

葛根素联合雷帕霉素调控 Nrf2/p62/Keap1 信号通路对阿尔茨海默病模型小鼠的神经保护作用

宋 冲^{1,2}, 占 伟^{3,4}, 谌 静⁵, 李心亮^{6*}

1. 长沙民政职业技术学院医学院, 湖南 长沙 410004

2. 国家老年疾病临床医学研究中心(湘雅)康养照护研究所, 湖南 长沙 410004

3. 中南大学湘雅护理学院, 湖南 长沙 410013

4. 中信湘雅生殖与遗传专科医院 影像科, 湖南 长沙 410008

5. 中南大学湘雅医院 口腔医学中心, 湖南 长沙 410008

6. 湖南省中医药研究院 中药临床药理研究所, 湖南 长沙 410017

摘要:目的 基于核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) /p62/Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 信号通路探讨葛根素联合雷帕霉素对阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 模型小鼠的神经保护作用。方法 BALB/c 小鼠随机分为对照组、模型组、葛根素组、雷帕霉素组、葛根素+雷帕霉素组、葛根素+雷帕霉素+Nrf2 抑制剂 ML385 组, 除对照组外, 其余小鼠均通过脑内注射 β -淀粉样蛋白 25-35 (β -amyloid protein 25-35, A β ₂₅₋₃₅) 构建 AD 模型, 给予药物干预 42 d。采用 Y 迷宫交替实验及新物体识别实验检测小鼠学习记忆能力; ELISA 检测海马组织氧化应激水平; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色及尼氏染色观察海马组织病理损伤情况; 硫磺素-S 染色观察小鼠海马组织中 A β 表达; 免疫组化检测海马组织 A β ₁₋₄₂ 和磷酸化 tau 蛋白 (phosphorylated tau, p-Tau) 的表达; TUNEL 染色观察海马组织神经元凋亡情况; Western blotting 检测海马组织凋亡、自噬及 Nrf2/p62/Keap1 通路相关蛋白表达。结果 与模型组比较, 葛根素组、雷帕霉素组、葛根素+雷帕霉素组小鼠自主交替率、偏好系数、辨别系数显著升高 ($P<0.05$); 海马组织中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性及谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平显著升高 ($P<0.05$), 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平显著降低 ($P<0.05$); 海马组织病理损伤表现出不同程度的改善, 神经元凋亡率显著降低 ($P<0.05$); 海马组织 A β 及 A β ₁₋₄₂、p-Tau 表达降低 ($P<0.05$); 海马组织半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、Keap1、p62 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), Beclin-1、微管相关蛋白轻链 3-II (microtubule-associated protein light chain 3-II, LC3-II) /LC3-I、Nrf2 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$); 与单独给药比较, 联合给药的变化最为显著 ($P<0.05$)。与葛根素+雷帕霉素组比较, 葛根素+雷帕霉素+ML385 组可部分逆转上述指标及病理的变化趋势 ($P<0.05$)。结论 葛根素联合雷帕霉素对 AD 小鼠发挥神经保护作用, 其作用机制与激活 Nrf2/p62/Keap1 信号通路有关。

关键词: 葛根素; 雷帕霉素; Nrf2/p62/Keap1 信号通路; 阿尔茨海默病; 神经保护

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)22-8234-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.22.015

Puerarin combined with rapamycin exerts neuroprotective effects in Alzheimer's disease mouse model by regulating Nrf2/p62/Keap1 signaling pathway

SONG Chong^{1,2}, ZHAN Wei^{3,4}, CHEN Jing⁵, LI Xinliang⁶

1. School of Medical, Changsha Social Work College, Changsha 410004, China

2. National Clinical Research Center for Geriatric Diseases (Xiangya) Institute of Health Care, Changsha 410004, China

3. Xiangya School of Nursing, Central South University, Changsha 410013, China

4. Department of Imaging, Reproductive & Genetic Hospital of Citic-Xiangya, Changsha 410008, China

5. Stomatological Center, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China

收稿日期: 2025-08-07

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目 (2023JJ60263)

作者简介: 宋 冲 (1986—), 男, 硕士, 讲师, 研究方向为阿尔茨海默病机制研究。Tel: (0731)82763264 E-mail: syhcil@163.com

*通信作者: 李心亮 (1984—), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为中药药理及新药开发。Tel: (0731)89949006 E-mail: lixinliang1024@163.com

6. Institute of Clinical Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410017, China

Abstract: Objective To explore the neuroprotective effects of puerarin combined with rapamycin in Alzheimer's disease (AD) mice model based on nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/p62/Kelch-like ECH associated protein 1 (Keap1) signaling pathway. **Methods** BALB/c mice were randomly divided into control group, model group, puerarin group, rapamycin group, puerarin + rapamycin group and puerarin + rapamycin + Nrf2 inhibitor ML385 group. Except for the control group, all other mice were injected with β -amyloid protein 25-35 ($A\beta_{25-35}$) into the brain to establish an AD model and received drug intervention for 42 d. Y-maze alternation experiment and new object recognition experiment were used to detect the learning and memory ability of mice; ELISA was used to detect oxidative stress levels in hippocampal tissue; Hematoxylin-eosin (HE) staining and Nissl staining were used to observe the pathological damage of hippocampal tissue; $A\beta$ expression in hippocampal tissue of mice was observed by sulfur-S staining; Immunohistochemistry was used to detect the expressions of $A\beta_{1-42}$ and phosphorylated tau protein (p-Tau) in hippocampal tissue; TUNEL staining was used to observe neuronal apoptosis in hippocampal tissue; Western blotting was used to detect apoptosis, autophagy and Nrf2/p62/Keap1 pathway related protein expressions in hippocampal tissue. **Results** Compared with model group, the spontaneous alternation rate, preference coefficient and discrimination coefficient of mice in puerarin group, rapamycin group and puerarin + rapamycin group were significantly increased ($P < 0.05$); The activity of superoxide dismutase (SOD) and level of glutathione (GSH) in hippocampal tissue were significantly increased ($P < 0.05$), while the level of malondialdehyde (MDA) was significantly decreased ($P < 0.05$); The pathological damage of hippocampal tissue showed varying degrees of improvement, with a significant decrease in neuronal apoptosis rate ($P < 0.05$); The expressions of $A\beta$, $A\beta_{1-42}$ and p-Tau in hippocampal tissue were decreased ($P < 0.05$); The expression levels of cystein-aspartate protease-3 (Caspase-3), B-cell lymphoma-2 associated X protein (Bax), Keap1 and p62 proteins in hippocampal tissue were significantly reduced ($P < 0.05$), while the expression levels of Beclin-1, microtubule associated protein light chain 3-II (LC3-II)/LC3-I, and Nrf2 proteins were significantly increased ($P < 0.05$); Compared with individual administration, the changes in combination administration were the most significant ($P < 0.05$). Compared with puerarin + rapamycin group, puerarin + rapamycin + ML385 group partially reversed the above indicators and pathological changes ($P < 0.05$). **Conclusion** The combination of puerarin and rapamycin exerts neuroprotective effects in AD mice, and its mechanism is related to the activation of Nrf2/p62/Keap1 signaling pathway.

Key words: puerarin; rapamycin; Nrf2/p62/Keap1 signaling pathway; Alzheimer's disease; neuroprotection

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是导致痴呆的主要原因, 主要是受衰老、全身炎症、生活方式等多因素影响致使大脑中的淀粉样斑块和神经原纤维缠结过度积累, 进而出现记忆学习能力下降等症状, 甚至残疾及死亡^[1-2]。随着生活饮食习惯的改变及全球老龄化加剧, AD 发病率持续升高且趋于年轻化, 给社会及家庭带来沉重的经济负担^[3]。目前主要通过服用 *N*-甲基天冬氨酸 (*N*-methyl-D-aspartic acid, NMDA) 受体拮抗剂、胆碱酯酶抑制剂等药物进行治疗, 但只能暂时缓解症状, 因此开发新的治疗策略至关重要^[4]。 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, $A\beta$) 的异常沉积是 AD 发病的关键驱动因素, 阐明其形成过程及发病机制有助于预防和治疗 AD^[5]。 $A\beta_{1-42}$ 沉积涉及氧化应激、凋亡、自噬等反应。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/p62/Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1,

Keap1) 通路作为氧化应激与自噬相关通路, 在神经退行性疾病的发展进程中发挥重要作用, 激活 Nrf2/p62/Keap1 通路可抑制氧化应激反应及神经元凋亡, 改善 APP/PS1 小鼠的学习、记忆和 AD 样病理症状^[6]。葛根素是从葛根 *Puerariae Lobatae Radix* 中提取出的一种异黄酮类化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、神经保护等多种生理活性^[7], 其可通过增加突触厚度、密度和长度, 维持突触可塑性, 发挥抗 AD 作用^[8]。雷帕霉素是一种大环内酯类抗生素^[9], 具有抗衰老、抗肿瘤和神经保护等多种作用, 可通过促进自噬增加 $A\beta_{1-42}$ 清除, 减少 Tau 过度磷酸化, 提高 AD 小鼠的学习记忆能力^[10]。本研究拟通过探究葛根素联合雷帕霉素对 AD 小鼠的神经保护作用及其相关机制, 丰富 AD 的治疗机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 BALB/c 小鼠, 4 周龄, 体质量 18~20 g,

购自长沙市天勤生物技术有限公司, 生产许可证号 SCXK(湘)2024-0021。动物饲养于湖南省中医药研究院医学实验动物中心, 使用许可证号 SYXK(湘)2024-0015, 无菌环境, 室内温度 25℃, 相对湿度 55%~65%, 12 h 光照/12 h 黑暗, 自由进食饮水。动物实验经湖南省中医药研究院动物伦理委员会批准(批准号 IACUC-2022-0109)。

1.2 药品与试剂

葛根素(质量分数为 98.9%, 批号 HY-N0145-260633)、雷帕霉素(质量分数为 99.9%, 批号 HY-10219-61925)、Nrf2 抑制剂 ML385(质量分数为 99.9%, 批号 HY-100523-273253) 购自上海皓元生物医药科技有限公司; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA) ELISA 试剂盒(批号分别为 Ek-M21269、Ek-M21274、AB4268) 购自上海酶研生物科技有限公司; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、Beclin-1 抗体(批号分别为 9662、2772T、3738S) 购自美国 CST 公司; 微管相关蛋白轻链 3-II(microtubule-associated protein light chain 3-II, LC3-II)/LC3-I 抗体(批号 FNA04717) 购自武汉菲恩生物科技有限公司; $A\beta_{1-42}$ 、磷酸化 tau(phosphorylated tau, p-Tau) 抗体(批号分别为 XYA946Ra01、IC164900) 购自上海信裕生物科技有限公司; Nrf2、p62、Keap1 抗体(批号分别为 GTX55732、GTX128173、GTX31864) 购自美国 GeneTex 公司; $A\beta_{25-35}$ (批号 bs-0872P) 购自北京博奥森生物技术有限公司; $A\beta$ 抗体(批号 CS-0076R) 购自上海彩佑实业有限公司; Alexa Fluor 594 标记山羊抗兔 IgG 二抗(批号 JK-301) 购自上海经科化学科技有限公司; β -actin 抗体(批号 ABL1011) 购自亚科因(武汉)生物技术有限公司; TUNEL 染色试剂盒(批号 E-CK-A320) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒、尼氏染色试剂盒(批号分别为 G1120、G1430) 购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 仪器

Leica Objectives 光学显微镜(重庆莱奥仪器有限公司); EnVision 多功能酶标仪[瑞孚迪生物医学(上海)有限公司]; DMIL LED 型荧光显微镜(德

国 Leica 公司); GenoSens 2000 型凝胶成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司); 63040 型新物体识别箱、63006 型 Y 迷宫(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 AD 模型的制备

小鼠麻醉后, 固定于脑立体定位仪上, 选择前囟点位后 2 mm、右 2.2 mm、深 1.5 mm 处, 用微量注射泵针头以 0.1667 μ L/min 注射速度将 1 μ L 200 μ mol/mL $A\beta_{25-35}$ 注入, 对照组以生理盐水代替^[11]。

2.2 分组与给药

小鼠随机分为对照组、模型组、葛根素(160 mg/kg)^[12]组、雷帕霉素(2 mg/kg)^[13]组、葛根素(160 mg/kg)+雷帕霉素(2 mg/kg)组、葛根素(160 mg/kg)+雷帕霉素(2 mg/kg)+ML385(43.33 mg/kg)^[14]组, 每组 12 只。除对照组外, 其余小鼠均通过脑内注射 $A\beta_{25-35}$ 构建 AD 模型。次日, 各给药组 ig 葛根素或 ip 雷帕霉素、ML385, 1 次/d, 连续给药 42 d。

2.3 小鼠学习记忆能力的检测

2.3.1 Y 迷宫交替实验 将小鼠置于 Y 型迷宫中心三角区域自由探索 5 min, 记录小鼠进入每个手臂的顺序及总次数(N), N-2 为最大进臂次数, 1 次交替为小鼠连续进入 3 个不同手臂, 计算交替百分率。

$$\text{交替百分率} = \text{交替次数} / (N - 2)$$

2.3.2 新物体识别实验^[15] 正方形开放场两端放置 2 个完全一样的物体(A1、A2), 并将小鼠放置在 2 个物体正中间位置, 记录小鼠接触 2 个物体的时间(TA1、TA2), 限时 5 min, 1 h 后用完全不一样的物体 B 替换 A2, 记录小鼠探索 2 个物体的时间(TA1-2、TB1), 限时 5 min。计算偏好系数和辨别系数。

$$\text{偏好系数} = TB1 / (TB1 + TA1-2)$$

$$\text{辨别系数} = (TB1 - TA1-2) / (TB1 + TA1-2)$$

2.4 ELISA 检测海马组织氧化应激水平

小鼠麻醉后处死, 取海马组织, 制成匀浆, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测海马组织 MDA、GSH 水平和 SOD 活性。

2.5 HE 及尼氏染色观察海马组织病理变化

取各组小鼠海马组织, 用 4% 多聚甲醛固定, 浸蜡包埋制成石蜡切片, 经二甲苯透明、梯度乙醇复水后, 分别进行 HE 染色及尼氏染色, 透明干燥

封片，于显微镜下观察海马组织病理变化。

2.6 硫磺素-S 染色检测海马组织 A β 表达

取各组小鼠海马组织石蜡切片，常规脱蜡处理后进行抗原修复并封闭，滴加 A β 抗体，4 ℃ 孵育过夜；再与 Alexa Fluor 594 标记的二抗于室温避光孵育 1 h，滴加硫磺素-S 避光染色，DAPI 染核，抗淬灭封片剂封片，24 h 后于显微镜下拍照，分析海马组织中 A β 的表达，其中硫磺素-S 自带绿色荧光，A β 呈红色荧光，DAPI 呈蓝色荧光。

2.7 免疫组化法观察海马组织 A β ₁₋₄₂、p-Tau 表达

取各组小鼠海马组织石蜡切片，进行常规脱蜡及抗原修复，清洗后，加入封闭液于室温封闭，加入 A β ₁₋₄₂、p-Tau 抗体，4 ℃ 孵育过夜，再与 HRP 标记的二抗于室温孵育 1 h，DAB 显色处理后，干燥密封，于显微镜下观察并拍照，并用 Image J 软件进行分析。

2.8 TUNEL 染色观察海马组织神经元凋亡情况

取各组小鼠海马组织石蜡切片，进行常规脱蜡水化，加入 TUNEL 染色液，室温避光孵育，再加入 DAPI 染液避光孵育，清洗后，于荧光显微镜下观察海马组织神经元凋亡情况。

2.9 Western blotting 检测海马组织凋亡、自噬及 Nrf2/p62/Keap1 通路相关蛋白表达

取各组小鼠海马组织，加入裂解液匀浆，离心

取上清，提取总蛋白并定量。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入 5% 脱脂牛奶，室温封闭；分别加入 Caspase-3、Bax、Beclin-1、LC3-II/LC3-I、Nrf2、p62、Keap1、 β -actin 抗体，4 ℃ 孵育过夜；加入 HRP 标记的二抗，室温孵育 1 h，加入 ECL 发光液显影，采集图像并用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.10 统计学分析

计量资料均符合正态分布，用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 29.0 软件对数据进行统计分析，采用单因素方差分析进行多组间比较，SNK-*q* 检验进行两组间比较。

3 结果

3.1 葛根素联合雷帕霉素对 AD 模型小鼠学习记忆能力的影响

如表 1 所示，与对照组比较，模型组小鼠自主交替率、偏好系数、辨别系数显著降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，葛根素组、雷帕霉素组小鼠自主交替率、偏好系数、辨别系数显著升高 ($P < 0.05$)；与葛根素组和雷帕霉素组比较，葛根素+雷帕霉素组小鼠自主交替率、偏好系数、辨别系数显著升高 ($P < 0.05$)；与葛根素+雷帕霉素组比较，葛根素+雷帕霉素+ML385 组小鼠自主交替率、偏好系数、辨别系数显著降低 ($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠学习记忆能力比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Comparison of learning and memory abilities of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	自主交替率/%	偏好系数/%	辨别系数/%
对照	—	35.26 ± 3.61	59.46 ± 6.05	23.58 ± 2.40
模型	—	12.74 ± 1.33 [#]	36.22 ± 3.71 [#]	14.26 ± 1.48 [#]
葛根素	160	22.15 ± 2.30 [*]	45.73 ± 4.62 [*]	17.55 ± 1.83 [*]
雷帕霉素	2	22.38 ± 2.35 [*]	45.89 ± 4.69 [*]	17.62 ± 1.86 [*]
葛根素+雷帕霉素	160+2	34.79 ± 3.56 ^{*▲}	58.75 ± 5.93 ^{*▲}	22.94 ± 2.34 ^{*▲}
葛根素+雷帕霉素+ML385	160+2+43.33	22.81 ± 2.39 [●]	46.08 ± 4.67 [●]	17.86 ± 1.89 [●]

与对照组比较：[#] $P < 0.05$ ；与模型组比较：^{*} $P < 0.05$ ；与葛根素组比较：[▲] $P < 0.05$ ；与雷帕霉素组比较：[■] $P < 0.05$ ；与葛根素+雷帕霉素组比较：[●] $P < 0.05$ ，下表同。

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group; [▲] $P < 0.05$ vs puerarin group; [■] $P < 0.05$ vs rapamycin group; [●] $P < 0.05$ vs puerarin + rapamycin group, same as below tables.

3.2 葛根素联合雷帕霉素对 AD 模型小鼠海马组织氧化应激水平的影响

如表 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠海马组织 MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$)，SOD 活性和 GSH 水平显著降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，葛根素组、雷帕霉素组小鼠海马组织 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$)，SOD 活性和 GSH 水平显著升高

($P < 0.05$)；与葛根素组和雷帕霉素组比较，葛根素+雷帕霉素组小鼠海马组织 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$)，SOD 活性和 GSH 水平显著升高 ($P < 0.05$)；与葛根素+雷帕霉素组比较，葛根素+雷帕霉素+ML385 组小鼠海马组织 MDA 水平显著升高 ($P < 0.05$)，SOD 活性和 GSH 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠海马组织氧化应激水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 2 Comparison of oxidative stress levels in hippocampal tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	GSH/(mg·g ⁻¹)
对照	—	0.47±0.06	104.22±11.02	3.52±0.36
模型	—	1.15±0.12 [#]	50.73±5.17 [#]	1.70±0.18 [#]
葛根素	160	0.88±0.10 [*]	71.70±7.32 [*]	2.59±0.27 [*]
雷帕霉素	2	0.84±0.09 [*]	72.33±7.39 [*]	2.61±0.28 [*]
葛根素+雷帕霉素	160+2	0.56±0.07 ^{*▲■}	98.42±9.95 ^{*▲■}	3.47±0.36 ^{*▲■}
葛根素+雷帕霉素+ML385	160+2+43.33	0.81±0.09 [●]	75.26±7.64 [●]	2.66±0.29 [●]

3.3 葛根素联合雷帕霉素对 AD 模型小鼠海马组织病理损伤的影响

如图 1 所示, 对照组小鼠海马组织形态结构完整, 神经元数量丰富、形态均匀且排列整齐有序; 与对照组比较, 模型组小鼠海马组织损伤严重, 神经元数量大量减少, 核固缩深染, 且排列紊乱; 与模型组比较, 葛根素组、雷帕霉素组、葛根素+雷帕霉素组小鼠海马组织病理损伤明显改善; 与葛根素+雷帕霉素组比较, 葛根素+雷帕霉素+ML385 组小鼠海马组织病理损伤加重。

3.4 葛根素联合雷帕霉素对 AD 模型小鼠海马组织神经元形态的影响

如图 2 所示, 对照组小鼠海马神经元结构完整, 排列紧密整齐, 尼氏体分布均匀; 与对照组比较, 模型组小鼠神经元数量减少, 排列稀疏紊乱, 伴随细胞核固缩或空泡化, 尼氏体崩解现象明显; 与模型组比较, 葛根素组、雷帕霉素组、葛根素+雷帕霉素组神经元形态、数量、排列及尼氏体分布均明显得到改善; 与葛根素+雷帕霉素组比较, 葛根素+

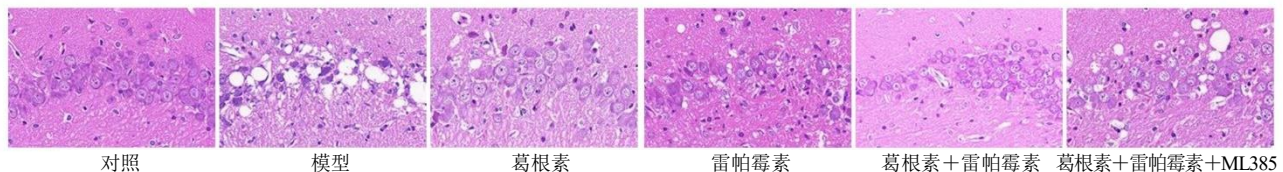
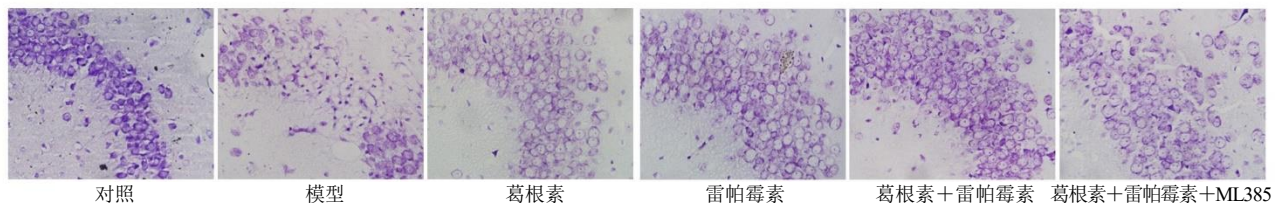
雷帕霉素+ML385 组神经元损伤严重。

3.5 葛根素联合雷帕霉素对 AD 模型小鼠海马组织中 A β 表达的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠海马组织中 A β 荧光强度增加; 与模型组比较, 葛根素组、雷帕霉素组 A β 荧光强度减少; 与葛根素组和雷帕霉素组比较, 葛根素+雷帕霉素组 A β 荧光强度减少; 与葛根素+雷帕霉素组比较, 葛根素+雷帕霉素+ML385 组 A β 荧光强度增加。

3.6 葛根素联合雷帕霉素对 AD 模型小鼠海马组织中 A β_{1-42} 和 p-Tau 表达的影响

如图 4 和表 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠海马组织中 A β_{1-42} 和 p-Tau 的表达显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 葛根素组、雷帕霉素组 A β_{1-42} 和 p-Tau 的表达显著降低 ($P < 0.05$); 与葛根素组和雷帕霉素组比较, 葛根素+雷帕霉素组 A β_{1-42} 和 p-Tau 的表达显著降低 ($P < 0.05$); 与葛根素+雷帕霉素组比较, 葛根素+雷帕霉素+ML385 组较 A β_{1-42} 和 p-Tau 的表达显著升高 ($P < 0.05$)。

图 1 HE 染色观察海马组织病理变化 ($\times 400$)Fig. 1 Histopathological changes in hippocampus observed by HE staining ($\times 400$)图 2 尼氏染色观察海马神经元形态 ($\times 400$)Fig. 2 Morphology of hippocampal neurons observed by Nissl staining ($\times 400$)

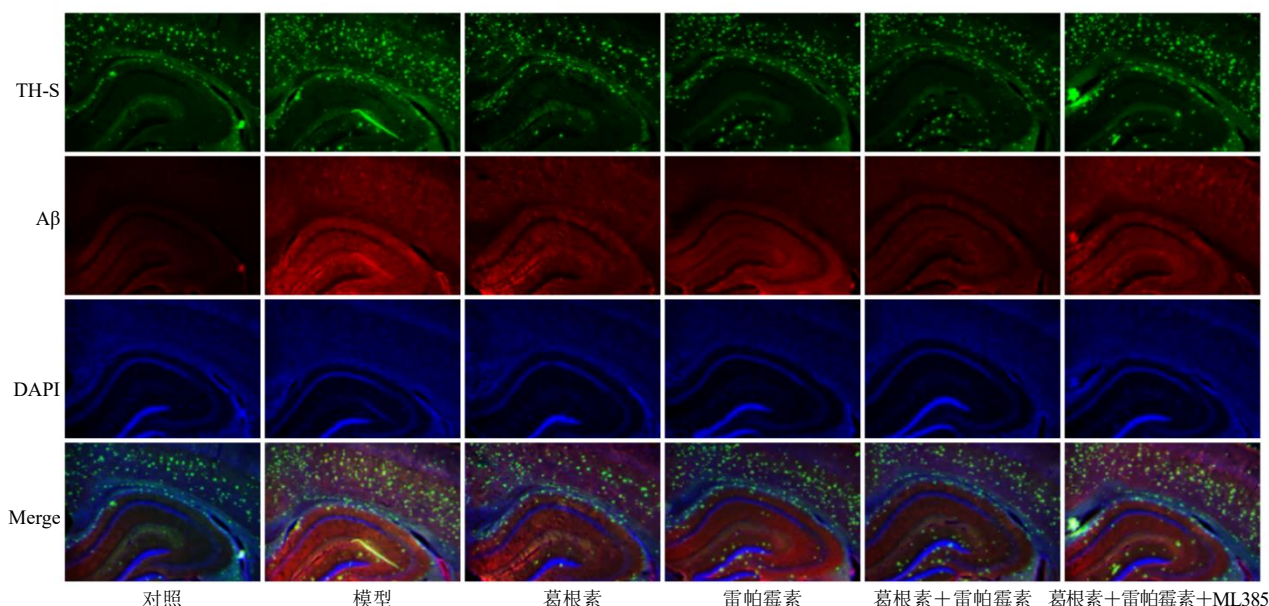


图 3 硫磺素-S 染色检测海马组织中 Aβ 的表达 (×20)

Fig. 3 Aβ expression in hippocampal tissues observed by sulfur yellow-S staining (× 20)

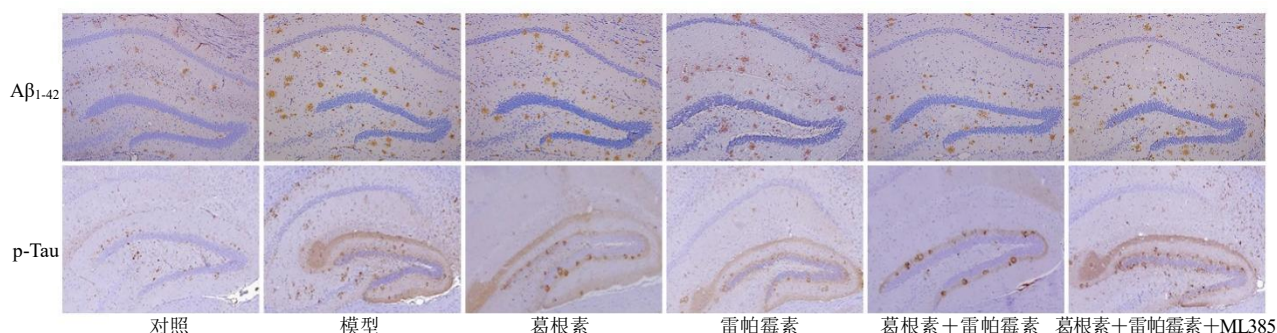


图 4 免疫组化检测海马组织 Aβ₁₋₄₂ 和 p-Tau 的表达 (×20)

Fig. 4 Expressions of Aβ₁₋₄₂ and p-Tau in hippocampal tissues detected by immunohistochemistry (× 20)

表 3 各组小鼠海马组织中 Aβ₁₋₄₂ 和 p-Tau 的表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Comparison of expressions of Aβ₁₋₄₂ and p-Tau in hippocampal tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	平均A值	
		Aβ ₁₋₄₂	p-Tau
对照	—	0.07±0.01	0.05±0.01
模型	—	0.18±0.03 [#]	0.14±0.02 [#]
葛根素	160	0.14±0.02 [*]	0.11±0.02 [*]
雷帕霉素	2	0.13±0.02 [*]	0.10±0.02 [*]
葛根素+雷帕霉素	160+2	0.08±0.01 ^{*▲■}	0.06±0.01 ^{*▲■}
葛根素+雷帕霉素+ML385	160+2+43.33	0.12±0.02 [●]	0.09±0.01 [●]

3.7 葛根素联合雷帕霉素对 AD 模型小鼠海马组织神经元凋亡的影响

如图 5、6 和表 4 所示,与对照组比较,模型组小鼠海马组织神经元凋亡率和 Caspase-3、Bax 蛋

白表达水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,葛根素组、雷帕霉素组小鼠海马组织神经元凋亡率和 Caspase-3、Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$);与葛根素组和雷帕霉素组比较,葛根素+雷

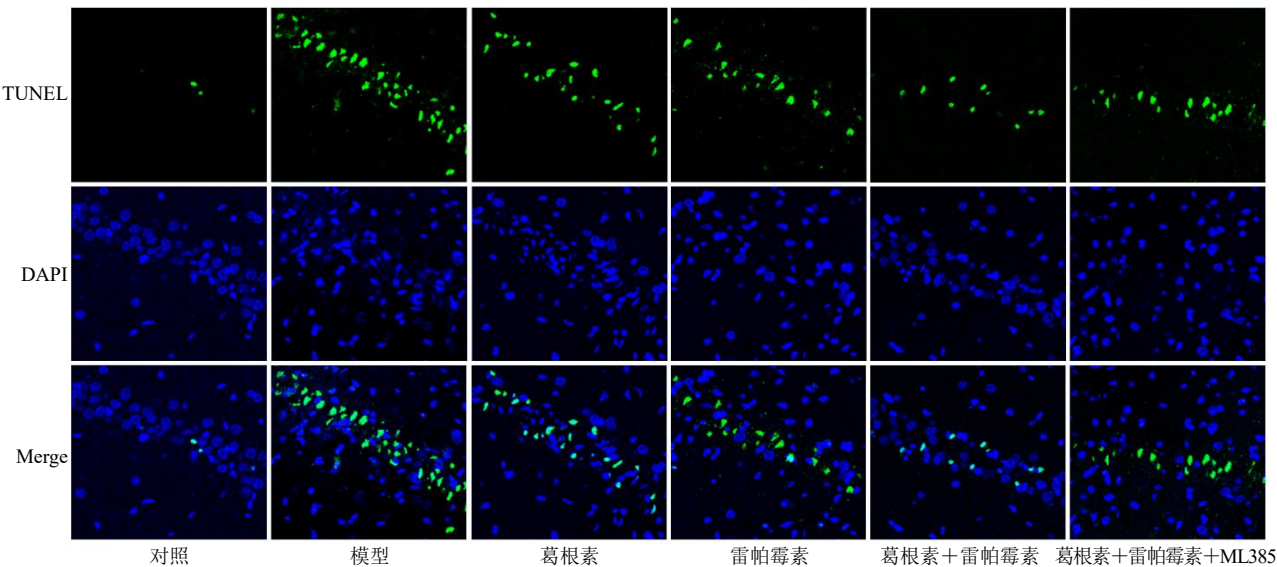


图 5 TUNEL 染色观察海马组织神经元凋亡情况 (×200)

Fig. 5 Apoptosis of neurons in hippocampal tissue observed by TUNEL staining (× 200)

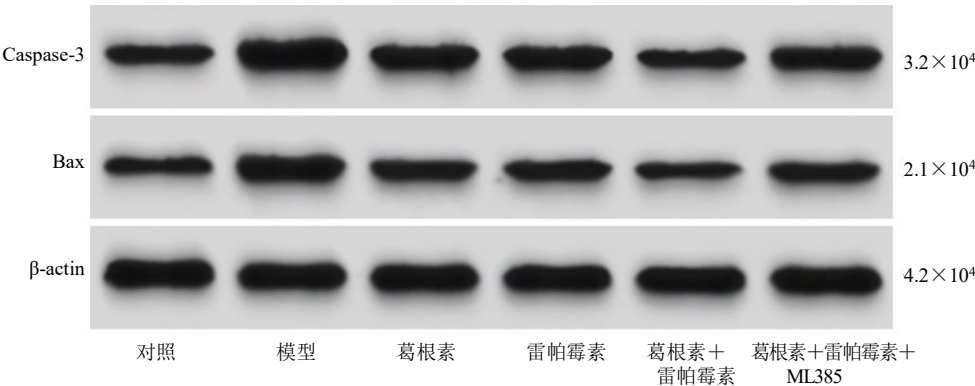


图 6 Western blotting 检测海马组织 Caspase-3、Bax 表达

Fig. 6 Caspase-3 and Bax expressions in hippocampal tissues detected by Western blotting

表 4 各组小鼠海马组织神经元凋亡率和 Caspase-3、Bax 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Comparison of neuronal apoptosis rate and expressions of Caspase-3 and Bax in hippocampal tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	神经元凋亡率/%	Caspase-3/β-actin	Bax/β-actin
对照	—	3.18±0.33	0.64±0.07	0.52±0.06
模型	—	32.75±3.39 [#]	1.27±0.14 [#]	1.18±0.13 [#]
葛根素	160	21.09±2.25 [*]	1.05±0.11 [*]	0.93±0.10 [*]
雷帕霉素	2	20.87±2.19 [*]	1.02±0.11 [*]	0.91±0.10 [*]
葛根素+雷帕霉素	160+2	9.54±1.03 ^{*▲■}	0.70±0.08 ^{*▲■}	0.62±0.07 ^{*▲■}
葛根素+雷帕霉素+ML385	160+2+43.33	19.61±2.06 [●]	0.95±0.10 [●]	0.87±0.10 [●]

帕霉素组小鼠海马组织神经元凋亡率和 Caspase-3、Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)；与葛根素+雷帕霉素组比较，葛根素+雷帕霉素+ML385 组小鼠海马组织神经元凋亡率、Caspase-3、Bax 蛋白表

达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

3.8 葛根素联合雷帕霉素对 AD 模型小鼠海马组织自噬相关蛋白表达

如图 7 和表 5 所示，与对照组比较，模型组小

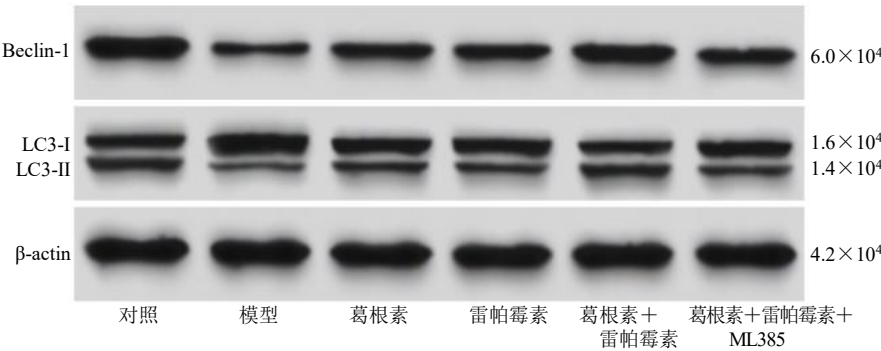


图 7 Western blotting 检测海马组织 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 表达

Fig. 7 Beclin-1 and LC3-II/LC3-I expressions in hippocampal tissues detected by Western blotting

表 5 各组小鼠海马组织自噬相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Comparison of expressions of autophagy-related proteins in hippocampal tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Beclin-1/β-actin	LC3-II/LC3-I
对照	—	0.95 ± 0.11	0.88 ± 0.10
模型	—	0.30 ± 0.04 [#]	0.26 ± 0.14 [#]
葛根素	160	0.53 ± 0.06 [*]	0.49 ± 0.06 [*]
雷帕霉素	2	0.56 ± 0.07 [*]	0.51 ± 0.06 [*]
葛根素+雷帕霉素	160+2	0.87 ± 0.10 ^{*▲■}	0.80 ± 0.09 ^{*▲■}
葛根素+雷帕霉素+ML385	160+2+43.33	0.60 ± 0.07 [●]	0.55 ± 0.07 [●]

鼠海马组织 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，葛根素组、雷帕霉素组 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)；与葛根素组和雷帕霉素组比较，葛根素+雷帕霉素组 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)；与葛根素+雷帕霉素组比较，葛根素+雷帕霉素+ML385 组 Beclin-1、LC3-II/LC3-I 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.9 葛根素联合雷帕霉素对 AD 模型小鼠海马组织 Nrf2、p62、Keap1 表达的影响

如图 8 和表 6 所示，与对照组比较，模型组小

鼠海马组织 Nrf2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)，Keap1、p62 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，葛根素组、雷帕霉素组 Nrf2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)，Keap1、p62 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)；与葛根素组和雷帕霉素组比较，葛根素+雷帕霉素组 Nrf2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)，Keap1、p62 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)；与葛根素+雷帕霉素组比较，葛根素+雷帕霉素+ML385 组 Nrf2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)，Keap1、p62 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

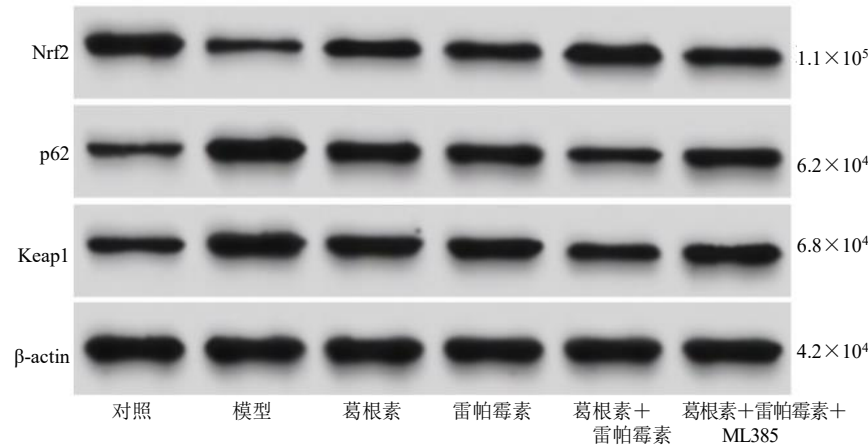


图 8 Western blotting 检测海马组织 Nrf2、p62、Keap1 表达

Fig. 8 Nrf2, p62 and Keap1 expressions in hippocampal tissues detected by Western blotting

表 6 各组小鼠海马组织 Nrf2、p62、Keap1 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 6 Comparison of expressions of Nrf2, p62 and Keap1 in hippocampal tissues of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Nrf2/ β -actin	p62/ β -actin	Keap1/ β -actin
对照	—	0.96 ± 0.11	0.38 ± 0.05	0.46 ± 0.06
模型	—	0.31 ± 0.04 [#]	1.01 ± 0.12 [#]	1.09 ± 0.12 [#]
葛根素	160	0.57 ± 0.07 [*]	0.75 ± 0.09 [*]	0.82 ± 0.09 [*]
雷帕霉素	2	0.59 ± 0.07 [*]	0.72 ± 0.08 [*]	0.81 ± 0.09 [*]
葛根素+雷帕霉素	160+2	0.90 ± 0.10 ^{*▲■}	0.43 ± 0.05 ^{*▲■}	0.50 ± 0.06 ^{*▲■}
葛根素+雷帕霉素+ML385	160+2+43.33	0.63 ± 0.07 [●]	0.68 ± 0.08 [●]	0.77 ± 0.09 [●]

4 讨论

AD 作为导致痴呆的第一因素, 目前已成为世界性公共卫生问题。A β ₂₅₋₃₅ 是 A β ₁₋₄₂ 的核心毒性片段, 两者诱导的下游信号通路和病理改变是相似的, 而 A β ₂₅₋₃₅ 更高效、毒性明确、更便宜、更快速。且另有研究表明在 A β ₂₅₋₃₅ 模型中同样可以观察到内源性 A β ₁₋₄₂ 和 p-Tau 水平的升高^[11]。故本研究通过大脑注射 A β ₂₅₋₃₅ 构建 AD 小鼠模型, 发现造模小鼠的自主交替率、偏好系数、辨别系数显著降低, 小鼠学习记忆能力衰退明显, 提示造模成功。AD 的发生与 A β 的异常沉积及 tau 蛋白异常磷酸化密切相关, 降低海马和脑脊液中 A β ₁₋₄₂ 积聚及 p-Tau 蛋白表达, 可减少海马组织损伤, 改善 AD 小鼠的认知功能^[16]。氧化应激在 AD 的发病中起着至关重要的作用, 氧化应激可增加 A β ₁₋₄₂ 和 p-Tau 表达, 而 A β ₁₋₄₂ 和 p-Tau 表达的增加又可加剧氧化还原失衡, 形成恶性循环, 加重 AD^[17]。本研究发现, 模型组小鼠海马组织 MDA 水平升高, SOD 活性和 GSH 水平降低。MDA、SOD、GSH 作为参与氧化应激进程中的重要因子, MDA 水平的升高及 SOD、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性的降低可加剧 AD 的病理损伤^[18]; 降低 MDA 水平, 提高 SOD 活性和 GSH 水平可抑制氧化应激反应, 改善 AD 大鼠认知障碍^[19]。A β ₁₋₄₂ 和 p-Tau 异常沉积可触发神经元凋亡途径, Caspase-3、Bax 作为经典凋亡相关蛋白在其中发挥重要作用^[20]。本研究发现, 模型组小鼠海马组织 Caspase-3、Bax 蛋白表达水平显著升高。降低 Caspase-3、Bax 表达可减少神经元凋亡, 改善 AD 大鼠海马结构, 进而改善认知功能、记忆和行为^[21]。而且降低 MDA 水平, 提高 SOD 抗氧化活性, 可减轻氧化应激损伤, 进而减少 Tau 蛋白的磷酸化及 A β ₁₋₄₂ 的沉积, 降低 Caspase-3、Bax 表达, 改善 AD 树突的认知障碍^[22]。此外, 自噬可以通过清除 A β ₁₋₄₂ 的沉积抑制神经元凋亡, 进而对 AD 发挥治疗作用^[23]。本研究发现, 模型组小鼠海马组织 Beclin-1、

LC3-II/LC3-I 表达降低。促进 Beclin-1 表达可增强自噬加速 A β 清除, 改善 APP/PS1 小鼠的 AD 样行为^[24]。上调 LC3II/LC3-I 和 Beclin-1 表达, 下调 p62 表达可促进自噬, 减少 A β ₁₋₄₂ 的沉积及 Tau 蛋白的磷酸化, 进而下调 Bax 表达, 抑制细胞凋亡, 改善 AD 相关病理^[25-26]。表明抑制氧化应激及细胞凋亡, 促进自噬有助于改善小鼠 AD。

研究显示, 自噬诱导剂与抗氧化剂联合可以治疗 APP/PS1 双转基因小鼠认知功能障碍^[27], 这为 AD 的治疗提供了新思路。葛根素是提取自葛根的一种异黄酮类化合物, 具有抗氧化应激、抗凋亡、自噬调节、神经保护等多种生理作用, 对包括阿尔茨海默病在内的多种神经系统疾病具有潜在的治疗价值^[24-25, 28-29]。研究发现, 葛根素可通过降低 MDA 水平, 提高 SOD 活性和 GSH 水平, 抑制氧化应激反应, 改善 APP/PS1 小鼠认知功能障碍^[30]。雷帕霉素作为一种大环内酯类抗生素, 常通过调控自噬参与多种神经系统相关疾病的治疗。雷帕霉素可通过促进自噬, 减少 A β 沉积, 抑制 Tau 蛋白过度磷酸化, 改善 AD 大鼠认知功能障碍^[31-32]。葛根素与雷帕霉素作为分别具备抗氧化和自噬调控特性的物质, 其联合应用可能产生“预备+强攻”的协同效应, 实现减毒增效的核心目标, 或成为治疗 AD 的有效策略。本研究进一步证实, 葛根素、雷帕霉素及两者联合均可抑制 AD 小鼠海马组织的氧化应激及凋亡反应, 促进自噬, 进而对 AD 发挥保护作用, 其中两者联合效果更显著。因此结合已有研究基础与本研究结果, 葛根素与雷帕霉素联合有望成为治疗 AD 的有效方案。

Nrf2/p62/Keap1 信号通路在 AD 的发生发展进程中发挥重要的作用, 正常情况下, Keap1 与 Nrf2 结合促进其泛素化降解。而在病理刺激下, p62 通过竞争性结合 Keap1, 使其与 Nrf2 解离, Nrf2 在细胞质中积累并发生核转移, 与抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 结合激活下游

抗氧化酶、自噬等相关因子表达,进而对 AD 发挥神经保护作用^[33-34]。本研究发现,模型组小鼠海马组织 Nrf2 表达降低,p62、Keap1 表达升高,而葛根素、雷帕霉素及两者联合治疗均可逆转上述指标变化趋势,其中葛根素联合雷帕霉素治疗变化最为显著。研究发现,激活 Nrf2/p62/Keap1 信号通路可降低 MDA 水平,提高 SOD 活性,激活神经元的抗氧化功能,抑制神经元的铁死亡,改善 AD 小鼠的认知功能^[35];可通过上调 LC3-II/LC3-I、Beclin-1 表达水平,促进自噬,进而促进 A β 和磷酸化 Tau 的清除,改善 APP/PS1 小鼠的记忆和认知障碍^[36]。且功能回复实验发现,ML385 处理可降低 Nrf2 表达,升高 p62、Keap1 表达,部分逆转葛根素联合雷帕霉素治疗对 AD 小鼠的神经保护作用。但发现葛根素+雷帕霉素+ML385 组的学习记忆能力、氧化应激水平与雷帕霉素单药组相似,而雷帕霉素可通过促进 p62 的积累,从而解除 Keap1 对 Nrf2 的抑制,激活 Nrf2 信号通路,雷帕霉素对 Nrf2/p62/Keap1 信号通路具有一定的调控作用,故可能是 ML385 给药剂量较低,致使逆转效果不足以超过 2 药联合的功效。

综上,葛根素联合雷帕霉素可能对 AD 小鼠发挥神经保护作用,与激活 Nrf2/p62/Keap1 信号通路有关。本研究丰富了 AD 的治疗机制,而且验证了通过“Nrf2 驱动抗氧化”与“mTOR 抑制驱动自噬”双途径协同,能有效打破 AD 的病理恶性循环,并展现出“1+1>2”的协同效应,但 AD 发生机制较复杂,而且本研究联合用药未设置剂量梯度或交互作用分析,以及对 ML385 给药剂量进行筛选,后续将针对两者联合用药的剂量、作用机制进行多途径、多方位深入论证探究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zheng Q Y, Wang X. Alzheimer's disease: Insights into pathology, molecular mechanisms, and therapy [J]. *Protein Cell*, 2025, 16(2): 83-120.
- [2] Testo A A, Roundy G, Dumas J A. Cognitive decline in Alzheimer's disease [J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2025, 69: 181-195.
- [3] 2023 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2023, 19(4): 1598-1695.
- [4] Athar T, Al Balushi K, Khan S A. Recent advances on drug development and emerging therapeutic agents for Alzheimer's disease [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(7): 5629-5645.
- [5] Ma C, Hong F F, Yang S L. Amyloidosis in Alzheimer's disease: Pathogeny, etiology, and related therapeutic directions [J]. *Molecules*, 2022, 27(4): 1210.
- [6] Peng Y Y, Li M X, Li W J, et al. DJ1 ameliorates AD-like pathology in the hippocampus of APP/PS1 mice [J]. *Biomed Environ Sci*, 2023, 36(11): 1028-1044.
- [7] Liu S, Zhou T, Chen D, et al. In silico-determined compound from the root of *Pueraria lobate* alleviates synaptic plasticity injury induced by Alzheimer's disease via the p38MAPK-CREB signaling pathway [J]. *Food Funct*, 2021, 12(3): 1039-1050.
- [8] 申小年, 彭俊宇, 杨光, 等. 葛根素对慢性偏头痛小鼠三叉神经节细胞钠离子电流及动作电位的影响 [J]. *中草药*, 2024, 55(13): 4445-4454.
- [9] 金元元, 孟德胜, 刘雅恬. 基于 Fas/FasL 信号通路探究雷帕霉素对食管癌裸鼠瘤体抑制及放疗增敏的作用机制 [J]. *现代药物与临床*, 2025, 40(1): 15-22.
- [10] Cai J, Xie D N, Kong F J, et al. Effect and mechanism of rapamycin on cognitive deficits in animal models of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis of preclinical studies [J]. *J Alzheimers Dis*, 2024, 99(1): 53-84.
- [11] 郝凤霄, 曾梦楠, 曹兵, 等. 山茱萸水提取物对 A β ₂₅₋₃₅ 诱导阿尔茨海默病小鼠脑损伤和神经炎症的作用 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(15): 4015-4026.
- [12] Ren H J, Tang L, Yuan Z Y, et al. Combined administration of catalpol, puerarin, gastrodin, and borneol modulates the TLR4/Myd88/NF- κ B signaling pathway and alleviates microglia inflammation in Alzheimer's disease [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1492237.
- [13] 吴洋洋, 宋小鸽, 朱才丰, 等. 基于 mTOR/p70S6K 信号通路探讨艾灸对阿尔茨海默病小鼠自噬的影响 [J]. *中国针灸*, 2022, 42(9): 1011-1016.
- [14] 樊赞, 窦润鹏, 胡久略, 等. 茯苓酸通过 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路调控铁死亡改善阿尔茨海默病大鼠认知障碍的研究 [J]. *中国全科医学*, 2024, 27(2): 177-183.
- [15] 谭慧英, 张先慧. 基于 JNK/p38 MAPK 信号通路探讨黄芪对阿尔茨海默病大鼠认知功能的影响 [J]. *北方药学*, 2024, 21(5): 1-4.
- [16] Liu J J, Wei F, Wang Y D, et al. Ginseng and *Polygonum multiflorum* formula protects brain function in Alzheimer's disease [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1461177.
- [17] Liu G D, Yang C, Wang X, et al. Oxygen metabolism abnormality and Alzheimer's disease: An update [J]. *Redox Biol*, 2023, 68: 102955.
- [18] Lin J X, Hong H H, Liu S C, et al. Aflatoxin B₁ exposure

- induces Alzheimer's disease like pathology by disrupting redox homeostasis and activating ferroptotic signals in C57BL/6 J mice [J]. *Sci Total Environ*, 2025, 970: 179049.
- [19] Ayobami F G, Ogundipe O J, Emmanuel A A, *et al.* Effects of lauric acid on cognitive impairment in a scopolamine-induced Alzheimer's disease-like rat model [J]. *Nutr Neurosci*, 2025, 28(10): 1304-1314.
- [20] Kumari S, Dhapola R, Reddy D H. Apoptosis in Alzheimer's disease: Insight into the signaling pathways and therapeutic avenues [J]. *Apoptosis*, 2023, 28(7/8): 943-957.
- [21] Alharbi K M, Alshehri S A, Almarwani W A, *et al.* Effects of cycloastragenol on Alzheimer's disease in rats by reducing oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2024, 21(2): 141-154.
- [22] Yang Y, Wang L M, Zhang C J, *et al.* Ginsenoside Rg₁ improves Alzheimer's disease by regulating oxidative stress, apoptosis, and neuroinflammation through Wnt/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2022, 99(6): 884-896.
- [23] Sose P M, Doshi G M, Kale P P. An update on autophagy as a target in the treatment of Alzheimer's disease [J]. *Curr Drug Targets*, 2023, 24(7): 547-567.
- [24] 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.
- [25] Wang X C, Jia J P. Magnolol improves Alzheimer's disease-like pathologies and cognitive decline by promoting autophagy through activation of the AMPK/mTOR/ULK1 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 161: 114473.
- [26] Liang C M, Mu Y Y, Tian H, *et al.* microRNA-140 silencing represses the incidence of Alzheimer's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2021, 758: 135674.
- [27] 邓敏贞, 黄丽平, 马阮昕, 温晓文. 石菖蒲挥发油联合人参总皂苷通过调节 PI3K/Akt/mTOR 通路对痴呆模型 APP/PS1 双转基因小鼠的 A β 40 和 GFAP 的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(4):92-95.
- [28] Liu X, Huang R, Wan J Y. Puerarin: A potential natural neuroprotective agent for neurological disorders [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114581.
- [29] Chauhan P, Wadhwa K, Mishra R, *et al.* Investigating the potential therapeutic mechanisms of puerarin in neurological diseases [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(12): 10747-10769.
- [30] Zhang T C, Lin Y C, Sun N N, *et al.* Icariin, astragaloside a and puerarin mixture attenuates cognitive impairment in APP/PS1 mice via inhibition of ferroptosis-lipid peroxidation [J]. *Neurochem Int*, 2024, 175: 105705.
- [31] Hou S J, Zhang S X, Li Y, *et al.* Rapamycin responds to Alzheimer's disease: A potential translational therapy [J]. *Clin Interv Aging*, 2023, 18: 1629-1639.
- [32] Ebrahim N, Al Saihati H A, Alali Z, *et al.* Exploring the molecular mechanisms of MSC-derived exosomes in Alzheimer's disease: Autophagy, insulin and the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 176: 116836.
- [33] Zhang W W, Feng C, Jiang H. Novel target for treating Alzheimer's diseases: Crosstalk between the Nrf2 pathway and autophagy [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 65: 101207.
- [34] Guo C J, Zhang Y, Nie Q, *et al.* SQSTM1/p62 oligomerization contributes to A β -induced inhibition of Nrf2 signaling [J]. *Neurobiol Aging*, 2021, 98: 10-20.
- [35] Chen Y, Li Y T, Wu M, *et al.* Electroacupuncture improves cognitive function in APP/PS1 mice by inhibiting oxidative stress related hippocampal neuronal ferroptosis [J]. *Brain Res*, 2024, 1831: 148744.
- [36] Zhang Z X, Zhang S M, Liu S, *et al.* Fuzhisan ameliorates cognitive ability in Alzheimer's disease by p62 and related autophagy regulatory pathways [J]. *Brain Res*, 2025, 1849: 149436.

[责任编辑 李亚楠]