

• 药理与临床 •

补益脾胃元气方药对 SAMP8 小鼠海马区形态功能和皮层胆碱能系统的影响

陈璐¹, 第五永长^{2*}, 温晓强¹, 岳涛¹, 屈夏夏¹, 雷筱菁¹, 周源³, 刘奇⁴

1. 陕西中医药大学第一临床医学院 中医系, 陕西 咸阳 712046

2. 陕西中医药大学第二临床医学院 临床医学系, 陕西 咸阳 712046

3. 陕西中医药大学基础医学院, 陕西 咸阳 712046

4. 陕西中医药大学针灸推拿学院, 陕西 咸阳 712046

摘要: 目的 研究补益脾胃元气方药人参、大补元煎、洗心汤对快速老化痴呆模型(SAMP8)小鼠空间学习记忆能力、海马区形态功能和皮层胆碱能系统的影响, 探讨其治疗阿尔茨海默病的可能作用机制。方法 3月龄雄性 SAMP8 小鼠随机分为模型组、盐酸多奈哌齐组、人参组、洗心汤组、大补元煎组, 以雄性抗快速老化型(SAMR1)小鼠为对照组。除对照组和模型组 ig 蒸馏水外, 其余各组 ig 药物(10 mL/kg), 1次/d, 连续3个月。实验结束后采用 Morris 水迷宫实验检测小鼠空间学习记忆能力, 透射电镜观察小鼠海马 CA3 区突触超微结构, 免疫组化法检测 CA1 区神经元密度、脑组织 β 淀粉样蛋白(A β)水平, 生物化学法检测海马胆碱乙酰基转移酶(ChAT)和乙酰胆碱酯酶(AChE)的活性。结果 补益脾胃元气方药各组小鼠逃避潜伏期平均值明显下降, 在目的象限游泳时间、穿过平台次数显著增加($P < 0.05$ 、 0.01); 各组小鼠 A β 阳性细胞数目显著降低($P < 0.05$ 、 0.01), 神经元特异核蛋白(NuN)阳性细胞密度有上升趋势, 但无显著差异; 各组小鼠 ChAT 活性升高($P < 0.05$ 、 0.01), 人参、洗心汤组小鼠 AChE 活性降低($P < 0.05$)。结论 补益脾胃元气方药对 SAMP8 小鼠空间识别和学习记忆能力有明显改善作用, 其机制可能与影响小鼠海马突触结构、促进海马神经元修复、降低小鼠脑内 A β 表达、调节海马胆碱能系统有关。

关键词: 补益脾胃元气方药; 快速老化痴呆模型小鼠; 海马区形态功能; 胆碱能系统; 人参; 阿尔茨海默病

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)20-5187-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.20.10

Effect of Tonifying Spleen and Stomach Yuanqi Prescriptions on morphology and function of hippocampus and cortical cholinergic system in SAMP8 mice

CHEN Lu¹, DIWU Yong-chang², WEN Xiao-qiang¹, YUE Tao¹, QU Xia-xia¹, LEI Xiao-jing¹, ZHOU Yuan³, LIU Qi⁴

1. Department of Traditional Chinese Medicine, First College of Clinical Medicine, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. Department of Clinical Medicine, Second College of Clinical Medicine, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

3. Basic Medical College, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

4. College of Acupuncture and Massage, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To study the effect of Tonifying Spleen and Stomach Yuanqi Prescriptions including ginseng, Dabuyuan Decoction and Xixin Decoction on spatial learning and memory ability, hippocampal morphological function and cortical cholinergic system in rapidly aging dementia model mice (SAMP8), and investigate the possible mechanism on treating Alzheimer's disease.

Methods Male SAMP8 mice aged three months were randomly divided into model group, donepezil group, ginseng group, Xixin Decoction group and Dabuyuan Decoction group. Male anti-aging mice (SAMR1) were used as control group. In addition to control

收稿日期: 2020-01-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(81674042, 81373703); 陕西省自然科学基金研究计划-重大基础研究项目(2017ZDJC-15); 陕西省“特支计划”人才项目(141019040); 陕西中医药大学学科创新团队项目(2019-QN05)

作者简介: 陈璐(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为老年病。Tel: 18292921137 E-mail: 779663170@qq.com

*通信作者 第五永长(1971—), 硕士生导师, 教授。Tel: (029)38183461 E-mail: diwuyongchang@126.com

3 months). The spatial learning and memory ability of mice was observed by Morris water maze test; The synaptic ultrastructure of hippocampal CA3 region was observed by transmission electron microscope; The density of neurons in CA1 area and the level of A β in brain tissue were detected by immunohistochemistry; The activities of choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE) in hippocampus were detected by biochemical method. **Results** The average escape latency of mice treated with Tonifying Spleen and Stomach Yuanqi Prescriptions was decreased, the swimming time and the number of passing through the platform were increased significantly ($P < 0.05, 0.01$). The number of A β positive cells were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), the density of NueN positive cells had no significant difference. The level of CHAT activity was increased ($P < 0.05, 0.01$), and the level of AChE activity was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The effect of Tonifying Spleen and Stomach Yuanqi prescriptions improve the spatial recognition and learning and memory abilities in SAMP8 mice, of which mechanism may be related to affect the synaptic structure of hippocampus, promote the repair of hippocampal neurons, reduce the expression of A β in mouse brain, and regulate the cholinergic system in cortex.

Key words: Tonifying Spleen and Stomach Yuanqi Prescription; rapidly aging dementia model mice; morphological function of hippocampus; cholinergic system; ginseng; Alzheimer's disease

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种发生于老年前期或老年期的进行性中枢神经退行性疾病, 以记忆认知功能减退、行为学改变为主要临床表现^[1], 以 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid peptide, A β) 沉积、神经元丢失为重要病理特征^[2]。研究认为 A β 的异常沉积是发病的核心环节, 其生化改变以海马胆碱乙酰基转移酶 (ChAT) 活性下降、乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性升高为主^[3]。由于本病发病机制尚未完全阐明, 目前缺乏阻止 AD 病理进展的有效治疗手段^[4]。中医药在 AD 防治方面积累了丰富的经验^[5-6]。课题组前期在中医“气化精”“精生髓”理论指导下, 以补益脾胃元气方药为切入点, 选取补益脾胃元气类方药的代表方人参、洗心汤、大补元煎干预 AD, 体内外研究均取得良好效果^[7-8]。本研究通过考察人参、洗心汤、大补元煎对快速老化痴呆模型 (SAMP8) 小鼠空间学习记忆能力、海马区形态功能和海马胆碱能功能的作用, 进一步探讨补益脾胃元气方药治疗 AD 的作用机制, 为临床应用中医药防治 AD 提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 动物

SPF 级雄性 SAMP8 小鼠 70 只, 雄性抗快速老化型 (SAMR1) 小鼠 14 只, 3 月龄, 体质量 20~24 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2016-0010。动物饲养环境为清洁级, 室温 18~22 °C, 相对湿度 50%~70%, 自由摄食饮水, 小鼠适应性饲养 1 周后使用。所有动物饲养和实验操作程序符合陕西中医药大学实验动物福利伦理委员会相关规定, 并经陕西中医药大学动物伦理委员会批准。

1.2 药品

盐酸多奈哌齐 (卫材药业有限公司, 批号

H20050978); 洗心汤颗粒剂: 人参 30 g (7061013)、茯神 30 g (6123033)、酸枣仁 30 g (6120933)、半夏 15 g (7080863)、陈皮 15 g (7091683)、炒神曲 9 g (7075033)、附子 3 g (6082283)、石菖蒲 3 g (7046595)、甘草 3 g (7120213), 浓缩中药颗粒每剂共 15.6 g; 人参颗粒剂: 人参 30 g (7061013), 剂量等同于独参汤, 浓缩中药配方颗粒每剂共 6 g; 大补元煎颗粒剂: 人参 10 g (7061013)、炒山药 6 g (7081273)、熟地 9 g (7100683)、杜仲 6 g (7090193)、当归 9 g (7121153)、山茱萸 3 g (7042573)、枸杞 9 g (7100823)、炙甘草 6 g (7120593), 浓缩中药颗粒每剂共 12.4 g。实验所用中药颗粒均购自国药集团广东一方制药有限公司。

1.3 试剂与仪器

神经元特异核蛋白 (Neun) 抗体 (GR249899-22, abcam 公司); 免疫组织化学 SP 试剂盒、DAB 显色剂 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 兔抗鼠神经胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 抗体、兔抗鼠 A β 42 多克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司); SP 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒 (北京康为世纪公司); AChE、ChAT 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); H-7650 透射式电子显微镜 (日本 Hitachi 公司); LKB-V/NOVA 超薄切片机 (瑞典 LKB 公司), RM2145 石蜡切片机 (Leica 公司); TD5A 台式低速离心机 (湖南凯达实业公司)。

2 方法

2.1 分组与给药

SAMR1 小鼠为对照组, SAMP8 小鼠随机分为模型组、盐酸多奈哌齐 (DON) 组、人参 (RSD) 组、洗心汤 (XXD) 组、大补元煎 (DBYD) 组, 每组 14 只。根据患者临床用量的等效剂量和动物体表面积计算^[9], 小鼠 ig RSD、DBYD、XXD、DON

剂量分别为 1.2、2.5、3.2 g/kg 和 1.027 mg/kg, 药物溶解于蒸馏水配制成相应浓度的溶液。各给药组每日按剂量 ig 药物, 给药体积为 10 mL/kg, 对照组和模型组均 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 3 个月。

2.2 行为学测试

给药结束后采用 Morris 水迷宫测试学习记忆能力。第 1~5 天进行定位航行实验, 平台置于 IV 象限, 位于水面下 2 cm, 每次 60 s, 分别以 I、II、III、IV 的 4 个象限池壁的中点作为入水点, 记录小鼠找到平台所用的时间, 为逃避潜伏期。第 6 天进行空间探索实验, 撤除平台, 记录 60 s 内小鼠游经平台次数和在平台所在象限的游泳时间。

2.3 电镜观察海马超微结构

末次行为学测试后, 每组随机选取 2 只小鼠进行心脏灌注固定, 取脑组织, 低温下切成 1 mm³ 小块, 于 2.5% 戊二醛溶液固定过夜, 以 0.1 mol/L PBS 缓冲液浸洗 30 min 后, 于 1% 四氧化锇固定液中固定 2 h。以 0.1 mol/L PBS 缓冲液浸洗 10 min, 依次用 30%、50%、70% 乙醇脱水 10 min, 70% 醋酸双氧铀块染 2 h, 经 90%、100% 乙醇脱水, 还氧丙烷置换 10 min, 环氧树脂 Epon812 浸透、包埋后切片, 厚 1~2 μm。美兰染色后于光学显微镜下定位, 超薄切片机切片, 柠檬酸铅和醋酸铀双染色, 采用透射式电子显微镜下观察海马细胞超微结构。

2.4 免疫组化法检测小鼠海马 NueN、Aβ 的表达

末次行为学测试后, 每组随机选取 4 只小鼠, 取脑组织, 海马切片脱蜡处理后, 经 PBS 缓冲液冲洗, 于 0.01 mol/L 柠檬酸盐微波修复 20 min 以暴露抗原, 再放入 0.03% H₂O₂ 中 15 min 以灭活内源性过氧化物酶, 经山羊血清封闭液封闭 20 min 后分别

加入鼠抗 NueN 单克隆抗体 (1:100) 和兔抗鼠 Aβ 多克隆抗体 (1:100), 4 °C 过夜。于 37 °C 复温 1 h 后加入生物素标记的羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 30 min 后加入生物素标记的链霉亲和素, 37 °C 孵育 30 min, 最后用 DAB 显色, 苏木素染液复染, 中性树脂封片, 于光学显微镜下观察。取光镜下 3 个连续不同视野, 分别计数海马 CA1 区神经元的 NeuN 阳性细胞数和 Aβ 阳性细胞数, 通过 Image-Pro plus 测量该视野下 CA1 的面积, 计算 CA1 区 NueN 的阳性细胞密度。

2.5 生物化学法检测皮质 ChAT、AChE 活性

末次行为学测试后, 取小鼠脑组织, 在冰浴上剥离出皮层, 滤纸吸干后称定脑组织质量, 按质量体积比 1:9 加入 4 °C 预冷的生理盐水, 用内切式匀浆机制备 10% 的组织匀浆, 低温低速离心 10 min, 取上清液, 按照试剂盒说明书测定皮质 ChAT、AChE 活性。

2.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。各组数据比较采用单因素方差分析和多因素重复测量方差分析。

3 结果

3.1 各组小鼠空间学习记忆能力比较

结果如表 1 所示, 在定位航行实验中, 随着训练时间的增加, 各组小鼠逃避潜伏期均呈下降趋势, 与对照组相比, 模型组小鼠平均逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组相比, DON、RSD、XXD、DBYD 组在第 4、5 天逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$ 、 0.01)。在第 6 天空间探索实验中, 与对照组比较, 模型组小鼠穿越平台次数和目

表 1 各组小鼠在不同时段平均逃避潜伏期、穿越平台次数、目的象限游泳时间 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Average escape latency, number of crossing platforms, and swimming time in target quadrant of each group of mice in different periods ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	逃避潜伏期/s					穿越平台次数/次	目的象限游泳时间/s
		第1天	第2天	第3天	第4天	第5天	第6天	第6天
对照	—	39.98±11.72	35.93±17.97	33.53±12.81	31.85±14.63	28.40±9.55	1.50±0.52	16.52±5.97
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 [△]	8.77±4.78 ^{△△}
DON	1.027×10 ⁻³	46.31±9.45	45.10±11.03	42.67±15.17	37.92±8.85*	36.15±12.68*	0.83±1.17	14.99±5.70*
RSD	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*	15.91±4.45**
XXD	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*	14.61±3.44**
DBYD	2.5	41.28±12.79	37.71±13.57	36.55±16.67*	33.72±17.3*	30.88±10.15**	1.33±0.52*	15.12±2.41**

与对照组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下表同

[△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

的象限游泳时间显著较低 ($P<0.05$ 、 0.01)；与模型组比较, 各组小鼠穿越平台次数和目的象限游泳时间明显增加 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.2 各组小鼠海马突触超微结构比较

如图 1 所示, 对照组小鼠神经元正常, 胞质可见较多线粒体、内质网等细胞器, 突触前后膜间距正常、间隙清晰, 可见突触囊泡, 未见病变。模型组小鼠海马胞质局部空旷不均匀, 多数线粒体可见脊消失溶解, 内质网粗大深染, 可见自噬小体; 完整突触较少, 突触结构深染, 前后膜分界不清、间隙消失, 电子致密带范围异常增大, 囊泡明显减少。DON 组胞质局部空旷不均匀, 但仍线粒体、内质网等细胞器, 少数突触前后膜分界不清, 后膜电子致密带范围较大, 但前膜相对正常, 囊泡较多, 病变明显减轻。DBYD 组胞质局部空旷不均匀, 细胞核可见染色质固缩, 线粒体内可见自噬体, 突触结构清晰, 但突触脑囊泡明显减少。XXD 组细胞器内可见自噬体, 少数线粒体内可见自噬体, 突触结构清晰。RSD 组胞质内空旷部位范围明显增大, 细胞器

内基质溶解消失, 突触结构清晰。

3.3 免疫组化法检测小鼠脑内 NueN、A β 表达

如图 2、表 2 所示, Neun 表达于神经元胞质中, 呈浅黄色或棕黄色颗粒。与对照组比较, 模型组 NueN 阳性细胞密度升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组均无显著差异。如表 3、图 3 所示, A β 表达于海马区, 呈褐色或黄褐色斑点状。对照组小鼠海马细胞几乎未检测到 A β 表达; 与对照组比较, 模型组小鼠海马内 A β 阳性细胞数目明显升高, 聚积形成老年斑 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠神经细胞内 A β 阳性细胞数目显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.4 生物化学法检测皮质 ChAT、AChE 活性

如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠 AChE 活性显著升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, DON、RSD、XXD 组小鼠 AChE 活性显著降低 ($P<0.05$), DBYD 组 AChE 活性无显著差异。与对照组比较, 模型组小鼠 ChAT 活性显著降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各给药组小鼠 AChE 活性显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。

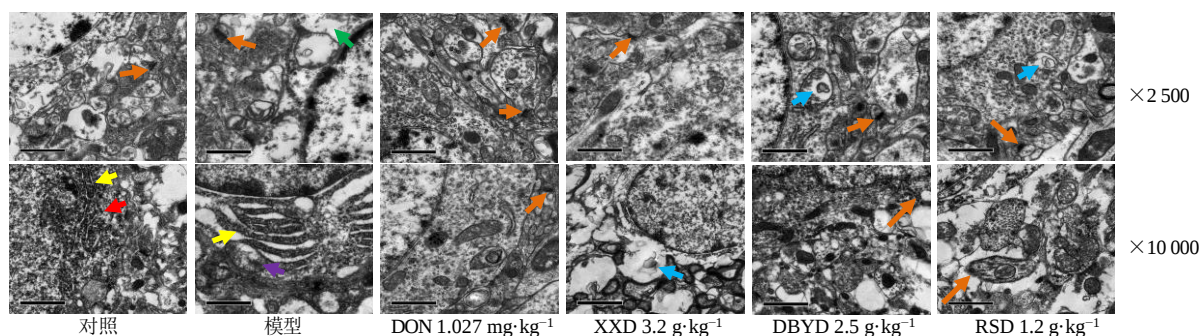


图 1 各组小鼠海马突触超微结构图

Fig. 1 Ultrastructure of hippocampal synapse of mice in each group

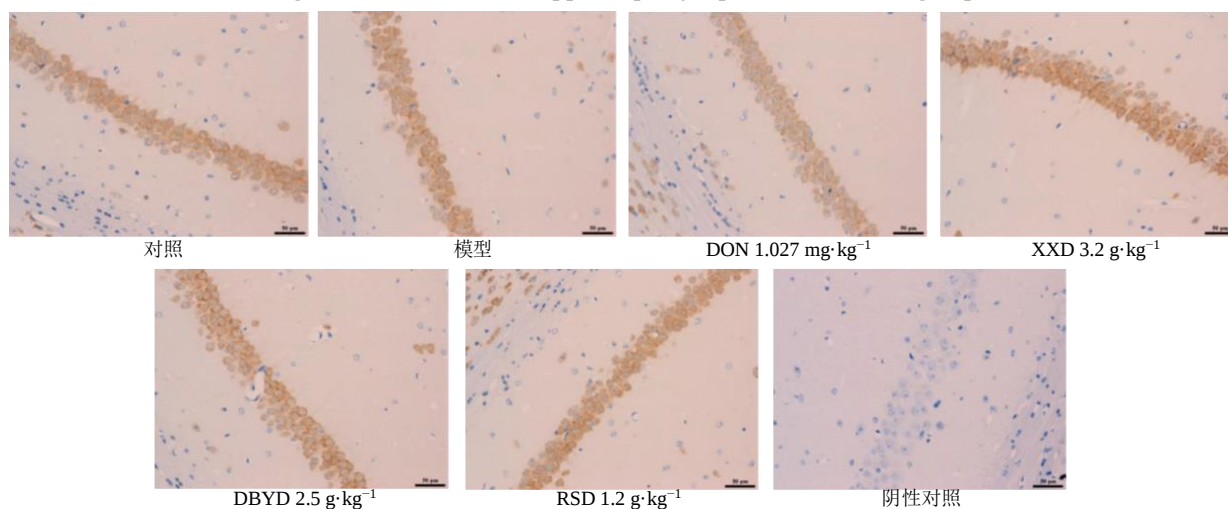


图 2 各组小鼠脑内 NueN 的表达 (×200)

Fig. 2 Expression of NueN in brain of mice in each group (×200)

表 2 各组小鼠脑内 NueN 密度 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 2 Density of NueN in brain of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	阳性 A 值/(n·μm ⁻²)
对照	—	0.00 474±0.000 543
模型	—	0.00 400±0.000 502 [△]
DON	1.027×10 ⁻³	0.00 431±0.000 258
DBYD	2.5	0.00 412±0.000 220
RSD	1.2	0.00 447±0.000 347
XXD	3.2	0.00 423±0.000 483

表 3 各组小鼠脑内 Aβ 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 3 Expression of Aβ in brain of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	阳性细胞数目/个
对照	—	2.3±0.6
模型	—	14.7±1.5 ^{△△}
DON	1.027×10 ⁻³	6.0±1.0**
DBYD	2.5	10.7±1.5*
RSD	1.2	10.3±1.5*
XXD	3.2	11.7±1.5*

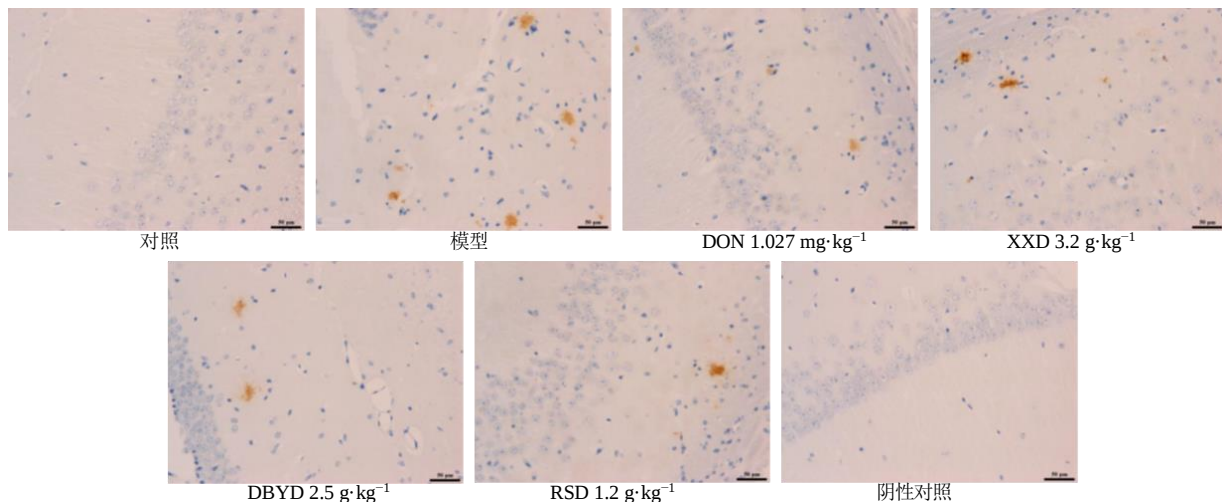


图 3 各组小鼠脑内 Aβ 的表达 (×200)

Fig. 3 Expression of Aβ in brain of mice in each group (×200)

表 4 各组小鼠皮质 ChAT、AChE 活性 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 4 Activity of ChAT and AChE in cortex of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	AChE/(U·mg ⁻¹)	ChAT/(U·g ⁻¹)
对照	—	0.37±0.06	0.57±0.17
模型	—	0.47±0.10 [△]	0.46±0.10 [△]
DON	1.027×10 ⁻³	0.43±0.03*	0.56±0.25*
DBYD	2.5	0.55±0.05	0.85±0.34**
RSD	1.2	0.40±0.05*	0.55±0.26*
XXD	3.2	0.45±0.07*	0.56±0.17*

4 讨论

SAMP8 小鼠具有典型的 AD 神经生化和病理学特征,是目前较理想的 AD 模型^[10-11]。Aβ 是 AD 发病的核心环节^[12],Aβ 生成与沉淀的异常增多,可导致神经原纤维缠结病理产物增加,进而引起神经元损害^[13]。AD 患者脑内神经元凋亡与 Aβ 神经毒性密切相关^[14]。海马中 CA1 和 CA3 区在学习记忆功能中起重要作用^[15]。NeuN 蛋白作为神经细胞的特异性标记物,能够特异性结合神经核^[16],且广

泛存在于脊椎动物神经系统的成熟神经细胞核内,可在物种体内高度保守和稳定表达^[17],因此 NeuN 蛋白被用来评价神经细胞丢失、死亡和量化治疗效应^[18]。免疫组化染色 NueN 可明确反映海马神经元的分布及丢失情况^[19]。盐酸多奈哌齐可提高脑内 ACh 浓度及神经传导功能^[20],并被证明是有效治疗阿尔茨海默病的关键,可作为改善记忆和认知障碍的阳性对照^[21-22]。胆碱能系统以 ACh 为主要神经递质,其生理作用主要通过 2 种生物酶起作用^[23]。存在于胆碱能神经元中的 ChAT 是 ACh 的生物合成酶,是衡量胆碱能神经元功能的标志^[24]。AChE 可水解 ACh,患者脑内 ChAT 活性下降、AChE 活性增高是引起胆碱能神经元功能退化的主要原因之一,被认为是 AD 的标志性生化特征^[25]。

AD 属中医“痴呆”的范畴,早在《灵枢·本神》中记载“心之所忆谓之意”,中医认为脾藏意,“意”即大脑的思维活动,说明脾的功能与脑、人的思维密切相关。“上气不足,脑为之不满”,“灵机记性在脑者,因饮食而生气血”,因此脾胃元气充足,

才能化生气血, 进而生精养髓、充养脑窍。课题组第五永长教授秉承清代名医陈士铎治疗痴呆的经验, 通过长期理论和临床实践研究, 提出“脑髓空虚, 痰浊蒙窍”为 AD 根本病机^[26], 补益脾胃元气是治疗痴呆的重要方法^[27]。课题组前期研究表明, 补益脾胃元气方药人参、洗心汤、大补元煎含药脑脊液可拮抗 A β 诱导的氧化应激, 且其有效成分易透过血脑屏障, 对大鼠海马 NSPCs 活力与迁移能力具有促进作用^[7]。在内源性线粒体途径方面, 洗心汤含药脑脊液组的作用较强^[28]。

本研究结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠逃避潜伏期明显延长, 表明 SAMP8 小鼠学习记忆功能受损。DBYD、RSD、XXD 组小鼠逃避潜伏期明显下降, 在目的象限游泳时间和穿越平台次数显著增加, 提示 DBYD、RSD、XXD 可明显改善 SAMP8 小鼠的学习记忆功能损伤。DBYD、RSD、XXD 组小鼠海马神经元细胞密集, 胞质局部空旷不均匀, 细胞核呈圆形, 核内染色质固缩, 可见核仁; 细胞质内线粒体轻度肿胀, 可见自噬体, 突触结构清晰, 指示 DBYD、RSD、XXD 可明显改善海马神经元超微结构受损。

DBYD、RSD、XXD 组小鼠海马组织中 A β 表达量明显降低, NeuN 表达有升高趋势, 提示补益脾胃元气三种代表方可明显改善神经元 A β 神经毒性, 增强 CA1 区神经元密度。模型组小鼠皮质 ChAT 活性显著降低, AChE 活性升高, 提示 SAMP8 可能造成皮层乙酰胆碱的代谢障碍, 导致 AD 小鼠的学习记忆能力下降。RSD、XXD 组小鼠皮质 ChAT 活性升高, AChE 活性下降, 可促进 ACh 在脑内的合成并抑制其分解, 促进胆碱能神经元的修复。DBYD 组 ChAT 活性上升, AChE 活性无显著变化, 也可促进 ACh 在脑内的合成。本研究涉及的 3 种补益脾胃元气类方药(大补元煎、人参、洗心汤)均含有人参, 具有补益脾胃元气的共性功效, 且各有偏重, 在补益脾胃元气基础上分别兼有滋补肾阴、安神益智、开郁化痰之效。本研究的 3 种补益脾胃元气类方药有改善神经元超微结构损害、降低 A β 表达、调节神经元密度、促进胆碱能神经元修复的作用, 可能与共同中药人参相关。人参的主要成分为人参皂苷, 前期实验表明 3 种补益脾胃元气类方药的主要成分人参皂苷 Rg₁ 易于透过血脑屏障, 因此, 3 种补益脾胃元气类方药改善 AD 可能与人参皂苷 Rg₁ 密切相关。

研究表明补益脾胃元气类方药改善 AD 学习记忆的功能可能与其改善神经元超微结构损害、促进神经元修复、降低 A β 表达、调节皮层胆碱能功能密切相关, 但补益脾胃元气类方药对神经保护作用的确切机制仍需进一步探索。

参考文献

- [1] Kumar A, Singh A. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update [J]. *Pharmacol Rep*, 2015, 67(2): 195-203.
- [2] Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, et al. A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease [J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1276-1290.
- [3] Lemes L F N, de Andrade Ramos G, de Oliveira A S, et al. Cardanol-derived AChE inhibitors: Towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's disease [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 108: 687-700.
- [4] 李琳, 王晓良, 彭英. 抗阿尔茨海默病天然产物及其药理学研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(2): 149-154, 155.
- [5] 王清峰, 张丹, 李柱. 健脾化痰法治疗老年性痴呆痰浊阻窍证的疗效及机制研究 [J]. *中医临床研究*, 2013, 5(2): 12-13.
- [6] 冯靖涵, 蔡宝昌, 过伟峰, 等. 中医药治疗阿尔茨海默病的实验研究进展 [J]. *南京中医药大学学报*, 2012, 28(4): 394-396.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Virgili J, Lebbadi M, Tremblay C, et al. Characterization of a 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease with the senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) background [J]. *Synapse*, 2018, 72(4). doi: 10.1002/syn.22025.
- [11] Wang J H, Ye F Q, Cheng X R, et al. The effects of LW-AFC on intestinal microbiome in senescence-accelerated mouse prone 8 strain, a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2016, 53(3): 907-919.
- [12] Omtri R S, Thompson K J, Tang X J, et al. Differential effects of Alzheimer's disease A β 40 and 42 on endocytosis and intraneuronal trafficking [J]. *Neuroscience*, 2018, 373:

- 159-168.
- [13] Benarroch E E. Adult neurogenesis in the dentate gyrus: General concepts and potential implications [J]. *Neurology*, 2013, 81(16): 1443-1452.
- [14] 冀莎莎, 雷 芸, 黄霄天, 等. β -二氢沉香呋喃倍半萜抗 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经细胞凋亡和氧化损伤的保护作用 (英文) [J]. *中国药理学: 英文版*, 2016(8):582-589.
- [15] Dimsdale-Zucker H R, Ritchey M, Ekstrom A D, *et al.* CA1 and CA3 differentially support spontaneous retrieval of episodic contexts within human hippocampal subfields [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 294.
- [16] Sugawara T, Lewén A, Noshita N, *et al.* Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial, and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1 subregion in rats [J]. *J Neurotrauma*, 2002, 19(1): 85-98.
- [17] Lian W W, Fang J S, Xu L, *et al.* DL0410 ameliorates memory and cognitive impairments induced by scopolamine via increasing cholinergic neurotransmission in mice [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 410.
- [18] Sui Z F, Qi C, Huang Y X, *et al.* Aqueous extracts from *Asparagus stems* prevent memory impairments in scopolamine-treated mice [J]. *Food Funct*, 2017, 8(4): 1460-1467.
- [19] Agis-Balboa R C, Pavelka Z, Kerimoglu C, *et al.* Loss of HDAC5 impairs memory function: Implications for Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2013, 33(1): 35-44.
- [20] Zhou Q, Nie S, Liu Z. Effect of donepezil hydrochloride on cognitive function recovery of rats with Alzheimer's disease [J]. *Med One*, 2016, doi: 10.20900/mo.20160023.
- [21] Johnson D S, Pettersson M. γ -Secretase modulators as $A\beta_{42}$ -lowering pharmacological agents to treat Alzheimer's disease [J]. *Alzheimer's Dis*, 2017, 24: 87-118.
- [22] Zhang S J, Xu T T, Li L, *et al.* Bushen-Yizhi formula ameliorates cognitive dysfunction through SIRT1/ER stress pathway in SAMP8 mice [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 49338-49350.
- [23] 蒲亚岚, 王永红. 阿尔茨海默病中枢胆碱能系统的损伤及主要机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(24): 3840-3842.
- [24] Ferreira-Vieira T H, Guimaraes I M, Silva F R, *et al.* Alzheimer's disease: Targeting the cholinergic system [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14(1): 101-115.
- [25] Piccardi M, Congiu D, Squassina A, *et al.* Alzheimer's disease: case-control association study of polymorphisms in ACHE, CHAT, and BCHE genes in a Sardinian sample [J]. *Am J Med Genet*, 2007, 144B(7): 895-899.
- [26] 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.
- [27] 第五永长, 田金洲, 时 晶. 从清代名医陈士铎治疗痴呆学术特色谈脾脑相关 [J]. *四川中医*, 2011, 29(2): 43-44.
- [28] 邵怡然, 第五永长, 曾 健, 等. 洗心汤对 $A\beta_{1-42}$ 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.