

补益脾胃元气方药对 SAMP8 小鼠学习记忆及海马区 PKA/ERK/p-CREB 信号通路的影响

屈夏夏¹, 第五永长^{2*}, 雷筱菁¹, 陈璐¹, 温晓强¹, 岳涛¹

1. 陕西中医药大学 第一临床医学院 中医系, 陕西 咸阳 712000

2. 陕西中医药大学 发展规划处办公室, 陕西 咸阳 712000

摘要: **目的** 观察补益脾胃元气类方药人参汤、洗心汤、大补元煎对 SAMP8 小鼠学习记忆能力和海马区蛋白激酶 A (PKA) / 细胞外调节激酶 (ERK) / 磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白 (p-CREB) 信号通路的影响, 探讨其防治阿尔茨海默病 (AD) 的作用机制。 **方法** 将 3 月龄 SAMP8 小鼠随机分为模型组、安理申组、补益脾胃元气类方药组 (人参汤组、大补元煎组、洗心汤组), 另以 3 月龄 SAMR1 小鼠作为对照组, 共 6 组, 连续 ig 给药 10 周后进行相关指标检测。采用 Morris 水迷宫实验观察各组小鼠空间学习记忆能力。免疫组化法检测 PKA 蛋白表达, 免疫荧光法检测 ERK、p-CREB 蛋白表达。蛋白印迹法检测小鼠海马区 PKA、p-CREB、ERK 蛋白表达。 **结果** 与模型组比较, 补益脾胃元气类方药各组小鼠逃避潜伏期缩短, 在目的象限游泳时间及穿越平台次数增加 ($P < 0.05$ 、 0.01); 免疫组化结果提示补益脾胃元气类方药各组小鼠海马区 PKA 蛋白表达量增加; 免疫荧光结果提示补益脾胃元气类方药各组小鼠海马区 ERK、p-CREB 蛋白表达量增加; 蛋白印迹实验结果与免疫组化、荧光结果一致 ($P < 0.05$ 、 0.01)。 **结论** 补益脾胃元气类方药对 SAMP8 小鼠空间学习记忆有明显的改善作用, 其机制可能与改善海马区 PKA/ERK/p-CREB 信号通路有关。

关键词: 阿尔茨海默病; 补益脾胃元气方药; 人参汤; 洗心汤; 大补元煎; 学习记忆; PKA/ERK/p-CREB 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)14-3389-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.14.018

Effects of Chinese herbal medicine of tonifying spleen and stomach on learning and memory ability and PKA/ERK/p-CREB pathway in hippocampus of SAMP8 mice

QU Xia-xia¹, DIWU Yong-chang², LEI Xiao-jing¹, CHEN Lu¹, WEN Xiao-qiang¹, YUE Tao¹

1. Department of Traditional Chinese Medicine, First College of Clinical Medicine, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

2. Office of Development and Planning, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

Abstract: Objective To study the effects of prescriptions including Ginseng Decoction, Xixin Decoction, and Dabuyuan Decoction for tonifying spleen and stomach on learning and memory ability and PKA/ERK/p-CREB pathway in hippocampus of SAMP8 mice, and explore the mechanism in the prevention and treatment of Alzheimer's disease (AD). **Methods** Three-month-old SAMP8 mice were randomly divided into model group, Donepezil Hydrochloride group, prescription group of Tonifying Spleen and Stomach Yuanqi Prescription (Ginseng, Xixin Decoction, and Dabuyuan Decoction). Moreover, three-month-old SAMR1 mice were recruited as a normal control group, six groups in total. Related indices were detected after 10 weeks continuous gastrogavage. The spatial learning-memory deficit of mice was detected by Morris water maze test. The expression levels of PKA protein in hippocampal region of mice were detected by immunohistochemistry, and the expression levels of ERK and p-CREB protein in hippocampal region of mice were detected by immunofluorescence. The protein expression levels of PKA, ERK, and p-CREB in hippocampus were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the escape latency of the prescription group of tonifying spleen and

收稿日期: 2019-05-01

基金项目: 陕西省自然科学基金计划-重大基础研究项目 (2017ZDJC-15); 国家自然科学基金面上项目 (81674042)

作者简介: 屈夏夏 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中医内科学-老年病方向。Tel: 15667280918 E-mail: 15667280918@163.com

*通信作者 第五永长 (1971—), 男, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为老年神经及血管疾病发病机制与中医药防治。

Tel: (029)38183461 E-mail: diwuyongchang@126.com

stomach was decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the swimming time and the times of crossing the platform in the target quadrant were increased ($P < 0.01$). Results of immunohistochemistry showed that the protein expression of PKA was significantly increased and the expression of ERK and p-CREB in hippocampal region was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The results of Western blotting were consistent with those of immunohistochemistry and immunofluorescence ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** The Tonifying Spleen and Stomach Yuanqi Prescription showed obvious improvement on the spatial learning-memory deficit in SAMP8 mice, which might be associated with affecting the PKA/ERK/p-CREB pathway in hippocampal region.

Key words: Alzheimer's disease; Tonifying Spleen and Stomach Yuanqi Prescription; Ginseng Decoction; Xixin Decoction; Dabuyuan Decoction; learning and memory ability; PKA/ERK/p-CREB pathway

阿尔茨海默病 (AD), 是一种中枢神经系统退行性疾病^[1], 其症状表现为渐进性记忆丧失和认知障碍等^[2]。该病起病隐匿, 发展缓慢, 严重危害患者身心健康, 加重社会经济负担^[3]。目前 AD 发病机制尚不明确, 且无特效疗法^[4], 西医治疗 AD 效果有所局限, 而中医药在 AD 防治方面积累了丰富的临床经验^[5]。本课题组在多年文献研究及临床实践基础上提出 AD 的核心病机为脑髓空虚、痰浊蒙窍, 并依据“气生精, 精生髓”的理论, 提出以补益脾胃元气类方药防治 AD 的特色疗法^[6-7]。前期实验研究证实, 补益脾胃元气方药能够参与突触可塑性, 介导神经元保护, 促神经元修复与再生, 防治 AD 病理进展^[8-10]。本实验选用增龄性学习记忆缺陷 SAMP8 小鼠为模型^[11-12], 观察补益脾胃元气类代表方洗心汤、人参汤、大补元煎对 SAMP8 小鼠海马区蛋白激酶 A (PKA) /细胞外调节激酶 (ERK) /磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白 (p-CREB) 信号通路的影响^[13], 旨在阐明补益脾胃元气方药防治 AD 的部分作用机制, 为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

3 月龄 SPF 级 SAMP8 雄性小鼠 40 只, SAMR1 雄性小鼠 8 只, 体质量 (20 ± 2) g, 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 CXK(京) 2016-0010。饲养室温度为 (24 ± 2) °C, 湿度为 40%~70%, 光/暗周期 12 h/12 h, 实验过程中动物自由摄食和饮水。动物饲养和实验操作符合陕西中医药大学实验动物福利伦理委员会相关规定, 并经其批准实施。

1.2 药物

安理申片 (盐酸多奈哌齐片, 批号 1702010, 5 mg/片) 购自卫才药业有限公司; 中药配方颗粒均由国药集团广东一方制药有限公司提供, 为单味免煎颗粒等比配制而成。洗心汤: 人参 (批号 7061013)、茯神 (批号 6123033)、酸枣仁 (批号

6120933)、半夏 (批号 7080863)、陈皮 (批号 7091683)、炒神曲 (批号 7075033)、附子 (批号 6082283)、石菖蒲 (批号 7046595)、甘草 (批号 7120213), 浓缩为中药配方颗粒 15.6 g/剂。人参汤: 人参 (批号 7061013), 浓缩为中药配方颗粒 6 g/剂。大补元煎: 人参 (批号 7061013)、炒山药 (批号 7081273)、熟地 (批号 7100683)、杜仲 (批号 7090193)、当归 (批号 7121153)、山茱萸 (批号 7042573)、枸杞 (批号 7100823)、炙甘草 (批号 7120593), 浓缩为中药配方颗粒 12.4 g/剂。

1.3 试剂与仪器

ERK1/2、PKA、p-CREB 抗体均购自美国 Abcam 公司; GAPDH 抗体、HRP 标记山羊抗兔二抗 (杭州联科生物技术股份有限公司); Alexa Fluor488 标记驴抗兔二抗 (美国 Technologies Life 公司); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司); 苏木精 (日本 Sigma 公司); Morris 水迷宫 (上海欣软信息科技有限公司); RM2235 型轮转式切片机 (Leica 公司); BX43 型显微镜 (Olympus 公司); SpectraMax Plus384 型全波长酶标仪 (Molecular Devices 公司); Mini-Proten Tetra System 电泳系统、ChemiDoc XRS + System 凝胶成像仪 (Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组与给药

SAMP8 小鼠适应性喂养 1 周后随机分为模型组、安理申组、洗心汤组、人参汤组和大补元煎组, SAMR1 小鼠作为对照组, 每组 8 只。所有药物采用研钵研末成粉, 超纯水加热至 60 °C 溶解, 给药剂量根据临床用量等效剂量和小鼠体形系数折算^[14], 各组给药量分别为人参汤 1.2 g/(kg·d)、洗心汤 3.2 g/(kg·d)、大补元煎 2.5 g/(kg·d)、安理申 1.02 mg/(kg·d)。模型组及对照组 ig 给予等体积超纯水。各组均按 0.2 mL/kg 给药, 每 4 周称体质量 1 次, 连续给药 10 周。

2.2 行为学测试

2.2.1 定位航行实验 行为学测试^[15]在安静、暗

光、恒温环境中进行,池壁粘贴 4 种几何图形,以辅助小鼠定位。实验前将清水注入水桶至预定高度(约 30 cm),加热器加热至 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。平台置于第 4 象限中央,低于水面约 1 cm,整个实验过程中平台位置保持不变。训练期依次从 4 个象限入水点将小鼠面向池壁放入水中,记录其找到平台的时间(逃避潜伏期)。若 90 s 内未找到站台,将其引至平台,并在平台上停留 30 s 后进行下一方向训练。实验进行 5 d 以检测小鼠的学习记忆能力。

2.2.2 空间搜索实验 定位航行实验结束 24 h 后,在电脑屏幕上用圆形环标记平台位置,后撤除平台,在第 2 象限将小鼠面向池壁放入水中,记录小鼠在目标象限停留时间及穿越平台次数,观察小鼠空间定位能力,检测小鼠记忆保持能力。

2.3 免疫组化检测 PKA 蛋白表达

末次行为学测试后,小鼠心脏灌注固定后开颅取脑,4%多聚甲醛溶液固定过夜,依次置于 80%、90%、95%、100%乙醇中脱水,二甲苯透明,浸蜡,以倒贴法用石蜡包埋组织并切片,厚度为 4 μm ,置于 65 $^\circ\text{C}$ 恒温箱中烤片 6~12 h。检测时二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水,3% H_2O_2 阻断、灭活内源性过氧化物酶,置于 0.01 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 6.0)中煮 10 min,自然冷却至室温,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min 以修复抗原。随后加一抗(1:50),4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,次日室温复温 30 min,弃一抗,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。再加二抗(1:300),37 $^\circ\text{C}$ 孵育 60 min,弃二抗,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。DAB 反应染色 10 min,苏木素复染,干燥,封片。用 Image-Pro plus 测量阳性表达的吸光度(A)值。

2.4 免疫荧光检测 ERK、p-CREB 蛋白表达

小鼠脑组织常规石蜡切片脱蜡水化,枸橼酸缓冲液中修复抗原,其余操作步骤同免疫组化。其中一抗为 1:100 稀释,二抗为 1:300 稀释。荧光显微镜拍片,Image-Pro Plus 测量荧光值。

2.5 Westren blotting 检测 PKA、p-CREB、ERK 蛋白表达

末次行为学测试后,小鼠断头取脑,冰浴上分离双侧海马,液氮速冻后存于 -80°C 冰箱。检测时取 0.1 mg 海马组织加入 500 μL 裂解液,离心(4 $^\circ\text{C}$, 11 000 r/min)20 min 后取上清。BCA 法蛋白定量后,加 5 $\times$ 上样缓冲液,100 $^\circ\text{C}$ 水浴 5 min,各泳道中分别加入 30 μg 样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,80 V 恒压电泳至溴酚蓝跑完浓缩胶层,后改用

120 V 恒压电泳,当溴酚蓝迁移至分离胶下缘时停止电泳。分离的蛋白在 250 mA 冰浴条件下转膜 30 min,将目的蛋白湿转到 PVDF 膜上,5% BSA 封闭液室温封闭 1 h。加一抗(PKA 1:2 000、p-CREB 1:500、ERK 1:1 000),4 $^\circ\text{C}$ 过夜,弃一抗,1 $\times$ TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。再加二抗(1:5 000),室温孵育 2 h,去二抗,1 $\times$ TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入 ECL 化学曝光显影,GAPDH 作为内参照,统计各组蛋白与 GAPDH 灰度值比值。

2.6 统计学方法

数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,定位航行实验结果采用双因素方差分析,其余各组数据间的比较采用单因素方差分析,方差齐时用 LSD 法,方差不齐时用 Dunnett's T3。

3 结果

3.1 补益脾胃元气方药对 AD 模型小鼠空间学习记忆能力的影响

Morris 水迷宫行为学测试反映小鼠的学习能力和记忆保持能力。在定位航行实验中,随训练次数增多,各组小鼠逃避潜伏期呈缩短趋势。与对照组比较,模型组小鼠逃避潜伏期显著延长($P < 0.05$ 、0.01)。与模型组比较,安理申组和补益脾胃元气方药各组小鼠逃避潜伏期显著缩短($P < 0.05$ 、0.01),见表 1。

空间探索实验中,与对照组比较,模型组小鼠在目标象限游泳时间显著缩短,穿越平台次数显著减少($P < 0.05$)。与模型组比较,安理申组和补益脾胃元气方药各组小鼠在目标象限游泳时间显著延长($P < 0.05$ 、0.01),洗心汤和大补元煎组小鼠穿越平台次数显著增加($P < 0.05$),见表 1。

3.2 补益脾胃元气方药对 AD 模型小鼠海马区 PKA 蛋白表达的影响

PKA 阳性呈褐色或黄褐色,在胞核及胞浆中表达。与对照组比较,模型组小鼠海马区 PKA 蛋白表达水平下降。与模型组比较,安理申组及补益脾胃元气方药各组小鼠海马区 PKA 蛋白表达水平升高,见图 1。

3.3 补益脾胃元气方药对 AD 模型小鼠海马区 p-CREB、ERK 蛋白表达的影响

p-CREB 为绿色荧光,表达于细胞核中。与对照组比较,模型组小鼠海马区 p-CREB 蛋白表达水平下降。与模型组比较,安理申组及补益脾胃元气类方药各组小鼠脑组织海马区 p-CREB 蛋白表达水平升高,见图 2。

表 1 补益脾胃元气方药对 AD 模型小鼠空间学习记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 1 Effects of Tonifying Spleen and Stomach Yuanqi Prescription on learning and memory ability of AD model mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	逃避潜伏期/s					穿越平台次数	目标象限游泳 时间/s
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天		
对照	—	38.98±11.72	35.93±17.97	33.53±12.81	31.85±14.63	28.40±9.55	1.50±0.52	22.34±6.87
模型	—	53.63±4.91*	52.73±7.09*	51.13±7.75*	50.44±8.29**	48.84±4.14**	0.33±0.52*	8.62±4.67**
安理申	1.02×10 ⁻³	46.31±9.45	45.10±11.03	42.67±15.17	37.92±8.85 [△]	36.15±11.41 [△]	0.83±1.17	15.34±3.59 [△]
人参汤	1.2	44.74±18.41	40.94±11.27	39.95±12.93	35.33±12.25 [△]	34.08±11.55 ^{△△}	1.00±0.89	17.45±4.11 ^{△△}
洗心汤	3.2	42.43±15.95	40.66±19.99	38.93±15.57	35.07±9.36 [△]	32.23±15.76 ^{△△}	1.17±0.41 [△]	17.89±2.86 ^{△△}
大补元煎	2.5	41.28±12.79	37.71±13.57	36.55±16.67 [△]	33.72±17.30 [△]	30.88±10.15 ^{△△}	1.33±0.52 [△]	17.93±3.70 ^{△△}

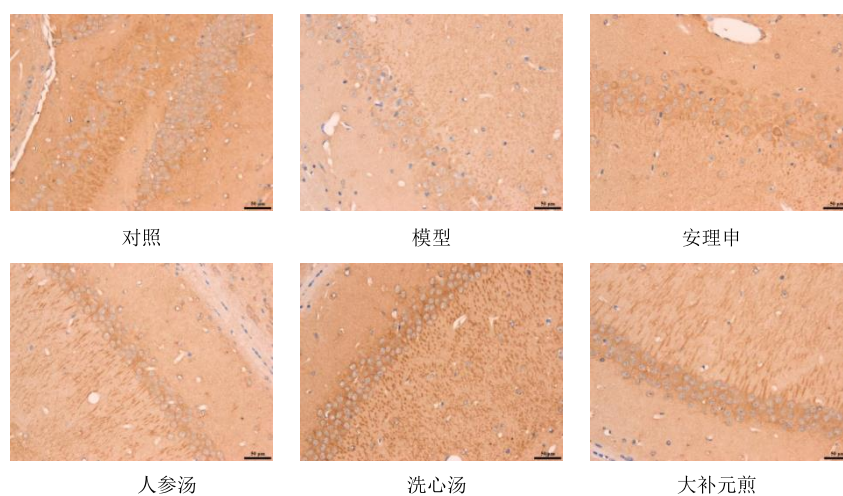
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group

图 1 补益脾胃元气方药对 AD 模型小鼠海马区 PKA 蛋白表达的影响 (免疫组化法, ×200)

Fig. 1 Effects of Tonifying Spleen and Stomach Yuanqi Prescription on protein expression of PKA in hippocampal region of AD model mice (immunohistochemistry, × 200)

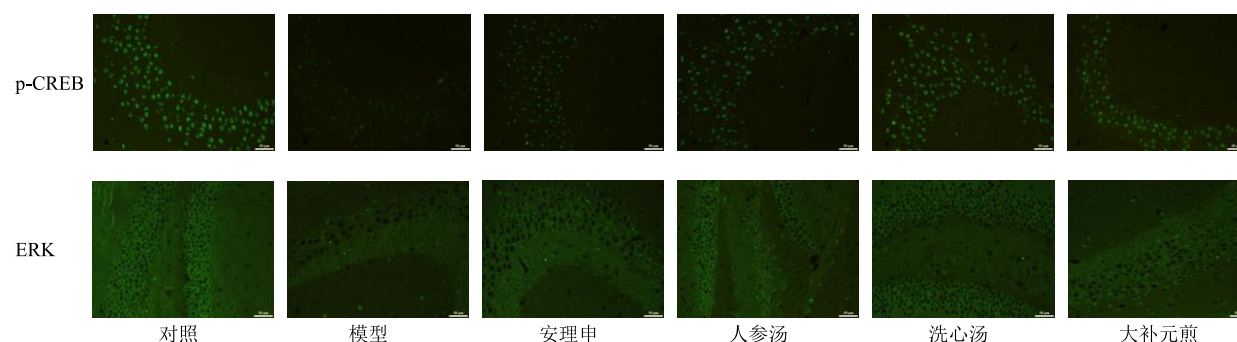


图 2 补益脾胃元气方药对 AD 模型小鼠海马区 p-CREB、ERK 蛋白表达的影响 (免疫荧光法, ×200)

Fig. 2 Effects of Tonifying Spleen and Stomach Yuanqi Prescription on protein expression of p-CREB and ERK in hippocampal region of AD model mice (immunofluorescence, × 200)

ERK 为绿色荧光, 主要表达于胞浆中。与对照组比较, 模型组小鼠海马区 ERK 蛋白表达水平明显降低。与模型组比较, 安理申组及补益脾胃元气方药各组小鼠海马区 ERK 蛋白表达水平升高, 见图 2。

3.4 补益脾胃元气方药对 AD 模型小鼠海马区 PKA、ERK、p-CREB 蛋白表达的影响

结果表明 (图 3), 与对照组比较, 模型组小鼠海马区 PKA、p-CREB、ERK 蛋白表达水平显著降

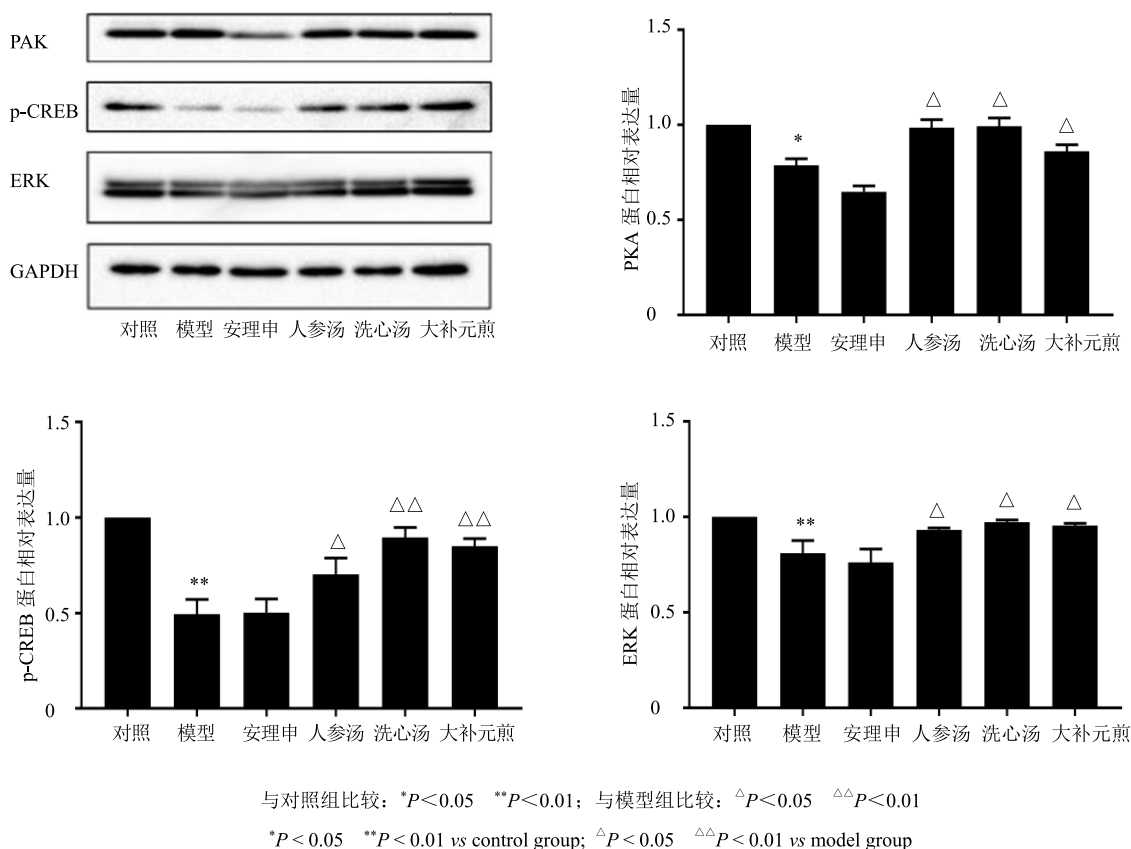


图 3 补益脾胃元气方药对 AD 模型小鼠海马区 PKA、ERK、p-CREB 蛋白表达的影响 (Western blotting, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
 Fig. 3 Effects of Tonifying Spleen and Stomach Yuanqi Prescription on protein expression of PKA, ERK, p-CREB in hippocampal region of AD model mice (Western blotting, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

低 ($P < 0.05$, 0.01)。与模型组比较, 补益脾胃元气方药各组小鼠海马区 PKA、p-CREB、ERK 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$, 0.01)。

4 讨论

AD 为神经系统退行性疾病, 其主要病理改变为老年斑^[16]、神经纤维缠结^[17]、神经细胞变性和凋亡^[18]、突触可塑性缺失等^[19]。海马是学习记忆调节中枢^[20], 其中海马长时程记忆 (LTP) 是学习记忆功能的基础, 是突触可塑性重要表现形式之一, 其形成需要基因转录和学习记忆相关蛋白合成^[21]。CREB 是多信号通路转导的汇聚点, p-CREB 是调节基因转录、诱导 LTP 和学习记忆形成的关键^[22]。PKA 由 4 个调节亚基 R、3 个催化亚基 C 组成, 其中 C 亚基是 CREB 磷酸化的关键, 为突触可塑性必需^[23]。ERK 可直接诱导树突蛋白合成, 该蛋白为 LTP 所必需, 此外 ERK 也参与了神经元形态学可塑性的形成过程^[24]。细胞内 Ca^{2+} 激活磷脂酶 C (PLC) 及腺苷酸环化酶 (AC) 活性, 使 PKA 磷酸化, 活化的 PKA 通过诱导 Rap21 和 B2Raf 结合启动 ERK,

活化的 ERK 通过激活核糖体 S6 激酶使 CREB 磷酸化, 从而调节下游脑源性营养因子 (BDNF)、神经生长因子 (NGF)、即早基因 (cfos、c-jun) 和突触素 I 等基因的转录, 促进与学习记忆相关蛋白合成, 参与突触可塑性, 抑制神经细胞凋亡, 介导神经元修复与再生等^[25]。此外, PKA 及 ERK 也可直接磷酸化 CREB, 分别通过 cAMP/PKA/p-CREB 通路及 ERK/MAPK 通路^[26-27]。因此 PKA、ERK、p-CREB 是 LTP 形成的中心分子途径, 参与记忆形成与巩固, 是构成中枢神经系统的重要结构。实验证实, CREB 活性降低可抑制 LTP 的形成^[28]。而使用 PKA 抑制剂可明显导致学习记忆障碍^[29]。此外有研究表明, ERK 参与了氯胺酮导致的学习记忆障碍形成的过程^[24]。因此 PKA/ERK/p-CREB 作为海马内信号传递经典调控通路, 在预防和治疗神经系统病变中起重要作用。

中医治疗 AD 多以补肾益精填髓为法, 本课题组提出老年性痴呆“髓空痰浊”病机观, 并依据“气生精, 精生髓”理论, 以补益脾胃元气类方药调补后天脾胃以使水谷之精充养脑髓, 达到益气生精养

髓,化痰开窍益智之功。《景岳全书·杂证谟》“癫狂痴呆”篇中指出该病“有可愈者,有不可愈者,亦在乎胃气元气之强弱”。因此,肾精、元气充足,必定以脾胃生理功能正常为前提^[30]。基于网络药理学分析发现治疗痴呆的方药主要由健脾、益气、利湿、开窍等药物配伍而成^[31]。此外现代研究表明肠道菌群与 AD 存在明显关联^[32],并提出从脾胃论治,与本研究观点高度一致。因此本课题组从脾胃入手,以补益脾胃元气方药防治 AD 切中病机。人参汤、洗心汤、大补元煎均以人参为君药以期补益脾胃元气,但三者组方又各有侧重。人参汤大补元气之功专,为治元气大亏之基础方;洗心汤则补脾益气与开郁化痰并重,适用于元气不足兼痰浊蒙窍证;大补元煎配伍以山药、熟地、当归等滋补肾阴之品,可达补肾益精填髓,脾肾同补之效,适用于久病元气大亏证。此外,前期大量实验证实洗心汤可介导神经元保护、参与突触可塑性、促进神经干/前体细胞(NSPCs)活力等,可改善 AD 动物模型学习记忆能力^[8-10]。相关研究表明,人参中含多种活性物质,其中人参皂苷能有效抑制 AD 病理进展^[33-34]。大补元煎通过补脾培元亦可延缓衰老,改善患者学习记忆能力^[35]。故本实验选用上述 3 方作为研究对象,以期揭示补益脾胃元气方药防治 AD 的部分作用机制。

SAMP8 小鼠在成熟期(4~6 月龄)快速老化,出现 A β 淀粉沉积、tau 蛋白磷酸化、神经元损伤,学习记忆障碍等异常改变^[36],因此常用于 AD 相关病理基础研究。本实验行为学测试结果表明模型组较对照组逃避潜伏期明显延长,提示 SAMP8 小鼠存在学习记忆功能受损;随训练次数增加,各治疗组小鼠逃避潜伏期均缩短,其中补益脾胃元气方药组逃避潜伏期明显缩短,在目标象限游泳时间及穿越台次数显著增加,表明补益脾胃元气方药对 SAMP8 小鼠的学习记忆损伤有明显的改善作用。

PKA、ERK、p-CREB 与神经元关系密切,本实验采用以上 3 个指标评价神经元损害程度。免疫组化及免疫荧光结果显示 PKA、ERK、p-CREB 在小鼠海马区均有表达。与模型组比较,补益脾胃元气方药组小鼠脑组织 PKA、ERK、p-CREB 蛋白表达量显著增加,Western blotting 检测进一步发现补益脾胃元气方药组小鼠脑组织 PKA、ERK、p-CREB 蛋白表达水平亦增高,与小鼠行为学检测结果一致,说明补益脾胃元气方药能够改善 SAMP8 小鼠学习记忆能力,其机制可能与提高 PKA、ERK、p-CREB

蛋白表达水平,激活 PKA/ERK/p-CREB 信号通路,促进 LTP 形成,影响海马突触可塑性,介导神经元保护,促进神经细胞修复、再生,抑制 AD 的发生和发展有关。在本研究中,补益脾胃元气方药 3 个代表方对 PKA、ERK、p-CREB 的蛋白表达组间差异不显著,因此关于补益脾胃元气药 3 个代表方防治 AD 的其他差异有待进一步研究。此外,与模型组比较,安理申组小鼠脑组织各蛋白表达虽有上升趋势,但差异不显著,而水迷宫实验结果显示,安理申组小鼠逃避潜伏期缩短、在目标象限游泳时间及穿越平台次数显著增加($P<0.05$),考虑安理申为胆碱酯酶抑制剂,主要以改善大脑神经递质水平胆碱能神经通路为主,对于 PKA/ERK/p-CREB 信号通路作用不明显。

综上,本研究为补益脾胃元气方药临床应用提供了部分实验依据。然而,本实验仍为初步探讨,有关补益元气方药防治 AD 的深层次作用机制仍有待深入研究。

参考文献

- [1] Ossenkoppele R, Pijnenburg Y A L, Perry D C, *et al.* The behavioural/dysexecutive variant of Alzheimer's disease: Clinical, neuroimaging and pathological features [J]. *Brain*, 2015, doi: 10.1093/brain/awv191.
- [2] Cummings J L, Ringman J, Metz K, *et al.* Easton center of Alzheimer's disease research at UCLA: Advancing the therapeutic imperative [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 19(2): 375-388.
- [3] World Alzheimer Report 2018 [R]. Alzheimer's Disease International [2018-09-21]. <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf>2.
- [4] Sabbagh M, Han S H, Kim S Y, *et al.* Clinical recommendations for the use of donepezil 23 mg in moderate-to-severe Alzheimer's disease in the Asia-Pacific region [J]. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*, 2016, 6(3): 382-395.
- [5] Hsiao L. Effectiveness and safety of traditional Chinese medicine for Alzheimer's disease (AD) [J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(7): 1327-1344.
- [6] Diwu Y C, Tian J Z, Shi J. Effects of Chinese herbal medicine Yinsiwei compound on spatial learning and memory ability and the ultrastructure of hippocampal neurons in a rat model of sporadic Alzheimer disease [J]. *J Integr Med*, 2011, 9(2): 209-215.
- [7] 第五永长. 老年性痴呆“髓空痰浊”病机及治法再识 [J]. 中医杂志, 2016, 57(12): 1075-1077.

- [8] 邵怡然, 第五永长, 曾 健, 等. 洗心汤 $A\beta_{1-42}$ 诱导的海马神经元线粒体功能的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(6): 1281-1284.
- [9] 高彦斌, 第五永长, 唐学成, 等. 洗心汤对 APP/PS1 双转基因小鼠突触功能相关蛋白及受体表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(6): 699-706.
- [10] 陈 璐, 第五永长, 温晓强, 等. 补益脾胃元气方药含药脑脊液对大鼠海马神经干细胞活力与迁移的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5580-5587.
- [11] Morley J E, Farr S A, Kumar V B, *et al.* The SAMP8 mouse: A model to develop therapeutic interventions for Alzheimer's disease [J]. *Curr Pharm Design*, 2012, 18(8): 1123-1130.
- [12] Yanai S, Endo S. Early onset of behavioral alterations in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 308(7): 187-195.
- [13] Kandel E R. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB [J]. *Mol Brain*, 2012, 5(1): 5-14.
- [14] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [15] Possin K L, Sanchez P E, Andersonbergman C, *et al.* Cross-species translation of the Morris maze for Alzheimer's disease [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(2): 779-783.
- [16] Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Alzheimer neurofibrillary degeneration: Significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(1): 38-55.
- [17] Alonso A D, Beharry C, Corbo C P, *et al.* Molecular mechanism of prion-like tau-induced neurodegeneration [J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 12(10): 1090-1097.
- [18] Kim H J, Kim W, Kong S Y. Antidepressants for neuro-regeneration: From depression to Alzheimer's disease [J]. *Arch Pharm Res*, 2013, 36(11): 1279-1290.
- [19] Selkoe D J. Alzheimer's disease is a synaptic failure [J]. *Science*, 2002, 298(5594): 789-791.
- [20] Vannini P, Hanseeuw B, Munro C E, *et al.* Hippocampal hypometabolism in older adults with memory complaints and increased amyloid burden [J]. *Neurology*, 2017, 88(18): 1759-1767.
- [21] Abraham W C, Williams J M. Properties and mechanisms of LTP maintenance [J]. *Neuroscientist*, 2003, 9(6): 463-474.
- [22] Kida S, Serita T. Functional roles of CREB as a positive regulator in the formation and enhancement of memory [J]. *Brain Res Bull*, 2014, 105(6): 17-24.
- [23] Park A J, Havekes R, Choi J H, *et al.* A presynaptic role for PKA in synaptic tagging and memory [J]. *Neurobiol Learn Memory*, 2014, 114(10): 101-112.
- [24] Peng S, Zhang Y, Zhang J, *et al.* ERK in learning and memory: A review of recent research [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(1): 222-232.
- [25] Coultrap S J, Buard I, Kulbe J R, *et al.* CaMKII autonomy is substrate-dependent and further stimulated by Ca^{2+} /calmodulin [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(23): 17930-17937.
- [26] Chen Y, Huang X, Zhang Y, *et al.* Alzheimer's β -secretase (BACE1) regulates the cAMP/PKA/CREB pathway independently of β -amyloid [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(33): 11390-11395.
- [27] Áine K, Laroche S, Davis S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(12): 5354-5360.
- [28] Sakamoto K, Karelina K, Obrietan K. CREB: A multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection [J]. *J Neurochem*, 2011, 116(1): 1-9.
- [29] Michel M, Green C L, Lyons L C. PKA and PKC are required for long-term but not short-term *in vivo* operant memory in Aplysia [J]. *Learn Memory*, 2011, 18(1): 19-23.
- [30] 李 瑞, 胡玉萍, 袁德培, 等. 从脾胃论治老年性痴呆 [J]. 中医杂志, 2017, 58(5): 384-386.
- [31] 易亚乔, 方 锐, 葛金文, 等. 基于数据挖掘的历代医家痴呆相关病症用药规律分析 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3376-3381.
- [32] 周珂新, 徐雷艇, 马银娟, 等. 阿尔茨海默病与肠道菌群的关系及菌群调节对其防治的展望 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(11): 1198-1205.
- [33] Zhao H, Li Q Z, Pei X, *et al.* Long-term ginsenoside consumption prevents memory loss in aged SAMP8 mice by decreasing oxidative stress and up-regulating the plasticity-related proteins in hippocampus [J]. *Brain Res*, 2009, 1256(2): 111-122.
- [34] Qian Y H, Han H, Hu X D, *et al.* Protective effect of ginsenoside Rb₁ on beta-amyloid protein(1-42)-induced neurotoxicity in cortical neurons [J]. *Neurol Res*, 2009, 31(7): 663-667.
- [35] 许 巧. 元气与衰老关系的探讨及大补元煎延缓线虫衰老作用的研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.
- [36] Tomobe K, Nomura Y. Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: A mouse model of senescence [J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(4): 660-669.