

• XXXX •

六味地黄丸调控GPNMB表达提高自噬防治 阿尔茨海默病的分子机制

刘羽茜¹, 朱仲康¹, 王松楠¹, 刘佳丽¹, 尹焯², 苗嘉芮¹, 何树诺³, 赵丹玉^{1*}

(1. 辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847; 2. 辽宁中医药大学附属第一医院, 沈阳 110847;

3. 辽宁中医药大学教学实验中心, 沈阳 110847)

[摘要] 目的:研究六味地黄丸通过调控糖蛋白非转移性黑色素瘤蛋白B(GPNMB)的表达影响快速老化小鼠(SAMP8)海马自噬功能,探讨补肾填精法治疗阿尔茨海默病(AD)的作用机制。方法:实验一采用24只5月龄SAMP8小鼠,随机均分为模型组及六味地黄丸低、中、高剂量组,同时以6只同月龄抗老化小鼠(SAMR1)为对照组,通过新物体识别实验评估学习记忆能力,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清皮质醇(Cort)、促肾上腺皮质激素(ACTH)及尿17-羟皮质类固醇(17-OHCS)水平,透射电镜观察海马神经元超微结构,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织GPNMB、解整合素样金属蛋白酶10(ADAM10)及自噬相关蛋白表达。实验二将18只SAMP8小鼠随机均分为模型组、载体对照组(Vector)及GPNMB过表达组(GPNMB^{OE}),通过脑立体定位注射慢病毒(GPNMB^{OE}组2 μL/侧),Western blot检测海马上述目标蛋白表达;实验三选取24只SAMP8小鼠随机均分为模型组、六味地黄丸组、六味地黄丸+阴性对照组(NC)、六味地黄丸+GPNMB沉默组(shGPNMB),其中六味地黄丸+NC组和六味地黄丸+shGPNMB组在药物治疗前分别注射阴性对照和GPNMB沉默慢病毒,Western blot检测海马上述目标蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠新物体辨别指数显著降低($P<0.01$);与模型组比较,六味地黄丸中、高剂量组小鼠新物体辨别指数显著提高($P<0.01$);透射电镜观察到正常组海马组织中可见聚集的自噬溶酶体;模型组以线粒体为主,未见典型特征的自噬小体;六味地黄丸低、中剂量组可见少量的自噬溶酶体及双层膜结构的自噬小体;六味地黄丸高剂量组自噬小体及自噬溶酶体的数量多于低、中剂量组;ELISA和Western blot结果表明,与正常组比较,模型组血清Cort、ACTH及尿17-OHCS水平显著升高,海马ADAM10、Beclin1、微管相关蛋白轻链3 II/I(LC3 II/I)表达显著降低,GPNMB、泛素结合蛋白p62表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,六味地黄丸低、中、高剂量组血清Cort、ACTH水平显著降低,仅六味地黄丸高剂量组尿17-OHCS水平显著下降,六味地黄丸低、中、高剂量组海马组织GPNMB、ADAM10、Beclin1、LC3 II/I表达显著升高,p62表达显著降低($P<0.01$),以上指标在三组中呈递进趋势。与模型组比较,GPNMB^{OE}组GPNMB、ADAM10、Beclin1、LC3 II/I表达显著升高,p62表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,六味地黄丸组海马GPNMB、ADAM10、Beclin1、LC3 II/I表达显著上升,p62表达显著下降($P<0.01$);与六味地黄丸组比较,六味地黄丸+shGPNMB组GPNMB、ADAM10、Beclin1、LC3 II/I显著下降,p62表达显著上升($P<0.01$)。结论:六味地黄丸可通过上调GPNMB表达提高海马自噬功能,改善AD。

[关键词] 阿尔茨海默病;六味地黄丸;糖蛋白非转移性黑色素瘤蛋白B(GPNMB);自噬;补肾填精

[中图分类号] R289;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(XXXX)XX-0001-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20252402

[网络出版地址]

[网络出版日期] XXXX-XX-XX



Molecular Mechanism of Liuwei Dihuangwan Regulating GPNMB Expression and Enhancing Autophagy in Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease

[收稿日期] 2025-09-03

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82374166);辽宁省教育厅基本科研项目-面上项目(LJKMZ20221317);辽宁省教育厅基本科研项目(LJ212410162052)

[第一作者] 刘羽茜,博士,讲师,从事中医药防治代谢性疾病分子机制研究,E-mail:751107629@qq.com

[通信作者] * 赵丹玉,博士,教授,从事中医药防治代谢性疾病分子机制研究,E-mail:danyu1978@163.com

LIU Yuxi¹, ZHU Zhongkang¹, WANG Songnan¹, LIU Jiali¹, YIN Ye²,
MIAO Jiarui¹, HE Shunuo³, ZHAO Danyu^{1*}

(1. School of Basic Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 2. First Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 3. Teaching and Experimental Center of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effect of Liuwei Dihuangwan on the autophagy function in the hippocampus of senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) by regulating the expression of glycoprotein non-metastatic melanoma protein B (GPNMB). Furthermore, it is designed to explore the mechanism of the method of tonifying the kidneys and replenishing essence in the treatment of Alzheimer's disease (AD). **Methods:** In experiment 1, 24 5-month-old SAMP8 mice were randomly and equally divided into the model group, and the low-, middle- and high-dose Liuwei Dihuangwan groups. At the same time, six 5-month-old senescence accelerated mouse resistant 1 (SAMR1) mice were used as the control group. The learning and memory ability was evaluated through novel object recognition experiment. Serum cortisol (Cort), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and urine 17-hydroxycorticosteroid (17-OHCS) levels were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The ultrastructure of hippocampal neurons was observed by transmission electron microscope (TEM), and the expression levels of hippocampal GPNMB, a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) and autophagy-related proteins were detected by Western blot. In experiment 2, 18 SAMP8 mice were randomly and equally divided into the model group, vector control group (Vector), and GPNMB overexpression group (GPNMB^{OE}). Lentiviral vectors were stereotactically injected into the brain (2 μ L per side in the GPNMB^{OE} group). Western blot was used to detect the expression of the above target proteins in the hippocampus; In Experiment 3, 24 SAMP8 mice were randomly and equally divided into the model group, Liuwei Dihuangwan group, Liuwei Dihuangwan+negative control (NC) group, and Liuwei Dihuangwan+GPNMB silencing group (shGPNMB). Before drug treatment, the Liuwei Dihuangwan+NC group and the Liuwei Dihuangwan+shGPNMB group were injected with negative control and GPNMB silencing lentivirus, respectively. Western blot was used to detect the expression of the above target proteins in the hippocampus. **Results:** The novel object discrimination index of mice in the model group was significantly lower than that of mice in the control group ($P<0.01$). The novel object discrimination index of mice in the medium- and high-dose Liuwei Dihuangwan groups was significantly higher than that of mice in the model group ($P<0.01$). Aggregated autolysosomes were observed in the normal hippocampus tissue by TEM. In the model group, mitochondria were dominant, and no typical characteristic autophagosomes were observed. In the low- and medium-dose Liuwei Dihuangwan groups, a small number of autolysosomes and autophagosomes with double-membrane structures were observed. In the high-dose Liuwei Dihuangwan group, the number of autophagosomes and autolysosomes was greater than that in the low- and medium-dose groups. The results of ELISA and Western blot showed that compared with the control group, the levels of serum Cort, ACTH, and urine 17-OHCS in the model group were substantially increased, while the expression of hippocampal ADAM10, Beclin1, and microtubule associated-protein light chain 3-II/I (LC3 II/I) was significantly decreased. The expression of GPNMB and ubiquitin binding protein p62 was significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the serum Cort and ACTH levels in the low-, medium-, and high-dose Liuwei Dihuangwan groups were significantly reduced, while only the urine 17-OHCS level in the high-dose group was significantly reduced. The hippocampal GPNMB, ADAM10, Beclin1, and LC3 II/I expression levels in the low-, medium-, and high-dose groups of Liuwei Dihuangwan were significantly increased compared to the model group, whereas the expression of p62 was significantly reduced ($P<0.01$). The above indicators showed a progressive trend among the three groups. Compared with the model group, the GPNMB^{OE} group showed a significant increase in GPNMB, ADAM10, Beclin1, LC3 II/I expression, and a significant decrease in p62 expression ($P<0.01$). Compared with the model group, the expression of GPNMB, ADAM10, Beclin1, and LC3 II/I in the hippocampus of the Liuwei Dihuangwan group significantly increased, while the expression of p62 significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the Liuwei Dihuangwan group, the Liuwei Dihuangwan+shGPNMB group showed a significant decrease in GPNMB, ADAM10, Beclin1, LC3 II/I, and a significant increase in p62 expression ($P<0.01$). **Conclusion:** Liuwei Dihuangwan can enhance hippocampal autophagy function and improve AD by upregulating GPNMB expression.

[Keywords] Alzheimer's disease; Liuwei Dihuangwan; glycoprotein non-metastatic melanoma protein B (GPNMB); autophagy; tonify the kidneys and replenish essence

阿尔茨海默病(AD)是一种神经系统退行性疾病,其典型病理特征是在脑皮质和海马体细胞外出现 β 淀粉样蛋白(A β)的异常沉积。因该病临床表

现以记忆力减退和认知功能衰退为主,故中医辨治AD时将其归属于“痴呆”“健忘”等范畴^[1]。中医认为脑髓是维持正常精神思维活动的物质基础。肾

藏精,精生髓,脑为髓海,肾精不足,髓海空虚,神思障碍,遂生痴呆。因此,肾精亏虚,髓海不足是AD发病的根本病机,治疗以补肾益精为首要原则。

现代中医理论研究认为,肾主气化与自噬功能之间存在微观联系^[2]。肾虚状态可导致自噬功能紊乱,进而影响A β 等病理产物的清除效率,使其在脑组织中异常堆积,加速AD病理进程。这一理论在临床实践中得到了验证,补肾中药在AD治疗中表现出良好疗效^[3-4]。本课题组前期研究亦证实,经典补肾方剂六味地黄丸能够有效增强神经细胞自噬能力,减少A β 沉积^[2,5-7]。

小胶质细胞作为中枢神经系统内固有免疫效应细胞,属于单核吞噬细胞系统。在受到A β 等病理产物刺激时,这些细胞可被激活并分泌炎症因子,同时通过趋化作用和吞噬功能清除脑内异常蛋白沉积,对维持神经微环境稳态具有关键作用。在AD进展过程中,病理产物的持续累积会引发小胶质细胞过度活化,这种异常激活状态反而会削弱其吞噬功能^[8]。小胶质细胞的吞噬功能与其自噬活性密切相关,自噬功能缺陷将直接导致其吞噬能力降低,清除A β 等异常蛋白的能力下降^[9]。近期研究发现,中枢神经系统中非转移性黑色素瘤蛋白B(GPNMB)是主要表达于活化的小胶质细胞亚群的I型跨膜糖蛋白,在神经炎症调控和神经保护中发挥重要作用。现有证据表明,GPNMB不仅可作为神经退行性疾病的新分子标志物,更可能成为潜在的治疗靶点^[10-11]。多项关于组织修复的研究也揭示了GPNMB与自噬功能之间的密切关联^[12-13]。故本研究综合前期基础,旨在深入阐明补肾经典方剂六味地黄丸通过调控GPNMB表达增强自噬活性的分子机制,从而为AD的“从肾论治”提供新的作用靶点和实验依据。

1 材料

1.1 动物 采用健康雄性5月龄SAMP8小鼠48只,健康雄性5月龄SAMR1小鼠6只,体质量25~30 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合格证号SCXK(京)2024-0003。全部动物皆于辽宁中医药大学实验动物研究中心动物室饲养,动物处理和实验程序严格遵守《医学实验动物的护理和使用》(中华人民共和国卫生部,1998年)和《辽宁中医药大学实验动物伦理标准指南》。

1.2 伦理 本研究获得辽宁中医药大学动物伦理委员会批准,批号21000062025006。

1.3 药物与试剂 六味地黄丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司,批号Z11021283);小鼠皮质醇

Cort、促肾上腺皮质激素(ACTH)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉菲恩生物科技有限公司,批号分别为EM1721、EM0466);17- α -羟皮质类固醇(17-OHCS)检测试剂盒(武汉优尔生生物科技有限公司,批号CEA067Ge);GPNMB抗体(美国Affinity公司,批号DF12621);解整合素样金属蛋白酶10(ADAM10)抗体、 β -微管相关蛋白轻链3 II/I(LC3 II/I)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、全蛋白提取试剂盒、聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、蛋白免疫印迹法(Western blot)一抗二抗稀释液、十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)凝胶快速制备试剂盒(万类生物科技有限公司,批号分别为WL04661、WL02508、WL02385、WL01506、WLA023、WL01372、WLA019、WLA004、WLA068、WLA013);过表达慢病毒载体LV-Mus-GPNMB-OE委托通用生物(安徽)股份有限公司合成至载体pLVX-IRES-puro(丰晖生物科技有限公司,货号BR025)上;干扰慢病毒载体LV-Mus-GPNMB-shRNA、LV-NC委托通用生物(安徽)股份有限公司合成至载体pLVX-shRNA1(丰晖生物科技有限公司,货号BR004)上;包装载体pSPAX2、包膜载体pMD2.G(丰晖生物科技有限公司,货号分别为BR036、BR037)。

1.4 仪器 ELX-800型酶标仪(美国BioTek公司);DH36001B型电热恒温培养箱(天津泰斯特仪器有限公司);WD-9413B型凝胶成像系统、DYY-7C型电泳仪、DYCZ-40D型转移槽、WD-9405B型水平摇床(北京六一仪器厂);H-2050R型超速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);DP73型显微镜拍照系统、BX53型显微镜(日本Olympus公司);ZS-FD型小鼠脑立体定位仪(北京众实迪创科技有限公司);H-7650型透射电镜(日本Hitachi公司)。

2 方法

2.1 六味地黄丸对SAMP8小鼠学习记忆能力、海马GPNMB、ADAM10及自噬功能的影响

2.1.1 动物分组及模型制备 取6只5月龄雄性SAMR1小鼠作为正常组,24只5月龄雄性SAMP8小鼠随机均分成4组:模型组,六味地黄丸低、中、高剂量组,每组6只。将以上30只小鼠适应性喂养1周后进行模型制备。六味地黄丸低、中、高剂量组分别给予0.59、1.18、2.36 g·kg⁻¹六味地黄丸浓缩液,正常组和模型组给予等体积生理盐水,每日灌胃

2次,连续灌胃给药4周后对小鼠进行各项指标检测。

2.1.2 新物体识别实验检测 各组小鼠学习记忆能力 适应阶段:实验第1天,将小鼠均依次放入旷场箱中适应10 min。熟悉阶段:实验第2天,需将2个相同的物体分别放在旷场箱两侧,将小鼠背朝物体放入旷场箱,让小鼠在安静环境下自由探索10 min。测试阶段:实验第3天,小鼠学习后24 h,将2个物体其中一个更换为新物体,同时将箱体内环境和物体进行清理去除气味,再将小鼠放入旷场箱中自由探索5 min。统计小鼠对熟悉物体A和新物体B的探索时间,计算并分析新物体辨别指数。新物体辨别指数=(新物体B探索时间/熟悉物体A探索时间+新物体B探索时间)×100%。

2.1.3 ELISA检测 各组小鼠血清Cort、ACTH及尿17-OHCS水平 小鼠给药后立即放入代谢笼内,收集24 h尿液,3 000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径6 cm,下同),取上清检测17-OHCS的含量。小鼠眼眶取血,血样放置于4℃过夜,3 500 r·min⁻¹离心10 min,取上清检测Cort、ACTH含量。检测过程严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作。

2.1.4 透射电镜观察 海马组织中自噬小体 将小鼠断头取脑,于冰上取海马组织并修成1 mm³的小块,置于4%的多聚甲醛内固定2 h以上,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗。1%锇酸固定2 h,PBS冲洗。梯度乙醇、丙酮脱水,包埋剂包埋,恒温箱内聚合。1 μm半薄切片,甲苯胺蓝染色定位,50~70 nm超薄切片,柠檬酸铅-醋酸双氧铀双染,透射电子显微镜下观察并摄片。

2.1.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 海马组织中GPNMB、ADAM10及自噬相关蛋白表达 取各组小鼠海马组织25~30 mg,加入RIPA裂解液(每100 mg组织加入裂解液1 mL),匀浆后4℃,16 000 r·min⁻¹离心2 min,吸取上清液备用。应用BCA试剂盒测定样品蛋白浓度,十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳分离;电泳结束后将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,加入含吐温20的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(TBST)(含5%脱脂奶粉)封闭,加入一抗(Beclin1、p62、LC3 II/I、ADAM10抗体稀释比例为1:500,GPNMB抗体稀释比例为1:1 000),4℃孵育过夜。TBST洗膜3次,加入二抗(羊抗兔IgG-HRP,稀释比例1:5 000),室温孵育。以β-actin作为内参,增强化学发光法(ECL)发光后进行图像采集及数据分析。

2.2 GPNMB对SAMP8小鼠海马ADAM10及自噬相关蛋白表达的影响

2.2.1 动物分组及模型制备 取18只5月龄雄性SAMP8小鼠采用随机数字表法分为3组:模型组、载体对照组(Vector)、GPNMB过表达组(GPNMB^{OE}),每组6只。模型组造模方法同2.1.1项,对GPNMB^{OE}组和Vector组SAMP8小鼠双侧海马分以0.5 μL·min⁻¹的速度分别注射2 μL(2.15×10⁷ TU·mL⁻¹)GPNMB过表达慢病毒和空白对照慢病毒(中线向左向右:3.2 mm,前囟后2.7 mm,深2.7 mm),4 min之内完成注射。末次给药结束后取材对小鼠各项指标进行检测。

2.2.2 Western blot检测 海马组织中GPNMB、ADAM10及自噬相关蛋白表达 检测各组小鼠海马GPNMB、ADAM10、Beclin1、p62、LC3 II/I表达水平,实验步骤及结果分析方法同2.1.5项。

2.3 六味地黄丸调控GPNMB对SAMP8小鼠海马ADAM10及自噬相关蛋白表达的影响

2.3.1 动物分组及模型制备 根据上述实验结果,选择效果最好的六味地黄丸剂量进行下述实验。取24只5月龄雄性SAMP8小鼠采用随机数字表法分为4组:模型组、六味地黄丸组、六味地黄丸+阴性对照组(NC)、六味地黄丸+GPNMB沉默组(shGPNMB),每组6只。模型组和六味地黄丸组造模方法同2.1.1项,六味地黄丸+NC组和六味地黄丸+shGPNMB组在药物治疗前分别给予小鼠双侧海马注射阴性对照和GPNMB沉默慢病毒,注射方式同2.2.1项,末次给药结束后取材对小鼠各项指标进行检测。

2.3.2 Western blot检测 海马组织中GPNMB、ADAM10及自噬相关蛋白表达 检测各组小鼠海马GPNMB、ADAM10、Beclin1、p62、LC3 II/I表达水平,实验步骤及结果分析方法同2.1.5项。

2.4 统计学分析 实验所有结果均采用GraphPad Prism 8.0进行分析,实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本参数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 六味地黄丸对SAMP8小鼠学习记忆能力、海马GPNMB、ADAM10及自噬功能的影响

3.1.1 各组小鼠一般状态 正常组小鼠体毛光滑,肌肉丰满,食欲较为旺盛,天然孔无异常分泌物,精神状态正常;模型组小鼠体毛较为粗糙,精神状态和自主活动能力较差,给予六味地黄丸浓缩液1周后,以上症状出现明显好转,其中六味地黄丸高剂量组最为明显。

3.1.2 六味地黄丸对SAMP8小鼠学习记忆能力的影响 与正常组比较,模型组小鼠探索新物体的时

间较短,其辨别指数显著降低($P<0.01$);与模型组比较,六味地黄丸中、高剂量组小鼠探索新物体的时间明显延长,其辨别指数明显提高,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表1。

表1 六味地黄丸对SAMP8小鼠新物体辨别指数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of Liuwei Dihuangwan on novel object recognition index in SAMP8 mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	新物体辨别指数/%
正常组		77.3±4.4
模型组		28.7±12.9 ²⁾
六味地黄丸低剂量组	0.59	34.2±4.4
六味地黄丸中剂量组	1.18	54.7±4.5 ³⁾
六味地黄丸高剂量组	2.36	67.2±3.2 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.01$;与六味地黄丸组比较⁴⁾ $P<0.01$ (表2-表5同)

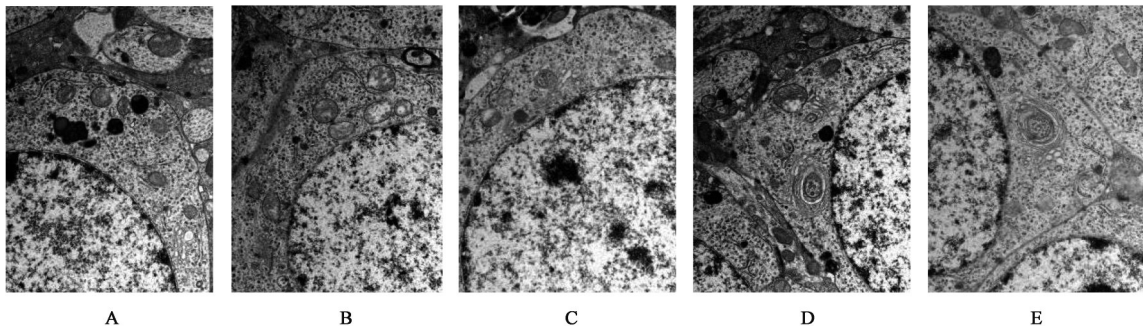
表2 六味地黄丸对SAMP8小鼠肾虚指标影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of Liuwei Dihuangwan on kidney deficiency indicators in SAMP8 mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Cort/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ACTH/ $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$	17-OHCS/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
正常组		18.31±0.30	85.53±1.36	15.64±0.05
模型组		55.00±0.45 ²⁾	213.96±2.33 ²⁾	16.28±0.14 ²⁾
六味地黄丸低剂量组	0.59	50.07±0.35 ³⁾	195.72±2.68 ³⁾	16.14±0.08
六味地黄丸中剂量组	1.18	41.81±0.39 ³⁾	145.10±2.93 ³⁾	16.04±0.10
六味地黄丸高剂量组	2.36	36.41±0.43 ³⁾	111.18±2.08 ³⁾	15.67±0.08 ³⁾

3.1.3 六味地黄丸对SAMP8小鼠血清Cort、ACTH及尿17-OHCS水平的影响 与正常组比较,模型组血清Cort、ACTH及尿17-OHCS水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,六味地黄丸低、中、高剂量组血清Cort、ACTH水平显著降低($P<0.01$),三组尿17-OHCS水平呈递减趋势,而仅六味地黄丸高剂量组较模型组显著降低($P<0.01$)。见表2。

3.1.4 六味地黄丸对SAMP8小鼠海马组织自噬小体的影响 通过透射电镜观察SAMP8小鼠海马组织发现,正常组海马组织中可见聚集的自噬溶酶体;模型组以线粒体为主,未见典型特征的自噬小体。六味地黄丸低、中剂量组可见少量的自噬溶酶体及双层膜结构的自噬小体;六味地黄丸高剂量组自噬小体及自噬溶酶体的数量多于低、中剂量组。见图1。



注:A. 正常组;B. 模型组;C. 六味地黄丸低剂量组;D. 六味地黄丸中剂量组;E. 六味地黄丸高剂量组(图2同)

图1 六味地黄丸对SAMP8小鼠海马组织中自噬小体变化的影响(透射电镜,×20 000)

Fig. 1 Effect of Liangwei Dihuangwan on changes of autophagosome in hippocampal tissue of SAMP8 mice (TEM, ×20 000)

3.1.5 六味地黄丸对SAMP8小鼠海马组织GPNMB、ADAM10及自噬相关蛋白表达的影响

Western blot结果显示,与正常组比较,模型组海马GPNMB、p62表达明显上升($P<0.05$, $P<0.01$),ADAM10、Beclin1、LC3 II/I表达显著下降($P<0.01$);与模型组比较,六味地黄丸中、高剂量干预后GPNMB、ADAM10、Beclin1、LC3 II/I表达显著上升,p62表达显著下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。见图2、表3。

3.2 GPNMB对SAMP8小鼠海马ADAM10及自噬相关蛋白表达的影响 与模型组比较,Vector组海马GPNMB、ADAM10、Beclin1、p62、LC3 II/I表达差异无统计学意义,而GPNMB^{OE}组p62表达较模型组显著降低,其余指标表达均显著升高($P<0.01$)。见图3、表4。

3.3 六味地黄丸调控GPNMB对SAMP8小鼠海马ADAM10及自噬相关蛋白表达的影响 根据3.1项实验结果,选择高剂量六味地黄丸探究其调控

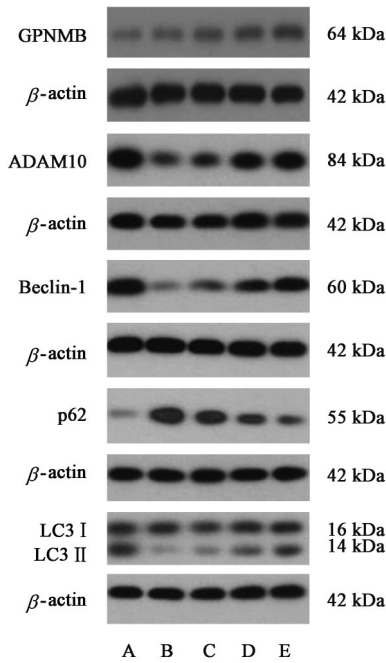


图2 各组小鼠海马组织中GPNMB、ADAM10及自噬相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoretic analysis of expression of GPNMB, ADAM10 and autophagy-related proteins in hippocampal tissues of each group of mice

GPNMB对SAMP8小鼠自噬能力的影响。结果显示,与模型组比较,六味地黄丸组海马GPNMB、ADAM10、Beclin1及LC3 II/I表达显著上升,p62

表3 六味地黄丸对SAMP8小鼠海马组织中GPNMB、ADAM10及自噬相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Liuwei Dihuangwan on expression of GPNMB, ADAM10, and autophagy-related proteins in hippocampus of SAMP8 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	GPNMB/ β -actin	ADAM10/ β -actin	Beclin1/ β -actin	p62/ β -actin	LC3 II / I
正常组		0.26±0.03	1.40±0.08	0.84±0.11	0.12±0.03	1.01±0.15
模型组		0.33±0.13 ¹⁾	0.39±0.02 ²⁾	0.11±0.03 ²⁾	0.81±0.11 ²⁾	0.19±0.04 ²⁾
六味地黄丸低剂量组	0.59	0.39±0.08	0.58±0.09 ³⁾	0.24±0.02 ³⁾	0.55±0.08 ³⁾	0.31±0.10 ³⁾
六味地黄丸中剂量组	1.18	0.44±0.09 ³⁾	0.90±0.04 ³⁾	0.43±0.05 ³⁾	0.32±0.06 ³⁾	0.46±0.12 ³⁾
六味地黄丸高剂量组	2.36	0.53±0.10 ³⁾	1.11±0.06 ³⁾	0.62±0.07 ³⁾	0.21±0.04 ³⁾	0.71±0.16 ³⁾

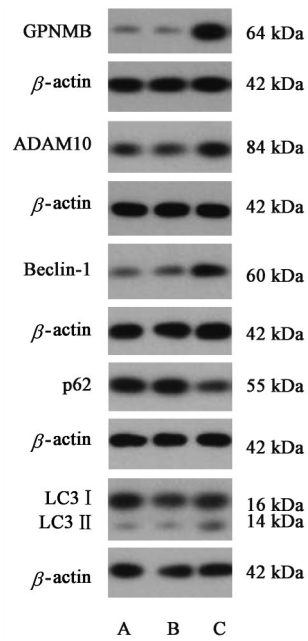
表4 GPNMB对SAMP8小鼠海马组织中ADAM10及自噬相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of GPNMB on expression of ADAM10 and autophagy-related proteins in hippocampus of SAMP8 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	GPNMB/ β -actin	ADAM10/ β -actin	Beclin1/ β -actin	p62/ β -actin	LC3 II / I
模型组	0.16±0.04	0.32±0.02	0.15±0.03	0.86±0.13	0.09±0.03
Vector组	0.14±0.02	0.33±0.05	0.16±0.05	0.85±0.09	0.10±0.02
GPNMB ^{OE} 组	0.93±0.18 ³⁾	0.69±0.08 ³⁾	0.54±0.07 ³⁾	0.42±0.07 ³⁾	0.21±0.06 ³⁾

4 讨论

根据2022年全国人口普查数据,我国社会已迈入深度老龄化时期。而与深度老龄化相关的AD发病率与致死率呈现持续上升趋势,这一疾病已发展为影响我国城乡民众健康的重大疾病和社会问



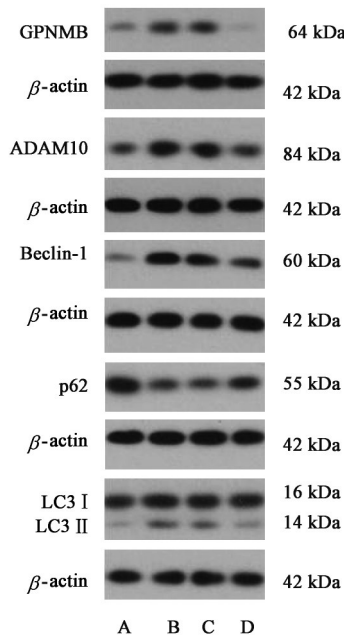
注:A.模型组;B.Vector组;C.GPNMB^{OE}组

图3 各组小鼠海马组织中ADAM10及自噬相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of expression of ADAM10 and autophagy-related proteins in hippocampal tissues of each group of mice

表达显著下降($P<0.01$);与六味地黄丸组比较,六味地黄丸+NC组上述指标表达差异无统计学意义,而六味地黄丸+shGPNMB组GPNMB、ADAM10、Beclin1及LC3 II/I表达显著降低,p62表达显著升高($P<0.01$)。见图4、表5。

题^[14]。AD的主要病理特征为脑内老年斑形成,其本质是A β 在神经元外异常聚集形成的不可溶性沉积物^[15]。这种蛋白具有神经毒性作用,当其过量累积时,会引发突触损伤、神经元营养供应失调及过早凋亡等一系列反应,从而加速AD病程的进展^[16]。



注:A.模型组;B.六味地黄丸组;C.六味地黄丸+NC组;D.六味地黄丸+shGPNMB组

图 4 各组小鼠海马组织中 ADAM10 及自噬相关蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of expression of ADAM10 and autophagy-related proteins in hippocampal tissues of each group of mice

《医学集成》记载:“健忘者,陡然而忘其事也,年老由精枯髓涸”,《医林改错》中:“小儿无记性者,髓海未满;高年无记性者,髓海渐空”,中医古籍中指出痴呆核心病机主要是因年老肾精亏虚,导致髓海空虚,脑失濡养,神机失用,出现记忆力减退、思维迟钝等症状,因此,中医治疗 AD 以滋补肾精为根本。源自宋代《小儿药证直诀》的经典方剂六味地黄丸,能够通过熟地黄、山茱萸与山药 3 味主药的协同作用,实现补肾填精、充髓健脑的治疗目的。现代临床研究数据表明,该方剂能有效改善 AD 患者的学习记忆能力与认知功能,延缓 AD 疾病进展^[4]。本研究中应用新物体识别实验测试模型动物短期记忆能力,该方法是广泛应用于评估啮齿类动物学习记忆能力的行为学实验方法,其主要依赖于海马的功能^[17]。通过实验发现,六味地黄丸能够显著提高 SAMP8 小鼠的新物体辨别指数,表明该方剂在改善模型小鼠的学习记忆能力方面具有显著效

表 5 六味地黄丸调控 GPNMB 对小鼠海马组织中 ADAM10 及自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Liuwei Dihuangwan on expression of ADAM10 and autophagy-related proteins in hippocampus of mice through regulating GPNMB ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	GPNMB/ β -actin	ADAM10/ β -actin	Beclin1/ β -actin	p62/ β -actin	LC3 II / I
模型组	0.11±0.03	0.32±0.04	0.13±0.03	0.84±0.14	0.11±0.02
六味地黄丸组	0.35±0.06 ³⁾	0.62±0.07 ³⁾	0.65±0.15 ³⁾	0.32±0.09 ³⁾	0.22±0.04 ³⁾
六味地黄丸+NC 组	0.33±0.08	0.65±0.12	0.63±0.07	0.30±0.07	0.24±0.05
六味地黄丸+shGPNMB 组	0.06±0.02 ⁴⁾	0.32±0.04 ⁴⁾	0.31±0.09 ⁴⁾	0.51±0.06 ⁴⁾	0.12±0.03 ⁴⁾

果,这一结果与课题组前期研究一致^[7,18]。然而其具体作用机制仍有待深入探究。阐明六味地黄丸治疗 AD 的分子机理,不仅有助于完善“肾脑相济”的中医理论体系,更能为“从肾论治”AD 提供现代科学依据。

现代证候研究将衰老定义为生理性肾虚,故研究中采用快速老化小鼠模型 SAMP8 进行实验。本研究旨在揭示六味地黄丸在 AD 早期阶段发挥神经保护作用的分子机制,而 SAMP8 小鼠自 6 月龄开始即出现典型的 AD 病理特征^[19],故选择此月龄动物模型进行实验,这一设计恰恰抓住了疾病干预的关键窗口期。诸多研究表明,肾虚小鼠模型存在神经内分泌系统紊乱,且通过观察下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA 轴)中 ACTH、Cort 等指标的变化可能佐证肾虚证的判断^[20-21]。国内学者基于海马-HPA 轴负反馈调控机制对中医肾脑关系进行理论分析,认为肾虚证证候表现可能与 HPA 轴功能抑制存在关联,而肾阴虚与 HPA 轴功能亢进相关^[22],并有研究检测肾虚证动物模型的血清 ACTH、Cort 及尿 17-OHCS 水平均显著低于正常对照组^[23]。然而,现有研究对肾虚动物模型 HPA 轴指标变化的动态规律尚未形成系统性结论,其分子机制仍需通过大样本实验进一步验证。HPA 轴中 Cort 是糖皮质激素的核心成分,其升高反映 HPA 轴的过度激活。长期高皮质醇水平不仅可引起代谢紊乱;还具有神经毒性,损伤海马神经元,加剧学习记忆障碍^[24];能抑制淋巴细胞功能,加速免疫衰老^[25]。ACTH 通过刺激肾上腺皮质释放 Cort 参与应激反应,其水平升高可能由负反馈调节失效引起,与海马 A β 沉积相关。17-OHCS 作为 Cort 的代谢产物,其排泄量可直接反映肾上腺皮质活性。本研究中,模型组 SAMP8 小鼠血清 Cort、ACTH 及尿 17-OHCS 水平较正常组升高,提示 HPA 轴功能存在虚性亢进^[26],可能是其加速老化进程的重要机制之一。经六味地黄丸干预后,上述指标均呈现剂量依赖性改善,其中高剂量组效果尤为显著。此外,模型组小鼠的行为学观察显示,干预后其精神状态获得明显提升,该结果提示六味地黄丸对 AD 模型小鼠的病理症状具有缓解作用。

AD的发病过程涉及多因素相互作用。现有研究证据显示,细胞自噬功能障碍引发的A β 病理性堆积与Tau蛋白异常磷酸化所形成的级联病理反应在AD疾病进展中起到关键作用^[27-28]。自噬作为维持内环境稳定的重要生理过程,其本质是细胞通过构建具有双层膜结构的自噬小体,选择性包裹细胞内老化变性的蛋白质组分、功能异常的细胞器及外来病原微生物等,最终转运至溶酶体系统完成分解代谢与回收利用的生命活动。本实验数据表明,六味地黄丸能改善SAMP8小鼠海马组织中自噬小体数量及自噬标志蛋白的表达水平。接下来,研究选取跨膜糖蛋白GPNMB作为关键分子靶点,探析该方剂通过调节自噬途径干预AD病理进程的作用机制。

GPNMB广泛表达于中枢神经系统,在神经退行性疾病中发挥改善记忆、调节神经微环境、抗炎及保护神经元等作用^[29]。在AD病理研究中,5 \times FAD小鼠和AD患者均检测到小胶质细胞表达的GPNMB富集于淀粉样斑块周围。GPNMB已被多项研究认定为AD的新型候选生物标志物^[30-32]。此外,脊髓损伤等疾病模型研究显示,GPNMB能够通过激活自噬途径促进组织修复过程^[12-13],然而该蛋白在神经退行性疾病中对自噬的调控仍需深入探索。

GPNMB结构由胞外段(ECD)、跨膜段和胞质尾段3个部分组成,其生物学功能的激活依赖于ECD经水解后从细胞膜表面脱落的过程。ADAM10是介导ECD脱落的关键酶,敲低ADAM10会显著减少GPNMB ECD的释放^[33]。本研究发现,与正常组比较,模型组小鼠海马中GPNMB表达水平显著上升,而自噬相关蛋白的表达则明显降低。这一现象可能与下列机制相关:首先,模型组中ADAM10表达下降,减少了GPNMB ECD片段脱落,从而削弱了GPNMB对自噬过程的调控作用;其次,自噬作为复杂的生物学过程,其调控涉及多种因素,GPNMB仅是其中之一。基于此,本研究开展后续实验,探究增强GPNMB表达能否促进SAMP8小鼠海马自噬功能,进而实现AD的防治目标。

研究对GPNMB进行过表达,结果显示,SAMP8小鼠海马组织中ADAM10及自噬相关蛋白Beclin1、LC3 II / I水平上升,p62表达下降。Beclin1作为自噬体形成的核心调控因子,通过募集其他自噬相关蛋白参与自噬溶酶体成熟过程,其表达量与自噬诱导水平呈正相关^[34]。在自噬进程中被激活的LC3蛋白会从胞质型LC3 I转化为膜结合型LC3 II,这种转化不仅是自噬体成熟的分子标志,更是定量评估自噬活性的关

键指标—LC3 II / I值越高反映自噬水平越强^[35]。p62蛋白作为连接泛素化底物与LC3的桥梁蛋白,可被整合入自噬溶酶体中降解^[36-37]。当自噬水平下降时,p62蛋白降解受阻,在细胞中不断积累,因此,p62表达量与自噬活性呈负相关^[36]。以上结果表明,GPNMB的过表达会促使激活其活性的关键酶ADAM10表达升高,从而生成更多具有活性的GPNMB分子,GPNMB对于自噬具有正向调控作用。

进一步研究发现,六味地黄丸干预可以促进小鼠海马组织GPNMB表达,进而使ADAM10及自噬蛋白Beclin1、LC3 II / I表达升高,p62表达降低,海马神经元自噬能力增强;而对GPNMB沉默慢病毒处理的小鼠,六味地黄丸此作用明显减弱。与六味地黄丸组比较,六味地黄丸+shGPNMB组小鼠海马组织ADAM10、GPNMB表达明显减低,自噬蛋白Beclin1、LC3 II / I表达下降,p62表达升高,以上结果说明六味地黄丸提高自噬的作用是依赖于促进GPNMB的表达来实现的。

本研究立足于中医“肾藏精,主骨生髓”的理论基础,以GPNMB为关键效应分子,系统阐释了六味地黄丸干预AD的现代科学机制。研究锁定小胶质细胞自噬功能障碍这一AD核心病理环节,证实补肾中药可通过上调GPNMB表达来改善自噬活性。小胶质细胞的自噬和吞噬功能在病理蛋白的清除^[38]、炎症调控^[39]、代谢互作^[40]等方面表现出密切协同关系。如AD病程中,小胶质细胞自噬受损可导致A β 和Tau蛋白清除减少,这些异常蛋白又通过PRRs激活小胶质细胞,消耗其吞噬能力^[41]。基于此,补肾中药是否能通过上调GPNMB表达改善自噬活性进而提高小胶质细胞的吞噬功能以达到防治AD的目的,是本课题组后续研究的内容。本研究成果从亚细胞水平拓展了“肾脑相济”理论的科学外延,为神经退行性疾病的补肾方剂治疗策略开辟了潜在的作用靶点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 杨文明,谢文婷,李祥. 痴呆病(阿尔茨海默病)中医诊疗标准[J]. 中医药临床杂志,2023,35(7):1448-1451.
YANG W M, XIE W T, LI X. Diagnosis and treatment standard for dementia (Alzheimer's disease) in traditional Chinese medicine[J]. Clin J Tradit Chin Med, 2023, 35(7): 1448-1451.
- [2] 朱仲康,刘羽茜,王冰,等. 六味地黄丸含药血清对A β 诱导SH-SY5Y细胞的自噬影响及机制研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2022,24(2):670-677.
ZHU Z K, LIU Y X, WANG B, et al. Effect of Liuwei Dihuang pill-containing serum on autophagy induced by A β in SH-SY5Y

- cells and its mechanism[J]. World Sci Tech Mod Tradit Chin Med, 2022, 24(2): 670-677.
- [3] 肖萌, 张晓莲, 刘伟, 等. 补肾方剂治疗阿尔兹海默病的临床及药理机制研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(10): 1628-1636.
- XIAO M, ZHANG X L, LIU W, et al. Progress of clinical and pharmacological mechanisms of kidney-tonifying formula for the treatment of Alzheimer's disease[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2024, 35(10): 1628-1636.
- [4] 饶桂兰. 六味地黄丸治疗阿尔兹海默病肾阴亏虚证的临床疗效观察[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2024.
- RAO G L. Clinical observation of Liuwei Dihuang pill on kidney yin deficiency syndrome in Alzheimer's disease[D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2024.
- [5] 侯文晓, 司蕊豪, 刘羽茜, 等. 六味地黄丸通过 FcγR II B/c-Src 通路干预自噬防治阿尔兹海默病的分子机制[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2025, 27(3): 724-738.
- HOU W X, SI R H, LIU Y X, et al. Molecular mechanism of Liuwei Dihuang pill in preventing Alzheimer's disease by regulating FcγRIIB/c-Src pathway and autophagy[J]. World Sci Tech Mod Tradit Chin Med, 2025, 27(3): 724-738.
- [6] 朱仲康, 张林, 柳春, 等. 补肾填精法对肾虚阿尔兹海默小鼠海马自噬的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(20): 43-48.
- ZHU Z K, ZHANG L, LIU C, et al. Intervention effect of kidney-tonifying and essence-filling therapy on hippocampal autophagy in kidney-deficiency Alzheimer mice[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2019, 25(20): 43-48.
- [7] ZHU Z K, LIU Y X, LI X Y, et al. GPNMB mitigates Alzheimer's disease and enhances autophagy via suppressing the mTOR signal[J]. Neurosci Lett, 2022, 767: 136300.
- [8] 周卿云, 夏天娇, 刘甜甜, 等. 免疫细胞参与调控阿尔兹海默病的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(21): 2653-2656, 2663.
- ZHOU Q Y, XIA T J, LIU T T, et al. Research progress of immune cells involved in regulation of Alzheimer's disease[J]. Chin J Immunol, 2021, 37(21): 2653-2656, 2663.
- [9] 唐润红. IL-4 对小胶质细胞自噬的影响及小胶质细胞极化与吞噬是否依赖于自噬的探讨[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2019.
- TANG R H. Effect of IL-4 on microglial autophagy and whether microglial polarization and phagocytosis depend on autophagy[D]. Shenyang: China Medical University, 2019.
- [10] TSOU P S, SAWALHA A H. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B: A key mediator and an emerging therapeutic target in autoimmune diseases[J]. FASEB J. 2020, 34(7): 8810-8823.
- [11] KITANI A, MATSUI Y. Integrative network analysis reveals novel moderators of Aβ-Tau interaction in Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Res Ther, 2025, 17(1): 70.
- [12] LI X, XU J, SU W, et al. GPNMB modulates autophagy to enhance functional recovery after spinal cord injury in rats[J]. Cell Transplant, 2024, doi: 10. 1177/09636897241233040.
- [13] XU Y, WANG M, ZHANG L, et al. Glycoprotein non-metastatic melanoma protein b restricts PRRSV replication by inhibiting autophagosome-lysosome fusion[J]. Viruses, 2023, 15(4): 920.
- [14] 王刚, 齐金蕾, 刘馨雅, 等. 中国阿尔兹海默病报告 2024[J]. 诊断学理论与实践, 2024, 23(3): 219-256.
- WANG G, QI J L, LIU X Y, et al. China Alzheimer report 2024[J]. J Diagn Concepts Pract, 2024, 23(3): 219-256.
- [15] 王旭, 许原, 管亚男, 等. 熟地黄-山茱萸药对通过 PI3K/Akt 通路对 Aβ₂₅₋₃₅ 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. Effect of Shudihuang (Rehmanniae Radix Praeparata)-Shanzhuyu (Corni Fructus) herb pair on N2a cell apoptosis induced by Aβ₂₅₋₃₅ through PI3K/Akt signaling pathway[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2024, 51(2): 151-154, 226.
- [16] 张帆, 李静, 孙涛垒. 基于 Aβ 淀粉样变性的神经毒性机制研究进展[J]. 武汉理工大学学报, 2018, 40(11): 29-35, 44.
- ZHANG F, LI J, SUN T L. Research progress in neurotoxicity mechanism of β-amyloidosis[J]. J Wuhan Univ Technol, 2018, 40(11): 29-35, 44.
- [17] 陈怡琴, 杨娇, 裴文丽, 等. 黑逍遥散对 APP/PS1 小鼠认知障碍及其肠道菌群的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(19): 191-201.
- CHEN Y Q, YANG J, PEI W L, et al. Regulatory effect of Hei Xiaoyaosan on cognitive impairment and gut microbiota in APP/PS1 mice[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(19): 191-201.
- [18] 侯文晓, 刘羽茜, 苗嘉芮, 等. 六味地黄丸提高 GPNMB 表达调控 FcγR II B/c-Src 通路防治阿尔兹海默病的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(21): 6062-6071.
- HOU W X, LIU Y X, MIAO J R, et al. Mechanism of Liuwei Dihuangwan in enhancing GPNMB expression to regulate FcγR II B/c-Src pathway for prevention and treatment of Alzheimer's disease[J]. China J Chin Mater Med, 2025, 50(21): 6062-6071.
- [19] PACESOVA A, HOLUBOVA M, HRUBA L, et al. Age-related metabolic and neurodegenerative changes in SAMP8 mice[J]. Aging (Albany NY), 2022, 14(18): 7300-7327.
- [20] 陈秀艳, 郭蕾, 张俊龙, 等. 地黄饮子对帕金森病肾虚证模型大鼠的干预作用及机制研究[J]. 云南中医中药杂志, 2018, 39(3): 72-75.
- CHEN X Y, GUO L, ZHANG J L, et al. Study on intervention effect of Rehmanniae decoction on Parkinson's disease model rats with kidney-deficiency syndrome and its mechanism[J]. Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med, 2018, 39(3): 72-75.
- [21] 王红梅, 宋彩梅, 刘新民, 等. 六味地黄丸对肾虚型老年痴呆动物模型的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 112-116.
- WANG H M, SONG C M, LIU X M, et al. Effects of Liuwei Dihuang Wan on animal senile dementia models with deficiency of the kidney[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2012, 18(5): 112-116.
- [22] 贺文彬, 张俊龙, 陈乃宏. 基于海马-HPA 轴负反馈调控机制对中医肾脑关系的理论分析[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(9): 3426-3428.
- HE W B, ZHANG J L, CHEN N H. Analysis of relationship between brain and kidney of TCM based on negative feedback

- regulation in hippocampus-HPA axis[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2016, 31(9):3426-3428.
- [23] 寿旗扬,张利棕,蔡月琴,等. Lewis大鼠肾虚体质及其HPA轴功能失衡[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(9):8-13, 38. SHOU Q Y, ZHANG L Z, CAI Y Q, et al. Kidney yang deficiency constitution and hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in Lewis rats[J]. *Chin J Comp Med*, 2015, 25(9):8-13, 38.
- [24] 王晓晴. 基于HPA轴通路探讨益肾养心安神片对失眠性应激模型大鼠学习记忆障碍的作用机制[D]. 承德:承德医学院, 2024. WANG X Q. Exploring the mechanism of Yishen Yangxin Anshen tablets on learning and memory impairments in insomnia stress model rats: A study based on the HPA Axis pathway[D]. Chengde: Chengde Medical College, 2024.
- [25] 随旭. 小鼠背海马 synaptotagmin I 和 GFAP 蛋白含量的年龄效应及长期口服阿卡波糖的影响[D]. 合肥:安徽医科大学, 2014. SUI X. Orally long-term administration of acarbose impacts the age effects on levels of synaptotagmin I and GFAP in dorsal hippocampus of mice[D]. Hefei: Anhui Medical University, 2014.
- [26] 李丹阳,艾民,周派,等. 肾虚证阿尔茨海默病证结合小鼠模型的构建及评价[J]. *中药药理与临床*, 2025, 41(5):102-109. LI D Y, AI M, ZHOU P, et al. Construction and evaluation of syndrome-combined mouse model of kidney deficiency Alzheimer's disease[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2025, 41(5):102-109.
- [27] ZHANG X W, ZHU X X, TANG D S, et al. Targeting autophagy in Alzheimer's disease: Animal models and mechanisms[J]. *Zool Res*, 2023, 44(6):1132-1145.
- [28] ZHANG Z, YANG X, SONG Y Q, et al. Autophagy in Alzheimer's disease pathogenesis: Therapeutic potential and future perspectives[J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 72:101464. doi: 10.1016/j.arr.2021.101464.
- [29] 黄超. GPNMB 促进周围神经损伤修复的作用及其机制[D]. 上海:中国人民解放军海军军医大学, 2019. HUANG C. The effects of GPNMB in promoting the repair of peripheral nerve injury and its mechanism[D]. Shanghai: Naval Medical University, 2019.
- [30] GILLET D A, WALLINGS R L, URIARTE HUARTE O, et al. Progranulin and GPNMB: Interactions in endo-lysosome function and inflammation in neurodegenerative disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1):286.
- [31] YARBRO J M, SHRESTHA H K, WANG Z, et al. Proteomic landscape of Alzheimer's disease: Emerging technologies, advances and insights (2021-2025)[J]. *Mol Neurodegener*, 2025, 20(1):83.
- [32] MARTINS-FERREIRA R, CALAFELL-SEGURA J, LEAL B, et al. The human microglia atlas (HuMicA) unravels changes in disease-associated microglia subsets across neurodegenerative conditions[J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1):739.
- [33] ROSE A A, ANNIS M G, DONG Z, et al. ADAM10 releases a soluble form of the GPNMB/osteostatin extracellular domain with angiogenic properties[J]. *PLoS One*, 2010, 5(8):e12093.
- [34] 牟连伟,韩鹏,杨运杰. 运动干预调控海马神经元自噬改善阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆障碍[J]. *解剖学报*, 2024, 55(5):533-540. MOU L W, HAN P, YANG Y J. Exercise intervention alleviating learning and memory dysfunction of Alzheimer's disease model mice through modulating autophagy of hippocampal neurons[J]. *Acta Anat Sin*, 2024, 55(5):533-540.
- [35] 张旖旎,鲁海菲,王平,等. 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[J]. *中国中西医结合杂志*, 2024, 44(3):324-330. ZHANG Y N, LU H F, WANG P, et al. Shenghui granules improve learning memory in Alzheimer's disease mice by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2024, 44(3):324-330.
- [36] KAGEYAMA, GUDMUNDSSON S R, SOU Y S, et al. p62/SQSTM1-droplet serves as a platform for autophagosome formation and anti-oxidative stress response[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):16.
- [37] 陶晓雪,萧闵,唐琨洋,等. 运动联合生慧汤干预 M1AChR 调控线粒体自噬提高阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆能力[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 27(3):1-13. TAO X X, XIAO M, TANG K Y, et al. Exercise combined with Shenghui decoction intervention on M1AChR regulation of mitochondrial autophagy improves learning and memory ability in Alzheimer's disease model rats[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2025, 27(3):1-13.
- [38] CHOI I, ZHANG Y, SEGOBIN S P, et al. Microglia clear neuron-released α -synuclein via selective autophagy and prevent neurodegeneration[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):1386.
- [39] HEGDEKAR N, SARKAR C, BUSTOS S, et al. Inhibition of autophagy in microglia and macrophages exacerbates innate immune responses and worsens brain injury outcomes [J]. *Autophagy*, 2023, 19(7):2026-2044.
- [40] WANG H, YE J, PENG Y, et al. CKLF induces microglial activation via triggering defective mitophagy and mitochondrial dysfunction[J]. *Autophagy*, 2024, 20(3):590-613.
- [41] WANG Z, WANG Q, LI S, et al. Microglial autophagy in Alzheimer's disease and Parkinson's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2023, 14:1065183.

[责任编辑 周冰冰]