

生慧汤调控cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路改善 阿尔茨海默病斑马鱼模型突触可塑性和 认知功能障碍的作用机制

孔梦¹, 鄢婷¹, 叶子怡¹, 黄梦莹¹, 刘汇真¹, 曹迪¹, 王平^{1,2*}

(1. 湖北中医药大学 老年脑健康中医药防护技术与新产品研发教育部工程研究中心, 武汉 430065;
2. 湖北时珍实验室, 武汉 430065)

[摘要] 目的:探讨生慧汤对氯化铝(AlCl_3)诱导的阿尔茨海默病(AD)斑马鱼模型学习记忆障碍的改善作用及分子机制,重点阐明其对环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶(PKA)/cAMP反应元件结合蛋白(CREB)/脑源性神经营养因子(BDNF)信号通路及突触可塑性的调控效应。方法:6~7月龄野生型AB系斑马鱼150尾,随机数字表法分成空白组,模型组,生慧汤低、中、高剂量组(0.74 、 1.48 、 $2.96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)和多奈哌齐组($0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组25尾。采用慢性 AlCl_3 浸泡法($0.0002 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)建立AD模型,持续30 d。T迷宫评估斑马鱼空间学习记忆;新物体识别检测斑马鱼识别记忆;新缸潜水实验评估斑马鱼焦虑样行为;苏木素-伊红(HE)染色观察端脑神经元形态;Fluoro-Jade B(FJB)染色检测端脑变性神经元;透射电镜观察端脑突触超微结构;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测脑组织cAMP含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脑组织中PKA、CREB、p-CREB、BDNF、突触素(SYN)和突触后密度蛋白-95(PSD-95)的蛋白表达水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测PKA、CREB、BDNF及凋亡相关基因B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和胱天蛋白酶-3(Caspase-3)的mRNA水平。结果:与空白组比较,模型组首次进入富集营养区(EC区)潜伏期显著延长($P<0.01$),穿越EC区次数显著减少($P<0.01$);新物体识别指数显著降低($P<0.01$)。首次进入顶部区域潜伏期显著增加($P<0.01$),顶部区域停留时间显著减少($P<0.01$)。端脑变性神经元数量显著增加($P<0.01$),神经元排列紊乱,胞体萎缩,核固缩及胞质空泡化;线粒体嵴膜断裂,肿胀及空泡化;凋亡相关基因Bcl-2水平显著减少($P<0.01$),Bax和Caspase-3水平显著增加($P<0.01$)。突触前膜囊泡数量减少,突触间隙增宽,突触后致密区变薄,且突触相关蛋白SYN和PSD-95表达显著减少($P<0.01$)。脑组织cAMP含量显著减少($P<0.01$),PKA、CREB、p-CREB和BDNF蛋白表达水平显著减少($P<0.01$),PKA、CREB和BDNF的mRNA表达水平显著下调($P<0.01$)。与模型组比较,生慧汤中、高剂量组和多奈哌齐组学习记忆和焦虑样行为改善,表现为首次进入EC潜伏期显著缩短($P<0.01$),穿越EC区次数显著增加($P<0.01$);新物体识别指数显著升高($P<0.01$);首次进入顶部区域时间缩短,顶部区域停留时间显著增加($P<0.01$);各给药组端脑变性神经元数量均显著减少($P<0.01$);神经元形态改善,排列较整齐,核固缩和空泡化减少;线粒体嵴膜相对完整,空泡化减少;生慧汤中、高剂量组Bcl-2 mRNA水平显著增加($P<0.01$),Bax和Caspase-3 mRNA表达明显减少($P<0.05$, $P<0.01$)。各给药组突触囊泡数目增多,突触间隙变窄,突触后致密区变厚;突触相关蛋白SYN和PSD-95表达增强。生慧汤各剂量组cAMP含量显著增加($P<0.01$),PKA和CREB mRNA水平显著上调($P<0.01$),生慧汤中、高剂量组BDNF基因水平明显上调($P<0.05$, $P<0.01$),多奈哌齐组PKA和CREB mRNA水平显著上调($P<0.01$);生慧汤中、高剂量组PKA、CREB、p-CREB和BDNF蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$),生慧汤低剂量组p-CREB和BDNF蛋白表达水平显著增加($P<0.01$),多奈哌齐组CREB、p-CREB和BDNF蛋白表达显著增强($P<0.01$)。结论:生慧汤可以通过激活cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路,改善突触可塑性,抑制神经元凋亡,缓解 AlCl_3 诱导的AD斑马鱼的学习记忆障碍和焦虑样行为。

[关键词] 生慧汤; 阿尔茨海默病; 斑马鱼; 学习记忆; 环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶(PKA)/cAMP反应元件结合蛋白(CREB)/脑源性神经营养因子(BDNF)信号通路; 突触可塑性

[中图分类号] R277;R285;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)16-0018-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20252239

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251118.1557.004>

[网络出版日期] 2025-11-18 16:32:31 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



[收稿日期] 2025-09-03

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(82130119);中医脑健康理论传承创新及应用研究项目(2024KJCX002);湖北中医药大学2025年度博士研究生创新能力项目(2025BSCX11)

[第一作者] 孔梦,在读博士,从事中医药防治老年脑病研究,E-mail:2734515259@qq.com

[通信作者] *王平,教授,从事中医药防治老年病的基础及应用研究,E-mail:pwang54@aliyun.com

Mechanism of Action of Shenghui Tang Ameliorating Synaptic Plasticity and Cognitive Dysfunction of Zebrafish Models with Alzheimer's Disease via Regulating cAMP/PKA/CREB/BDNF Signaling Pathway

KONG Meng¹, YAN Ting¹, YE Ziyi¹, HUANG Mengying¹, LIU Huizhen¹, CAO Di¹, WANG Ping^{1,2*}

(1. *Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine Protection Technology and New Product Development for the Elderly Brain Health, Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China*; 2. *Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China*)

[Abstract] **Objective:** This paper aims to investigate the ameliorative effect of Shenghui Tang on learning and memory impairment in aluminum chloride (AlCl_3)-induced zebrafish models with Alzheimer's disease (AD) and explore its molecular mechanisms, with a focus on its regulatory effects on the cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA)/cAMP response element-binding protein (CREB)/brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signaling pathway and synaptic plasticity. **Methods:** By using a random number table, a total of 150 wild-type AB strain zebrafish (aged 6-7 months) were divided into a blank group, a model group, Shenghui Tang groups with low, middle, and high doses (0.74, 1.48, and $2.96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and a donepezil group ($0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). The AD model was established via the chronic AlCl_3 immersion method ($0.000 2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) for 30 days. T-maze test was used to assess spatial learning and memory of zebrafish. The novel object recognition test was used to detect recognition memory of zebrafish. Anxiety-like behavior of zebrafish was assessed by the novel tank diving test. Telencephalic neuronal morphology was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Fluoro-Jade B (FJB) staining was applied for degenerative neurons in the telencephalon. Transmission electron microscope (TEM) was used for synaptic ultrastructure in the telencephalon. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of cAMP in the brain tissue. Western blot was used to analyze the protein expression levels of PKA, CREB, phosphorylated (p)-CREB, BDNF, synaptophysin (SYN), and postsynaptic density protein-95 (PSD-95) in the brain tissue. Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA levels of PKA, CREB, and BDNF, as well as apoptosis-related genes B cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and cysteine-aspartic protease 3 (Caspase-3). **Results:** Compared with the blank group, the model group exhibited prolonged latency to first entry into the EC zone ($P < 0.01$), reduced entries into the EC zone ($P < 0.01$), significantly decreased novel object recognition index ($P < 0.01$), significantly increased latency to first entry into the top zone ($P < 0.01$), and reduced residence time in the top zone ($P < 0.01$). The number of degenerative neurons in the telencephalon was significantly increased ($P < 0.01$). The model group expressed disordered neuronal arrangement, soma atrophy, nuclear pyknosis, and cytoplasmic vacuolation. Mitochondrial cristae membrane exhibited rupture, swelling, and vacuolation. The Bcl-2 mRNA level was downregulated ($P < 0.01$), and Bax and Caspase-3 levels were upregulated ($P < 0.01$). Reduced number of presynaptic vesicles, widened synaptic cleft, and thinned postsynaptic density were observed. The expression of synapse-related proteins SYN and PSD-95 was significantly decreased ($P < 0.01$). The cAMP content was decreased in the brain tissue ($P < 0.01$). The protein expression levels of PKA, CREB, p-CREB, and BDNF were significantly reduced ($P < 0.01$), and the mRNA expression levels of PKA, CREB, and BDNF were significantly downregulated ($P < 0.01$). Compared with the model group, Shenghui Tang groups with middle and high doses and donepezil group showed improved learning and memory ability and anxiety-like behavior, characterized by shortened latency to first entry into the EC zone ($P < 0.01$), increased number of crossings into the EC zone ($P < 0.01$), elevated novel object recognition index ($P < 0.01$), reduced latency to first entry into the top zone, and longer residence time in the top zone ($P < 0.01$). The number of degenerative neurons in the telencephalon of each treatment group was reduced ($P < 0.01$), with improved neuronal morphology and relatively regular arrangement, as well as decreased nuclear pyknosis and vacuolation. Mitochondrial cristae membrane integrity was improved, and vacuolation was reduced. The Shenghui Tang groups with middle and high doses exhibited upregulated mRNA expression of Bcl-2 ($P < 0.01$) and downregulated mRNA expression of Bax and Caspase-3 ($P < 0.05$, $P < 0.05$). In each treatment group, the number of synaptic vesicles increased, and the synaptic cleft narrowed. The postsynaptic density thickened, and the expression of synaptic-related proteins SYN and PSD-95 was enhanced. In Shenghui Tang groups with different doses, cAMP content was increased ($P < 0.01$), and the mRNA levels of PKA and CREB were upregulated ($P < 0.01$). Specifically, the mRNA level of BDNF was upregulated in Shenghui Tang groups with medium and high doses ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The donepezil group showed upregulated mRNA expression levels of PKA and CREB ($P < 0.01$). In the Shenghui Tang groups with medium and high doses, the protein expression levels of PKA, CREB, p-CREB, and BDNF were all significantly increased ($P < 0.01$), and the protein expression levels of p-CREB and BDNF were increased in the Shenghui Tang groups with low dose ($P < 0.01$). In the donepezil group, the protein expression of CREB, p-CREB, and BDNF was significantly enhanced ($P < 0.01$).

Conclusion: Shenghui Tang alleviates learning and memory impairment and anxiety-like behaviors in AlCl_3 -induced AD zebrafish by activating the cAMP/PKA/CREB/BDNF signaling pathway to improve synaptic plasticity and inhibit neuronal apoptosis.

[Keywords] Shenghui Tang; Alzheimer's disease; zebrafish; learning and memory; cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/protein kinase A (PKA)/cAMP response element-binding protein (CREB)/brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signaling pathway; synaptic plasticity

阿尔茨海默病(AD)是一种以进行性认知功能障碍和神经元退行变性为特征的神经系统疾病,其发病机制复杂,涉及 β 淀粉样蛋白沉积、Tau蛋白过度磷酸化、突触损伤、神经元凋亡及神经炎症等多种病理过程^[1]。学习记忆能力减退是AD患者的临床核心症状,而突触可塑性损伤被认为是认知功能障碍的关键病理基础^[2]。

环磷酸腺苷(cAMP)/蛋白激酶(PKA)/cAMP反应元件结合蛋白(CREB)/脑源性神经营养因子(BDNF)信号通路在突触可塑性调控中起关键作用。cAMP水平升高可以激活PKA,进而激活转录因子CREB,上调BDNF的表达,最终改善突触结构与功能,增强学习记忆能力^[3-4]。当前临床常用AD治疗药物[如胆碱酯酶抑制剂盐酸多奈哌齐、*N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂盐酸美金刚]仅能缓解症状,无法逆转疾病进展,因此探索安全有效的替代疗法具有重要意义^[5]。

中医药在AD防治中具有独特优势,其中生慧汤作为中医药防治痴呆的经典古方,前期研究显示其可通过抗炎、调节神经递质及线粒体自噬等途径发挥神经保护作用,改善AD相关模式生物的学习记忆功能^[6-11]。斑马鱼因与人类基因同源性高、神经系统结构相似、繁殖快及实验周期短等特点,已成为AD研究的理想模式生物^[12-15]。本研究通过氯化铝(AlCl_3)慢性暴露法构建AD斑马鱼模型,旨在探讨生慧汤对学习记忆的改善作用,并系统阐明其通过cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路及突触可塑性发挥作用的机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 6~7月龄野生型AB系斑马鱼150尾,购自国家斑马鱼资源中心。动物饲养于老年脑健康中医药防护技术与新产品研发教育部工程研究中心斑马鱼实验室,光照条件设置为14 h/10 h光暗循环,室温保持在 $(28 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,每日投喂丰年虫2次。

1.2 伦理 实验经湖北中医药大学实验动物管理委员会批准(HUCMS00137435),符合动物伦理准则。

1.3 药品和试剂 生慧汤由熟地黄30 g,酸枣仁、柏子仁15 g,山萸肉12 g,人参片、茯苓各9 g,石菖蒲1.5 g,远志、白芥子各6 g组成,饮片购自湖北省

中医院附属医院,经湖北中医药大学药学院陈霖林教授鉴定,均符合2020年版《中华人民共和国药典》要求。饮片用14倍体积的蒸馏水浸泡30 min,煎煮2次后浓缩制成 $0.345 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 生慧汤水煎液备用。盐酸多奈哌齐(货号1706065,规格5 mg/片)购于江苏卫材制药有限公司,溶解于生理盐水后配制成最终质量浓度为 $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。 AlCl_3 (货号K2003060)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(四维加生物科技有限公司,货号S10010);Davidson固定液(北京索莱宝科技有限公司,货号G2340);斑马鱼cAMP定量检测试剂盒(睿信生物科技有限公司,货号RXJW1300679F);Fluoro-Jade B(FJB)染色试剂盒(默克生命科学,货号AG310);抗体PKA(赛默飞世尔科技公司,货号PA5-17626);CREB、磷酸化(p)-CREB抗体(美国CST公司,货号分别为#9197、#9198);BDNF、突触素(SYN)、突触后致密蛋白-95(PSD-95)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为28205-1-AP、17785-1-AP、30225-1-AP);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,英国Abcam公司,货号ab8245)。

1.4 仪器 ViewPoint ZebraLab®系统v3.0版本(法国ViewPoint公司);Leica UC7型超薄切片机(德国Leica公司);Tecnaï G2 20 TWIN型透射电子显微镜(TEM,美国赛默飞世尔科技公司);JB-P5型包埋机(武汉俊杰有限公司);Pannoramic MIDI型切片扫描仪(匈牙利3DHISTECH公司);RM2016型病理切片机、LEICA DM750型成像系统(上海徕卡仪器有限公司)。

2 方法

2.1 分组、造模和给药 6~7月龄野生型AB系斑马鱼150尾,随机分成空白组,模型组,生慧汤低、中、高剂量组($0.74, 1.48, 2.96 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)和多奈哌齐组($0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组25尾。除空白组外,其余各组均浸泡于含 AlCl_3 ($0.000 2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)的水箱中,连续30 d,每天换水^[11]。同时,各给药组从造模第16天开始每日给予相应药液,采用浸泡给药的方式(生慧汤组按低、中、高剂量分别加入水箱),治疗连续14 d。

2.2 行为学检测

2.2.1 T迷宫实验 T迷宫由2个水平臂($15 \text{ cm} \times$

8 cm)和1个垂直臂(30 cm×8 cm)组成,垂直臂远端有一个被移动隔板隔开的起始区。基于斑马鱼对红色的先天偏好及其形成颜色关联记忆的能力,分别用红色(左侧)和绿色(右侧)卡纸包裹水平臂内壁,绿色侧定义为营养富集区(EC),内含食物奖励。T迷宫分成2个阶段,训练阶段持续3 d,第4天为测试阶段,撤去食物奖励,记录6 min内斑马鱼首次进入EC区的逃避潜伏期及EC区总停留时间,评估空间学习记忆能力。

2.2.2 新物体识别实验 新物体识别实验分3步进行。适应阶段持续3 d,第4天进行训练实验,在空水箱中加入2个相同的红色立方体,将斑马鱼暴露其中10 min。训练实验结束后1 h,用绿色立方体(新物体)替代其中一个红色立方体(旧物体),记录10 min内斑马鱼探索新旧物体时间,评估斑马鱼识别记忆能力。新物体识别指数(NOI)计算公式: $NOI = \frac{\text{探索新物体时间}}{\text{探索新物体时间} + \text{探索旧物体时间}} \times 100\%$ 。

2.2.3 新缸潜水实验 新缸潜水实验通过利用斑马鱼在新环境中的先天潜水反射量化焦虑样行为。将矩形透明水箱垂直等分为底部和顶部区域,用侧装摄像头记录6 min内斑马鱼在顶部区域的总停留时间及首次进入顶部区域的潜伏期。

2.3 样本采集 行为学测试结束后,斑马鱼通过浸入冰水混合物(2~4℃)处死。立即分离脑组织,部分用Davidson固定液固定用于切片染色,剩余新鲜组织-80℃保存备用。另外取1 mm³脑组织用电镜固定液保存。

2.4 组织病理学检测

2.4.1 HE染色观察斑马鱼端脑形态 固定的脑组织,石蜡包埋后全脑切片。切片经二甲苯脱蜡后,依次95%~70%乙醇梯度脱水。磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后,苏木素核染色5 min,伊红胞质复染3 min。脱水、封片后用于显微镜观察。

2.4.2 FJB染色观察端脑神经元变性 切片依次放入二甲苯、梯度乙醇脱蜡至水,滴加FJB工作液,4℃过夜,4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)复染核8 min,封片后采集图像,Image J软件分析FJB阳性神经元平均荧光强度。

2.5 TEM观察端脑超微结构 使用1%锇酸对斑马鱼脑组织进行后固定。乙醇梯度脱水后,EPON 812树脂包埋脑组织;超薄切片机切片(60~80 nm),随后用2%醋酸铀和2.6%柠檬酸铅双重染色,将切片置于200目铜网,用TEM在200 kV下成像。

2.6 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测cAMP含量 取新鲜斑马鱼脑组织,匀浆提取上清液,根据ELISA试剂盒说明书,检测脑组织cAMP含量。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测PKA、CREB、p-CREB、BDNF、SYN和PSD-95蛋白表达水平 使用蛋白定量法(BCA)试剂盒检测蛋白浓度。取等量蛋白上样,经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜后,用5%脱脂牛奶室温封闭1 h。滴加一抗PKA(1:1 000)、CREB(1:1 000)、p-CREB(1:1 000)、BDNF(1:1 000)、SYN(1:20 000)、PSD-95(1:5 000)、GAPDH(1:10 000),4℃孵育过夜;二抗(1:1 000)室温孵育2 h,增强化学发光法(ECL)显色;Odyssey红外成像系统扫描蛋白条带,Image J软件分析蛋白灰度值,以目的蛋白与GAPDH灰度值比值表示蛋白表达水平。

2.8 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测PKA、CREB、BDNF、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和胱天蛋白酶-3(Caspase-3)的mRNA表达 使用总RNA提取试剂盒提取斑马鱼脑组织总RNA,并通过随机引物将其逆转录为互补DNA(cDNA)。反应条件:将PCR仪参数设置为95℃预变性5 min(1个循环);随后进行40个循环,每个循环包含95℃变性10 s、60℃退火30 s。以GAPDH为内参,PKA、CREB、BDNF、Bcl-2、Bax和Caspase-3的相对mRNA表达采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。引物由四维加生物科技有限公司合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences		
引物	序列(5'-3')	长度/bp
PKA	上游 GCAATGAACTGGAGAGCGTCA	86
	下游 TGTGCTCTGTTGTGGCGATT	
CREB	上游 CGAGTCTGTGTCGGGCTATC	114
	下游 CTTGTGCCAAGGTGGCAATC	
BDNF	上游 AGGGGAAAATGTTCCAACAGG	89
	下游 CGCAGCTCTCATGCAACTGA	
GAPDH	上游 ATCATCTCTGCCCAAGTGC	199
	下游 TCTGTGTTGCTGTGATGGCA	
Bax	上游 CGGGTGGAGGCGATACG	166
	下游 CGTTTATGGCTGGGGTCACA	
Bcl-2	上游 AGATGGCGTCCCAGGTAGAT	155
	下游 AGAGTCTCTGTGCTGACCGT	
Caspase-3	上游 ACAACACCAGAAGCAGGACTT	172
	下游 TTTGCATCGCTTTGTCTGGC	

2.9 统计学方法 采用SPSS 26.0软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 t 检验,多组比较采用单因素方差分析,重复测量方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 生慧汤对AD斑马鱼学习记忆能力的影响

3.1.1 T迷宫实验 与空白组比较,模型组斑马鱼在实验第2~4天进入EC区的潜伏期显著延长($P<$

0.01);与模型组比较,在实验第2~4天,生慧汤中、高剂量组和多奈哌齐组斑马鱼进入EC区的潜伏期均明显缩短($P<0.05, P<0.01$);在实验第3~4天生慧汤低剂量组首次进入EC区的潜伏期显著缩短($P<0.01$),见表2及增强出版附加材料。与空白组比较,模型组斑马鱼进入EC区的次数显著减少($P<0.01$);与模型组比较,生慧汤中、高剂量组和多奈哌齐组进入EC区的次数显著增加($P<0.01$),见表3。

表2 生慧汤对AD斑马鱼首次进入EC区逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 2 Effect of Shenghui Tang on escape latency of first entry into EC zone in AD zebrafish ($\bar{x} \pm s, n=7$)						s
组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	第1天	第2天	第3天	第4天	
空白组		217.70 $\pm$ 68.01	119.60 $\pm$ 26.31	78.29 $\pm$ 20.81	57.00 $\pm$ 10.15	
模型组		246.70 $\pm$ 61.76	241.70 $\pm$ 57.47 ¹⁾	220.40 $\pm$ 68.84 ¹⁾	144.00 $\pm$ 23.69 ¹⁾	
生慧汤低剂量组	0.74	239.90 $\pm$ 81.39	231.60 $\pm$ 89.84	151.30 $\pm$ 54.56 ³⁾	129.00 $\pm$ 47.06 ³⁾	
生慧汤中剂量组	1.48	218.90 $\pm$ 33.74	146.70 $\pm$ 20.60 ³⁾	105.10 $\pm$ 13.98 ³⁾	83.86 $\pm$ 14.09 ³⁾	
生慧汤高剂量组	2.96	216.10 $\pm$ 18.51	139.10 $\pm$ 31.99 ³⁾	98.71 $\pm$ 15.29 ³⁾	65.00 $\pm$ 19.41 ³⁾	
多奈哌齐组	0.01	214.90 $\pm$ 33.06	157.10 $\pm$ 39.32 ²⁾	103.90 $\pm$ 16.35 ³⁾	63.29 $\pm$ 28.73 ³⁾	

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表3-表11同)

表3 生慧汤对AD斑马鱼进入EC区次数的影响($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 3 Effect of Shenghui Tang on number of entries into EC zone in AD zebrafish ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	进入EC区的次数/次
空白组		14.43 $\pm$ 2.51
模型组		3.71 $\pm$ 1.80 ¹⁾
生慧汤低剂量组	0.74	5.86 $\pm$ 1.35
生慧汤中剂量组	1.48	8.71 $\pm$ 2.21 ³⁾
生慧汤高剂量组	2.96	10.86 $\pm$ 2.27 ³⁾
多奈哌齐组	0.01	8.14 $\pm$ 2.27 ³⁾

3.1.2 新物体识别实验 与空白组比较,模型组斑马鱼新物体识别指数显著降低($P<0.01$);与模型组比较,生慧汤中、高剂量组和多奈哌齐组新物体识别指数显著升高($P<0.01$),生慧汤低剂量组差异无统计学意义。见表4及增强出版附加材料。

表4 生慧汤对AD斑马鱼新物体识别指数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Shenghui Tang on novelty recognition index in AD zebrafish ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	新物体识别指数/%
空白组		58.88 $\pm$ 3.92
模型组		36.23 $\pm$ 3.70 ¹⁾
生慧汤低剂量组	0.74	41.96 $\pm$ 7.48
生慧汤中剂量组	1.48	48.54 $\pm$ 7.93 ³⁾
生慧汤高剂量组	2.96	51.39 $\pm$ 7.75 ³⁾
多奈哌齐组	0.01	49.52 $\pm$ 6.87 ³⁾

3.2 生慧汤对AD斑马鱼焦虑样行为的影响 与空白组比较,模型组斑马鱼首次进入顶部区域的潜伏期显著延长($P<0.01$),在顶部区域的停留时间显著减少($P<0.01$);与模型组比较,生慧汤中、高剂量组和多奈哌齐组斑马鱼首次进入顶部区域潜伏期明显缩短($P<0.05, P<0.01$),顶部区域停留时间显著延长($P<0.01$);生慧汤低剂量组差异无统计学意义。见表5及增强出版附加材料。

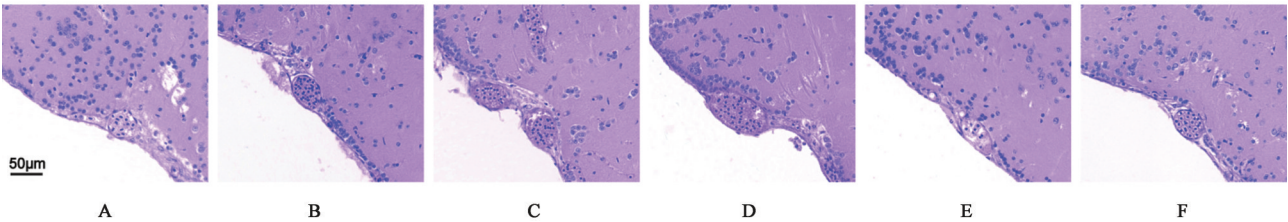
表5 生慧汤对AD斑马鱼焦虑样行为的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 5 Effect of Shenghui Tang on anxiety-like behaviors in AD zebrafish ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	首次进入顶部区域潜伏期	顶部区域停留时间
空白组		56.11 $\pm$ 33.07	150.30 $\pm$ 39.84
模型组		186.40 $\pm$ 53.22 ¹⁾	44.79 $\pm$ 20.43 ¹⁾
生慧汤低剂量组	0.74	154.10 $\pm$ 69.95	60.88 $\pm$ 22.75
生慧汤中剂量组	1.48	89.89 $\pm$ 33.78 ³⁾	102.00 $\pm$ 22.62 ³⁾
生慧汤高剂量组	2.96	61.00 $\pm$ 33.62 ³⁾	119.90 $\pm$ 40.97 ³⁾
多奈哌齐组	0.01	89.78 $\pm$ 40.60 ²⁾	111.40 $\pm$ 24.98 ³⁾

3.3 生慧汤对AD斑马鱼端脑神经元形态的影响

空白组端脑神经元排列整齐,胞体饱满,核仁清晰;与之比较,模型组斑马鱼端脑神经元排列紊乱,胞体萎缩,核固缩及胞质空泡化。与模型组比较,生慧汤和多奈哌齐组神经元形态改善,排列较整齐,核固缩和空泡化减少。见图1。



注:A.空白组;B.模型组;C.生慧汤低剂量组;D.生慧汤中剂量组;E.生慧汤高剂量组;F.多奈哌齐组(图2-图4同)

图1 生慧汤对AD斑马鱼端脑神经元形态的影响(HE,×300)

Fig. 1 Effect of Shenghui Tang on neuronal morphology in telencephalon of AD zebrafish (HE, ×300)

3.4 生慧汤对AD斑马鱼端脑神经元变性的影响
与空白组比较,模型组端脑组织标记的阳性神经元数量显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型

组比较,除生慧汤低剂量组外,各给药组端脑阳性神经元数量均显著降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图2、表6。

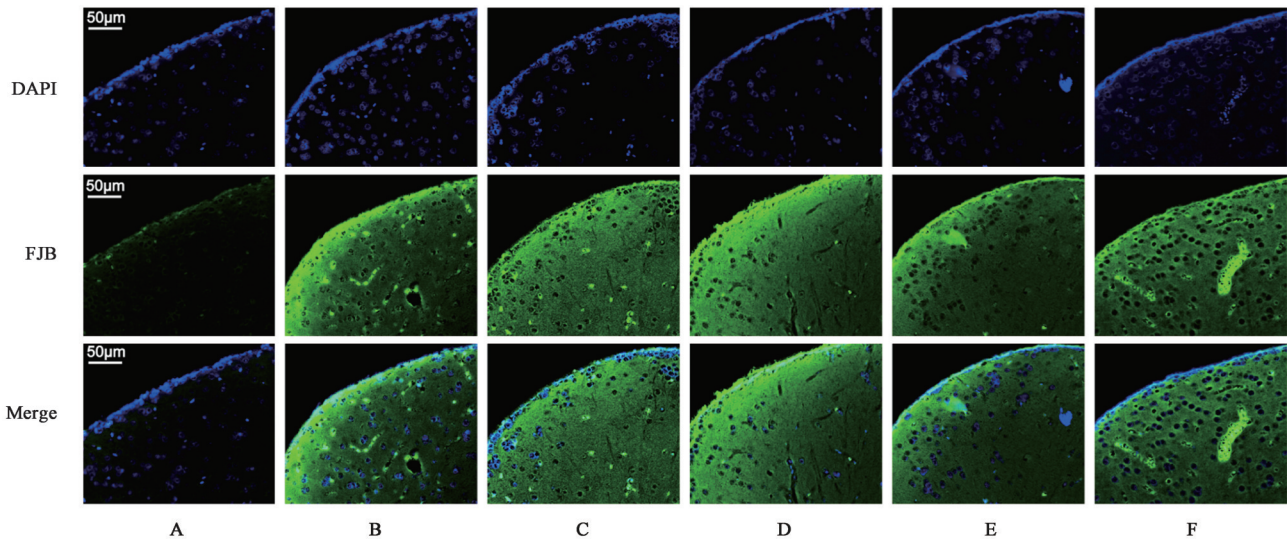


图2 生慧汤对AD斑马鱼端脑变性神经元的影响(FJB,×200)

Fig. 2 Effect of Shenghui Tang on neurodegeneration in telencephalon of AD zebrafish (FJB, ×200)

表6 生慧汤对AD斑马鱼端脑FJB阳性神经元的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 6 Effect of Shenghui Tang on number of FJB-positive neurons in telencephalon of AD zebrafish ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	FJB 荧光强度
空白组		4.90±1.48
模型组		27.85±1.09 ⁽¹⁾
生慧汤低剂量组	0.74	24.78±1.54
生慧汤中剂量组	1.48	20.73±0.91 ⁽³⁾
生慧汤高剂量组	2.96	10.41±0.10 ⁽³⁾
多奈哌齐组	0.01	17.05±2.12 ⁽³⁾

3.5 生慧汤对AD斑马鱼端脑突触超微结构的影响
与空白组比较,模型组突触前膜囊泡数量减少,部分囊泡形态不规则,出现皱缩或者融合,提示突触前递质储存与释放功能障碍;突触间隙增宽,突触后致密区变薄;线粒体结构破坏,部分嵴膜断裂形成不规则碎片,甚至消失,线粒体肿胀及空泡化。与模型组比较,各给药组均能不同程度上减轻

上述超微结构异常,表现为突触前膜囊泡数量增加,突触间隙变窄,突触后膜致密区增厚,线粒体肿胀及空泡化减少,嵴膜完整度有所改善。见图3。

3.6 生慧汤对AD斑马鱼脑组织 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的 mRNA 表达水平的影响
与空白组比较,模型组斑马鱼脑组织中抗凋亡基因 Bcl-2 水平显著减少($P<0.01$),促凋亡基因 Bax 和 Caspase-3 水平显著增加($P<0.01$);与模型组比较,生慧汤中、高剂量组 Bcl-2 水平显著增加($P<0.01$),Bax 和 Caspase-3 水平明显减少($P<0.05, P<0.01$);多奈哌齐组对凋亡相关基因无明显改善作用。见表7。

3.7 生慧汤对AD斑马鱼脑组织 cAMP 含量的影响
与空白组比较,模型组脑组织 cAMP 含量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,生慧汤低、中、高剂量组脑组织 cAMP 含量显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$);多奈哌齐组对 cAMP 含量无明显改善作用。见表8。

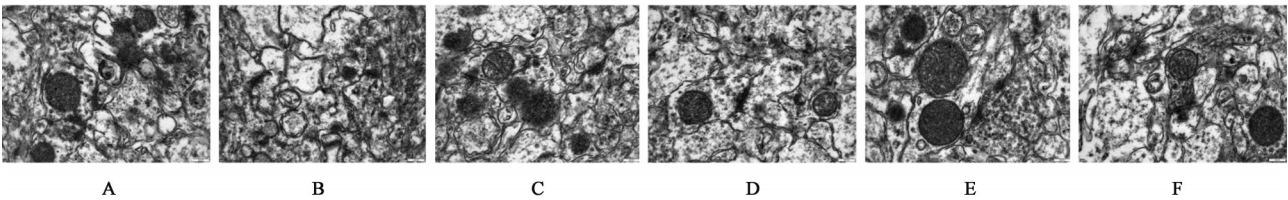


图3 生慧汤对AD斑马鱼端脑超微结构变化的影响(TEM,×20 000)
Fig. 3 Effect of Shenghui Tang on ultrastructural changes in telencephalon of AD zebrafish (TEM, ×20 000)

表7 生慧汤对AD斑马鱼Bcl-2、Bax和Caspase-3 mRNA表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 7 Effect of Shenghui Tang on mRNA levels of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in AD zebrafish ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bcl-2	Bax	Caspase-3
空白组		1.28±0.25	0.92±0.07	0.86±0.63
模型组		0.27±0.01 ¹⁾	5.40±1.85 ¹⁾	3.06±0.38 ¹⁾
生慧汤低剂量组	0.74	0.50±0.06	2.52±0.62 ³⁾	3.01±0.81
生慧汤中剂量组	1.48	0.68±0.03 ³⁾	1.57±0.35 ³⁾	1.57±0.28 ²⁾
生慧汤高剂量组	2.96	1.03±0.09 ³⁾	0.99±0.21 ³⁾	1.08±0.91 ³⁾
多奈哌齐组	0.01	0.40±0.03	3.37±0.69	3.00±0.09

表8 生慧汤对AD斑马鱼脑组织cAMP含量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 8 Effect of Shenghui Tang on content of cAMP in brain of AD zebrafish ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	cAMP/nmol·L ⁻¹
空白组		3.09±0.24
模型组		1.22±0.02 ¹⁾
生慧汤低剂量组	0.74	1.61±0.06 ³⁾
生慧汤中剂量组	1.48	2.07±0.08 ³⁾
生慧汤高剂量组	2.96	2.60±0.11 ³⁾
多奈哌齐组	0.01	1.42±0.02

3.8 生慧汤对AD斑马鱼脑组织PKA、CREB和BDNF mRNA表达水平的影响 与空白组比较,模型组斑马鱼脑组织PKA、CREB和BDNF mRNA表

达水平显著下调($P<0.01$);与模型组比较,生慧汤各剂量组和多奈哌齐组PKA和CREB mRNA显著上调($P<0.01$);生慧汤中、高剂量组BDNF mRNA表达明显上调($P<0.05, P<0.01$)。见表9。

3.9 生慧汤对AD斑马鱼PKA、CREB、p-CREB和BDNF蛋白表达水平的影响 与空白组比较,模型组脑组织PKA、CREB、p-CREB和BDNF蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,生慧汤中、高剂量组上述蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$),生慧汤低剂量组p-CREB和BDNF蛋白表达水平显著升高($P<0.01$),多奈哌齐组脑组织CREB、p-CREB和BDNF蛋白表达水平显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表10、图4。

表9 生慧汤对AD斑马鱼PKA、CREB和BDNF mRNA表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 9 Effect of Shenghui Tang on mRNA expression of PKA, CREB, and BDNF in AD zebrafish ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PKA	CREB	BDNF
空白组		1.01±0.01	0.99±0.01	0.94±0.06
模型组		0.25±0.02 ¹⁾	0.25±0.02 ¹⁾	0.27±0.04 ¹⁾
生慧汤低剂量组	0.74	0.34±0.01 ³⁾	0.36±0.02 ³⁾	0.32±0.06
生慧汤中剂量组	1.48	0.50±0.01 ³⁾	0.51±0.02 ³⁾	0.41±0.05 ²⁾
生慧汤高剂量组	2.96	0.71±0.06 ³⁾	0.68±0.01 ³⁾	0.55±0.03 ³⁾
多奈哌齐组	0.01	0.39±0.02 ³⁾	0.41±0.02 ³⁾	0.31±0.06

3.10 生慧汤对AD斑马鱼脑组织突触相关蛋白SYN和PSD-95表达水平的影响 与空白组比较,模型组斑马鱼脑组织突触相关蛋白SYN和PSD-95表达水平显著下降($P<0.01$);与模型组比较,生慧汤

各剂量组及多奈哌齐组SYN和PSD-95蛋白表达明显升高($P<0.05, P<0.01$)。见图4、表11。

4 讨论

铝是自然界中广泛分布的重金属元素,具有显

表 10 生慧汤对 AD 斑马鱼 PKA、CREB、p-CREB 和 BDNF 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of Shenghui Tang on protein expression of PKA, CREB, p-CREB and BDNF in AD zebrafish ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	PKA/GAPDH	CREB/GAPDH	p-CREB/GAPDH	BDNF/GAPDH
空白组		1.00±0.03	1.00±0.01	1.00±0.02	1.00±0.02
模型组		0.49±0.03 ¹⁾	0.39±0.02 ¹⁾	0.24±0.01 ¹⁾	0.41±0.02 ¹⁾
生慧汤低剂量组	0.74	0.57±0.02	0.43±0.01	0.52±0.01 ³⁾	0.62±0.02 ³⁾
生慧汤中剂量组	1.48	0.83±0.02 ³⁾	0.68±0.02 ³⁾	0.72±0.01 ³⁾	0.77±0.02 ³⁾
生慧汤高剂量组	2.96	0.91±0.06 ³⁾	0.74±0.02 ³⁾	0.83±0.01 ³⁾	0.83±0.03 ³⁾
多奈哌齐组	0.01	0.47±0.02	0.47±0.02 ³⁾	0.48±0.02 ³⁾	0.63±0.02 ³⁾

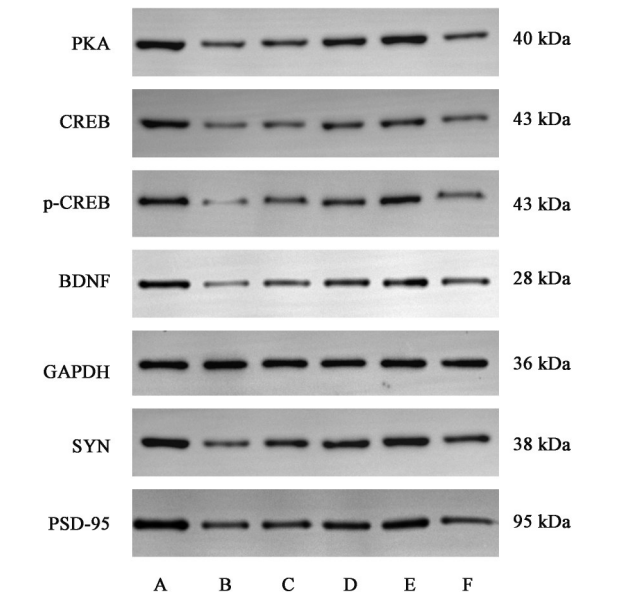


图 4 AD 斑马鱼 PKA、CREB、p-CREB、BDNF、SYN 和 PSD-95 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of PKA, CREB, p-CREB, BDNF, SYN and PSD-95 protein expression in AD zebrafish

表 11 生慧汤对 AD 斑马鱼突触相关蛋白 SYN 和 PSD-95 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 11 Effect of Shenghui Tang on synaptic proteins SYN and PSD-95 expression in AD zebrafish ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	SYN/GAPDH	PSD-95/GAPDH
空白组		1.00±0.03	1.00±0.02
模型组		0.49±0.03 ¹⁾	0.68±0.02 ¹⁾
生慧汤低剂量组	0.74	0.68±0.03 ³⁾	0.74±0.01 ²⁾
生慧汤中剂量组	1.48	0.89±0.04 ³⁾	0.87±0.03 ³⁾
生慧汤高剂量组	2.96	0.91±0.04 ³⁾	0.84±0.02 ³⁾
多奈哌齐组	0.01	0.68±0.02 ³⁾	0.74±0.02 ²⁾

著神经损伤,可直接损伤神经元结构与功能。 AlCl_3 诱导的 AD 斑马鱼模型,因能较好地模拟 AD 的核心病理进程(如神经元损伤、认知障碍)与临床表型,已成为神经退行性疾病机制研究及药物筛选的常用模型^[14-15]。研究证实,长期暴露于 AlCl_3 水溶液中

可诱导活性氧过量生成,继而引发氧化应激反应,最终导致神经元凋亡并损伤学习和记忆功能^[16-17]。本研究建立的 AlCl_3 慢性暴露 AD 斑马鱼模型,表现出明显的认知行为异常,且伴随神经元变性、突触损伤等典型 AD 样病理改变,与前期研究结论基本一致。

进行性认知功能衰退是 AD 的核心临床特征,其发生与突触损伤、神经元丢失密切相关。本研究行为学结果显示,模型组斑马鱼首次进入 EC 区的潜伏期延长,进入 EC 区次数减少,新物体识别指数显著降低,提示空间学习记忆及识别记忆能力均受损;新缸潜水实验中,模型组首次进入鱼缸顶部区域的潜伏期延长,且顶部区域的停留时间缩短,表明其存在明显焦虑样行为,这与 AD 患者常伴随的精神行为异常具有一致性^[18],进一步表明 AlCl_3 暴露能较好地模拟 AD 的表型,是被反复验证的可靠造模方法。经生慧汤干预后,上述异常行为学指标均得到显著改善,且呈现剂量依赖性趋势;与阳性药多奈哌齐干预效果类似,由此说明生慧汤可有效改善 AD 斑马鱼的学习记忆障碍与焦虑状态。

神经元形态完整及存活状态是维持正常脑功能的物质基础。HE 染色结果显示, AlCl_3 处理后斑马鱼端脑神经元排列紊乱、胞体萎缩;FJB 染色进一步证实,模型组斑马鱼端脑的 FJB 阳性神经元数量显著增加,提示神经元发生变性损伤。凋亡相关基因检测结果显示,模型组促凋亡基因 Bax、Caspase-3 的 mRNA 表达水平明显升高,而抗凋亡基因 Bcl-2 的 mRNA 表达水平显著降低,该结果证实神经元凋亡是 AlCl_3 介导神经损伤的重要环节。经生慧汤干预后,斑马鱼端脑神经元形态损伤明显减轻,变性神经元数量显著减少,同时促凋亡基因 Bax、Caspase-3 表达下调,抗凋亡基因 Bcl-2 表达上调。上述结果提示,生慧汤可通过抑制神经元凋亡、保护神经元结构完整性,发挥神经保护作用。

突触是神经元间信息传递的关键结构,其动态调控机制在神经信息编码与存储中发挥核心作用^[19];同时,突触可塑性作为大脑可塑性的重要表征,可通过突触形态重构与功能调节实现神经环路的适应性改变,是学习记忆形成的细胞层面基础^[20-22]。值得注意的是,突触传递效能不仅取决于突触后膜受体密度,还与突触前膜神经递质释放及突触间隙微环境密切相关^[23-25]。本研究TEM结果显示,AD斑马鱼模型端脑存在明显的突触超微结构异常,具体表现为突触前膜囊泡数量减少、突触间隙增宽、突触后致密区变薄,这些改变会导致突触传递效率下降、神经递质扩散异常,进而直接影响脑内信息整合功能。SYN(突触前膜标志蛋白)和PSD-95(突触后膜标志蛋白)是反映突触结构完整性和功能状态的关键分子,Western blot结果显示,模型组SYN和PSD-95蛋白表达水平显著降低,与突触超微结构损伤一致,证实AlCl₃暴露可导致突触结构损伤和功能异常,进而引发学习记忆障碍。经生慧汤治疗后,斑马鱼端脑突触前膜囊泡数量增加、突触间隙变窄、突触后致密区变厚,同时SYN和PSD-95蛋白表达水平明显上调,提示生慧汤可通过改善突触超微结构、上调突触相关蛋白表达,增强突触可塑性,这可能是其改善AD斑马鱼学习记忆功能的结构基础。

cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路是调控突触可塑性与学习记忆的经典通路,该通路功能异常与AD认知衰退的发生发展密切相关^[3]。其中,cAMP作为细胞内第二信使,可激活下游cAMP依赖的PKA;PKA进一步通过磷酸化作用激活CREB,p-CREB可进入细胞核启动下游靶基因转录,进而促进BDNF的表达^[26]。BDNF作为重要的神经营养因子,不仅能促进神经元存活与分化,还可通过调节突触前膜神经递质释放、突触后膜受体表达及突触结构重塑,增强突触可塑性^[27]。本研究结果显示,生慧汤处理后,斑马鱼端脑组织中cAMP含量显著升高,PKA、CREB和BDNF蛋白与mRNA表达水平均明显增强,表明生慧汤可以通过激活cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路,恢复神经营养因子BDNF的表达,进而改善突触可塑性与学习记忆功能。

综上所述,生慧汤可通过多靶点调控发挥抗AD作用,一方面,通过激活cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路,上调突触相关蛋白PSD-95与SYN表达,改善AlCl₃诱导的突触结构损伤与功能异常;另一方面,通过上调抗凋亡基因Bcl-2、下调促凋亡

基因Bax与Caspase-3,抑制神经元凋亡,保护神经元完整性。最终,上述作用共同改善AlCl₃诱导AD斑马鱼的学习记忆障碍与焦虑样行为,为生慧汤用于AD防治提供了实验依据,也为中医药多靶点干预AD提供了新策略。

本研究仍存在一定局限性,一是生慧汤发挥抗AD作用的具体活性成分尚未明确;二是生慧汤对cAMP/PKA/CREB/BDNF信号通路的直接调控靶点尚未阐明;后续研究可通过网络药理学结合分子对接、体外细胞实验等手段,进一步筛选生慧汤的关键活性成分并验证其作用靶点,为其临床应用提供更充分的理论支撑。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LANE C, HARDY J, SCHOTT J. Alzheimer's disease[J]. Eur J Neurol, 2018, 25(1): 59-70.
- [2] KOCH G, SPAMPINATO D. Alzheimer disease and neuroplasticity[J]. Handb Clin Neurol, 2022, 184: 473-479.
- [3] YOUM, PAN Y, LIU Y, et al. Royal jelly alleviates cognitive deficits and β -amyloid accumulation in APP/PS1 mouse model via activation of the cAMP/PKA/CREB/BDNF pathway and inhibition of neuronal apoptosis[J]. Front Aging Neurosci, 2019, 10: 428.
- [4] 陈逢义, 王艳平, 向庆伟. 天麻素调节cAMP/PKA/CREB信号通路对阿尔茨海默病大鼠认知障碍的影响[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(7): 1714-1717.
CHEN F Y, WANG Y P, XIANG Q W. Effect of ginsenoside on regulating cAMP/PKA/CREB signaling pathway on cognitive impairment in Alzheimer's disease rats[J]. Chin J Gerontol, 2024, 44(7): 1714-1717.
- [5] DHAPOLA R, BEURA S K, SHARMA P, et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Current knowledge of signaling pathways and therapeutics [J]. Mol Biol Rep, 2024, 51(1): 48.
- [6] 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.
LONG Q H, ZHAO B B, DING L, et al. Effect of Shenghui decoction on JAK2/STAT3/SOCS-1 signaling pathway in hippocampus of APP/PS1 double transgenic dementia mice [J]. Chin J Integr Med, 2022, 42(12): 1484-1492.
- [7] 文纯, 游秋云, 王平, 等. 生慧汤对APP/PS1雄性AD小鼠海马内APP代谢产物的昼夜变化影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2022, 24(8): 3212-3218.
WEN C, YOU Q Y, WANG P, et al. Effect of Shenghui decoction on circadian changes of APP metabolites in hippocampus of male APP/PS1 AD mice [J]. World Sci Technol Mod Chin Med, 2022, 24(8): 3212-3218.

- [8] 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.
- LONG Q H, ZHAO B B, DING L, et al. Shenghui decoction improves cognitive impairment and circadian rhythm disorder in Alzheimer's disease model mice by regulating neurotransmitters[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(22):16-22.
- [9] 张美娅,王平,游秋云,等. 生慧汤对APP/PS1双转基因AD模型小鼠海马慢性炎症的影响[J]. 时珍国医国药,2022,33(2):339-342.
- ZHANG M Y, WANG P, YOU Q Y, et al. Effect of Shenghui decoction on chronic inflammation in hippocampus of APP/PS1 double transgenic AD model mice[J]. Shizhen J Tradit Chin Med, 2022, 33(2):339-342.
- [10] 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.
- LONG Q H. Theoretical exploration of tonifying kidney, regulating heart and strengthening spleen method in preventing and treating insomnia and amnesia and study on effect of Shenghui decoction on neurogenesis in APP/PS1 dementia mice [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2020.
- [11] LU H F, TAN A H, ZHANG Y N, et al. Neuroprotective effects of Shenghui decoction via inhibition of the JNK/p38 MAPK signaling pathway in an Aβ1-42-induced zebrafish (*Danio rerio*) model of Alzheimer's disease [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 328:117993.
- [12] TAN J K, NAZAR F H, MAKPOL S, et al. Zebrafish: A pharmacological model for learning and memory research[J]. Molecules, 2022, 27(21):7374.
- [13] 钟绮媚. 比较研究三种阿尔茨海默病(AD)斑马鱼模型的特点及探索DPA改善铝致AD的作用机制[D]. 湛江:广东海洋大学,2021.
- ZHONG Q M. Comparative study on characteristics of three Alzheimer's disease (AD) zebrafish models and exploration of the mechanism by which DPA ameliorates aluminum-induced AD[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2021.
- [14] NADIGA A P R, SUMAN, KRISHNA K L. A novel zebrafish model of Alzheimer's disease by Aluminium chloride; involving nitro-oxidative stress, neuroinflammation and cholinergic pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2024, 965:176332.
- [15] LUO L, YAN T, YANG L, et al. Aluminum chloride and D-galactose induced a zebrafish model of Alzheimer's disease with cognitive deficits and aging [J]. Comput Struct Biotechnol J, 2024, 23:2230-2239.
- [16] GERLAI R. Learning and memory in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Methods Cell Biol, 2016, 134: 551-586.
- [17] KAUR K, NARANG R K, SINGH S. Aβ1-42 induced learning and memory deficit in zebrafish [J]. Neurotoxicology, 2022, 92:67-76.
- [18] SIMNUKKOVA M, ALWASEL S H, ALHAZZA I M, et al. Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease [J]. Arch Toxicol, 2019, 93(9): 2491-2513.
- [19] GIPSON C D, OLIVE M F. Structural and functional plasticity of dendritic spines-root or result of behavior? [J]. Genes Brain Behav, 2017, 16(1):101-117.
- [20] COLON-RANOS D A. Synapse formation in developing neural circuits[J]. Curr Top Dev Biol, 2009, 87:53-79.
- [21] KANAT P K, KALANI A, TYAGI N. Role of hydrogen sulfide in brain synaptic remodeling[J]. Methods Enzymol, 2015, 555:207-229.
- [22] MAGEE J C, GRIENBERGER C. Synaptic plasticity forms and functions[J]. Annu Rev Neurosci, 2020, 43:95-117.
- [23] CITRI A, MALENKA R C. Synaptic plasticity: Multiple forms, functions, and mechanisms [J]. Neuropsychopharmacology, 2008, 33(1):18-41.
- [24] SHENG M, KIM M J. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms[J]. Science, 2002, 298(5594):776-780.
- [25] MO J Y, LIAO W G, DU J Y, et al. Buyang huanwu decoction improves synaptic plasticity of ischemic stroke by regulating the cAMP/PKA/CREB pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 335:118636.
- [26] LI J C, YE H Y, XU F, et al. Tong-Qiao-Huo-Xue decoction promotes synaptic remodeling via cAMP/PKA/CREB pathway in vascular dementia rats[J]. Phytomedicine, 2024, 135:156166.
- [27] ESVALD E E, TUVIKENE J, SIRP A, et al. CREB family transcription factors are major mediators of BDNF transcriptional autoregulation in cortical neurons [J]. J Neurosci, 2020, 40(7):1405-1426.

[责任编辑 孙丛丛]