经系统 PI3K/AKT/mTOR 信号通路研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36 (5): 689–694.
- [5] 李娇, 袁硕, 张庆镐. 自噬功能障碍与阿尔茨海默病发病机制研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42 (18): 4621–4624.
- [6] Hung C, Livesey FJ. Endolysosome and autophagy dysfunction in Alzheimer disease[J]. *Autophagy*, 2021, 17 (11): 3882–3883.
- [7] Fang EF, Hou Y, Palikaras K, et al. Mitophagy inhibits amyloid-beta and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22 (3): 401–412.
- [8] Kerr JS, Adriaanse BA, Greig NH, et al. Mitophagy and Alzheimer's disease: Cellular and molecular mechanisms[J]. *Trends Neurosci*, 2017, 40 (3): 151–166.
- [9] 曾星开, 薛中峰. 自噬在阿尔茨海默病中的作用及中医药研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29 (3): 273–282.
- [10] 清·陈士铎撰. 古典医籍编辑部. 辨证录[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2020: 162.
- [11] 龙清华, 赵宾宾, 丁莉, 等. 生慧汤对 APP/PS1 双转基因痴呆小鼠海马 JAK2/STAT3/SOCS-1 信号通路的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42 (12): 1484–1492.
- [12] 龙清华, 赵宾宾, 丁莉, 等. 生慧汤通过调节神经递质改善阿尔茨海默病模型小鼠认知损伤和昼夜节律紊乱[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28 (22): 16–22.
- [13] 谭爱华, 龙清华, 王平, 等. 生慧汤对慢性睡眠剥夺模型小鼠的神经保护作用及其机制[J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42 (1): 56–60.
- [14] 李童, 谢光璟, 邵玉萍, 等. 运动结合生慧汤对睡眠剥夺大鼠海马神经元树突棘发育异常和认知损害的影响[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2023, 25 (1): 203–211.
- [15] 徐叔云, 卞如濂, 陈修主编. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1861.
- [16] 龙清华. 补肾调心健脾法防治失眠健忘的理论探讨及生慧汤对 APP/PS1 痴呆小鼠神经发生的作用研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.
- [17] 张笑颜, 王谢, 王杰, 等. 大黄酚调控 AMPK/mTOR 自噬信号通路改善 Wilson 病铜负荷大鼠认知功能[J]. *中国中西医结合杂志*, 2023, 43 (5): 578–584.
- [18] 叶妙勇, 赵凡, 王军卫, 等. 补阳还五汤对糖尿病性勃起功能障碍大鼠阴茎海绵体纤维化及 RhoA、ROCK2 蛋白表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42 (11): 1369–1375.
- [19] 李瑞暖, 谢苗莹, 曾榕, 等. 基于 lncRNA-UCA1/miR-187/MAPK8 通路探讨加味柴胡疏肝汤治疗癫痫作用机制[J]. *中国中西医结合杂志*, 2023, 43 (10): 1205–1213.
- [20] 徐勇, 王军, 王虹峥, 等. 2023 中国阿尔茨海默病数据与防控策略[J]. *阿尔茨海默病及相关病杂志*, 2023, 6 (3): 175–192.
- [21] 王英全, 梁景宏, 贾瑞霞, 等. 2020–2050 年中国阿尔茨海默病患病情况预测研究[J]. *阿尔茨海默病及相关病*, 2019, 2 (1): 289–298.
- [22] Khan S, Barve KH, Kumar MS. Recent advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease[J]. *Curr Neuroparmacol*, 2020, 18 (11): 1106–1125.
- [23] 刘红森, 李艳玲, 刘欢, 等. 通窍活血汤对血管性痴呆大鼠学习记忆及海马 PI3K/Akt 信号通路的影响[J/OL]. *中国实验方剂学杂志*: 1–8[2023-11-08]. <https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20230907>.
- [24] 李想, 李安特, 孙秋霞, 等. PI3K/Akt 信号通路 with 神经损伤修复的研究进展[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43 (1): 246–249.
- [25] Long HZ, Cheng Y, Zhou ZW, et al. PI3K/AKT signal pathway: A target of natural products in the prevention and treatment of Alzheimer's disease and Parkinson's disease[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 648636.
- [26] Fakhri S, Iranpanah A, Gravandi MM, et al. Natural products attenuate PI3K/Akt/mTOR signaling pathway: A promising strategy in regulating neurodegeneration[J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153664.
- [27] Ding MR, Qu YJ, Hu B, et al. Signal pathways in the treatment of Alzheimer's disease with traditional Chinese medicine[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 152: 113208.

(收稿: 2023-08-18 在线: 2024-02-21)

责任编辑: 赵芳芳