

# 红花黄色素通过调控谷氨酸循环改善 APP/PS1 小鼠学习记忆功能

辛贝贝<sup>1,2</sup>,陈浩然<sup>1,2</sup>,王妍又<sup>1,2</sup>,王亚茹<sup>1,2</sup>,曾杰<sup>1,2</sup>,杨梓悦<sup>1,2</sup>,刘秀明<sup>3</sup>,胡艳丽<sup>1,2\*</sup>

(1 石河子大学药学院,新疆石河子 832002;2 新疆植物药资源利用教育部重点实验室,新疆石河子 832002;  
3 石河子大学红花产业研究院,新疆石河子 832002)

**摘要:**目的 研究红花黄色素(Safflower yellow, SY)调节星形胶质细胞介导的谷氨酸循环在改善 APP/PS1 转基因阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)小鼠学习记忆能力中的作用。方法 选取6月龄 APP/PS1 小鼠24只,随机分为2组,即 Tg 组、Tg+SY 组。对照组选取同月龄 C57BL/6J 小鼠12只。给药后采用行为学实验评价阿尔茨海默病小鼠的学习记忆和认知能力;尼氏染色法观察小鼠脑组织尼氏小体数量;免疫组织化学法观察小鼠脑组织 A $\beta$  斑块沉积变化情况;生化试剂盒检测小鼠脑组织谷氨酸浓度;蛋白免疫印迹技术检测各组小鼠谷氨酸循环相关蛋白表达量。结果 与 Tg 组相比,Tg+SY 组小鼠学习记忆能力明显提高,尼氏小体数量显著增加,A $\beta$  阳性表达显著降低,脑组织谷氨酸浓度显著下降,谷氨酸循环相关蛋白 GS、EAAT1 的表达水平显著增加,GLS、NMDAR 2B 的表达水平显著下降。结论 SY 能显著改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力,其作用机制可能是通过改善谷氨酸循环系统,减少神经兴奋性毒性损伤,进而发挥神经保护作用。

**关键词:**红花黄色素;阿尔茨海默病;谷氨酸循环;谷氨酸;星形胶质细胞

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

## Safflower yellow improves learning and memory function in the APP/PS1 mice by regulating the glutamate cycle

XIN Beibei<sup>1,2</sup>, CHEN Haoran<sup>1,2</sup>, WANG Yanyou<sup>1,2</sup>, WANG Yaru<sup>1,2</sup>, ZENG Jie<sup>1,2</sup>, YANG Ziyue<sup>1,2</sup>,  
LIU Xiuming<sup>3</sup>, HU Yanli<sup>1,2\*</sup>

(1 Pharmacy College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002, China; 2 Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, Ministry of Education, Shihezi, Xinjiang 832002, China; 3 Institute for Safflower Industry Research, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role of Safflower yellow (SY) in regulating astrocyte-mediated glutamate cycle in improving learning and memory in APP/PS1 transgenic Alzheimer's disease (AD) mice. **Methods** 24 6-month-old APP/PS1 mice were selected and randomly divided into two groups, namely the Tg group and the Tg+SY group. For the control group, 12 age-matched C57BL/6J mice were chosen. After administration, behavioral experiments were used to evaluate the learning, memory and cognitive ability of Alzheimer's disease mice; Nissl staining was used to observe the number of Nissl bodies in mouse brain tissue; Immunohistochemistry was used to observe the changes of A $\beta$  plaque deposition in mouse brain tissue; The biochemical kit was used to detect the glutamate concentration in mouse brain tissue; The expression levels of glutamate cycle-related proteins in mice from each group were detected using the Western blotting technique. **Results** Compared with the Tg group, the learning and memory abilities of the Tg+SY group of mice were significantly improved, the number of Nissl bodies was significantly increased, the A $\beta$ -positive expression was significantly reduced, the concentration of glutamate in brain tissue was significantly decreased, the expression levels of glutamate cycle-related proteins GS and EAAT1 were significantly increased, and the expression levels of GLS and NMDAR 2B were significantly decreased. **Conclusion** SY can significantly improve the learning and memory abilities of APP/PS1 mice. The mechanism of action may be through

收稿日期:2025-08-11

基金项目:国家自然科学基金项目(82260712);新疆生产建设兵团指导性科技计划项目(2024ZD030)

作者简介:辛贝贝(1991—),女,硕士研究生,专业方向为神经药理学。

\*通信作者:胡艳丽(1976—),女,教授,博士生导师,从事神经药理学研究,e-mail:wzx330@163.com。

improving the glutamate cycle system, reducing the excitotoxic damage of neurons, and thus exerting a neuroprotective effect.

**Key words:** safflower yellow; Alzheimer's disease; glutamate cycle; glutamic acid; astrocytes

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种与年龄密切相关的,以进行性认知障碍和记忆力损害为主的中枢神经系统退行性疾病<sup>[1]</sup>。其病理特征表现为 $\beta$ -淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid peptide, A $\beta$ )沉积形成的老年斑和过度磷酸化 Tau 蛋白构成的神经原纤维缠结<sup>[2]</sup>。神经胶质细胞的过度激活会诱导 A $\beta$  沉积、神经元受损、突触损伤和神经退化<sup>[3]</sup>。星形胶质细胞(Astrocytes, AS)是中枢神经系统中分布最广、数量最多的胶质细胞,它能释放生长因子并调节许多神经递质,包括谷氨酸(Glutamate, Glu)的摄取和释放。谷氨酸作为中枢神经系统中关键的兴奋性神经递质,在维系突触稳态及调控突触可塑性方面发挥核心作用,且与神经元的信息传递功能及学习记忆过程密切相关。然而,当谷氨酸过度释放或摄取障碍时,能够激活突触后 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA),引起 Ca<sup>2+</sup>大量内流,进一步导致微管断裂、突触的减少和线粒体损伤等,从而产生一系列的兴奋性神经毒性,表现为突触可塑性的抑制和学习记忆功能障碍。

红花黄色素(Safflower yellow, SY)是红花水溶性提取物的主要活性成分。SY具有多种药理作用,如调节脂质,改善心脑血管疾病等<sup>[4]</sup>。课题组前期研究结果显示,SY可以提高多种 AD 模型动物的学习和记忆能力<sup>[4,5]</sup>。同时,它能够抑制星形胶质细胞过度活化,改善 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 诱导的 AD 模型大鼠的突触可塑性<sup>[6]</sup>。然而,目前尚不清楚 SY 是否通过调节星形胶质细胞介导的谷氨酸循环,减轻兴奋性神经毒性损伤,改善 AD 小鼠学习记忆能力。本研究通过检测 APP/PS1 小鼠脑组织中谷氨酸含量,以及 NMDAR 2B、兴奋性氨基酸转运体 1(Excitatory amino acids transporter 1, EAAT1)、谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase, GS)、谷氨酰胺酶(Glutaminase, GLS)的表达水平,旨在分析 SY 对该小鼠脑组织谷氨酸循环的调控作用,进而阐明其改善学习记忆能力的潜在机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及材料

#### 1.1.1 实验动物

选用 6 月龄 C57BL/6J 正常小鼠 12 只,同月龄

APP/PS1 转基因 AD 小鼠 24 只,均购自于南京君科生物科技有限公司(许可证号:20230009006319)。所有动物均饲养在 12 h 明暗交替且湿度和温度均适宜的环境,可自由饮水摄食,实验所有流程均符合实验动物中心相关要求,通过石河子大学动物伦理审查,批准编号(A2022-088-01)。

#### 1.1.2 实验药物

红花黄色素(YSCMY20240329,云南通海杨氏天然产物有限公司),由多种查尔酮混合物组成,根据峰面积比值,其中羟基红花黄色素 A(HSYA)含量为 19.45%。

#### 1.1.3 实验试剂

总蛋白定量试剂盒、谷氨酸试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A045-4-2、A074-1-2);尼氏染液(索莱宝, #1436);EAAT1 抗体(Proteintech, 批号:20785-1-AP);NMDAR 2B(Affinity Biosciences, 批号:#AF6426);GS 抗体(Cell Signaling Technology, 批号:80636 S);GLS 抗体(Proteintech, 批号:12855-1-AP);6E10(Biolegend, 批号:803004);山羊抗小鼠 IgG(H+L)HRP 标记(Proteintech, 批号:RGAM001);山羊抗兔 IgG(H+L)HRP 标记(Proteintech, 批号:RGAR001)。

#### 1.1.4 仪器

Morris 水迷宫(北京众实迪创科技发展有限公司)、DTT-2 型小鼠跳台仪(中国医学科学院药物研究所)、SBA-2 型小鼠避暗仪(中国医学科学院药物研究所);BVE-4 型电泳仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);BVT-4 型电转仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);Tanon 5200 Multi 型全自动化学发光成像仪(上海天能科技有限公司);3001-1138 全波长扫描式多功能酶标仪(赛默飞世尔科技公司);LSM510 正置显微镜(德国 Zeiss 公司);5430R 型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf);KZ-5F-3D 型三维冷冻研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组及给药

本研究采用 6 月龄 C57BL/6J 小鼠 12 只,即 WT 组;同月龄 APP/PS1 小鼠 24 只,随机分为两组,即 Tg 组及 Tg+SY 组(SY, 30 mg·kg<sup>-1</sup>),雌雄各半;单日单次灌胃给药,持续给药 12 周。

### 1.2.2 Morris 水迷宫实验

实验前向水迷宫水池中加入适量水,调整水温

在  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 向水池中倒入适量可食用钛白粉, 搅拌均匀, 使水池中的水呈现白色, 与黑色小鼠形成明显的颜色对比, 便于摄像采集。将水迷宫平均分成四个象限, 把透明玻璃平台放置在其中一个象限的中心位置, 使水面超过平台约 1 cm, 保持每天的实验时间和实验环境不变。该实验时长为 6 d, 第 1~5 天是定位航行实验, 第 6 天是空间探索实验。定位航行实验中, 将小鼠分别从平台的邻位和对位象限放入水池, 保持小鼠头朝池壁, 记录小鼠找到平台的潜伏期, 若 120 s 内未找到平台, 潜伏期记录为 120 s, 引导小鼠上平台后停留 15 s, 从另一象限进入水池。第 6 天撤去平台后进行空间探索实验, 小鼠从选定象限入水, 记录 120 s 内小鼠穿越平台的次数和第一次穿越平台的时间。

### 1.2.3 避暗实验

避暗仪器由明室和暗室组成, 接通电源后在暗室底部会通有电流。实验时长共 2 d。第 1 天是学习记忆阶段, 共进行两次实验, 每次 300 s。第 1 次断开电源, 先将小鼠放入明室, 熟悉环境 300 s; 第 2 次接通电源, 以同样的方法放入明室, 当小鼠由明室进入暗室时, 会被电击中, 从而形成记忆。第 2 天在相同的时间和环境下进行实验, 接通电源, 记录小鼠在 300 s 内第 1 次进入暗室的时间以及进入暗室的次数, 即逃避潜伏期和错误次数。

### 1.2.4 跳台实验

跳台实验分 2 个阶段。第 1 天是学习记忆阶段; 共进行两次实验。第 1 次是打开跳台实验箱, 将小鼠头朝内侧放置于平台上, 在实验箱内熟悉 180 s; 第 2 次是接通电源后, 实验箱底部会通有电流, 以同样的方法放置小鼠, 当小鼠跳下平台时, 会被电击到, 尽量使小鼠在 180 s 内被电击 2 次, 完成学习记忆的过程。第 2 天是正式实验阶段: 直接接通电源, 将小鼠头朝内侧放置于实验箱内的平台上, 记录小鼠跳下平台的次数和第 1 次跳下平台的时间, 即错误次数和逃避潜伏期。

### 1.2.5 标本取材与检测

行为学实验结束后, 对小鼠进行断头取脑处理, 每组中半数小鼠的半脑样本采用 4% 多聚甲醛固定; 其余小鼠的脑组织需先分离海马与皮层组织, 再迅速置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱内保存备用。

### 1.2.6 谷氨酸试剂盒检测谷氨酸含量

准确称取适量脑组织, 按重量 (g) : 体积 (mL) = 1:9 的比例, 加入 9 倍体积的生理盐水, 冰水浴条件下机械匀浆,  $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 10 min, 即得

10% 的匀浆上清液; 取 10% 匀浆上清 50  $\mu\text{L}$  加 150  $\mu\text{L}$  试剂盒所含工作液, 充分混匀,  $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 10 min, 取上清待测。样品前处理完成后, 参照试剂盒说明书进行后续实验操作, 检测脑组织谷氨酸含量。

### 1.2.7 尼氏染色

通过尼氏染色方法考察小鼠海马各区及皮层区尼氏小体数量, 神经元形态及排列情况。取半脑石蜡切片, 二甲苯脱蜡, 乙醇梯度洗脱, 蒸馏水润洗, 使用甲苯胺蓝染液充分染色, 95% 乙醇分化后, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 使用永久性封片剂封片, 显微镜拍摄。

### 1.2.8 免疫组化

取小鼠半脑石蜡切片, 依次进行脱蜡、梯度水化处理; 随后采用适宜方法进行抗原修复, 以消除内源性过氧化物酶干扰, 并通过封闭阻断非特异性结合。滴加一抗 6E10 (1:500), 置于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  环境中孵育过夜, 次日加入对应二抗孵育 30 min, 经 DAB 显色、苏木精返蓝后, 进行梯度酒精脱水、二甲苯透明处理, 最终完成中性树脂封片。通过免疫组织化学染色结果, 观察小鼠海马各区及大脑皮层内  $\text{A}\beta$  斑块的分布特征, 并运用 Image J 图像分析软件定量统计各目标脑区  $\text{A}\beta$  阳性染色区域的占比。

### 1.2.9 Western Blot 检测小鼠脑组织中谷氨酸循环相关蛋白 GS、GLS、EAAT1、NMDAR 2B 蛋白的表达水平

准确称取一定质量的小鼠海马及皮层组织, 按 PMSF 蛋白酶抑制剂 ( $\mu\text{L}$ ) : 组织 (mg) : RIPA 裂解液 ( $\mu\text{L}$ ) = 1:10:100 的比例加入裂解体系, 充分研磨使组织匀浆化, 随后离心, 收集上清液, 采用 Q5000 蛋白定量检测系统测定总蛋白浓度, 根据测得浓度, 向样品中加入电泳缓冲液及 4 $\times$  上样缓冲液, 调整蛋白终浓度至  $5\ \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 将配制好的样品充分混匀后, 置于沸水浴中加热煮沸 10 min, 样品储存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。提前配制好 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 样品上样量为 10  $\mu\text{L}$ , 根据目的蛋白不同的分子量大小进行电泳, 转膜, 封闭。随后加入对应一抗进行孵育, 各一抗稀释比例分别为: GS (1:1 000)、GLS (1:5 000)、EAAT1 (1:1 000)、NMDAR 2B (1:1 000),  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日取出膜, 先用 TBST 缓冲液洗涤条带 5 遍, 再使用同种属的二抗 (1:10 000), 室温孵育 1 h, 再次用 TBST 缓冲液洗涤 5 遍, 采用化学发光成像系统对蛋白条带进行显影与曝光。

### 1.2.10 统计学处理

本研究实验结果图表通过 GraphPad Prism

9.5.0 软件绘制,数据以均数±标准误形式呈现,采用 SPSS 27.0 软件进行数据分析。其中,采用双因素方差分析(Two-way ANOVA)法处理 Morris 水迷宫定位航行实验相关数据,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)法处理其余检测指标数据。

## 2 结果

### 2.1 Morris 水迷宫

如图 1a 是各组小鼠在 Morris 水迷宫实验第 5 天的代表性轨迹图。定位航行实验阶段(第 1~

5 天)(图 1b),Tg 组小鼠逃逸潜伏期相较于 WT 组显著延长( $P<0.01$ );而 SY 组与 Tg 组小鼠相比逃逸潜伏期显著缩短( $P<0.01$ ),提示 SY 可以提高小鼠的长期记忆能力。空间探索实验阶段(第 6 天),结果如(图 1c、图 1d)所示,Tg 组与 WT 组小鼠相比首次穿越平台时间显著增加( $P<0.01$ ),且 120 s 内穿越平台次数显著减少( $P<0.01$ ),而 SY 组与 Tg 组小鼠相比首次穿越时间显著缩短( $P<0.01$ ),穿越次数显著增多( $P<0.05$ )。提示 SY 可以提高小鼠的空间记忆能力。

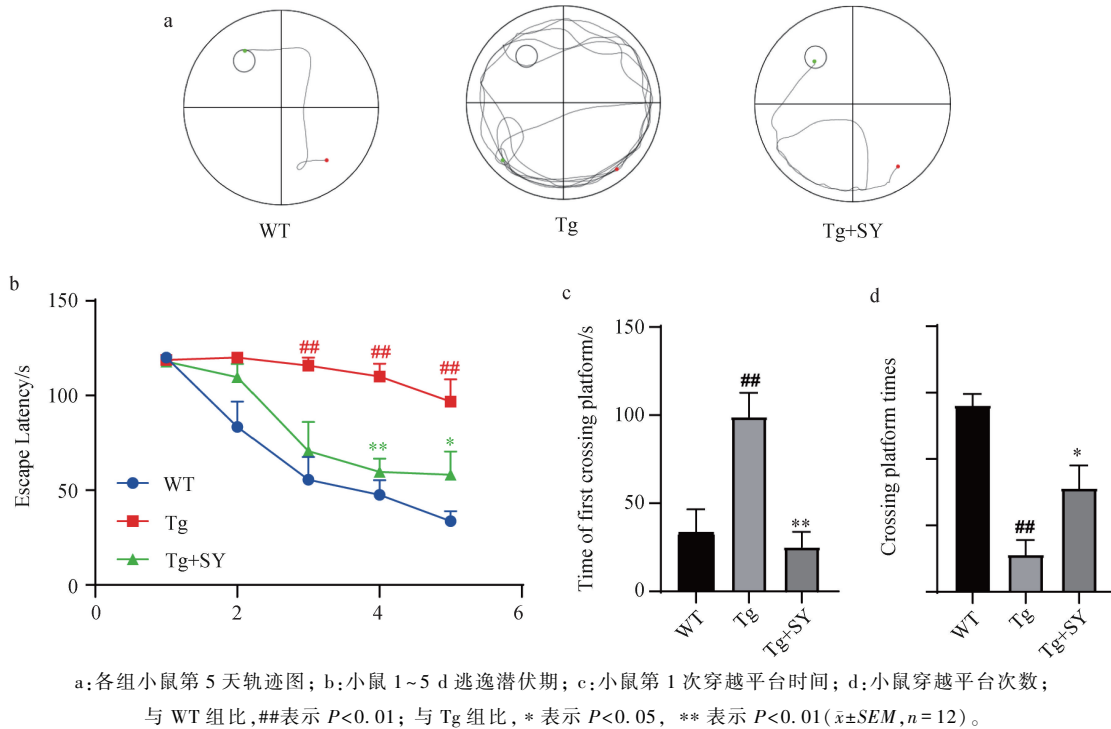


图 1 红花黄色素对 APP/PS1 小鼠 Morris 水迷宫的影响

Figure 1 The effect of SY on the Morris water maze in APP/PS1 mice

### 2.2 避暗及跳台实验

避暗实验结果显示(图 2a、图 2b),实验过程中 Tg 组小鼠的逃避潜伏期明显低于 WT 组( $P<$

0.01),错误次数明显高于 WT 组( $P<0.05$ );而 SY 组小鼠的逃避潜伏期明显高于 Tg 组( $P<0.05$ ),实验过程中错误次数明显低于 Tg 组( $P<0.05$ )。跳台

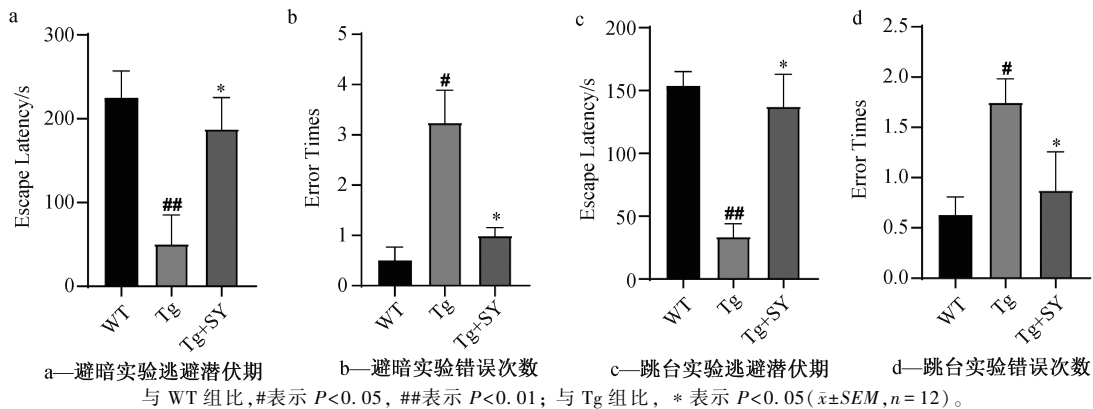


图 2 小鼠避暗及跳台实验

Figure 2 The dark avoidance test and step-down test of mice

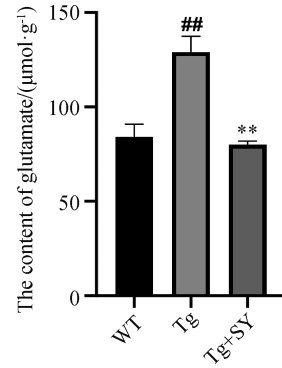
实验结果显示(图 2c、图 2d),在实验过程中,Tg 组小鼠的逃避潜伏期明显低于 WT 组( $P < 0.01$ ),错误次数明显高于 WT 组( $P < 0.05$ );SY 组小鼠的逃避潜伏期同样明显高于 Tg 组( $P < 0.05$ ),错误次数也明显低于 Tg 组( $P < 0.05$ )。

### 2.3 谷氨酸试剂盒检测谷氨酸浓度

谷氨酸试剂盒检测结果如图 3 所示,与 WT 组相比,Tg 组小鼠脑组织内谷氨酸浓度显著升高( $P < 0.01$ ),与 Tg 组相比,SY 给药组小鼠脑组织内谷氨酸浓度显著降低( $P < 0.01$ )。结果显示,给药后能显著降低 AD 小鼠脑组织内谷氨酸浓度,减轻神经兴奋性毒性。

### 2.4 SY 对 APP/PS1 小鼠神经元保护作用

尼氏染色能够清晰地显示神经元的形态结构,尼氏小体的分布和数量变化与神经元功能状态紧密相关,因此通过尼氏染色可以揭示神经元的生理状况。各组小鼠尼氏染色结果显示(图 4a),相较于 WT 组,

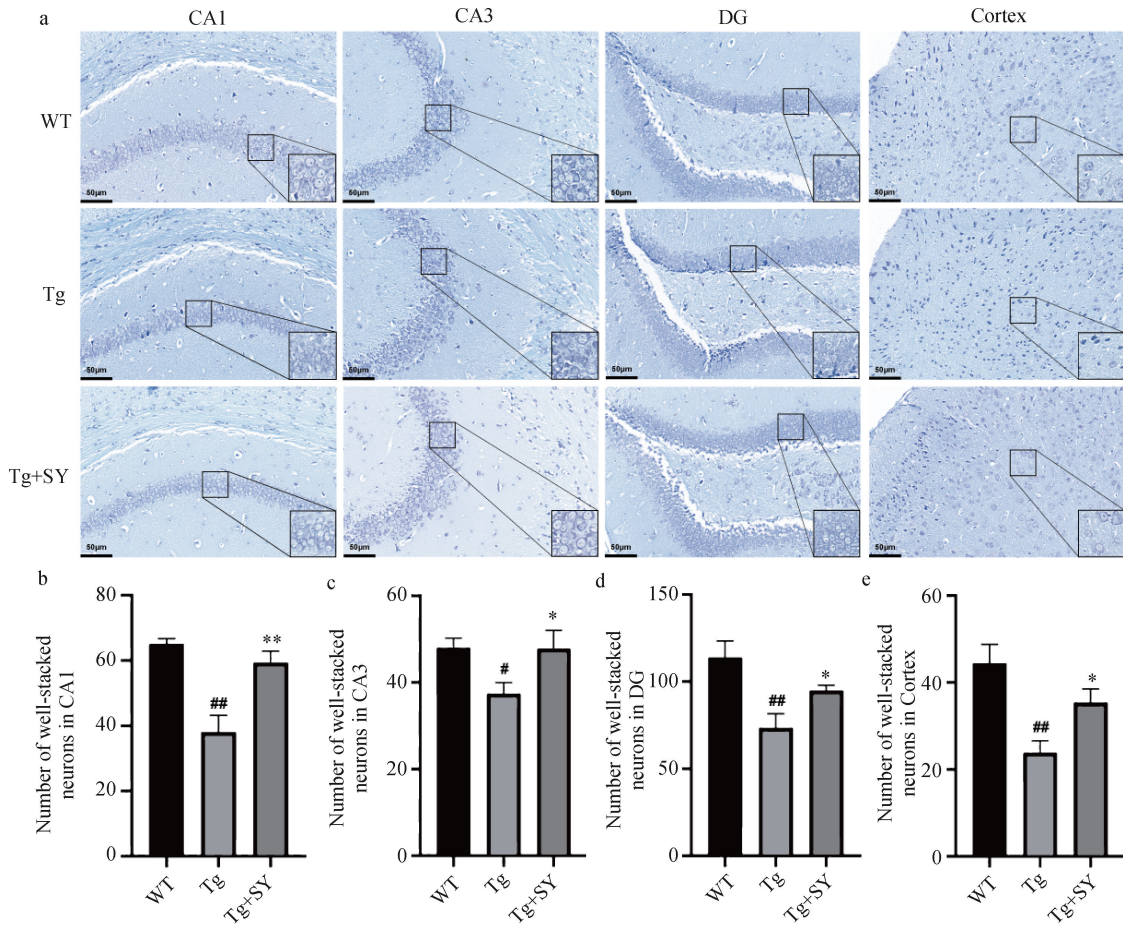


与 WT 组比,##表示  $P < 0.01$ ;与 Tg 组比,\*\*表示  $P < 0.01$  ( $\bar{x} \pm SEM, n = 4$ )。

图 3 各组小鼠脑组织中谷氨酸浓度

Figure 3 Glutamate concentrations in brain tissues of mice from different groups

Tg 组小鼠海马 CA1,CA3,DG 及皮层区域神经元排列无序且无完整细胞形态,呈明显受损状态;与 Tg 组相比,SY 组小鼠海马各区及皮层区域神经元排列显著改善,完整细胞形态的神经元数量显著增加。



a: 各组小鼠海马(CA1, CA3, DG)和皮层区域尼氏染色的代表性图像(比例尺50 μm); b: 海马CA1区神经元数量统计图; c: 海马CA3区神经元数量统计图; d: 海马DG区神经元数量统计图; e: 皮层神经元数量统计图  
与 WT 组比,#表示  $P < 0.05$ ,##表示  $P < 0.01$ ;与 Tg 组比,\*表示  $P < 0.05$ ,\*\*表示  $P < 0.01$  ( $\bar{x} \pm SEM, n = 5$ )。

图 4 各组小鼠脑组织尼氏染色结果图及神经元数量统计

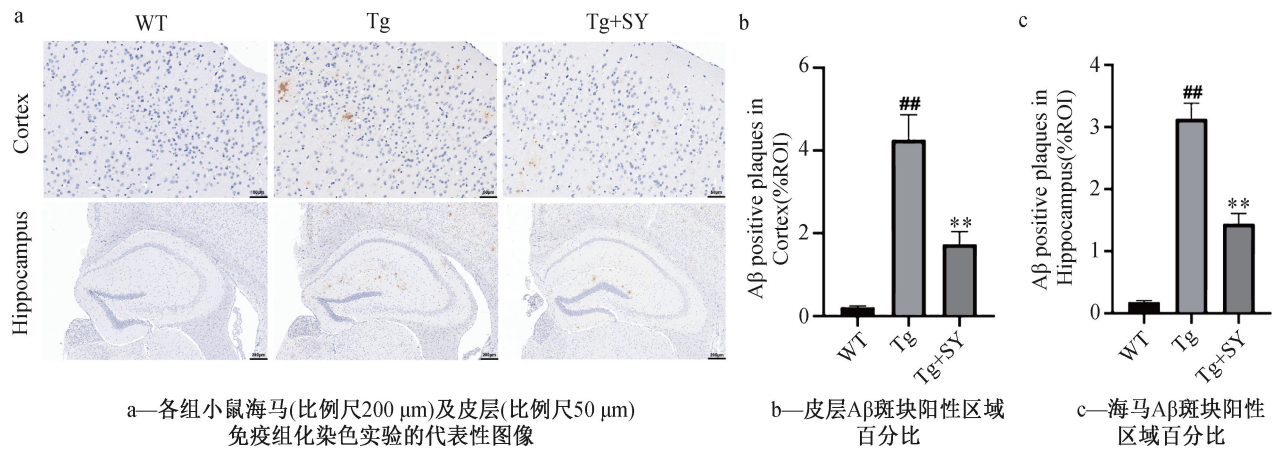
Figure 4 Nissl staining results and neuronal count in brain tissues of mice from different groups

海马 CA1, CA3, DG 区及皮层区域神经元定量分析结果,如图 4b—图 4e 所示,与 WT 组相比,Tg 组小鼠海马 CA1, CA3, DG 区及皮层神经元数量显著降低 ( $P < 0.01, P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$ ),与 Tg 组相比,SY 组小鼠海马 CA1, CA3, DG 区及皮层神经元数量显著增加 ( $P < 0.01, P < 0.05, P < 0.05, P < 0.05$ )。结果显示 SY 可明显改善 AD 小鼠脑组织神经元形态,增加神经元数量。

### 2.5 SY 对小鼠脑组织 A $\beta$ 斑块的影响

通过免疫组化染色 A $\beta$  斑块能够被标记为不规则圆形或椭圆形,边界较清晰,同时中心可呈现致密

淀粉样核心,周围环绕放射状分布的棕褐色纤维状结构。各组小鼠免疫组化染色结果如图 5a 所示,与 WT 组相比,Tg 组小鼠皮层及海马组织出现明显的 A $\beta$  斑块沉积,与 Tg 组相比,SY 组小鼠皮层及海马组织 A $\beta$  斑块沉积数量显著降低。通过 ImageJ 软件对免疫组化染色图进行定量分析,结果如图 5b、图 5c 所示,与 WT 组相比,Tg 组小鼠皮层及海马组织 A $\beta$  阳性区域百分比显著增加 ( $P < 0.01, P < 0.01$ )。与 Tg 组相比,SY 组小鼠皮层及海马组织 A $\beta$  阳性区域占比显著减少 ( $P < 0.01, P < 0.01$ )。结果显示 SY 可明显减少 AD 小鼠脑组织 A $\beta$  斑块沉积。



与 WT 组比,##表示  $P < 0.01$ ; 与 Tg 组比, \*\* 表示  $P < 0.01$  ( $\bar{x} \pm SEM, n = 5$ )。

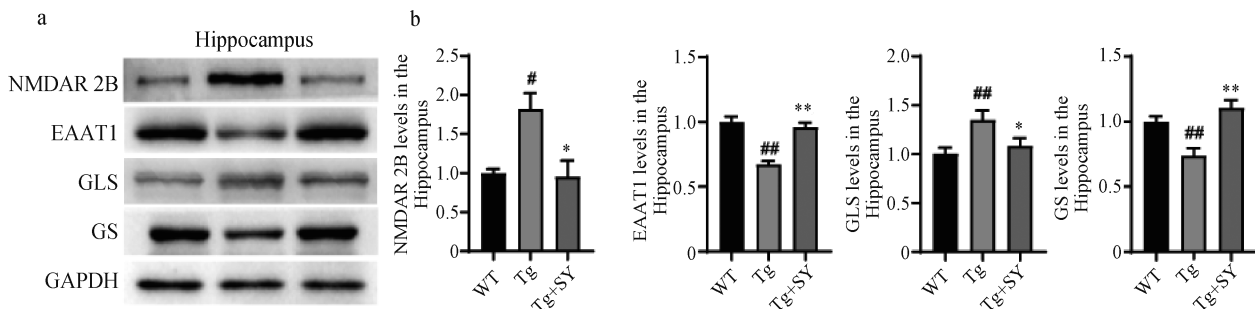
图 5 小鼠脑组织 A $\beta$  斑块沉积

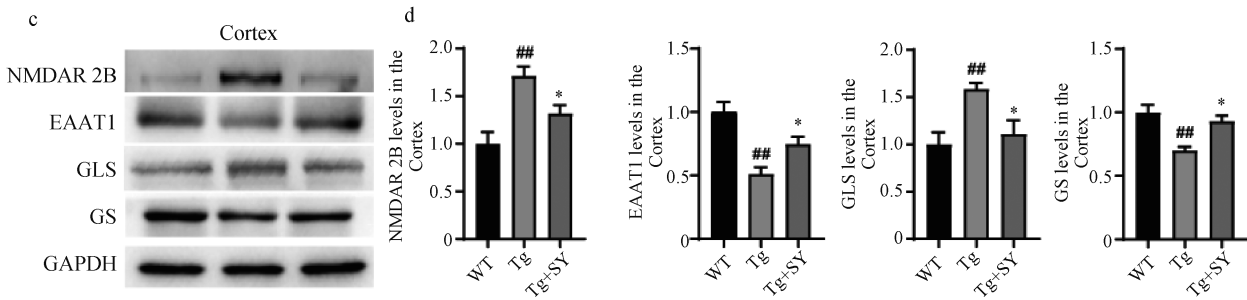
Figure 5 A $\beta$  plaque deposition in mouse brain tissue

### 2.6 SY 对 APP/PS1 小鼠海马及皮层中 GS、GLS、EAAT1、NMDAR 2B 蛋白表达的影响

如图 6b、图 6d 所示,相较于 WT 组,Tg 组小鼠海马及皮层中 GS、EAAT1 蛋白表达水平显著下调(海马: $P < 0.01, P < 0.01$ ;皮层: $P < 0.01, P < 0.01$ ),而海马及皮层中的 GLS、NMDAR 2B 蛋白表达水平显著上调(海马: $P < 0.01, P < 0.05$ ;皮层: $P < 0.01, P < 0.01$ ),

$P < 0.01$ );与 Tg 组相比,SY 组小鼠海马及皮层中 GS、EAAT1 蛋白表达水平显著上调(海马: $P < 0.01, P < 0.01$ ;皮层: $P < 0.05, P < 0.05$ ),而海马及皮层中的 GLS、NMDAR 2B 蛋白表达水平显著下调(海马: $P < 0.05, P < 0.05$ ;皮层: $P < 0.05, P < 0.05$ )。结果显示,SY 通过调节谷氨酸转运和相关代谢酶的表达,减少谷氨酸含量,减轻脑组织兴奋性毒性损伤。





a: SY 对 APP/PS1 小鼠海马 GS、GLS、EAAT1、NMDAR 2B 的蛋白条带图;b: SY 对 APP/PS1 小鼠海马 GS、GLS、EAAT1、NMDAR 2B 的结果统计图;c: SY 对 APP/PS1 小鼠皮层 GS、GLS、EAAT1、NMDAR 2B 的蛋白条带图;d: SY 对 APP/PS1 小鼠皮层 GS、GLS、EAAT1、NMDAR 2B 的结果统计图;与 WT 组比,#表示  $P < 0.05$ , ##表示  $P < 0.01$ ;与 Tg 组比,\*表示  $P < 0.05$ , \*\*表示  $P < 0.01$  ( $\bar{x} \pm SEM, n = 5$ )。

图 6 SY 对 APP/PS1 小鼠脑组织 GS、GLS、EAAT1、NMDAR 2B 蛋白表达的影响

Figure 6 The effect of SY on the expression of GS, GLS, EAAT1, and NMDAR 2B proteins in brain tissues of APP/PS1 mice

### 3 讨论

AD 是常见的中枢神经系统退行性疾病,患者表现出的持续智力减退和行为能力失常,严重影响其日常生活和社会功能,因此加强对 AD 发病机制的研究,寻找防治 AD 的靶标药物,对改善 AD 患者的生活质量、减轻社会经济负担具有重要意义。AD 的发病机制复杂,除目前公认的淀粉样蛋白级联学说、Tau 蛋白学说、炎症学说外,谷氨酸能学说也备受关注<sup>[7]</sup>。

谷氨酸是中枢神经系统内重要的兴奋性神经递质,与神经元信息传递、学习和记忆密切相关,研究表明,脑内谷氨酸循环障碍是 AD 重要的发病机制之一<sup>[8]</sup>。在神经元突触前膜中,囊泡膜谷氨酸转运体(Vesicular glutamate transporters, VGLUTs)将谷氨酸转运至突触囊泡中储存于突触前神经元,以维持囊泡内谷氨酸浓度在生理水平,当突触前神经元兴奋时,谷氨酸被释放到突触间隙中,与突触后膜谷氨酸受体结合进行突触信息传递,此时谷氨酸经兴奋性氨基酸转运体(Excitatory amino acids transporter, EAATs)被星形胶质细胞摄取,以防止谷氨酸受体过度激活,在 GS 作用下转化为谷氨酰胺(Glutamine, Gln),新生成的谷氨酰胺在突触前神经元经 GLS 的作用,重新转化为谷氨酸,该过程被称为谷氨酸-谷氨酰胺循环(Glutamate/glutamine, Glu/Gln)<sup>[9]</sup>。Glu/Gln 循环的正常进行对于维持神经系统内谷氨酸浓度平衡至关重要<sup>[10]</sup>。课题组前期研究结果表明,SY 可以在星形胶质细胞调控下对  $A\beta_{1-42}$  诱导的海马神经元发挥保护作用<sup>[11]</sup>,SY 可以改善 APP/PS1 小鼠学习记忆的能力<sup>[5]</sup>,本研究进一步探究 SY 对 APP/PS1 小鼠学习记忆能力的改善作用是否与其调节 Glu/Gln 循环相关。

行为学实验结果显示,在 Morris 水迷宫实验中,SY 可以有效增强 APP/PS1 小鼠的长期空间记忆能力;在避暗实验和跳台实验中,SY 对 APP/PS1 小鼠的短期记忆功能具有显著的改善作用。 $A\beta$  是 AD 发病机制中的关键诱因,当  $A\beta$  大量聚集时,会引发星形胶质细胞过度激活,导致谷氨酸释放增加,神经元受损<sup>[12]</sup>。结果显示,与 WT 组相比,Tg 组小鼠  $A\beta$  水平显著升高,经 SY 治疗后小鼠  $A\beta$  水平显著降低,初步表明 SY 可显著减少 APP/PS1 小鼠脑组织中  $A\beta$  斑块的聚集。虽然通过免疫组化直观观察  $A\beta$  的空间分布是实验研究的重要手段,但是后期我们还需对可溶/不可溶  $A\beta$  进行 ELISA 定量测定,通过定量分析进一步探究 SY 对  $A\beta$  沉积的改善作用。尼氏染色是通过观察尼氏小体的变化来表征神经元的丢失数量,与 Tg 组相比,经 SY 治疗后,小鼠皮层及海马神经元胞质内的尼氏小体数量显著上升,且神经元排列整齐,表明 SY 能够对 APP/PS1 小鼠脑组织神经元的病理损伤发挥改善作用。

星形胶质细胞中,EAATs 是 Glu/Gln 循环中的关键转运蛋白,有研究表明,在体外实验中, $A\beta$  寡聚体及斑块前  $A\beta$  可下调星形胶质细胞中 EAAT1 和 EAAT2 蛋白的表达水平,使谷氨酸摄取减少<sup>[13]</sup>,显示谷氨酸转运功能的变化影响了突触间隙中谷氨酸的清除,产生神经元兴奋性毒性损伤<sup>[14]</sup>。NMDARs 的过度激活被认为是导致谷氨酸兴奋性毒性的主要原因,调控该受体的表达,是预防兴奋性毒性的潜在策略<sup>[15]</sup>。在 Glu/Gln 循环中,GS 参与谷氨酸的代谢过程,且仅存在于星形胶质细胞中。有研究发现,在 AD 患者的颞叶皮层和 3×Tg AD 小鼠的海马中 GS 的表达减少<sup>[16]</sup>,GS 表达的降低能够引起神经元的过度兴奋。GLS 主要存在于突触前神经

元中<sup>[8]</sup>,是谷氨酸合成的关键酶,过度激活的 GLS 会导致突触间隙中谷氨酸蓄积。为探究 SY 对 APP/PS1 小鼠脑组织谷氨酸的调节作用,本研究检测了小鼠脑组织中的谷氨酸水平,结果表明,在 APP/PS1 小鼠脑组织中谷氨酸水平明显升高,SY 可显著降低其谷氨酸水平,从而降低兴奋性神经毒性。为进一步阐明 SY 减轻脑组织兴奋性毒性损伤是否与调节 Glu/Gln 循环相关,本研究测定了 Glu/Gln 循环相关蛋白 GS、GLS、EAAT1、NMDAR 2B 的表达,结果发现 Tg 组 GS、EAAT1 蛋白表达降低,GLS、NMDAR 2B 蛋白表达升高;经 SY 治疗后,GS、EAAT1 蛋白表达明显升高,GLS、NMDAR 2B 蛋白表达降低。以上结果表明,SY 可加快突触间隙中谷氨酸向星形胶质细胞的转运,促进星形胶质细胞将谷氨酸转化为谷氨酰胺,减少谷氨酸蓄积,同时通过减少谷氨酸与突触后膜 NMDAR 2B 的结合,调节 Glu/Gln 循环障碍,减轻神经元兴奋性毒性损伤。

综上所述,SY 可以改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆能力,通过调节 Glu/Gln 循环相关蛋白 GS、GLS、EAAT1、NMDAR 2B 的表达,减少脑组织内谷氨酸蓄积,减轻神经兴奋性毒性损伤,发挥神经保护作用。在随后的研究中还需深入探究 Glu/Gln 循环中涉及的能量代谢、钙超载触发的兴奋性毒性级联反应以及突触可塑性改变等,进一步阐明 SY 发挥抗 AD 作用的分子机制。

### 参考文献(References)

- [ 1 ] CHANG C H, LIN C H, LANE H Y. D-glutamate and Gut Microbiota in Alzheimer's Disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2676.
- [ 2 ] BUSCHE M A, HYMAN B T. Synergy between amyloid- $\beta$  and tau in Alzheimer's disease [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(10): 1183-1193.
- [ 3 ] DENG Q T, WU C Y, PARKER E, et al. Microglia and astrocytes in Alzheimer's Disease: Significance and summary of recent advances[J]. *Ageing Dis*, 2024, 15(4): 1537-1564.
- [ 4 ] QI Y Q, WANG Y Y, NI M Y, et al. Safflower yellow alleviates cognitive impairment in mice by modulating cholinergic system function, oxidative stress, and CREB/BDNF/TrkB signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025(340): 118986.
- [ 5 ] DU C, HOU J W, WANG C H, et al. Effects of safflower yellow on cholesterol levels in serum and brain tissue of APP/PS1 mice[J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36(4): 557-569.
- [ 6 ] HOU J W, WANG C H, ZHANG M Y, et al. Safflower yellow improves the synaptic structural plasticity by ameliorating the disorder of glutamate circulation in  $A\beta(1-42)$ -induced AD model rats [J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(8): 1870-1887.
- [ 7 ] SOARES C, DA ROS L U, MACHADO L S, et al. The glutamatergic system in Alzheimer's disease: A systematic review with meta-analysis [J]. *Mol Psychiatry*, 2024, 29(7): 2261-2273.
- [ 8 ] PURANIK N, SONG M. Glutamate: Molecular mechanisms and signaling pathway in Alzheimer's disease, a potential therapeutic target [J]. *Molecules*, 2024, 29(23): 5744.
- [ 9 ] MAHMOUD S, GHARAGOZLOO M, SIMARD C, et al. Astrocytes maintain glutamate homeostasis in the CNS by controlling the balance between glutamate uptake and release[J]. *Cells*, 2019, 8(2): 184.
- [ 10 ] ANDERSEN J V. The glutamate/GABA-glutamine cycle: Insights, updates, and advances [J]. *J Neurochem*, 2025, 169(3): e70029.
- [ 11 ] 莫玉言,侯加卫,周张玖智,等. 星形胶质细胞调控下红花黄色素对  $A\beta_{1-42}$  介导的海马神经元突触损伤的保护作用研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2019, 37(1): 47-54.
- MO Y Y, HOU J W, ZHOU Z J Z, et al. Study on the protective effects of safflower yellow on synaptic damage in hippocampal neurons induced by  $A\beta_{1-42}$  in the presence of astrocytes [J]. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 2019, 37(1): 47-54.
- [ 12 ] LI Y P, YANG X L, YANG H, et al. Modeling of neuronal hyperexcitability modulated by  $A\beta$ -mediated astrocyte dysfunction [J]. *Phys Rev E*, 2025, 111(6-1): 064419.
- [ 13 ] MONTEREY M D, WEI H C, WU X Z, et al. The many faces of astrocytes in Alzheimer's disease [J]. *Front Neurol*, 2021(12): 619626.
- [ 14 ] LIMBAD C, ORON T R, ALIMIRAH F, et al. Astrocyte senescence promotes glutamate toxicity in cortical neurons [J]. *PLoS One*, 2020, 15(1): e0227887.
- [ 15 ] CHIANG T I, YU Y H, LIN C H, et al. Novel biomarkers of Alzheimer's disease; Based Upon N-methyl-D-aspartate receptor hypoactivation and oxidative stress [J]. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 2021, 19(3): 423-433.
- [ 16 ] RODRIGUEZ J J, GARDENAL E, ZALLO F, et al. Astrocyte S100 $\beta$  expression and selective differentiation to GFAP and GS in the entorhinal cortex during ageing in the 3xTg-Alzheimer's disease mouse model [J]. *Acta Histochem*, 2024, 126(1): 152131.

(责任编辑:唐慧)