· 药理与临床 ·

调心方对杏仁核注射 $A\beta_{25-35}$ 诱导的阿尔茨海默病模型大鼠的影响

刘学源, 赵伟康, 徐品初, 林水淼*

(上海中医药大学老年医学研究所, 上海 200032)

摘要: 目的 研究调心方 (HBR) 对杏仁核注射 β -淀粉样蛋白 ($A\beta_{25-35}$) 致阿尔茨海默病 (AD) 模型大鼠相关病理变化的作用。方法 单侧杏仁核注射 $A\beta_{25-35}$ 造成 AD 大鼠模型, 采用 Morris 水迷宫法、放射免疫法、免疫组化法、RT-PCR 法, 以 Aricept 为对照, 观察 HBR 对 AD 模型大鼠的空间学习记忆能力、胆碱能系统、 $A\beta_{40}$ 沉积、tau 蛋白异常磷酸化及脑额叶皮层内 APP mRNA 表达的影响。结果 HBR 可显著改善 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 AD 大鼠空间学习记忆障碍, 提高模型大鼠的胆碱乙酰化转移酶 (ChAT) 活性及 M 受体结合容量 (Rt) 值, 减少 APP mRNA 的表达和 $A\beta_{40}$ 的沉积, 抑制 tau 蛋白的异常磷酸化。结论 HBR 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 AD 大鼠空间学习记忆障碍及胆碱能系统损害具有显著改善作用, 可以明显减轻 $A\beta_{40}$ 的沉积和 tau 蛋白的异常磷酸化。

关键词: 调心方; 阿尔茨海默病; β -淀粉样蛋白 ($A\beta_{25-35}$); tau 蛋白异常磷酸化

中图分类号: R 285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)01-0050-04

Effect of Heart-benefitting Recipe on Alzheimer's disease rats after unilateral $A\beta_{25-35}$ injection into amygdala

LIU Xue-yuan, ZHAO Wei-kang, XU Pin-chu, LIN Shui-miao

(Institute of Geriatrics, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

Abstract: **Object** To investigate the effects of Heart-benefitting Recipe (HBR) on the histopathological changes of Alzheimer's disease (AD) rats after unilateral amyloid- β_{25-35} protein ($A\beta_{25-35}$) injection into the amygdala. **Methods** The experimental rat models with dementia, spatial learning, and memory impairment were induced by unilateral amyloid β_{25-35} protein ($A\beta_{25-35}$) injection into the amygdala of rats. The spatial learning and memory ability and the function of cholinergic system were observed by the means of Morris water maze and radioligand binding assay. The protein expression of $A\beta_{40}$, AT8 was estimated with immunohistochemistry. The expression of mRNA related to APP was observed by RT-PCR. **Results** HBR significantly alleviated the spatial learning and memory impairment induced by $A\beta_{25-35}$ and remarkably increased the activity of ChAT and Rt of M-receptor binding sites of these models. The expressions of $A\beta_{40}$ protein and APP mRNA in cortex and hippocampus of AD rats were decreased remarkably by HBR. The results of immunohistochemistry showed that the expression of hyperphosphorylated tau AT8 in cortex and hippocampus of AD rats was inhibited significantly by HBR. **Conclusion** HBR can effectively improve the spatial learning and memory impairment, decrease the deposition of $A\beta_{40}$, and alleviate the hyperphosphorylation of tau of AD rats induced by $A\beta_{25-35}$.

Key words: Heart-benefitting Recipe (HBR); Alzheimer's disease (AD); amyloid- β_{25-35} protein ($A\beta_{25-35}$); hyperphosphorylated tau

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是老年期发生的以进行性痴呆为特征的脑变性疾病, 其病因尚未完全研究清楚, 因此缺乏有效的治疗措施^[1]。中医认为心为君主之官, 主血脉, 司神明, 与人的生命活动、思维意识、记忆等活动密切相关。若心气不足, 则心血不旺、血行不畅而神明失养; 心气不

足又可导致痰浊上蒙、闭窍蒙神, 致神明失用。调心方 (HBR) 以党参补气, 安神明; 以菖蒲、远志、茯苓化痰浊、通心窍, 临床治疗 AD 取得较好效果。该方能明显改善患者的认知功能, 提高患者的生活能力^[2]。实验研究表明, HBR 能显著改善单侧电解损毁大脑基底核造成的“痴呆”模型大鼠的记忆功能,

* 收稿日期: 2003-05-15

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (39830450)

作者简介: 刘学源 (1962—), 男, 山东临朐人, 副主任医师, 博士, 现任同济大学附属铁路医院神经内科主任, 同济大学临床一系神经病学教研室主任, 研究方向为老年痴呆的中西医结合治疗。Tel: (021) 51227947 E-mail: xueyuanliushjtj@yahoo.com.cn

增强模型大鼠大脑皮层胆碱乙酰化转移酶 (ChAT) 活性, 升高海马 M 受体和 N 受体结合容量 (Rt) 值, 明显提高模型大鼠大脑皮层去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA) 和 5-羟色胺 (5-HT) 的水平^[3]。因此本实验采用能反映 AD 主要病理特征的杏仁核注射 A β_{5-35} 致 AD 大鼠模型, 用胆碱脂酶抑制剂 Aricept 做对照, 从空间学习记忆、胆碱能系统、APP mRNA 表达、A β_{40} 沉积、tau 蛋白异常磷酸化等方面, 研究 HBR 治疗 AD 的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物: 选用 SD 雄性大鼠, 清洁级, 体重 (250 ± 30) g, 购自中国科学院上海实验动物中心。大鼠单笼饲养, 自由摄食与饮水, 室温 18 ~ 20 ℃, 日光辅助照明, 维持每日光照 12 h。

1.2 药物: HBR 由党参、茯苓、远志、桂枝、菖蒲等中药组成, 每剂含生药 149 g, 用水提醇沉法制成含生药 7.45 g/mL 的水溶液, 备用。

2 方法

2.1 动物模型的制备: 大鼠以 2% 异戊巴比妥钠 (40 mg/100 g) ip 麻醉, 立体定向仪固定头部, 切开皮肤, 暴露头骨, 于前囟后 3.2 mm, 右侧旁开 4.3 mm, 深度 8.5 mm 进针。每次注射 A β_{5-35} (Sigma 公司) 5.0 nmol (0.1% 三氟乙酸溶解), 假手术组注射等量 0.1% 三氟乙酸, 注射时平稳进针, 6 min 内注射完毕, 留针 5 min 后缓慢退出^[4]。

2.2 分组及给药: 模型大鼠按体重随机分为 4 组: 假手术组, AD 模型组, HBR 组, Aricept 组; 另取正常大鼠作正常对照组。各组动物于造模前一周开始 ig 给药, 每天 1 次, 连续 3 周。迷宫训练期间, 于训练前 0.5 h 给药。HBR 组用药剂量为 24.8 g (生药)/kg (相当于成人每天用量的 10 倍), Aricept 用药剂量为 0.125 mg/kg (相当于成人用药量)。迷宫训练期间, 其余各组 ig 等量的双蒸水。

2.3 空间学习记忆力测试: 采用 Morris 水迷宫法^[5]。平台设于迷宫东北象限正中, 水平面高出平台 1.5 cm, 水温保持在 19 ~ 20 ℃, 大鼠连续训练 6 d, 每天 2 次, 设定最长游动时间为 70 s, 以秒表计时, 记录大鼠找到平台所需时间 (潜伏期, EL)。

2.4 ChAT 活性测定: 采用 [¹⁴C] Ac-CoA 掺入法^[6]。 [¹⁴C] Ac-CoA 为 Amersham 公司产品, 比放射性 1 887 TBq/mol。

2.5 乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性测定: 采用改良的微量羟胺比色法^[7]。

2.6 M 受体 Rt 值测定: 采用 ³H-QNB 受体结合

法^[8]。³H-QNB: Amersham 公司产品, 比放射性 1 887 TBq/mol。

2.7 A β_{40} , AT₈ 免疫组织化学法 (采用 SABC 法)^[9]: A β_{40} 一抗为兔抗大鼠单克隆抗体, 稀释度为 1 500, 二抗为生物素标记的羊抗兔 IgG, 稀释度为 1 100; AT₈ 一抗为小鼠抗大鼠单克隆抗体, 稀释度为 1 500, 二抗为生物素标记的羊抗小鼠 IgG, 稀释度为 1 100。

2.8 APP mRNA 表达检测 (RT-PCR 法): 引物设计^[10]: APP_{KPI}: 5'-TGCCACCACT ACCACA ACTA-3 (正义链), 5'-GTTCTGCATCTGCTCAAAG-3 (反义链), 扩增片段为 1 269 bp。APP_{MPI}: 5'-GGAT-GCGGAGTTCGGACATG-3 (正义链), 5'-GTT-CTGCATCTGCTCAAAG-3 (反义链), 扩增片段为 297 bp。G₃PD: 5'-GGTGAAGGTCGGTGTCA-AC-3 (正义链), 5'-GGGGTCTTGATGG-CAA-CA-3 (反义链), 扩增片段为 100 bp。

2.9 统计方法: 水迷宫数据采用重复测量设计的方差分析, 应用 6.12 统计软件在 PC 上处理, 并用 Duncan 或 SNK 进行组间两两比较。

3 结果

3.1 对 AD 大鼠空间学习记忆力的影响: 随训练天数增加, 各组大鼠平均 EL 逐渐缩短。与正常组及假手术组比较, 模型组大鼠 EL 明显延长, 第 4 天开始差异显著 ($P < 0.05$)。与模型组比, HBR 组大鼠第 3 天开始 EL 明显缩短, 差异显著 ($P < 0.05$); Aricept 组第 4 天开始 EL 明显缩短, 差异显著 ($P < 0.05$)。正常组与假手术组比较, HBR 组与 Aricept 组比较, 差异均不显著 ($P > 0.05$)。表明 HBR, Aricept 均能显著改善 A β_{5-35} 诱导的大鼠空间学习记忆障碍, 而 HBR 作用最为显著, 见表 1。

3.2 对 ChAT 及 AChE 活性的影响: 见表 2。与正常组及假手术组比较, 模型组海马 ChAT 活性明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, HBR 组 ChAT 活性明显升高 ($P < 0.05$), 而 Aricept 组变化不明显, 且显著低于正常组及假手术组 ($P < 0.05$)。提示 HBR 能显著提高 A β_{5-35} 诱导的降低的 ChAT 活性, 而 Aricept 作用不明显。与此作用不同的是, 与正常组及假手术组比较, 模型组额叶皮层 AChE 活性无明显变化, 与模型组比较, HBR 组 AChE 活性差异不显著, 而 Aricept 组 AChE 活性则明显降低 ($P < 0.05$)。提示 Aricept 能显著降低 A β_{5-35} 诱导的 AD 大鼠 AChE 活性, HBR 则作用不明显。

3.3 对 M 受体 Rt 值的影响: 见表 3。与正常组及

表 1 HBR 对杏仁核注射 $A\beta_{25-35}$ 致 AD 大鼠空间学习记忆力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of HBR on spatial learning and memory of AD rats after $A\beta_{25-35}$ injection into amygdala ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	潜伏期/s					
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
正常	58.68 ± 6.86	47.13 ± 8.79	43.18 ± 11.30	32.56 ± 8.42*	23.50 ± 4.96*	18.00 ± 5.11*
假手术	58.37 ± 5.23	50.18 ± 6.73	44.25 ± 8.59	34.18 ± 12.87*	26.25 ± 8.80*	25.00 ± 6.72*
AD 模型	60.18 ± 6.69	57.43 ± 4.83	54.87 ± 9.29	52.18 ± 7.15	51.37 ± 10.67	50.37 ± 10.08
HBR	59.44 ± 8.30	53.68 ± 6.64	39.87 ± 6.06*	33.93 ± 7.09*	24.31 ± 3.89*	22.75 ± 7.69*
Aricept	61.50 ± 7.90	55.50 ± 9.21	49.20 ± 10.87	39.25 ± 10.26*	36.18 ± 7.87*	30.50 ± 4.39*

与 AD 模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs AD model group

表 2 HBR 对杏仁核注射 $A\beta_{25-35}$ 致 AD 大鼠 ChAT 及 AchE 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of HBR on activities of ChAT and AchE of AD rats after $A\beta_{25-35}$ injection into amygdala ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	海马 ChAT/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)	额叶皮层 AchE/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)
正常	14.06 ± 1.72*	0.193 ± 0.026
假手术	12.07 ± 2.33*	0.192 ± 0.034
AD 模型	7.16 ± 1.52	0.161 ± 0.021
HBR	13.21 ± 2.75*	0.162 ± 0.022
Aricept	7.99 ± 0.82	0.082 ± 0.023*

与 AD 模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs AD model group

假手术组比较, 模型组皮层 M 受体 R_t 值显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, HBR 组 M 受体 R_t 值则明显升高 ($P < 0.05$), Aricept 组 M 受体 R_t 值虽然较模型组显著升高, 但明显低于其他 3 组 ($P < 0.05$)。提示 HBR 能有效提高 $A\beta_{25-35}$ 诱导的降低的 M 受体 R_t 值, Aricept 的作用则明显低于 HBR。

表 3 HBR 对杏仁核注射 $A\beta_{25-35}$ 致 AD 大鼠皮层 M 受体 R_t 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of HBR on R_t of M-receptor binding sites in cortex of AD rats after $A\beta_{25-35}$ injection into amygdala ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	M 受体 R_t 值/ ($\text{fmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)
正常	2 202.05 ± 129.04*
假手术	2 131.96 ± 91.01*
AD 模型	1 082.67 ± 166.06
HBR	2 124.05 ± 413.56*
Aricept	1 440.34 ± 125.44*

与 AD 模型组比较: * $P < 0.05$; 与 Aricept 组比较: $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs AD model group; $P < 0.05$ vs Aricept group;

3.4 对模型大鼠脑内 $A\beta_{40}$ 沉积的影响: $A\beta_{40}$ 免疫组化染色结果显示, 模型组可见皮质、海马大量 $A\beta_{40}$ 阳性细胞, 呈神经元核周质及突起 $A\beta_{40}$ 染色阳性, 间质也见大量的 $A\beta_{40}$ 免疫组化着色, 与正常组及假手术组比较, 皮质、海马的 $A\beta_{40}$ 阳性细胞数, $A\beta_{40}$ 免疫组化着色平均吸光度均明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组

比较, HBR 组的 $A\beta_{40}$ 阳性细胞数、 $A\beta_{40}$ 免疫组化着色平均吸光度明显降低 ($P < 0.05$); Aricept 组虽有降低但不明显 ($P > 0.05$)。表明 $A\beta_{25-35}$ 致 AD 大鼠脑内 $A\beta_{40}$ 的表达明显增高, 而 HBR 可显著减轻模型大鼠脑内 $A\beta_{40}$ 的沉积, 见表 4。

表 4 HBR 对杏仁核注射 $A\beta_{25-35}$ 致 AD 大鼠 $A\beta_{1-40}$ 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of HBR on expression of $A\beta_{1-40}$ in AD rats after $A\beta_{25-35}$ injection into amygdala ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	阳性细胞数		吸光度	
	海马 (CA2)	额皮质	海马 (CA2)	额皮质
正常	29.12 ± 5.36	32.25 ± 4.46	0.181 ± 0.047	0.199 ± 0.041
假手术	32.50 ± 5.04	40.00 ± 5.61	0.219 ± 0.027	0.210 ± 0.017
AD 模型	60.25 ± 9.56	70.75 ± 6.96	0.464 ± 0.049	0.451 ± 0.055
HBR	49.13 ± 4.32*	51.00 ± 7.37*	0.294 ± 0.044*	0.284 ± 0.040*
Aricept	60.75 ± 5.04	63.63 ± 5.80	0.410 ± 0.028	0.416 ± 0.029

与 AD 模型组比较: * $P < 0.05$; 与正常组比较: $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs AD model group; $P < 0.05$ vs normal group

3.5 对模型大鼠脑内异常磷酸化 tau 蛋白表达的影响: 见表 5。AT₈ 蛋白免疫组化染色结果显示, 模型组可见皮质、海马、杏仁核等部位大量阳性细胞, 呈神经元核周质及突起异常磷酸化 tau 蛋白染色阳性, 轴突明显增粗, 染色加深; 皮质、海马、杏仁核等部位阳性细胞数及异常磷酸化 tau 蛋白染色着色平均吸光度显著高于正常组及假手术组 ($P < 0.05$)。表明 $A\beta_{25-35}$ 的神经细胞毒性作用在 tau 蛋白的异常磷酸化及神经原纤维缠结 (NFT) 形成过程。与模型组比较, HBR 组皮质、海马、杏仁核等部位阳性细胞数及平均吸光度值明显降低 ($P < 0.05$)。Aricept 组作用不明显。

3.6 对模型大鼠脑额叶皮层内 APP mRNA 表达的影响: 抽提大鼠脑额叶皮层总 RNA 琼脂糖凝胶电泳, 可见清晰的 28 S, 18 S, 5 S 区带, 28 S 明显多于 18 S, 说明 RNA 未降解。APP_{KPI} 及 APP_{MPI} 引物分别同时与 G₃PD 进行 PT-PCR, PCR 产物琼脂

表 5 HBR 对杏仁核注射 $A\beta_{25-35}$ 致 AD 大鼠异常磷酸化 tau 蛋白 AT₈ 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 5 Effect of HBR on expression of hyperphosphorylated tau (AT₈) in AD rats after $A\beta_{25-35}$ injection into amygdala ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	阳性细胞数		吸光度	
	海马 (CA ₂)	额皮质	海马 (CA ₂)	额皮质
正常	21.25 ± 2.82	18.25 ± 2.43	0.135 ± 0.028	0.130 ± 0.028
假手术	21.87 ± 3.36	23.38 ± 4.27	0.136 ± 0.031	0.190 ± 0.037
AD 模型	49.75 ± 7.74	56.00 ± 10.39	0.318 ± 0.037	0.278 ± 0.040
HBR	27.38 ± 3.85*	29.63 ± 3.58*	0.155 ± 0.023*	0.138 ± 0.038*
Aricept	46.63 ± 6.14	49.25 ± 5.50	0.228 ± 0.049	0.228 ± 0.033

与 AD 模型组比较: * $P < 0.05$; 与正常组比较: $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs AD model group; $P < 0.05$ vs normal group

糖凝胶电泳, 可见分别扩增出了 1 269 bp (KPI), 297 bp (MPI) 和 100 bp (G₃PD) 条带, 图像分析结果显示, 与正常组及假手术组比较, 模型组 KPI (1 269 bp)、MPI (297 bp) 条带表达均明显增高。而与模型组比较, HBR 组上述条带表达明显减弱。Aricept 组无明显变化。表明模型大鼠脑额叶皮层 APP mRNA 表达显著增高, 而 HBR 能有效抑制这一变化, Aricept 作用不明显, 见表 6。

表 6 HBR 对杏仁核注射 $A\beta_{25-35}$ 致 AD 大鼠脑皮层 APP mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 6 Effect of HBR on expression of APP mRNA in cortex of AD rats after $A\beta_{25-35}$ injection into amygdala ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	平均灰度	
	MPI/G ₃ PD	KPI/G ₃ PD
正常	0.91 ± 0.04	0.72 ± 0.03
假手术	1.02 ± 0.07	0.49 ± 0.02
AD 模型	1.96 ± 0.08	1.43 ± 0.06
HBR	0.43 ± 0.05*	0.82 ± 0.03*
Aricept	1.88 ± 0.07	1.25 ± 0.05

与 AD 模型组比较: * $P < 0.05$; 与正常组比较: $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs AD model group; $P < 0.05$ vs normal group

4 讨论

AD 是严重危害人类健康的疾病之一, 发病率呈逐渐增高的趋势, 其病因还不完全清楚, 因而缺乏理想的动物模型和治疗方法。以往主要有中枢胆碱能神经系统破坏模型、实验性自身免疫性痴呆模型、自然衰老模型等, 但这些模型均不能全面反映出 AD 的病理特征, 限制了其临床应用^[1]。近几年重点转移到研制具有 $A\beta_{1-40}$ 沉积和神经原纤维缠结特征的 AD 模型。本研究采用单侧杏仁核注射 $A\beta_{25-35}$ 的方法, 造成同时具有 $A\beta_{1-40}$ 沉积和 tau 蛋白异常磷酸化 AD 两大病理变化的大鼠痴呆模型。水迷宫实验

结果表明该模型大鼠存在明显的空间学习记忆障碍, ChAT 活力及 M 受体 R_t 值均显著下降。

本实验结果表明 HBR 能显著改善杏仁核注射 $A\beta_{25-35}$ 致 AD 大鼠模型的空间学习记忆能力, 提高 ChAT 活性及 M 受体的 R_t 值; 下调大脑皮质和海马 APP751/770mRNA 的表达; 减轻 $A\beta_{1-40}$ 在大脑内的沉积; 同时还能抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的异常磷酸化 tau 蛋白 (AT₈) 的形成。说明 HBR 能通过改善 AD 两个主要病理特征的物质基础, 从而提高模型大鼠学习记忆力。同时还可能通过抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 tau 蛋白异常磷酸化蛋白激酶 GSK-3 β /TPK-K 等, 从而降低 tau 蛋白异常磷酸化, 改善胆碱能神经元功能^[12]。可见 HBR 防治 AD 的作用是多靶点、多环节综合的结果。

References:

- [1] Galasko D. Biological markers and the treatment of Alzheimer's disease [J]. *J Mol Neurosci*, 2001, 17(2): 119-125.
- [2] Lin C X. Clinical study of Heart Benefitting and Kidney-tonifying Recipe on the mentality of AD patients [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 1959, 9: 8.
- [3] Zhao W K. Effects of traditional Chinese medical Heart-benefitting and Kidney-tonifying on adrenergic nervous system of the "dementia" and dysmnnesia rat model [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1993, (Collection of Basal Theses): 20-21.
- [4] Sigurdsson E M, Lorens S A, Hejna M J, et al. Local and distant histopathological effects of unilateral amyloid- β_{25-35} injections into the amygdala of young F344 rats [J]. *Neurobiol Aging*, 1996, 17(6): 893-897.
- [5] Morris R. Developments of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat [J]. *J Neurosci Methods*, 1984, 11: 47-50.
- [6] Fonnum F. A rapid radiochemical method for the determination of cholineacetyl transferase [J]. *J Neurochem*, 1975, 24: 407-411.
- [7] Zhao W K, Dai X D, Shentu S J. Study of HBR on the "dementia" and dysmnnesia rat model [J]. *J Shanghai Univ Tradit Chin Med* (上海中医药大学学报), 1998, 12(2): 59-60.
- [8] Liu X Y, Zhao W K, Xu P C, et al. Effects of Heart Benefitting Recipe (HBR) on the spatial learning and memory impairment and cholinergic system in unilateral amyloid- β injections into the amygdala of rats [J]. *Modern Rehabilitation* (现代康复), 2001, 5(5): 48-50.
- [9] Augustinack J C, Sanders J L, Tsai L H. Colocalization and fluorescence resonance energy transfer between cdk5 and AT8 suggests a close association in pre-neurofibrillary tangles and neurofibrillary tangles [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002, 61(6): 557-564.
- [10] Shi J, Xiang Y, Simpkins J W. Hypoglycemia enhances the expression of mRNA encoding β -amyloid precursor protein in rat primary cortical astroglial cells [J]. *Brain Res*, 1997, 772: 247-251.
- [11] Games D, Adames D, Alessandrini R, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpression V717F β -amyloid precursor protein [J]. *Nature*, 1995, 373: 523-527.
- [12] Blennow K, Vanmechelen E, Hampel H. CSF total tau, A-beta42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2001, 24(1-3): 87-97.