

• XXXX •

基于酮体代谢-谷氨酸/AMPA信号通路探讨当归芍药散改善 认知障碍的作用及机制

王莎莎¹, 王鑫¹, 龚可心¹, 邱羿¹, 喻燕姿¹, 孙家群¹, 陈玟璇¹, 吴惠妃^{2*}, 李伟荣^{1*}

(1. 广州中医药大学 科技创新中心, 广州 510405;

2. 中山市中医院, 广州中医药大学附属中山中医院, 中山 614001)

[摘要] 目的:探讨当归芍药散(DSS)改善认知障碍的作用,是否与其促进脑内酮体代谢、调控谷氨酸/ α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸受体(AMPA)信号通路有关。方法:雄性APP/PS1小鼠随机分为模型组,DSS低、中、高剂量组(3.2、6.4、12.8 g·kg⁻¹),生酮饮食组,抑制剂他仑帕奈组(5 mg·kg⁻¹),C57BL/6J野生型小鼠为正常组。他仑帕奈组于第6周起连续灌胃2周,其余各组均连续干预8周后进行行为学检测,透射电镜观察CA1区突触超微结构,免疫组化法(IHC)检测钙/钙调蛋白依赖激酶Ⅱ(CaMKⅡ)蛋白表达,生化试剂盒检测 β -羟基丁酸(BHB)与乳酸(LAC)的含量,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)、 γ -氨基丁酸(GABA)和突触素(SYP)含量,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测谷氨酰胺合成酶(GS)、谷氨酰胺酶(GLS)、谷氨酸脱羧酶(GAD)、CaMKⅡ、AMPA受体亚基GluA1、GluA2 mRNA表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测GS、GLS、GAD、GluA1、GluA2蛋白的表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠识别指数、自发交替率、目标象限停留时间显著降低($P<0.01$),逃避潜伏期和目標象限对侧与目標象限时间比值明显上升($P<0.05$, $P<0.01$),海马CA1区突触超微结构出现显著损伤,CaMKⅡ蛋白表达明显增加,BHB含量差异无统计学意义,LAC、Glu含量显著增加($P<0.01$),SYP、Gln及GABA含量显著降低($P<0.01$),GS、GAD、GluA2的mRNA和蛋白表达明显下调($P<0.05$, $P<0.01$),GLS、GluA1的mRNA和蛋白表达明显上调($P<0.05$, $P<0.01$),CaMKⅡ mRNA表达显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,DSS干预后小鼠行为学指标明显改善($P<0.05$, $P<0.01$),海马CA1区突触超微结构可塑性增强,CaMKⅡ蛋白表达明显降低,BHB含量显著升高($P<0.01$),LAC和Glu含量显著降低($P<0.01$),SYP、Gln及GABA含量显著升高($P<0.01$),GS、GAD、GluA2 mRNA和蛋白表达均显著回升,GLS与GluA1 mRNA和蛋白表达明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),CaMKⅡ mRNA表达显著降低($P<0.01$)。结论:DSS能够改善APP/PS1小鼠的学习记忆能力并增强突触可塑性,其神经保护作用与促进酮体生成、重塑脑能量代谢相耦合,且与谷氨酸/AMPA通路的调控相关。

[关键词] 当归芍药散; 阿尔茨海默病; 酮体; 能量代谢; 谷氨酸/ α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噁唑丙酸受体(AMPA)信号通路; 认知障碍

[中图分类号] R289;R259;R285 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(XXXX)XX-0001-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260104

[网络出版地址]

[网络出版日期] XXXX-XX-XX



Danggui Shaoyaosan Alleviates Cognitive Impairment by Regulating Ketone Body Metabolism and Glutamate/AMPA Pathway

WANG Shasha¹, WANG Xin¹, GONG Kexin¹, QIU Yi¹, YU Yanzi¹, SUN Jiaqun¹,

CHEN Wenxuan¹, WU Huifei^{2*}, LI Weirong^{1*}

(1. Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine,

[收稿日期] 2025-10-21

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82374547);广东省自然科学基金面上项目(2023A1515011835);中山市中医药传承创新发展科研专项(2024B3024)

[第一作者] 王莎莎,在读硕士,从事中医药防治脑病研究,E-mail:1105851655@qq.com

[通信作者] * 吴惠妃,博士,主任中药师,从事中药临床药学研究,E-mail:1806888243@qq.com;

* 李伟荣,博士,研究员,从事中医药防治脑病研究,E-mail:liwr@gzucm.edu.cn

Guangzhou 510405, China; 2. Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to
Guangzhou University of Chinese Medicine, Zhongshan 614001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether the effect of Danggui Shaoyaosan (DSS) on cognitive impairment is related to its promotion of ketone body metabolism in the brain and regulation of glutamate/ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) pathway. **Methods:** Male APP/PS1 mice were randomized into model, low-dose ($3.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) DSS, medium-dose ($6.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) DSS, high-dose ($12.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) DSS, ketogenic diet, and inhibitor (talampanel, $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) groups. C57BL/6J wild-type mice were selected as the normal group. The talampanel group was intragastrically administered for 2 consecutive weeks from the 6th week, and the other groups were continuously treated for 8 weeks before behavioral testing. The ultrastructure of synapses in hippocampal CA1 region was observed by transmission electron microscopy, and calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaMK II) expression was detected by immunohistochemistry (IHC). The levels of β -hydroxybutyrate (BHB) and lactic acid (LAC) were measured by biochemical kits, and those of glutamate (Glu), glutamine (Gln), γ -aminobutyric acid (GABA), and synaptophysin (SYP) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA levels of glutamine synthetase (GS), glutaminase (GLS), glutamate decarboxylase (GAD), CaMK II, and AMPAR subunits GluA1 and GluA2 were quantified by Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR), and the protein levels of GS, GLS, GAD, GluA1, and GluA2 by Western blot. **Results:** Compared with the normal group, the model group exhibited decreased recognition index, spontaneous alternation rate, and residence time in the target quadrant ($P<0.01$), increased escape latency and ratio of the time in the opposite side of the target quadrant to the time in the target quadrant ($P<0.05$, $P<0.01$), damaged synaptic ultrastructure of hippocampal CA1 region, increased positive expression of CaMK II, no significant difference in BHB level, elevated LAC and Glu levels ($P<0.01$), declined SYP, Gln, and GABA levels ($P<0.01$), downregulated mRNA and protein levels of GS, GAD, and GluA2 ($P<0.05$, $P<0.01$), and upregulated mRNA and protein levels of GLS and GluA1 ($P<0.05$, $P<0.01$) and mRNA level of CaMK II ($P<0.01$). Compared with the model group, DSS intervention improved the behavioral indexes of mice ($P<0.05$, $P<0.01$), enhanced the synaptic ultrastructure plasticity in hippocampal CA1 region, decreased the positive expression of CaMK II, raised the BHB level ($P<0.01$), reduced the LAC and Glu levels ($P<0.01$), elevated the SYP, Gln, and GABA levels ($P<0.01$), upregulated the mRNA and protein levels of GS, GAD, and GluA2, and downregulated the mRNA and protein levels of GLS and GluA1 ($P<0.05$, $P<0.01$) and the mRNA level of CaMK II ($P<0.01$). **Conclusion:** DSS can improve the learning and memory and enhance the synaptic plasticity of APP/PS1 mice. Its neuroprotective effect is coupled with the promotion of ketone body formation and remodeling of brain energy metabolism, and is related to the regulation of glutamate/AMPA pathway.

[Keywords] Danggui Shaoyaosan; Alzheimer's disease; ketone body; energy metabolism; glutamate/ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) pathway; cognitive impairment

阿尔茨海默病(AD)是一种以进行性记忆减退和认知功能下降为主要临床特征的神经退行性疾病^[1-2]。AD早期存在代谢功能障碍,大脑糖脂代谢受损会导致能量供应不足,谷氨酸摄取减弱,过量的谷氨酸通过 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噻唑丙酸受体(AMPA)导致钙超载,对突触后神经元产生兴奋性毒性,导致突触损伤和功能障碍,成为AD早期关键病理因素^[3]。

鉴于脑葡萄糖代谢受损,以酮体作为替代能源已成为AD干预的重要研究方向^[4-6]。酮体能够绕过胰岛素依赖的葡萄糖转运途径,直接为神经元供能,从而缓解能量危机并改善下游信号传导^[7]。然而,生酮饮食的干预方式仍存在依从性差与长期安全性不足等局限^[8-9]。因此,探索能够稳定调节脑内酮体水平的药物干预手段显得尤为重要。

当归芍药散(DSS)为仲景经方,功擅活血调肝、健脾利水,其病机认识与AD早期代谢障碍相契

合^[10-11]。该方的现代临床应用始于20世纪日本学者的探索,后续多项临床研究及系统评价进一步证实了其改善认知功能的疗效^[12-14]。本课题组前期工作发现,DSS能够降低模型小鼠血脂水平并诱导生理性酮症,具备调节能量代谢的潜力。

基于上述分析,本研究拟观察DSS对APP/PS1小鼠学习记忆能力、突触可塑性、脑能量代谢及谷氨酸/AMPA信号通路的影响,探讨DSS改善认知功能与能量代谢重编程及谷氨酸-AMPA通路紊乱的相关性及潜在作用机制。

1 材料

1.1 动物 45只3月龄雄性小鼠(含APP/PS1模型鼠及C57BL/6J对照鼠),初始体质量为(25 ± 2)g,均由江苏凌菲生物科技有限公司提供,合格证号SCXK(浙)2019-004。所有小鼠在广州中医药大学SPF级实验室内,于恒温(24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、湿度50%~60%及12 h/12 h光暗循环的标准条件下分笼饲养,自由

摄食饮水。

1.2 伦理 本实验经广州中医药大学实验动物伦理委员会审查(伦理批号20240319005)。

1.3 药物与试剂 当归、芍药、白术、茯苓、泽泻、川芎饮片(康美大药房连锁有限公司,批号分别为231201011、231200409、230500511、231205341、230960321、231200381,经广州中医药大学中药学院夏荃教授鉴定为正品);他仑帕奈(广州市左克生物科技发展有限公司,批号HY-15079);生酮饲料(河北尼咖生物科技有限公司,批号XTKD01); β -羟基丁酸(BHB)测定试剂盒、L-乳酸(LAC)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为E030-2-1、A019-2-2);谷氨酸(Glu)、谷氨酰胺(Gln)、 γ -氨基丁酸(GABA)、突触素(SYP)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为YJ616547、YJ063302、YJ001894、YJ001894);Evo M-MLV反转录试剂预混液、SYBR Green Pro Taq HS预混型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司,批号分别为AG11706、AG11701);谷氨酰胺合成酶(GS)抗体、谷氨酸脱羧酶(GAD)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为11037-2-AP、10408-1-AP);谷氨酰胺酶(GLS)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)-山羊抗兔二抗(北京博奥龙免疫技术有限公司,批号分别为BD-PB5062、BF03008X);钙/钙调蛋白依赖激酶II(CaMK II)(美国Immunoway公司,批号YM8422);GluA1抗体、GluA2抗体(湖南艾方生物科技有限公司,批号分别为AFRM9615、AFRM81488)。

1.4 仪器 R550IE型小动物麻醉机、XR-XX117型新物体识别系统、XR-XY1032型Y迷宫系统、XR-XM101型水迷宫系统(上海欣软信息科技有限公司);HT7800型透射电子显微镜(日本日立公司);Synergy HT多功能酶标仪(美国BioTek公司);NanoDrop2000超微量分光光度计(美国Thermo公司);CFX connect型Real-time PCR仪、PowerPac™ HC型高电流电泳仪、小型Mini Trans-Blot®型转印槽、ChemiDoc XRS+型高灵敏度化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 当归芍药散的制备方法 采用传统水煎法提取当归芍药散(当归9 g、芍药48 g、川芎24 g、泽泻24 g、白术12 g、茯苓12 g)。称取规定量的药材,以8倍量蒸馏水浸润30 min。首次煎煮先以武火加热

至沸,随后转为文火维持微沸状态1 h,趁热过滤获取滤液。药渣中再次加入6倍量蒸馏水,采用相同的加热方式进行二次煎煮,时间为30 min,过滤。最终将2次滤液合并,减压浓缩至1.3 g·mL⁻¹。

2.2 分组与干预 采用随机数字表法将雄性APP/PS1小鼠随机分为模型组、DSS低(3.2 g·kg⁻¹)、中(6.4 g·kg⁻¹)、高(12.8 g·kg⁻¹)剂量组,生酮饮食组^[15](予生酮饲料喂养),他仑帕奈组^[16](5 mg·kg⁻¹·d⁻¹);另设C57BL/6J野生型小鼠为正常组。参照他仑帕奈(AMPA拮抗剂)的常用给药方案^[17],设定2周干预时间,以明确其在行为学测试窗口内的快速效应;而DSS与生酮饮食作为需长期作用的代谢调节策略,则进行为期8周的干预,系统评估其累积性神经保护作用。

2.3 新物体识别 实验前24 h,将各组小鼠置于空识别箱中适应5 min。分别于训练期(两相同树脂蘑菇体)和测试期(一新物体+原蘑菇体)记录小鼠5 min的探索行为。每次实验结束后用75%乙醇清洁箱体。动物的识别记忆能力通过新物体识别指数(RI)=N/(N+F)×100%进行评估。

2.4 Morris水迷宫 在完成环境适应性训练后,开展为期4 d的定位航行训练。在此阶段,小鼠每日从4个象限被放入水池,记录其寻找到隐藏平台的逃避潜伏期(1 min为限),成功定位平台则单次试验终止,而未能在规定时间内找到平台的小鼠则被引导至平台并停留15 s。训练阶段结束后的第5天,通过撤除平台进行空间探索实验,并采集1 min的小鼠运动轨迹。

2.5 Y迷宫 实验采用三臂(A、B、C)对称式Y迷宫。记录小鼠中央区释放后5 min内的自由探索行为,通过统计连续入臂正确次数(n)与总次数(N),并利用公式 $n/(N-2) \times 100\%$ 计算自发交替反应率(%)来评价工作记忆。测试结束后处死小鼠,组织样本依据不同检测需求分别进行4%多聚甲醛(PFA)固定或-80℃冷冻处理。

2.6 透射电镜观察小鼠海马CA1区突触超微结构 脑组织经常规脱水、树脂包埋后,对包埋块行0.8 μ m半薄切片,甲苯胺蓝染色定位海马神经元,再切取90 nm超薄切片裱于铜网。经铀-铅双染色后,于透射电镜下观察超微结构并采集图像。

2.7 免疫组化法(IHC)检测小鼠前额叶皮层CaMK II蛋白表达 将固定后的小鼠脑组织经脱水、透明、石蜡包埋后制备成切片。脱蜡至水的切片经抗原修复后,依次进行内源性过氧化物酶封

闭、CaMKⅡ一抗(1:500)4℃过夜孵育、HRP标记二抗室温孵育、二氨基联苯胺(DAB)显色及苏木素核复染,中性树胶封固后镜检。以出现棕黄色颗粒状沉积物为阳性判定标准,并进行图像分析。

2.8 生化试剂盒检测小鼠脑组织BHB、LAC的含量 取冻存脑组织,按1:9($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)比例加入预冷生理盐水,4℃匀浆、 $1\,500\,\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min后收集上清。按照BHB及LAC试剂盒说明书进行操作,取适量上清液与基质液混合于37℃孵育5 min,测定505 nm处吸光度(A_1);加入酶工作液继续反应5 min后再次测定(A_2)。根据吸光度差值($\Delta A=A_2-A_1$)计算BHB/LAC含量。

2.9 ELISA检测脑组织SYP、Glu、Gln、GABA的含量 取冻存脑组织,按1:9($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)比例加入预冷生理盐水,4℃匀浆、 $3\,000\,\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min后收集上清。参照ELISA试剂盒说明书进行,设置空白孔、标准品孔和样本孔,依次加入相应样本与试剂,经HRP标记抗体孵育、洗涤、底物显色及终止反应后,在450 nm波长下测定吸光度。

2.10 Real-time PCR检测小鼠脑组织相关基因表达水平 海马组织总RNA的提取使用TRIzol法,所得RNA经质量检测合格后,按Evo M-MLV试剂盒操作指南进行cDNA的反转录,反应条件为37℃、15 min,85℃、5 s及4℃、 ∞ 。采用SYBR Green预混试剂进行Real-time PCR分析,运行程序包括95℃预变性30 s,及40个循环的95℃变性5 s与58℃退火30 s。目的基因的相对表达水平以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参基因,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算,实验所需全部引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。见表1。

2.11 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织GS、GLS、GAD、GluA1、GluA2蛋白表达 海马组织经含苯甲基磺酰氟(PMSF)的放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液4℃匀浆、 $12\,000\,\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min后,取上清测定蛋白浓度。样品统一校正至 $5\,\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,与5 $\times$ 上样缓冲液混合并煮沸变性。25 μg 蛋白样品经电泳(150 V,50 min)、转膜(400 mA,45 min)及封闭(5%脱脂奶粉,室温2 h)处理后,依次与一抗GS(1:2 000)、GLS(1:3 000)、GAD(1:4 000)、GluA1(1:2 000)、GluA2(1:2 000)、 α -tubulin(1:8 000)及HRP标记的山羊抗兔二抗分别进行孵育。Image Lab测定条带灰度值进行统计学分析。

2.12 统计学分析 采用SPSS 26.0进行统计分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,符合正态分布且方差齐者,

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GS	上游 CAGAGACCAACTTGAGGCACATC	89
	下游 AGTATATTCCTGCTCCATTCCAAACC	
GLS	上游 AGTCCTGTGTAAACCCCTGAAATATG	102
	下游 TGAATCTTAATCCACTTGCGCTCCTTC	
GAD	上游 CTGGTTAGAGAGGAGGGACTGATG	93
	下游 GTCATAGGACAGGTCATAGTGCTTATC	
GluA1	上游 ACAACTCAAGCGTCCAGAATAGAAC	111
	下游 CCTCATAGCGGTCATTGCCTTC	
GluA2	上游 TCAGATTGTAGACTACGACGACTCC	90
	下游 GTGTGTGCTCCAGGGTATTCTTTC	
CaMKⅡ	上游 GCCTTGCCTGGTGTGCTAAC	113
	下游 TGGTGGTGTGCTGCTCTCAG	
β -actin	上游 GGCTGTATCCCCTCCATCG	154
	下游 CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	

采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD);方差不齐时,采用Dunnett's T3检验进行多重比较,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 DSS对APP/PS1小鼠学习与记忆功能的影响

行为学结果显示,与正常组比较,模型组小鼠的新物体识别指数与Y迷宫自发交替率均显著降低($P<0.01$),定位航行试验的逃避潜伏期显著延长($P<0.01$),目标象限停留时间显著缩短($P<0.01$),目标象限对侧与目标象限的停留时间比明显升高($P<0.05$)。与模型组比较,DSS各剂量组小鼠自发交替率与目标象限停留时间均明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),DSS低、高剂量组逃避潜伏期显著缩短($P<0.01$),新物体识别指数明显提高($P<0.05$),同时,DSS高剂量组在目标象限对侧与目标象限的停留时间比明显降低($P<0.05$),而DSS中剂量组在上述指标中虽有改善趋势,但差异无统计学意义。见表2。

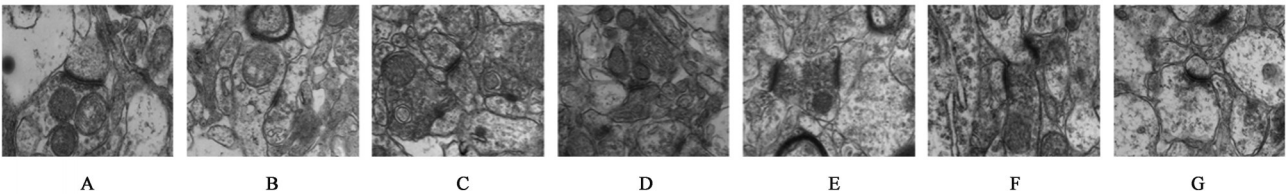
3.2 DSS对APP/PS1小鼠海马CA1区突触超微结构可塑性的影响

与正常组比较,模型组神经元损伤显著,表现为细胞整体固缩,核膜皱缩明显,核位置基本居中,线粒体及高尔基体等细胞器出现轻度至中度肿胀,突触后致密区厚度显著变薄,突触结构完整性受损。与模型组比较,DSS干预后,神经元结构完整性得以显著改善,细胞固缩程度减轻,核膜结构趋于平滑,突触数量增多且超微结构可塑性增强,突触前成分中小泡结构清晰,突触后致密物质厚度增加,细胞器形态基本恢复正常。见图1。

表 2 DSS 对 APP/PS1 小鼠行为学指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 2 Effect of DSS on behavioral indices of APP/PS1 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	新物体识别指数/%	自发交替反应率/%	逃避潜伏期/s	水迷宫停留在目标象限的时间/s	水迷宫目标象限对侧与目标象限时间比/%
正常组		76.26±13.43	76.21±5.74	8.85±2.97	21.64±3.66	62.49±11.80
模型组		52.12±19.16 ²⁾	57.01±9.93 ²⁾	53.36±7.82 ²⁾	8.66±5.02 ²⁾	138.66±38.98 ¹⁾
DSS 低剂量组	3.2	71.18±7.84 ³⁾	69.18±8.89 ³⁾	23.34±9.21 ⁴⁾	18.13±5.43 ⁴⁾	75.07±20.21
DSS 中剂量组	6.4	58.16±10.68	70.32±8.04 ³⁾	39.61±17.66	19.90±6.88 ⁴⁾	68.46±22.66
DSS 高剂量组	12.8	77.81±10.98 ³⁾	71.12±5.70 ³⁾	29.53±18.44 ⁴⁾	21.91±5.80 ⁴⁾	48.93±16.00 ³⁾
生酮饮食组		73.18±10.98 ³⁾	70.64±10.94 ³⁾	28.50±18.86 ⁴⁾	21.86±5.48 ³⁾	75.34±8.97
他仑帕奈组	5×10 ⁻³	70.53±13.30 ³⁾	68.35±11.66 ³⁾	39.82±9.78	17.49±9.32 ³⁾	77.54±43.99

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表 3-表 6 同)



注:A.正常组;B.模型组;C.DSS 低剂量组;D.DSS 中剂量组;E.DSS 高剂量组;F.生酮饮食组;G.他仑帕奈组(图 2 和图 3 同)

图 1 DSS 对 APP/PS1 小鼠海马 CA1 区突触超微结构可塑性的影响 (透射电镜,×30 000)
Fig. 1 Effect of DSS on synaptic ultrastructure plasticity in hippocampal CA1 region of APP/PS1 mice (TEM,×30 000)

3.3 DSS 对 APP/PS1 小鼠前额叶皮层 CaMK II 蛋白表达的影响 免疫组化结果显示,与正常组比较,模型小鼠前额叶皮层 CaMK II 蛋白表达增加。与模型组比较,经 DSS 干预后,CaMK II 蛋白表达降低。见图 2。

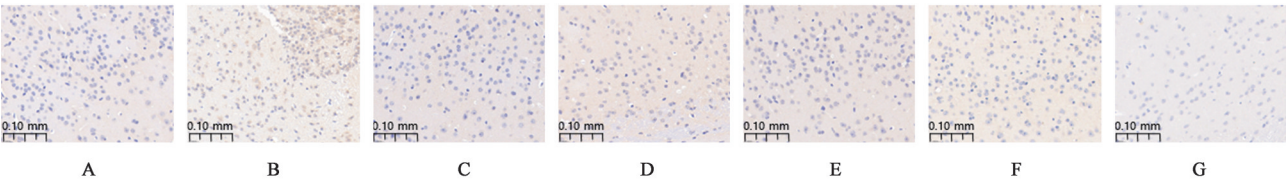


图 2 DSS 对 APP/PS1 小鼠前额叶皮层 CaMK II 蛋白表达的影响 (免疫组化,×200)
Fig. 2 Effect of DSS on expression of CaMKII protein in prefrontal cortex of APP/PS1 mice (IHC,×200)

3.4 DSS 对 APP/PS1 小鼠脑组织 BHB、LAC 含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠脑组织中 BHB 含量差异无统计学意义,而 LAC 含量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,DSS 各剂量组 BHB 含量均显著升高($P<0.01$),LAC 含量则显著降低($P<0.01$)。见表 3。

3.5 DSS 对 APP/PS1 小鼠脑组织 Glu、Gln、GABA 及 SYP 含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠脑组织中 SYP、Gln 及 GABA 含量均显著降低($P<0.01$),Glu 含量显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,DSS 各剂量组 SYP、Gln 及 GABA 含量均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),Glu 含量则显著降低($P<0.01$)。见表 4。

3.6 DSS 对 APP/PS1 小鼠脑组织 GS、GLS、GAD、GluA1、GluA2、CaMK II mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠脑组织中 GS、GAD、GluA2

表 3 DSS 对 APP/PS1 小鼠脑组织 BHB、LAC 含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 3 Effect of DSS on contents of BHB and LAC in brain tissue of APP/PS1 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BHB	LAC
正常组		0.48±0.05	0.20±0.04
模型组		0.46±0.05	0.35±0.02 ²⁾
DSS 低剂量组	3.2	0.73±0.04 ⁴⁾	0.26±0.03 ⁴⁾
DSS 中剂量组	6.4	0.92±0.09 ⁴⁾	0.20±0.03 ⁴⁾
DSS 高剂量组	12.8	0.87±0.09 ⁴⁾	0.23±0.04 ⁴⁾
生酮饮食组		1.06±0.17 ⁴⁾	0.20±0.07 ³⁾
他仑帕奈组	5×10 ⁻³	0.91±0.13 ⁴⁾	0.17±0.02 ⁴⁾

mRNA 表达均显著降低($P<0.01$),而 GLS、GluA1、CaMK II mRNA 表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,DSS 各剂量组 GS、GAD 及 GluA2

表4 DSS对APP/PS1小鼠脑组织Glu、Gln、GABA及SYP含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of DSS on contents of Glu, Gln, GABA and SYP in brain tissue of APP/PS1 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Glu	Gln	GABA	SYP
正常组		129.21±11.16	91.59±7.83	130.46±6.87	67.45±3.46
模型组		169.83±25.03 ²⁾	70.28±4.62 ²⁾	97.93±5.21 ²⁾	52.31±5.78 ²⁾
DSS低剂量组	3.2	121.82±13.50 ⁴⁾	83.84±8.94 ⁴⁾	118.51±5.88 ⁴⁾	61.48±3.80 ⁴⁾
DSS中剂量组	6.4	97.35±15.25 ⁴⁾	86.95±9.71 ⁴⁾	120.66±6.40 ⁴⁾	62.72±5.20 ⁴⁾
DSS高剂量组	12.8	112.81±14.66 ⁴⁾	82.55±11.59 ³⁾	114.52±5.92 ⁴⁾	63.80±6.18 ⁴⁾
生酮饮食组		121.49±12.18 ⁴⁾	85.11±4.80 ⁴⁾	114.83±3.42 ⁴⁾	58.17±7.32
他仑帕奈组	5×10 ⁻³	124.52±12.08 ⁴⁾	89.02±9.33 ⁴⁾	126.62±7.91 ⁴⁾	68.42±5.68 ⁴⁾

mRNA表达均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$), GLS、CaMK II及GluA1 mRNA表达则明显降低,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表5。

表5 DSS对APP/PS1小鼠脑组织GS、GLS、GAD、GluA1、GluA2、CaMK II mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of DSS on expression of GS, GLS, GAD, GluA1, GluA2 and CaMK II mRNA in brain tissue of APP/PS1 mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GS	GLS	GAD	GluA1	GluA2	CaMK II
正常组		1.13±0.10	0.89±0.03	1.11±0.09	0.87±0.12	1.02±0.19	0.78±0.08
模型组		0.65±0.11 ²⁾	1.14±0.10 ²⁾	0.60±0.11 ²⁾	1.12±0.17 ¹⁾	0.62±0.10 ²⁾	1.09±0.13 ²⁾
DSS低剂量组	3.2	1.01±0.14 ³⁾	0.85±0.10 ⁴⁾	1.08±0.19 ³⁾	0.90±0.07 ³⁾	0.91±0.06 ³⁾	0.81±0.10 ⁴⁾
DSS中剂量组	6.4	0.95±0.12 ³⁾	0.84±0.09 ⁴⁾	1.05±0.25 ³⁾	0.81±0.12 ⁴⁾	0.98±0.19 ⁴⁾	0.77±0.05 ⁴⁾
DSS高剂量组	12.8	0.99±0.14 ³⁾	0.81±0.12 ⁴⁾	1.06±0.24 ³⁾	0.85±0.06 ⁴⁾	0.95±0.20 ³⁾	0.80±0.13 ⁴⁾
生酮饮食组		0.83±0.24	0.74±0.08 ⁴⁾	1.00±0.35 ³⁾	0.77±0.09 ⁴⁾	0.98±0.10 ⁴⁾	0.76±0.08 ⁴⁾
他仑帕奈组	5×10 ⁻³	0.93±0.19 ³⁾	0.75±0.10 ⁴⁾	0.99±0.06 ³⁾	0.78±0.07 ⁴⁾	1.01±0.08 ⁴⁾	0.60±0.12 ⁴⁾

3.7 DSS对APP/PS1小鼠海马GS、GLS、GAD、GluA1、GluA2蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马组织中GS、GAD、GluA2蛋白表达均明显降低($P<0.05, P<0.01$), GLS与GluA1蛋白表达明显升高($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,DSS各剂量组GS、GAD及GluA2蛋白表达明显升高($P<0.05, P<0.01$), GLS与GluA1蛋白表达则显著降低($P<0.01$)。见表6、图3。

表6 DSS对APP/PS1小鼠海马GS、GLS、GAD、GluA1、GluA2蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of DSS on expression of GS, GLS, GAD, GluA1 and GluA2 in hippocampus of APP/PS1 mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GS/α-tubulin	GLS/α-tubulin	GAD/α-tubulin	GluA1/α-tubulin	GluA2/α-tubulin
正常组		1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组		0.48±0.14 ²⁾	1.35±0.12 ¹⁾	0.81±0.03 ¹⁾	1.73±0.13 ²⁾	0.31±0.15 ²⁾
DSS低剂量组	3.2	0.77±0.08 ³⁾	0.80±0.17 ⁴⁾	1.12±0.05 ⁴⁾	0.89±0.08 ⁴⁾	0.94±0.29 ⁴⁾
DSS中剂量组	6.4	0.78±0.19 ³⁾	0.87±0.12 ⁴⁾	1.14±0.07 ⁴⁾	1.05±0.26 ⁴⁾	1.41±0.28 ⁴⁾
DSS高剂量组	12.8	0.78±0.14 ³⁾	0.78±0.19 ⁴⁾	1.13±0.11 ⁴⁾	1.22±0.21 ⁴⁾	1.26±0.19 ⁴⁾
生酮饮食组		0.72±0.21	0.90±0.26 ⁴⁾	1.24±0.14 ⁴⁾	1.17±0.18 ⁴⁾	1.16±0.35 ⁴⁾
他仑帕奈组	5×10 ⁻³	0.82±0.22 ³⁾	0.92±0.12 ⁴⁾	1.16±0.12 ⁴⁾	1.16±0.18 ⁴⁾	0.93±0.09 ⁴⁾

4 讨论

AD属中医学“健忘”“痴呆”范畴,其病位在脑,与肝、脾、肾密切相关^[18-20]。基本病机为本虚标实,以肝脾失调为核心:髓海不足、元神失养为本虚之基;肝郁血瘀、脾虚痰浊,相互胶结、上扰清窍为标实之候。肝失疏泄则血行不利而成瘀,瘀阻脑络;脾失健运则水湿不化而生痰,痰浊蒙蔽。瘀痰互结,壅滞窍络,更碍气血精微之输布,致使清阳不升,脑失所养,神机失用,是为本病发生发展之关键环节。东汉张仲景《金匱要略》所载之当归芍药散正中病机。全方以当归、川芎、芍药活血调肝以化瘀通络;茯苓、白术、泽泻健脾渗湿以杜痰之源。诸

• 6 •

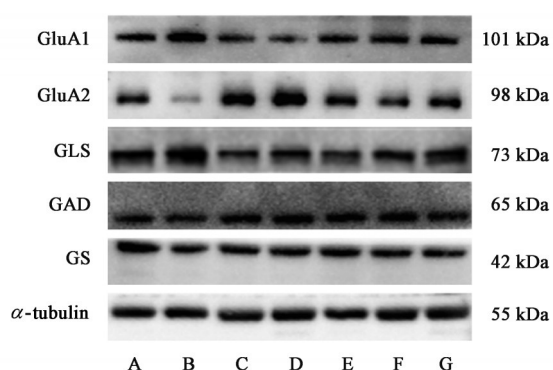


图3 各组小鼠海马GluA1、GluA2、GLS、GAD、GS蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of GluA1, GluA2, GLS, GAD and GS protein expression in hippocampus of mice

药合用,共奏肝脾同调、血水共治之功,使气血畅、湿浊化,则清阳得升,脑窍得养,神机可复。

药理研究表明DSS有调节外周血脂作用,也可调节胆碱能和单胺能系统、减轻线粒体损伤、氧化应激、A β 沉积等^[21-23]。研究发现,DSS可降低高胆固醇血症模型小鼠血脂水平,具有诱导轻度酮症作用并可促进雌激素 α 受体表达改善糖尿病小鼠脑内胰岛素抵抗^[24-26]。方中有效成分藁本内酯、芍药内酯苷可改善线粒体功能、降低氧化应激,改善记忆缺陷^[27-28]。本研究结果显示,APP/PS1小鼠脑内BHB无明显变化而LAC蓄积,表明其氧化磷酸化过程受损,并伴发糖酵解途径的代偿性增强。DSS干预后,BHB显著上升而LAC降低,提示能量代谢模式发生了重编程,即从糖酵解主导转向酮体氧化。这一重编程过程以酮体生成为核心,或可为脑组织提供糖酵解之外的高效替代燃料。

酮体作为能量代谢的底物,也参与兴奋性神经递质谷氨酸的代谢。其小分子特性使其能通过单羧酸转运体(MCT)跨越血脑屏障,在神经元线粒体内经三羧酸循环氧化产生大量三磷酸腺苷(ATP),提高能量代谢;另一方面能量供应增加,促进星形胶质细胞摄取谷氨酸通过GS转化为Gln,Gln随即释放被神经元摄取,通过GLS转化为谷氨酸,再通过谷氨酸脱羧酶生成GABA,减少突触间隙谷氨酸浓度,抑制兴奋性神经毒性^[29-30]。

酮体亦可抑制AMPA受体介导的谷氨酸神经毒性,提高突触可塑性,增强学习记忆能力。大脑在执行学习记忆任务时,神经网络处于突触可塑性过程中,会对突触强度进行新的连接、调整。海马区谷氨酸能神经这种重组是通过严格控制突触后区谷氨酸离子型受体AMPA的数量来实现的。AMPA含有2个二聚体GluA1/GluA2,当谷氨酸刺

激时,AMPA会诱导Ca²⁺内流,维持突触增强、调节突触可塑性^[31]。研究表明,生酮饮食可使齿状回中grial(编码GluA1)及其他突触后蛋白表达减少,并可减少AMPA表达;生酮补充能直接抑制AMPA,阻断GluA1同源体改善神经元存活^[32-33]。AD早期能量代谢障碍,能量供应不足,谷氨酸摄取减弱,过量的谷氨酸或谷氨酸能信号导致钙超载,对突触后神经元产生兴奋性毒性,成为AD发生和发展的一个关键因素。本研究结果显示,DSS诱导的代谢重编程,与谷氨酸-AMPA通路轴上关键环节的改善同步出现,其效应与能量代谢障碍驱动通路失衡的理论模型高度契合。

本研究采用传统汤剂进行干预,参照临床等效剂量折算原则设低、中、高3个剂量组。结果显示,DSS各剂量组均可改善APP/PS1小鼠学习记忆能力与突触可塑性,且以低剂量组效果最佳。DSS“低剂量效果最优”的现象,反映了其非线性的量-效关系与双向调节特性。药效存在一个剂量阈值:低于阈值时,效应随剂量增加而增强;超过阈值后,可能因代谢扰动等次级效应抵消初始获益,导致效果减弱或进入平台期。这也提示中药并非浓度越高越好,其科学应用需遵循合理的剂量范围。

本研究明确了DSS诱导的酮体代谢重编程与其神经保护作用存在耦合,但酮体是否为DSS作用的必需中间环节尚未证实。DSS作为多成分复方,其效应可能涉及多靶点协同,酮体代谢或是其中之一。未来需在DSS干预的同时特异性抑制酮体生成或利用,验证其必要性,为确立因果关系提供关键证据。

综上所述,DSS改善认知障碍的作用,与其提升脑内酮体水平、重塑能量代谢模式及增加能量供应的效应相伴随,并可能与此代谢重塑涉及谷氨酸-AMPA神经通路有关。本研究为理解DSS的神经保护作用提供了关键的代谢与通路视角。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] KCIUK M, KRUCZKOWSKA W, GAŁĘZIEWSKA J, et al. Alzheimer's disease as type 3 diabetes: Understanding the link and implications[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(22): 11955.
- [2] SIGHENCEA M G, POPESCU R, ȘTEFANIA, TRIFU S C. From fundamentals to innovation in Alzheimer's disease: Molecular findings and revolutionary therapies[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(22): 12311.
- [3] SONG J, YANG X, ZHANG M, et al. Glutamate metabolism

- in mitochondria is closely related to Alzheimer's disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 84(2):557-578.
- [4] DILMORE A H, MARTINO C, NETH B J, et al. Effects of a ketogenic and low-fat diet on the human metabolome, microbiome, and foodome in adults at risk for Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2023, 19(11):4805-4816.
- [5] CHINNA-MEYYAPPAN A, GOMES F A, KONING E, et al. Effects of the ketogenic diet on cognition: A systematic review[J]. *Nutr Neurosci*, 2023, 26(12):1258-1278.
- [6] XU Y, JIANG C, WU J, et al. Ketogenic diet ameliorates cognitive impairment and neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(4):580-592.
- [7] CUNNANE S C, TRUSHINA E, MORLAND C, et al. Brain energy rescue: An emerging therapeutic concept for neurodegenerative disorders of ageing[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(9):609-633.
- [8] RUAN Y, CHEN L, SHE D, et al. Ketogenic diet for epilepsy: An overview of systematic review and meta-analysis[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2022, 76(9):1234-1244.
- [9] HERSANT H, GROSSBERG G. The ketogenic diet and Alzheimer's disease[J]. *J Nutr Health Aging*, 2022, 26(6):606-614.
- [10] MAJIDAZAR R, REZAZADEH-GAVGANI E, SADIGH-ETEGHAD S, et al. Pharmacotherapy of Alzheimer's disease: An overview of systematic reviews[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2022, 78(10):1567-1587.
- [11] FU X, LIU Q, SUN X, et al. Research advances in the treatment of Alzheimer's disease with polysaccharides of Danggui-Shaoyao-San[J]. *J Alzheimers Dis*, 2022, 85(1):7-19.
- [12] KIM K H, GO H Y, LEE J A, et al. The effect of Dangguijagyag-san on mild cognitive impairment[J]. *J Altern Complement Med*, 2016, 22(7):509-514.
- [13] KIM Y, CHO S H. Danggui-Shaoyao-San for dementia: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(4):e18507.
- [14] MATSUOKA T, NARUMOTO J, SHIBATA K, et al. (2012). Effect of toki-shakuyaku-san on regional cerebral blood flow in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, doi: 10.1155/2012/245091.
- [15] 黄禹豪, 曾薪宇, 陈飞, 等. 18F-FDG与18F-DPA-714 Micro PET/CT显像评价生酮饮食治疗阿尔茨海默病小鼠大脑代谢及神经炎症[J]. *中国医学影像学杂志*, 2024, 32(5):431-438.
- HUANG Y H, ZENG X Y, CHEN F, et al. Evaluation of brain metabolism and neuroinflammation in mice with Alzheimer's disease treated by ketogenic diet by 18F-FDG and 18F-DPA-714 Micro PET/CT[J]. *Chin J Med Imaging*, 2024, 32(5):431-438.
- [16] PAIZS M, TORTAROLO M, BENDOTTI C, et al. Talampanel reduces the level of motoneuronal calcium in transgenic mutant SOD1 mice only if applied presymptomatically[J]. *Amyotroph Lateral Scler*, 2011, 12(5):340-344.
- [17] PATAI R, PAIZS M, TORTAROLO M, et al. Presymptomatically applied AMPA receptor antagonist prevents calcium increase in vulnerable type of motor axon terminals of mice modeling amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(7):1739-1748.
- [18] 李佳明, 马玉滢, 张博, 等. 基于燕赵医学“温补脾肾”理论探讨阿尔茨海默病病因病机[J]. *河北中医药学报*, 2023, 38(2):61-65.
- LI J M, MA Y Y, ZHANG B, et al. Etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease based on theory of "warming and tonifying spleen and kidney" in Yanzhao medicine[J]. *Hebei J Tradit Chin Med*, 2023, 38(2):6-10.
- [19] 孙晨曦, 韩欣园, 肖依彤, 等. 当归芍药散防治阿尔茨海默病的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(22):6215-6226.
- SUN C X, HAN X Y, XIAO Y T, et al. Research progress on the prevention and treatment of Alzheimer's disease with Danggui Shaoyao San[J]. *China J Chin Mater Med*, 2025, 50(22):6215-6226.
- [20] 王虎平, 米彩云, 周君. 从“肝肾同调”探析黑逍遥散干预AD免疫炎症的研究思路[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(17):180-187.
- WANG H P, MI C Y, ZHOU J. Intervention of Hei Xiaoyaosan in Alzheimer's disease immune inflammation based on liver-kidney homology[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(17):180-187.
- [21] 徐红彩, 许玉珉, 刘诗雨, 等. 中医药调控突触可塑性干预阿尔茨海默病的机制研究[J]. *世界中医药*, 2025, 20(6):1011-1019.
- XU H C, XU Y M, LIU S Y, et al. Mechanism of traditional Chinese medicine in intervening in Alzheimer's disease by regulating synaptic plasticity[J]. *World Chin Med*, 2025, 20(6):1011-1019.
- [22] 侯露瑜, 张圆圆, 石文婧, 等. 基于RhoA/ROCK/NF- κ B信号通路探讨当归芍药散对db/db小鼠肾脏保护机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20260704.
- HOU L Y, ZHANG Y Y, SHI W J, et al. Exploring the renal protective mechanism of Danggui Shaoyaosan in db/db mice based on the RhoA/ROCK/NF- κ B signaling pathway[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20260704.
- [23] 丁海霞, 陈秀如, 罗柏樑, 等. 当归芍药散不同剂型改善东莨菪碱诱导小鼠认知障碍的作用机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2025, 41(11):2-9.
- DING H X, CHEN X R, LUO B J, et al. Mechanisms of different dosage forms of Danggui Shaoyao powder in ameliorating scopolamine-induced cognitive impairment in mice[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2025, 41(11):

- 2-9.
- [24] HUANG J, WANG X, XIE L, et al. Extract of Danggui-Shaoyao-San ameliorates cognition deficits by regulating DHA metabolism in APP/PS1 mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 253: 112673.
- [25] SHI J J, LIU H F, HU T, et al. Danggui-Shaoyao-San improves cognitive impairment through inhibiting O-GlcNAc-modification of estrogen α receptor in female db/db mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 281: 114562.
- [26] 徐一琳, 黎柳, 邹俊驹, 等. 当归芍药散合茵陈蒿汤对2型糖尿病合并代谢功能障碍相关脂肪性肝病脂质代谢的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(15): 38-47.
- XU Y L, LI L, ZOU J J, et al. Danggui Shaoyaosan combined with Yinchenaotang regulates lipid metabolism to ameliorate type 2 diabetes mellitus complicated with metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 31(15): 38-47.
- [27] XU Y J, MEI Y, SHI X Q, et al. Albiflorin ameliorates memory deficits in APP/PS1 transgenic mice via ameliorating mitochondrial dysfunction [J]. *Brain Res*, 2019, 1719: 113-123.
- [28] ZHU W L, ZHENG J Y, CAI W W, et al. Ligustilide improves aging-induced memory deficit by regulating mitochondrial related inflammation in SAMP8 mice [J]. *Aging*, 2020, 12(4): 3175-3189.
- [29] CHUNG J Y, KIM O Y, SONG J. Role of ketone bodies in diabetes-induced dementia: Sirtuins, insulin resistance, synaptic plasticity, mitochondrial dysfunction, and neurotransmitter [J]. *Nutr Rev*, 2022, 80(4): 774-785.
- [30] DYŃKA D, KOWALCZE K, PAZIEWSKA A. The role of ketogenic diet in the treatment of neurological diseases [J]. *Nutrients*, 2022, 14(23): 5003.
- [31] FADÓ R, MOLINS A, ROJAS R, et al. Feeding the brain: Effect of nutrients on cognition, synaptic function, and AMPA receptors [J]. *Nutrients*, 2022, 14(19): 4137.
- [32] HERNANDEZ A R, HERNANDEZ C M, TRUCKENBROD L M, et al. Age and ketogenic diet have dissociable effects on synapse-related gene expression between hippocampal subregions [J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 239.
- [33] AUGUSTIN K, KHABBUSH A, WILLIAMS S, et al. Mechanisms of action for the medium-chain triglyceride ketogenic diet in neurological and metabolic disorders [J]. *Lancet Neurol*, 2018, 17(1): 84-93.
- [责任编辑 周冰冰]