

锁阳提取物对阿尔茨海默病模型小鼠认知功能障碍的影响研究

柴晓盈¹,任琪²,张剑平³,吴丽娥¹,贾建新³

摘要 目的 基于网络药理学及动物实验探讨锁阳提取物对阿尔茨海默病(AD)模型小鼠认知功能障碍的影响。

方法 利用网络药理学预测锁阳提取物改善 AD 的相关靶点及信号通路;以快速老化小鼠(SAMP8)为 AD 模型,基于前期预实验结果,选取 0.17 g/(kg·d)为锁阳提取物最佳给药剂量,根据分组分别给予锁阳提取物[0.17 g/(kg·d)]、盐酸多奈哌齐[2.0 mg/(kg·d)]及生理盐水等体积灌胃 28 d;Morris 水迷宫评价动物学习认知功能;尼氏染色观察海马回 1 区(CA1)神经元形态数量;免疫组织化学法染色检测自噬效应蛋白(Beclin-1)、选择性自噬接头蛋白(p62)、微管相关蛋白轻链 3(LC-3)蛋白表达情况;蛋白质印迹法(Western blot)检测各组小鼠海马区磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)、糖原合成酶激酶 3β(GSK-3β)蛋白表达水平。**结果** 基于网络药理学研究,预测锁阳改善 AD 的生物机制可能为自噬的调节,可能的信号通路为 PI3K/AKT/GSK-3β;动物实验结果显示,锁阳提取物能够改善 AD 模型小鼠的空间记忆学习能力,改善海马神经元细胞损伤状况,明显增加神经元细胞数量,提高小鼠海马 PI3K、p-AKT/AKT、Beclin-1、LC3 表达水平,降低 p-GSK-3β/GSK-3β、p62 表达水平。且上述实验过程中雌雄小鼠未见明显差异。**结论** 锁阳提取物可能通过激活 PI3K-AKT-GSK-3β 信号通路介导的自噬作用改善雌雄 AD 模型小鼠的认知功能障碍,且作用无明显性别差异。

关键词 锁阳;阿尔茨海默病;网络药理学;自噬;PI3K-AKT-GSK-3β 信号通路

中图分类号 R 741.05

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)05-0780-09
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.006

2023-12-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81860215);内蒙古自治区高等学校“青年科技英才支持计划”(编号:NJYT-20-A08)

作者单位:¹ 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院神经内科,包头 014010

² 内蒙古科技大学包头医学院,包头 014040

³ 内蒙古科技大学包头医学院人体解剖教研室,包头 014040

作者简介:柴晓盈,女,硕士研究生;

吴丽娥,女,教授,主任医师,研究生导师,责任作者,E-mail:dx6917@163.com;

贾建新,男,教授,研究生导师,责任作者,E-mail:jjianxin@163.com

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一种以神经细胞外 Aβ 斑块沉积形成老年斑及神经细胞内 Tau 蛋白过度磷酸化导致的神经元纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT)为主要病理学特征的神经退行性疾病^[1],目前中国的 AD 患者已超 700 万例,占世界痴呆总人数的 1/5^[2]。预计到 2050 年,中国 AD 的患者数量可达 3 003 万例,其带来的社会经济负担同年可高达 9.12 亿美元^[3],寻找积极有效的治疗方法是目前 AD 研究的热点问题。

锁阳是一种重要的抗记忆障碍中草药,可用于改善包括轻度记忆障碍、痴呆等在内的衰老症状^[4]。近年来,锁阳已被证实可通过抗胆碱能、抗氧化应激、调节肠道菌群紊乱、类雌激素等多种作用改善 AD 认知功能。但其对 AD 的作用是否存在性别差异及相关通路机制尚不明确。该研究基于网络药理学筛选锁阳提取物对 AD 的作用途径,通过动物实验进行证实,并探究其作用是否存在性别差异,以为锁阳改善 AD 认知障碍的机制研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 网络药理学分析

1.1.1 锁阳活性成分及对应靶点的搜集与筛选

通过 SYMmap 数据库(<http://www.symmap.org/>)、Herb 数据库(<http://herb.ac.cn/>)搜集锁阳有效成分,同时,运用 pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得化合物获得其简化分子线性输入规范(simplified molecular input line entry system, SMILES),导入 SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)数据库预测其有效靶点。

1.1.2 AD 靶点的搜集与筛选 通过在 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、OMIM(<https://www.omim.org/>)数据库中输入关键词“Alzheimer”进行检索,剔除重复基因,得到 AD 的相关疾病靶点。

1.1.3 交集靶点的获取 利用 Venny(<https://bioinfopg.cnb.csic.es/tools/venny/>)软件获取锁阳活性成分与 AD 的交集靶点,作为锁阳治疗 AD 的潜在关键靶点。

1.1.4 “成分-靶点-疾病”网络分析 准备锁阳有效成分、AD 及交集靶点做成“network”文件和 Type 文件,运用 Cytoscape 3.10.0 软件,导入相关文件,进行网络拓扑学分析,构造“中药成分-靶点-疾病”网络图。

1.1.5 蛋白互作网络 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建及网络拓扑分析 通过 STRING (<https://string-db.org/>) 平台,导入交集基因得到蛋白互作关系,结果导入 Cytoscape 3.10.0 软件中,选择“network Analyzer”,得到网络拓扑学参数。将制表符分隔值 (tab separated values, TSV) 文件导入 Cytoscape 软件做 PPI 图,根据平均度值选取前 10 作为核心靶点。

1.1.6 基因本体论 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析 利用 David (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库对其进行生物学过程的 GO、KEGG 功能富集分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,并通过微生信平台进行可视化显示。

1.2 动物实验

1.2.1 实验动物 7 月龄 SPF 级快速老化小鼠 (senescence accelerated mice P8, SAMP8) 雌雄各 36 只,购自北京大学医学部 (实验动物科学部),动物许可证号:SCXK(京)2016-0010。饲养于清洁环境,小鼠体质量控制于 (35 ± 5) g,环境温度控制在 (24 ± 1) °C,湿度控制在 (50 ± 5) %,自由进食水。已经由包头医学院动物伦理审查,批准号:202350。

1.2.2 药品与试剂 锁阳提取物购自陕西新天域生物科技有限公司,水溶性提取物,主要成分包括花色甙 (anthocyanin)、三萜皂甙 (triterpenoid saponins)、鞣质 (tannin)、胡萝卜甙 (daucosterol)、 β -谷甾醇 (β -sitosterol)、熊果酸 (ursolic acid)、儿茶素 (catechin)、没食子酸 (gallic acid) 等,批号:XTY2022-1015;磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 抗体 (批号:AF6241),蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 抗体 (批号:AF0016),p-AKT 抗体 (批号:AF6261) 均购自武汉亲科生物研究中心有限公司,均为兔抗,蛋白质印记法 (Western blot) 工作浓度均为 1 : 1 000;糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β) 抗体 (批号:T40069)、p-GSK-3 β 抗体 (批号:T40070) 均购自上海 Abmart 公司,均为兔抗,Western blot 工作浓度均为 1 : 1 000;甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号:52902) 购自美

国 SAB 公司,来源为兔抗,Western blot 工作浓度为 1 : 5 000;山羊抗兔二抗 (批号:S0001) 购自武汉亲科生物研究中心有限公司,Western blot 工作浓度为 1 : 3 000;微管相关蛋白轻链 3 β (microtubule-associated protein 1 light chain 3 β , LC3B) 抗体 (批号:27524),选择性自噬接头蛋白 (selective autophagy adaptor protein, p62) 抗体 (批号:31319),自噬效应蛋白 (autophagy-related protein, Beclin 1) 抗体 (批号:30900),均购自美国 SAB 公司,来源均为兔抗,免疫组织化学染色工作浓度均为 1 : 100。

1.2.3 动物分组与给药 将 36 只雄性小鼠随机分为以下 3 组 (12 只/组):空白对照组、多奈哌齐组 [2.0 mg/(kg·d)]、锁阳提取物组 [0.17 g/(kg·d)],空白对照组动物给予同样体积生理盐水灌胃。上述给药组连续给药 28 d。调整各给药组药液浓度,保证动物灌胃量均为 0.2 ml/d。36 只雌性小鼠分组及处理同上。锁阳提取物灌胃剂量由前期预实验结果得出,预实验雌雄小鼠各自分为锁阳高剂量组 [0.4 g/(kg·d)]、锁阳中剂量组 [0.17 g/(kg·d)]、锁阳低剂量组 [0.09 g/(kg·d)] 3 组进行灌胃给药,观察各组小鼠 Morris 水迷宫行为学及尼氏染色表现情况,其中锁阳中剂量组 [0.17 g/(kg·d)] 雌雄两组小鼠的空间记忆能力及海马区神经损伤改善情况最为显著,选其作为锁阳最佳给药浓度。

1.2.4 Morris 水迷宫测试 小鼠给药完毕后,开始水迷宫实验。实验开始前一天小鼠适应环境,保证水池水温保持在 (24 ± 2) °C,前 5 d 进行定位航行实验,放置平台,划分 4 个象限,每早 8 时开始各组小鼠从第一象限开始依次背对水池入水,直至 4 个象限全部训练完毕,记录各小鼠逃避潜伏期即动物下水到登陆平台时间等指标。第 6 天进行空间探索实验,撤去平台,仅从平台对侧象限依次背对水池入水,记录各小鼠逃避潜伏期即小鼠下水到第一次到达平台所在区域时间、穿越平台次数等指标。

1.2.5 组织准备 每组随机选取 6 只小鼠进行腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠溶液 (0.15 ml/10 g) 麻醉,麻醉完全后,暴露心脏,灌注生理盐水至血液大致流尽、肝脏血色消失,继续以 4% 多聚甲醛灌注,至小鼠颈部及四肢僵硬、肝脏质地变硬后,取出全脑组织保存于 4% 多聚甲醛溶液,24 h 后进石蜡包埋,石蜡切片,切片厚度为 6 μ m,剩余每组 6 只小鼠生理盐水灌注后即取脑,冰上剥离海马,海马保存于 -80 °C 冰箱。

1.2.6 尼氏染色实验 石蜡切片置于 64 °C 烘箱烘

烤 30 min 后,浸泡于二甲苯进行脱蜡,后梯度乙醇脱水,蒸馏水冲洗,浸泡入现配的甲苯胺染液,放置于 64 °C 烘箱染色 30 min。95% 乙醇室温分化至镜下观察背景变透明即停止分化,无水乙醇浸泡数分钟,注意观察以免过度脱色,二甲苯 I、II 各浸泡 15 min,封片,晾干后 200 倍显微镜下观察海马回 1 区 (cornu ammonis 1, CA1) 神经元形态并用 Image J 软件进行完整锥体细胞计数。

1.2.7 免疫组织化学染色实验 64 °C 烘烤 30 min,二甲苯溶液常规脱蜡,梯度乙醇脱水,枸橼酸盐缓冲液行抗原修复,内源性过氧化物酶室温孵育 10 min,滴加一抗,4 °C 孵育过夜,反应增强液 37 °C 烘箱孵育 25 min,滴加二抗,37 °C 烘箱孵育 25 min,配制二氨基苯联胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色液,显色,苏木精复染,常规脱水透明,封片,400 倍显微镜下观察并采集图片,所得图片用 Image-Pro Plus 软件进行定量分析,以选定区域积累吸光度值/选定目标区域分布面积计算得出平均吸光度值。

1.2.8 Western blot 实验 小鼠海马加入蛋白裂解液研磨,冰上裂解 30 min,低温离心机 4 °C 离心 15 min (12 000 r/min),酶标仪检测蛋白浓度,制样,100 °C 变性 5 min,保存于 -20 °C 冰箱,余样品保存于 -80 °C。制备十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺 (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶,上样,80 V 恒压电泳 60 min,转为 120 V 恒压电泳 80 min。300 mA 恒流转膜 130 min,室温牛奶封闭 2 h,洗涤缓冲液 (tris buffered saline with tween 20, TBST) 洗,裁条带,一抗 4 °C 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h, TBST 洗,配制发光液,曝光,利用 Image J 软件分析灰度值,计算 PI3K/GAPDH、p-AKT/AKT、p-GSK-3 β /GSK-3 β 3 组数据的比值,作为评价 PI3K、AKT、GSK-3 β 蛋白表达的指标。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析并作图。定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数两两比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

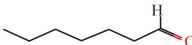
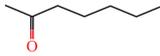
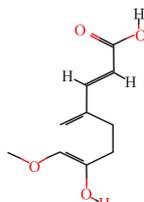
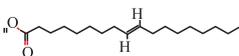
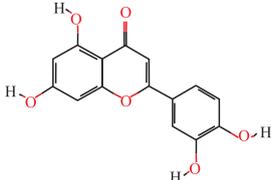
2 结果

2.1 网络药理学结果

2.1.1 锁阳有效成分作用靶点 AD 疾病交集靶点的获取 通过 SYMmap 数据库、Herb 数据库搜集锁阳成分,筛选口服利用度 (oral availability, OB) $\geq 30\%$,符合类药性 5 规则的成分作为有效成分。共

得到 6 种有效成分见表 1。通过检索 SwissTarget-Prediction 数据库预测锁阳有效靶点,共得到 212 个有效靶点。通过检索 GeneCards、OMIM 数据库得到 AD 相关靶点,剔除重复基因,共得到有效靶点 9 300 个。通过构建 Venn 图预测锁阳有效成分及 AD 共有靶点。得到锁阳对应的 212 个靶基因与 AD 相关的 9 300 个靶基因相互映射,得到交集基因 177 个,见图 1。

表 1 锁阳有效成分

化合物	分子式	OB score	结构式
N-Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	79.735 2	
Acetic Acid	C ₂ H ₄ O ₂	47.865 2	
2-Heptanone	C ₇ H ₁₄ O	46.561 8	
Ferulic Acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	40.434 3	
9-Octadecenoic Acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	39.773 2	
Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	36.162 6	

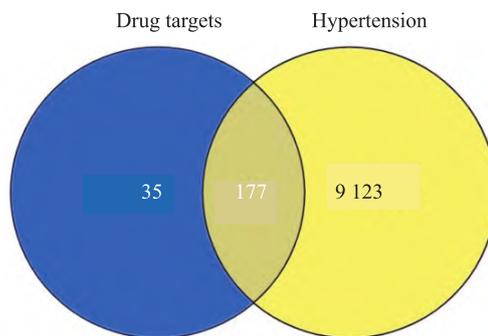


图 1 “锁阳 - 阿尔茨海默病”交集基因 Venn 图

2.1.2 构建“药物活性成分 - 疾病 - 靶点”及 PPI 网络 运用 Cytoscape 软件,导入相关文件构建“药物活性成分 - 疾病 - 靶点”网络图。结果可见一个靶点可与多个锁阳活性成分相对应,同时一个活性

成分也可对应多个靶点,展现出锁阳多成分、多靶点治疗 AD 的优点,见图 2。于 STRING 平台导入交集基因,得到蛋白互作关系,结果导入 Cytoscape 软件中制作 PPI 图,根据平均度值筛选前 10 核心靶点见图 3。

2.1.3 锁阳治疗 AD 的核心靶点 GO 富集分析
KEGG 富集分析结果 利用 David 数据库进行 GO、KEGG 富集分析。GO 富集分析生物过程 (biological process, BP) 共收集 3 998 个,其中自噬的调节 (regulation of autophagy) 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。KEGG 富集 252 个通路,其中 PI3K-AKT 信号通路 & AD 密切相关,此通路内富集 AKT1、PIK3R1、GSK3B

等靶点。将 GO 富集分析排名前 10 的生物过程、分子功能、细胞组分见图 4 及 KEGG 排名前 10 的通路见图 5 可视化。

2.2 动物实验结果

2.2.1 Morris 水迷宫测试结果 定位航行实验中,与空白对照组 (雄) 相比,第 3 天、第 4 天、第 5 天锁阳提取物组 (雄) 及多奈哌齐组 (雄) 的逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$)。与空白对照组 (雌) 相比,第 3 天、第 4 天、第 5 天锁阳提取物组 (雌) 及多奈哌齐组 (雌) 的逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$),但雌雄两组小鼠互相比差异无统计学意义。空间探索实验,与空白对照组 (雄) 相比,锁阳提取物组 (雄) 及

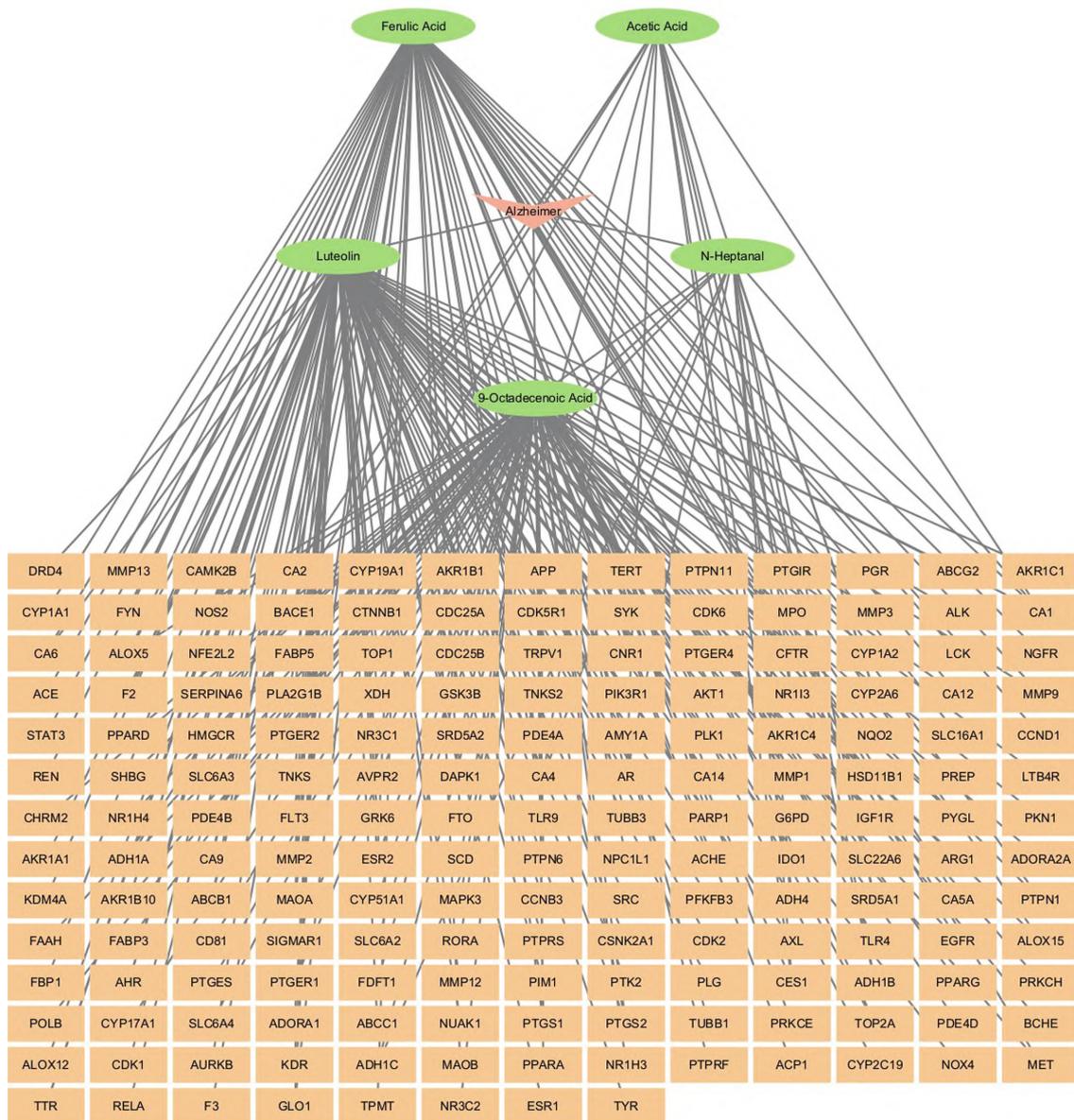


图 2 “药物活性成分-疾病-靶点”网络图

黄色长方形:核心靶点;红色三角:阿尔茨海默病;绿色椭圆形:锁阳活性成分;边:节点间的作用关系

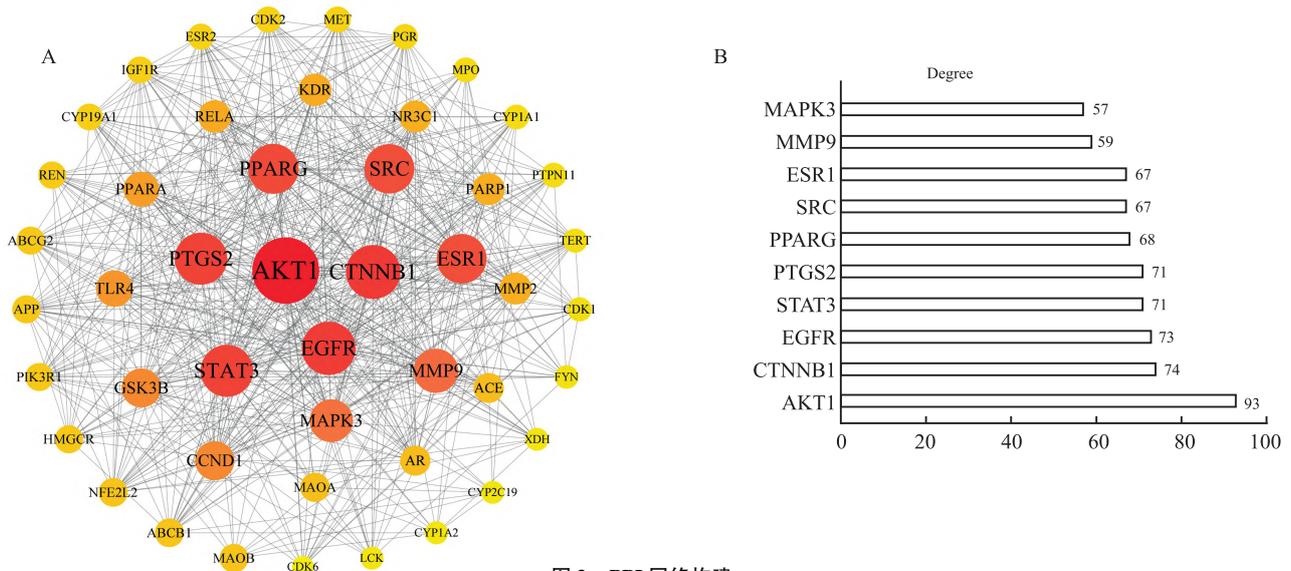


图3 PPI网络构建

A: PPI网络图; B:核心靶点表

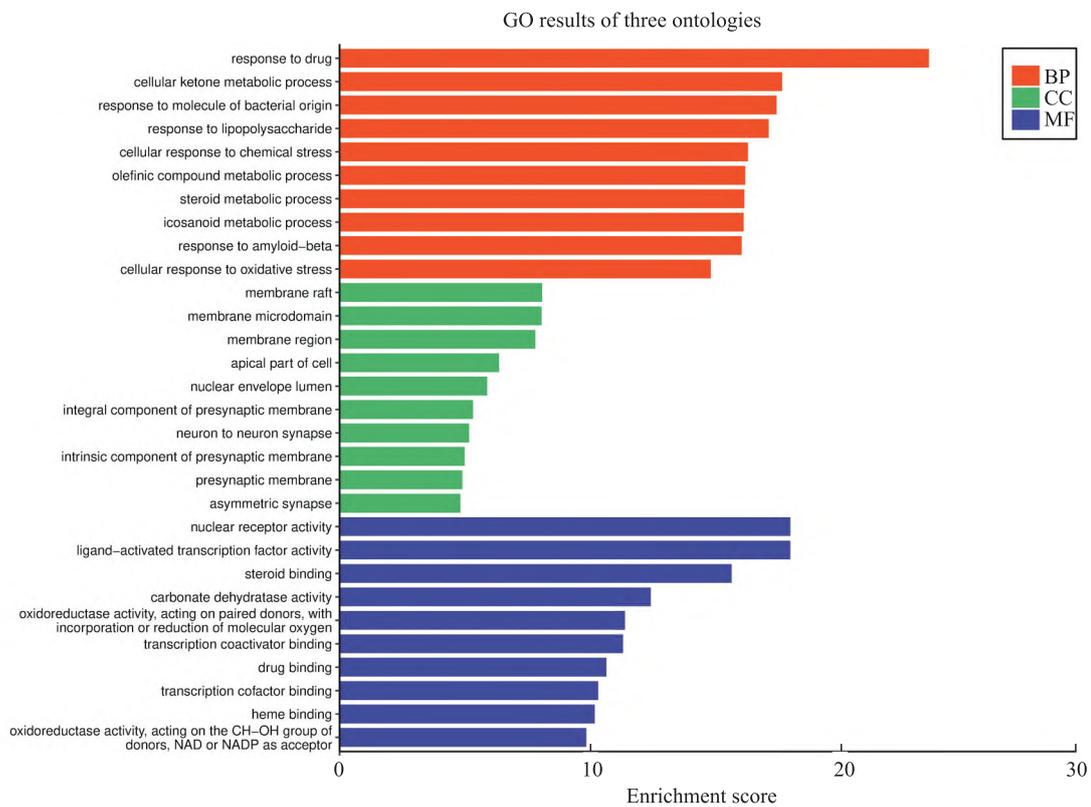


图4 GO富集分析条形图

多奈哌齐组(雄)穿越平台次数显著增加($P < 0.05$),潜伏期显著缩短($P < 0.05$),雌性组表现同雄性组,雌雄两组小鼠互相比差异无统计学意义。见图6。

2.2.2 各组小鼠海马CA1区神经元形态及数量比较 空白对照组(雄)海马CA1区神经元细胞排列松散,镜下可见大量变性坏死,神经元细胞严重缺

失。锁阳提取物组(雄)及多奈哌齐组(雄)海马CA1区细胞排列较为紧密,少有细胞坏死见图7。与空白对照组(雄)相比,锁阳提取物组(雄)及多奈哌齐组(雄)海马CA1区神经元数目明显增多,且差异有统计学意义($P < 0.01$)。雌性小鼠组尼氏染色表现同雄性小鼠组,且雌雄两组小鼠互相比差异无统计学意义。见图8。

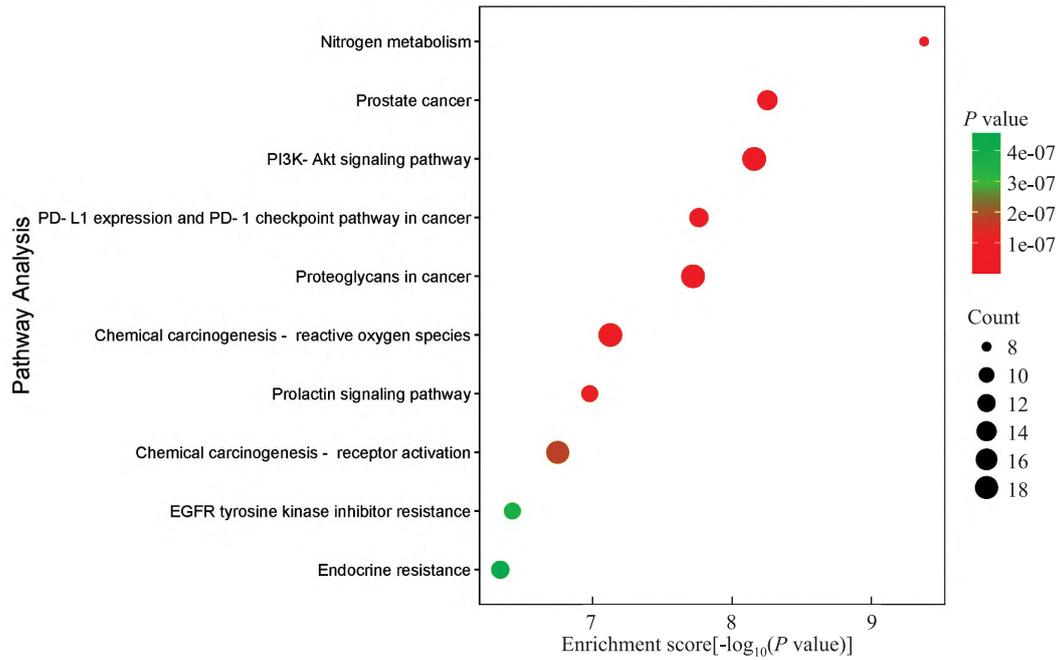


图5 KEGG 富集分析气泡图

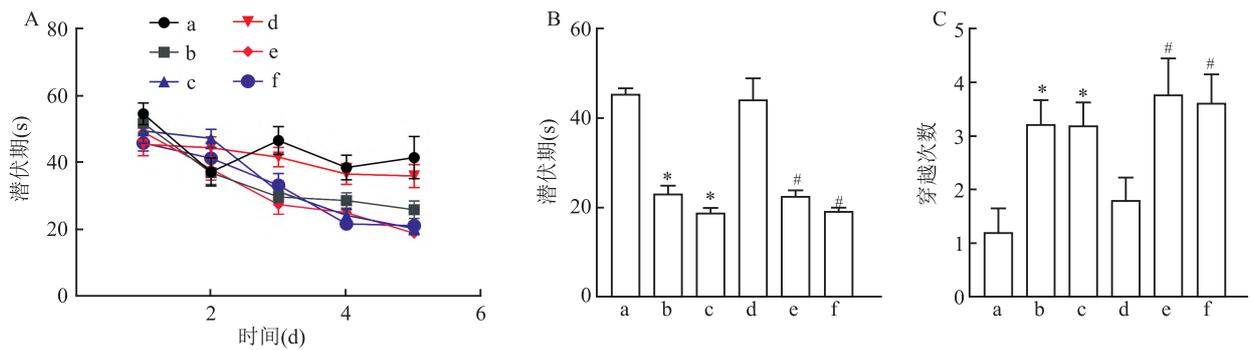


图6 锁阳提取物对 AD 模型小鼠空间记忆能力的影响 (n = 12)

A: 定位航行实验前 5 d 各组小鼠逃避潜伏期变化曲线; B: 空间探索实验各组小鼠潜伏期; C: 空间探索实验各组小鼠穿越平台次数; a: 空白对照组 (雄); b: 锁阳提取物组 (雄); c: 多奈哌齐组 (雄); d: 空白对照组 (雌); e: 锁阳提取物组 (雌); f: 多奈哌齐组 (雌); 与空白对照组 (雄) 比较: * $P < 0.05$; 与空白对照组 (雌) 比较: # $P < 0.05$

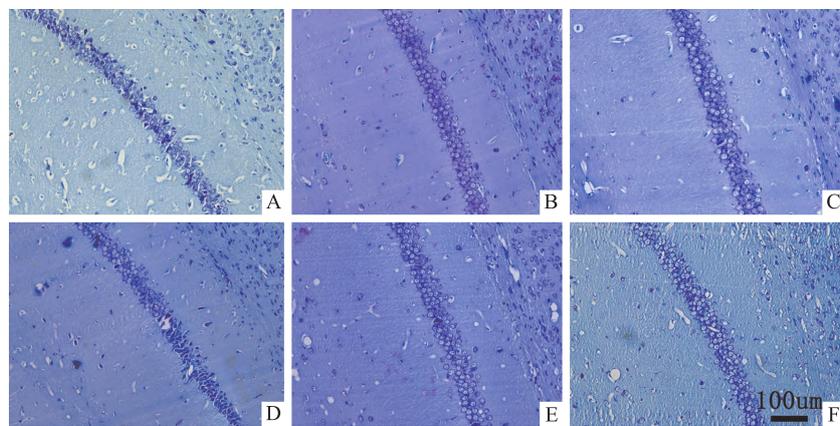


图7 各组小鼠海马 CA1 区锥体细胞比较 (n = 6) 尼氏染色 ×200

A: 空白对照组 (雄); B: 锁阳提取物组 (雄); C: 多奈哌齐组 (雄); D: 空白对照组 (雌); E: 锁阳提取物组 (雌); F: 多奈哌齐组 (雌)

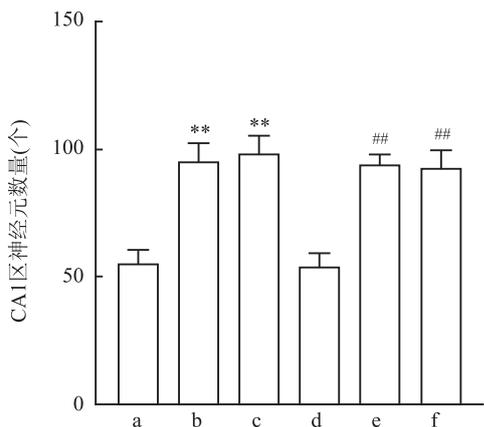


图8 各组小鼠海马 CA1 区神经元数量比较 (n=6)

a: 空白对照组(雄); b: 锁阳提取物组(雄); c: 多奈哌齐组(雄); d: 空白对照组(雌); e: 锁阳提取物组(雌); f: 多奈哌齐组(雌); 与空白对照组(雄)比较: ** P < 0.01; 与空白对照组(雌)比较: ## P < 0.01

2.2.3 各组小鼠海马 Beclin-1、p62、LC-3 蛋白表达比较 免疫组化结果显示,与空白对照组(雄)相比,锁阳提取物组(雄)及多奈哌齐组(雄)小鼠海马中 Beclin-1 与 LC-3 蛋白表达明显增多,p62 蛋白表达明显减少,且差异有统计学意义(P < 0.01)。雌性组小鼠表现同雄性组小鼠,且雌雄两组小鼠互相比差异无统计学意义。见图 9、10。

2.2.4 各组小鼠海马 PI3K、p-AKT/AKT、p-GSK-

3β/GSK-3β 蛋白表达比较 Western blot 结果显示,与空白对照组(雄)相比,锁阳提取物组(雄)及多奈哌齐组(雄)小鼠海马 PI3K、p-AKT/AKT 蛋白表达明显增多,p-GSK-3β/GSK-3β 蛋白表达明显减少,且差异有统计学意义(P < 0.01)。雌性组小鼠表现同雄性组小鼠,且雌雄两组小鼠互相比差异无统计学意义。见图 11。

3 讨论

通过网络药理学预测锁阳提取物改善 AD 的相关靶点及可能信号通路,并对 AD 模型小鼠作用是否存在性别差异及预测所得通路机制进行实验研究。网络药理学 GO 富集分析得出自噬的调节过程差异有统计学意义。维持正常的自噬水平对神经元的正常代谢有重要意义,自噬活性降低会导致有害蛋白质聚集并积累受损的线粒体,从而导致氧化应激、细胞死亡和神经变性,而适当的自噬可减少 Aβ 聚集,改善神经变性,因而维持自噬水平的稳定是目前治疗 AD 的研究热点[5]。网络药理学 KEGG 富集分析得到 PI3K-AKT 信号通路与 AD 密切相关。其参与细胞存活、神经元增殖分化、突触可塑性等一系列中枢神经系统生理过程,并参与 AD 老年斑及神经原纤维缠结的形成。激活该通路可保护神经元,抵抗 Aβ 诱发的神经毒性,其下游的各种靶点也与

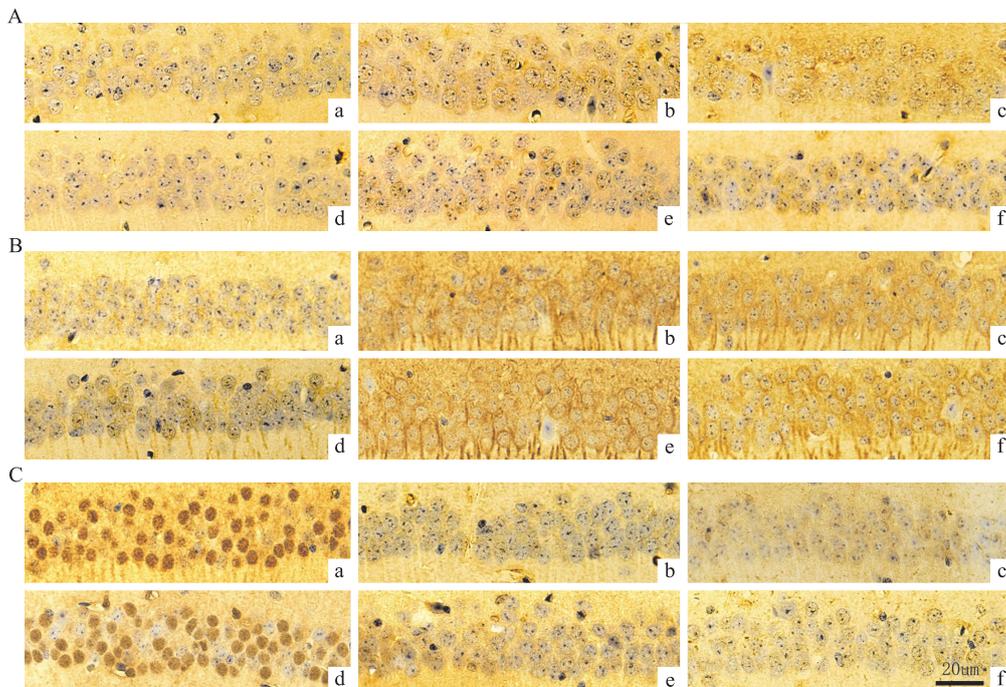


图9 各组小鼠海马 Beclin-1、p62、LC-3 蛋白表达比较 (n=6) ×400

A: Beclin-1 阳性表达; B: LC3 阳性表达; C: p62 阳性表达; a: 空白对照组(雄); b: 锁阳提取物组(雄); c: 多奈哌齐组(雄); d: 空白对照组(雌); e: 锁阳提取物组(雌); f: 多奈哌齐组(雌)

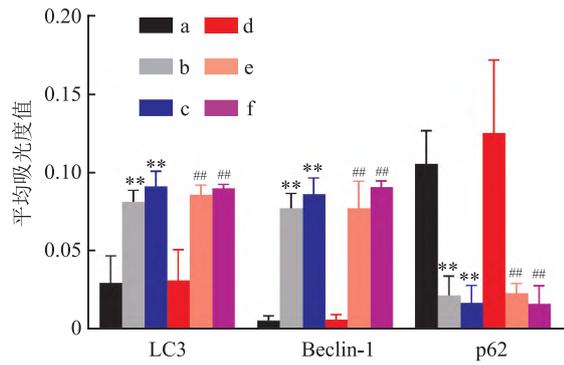


图 10 各组小鼠海马 Beclin-1、p62、LC-3 蛋白表达比较($n=6$)

a: 空白对照组(雄); b: 锁阳提取物组(雄); c: 多奈哌齐组(雄); d: 空白对照组(雌); e: 锁阳提取物组(雌); f: 多奈哌齐组(雌); 与空白对照组(雄)比较: ** $P < 0.01$; 与空白对照组(雌)比较: ## $P < 0.01$

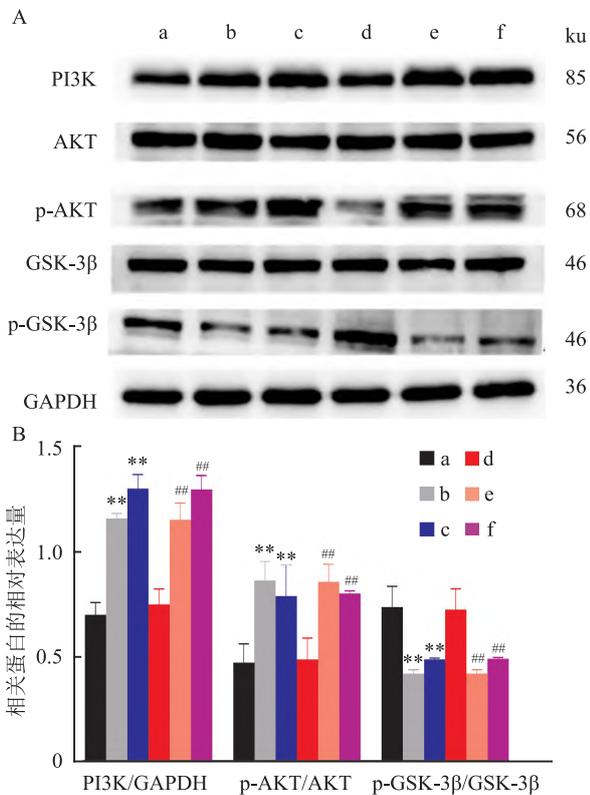


图 11 各组小鼠海马 PI3K、p-AKT/AKT、p-GSK-3β/GSK-3β 蛋白表达比较($n=6$)

A: 各组小鼠蛋白表达条带图; B: 相关蛋白相对表达量; a: 空白对照组(雄); b: 锁阳提取物组(雄); c: 多奈哌齐组(雄); d: 空白对照组(雌); e: 锁阳提取物组(雌); f: 多奈哌齐组(雌); 与空白对照组(雄)比较: ** $P < 0.01$; 与空白对照组(雌)比较: ## $P < 0.01$

AD 有关^[6]。GSK-3 β 是一种组成型活性的丝氨酸/苏氨酸激酶,是 PI3K/AKT 信号通路下游的重要靶点,其活性的增加与 A β 生成和沉积的增加直接相关。PI3K 的激活使 AKT 构象发生变化,暴露磷酸

化位点,进而对下游的 GSK-3 β 进行负性调节,增强自噬活性,削弱 Tau 蛋白的过度磷酸化,抑制 NFT 形成^[7]。动物实验结果显示,水迷宫实验结果提示锁阳提取物可以改善 AD 模型小鼠的空间记忆认知功能;尼氏染色观察到锁阳提取物可以明显改善海马 CA1 区神经元损伤;同时与空白对照组比较,锁阳提取物组小鼠海马 PI3K、p-AKT/AKT、Beclin-1、LC3 表达水平明显升高,p-GSK-3 β /GSK-3 β 、p62 表达水平明显下降,这表明锁阳提取物可能通过激活 PI3K-Akt-GSK-3 β 信号通路介导的自噬作用改善 AD 模型小鼠的认知功能障碍。

AD 的发生和发展差异有统计学意义。在女性中,终生雌激素暴露量降低会增加 AD 风险,而在接近绝经期时给予雌激素治疗可降低 AD 风险。但在男性中,雌激素未表现出与年龄相关的降低,且与 AD 风险无显著相关性。相反,血浆和脑中与年龄相关的睾酮正常耗竭可预测 AD 的易感性增强^[8]。因此,研究药物作用的性别差异对疾病的精确治疗以及药物的高效利用有着重要作用。锁阳已被证实有植物雌激素^[9]及提高体内睾酮水平的功效^[10],了解锁阳提取物对 AD 作用的性别差异对药物的开发和利用有着重要的意义。下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴,可产生黄体生成素、促性腺激素释放激素和具有神经元受体的激活素,这些受体贯穿于不同细胞类型的边缘系统调节大脑的结构和功能,HPG 轴失调可通过各种信号通路促进神经元细胞结构和功能的改变^[11]。而女性 HPG 轴失调的发生率显著高于男性,这可能是女性 AD 发病率更高的原因^[12]。与年龄匹配的 SAMR1 小鼠相比,雌雄 SAMP8 小鼠的激素 HPG 轴均受到显著干扰,相关激素水平均明显下降^[13]。实验结果未发现锁阳提取物对 AD 模型小鼠认知障碍的作用存在明显性别差异,这或与锁阳提取物调节 HPG 轴失衡有关,其可能性及相关机制仍有待验证。

参考文献

- [1] Khan S, Barve K H, Kumar M S. Recent advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease [J]. Curr Neuropharmacol, 2020, 18(11): 1106-25.
- [2] Ren R, Qi J, Lin S, et al. The China Alzheimer report 2022 [J]. Gen Psychiatr, 2022, 35(1): e100751.
- [3] Zhang Y, Li Y, Ma L. Recent advances in research on Alzheimer's disease in China [J]. J Clin Neurosci, 2020, 81: 43-6.
- [4] 任梦云, 杨光, 杜乐山, 等. 药用植物锁阳的研究进展 [J]. 生

- 物学杂志,2018,35(5):95-8.
- [5] 周彦均,黄南渠,巴智胜,等. 自噬在阿尔兹海默病发病机制中的作用[J]. 中国实用神经疾病杂志,2019,22(12):1388-92.
- [6] Long H Z, Cheng Y, Zhou Z W, et al. PI3K/AKT signal pathway: A target of natural products in the prevention and treatment of Alzheimer's disease and Parkinson's disease[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 648636.
- [7] Dai S, Zhou F, Sun J, et al. NPD1 Enhances autophagy and reduces hyperphosphorylated tau and amyloid- β 42 by inhibiting GSK3 β activation in N2a/APP695swe cells[J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 84(2): 869-81.
- [8] Pike C J. Sex and the development of Alzheimer's disease[J]. *J Neurosci Res*, 2017, 95(1-2): 671-80.
- [9] 郑俊超,马素亚,于雪,等. 锁阳乙酸乙酯提取物的雌激素样作用研究[J]. 天然产物研究与开发,2016,28(11):1687-90.
- [10] 顾娟,厉振北,祁玉娟,等. 锁阳对少弱精大鼠模型精液质量及性激素水平的影响[J]. 当代医学,2021,27(13):14-6.
- [11] Ahmad M H, Fatima M, Mondal A C. Role of hypothalamic-pituitary-adrenal axis, hypothalamic-pituitary-gonadal axis and insulin signaling in the pathophysiology of Alzheimer's disease[J]. *Neuropsychobiology*, 2019, 77(4): 197-205.
- [12] Heck A L, Handa R J. Sex differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis' response to stress: An important role for gonadal hormones[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2019, 44(1): 45-58.
- [13] Ma Y, Zhou W X, Cheng J P, et al. Age-related changes in the oestrous cycle and reproductive hormones in senescence-accelerated mouse[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2005, 17(5): 507-12.

Study on the effects of extracts from *Cynomorium songaricum* on cognitive dysfunction of Alzheimer's disease model mice

Chai Xiaoying¹, Ren Qi², Zhang Jianping³, Wu Li'e¹, Jia Jianxin³

(¹Dept of Neurology, The First Affiliated Hospital, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010; ²Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040; ³Dept of Human Anatomy, Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040)

Abstract Objective To investigate the effects of *Cynomorium songaricum* extract on cognitive dysfunction of Alzheimer disease (AD) model mice based on network pharmacology and animal experiments. **Methods** Network pharmacology was used to predict the related targets and signal pathways of the extract of *Cynomorium songaricum* to improve AD. Senescence accelerated mice P8 (SAMP8) were selected as the model of AD. Based on the results of the preliminary experiment, 0.17 g/(kg·d) was selected as the optimal dosage for the extract of *Cynomorium songaricum*. The extract of *Cynomorium songaricum* [0.17 g/(kg·d)], Donepezil hydrochloride [2.0 mg/(kg·d)] and normal saline were given orally for 28 days according to the groups. Morris water maze evaluated the learning and cognitive function of animals. The number of neurons in cornu ammonis 1 (CA1) of hippocampus was observed by Nissl staining. The expression of recombinant Beclin 1 (Beclin-1), Sequestosome 1 (p62), light chain 3 (LC-3) protein was detected by immunohistochemical method. The protein expression levels of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), protein kinase B (AKT) and glycogen synthase kinase3 β (GSK-3 β) in the hippocampus of mice in each group were detected by Western blot. **Results** Based on the network pharmacology study, it was predicted that the biological mechanism of *Cynomorium songaricum* to improve AD might be the regulation of autophagy, and the possible signaling pathway was PI3K/AKT/GSK-3 β . The results of animal experiments showed that the extract of *Cynomorium songaricum* could improve the spatial memory learning ability of AD model mice, improve the damage of hippocampal neurons, significantly increase the number of neurons, and increase the expression levels of PI3K, p-AKT/AKT, p-GSK-3 β /GSK-3 β , Beclin-1 and LC3 in the hippocampus of mice. The expression level of p62 decreased. There was no significant difference between male and female mice during the experiment. **Conclusion** The extract may improve the cognitive dysfunction of male and female AD models by activating autophagy mediated by PI3K-AKT-GSK-3 β signaling pathway, and there is no significant gender difference in the effect. **Key words** *Cynomorium songaricum*; Alzheimer disease; network pharmacology; autophagy; PI3K-AKT-GSK-3 β signaling pathway