

地黄饮子调节PI3K/Akt信号通路保护AD小鼠脑组织 星形胶质细胞损伤及糖酵解的作用机制

余虹霓¹, 孙梦捷¹, 王凤丽¹, 康盛华¹, 韩广卉¹, 李东岳², 甄伟哲³, 马涛^{1*}
(1. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078; 2. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029;
3. 中日友好医院, 北京 100029)

[摘要] 目的:研究地黄饮子调节磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路,改善阿尔茨海默病(AD)小鼠脑组织星形胶质细胞损伤和糖酵解,提高AD小鼠认知功能的作用机制。方法:将40只4月龄雄性APP/PS1转基因小鼠随机分为模型组、模型+地黄饮子(2.5 g·kg⁻¹)组,每组20只;同背景、同月龄C57BL/6J小鼠40只,随机分为正常组、正常+地黄饮子(2.5 g·kg⁻¹)组,每组20只。正常+地黄饮子组和模型+地黄饮子组给予地黄饮子灌胃,正常组和模型组均给予等量无菌生理盐水,每天灌胃1次,连续给药150 d。Morris水迷宫实验测试小鼠定位航行与空间探索能力。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠脑组织PI3K、Akt蛋白及其磷酸化水平,以及磷酸果糖激酶-1(PFK-1)、乙醛脱氢酶3家族B2(ALDH3B2)蛋白表达。免疫荧光法评估星形胶质细胞形态及ALDH3B2的表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠在定位航行实验第2~5天中逃避潜伏期明显延长($P<0.05$, $P<0.01$),穿越平台目标区域次数和目标象限停留时间明显减少($P<0.05$, $P<0.01$),在相对象限停留时间明显增加($P<0.05$),星形胶质细胞胞体表面积和细胞突起总长度明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),PI3K、Akt磷酸化水平、ALDH3B2、PFK-1蛋白表达量显著降低($P<0.01$),而正常+地黄饮子组小鼠的上述实验指标差异无统计学意义。与模型组比较,模型+地黄饮子组小鼠在定位航行实验第2~5天中逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$, $P<0.01$),穿越平台次数和目标象限停留时间明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),在相对象限停留时间明显降低($P<0.05$),星形胶质细胞胞体表面积和细胞突起总长度明显减少($P<0.05$),PI3K、Akt磷酸化水平和ALDH3B2、PFK-1蛋白表达量显著提高($P<0.01$)。结论:地黄饮子通过激活PI3K/Akt信号通路,上调PFK-1、ALDH3B2蛋白表达量,保护AD小鼠脑组织星形胶质细胞损伤,提高糖酵解活性,改善AD小鼠学习记忆能力。

[关键词] 地黄饮子; 阿尔茨海默病(AD); 星形胶质细胞; 糖酵解; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt); 磷酸果糖激酶-1(PFK-1)

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)08-0010-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230606

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230215.1619.010.html>

[网络出版日期] 2023-02-16 11:17:26

Mechanism of Dihuang Yinzi in Improving Astrocyte Injury and Glycolysis in AD Mice via PI3K/Akt Pathway

YU Hongni¹, SUN Mengjie¹, WANG Fengli¹, KANG Shenghua¹, HAN Guanghui¹,
LI Dongyue², ZHEN Weizhe³, MA Tao^{1*}

(1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
3. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Dihuang Yinzi in improving astrocyte injury and

[收稿日期] 2022-12-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973786,81673929)

[第一作者] 余虹霓,在读硕士,从事神经退行性疾病的发病机制及中药干预研究,Tel:010-67689634,E-mail:y1135883702@163.com

[通信作者] *马涛,博士,副研究员,从事神经退行性疾病发病机制及中药干预研究,Tel:010-67689634,E-mail:matao327@126.com

glycolysis in Alzheimer's disease (AD) mice via regulating the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway, thereby improving the cognitive function of AD mice. **Method:** Forty male APP/PS1 transgenic mice aged four months were randomly divided into a model group and a model + Dihuang Yinzi ($0.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, with 20 mice in each group. Forty C57BL/6J mice with the same background and same age were randomly divided into a control group and a control + Dihuang Yinzi ($0.25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, with 20 mice in each group. The mice in the control + Dihuang Yinzi group and the model + Dihuang Yinzi group were administered with Dihuang Yinzi by gavage, and those in the control group and the model group received an equal volume of sterilized normal saline, once a day for 150 days. Morris water maze test was performed to test the ability of navigation and space exploration of mice. The protein expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, phosphofructokinase-1 (PFK-1), and aldehyde dehydrogenase 3 family member B2 (ALDH3B2) in mouse brain tissues was measured by Western blot. An immunofluorescence assay was performed to detect astrocyte morphology and the expression level of ALDH3B2. **Result:** As compared with the control group, the model group showed prolonged escape latency during the 2nd to 5th days of the location-based navigation ($P < 0.05$, $P < 0.01$), reduced number of times crossing the target area of the platform, shortened residence time in the target quadrant ($P < 0.05$, $P < 0.01$), prolonged residence time in the opposite quadrant ($P < 0.05$), increased surface area of the cell body and total length of cell protrusions of astrocytes ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and down-regulated protein expression of p-PI3K, p-Akt, ALDH3B2, and PFK-1 ($P < 0.01$), while the above experimental indexes were not significantly different in the control + Dihuang Yinzi group. Compared with the model group, the model + Dihuang Yinzi group showed shortened escape latency of APP/PS1 mice during the 2nd to 5th days of the location-based navigation ($P < 0.05$, $P < 0.01$), increased number of times crossing the platform, prolonged target quadrant residence time ($P < 0.05$, $P < 0.01$), shortened residence time in the opposite quadrant ($P < 0.05$), reduced surface area of the cell body and total length of cell protrusions of astrocytes ($P < 0.05$), and up-regulated protein expression of p-PI3K, p-Akt, ALDH3B2, and PFK-1 ($P < 0.01$). **Conclusion:** Dihuang Yinzi can improve the learning and memory ability of AD mice by activating the PI3K/Akt signaling pathway and up-regulating the protein expression of PFK-1 and ALDH3B2 to protect against astrocyte injury in brain tissues and improve glycolysis.

[Keywords] Dihuang Yinzi; Alzheimer's disease; astrocytes; glycolysis; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt); phosphofructokinase-1 (PFK-1)

阿尔茨海默病(AD)是一种重要的中枢神经系统退行性疾病,是最常见的痴呆症类型。AD临床表现为短期记忆困难,语言表达、视觉空间处理和执行(精神敏捷)功能损害等^[1]。随着我国快速进入老龄化社会,预计2023年AD患者将超过3 000万人^[2]。因此,积极开展针对AD治疗和发病机制的研究具有重大意义。近年研究显示保护星形胶质细胞损伤,改善糖酵解障碍是AD治疗的新靶标^[3],为AD治疗提供了新的思路。作为中枢神经系统内最丰富的胶质细胞类型,星形胶质细胞发挥营养和支持神经元的作用,并通过糖酵解参与脑组织能量代谢^[4]。近年来研究证实星形胶质细胞损伤在AD病程中发挥关键作用^[5]。在AD病程中,随着 β -淀粉样蛋白(A β)累积,脑组织中星形胶质细胞反应性增生,磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信

号通路被抑制^[6],其下游糖酵解关键酶磷酸果糖激酶-1(PFK-1)表达下调,糖酵解过程受损^[7],因而通过星形胶质细胞糖酵解途径的葡萄糖利用显著降低,能量代谢底物乳酸生成减少,从而出现能量代谢障碍,导致大脑认知功能下降^[8-9]。

地黄饮子出自金代刘河间著《黄帝内经·素问·宣明论方》卷二的诸证门,是益肾填髓的经典方剂,被广泛应用于治疗AD^[10-11]。研究显示,地黄饮子具有调节神经信号传导、抗氧化、抗炎、抗凋亡等作用^[12-13]。本课题组前期研究证实地黄饮子可通过激活PI3K/Akt,提高APP/PS1小鼠抗氧化能力和抑制神经细胞凋亡,改善星形胶质细胞异常活化^[14-15];同时地黄饮子可改善AD小鼠脑组织能量代谢和星形胶质细胞乳酸穿梭^[16-17]。然而,地黄饮子是否可以通过PI3K/Akt信号通路保护星形胶质细胞结构

功能,进而调节其糖酵解作用还未见报道。本文围绕PI3K/Akt信号通路的激活,以APP/PS1转基因小鼠为研究对象,探讨地黄饮子对星形胶质细胞结构功能及其糖酵解的保护作用。

1 材料

1.1 动物 40只4月龄雄性APP/PS1转基因小鼠,40只4月龄雄性C57BL/6J小鼠,合格证号SCXK(苏)2020-0009,体质量24~26 g,由江苏华创信诺医药科技有限公司(中国,南京)提供。饲养于北京中医药大学东方医院SPF动物实验室,饲养环境温度(24±2)℃,相对湿度50%±10%,12/12 h明暗循环,光照时间8:00~20:00,小鼠维持饲料自由饮食,自由饮水。动物实验的开展得到了北京中医药大学东方医院动物实验伦理委员会批准(编号20211226)。

1.2 药物 地黄饮子方药组成为熟地黄15 g、山茱萸15 g、肉苁蓉15 g、巴戟天15 g、附子15 g、肉桂15 g、麦冬15 g、石斛15 g、五味子15 g、茯苓15 g、石菖蒲15 g、远志15 g、薄荷15 g、生姜10 g、大枣5 g。饮片由北京同仁堂药店提供(批号分别为1312-315、2814-021、2131-512、3918-508、4492-070、3729-s091、2929-360、7926-y448、5982-u650、5104-617、3291-759、2760-j610、4501-336、3719-291、6640-739)。由北京中医药大学第三附属医院赵永烈主任医师鉴定均为正品。按照地黄饮子原方剂量称取药物,混匀后的加入4倍量蒸馏水,浸泡2 h,100℃提取2次,每次2 h,收集煎液,混合过滤,60℃浓缩至浸膏(14 g中药生药合1 g浸膏),浸膏4℃保存,使用前用无菌生理盐水溶解至所需浓度。

1.3 试剂 BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA组织蛋白裂解液(普利莱基因技术有限公司,批号分别为20220215、20220519);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(德国Merck公司,批号IPVH00010);胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、磷酸化(p)-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为3670、17366、13666、4060、4685);乙醛脱氢酶3家族B2(ALDH3B2)、S100B抗体(瑞典Atlas Antibodies公司,批号分别为AMAb91038、HPA045132);PFK-1抗体(美国Abcam公司,批号ab204131);β-肌动蛋白(β-actin)(C-4)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Santa Cruz公司,批号分别为sc-47778、sc-365062);FITC标记山羊抗兔、Alexa Fluor 594标记山羊抗小鼠荧光二抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗(中杉金桥生物公司,批号

分别为ZF-0311、ZF-0513、ZB-2301、ZB-2305);Pierce ECL Plus显色试剂盒(美国Thermo Fisher公司,批号32134)。

1.4 仪器 DMS-2型Morris水迷宫(中国医学科学院药物研究所),Mini-Protean型小型垂直电泳系统及转膜仪(美国Bio-Rad公司),GeneGenome型ECL成像仪(美国Syngene公司),ELX800型酶标仪和Synergy H1型全波长酶标仪(美国Bio Tex公司),5810R型台式多功能高速冷冻离心机(美国Eppendorf公司),IX71型荧光显微镜(日本Olympus公司),CM1900型冰冻切片机(德国Leica公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 在适应性喂养7 d后,将40只APP/PS1转基因小鼠按照随机数字法分为模型组(20只)、模型+地黄饮子组(20只);另取同背景、同月龄C57BL/6J小鼠40只,同样按照随机数字法分为正常组(20只)、正常+地黄饮子组(20只)。在小鼠4月龄时开始灌胃给药,按照地黄饮子的人临床用药量,即浸膏0.25 g·kg⁻¹体质量,计算小鼠给药剂量为2.5 g·kg⁻¹,地黄饮子空白组和模型组小鼠分别给予相同体积的无菌生理盐水,给药时间为150 d,每天1次。给药结束后,进行行为学及相关指标测试。

2.2 Morris水迷宫实验 连续中药干预150 d后,采用Morris水迷宫检测小鼠学习空间学习记忆能力。该系统由圆形水池和自动录像记录系统及水迷宫图象采集、分析软件三部分组成,水池直径160 cm,高50 cm,水深30 cm,水温保持在(21±2)℃,池壁上标记4个等距离点N、E、S、W作为试验的起始点,分水池为4个象限,选择第IV象限的中央放置圆柱形平台,平台直径10 cm,高29 cm,没于水下1 cm。实验共计6 d,分为定位航行实验和空间探索实验2个阶段。第1~5天进行定位航行实验,每天训练2次,每次间隔2 h。第1次,将小鼠面朝水池壁从平台对角线的对侧放入水中;第2次,将小鼠从I或III象限随机放入水中。在每次训练中,小鼠在60 s内找到平台则停止,若时间超过60 s,则引导小鼠至平台上停留5 s,每次训练结束移出动物后,将其放入干燥垫料中。仪器自动记录小鼠找到水中平台的时间,即逃避潜伏期,以此作为学习记忆能力的检测指标。第6天进行空间探索实验,撤掉水池中的圆形平台,各组小鼠于水迷宫的同一位置被放入水中,记录小鼠60 s内穿越平台目

标区域次数、目标象限、相对象限停留时间。

2.3 脑组织样品处理及冰冻切片 Morris水迷宫结束后,每组随机选出6只小鼠,进行麻醉,碘伏消毒后打开腹腔,先用预冷的生理盐水冲洗实验小鼠心脏,再予以4% (pH 7.0)多聚甲醛进行心脏灌注。待可见小鼠肝脏颜色变白,四肢僵硬,用断头器断头,剥取全脑并4℃保存于4%多聚甲醛中。在30%蔗糖溶液中脱水,用冰冻切片机连续切割得到小鼠海马脑组织切片,-20℃冰箱保存用于组织学检测。

2.4 免疫荧光法检测星形胶质细胞形态及ALDH3B2的表达 将小鼠海马脑组织冰冻切片平衡至室温,用PAP笔在载玻片上脑组织周围画圈,在室温下使用0.3% TritonX-100溶液透膜30 min,10%牛血清白蛋白(BSA)在室温下封闭1 h。根据说明书加入一抗稀释液(1:200)4℃孵育过夜。一抗孵育结束,采用磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液清洗后加入二抗(1:200),室温避光孵育2 h,结束后用PBS缓冲液冲洗二抗,滴加含有DAPI的抗荧光淬灭封片剂封片。将切片置于共聚焦激光扫描显微镜下观测并采集图像,采用Image J 1.8.0图像分析软件进行定量分析。

2.5 星形胶质细胞形态学分析 所有的荧光切片都在室温下采用IX71型显微镜,并以1 024×1 024像素的分辨率采集图像。所有的图像均使用相同的激光设置,以便进行跨组比较。每组选取3只老鼠,每张脑片选取5个细胞进行形态学分析。使用Image J 1.8.0中Fiji软件包测量星形胶质细胞胞体表面积,并运用简单神经元追踪器(SNT)插件,帮助重建星形胶质细胞GFAP染色结构。以星形胶质细胞胞体为中心确定一个点,在最远的分支末端画一根线,SNT软件沿着分支中线识别并符合分支弯曲度,并应用于所有路径来追踪细胞突起,从“all paths”窗口获得的所有单独路径长度的和并作为星形胶质细胞突起总长度。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定小鼠脑组织中PI3K、Akt磷酸化水平及ALDH3B2、PFK-1表达情况 取各组小鼠脑组织,剪碎后置于玻璃匀浆器中,加入预冷的RIPA裂解液,在冰上匀浆提取组织蛋白。根据试剂盒说明书操作,BCA法测定蛋白浓度。采用SDS-PAGE电泳检测蛋白表达量。每孔上样量为50 μg,恒压100 V电泳50 min,295 mA恒流转膜1.5 h。聚偏二氟乙烯(PVDF)膜用含5% BSA的PBST封闭液封闭1 h,加入封闭液稀释的抗体反应液(1:1 000),在杂交袋中4℃孵育过夜。PBST清洗后,加入封闭液稀释的第二抗体反应液(1:5 000),室温下孵育1.5 h。PBST清洗后,采用ECL发光液显GeneGenome ECL成像仪捕捉图像,采用Imag J 1.8.0软件分析条带灰度值。

2.7 统计学分析 实验数据用SPSS 25.0软件进行处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,水迷宫实验中的定位航行实验数据采用具有重复测量数据的方差分析,组间比较采用单因素方差分析结合Post Hoc检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对AD小鼠空间学习记忆能力的影响 Morris水迷宫定位航行实验第2~5天,与正常组比较,模型组小鼠的逃避潜伏期明显延长($P<0.05$, $P<0.01$),正常+地黄饮子组的逃避潜伏期则差异无统计学意义,这提示模型小鼠出现了明显的空间学习记忆能力障碍,且地黄饮子对正常小鼠空间学习记忆能力没有显著影响;与模型组比较,模型+地黄饮子组小鼠的逃避潜伏期明显缩短($P<0.05$, $P<0.01$)。在空间探索实验中,与正常组比较,模型组小鼠穿越平台目标区域次数和目标象限停留时间明显减少($P<0.05$, $P<0.01$),在相对象限停留时间明显增加($P<0.05$),而正常+地黄饮子组差异无统计学意义;而地黄饮子干预后,明显增加模型组小鼠穿越平台次数和目标象限停留时间($P<0.05$, $P<0.01$),明显降低在相对象限停留时间($P<0.05$)。见表1、表2。

表1 地黄饮子对AD小鼠Morris水迷宫定位航行实验逃避潜伏期的影响($\bar{x}\pm s$, $n=18$)

Table 1 Effect of Dihuang Yinzi on escape latency of AD mice in place navigation test of Morris water maze test ($\bar{x}\pm s$, $n=18$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	逃避潜伏期/s				
		第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
正常组		57.31±15.91	33.23±9.95	14.27±7.74	13.39±4.08	11.18±3.43
模型组		58.02±19.21	47.21±10.05 ¹⁾	39.94±10.25 ²⁾	30.06±9.42 ²⁾	27.73±9.14 ¹⁾
正常+地黄饮子组	2.50	55.36±20.32	29.02±7.74	15.27±4.47	10.42±3.59	12.41±4.42
模型+地黄饮子组	2.50	59.25±15.10	38.35±8.82 ³⁾	23.56±8.15 ⁴⁾	17.26±5.57 ⁴⁾	14.85±6.27 ³⁾

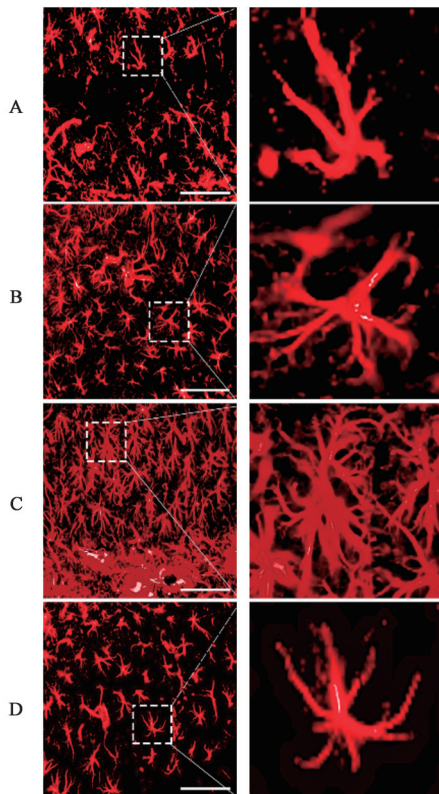
注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2-表5同)

表2 地黄饮子对AD小鼠Morris水迷宫空间探索实验指标的影响 ($\bar{x}\pm s, n=18$)

Table 2 Effect of Dihuang Yinzi on cognition index of AD mice in spatial probe test of Morris water maze test ($\bar{x}\pm s, n=18$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	穿越平台 数/次	目标象限停 留时间/s	相对象限停 留时间/s
正常组		8.87±3.28	26.39±9.98	13.91±5.27
模型组		0.52±0.44 ²⁾	17.16±7.12 ¹⁾	24.76±6.01 ¹⁾
正常+地黄饮子组	2.50	7.93±4.72	27.27±11.04	14.29±8.73
模型+地黄饮子组	2.50	3.36±1.29 ⁴⁾	22.84±8.39 ³⁾	20.47±12.35 ³⁾

3.2 对AD小鼠脑组织中星形胶质细胞形态的影响 与正常组比较,模型组小鼠脑组织中星形胶质细胞胞体表面积和细胞突起总长度明显增加($P<0.05, P<0.01$),而正常+地黄饮子组小鼠的星形胶质细胞胞体表面积和细胞突起总长度差异无统计学意义。与模型组比较,模型+地黄饮子组小鼠脑组织星形胶质细胞胞体表面积和细胞突起总长度明显降低($P<0.05$)。见图1、表3。



注:A.正常组;B.模型组;C.正常+地黄饮子组;D.模型+地黄饮子组(图2-图4同)

图1 地黄饮子对AD小鼠脑组织星形胶质细胞形态的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 1 Effect of Dihuang Yinzi on morphology of astrocytes in brain of AD mice (IF, ×200)

表3 地黄饮子对AD小鼠脑组织星形胶质细胞形态的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Dihuang Yinzi on morphology of astrocytes in brain of AD mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·k ⁻¹	胞体面积/ μm^2	突起长度/ μm
正常组		142.14±39.87	261.9±32.36
模型组		215.98±19.90 ¹⁾	482.21±134.29 ²⁾
正常+地黄饮子组	2.50	127.94±33.43	214.35±39.72
模型+地黄饮子组	2.50	156.77±21.56 ³⁾	299.13±51.62 ³⁾

3.3 对AD小鼠脑组织PI3K、Akt磷酸化水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠脑内p-PI3K和p-Akt表达量显著降低($P<0.01$),在正常+地黄饮子组中则差异无统计学意义。与模型组比较,模型+地黄饮子组小鼠中PI3K和Akt磷酸化水平显著上升($P<0.01$)。见图2、表4。

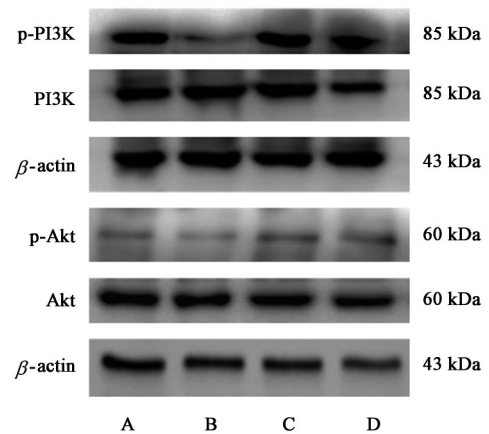


图2 各组小鼠脑组织中PI3K和Akt蛋白磷酸化水平电泳

Fig. 2 Electrophoresis of phosphorylation of PI3K and Akt in brain of AD mice

表4 地黄饮子对AD小鼠脑组织中PI3K和Akt蛋白磷酸化水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Dihuang Yinzi on phosphorylation of PI3K and Akt in brain of AD mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
正常组		5.173±0.038	2.931±0.028
模型组		0.836±0.006 ²⁾	0.429±0.014 ²⁾
正常+地黄饮子组	2.50	6.217±0.051	2.818±0.035
模型+地黄饮子组	2.50	4.294±0.031 ⁴⁾	2.147±0.015 ⁴⁾

3.4 对AD小鼠星形胶质细胞PFK-1和ALDH3B2和蛋白表达的影响 免疫荧光结果显示,ALDH3B2与星形胶质细胞标记物S100B共定位,说明ALDH3B2主要在星形胶质细胞中表达。与正常组比较,模型组小鼠脑组织中ALDH3B2荧光强度明显降低,正常+地黄饮子组小鼠脑组织

ALDH3B2 荧光强度无明显差异;与模型组比较,模型+地黄饮子组小鼠脑组织 ALDH3B2 荧光强度增高。Western blot 结果显示,与正常组比较,模型组中 PFK-1 和 ALDH3B2 蛋白表达量显著降低($P <$

0.01),正常+地黄饮子组则差异无统计学意义;与模型组比较,模型+地黄饮子组小鼠脑组织 PFK-1 和 ALDH3B2 的表达量则显著升高($P < 0.01$)。见图3、图4及表5。

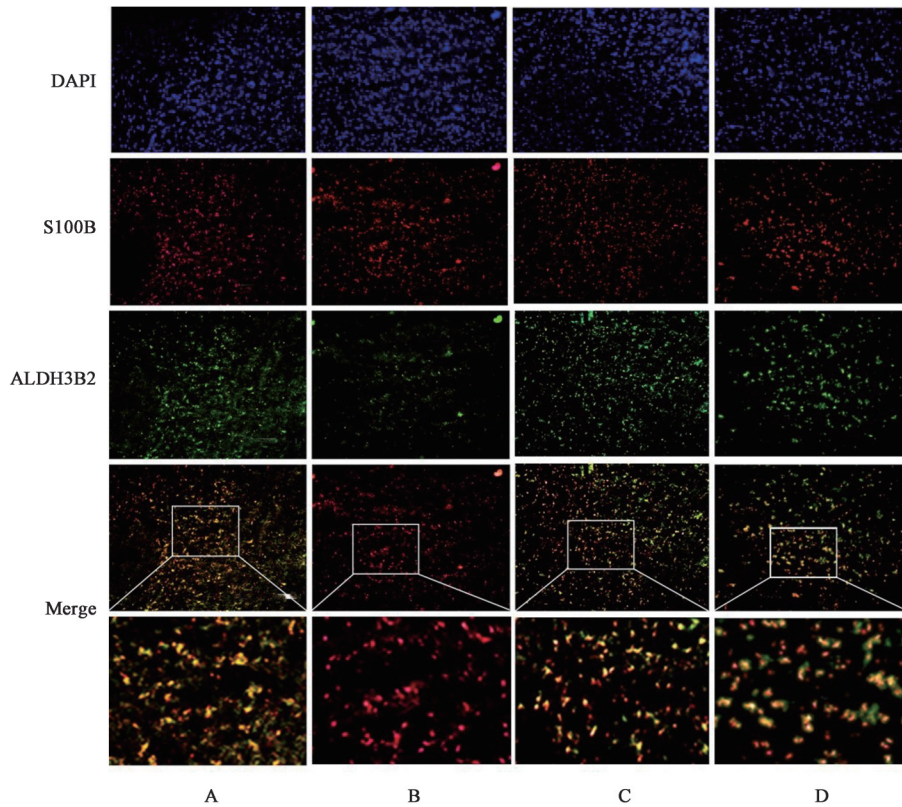


图3 地黄饮子对AD小鼠脑内ALDH3B2表达水平的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 3 Effect of Dihuang Yinzi on level of ALDH3B2 in brain of AD mice (IF, ×200)

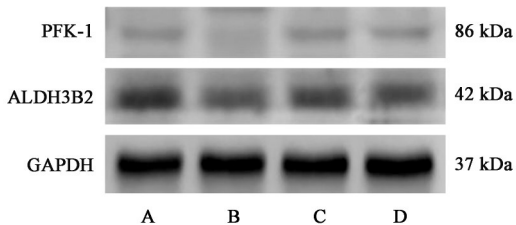


图4 各组小鼠脑内PFK-1和ALDH3B2蛋白表达水平电泳

Fig. 4 Electrophoresis of PFK-1 and ALDH3B2 protein expression in brain

4 讨论

AD是一种与年龄呈正相关的神经退行性疾病,其症状与记忆、认知障碍和行为变化密切相关。AD在中医学中属于“痴呆”“呆症”等范畴,早在《左传》中就有相关症状的描述,而“痴呆”一词最早见于东汉《华佗神医秘传·华佗治痴呆神方》^[18]。中医学对痴呆的发病机制进行了大量地研究,从中医学脏腑辨证角度认为“肾者,主蛰,封藏之本,精之处也。”肾藏一身精,精生髓,而脑为髓之海,当脑髓

表5 地黄饮子对AD小鼠脑组织中PFK-1和ALDH3B2蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Dihuang Yinzi on PFK-1 and ALDH3B2 protein expression level in brain of AD mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	PFK-1 /GAPDH	ALDH3B2 /GAPDH
正常组		0.392±0.007	3.427±0.042
模型组		0.015±0.005 ²⁾	0.782±0.031 ²⁾
正常+地黄饮子组	2.50	0.521±0.009	3.989±0.027
模型+地黄饮子组	2.50	0.345±0.004 ⁴⁾	3.071±0.041 ⁴⁾

失养发为痴呆^[19-20]。现代医学也对AD的发病机制提出了诸多假说,如淀粉样蛋白级联假说、氧化应激假说、炎症假说等,近些能量代谢紊乱被认为是AD早期重要病理事件,因而受到越来越多关注,成为AD早期诊断及治疗的重要靶标^[21-23]。

星形胶质细胞是大脑中重要的供能场所,具有糖原储存功能^[24],脑组织血液中葡萄糖通过葡萄糖

转运体1(GLUT1)转运至星形胶质细胞内。在PFK-1的作用下经过一系列催化反应生成乳酸传递给神经元,从而为大脑神经元维持正常生理活动提供能量,保证中枢神经系统信号传导^[25]。在AD病程中,由于星形胶质细胞受损,形态出现反应性异常,星形胶质细胞中糖酵解途径关键酶表达下调,使脑内葡萄糖代谢紊乱,导致能量代谢障碍,引发认知功能障碍。MERLINI等^[26]发现体外培养的AD小鼠星形胶质细胞中GLUT1的表达下调和乳酸分泌减少,这与AD小鼠早期行为异常和认知障碍密切相关。星形胶质细胞是维持大脑内稳态的基础,与AD发病密切相关。在AD中星形胶质细胞被激活,其特征性改变包括形态和蛋白分子的改变,如细胞肥大和分支变长等^[27]。本研究显示,AD小鼠出现显著的空间学习记忆能力障碍,脑组织星形胶质细胞形态发生显著改变,表现出肥厚特征,如细胞胞体表面积增大、分支总长度增加等。地黄饮子能显著提高AD小鼠空间学习记忆能力,改善星形胶质细胞形态结构异常,而对正常组小鼠则没有显著影响。

星形胶质细胞是脑组织中糖酵解作用的主要场所,其糖酵解受到PI3K/Akt信号通路的调节。PI3K/Akt被认为与A β 、神经纤维缠结(NFT)和脑萎缩有关,它是大脑内由不同的刺激因素触发的一种途径,能够调节糖代谢功能,并抑制许多神经毒性机制^[28-29]。Akt的活性受到PI3K的调控,研究显示A β 蛋白的沉积会抑制PI3K的磷酸化,从而降低Akt在苏氨酸308位点的磷酸化,进而抑制PI3K/Akt通路活性。本研究显示,AD小鼠脑组织PI3K/Akt信号通路活性显著下降,而地黄饮子能够明显激活PI3K/Akt信号通路。

PFK-1是星形胶质细胞中催化糖酵解的关键酶,也是哺乳动物星形胶质细胞中糖酵解过程最重要的控制点,PFK-1可以催化果糖-6-磷酸(F-6-P)转变为果糖-1,6-二磷酸(F-1,6-BP),维持星形胶质细胞的能量供应。在AD中,当PI3K/Akt通路活性下降时,PFK-1表达下调,导致葡萄糖利用率下降,引发星形胶质细胞糖酵解障碍^[7,9,30-31]。有研究证实,通过激活PI3K/Akt信号通路,可以显著上调PFK-1表达,促进星形胶质细胞的糖酵解作用^[32]。ALDH3B2是一种乙醛脱氢酶,在星形胶质细胞中特异性表达,能够氧化糖酵解过程中产生的毒性物质甲基乙二醛(MG),降低星形胶质细胞毒性,从而起到特异性保护作用^[33]。结合网络药理学和代谢

组学分析发现,在AD小鼠模型中ALDH3B2在星形胶质细胞中表达量明显下降,抑制了糖酵解产生的重要能量底物L-乳酸水平,导致星形胶质细胞能量障碍,进一步促进星形胶质细胞的损伤^[16]。本研究结果显示,在AD小鼠脑内由于PI3K/Akt信号通路被抑制,PFK-1表达下调,星形胶质细胞中ALDH3B2水平下降,表明AD小鼠脑组织星形胶质细胞中的糖酵解作用出现显著障碍。地黄饮子能够通过激活PI3K/Akt信号通路,上调PFK-1表达,促进星形胶质细胞中糖酵解过程,改善能量代谢障碍。同时,地黄饮子还能升高星形胶质细胞中ALDH3B2水平,促进糖酵解中MG的氧化,降低毒性物质对星形胶质细胞的损害及提高能量底物的生成。

在中医学中,AD病位在脑,与肾密切相关。肾气亏虚,脑失所养,髓减脑消,神机失用是AD主要病机,临床上多采用益肾填髓法遣方用药。地黄饮子是经典的益肾填髓中药,方中肉苁蓉、巴戟天、附子等辛温之品温肾阳,又配以熟地黄、山萸肉等滋补肾阴,填益肾精,再配以麦冬、五味子、石斛滋养阴液,以增补肾阴之功效,诸药合用,共奏补肾填精、充养髓海之功效^[34]。地黄饮子性味温和,临床上广泛用于AD治疗,大量临床研究证实其改善认知功能的效果^[35-37]。本课题组前期研究显示,地黄饮子能显著改善AD大、小鼠脑组织能量代谢水平,改善能量代谢障碍AD小鼠脑内内质网应激^[17,38]。与前述结果一致,本研究显示地黄饮子可以通过保护AD小鼠脑内星形胶质细胞及其糖酵解作用,改善AD小鼠的学习记忆能力。

综上所述,本研究使用APP/PS1转基因AD小鼠模型,证实地黄饮子可以改善AD小鼠空间学习记忆能力,保护星形胶质细胞形态异常,其作用机制与PI3K/Akt信号通路激活,及其下游糖酵解相关酶PFK-1、ALDH3B2的表达上调和改善糖酵解作用有关,其中涉及的关于地黄饮子量效关系需要在将来的研究中进一步探索。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] KNOPMAN D S, AMIEVA H, PETERSEN R C, et al. Alzheimer disease [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1):33.
- [2] 胡世莲,王静,方向,等. 中国居民主要致死性慢性病的人口死亡趋势及应对策略[J]. 中国临床保健杂志, 2022, 25(3):297-302.

- [3] 王亚鑫,赵丽. 星形胶质细胞有氧糖酵解及其产物乳酸在阿尔茨海默病突触可塑性中的作用[J]. 生命科学,2022,34(9):1126-1134.
- [4] 赵娜,夏杰,张晨斐,等. 运动裨益AD的机制:大脑糖代谢紊乱和特征性病理症状的协同改善[J]. 中国体育科技,2022,doi:10.16470/j.csst.2021080.
- [5] 龙清熙,张萍淑,刘青,等. 单细胞RNA测序揭示星形胶质细胞的异质性[J]. 中国组织工程研究,2022,doi:10.16470/j.csst.2021080.
- [6] 张杰,周媛,马云枝,等. 基于PI3K/Akt/mTOR通路探讨补肾通络方对血管性痴呆大鼠海马神经元突触可塑性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(18):25-31.
- [7] FU W, JHAMANDAS J H. Role of astrocytic glycolytic metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis [J]. *Biogerontology*, 2014, 15 (6) : 579-586.
- [8] ANDERSEN J V, SKOTTE N H, CHRISTENSEN S K, et al. Hippocampal disruptions of synaptic and astrocyte metabolism are primary events of early amyloid pathology in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12 (11):954.
- [9] ZHENG J, XIE Y, REN L, et al. GLP-1 improves the supportive ability of astrocytes to neurons by promoting aerobic glycolysis in Alzheimer's disease [J]. *Mol Metab*,2021,47:101180.
- [10] 薛静,赵迪,王丽晔,等. 地黄饮子对多系统萎缩、阿尔茨海默病及帕金森病同治机制初探[J]. 现代中西医结合杂志,2022,31(11):1577-1582.
- [11] 张秀芬,王思梦,白建英,等. 经典名方地黄饮子的古代文献考究[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(14):59-64.
- [12] 关慧波,周妍妍,徐丽,等. 地黄饮子对转基因果蝇AD模型mTOR信号通路中4E结合蛋白和p70核糖体S6蛋白激酶表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2015,30(2):531-533.
- [13] 宋志勇,穆亚敏. 地黄饮子对阿尔茨海默病模型小鼠海马组织氧化应激及炎症因子表达的影响[J]. 吉林医学,2022,43(10):2597-2600.
- [14] 马涛,徐世军,闫妍,等. 地黄饮子对阿尔茨海默病小鼠神经炎症损伤的改善作用[J]. 成都中医药大学学报,2015,38(4):23-25,33.
- [15] 马涛,闫妍,张允岭,等. 补肾填精法对阿尔茨海默病小鼠PI3K/Akt通路激活及氧化应激的影响[J]. 北京中医药,2014,33(7):492-495.
- [16] HAN G, ZHEN W, DAI Y, et al. Dihuang-Yinzi alleviates cognition deficits via targeting energy-related metabolism in an Alzheimer mouse model as demonstrated by integration of metabolomics and network pharmacology [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022,14:873929.
- [17] 温彬宇,张志辰,高俊峰,等. 地黄饮子抑制能量障碍诱导的APP/PS1小鼠内质网应激及神经元凋亡的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(21):111-117.
- [18] 崔远武,张玉莲. 中医对老年性痴呆的认识和辨证思路分析[J]. 中国老年学杂志,2015(5):1419-1422.
- [19] 金香兰. 阿尔茨海默病的中医中药治疗[J]. 家庭医学(下),2022(10):16-17.
- [20] 车晶晶,谢淑莹,晏敏,等. 益气补肾活血方药治疗阿尔兹海默病效果的Meta分析[J]. 中国中医药现代远程教育,2023,21(4):56-59.
- [21] 李辉,蒋与刚. 阿尔茨海默病脑组织能量代谢紊乱及其机制[J]. 生理科学进展,2022,53(4):276-280.
- [22] 王倩倩,王莹莹,韩笑,等. 能量代谢在阿尔茨海默病发生和防治中的作用[J]. 郑州大学学报:医学版,2022,57(1):50-56.
- [23] 卢彦宇,方梓庄,范洋溢,等. 阿尔茨海默病发病机制与药物治疗研究进展[J]. 生理科学进展,2022,doi:10.20059/j.cnki.pps.2022.11.0095.
- [24] FALKOWSKA A, GUTOWSKA I, GOSCHORSKA M, et al. Energy metabolism of the brain, including the cooperation between astrocytes and neurons, especially in the context of glycogen metabolism [J]. *Int J Mol Sci*,2015,16(11):25959-25981.
- [25] 张敏,宋伦. 脑能量代谢:星形胶质细胞-神经元耦合[J]. 生物技术通讯,2020,31(4):473-477.
- [26] MERLINI M, MEYER E P, ULMANN-SCHULER A, et al. Vascular β -amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcA β mice [J]. *Acta Neuropathol*,2011,122(3):293-311.
- [27] LI K Y, GONG P F, LI J T, et al. Morphological and molecular alterations of reactive astrocytes without proliferation in cerebral cortex of an APP/PS1 transgenic mouse model and Alzheimer's patients [J]. *Glia*,2020,68(11):2361-2376.
- [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.
- [29] 彭俊,张杰. 中医药通过PI3K/Akt信号通路防治阿尔茨海默病的研究进展[J]. 中医药导报,2022,28(9):105-109.
- [30] FUHRMANN D C, BRÜNE B. miR-193a-3p increases

- glycolysis under hypoxia by facilitating Akt phosphorylation and PFKFB3 activation in human macrophages[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(2):89.
- [31] LE DOUCE J, MAUGARD M, VERAN J, et al. Impairment of glycolysis-derived l-serine production in astrocytes contributes to cognitive deficits in Alzheimer's disease [J]. *Cell Metab*, 2020, 31(3):503-517.
- [32] HU X, XU Q, WAN H, et al. PI3K-Akt-mTOR/PFKFB3 pathway mediated lung fibroblast aerobic glycolysis and collagen synthesis in lipopolysaccharide-induced pulmonary fibrosis [J]. *Lab Invest*, 2020, 100(6):801-811.
- [33] BÉLANGER M, YANG J, PETIT J M, et al. Role of the glyoxalase system in astrocyte-mediated neuroprotection[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(50):18338-18352.
- [34] 李金桂. 地黄饮子治疗老年性痴呆症疗效观察[J]. *内蒙古中医药*, 2012, 31(22):18-19.
- [35] 贾茜, 罗海, 许微微, 等. 地黄饮子加减治疗阿尔茨海默病的疗效观察[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2018, 18(4):499-500, 503.
- [36] 汪庆华. 地黄饮子治疗老年性痴呆症的临床效果分析[J]. *中外医疗*, 2017, 36(34):177-179.
- [37] 王凯, 崔远武, 徐家淳, 等. 从肾论治阿尔茨海默病的中药研究进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31(12):1749-1752.
- [38] 高俊峰, 张志辰, 温彬宇, 等. 地黄饮子对能量障碍致SH-SY5Y细胞内质网应激的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(21):118-123.

[责任编辑 周冰冰]