

基于PI3K/Akt信号通路探讨上下两济丹改善AD小鼠 认知功能作用机制

杨硕^{1,2}, 朱玲³, 程炜⁴, 谭爱华^{5*}, 沈峰^{1,6*}

- (1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 湖北中医药大学附属黄冈中医医院, 湖北 黄冈 438000;
3. 黄冈市中心医院, 湖北 黄冈 438000; 4. 湖北民族大学, 湖北 恩施 445000;
5. 大别山道地药材种质改良与利用湖北省重点实验室(黄冈师范学院), 湖北 黄冈 438000;
6. 湖北时珍实验室, 武汉 430061)

[摘要] 目的: 基于磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路探讨上下两济丹改善阿尔茨海默病(AD)小鼠认知功能的机制研究, 以期临床使用上下两济丹治疗AD提供实验依据。方法: 将50只淀粉样前体蛋白/早老素1(APP/PS1)双转基因小鼠随机分为模型组, 上下两济丹低、中、高剂量组, 盐酸多奈哌齐组, 每组10只; 将10只同背景C57BL/6小鼠分为正常组。采用Morris水迷宫、新物体识别观察小鼠认知能力, 透射电镜、尼氏染色观察小鼠海马区病理改变, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测小鼠海马组织神经炎症情况, 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠海马组织PI3K/Akt通路蛋白、突触后致密区蛋白95(PSD95)、淀粉样前体蛋白(APP)表达情况。结果: 与正常组比较, 模型组小鼠游泳总路程、上平台潜伏期显著增加($P<0.01$), 穿越平台次数显著减少($P<0.01$); 识别指数显著降低($P<0.01$); 海马区神经元凋亡明显; CA3区神经元数量显著减少($P<0.01$); 海马组织中白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量显著升高($P<0.01$); 海马组织中APP蛋白表达显著上调($P<0.01$), PSD95、磷酸化(p)-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白表达显著下调($P<0.01$)。与模型组比较, 上下两济丹高剂量组小鼠游泳总路程、上平台潜伏期显著减少, 穿越平台次数显著增加($P<0.01$); 识别指数显著升高($P<0.01$); 海马区神经元凋亡减轻; CA3区神经元数量显著增多($P<0.01$); 海马组织中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量显著降低($P<0.01$); 海马组织中APP蛋白表达明显下调($P<0.05$), PSD95、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白表达显著上调($P<0.01$)。结论: 上下两济丹可能通过调控PI3K/Akt信号通路, 减轻AD小鼠神经炎症, 缓解神经元及突触损伤, 改善认知功能。

[关键词] 上下两济丹; 阿尔茨海默病; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路

[中图分类号] R277; R285; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)17-0038-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260136

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251223.1928.002>

[网络出版日期] 2025-12-24 09:50:56 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Mechanisms of Shangxia Liangji Danin Improving Cognitive Function in AD Mice Based on PI3K/Akt Signaling Pathway

YANG Shuo^{1,2}, ZHU Ling³, CHENG Wei⁴, TAN Aihua^{5*}, SHEN Feng^{1,6*}

- (1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;
2. Huanggang Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Hubei University of Chinese Medicine, Huanggang 438000, China; 3. Huanggang Central Hospital, Huanggang 438000, China;
4. Hubei Minzu University, Enshi 445000, China;
5. Hubei Key Laboratory of Germplasm Improvement and Utilization of Dabie Shan Dao-di Herbs

[收稿日期] 2025-09-14

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(82405523); 黄冈市卫生健康委员会黄冈市科学技术局中医药科研专项(黄卫发[2024]17号-1、黄卫发[2024]17号-10)

[第一作者] 杨硕, 在读博士, 主治医师, 从事中医药防治老年病的临床和基础研究, E-mail: 734916256@qq.com

[通信作者] * 谭爱华, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中医药防治老年病的临床和基础研究, E-mail: baihuicm2020@163.com;

* 沈峰, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 从事针药结合防治AD研究, E-mail: 40052958@qq.com

(Huanggang Normal University), Huanggang 438000, China;
6. Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430061, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanisms by which Shangxia Liangji pills improve cognitive function in Alzheimer's disease (AD) mice based on the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway, aiming to provide experimental evidence for its clinical use in AD treatment. **Methods:** Fifty APP/PS1 double-transgenic mice were randomly divided into a model group, Shangxia Liangji pills low-dose group, medium-dose group, high-dose group, and donepezil hydrochloride group, with 10 mice in each group. Additionally, 10 C57BL/6 mice of the same genetic background were assigned to the normal group. Cognitive function was assessed using the Morris water maze and novel object recognition tests. Hippocampal pathological changes were observed using transmission electron microscopy and Nissl staining. Neuroinflammation in hippocampal tissue was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Protein expression levels of PI3K/Akt pathway-related proteins, postsynaptic density protein 95 (PSD95), and amyloid precursor protein (APP) in hippocampal tissue were measured by Western blot. **Results:** Compared with the normal group, the model group exhibited significantly increased total swimming distance and escape latency, significantly reduced number of platform crossings ($P<0.01$), and a decreased recognition index ($P<0.01$). Marked neuronal apoptosis was observed in the hippocampal region, with a marked reduction in the number of neurons in the CA3 region ($P<0.01$). Levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in hippocampal tissue were significantly elevated ($P<0.01$). APP expression in hippocampal tissue was markedly upregulated ($P<0.01$), while PSD95, p-PI3K/PI3K, and p-Akt/Akt protein expression were significantly downregulated ($P<0.01$). Compared with the model group, the Shangxia Liangji pills high-dose group showed significantly reduced total swimming distance and escape latency, significantly increased number of platform crossings ($P<0.01$), and an elevated recognition index ($P<0.01$). Hippocampal neuronal apoptosis was alleviated, with a significant increase in the number of neurons in the CA3 region ($P<0.01$). Levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α were significantly decreased ($P<0.01$). APP expression was downregulated ($P<0.05$), while PSD95, p-PI3K/PI3K, and p-Akt/Akt protein expression were significantly upregulated ($P<0.01$). **Conclusion:** Shangxia Liangji pills may improve cognitive function in AD mice by modulating the PI3K/Akt pathway, thereby reducing neuroinflammation and alleviating neuronal and synaptic injury.

[Keywords] Shangxia Liangji pills; Alzheimer's disease; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway

阿尔茨海默病(AD)是一种以认知水平下降为主的老年神经退行性疾病,其病理表现主要为神经炎症、 β 淀粉样蛋白(A β)沉积及Tau蛋白的过度磷酸化^[1]。随着全球人口老龄化与人口总量增长,在过去几十年内AD患病人数逐年增长,在未来10年发病人数预计将突破1.52亿^[2-3]。在我国,60岁以上人口中AD患病率在5.5%左右,未来随着老龄化的持续加剧,患病总数将持续增长,严重威胁着公共卫生安全和社会保障^[4]。

磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路是细胞存活、增殖和代谢的核心调节通路,该通路与多种疾病密切相关,在大脑中密切调控神经炎症及突触可塑性^[5]。该通路可磷酸化下游靶点如糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR),抑制凋亡并促进神经元存活^[6]。在AD中,PI3K/Akt信号通路失活可导致A β 沉积,Tau蛋白异常磷酸化,加剧神经炎症,引起神经元凋亡^[7]。研究表明,PI3K/Akt信号通路还可通过修复线粒体功能,减少活性氧含量,发挥AD神经元保护作用^[8]。

在中医学中,AD属于“痴呆”“健忘”“神呆”等疾病范畴,病机为“本虚标实”,肾精亏虚为本,痰浊血瘀为标。脑为“元神之府”,后天生化无源,经脉阻滞不通,而致元神失养,髓减脑消,引起记忆减退,最终形成“呆病”^[9]。上下两济丹出自陈士铎《辨证录》,全方既可补肾填精治其本,又可降火解毒祛其标,标本兼治,共同改善认知能力。前期研究表明,上下两济丹可减轻淀粉样前体蛋白/早老素1(APP/PS1)双转基因小鼠神经元及突触损伤,改善认知功能,但其详细作用机制尚不明确^[10]。

AD核心病理生理(A β 沉积、Tau蛋白异常磷酸化等)过程中,PI3K/Akt信号通路为其核心机制。本研究聚焦该通路,首次阐释中药复方“上下两济丹”通过多靶点协同调控此通路发挥综合神经保护作用的独特机制。故本研究以APP/PS1小鼠为模型,观察上下两济丹能否通过激活PI3K/Akt信号通路,改善突触损伤,最终改善小鼠认知功能。

1 材料

1.1 动物 50只6月龄SPF级APP/PS1双转基因雄性小鼠,10只6月龄SPF级同背景C57BL/6小鼠,

体质量(26 ± 2) g 购买于北京华阜康生物科技股份有限公司,生产合格证号 SCXK(京)2019-0008。小鼠饲养在温度(23.5 ± 1.5) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 45%~55% 的屏障环境内,12 h 明暗交替,自由摄食饮水。

1.2 伦理 实验遵照“3R”原则实施,实验方案通过湖北中医药大学附属黄冈中医医院伦理委员会批准(IEC202405)。

1.3 药品与试剂 人参 15 g、白术 15 g、山萸肉 9 g、肉桂 6 g(安徽林峰药业有限公司,批号分别为 240701、240801、240901、240501),熟地黄 30 g、黄连 6 g(湖北辰美中药有限公司,批号分别为 2423120109、2424110106),中药饮片购买于湖北中医药大学附属黄冈中医医院中药房,经湖北中医药大学药学院丁莉教授鉴定为正品。参照《医疗机构中药煎药室管理规范》,将上述饮片加水浸泡,分 2 次煎煮,浓缩,减压冷冻干燥制成冻干粉,干燥后密封保存,用时以 ddH_2O 配制成生药质量浓度为 $1.0\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液^[11]。盐酸多奈哌齐片购买于湖北中医药大学附属黄冈中医医院门诊药房(天津力生制药股份有限公司,批号 2403008),用时以 ddH_2O 溶解。电镜固定液、尼氏染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为 G1102、G1036);PI3K、淀粉样前体蛋白(APP)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为 67071-1-Ig、25524-1-AR、10494-1-AP);磷酸化(p)-PI3K(Y607)抗体(美国 Immunoway 公司,货号 YP0765);Akt、p-Akt(S473)、突触后致密区蛋白 95(PSD95)抗体(上海埃必威生物技术有限公司,货号分别为 CY5561、CY6569、CY5407);白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号分别为 E-EL-M0044、E-EL-M0037、E-EL-M3063)。

1.4 仪器 Eclipse E100 型正置光学显微镜(日本光学工业株式会社);HT7700 型透射电子显微镜(日本株式会社日立制作所);VT1000S 型振动切片机(德国徕卡仪器有限公司);Morris 型水迷宫、ZH-XT 型新物体识别设备(安徽正华生物仪器设备有限公司);KDC-140HR 型高速冷冻离心机(合肥科大创新股份有限公司中佳分公司);GelView 6000 Pro II 型多功能图像工作站(广州博鹭腾生物技术有限公司);PowerPac Basic 型电泳仪(上海伯乐生命医学产品有限公司);flexa-200 型全自动酶标仪(杭州奥盛仪器有限公司);SCIENTZ-18N/A 型

冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 所有小鼠适应性饲养 7 d 后进行 Morris 水迷宫实验,筛选合格动物。50 只 APP/PS1 小鼠随机分为模型组,上下两济丹低、中、高剂量组,盐酸多奈哌齐组,每组 10 只;10 只 C57BL/6 小鼠分为正常组。根据人与动物体表面积换算法及课题组前期实验结果^[10,12],换算后小鼠等剂量用量为 $10.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,上下两济丹低、中、高剂量组给药量分别为 5.45 、 10.9 、 $21.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,盐酸多奈哌齐给药量为 $0.65\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,正常组、模型组给予等体积 ddH_2O ,每日灌胃 1 次,连续给药 40 d。

2.2 Morris 水迷宫检测小鼠空间记忆能力 灌胃结束后,各组小鼠先进行 5 d 的定位航行训练,记录各个小鼠的游泳速度,游泳总路程,上平台潜伏期,并记录运动轨迹。休息 1 d 后,撤掉平台,记录各个小鼠穿越平台次数,并记录运动轨迹。

2.3 新物体识别检测小鼠认知记忆能力 各组小鼠 Morris 水迷宫结束后先适应空场环境,再放置 2 个相同物体使其熟悉。随后替换一物体为新物体,记录各个小鼠对新旧物体的探索时间、次数等,计算识别指数。识别指数=探索新物体时间/(探索新物体时间+探索旧物体时间)。

2.4 透射电镜检测小鼠海马区超微结构 小鼠新物体识别实验结束后,取海马区 1 mm^3 组织,组织经固定、梯度脱水、包埋后,超薄切片。切片经双重染色(醋酸铀+柠檬酸铅),上样至铜网,透射电镜观察并采集图像,分析超微结构特征。

2.5 尼氏染色检测小鼠海马区神经元数量 取小鼠全脑,组织经固定,石蜡包埋后切薄片,碱性染料染色,乙醇梯度脱色、二甲苯透明,中性树胶封片,显微镜采集图片,Image J 软件分析。

2.6 ELISA 检测小鼠海马组织中炎症因子的表达水平 取小鼠海马组织,匀浆制备上清,酶标板上加标准品 $50\text{ }\mu\text{L}$,加入样品 $50\text{ }\mu\text{L}$,孵育,洗涤,加酶标试剂 $50\text{ }\mu\text{L}$,孵育,洗涤,加入显色剂,避光显色,加终止液 $50\text{ }\mu\text{L}$,全自动酶标仪 450 nm 处测吸光度 A ,绘制标准曲线,计算 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠海马组织中 PI3K/Akt 通路相关蛋白及 APP、PSD95 蛋白表达情况 取小鼠海马组织,裂解液提取蛋白,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜,5%脱脂奶粉封闭,一抗(PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、APP、PSD95,稀释比为 1:1 000;GAPDH 稀释

比为1:5 000)4℃孵育过夜,TBST洗涤,二抗(1:10 000)室温孵育1 h,洗涤,增强化学发光法(ECL)化学发光显影,Image J软件测量灰度值。

2.8 统计分析 所有数据采用SPSS 23.0软件进行数据分析,使用Photoshop CC 2020软件编辑图片。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$,数据符合正态分布、方差齐时,采用单因素方差分析,方差不齐时两组间采用Welch's *t*检验,多组间采用非参数检验;数据不符合正态分布时,采用非参数检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

表1 上下两济丹对小鼠空间记忆能力的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Shangxia Liangji pills on spatial memory ability in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	平均游泳速度/mm·s ⁻¹	游泳总路程/m	上平台潜伏期/s	穿越平台次数/次
正常组		163.23±19.35	2.66±0.37	16.32±2.26	4.50±1.08
模型组		158.54±17.02	13.22±0.93 ¹⁾	83.39±5.87 ¹⁾	0.60±0.52 ¹⁾
上下两济丹低剂量组	5.45	161.48±14.41	12.55±1.32	77.71±8.16	0.90±0.74
上下两济丹中剂量组	10.9	165.09±16.87	11.31±1.51 ³⁾	68.47±9.14 ³⁾	1.70±0.82 ³⁾
上下两济丹高剂量组	21.8	160.51±16.32	9.45±1.86 ³⁾	58.57±11.58 ³⁾	2.40±0.84 ³⁾
盐酸多奈哌齐组	6.5×10 ⁻⁴	162.51±11.84	8.24±1.92 ³⁾	50.69±11.82 ³⁾	3.00±1.15 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.01$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表2-表6同)

3.2 上下两济丹对小鼠认知记忆能力的影响 与正常组比较,模型组小鼠识别指数明显减少($P<0.01$);与模型组比较,上下两济丹高剂量组、盐酸多奈哌齐组小鼠识别指数明显升高($P<0.01$)。见表2。

3.3 上下两济丹对小鼠海马区神经细胞状态的影响 正常组海马神经元细胞结构完整,细胞核结构完整,染色质团聚在核内,线粒体丰富且结构完整。模型组海马神经元出现细胞死亡现象,镜下可见细胞核塌陷,边界破解甚至消失,染色质固缩或消失,线粒体数量明显减少,且大部分线粒体出现肿胀甚至破裂。上下两济丹中、高剂量组与盐酸多奈哌齐组小鼠海马神经元也存在不同程度的损伤,但细胞

3 结果

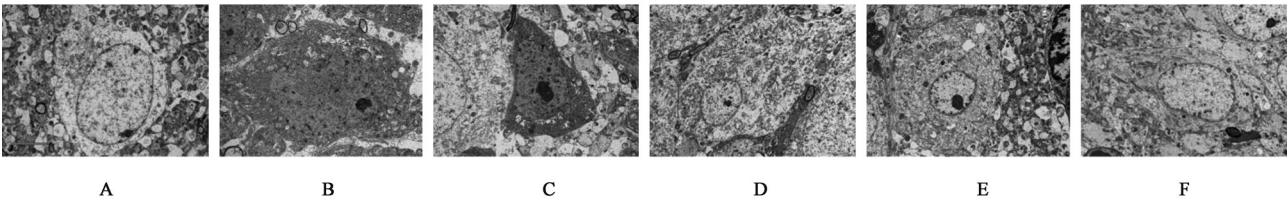
3.1 上下两济丹对小鼠空间记忆能力的影响 与正常组比较,模型组小鼠游泳总路程及上平台潜伏期显著增加($P<0.01$),穿越平台次数显著减少,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,上下两济丹中、高剂量组与盐酸多奈哌齐组小鼠游泳总路程及上平台潜伏期显著减少($P<0.01$),穿越平台次数显著增多,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表1及增强出版附加材料。

表2 上下两济丹对小鼠认知记忆能力的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Shangxia Liangji pills on cognitive memory ability in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	识别指数
正常组		0.78±0.08
模型组		0.45±0.06 ¹⁾
上下两济丹低剂量组	5.45	0.47±0.09
上下两济丹中剂量组	10.9	0.49±0.06
上下两济丹高剂量组	21.8	0.58±0.05 ³⁾
盐酸多奈哌齐组	6.5×10 ⁻⁴	0.63±0.05 ³⁾

核整体形态基本正常、结构完整,镜下可见部分线粒体肿胀,见图1。



注:A.正常组;B.模型组;C.上下两济丹低剂量组;D.上下两济丹中剂量组;E.上下两济丹高剂量组;F.盐酸多奈哌齐组(图2-图4同)

图1 上下两济丹对小鼠海马区神经细胞状态的影响(透射电镜,×5 000)

Fig. 1 Effect of Shangxia Liangji pills on hippocampal neuronal state in mice (TEM, ×5 000)

3.4 上下两济丹对小鼠海马CA3区神经元数量的影响 与正常组比较,模型组小鼠视野内神经细胞数目显著减少($P<0.01$);与模型组比较,上下两济丹中、高剂量组与盐酸多奈哌齐组小鼠视野内神经细

胞数目明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。见图2、表3。

3.5 上下两济丹对小鼠海马神经炎症的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马组织中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量显著增多($P<0.01$);与模型组比较,上下两济丹

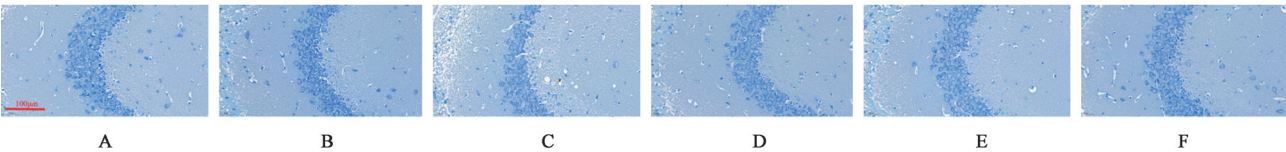


图 2 上下两济丹对小鼠海马 CA3 区病理改变的影响 (尼氏,×200)

Fig. 2 Effect of Shangxia Liangji pills on pathological changes in hippocampal CA3 region of mice (Nissl,×200)

表 3 上下两济丹对小鼠海马 CA3 区神经元数量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Shangxia Liangji pills on neuronal number in hippocampal CA3 region of mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	视野内神经细胞数目/个
正常组		147.33±18.18
模型组		63.33±14.57 ¹⁾
上下两济丹低剂量组	5.45	73.67±6.64
上下两济丹中剂量组	10.9	85.66±7.77 ²⁾
上下两济丹高剂量组	21.8	94.33±15.69 ³⁾
盐酸多奈哌齐组	6.5×10 ⁻⁴	115.67±9.02 ³⁾

表 4 上下两济丹对小鼠海马神经炎症的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6	IL-1β	TNF-α
正常组		97.89±3.28	121.56±2.43	212.41±31.97
模型组		199.28±6.87 ¹⁾	337.50±9.87 ¹⁾	582.02±50.75 ¹⁾
上下两济丹低剂量组	5.45	190.98±3.68 ²⁾	327.98±14.47	577.71±40.44
上下两济丹中剂量组	10.9	177.36±6.79 ³⁾	307.25±7.03 ³⁾	454.18±37.98 ³⁾
上下两济丹高剂量组	21.8	158.32±4.09 ³⁾	287.69±8.63 ³⁾	350.45±35.08 ³⁾
盐酸多奈哌齐组	6.5×10 ⁻⁴	139.71±8.04 ³⁾	261.57±10.60 ³⁾	300.84±48.39 ³⁾

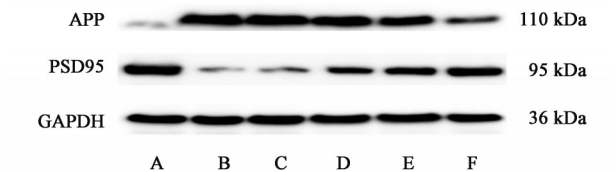


图 3 小鼠海马组织中 PSD95、APP 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of PSD-95 and APP proteins expression in hippocampus of mice

表 5 上下两济丹对小鼠海马组织中 PSD95、APP 蛋白表达情况的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Shangxia Liangji pills on expression of PSD-95 and APP proteins in hippocampus of mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PSD95/GAPDH	APP/GAPDH
正常组		1.15±0.21	0.10±0.02
模型组		0.15±0.01 ¹⁾	1.16±0.13 ¹⁾
上下两济丹低剂量组	5.45	0.25±0.05	1.09±0.06
上下两济丹中剂量组	10.9	0.51±0.05 ²⁾	0.92±0.18
上下两济丹高剂量组	21.8	0.69±0.91 ²⁾	0.82±0.09 ²⁾
盐酸多奈哌齐组	6.5×10 ⁻⁴	0.86±0.16 ²⁾	0.42±0.07 ³⁾

中、高剂量组与盐酸多奈哌齐组小鼠海马组织中 IL-6、IL-1β、TNF-α 含量显著降低 ($P<0.01$)。见表 4。

3.6 上下两济丹对小鼠海马组织中 PSD95、APP 蛋白表达情况的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马中 PSD95 蛋白表达明显下调,APP 蛋白表达显著上调,差异具有统计学意义 ($P<0.01$);与模型组比较,上下两济丹高剂量组与盐酸多奈哌齐组小鼠海马中 PSD95 蛋白表达明显上调,差异具有统计学意义 ($P<0.05$),APP 蛋白表达明显下调 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 3、表 5。

3.7 上下两济丹对小鼠海马组织中 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达情况的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达显著下调 ($P<0.01$);与模型组比较,上下两济丹中、高剂量组与盐酸多奈哌齐组小鼠海马中 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达明显上调 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 6、图 4。

表 6 上下两济丹对小鼠海马组织中 PI3K/Akt 通路蛋白表达情况的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Shangxia Liangji pills on PI3K/Akt pathway protein expression in hippocampus of mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
正常组		1.04±0.04	1.39±0.21
模型组		0.17±0.04 ¹⁾	0.01±0.01 ¹⁾
上下两济丹低剂量组	5.45	0.27±0.05	0.02±0.01
上下两济丹中剂量组	10.9	0.42±0.02 ²⁾	0.06±0.01 ³⁾
上下两济丹高剂量组	21.8	0.69±0.07 ³⁾	0.35±0.05 ³⁾
盐酸多奈哌齐组	6.5×10 ⁻⁴	0.88±0.08 ³⁾	0.54±0.08 ³⁾

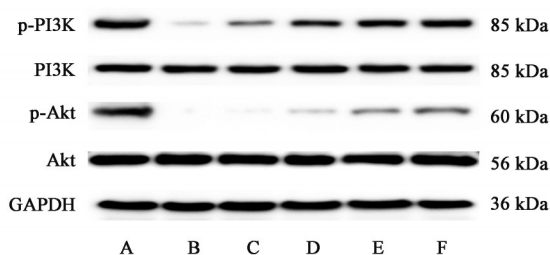


图4 小鼠海马组织中PI3K/Akt通路蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of PI3K/Akt pathway proteins expression in hippocampus of mice

4 讨论

AD属中医“神志病”范畴,其病位在脑,与肾、心、肝、脾有关,其核心病机可归纳为“肾元亏虚、痰瘀痹阻、髓减脑消、神机失用”^[13]。《黄帝内经·灵枢·海论》提出“脑为髓之海”,首次将认知障碍与脏腑衰老关联。《伤寒杂病论》记载“阳明病,其人善忘者,必有蓄血”,开创“瘀血致呆”学说。《华佗神医密传》首次使用“痴呆”一词。《太平惠民和剂局方》将远志丸用于治疗“心气不足,肾经虚损”所致健忘,体现心肾同治理念。

上下两济丹由熟地黄、人参、白术、山茱萸、黄连、肉桂组成,方中熟地黄滋阴补肾,人参大补元气,白术健脾益气,山茱萸固精补肾,四药共筑心肾气血之基,解决“髓减脑消”之本。黄连清心火,肉桂温肾阳,二者配伍形成“交泰丸”结构,直接调和心肾阴阳失衡。陈士铎明确指出:“黄连泻心火,肉桂温肾水,水火既济则神明安”。黄连与肉桂剂量轻,避免过于寒凉或温燥,白术、人参、熟地黄等补益药可缓解其偏性,体现“扶正祛邪、寒热并调”的配伍智慧。现代研究表明,黄连中的小檗碱可减轻AD神经炎症,减少神经元凋亡^[14];人参中的人参皂苷Rg₁可穿透血脑屏障,改善突触可塑性^[15];肉桂提取物可以提高氧化应激能力^[16];熟地黄、山茱萸药对可减轻AD细胞模型的凋亡率^[17];白术内酯Ⅲ可改善AD大鼠学习记忆能力^[18]。上下两济丹复方中单味药物或单味单体在AD治疗中屡次被报道,并表现出显著的抗AD效果。然而目前关于上下两济丹复方治疗AD相关的报道较少,研究主要集中在失眠疾病中^[19]。本课题组聚焦中药复方多靶点协同调控的优势,以动物模型为切入点,探究其改善AD认知能力的功效。

AD病机复杂,目前尚不明确,其发生主要与多个生物学机制密切相关,主要病理表现为A β 沉积形成淀粉样斑块、Tau蛋白过度磷酸化形成神经

维缠结(NFTs)、突触损伤与神经元凋亡^[20]。具体表现为,A β 被异常切割为A β ₁₋₄₂,A β ₁₋₄₂异常聚体,激活星形胶质细胞和小胶质细胞,触发神经炎症,诱导神经元凋亡,增加突触损伤^[21]。Tau蛋白可维持神经元内微管稳定性,过度磷酸化的Tau蛋白丧失与微管结合能力,致使微管解体,最终形成NFTs,阻碍突触传导^[22]。本研究选用业界公认的APP/PS1双转基因小鼠作为AD模型,Morris水迷宫发现,上下两济丹可减少小鼠游泳总路程及上平台潜伏期,增加穿越平台次数,表明上下两济丹可改善小鼠的空间记忆能力。新物体识别发现,上下两济丹可提高小鼠识别指数,表明上下两济丹可改善小鼠的认知记忆能力。进一步通过超微电镜发现,上下两济丹组细胞核整体形态大体正常、结构完整,表明上下两济丹可改善AD小鼠海马区神经元细胞结构完整性。通过尼氏染色发现,上下两济丹可改善海马CA3区神经细胞数目,表明上下两济丹可减轻CA3区神经元损伤。

PI3K/Akt通路是细胞内高度保守的信号传导网络,通过级联激活,可以调控细胞增殖、代谢、存活及凋亡等生物学过程^[23]。PI3K作为异二聚体脂质激酶家族,拥有3个不同类型:I型为信号传导核心,I A型主要由受体酪氨酸激酶、生长因子等激活,I B型主要由G蛋白偶联受体激活;II型主要产生磷脂酰肌醇三磷酸(PIP₃),参与多种膜相关过程;III型是膜运输/自噬核心^[24]。Akt作为丝氨酸/苏氨酸激酶家族,拥有3种不同亚型,即Akt1、Akt2、Akt3,I型PI3K被上游信号激活后,将细胞膜上的磷脂酰肌醇二磷酸(PIP₂)磷酸化为PIP₃,Akt通过PH结构域结合PIP₃,将Akt从细胞质招募到细胞膜上,Akt暴露疏水结构域和激活结构域,并被3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶-1(PDK-1)和MTOR复合体2(mTORC2)磷酸化^[25]。该通路受上游细胞因子、激素、受体酪氨酸激酶等信号激活PI3K,信号向下传导激活Akt,并产生下游效应^[26]。研究表明,在AD中PI3K/Akt信号通路受到抑制,导致神经元减少,加剧突触损伤^[27]。Akt可以通过磷酸化核转录因子- κ B(NF- κ B)减轻神经炎症,通路失活可加剧小胶质细胞的炎症反应,促进IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等炎症因子释放^[28]。本研究通过ELISA检测发现,上下两济丹可减轻AD小鼠海马组织中IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量,IL-6、IL-1 β 、TNF- α 均为炎症相关因子,表明上下两济丹可减轻小鼠脑神经炎症。进一步通过Western blot检测AD小鼠海马组织中AD及PI3K/

Akt通路相关指标,上下两济丹可下调海马组织中APP,上调PSD95、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白表达,表明上下两济丹可能通过激活位于细胞膜上的受体酪氨酸激酶、G蛋白偶联受体激活PI3K,招募并活化Akt,激活的Akt可能通过磷酸化NF- κ B减轻神经炎症。下调APP表达,表明上下两济丹可减少APP含量,进而减少A β_{1-42} 的异常聚体。PSD95为突触后膜的特异性标志物,其信号上调,表明上下两济丹可改善突触损伤,进而改善认知功能。

综上所述,上下两济丹可能通过调控PI3K/Akt通路,减轻AD小鼠神经炎症,缓解神经元及突触损伤,改善认知功能。但本次研究只是粗浅地检测了PI3K/Akt通路上相关指标,未对通路进行抑制或阻断,未对通路上游启动因子进行检测,无法具体证实对该通路的调控作用,在下一步的研究中,将加入体外细胞实验,完善通路机制研究。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] SCHELTENS P, DE S B, KIVIPELTO M, et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet, 2021, 397(10284): 1577-1590.
- [2] COLLABORATORS G 2 D F. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: An analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet Public Health, 2022, 7(2): e105-e125.
- [3] ZHANG Q, DENG Y, XUE M, et al. Global trends in Alzheimer's disease and other dementias in adults aged 55 and above (1992-2021): An age-period-cohort analysis based on the GBD 2021[J]. PLoS One, 2025, 20(8): e0331204.
- [4] 汪睿彤,刘珏. 阿尔茨海默病的流行病学研究进展[J]. 中国慢性病预防与控制, 2021, 29(9): 707-711.
WANG R T, LIU J. Research progress in epidemiology of Alzheimer's disease[J]. Chin J Prev Control Chronic Non-Commun Dis, 2021, 29(9): 707-711.
- [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): 943-957.
- [6] MIAO J, ZHANG Y, SU C, et al. Insulin-like growth factor signaling in Alzheimer's disease: Pathophysiology and therapeutic strategies[J]. Mol Neurobiol, 2025, 62(3): 3195-3225.
- [7] PENG X, GUO H, ZHANG X, et al. TREM2 inhibits Tau hyperphosphorylation and neuronal apoptosis via the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(5): 2470-2485.
- [8] 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.
- [9] 关徐涛,关运祥,张振强. 阿尔茨海默病中医核心病机演变

规律[J]. 中医学报, 2022, 37(6): 1153-1157.

GUAN X T, GUAN Y X, ZHANG Z Q. TCM core pathogenesis and evolution pattern of Alzheimer's disease[J]. Acta Chin Med, 2022, 37(6): 1153-1157.

- [10] 杨硕,刘芳,朱玲,等. 基于NPTX2/C1q/C3补体通路探讨“上下两济丹”改善AD-痰瘀互结小鼠认知能力的作用机制[J]. 时珍国医国药, 2025, 36(3): 467-473.

YANG S, LIU F, ZHU L, et al. Exploring the action mechanism of Shangxia Liangji pill in ameliorating the learning and cognitive ability of mice with Alzheimer's disease and phlegm stasis through the NPTX2/C1q/C3 complement pathway [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2025, 36(3): 467-473.

- [11] 国家中医药管理局、卫生部关于印发医疗机构中药煎药室管理规范的通知[J]. 中华人民共和国卫生部公报, 2009(6): 29-31.

Notice of the National Administration of Traditional Chinese Medicine and the Ministry of Health on Issuing the Management Standards for TCM decoction rooms in medical institutions[J]. Gaz Minist Health Chin, 2009(6): 29-31.

- [12] 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): 1069-1072.

HUANG J H, HUANG X H, CHEN Z Y, et al. Dose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2004(9): 1069-1072.

- [13] 刘欣,张若冰,李陈雪,等. 中医药治疗阿尔茨海默病的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(5): 1146-1154.

LIU X, ZHANG R B, LI C X, et al. Research progress of treating Alzheimer's disease with traditional Chinese medicine [J]. Chin J Chin Mater Med, 2025, 50(5): 1146-1154.

- [14] 王雪婧,钟光成,李舒婷,等. 小檗碱治疗阿尔茨海默病的药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(2): 286-294.

WANG X J, ZHONG G C, LI S T, et al. Pharmacological effect of berberine on Alzheimer's disease: A review[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(2): 286-294.

- [15] 王超楠,赵大庆,严铭铭,等. 人参治疗阿尔茨海默病药理作用及机制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2023, 42(3): 116-122.

WANG C N, ZHAO D Q, YAN M M, et al. Research progress on pharmacological action and mechanism of Renshen (Ginseng Radix et Rhizoma) in treatment of Alzheimer's disease [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2023, 42(3): 116-122.

- [16] 李冉,田子明. 肉桂提取物对阿尔茨海默病大鼠学习记忆和氧化应激水平的影响及机制[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(11): 2811-2815.

LI R, TIAN Z M. Effects and mechanisms of cinnamon extract on learning-memory abilities and oxidative stress levels in Alzheimer's disease rats[J]. Chin J Gerontol, 2022,

- 42(11):2811-2815.
- [17] 王旭,许原,管亚男,等. 熟地黄-山茱萸药对通过PI3K/Akt通路对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的N2a细胞凋亡的影响[J]. 辽宁中医杂志,2024,51(2):151-154,226.
- WANG X, XU Y, GUAN Y N, et al. Effects of Shudihuang (Rehmanniae Radix Praeparata)-Shanzhuyu (Corni Fructus) herb pair on N2a cell apoptosis induced by $A\beta_{25-35}$ through PI3K/Akt signaling pathway[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2024,51(2):151-154,226.
- [18] 于新宇,张媛媛,嵇志红. 白术内酯Ⅲ对痴呆大鼠学习记忆能力及海马Bcl-2表达的影响[J]. 东北师大学报:自然科学版,2018,50(3):109-113.
- YU X Y, ZHANG Y Y, JI Z H. Effects of atractylenolide Ⅲ on learning and memory impairment and Bcl-2 expression in hippocampus in a rat model of Alzheimer's disease [J]. J Northeast Norm Univ:Nat Sci Ed,2018,50(3):109-113.
- [19] 全夏杰,梁豪,纪雄英,等. 上下两济丹治疗失眠作用机制探析:基于网络药理学、分子对接和实验验证[J]. 亚太传统医药,2024,20(11):25-33.
- QUAN X J, LIANG H, JI X Y, et al. Analysis of the mechanism of Shangxia Liangji decoction in treating insomnia based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification[J]. Asia-Pac Tradit Med, 2024, 20(11):25-33.
- [20] GUO X, YAN L, ZHANG D, et al. Passive immunotherapy for Alzheimer's disease [J]. Ageing Res Rev, 2024, 94: 102192.
- [21] ZOTT B, SIMON M M, HONG W, et al. A vicious cycle of β amyloid-dependent neuronal hyperactivation [J]. Science, 2019,365(6453):559-565.
- [22] SAMUDRA N, LANE-DONOVAN C, VANDEVREDE L, et al. Tau pathology in neurodegenerative disease: Disease mechanisms and therapeutic avenues[J]. J Clin Invest, 2023, 133(12):e168553.
- [23] 黄子轩,杨硕,周家琪,等. 基于PI3K/Akt信号通路探讨酸枣仁皂苷A改善血管性认知障碍模型大鼠认知功能的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2025,31(6):107-114.
- HUANG Z X, YANG S, ZHOU J Q, et al. Jujuboside A improves cognitive function in rat model of VCI via PI3K/Akt signaling pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(6):107-114.
- [24] JIANG N, DAI Q, SU X, et al. Role of PI3K/Akt pathway in cancer: The framework of malignant behavior [J]. Mol Biol Rep, 2020,47(6):4587-4629.
- [25] YUDUSHKIN I. Control of Akt activity and substrate phosphorylation in cells[J]. IUBMB Life, 2020, 72(6):1115-1125.
- [26] HE Y, SUN M M, ZHANG G G, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021,6(1):425.
- [27] JIANG M, ZHAO D, ZHOU Y, et al. Cathepsin B modulates microglial migration and phagocytosis of amyloid β in Alzheimer's disease through PI3K-Akt signaling [J]. Neuropsychopharmacology, 2025, 50(4):640-650.
- [28] KUMAR M, BANSAL N. Implications of phosphoinositide 3-kinase-Akt (PI3K-Akt) pathway in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Mol Neurobiol, 2022, 59(1):354-385.
- [责任编辑 孙丛丛]