

开心散对 APP/PS1 小鼠神经炎症和 A β 沉积的作用研究

王彬斌, 冯晓晓, 恩特扎尔·别尔克, 赵 晖, 李朝霞*

首都医科大学中医药学院, 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069

摘 要: **目的** 研究开心散对阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 动物模型淀粉样前体蛋白/早老素基因 1 (amyloid precursor protein/presenilin 1, APP/PS1) 双转基因小鼠的作用。**方法** 将 3 月龄雄性 APP/PS1 小鼠随机分为模型组、美金刚 (3.33 mg/kg) 组及开心散低、中、高剂量 (0.33、1.00、3.00 g/kg) 组, 采用同月龄相同遗传背景 C57BL/6J 小鼠作为对照组和对照给药 (开心散 1.00 g/kg) 组, 每组 8 只。连续 ig 给药 2 个月后, Morris 水迷宫实验评价小鼠学习记忆能力; 苏木素-伊红 (HE) 染色法观察小鼠海马 CA1 区神经元形态; 刚果红染色法检测小鼠脑组织淀粉样斑块表达; 免疫组化法检测小鼠皮层和海马中 β 淀粉样蛋白 1-40 (amyloid β protein 1-40, A β ₁₋₄₀)、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 和离子钙接头结合调节分子-1 (ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba-1) 的表达; ELISA 法检测小鼠血清中炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 IL-6 水平以及皮层和海马中乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 水平。**结果** 与模型组相比, 美金刚组和开心散组小鼠学习记忆能力明显提高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 海马 CA1 区神经元数量增加 ($P < 0.01$); 皮层和海马中的淀粉样斑块、A β ₁₋₄₀、GFAP 和 Iba-1 表达明显减少 ($P < 0.05$ 、 0.01); 血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 皮层中 Ach 水平显著升高 ($P < 0.01$)。**结论** 开心散可能通过抑制星形胶质细胞和小胶质细胞活化, 降低血清中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平, 减少 A β 和淀粉样斑块的生成, 增加皮层中 Ach 含量, 从而发挥保护神经元、防治 AD 的作用。

关键词: 开心散; 阿尔茨海默症; 淀粉样前体蛋白/早老素基因 1 双转基因小鼠; β 淀粉样蛋白; 胶质纤维酸性蛋白; 离子钙接头结合调节分子-1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)24-7511-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.013

Pharmacological effects of Kaixin San on neuroinflammation and A β deposition in APP/PS1 mice

WANG Bin-bin, FENG Xiao-xiao, Entzal Berk, ZHAO Hui, LI Zhao-xia

Beijing Key Laboratory of TCM Collateral Disease Theory Research, School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: Objective To study the pharmacological effects of Kaixin San (开心散) on Alzheimer's disease (AD) animal model, amyloid precursor protein/presenilin 1 (APP/PS1) double transgenic mice. **Methods** Three-month-old male APP/PS1 mice were randomly divided into model group, memantine group (3.33 mg/kg), low-, medium- and high-dose Kaixin San (0.33, 1.00, 3.00 g/kg) groups. C57BL/6J mice with the same genetic background of same month age were used as control group and control administration (Kaixin San 1.00 g/kg) group, with eight mice in each group. After continuous ig administration for two months, the learning and memory ability of mice was evaluated by Morris water maze test; Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to observe the neuron morphology in hippocampus CA1 area; Congo red staining was used to detect amyloid plaques expression in cortex and hippocampus; Immunohistochemical staining was used to detect amyloid β protein 1-40 (A β ₁₋₄₀), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionized calcium binding adaptor molecule-1 (Iba-1) expressions in cortex and hippocampus; ELISA was used to detect the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 in serum and acetylcholine (Ach) level in cortex and hippocampus. **Results** Compared with model group, learning and memory ability of mice in memantine group and Kaixin San group was

收稿日期: 2021-09-03

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目 (7182019)

作者简介: 王彬斌, 硕士研究生, 研究方向为中药体内过程和作用机制研究。E-mail: missbin1996@163.com

*通信作者: 李朝霞, 副教授, 研究方向为中药体内过程和作用机制研究。E-mail: gmacli@ccmu.edu.cn

significantly improved ($P < 0.05, 0.01$), number of neurons in hippocampal CA1 area was increased ($P < 0.01$); Expressions of amyloid plaques, A β_{1-40} , GFAP and Iba-1 in cortex and hippocampus were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$); Levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$); Ach level in cortex was increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Kaixin San may prevent and treat AD by inhibiting the activation of astrocytes and microglia, decreasing the levels of inflammatory factors TNF- α , IL-6 and IL-1 β in serum, reducing the production of A β and amyloid plaques, and increasing the content of Ach.

Key words: Kaixin San; Alzheimer's disease; APP/PS1 double transgenic mice; amyloid β protein; glial fibrillary acidic protein; ionized calcium binding adaptor molecule-1

阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以获得性记忆减退、认知功能障碍等为主要特征的中枢神经系统退行性疾病, 以老年斑和神经原纤维缠结为主要病理特征^[1]。随着世界人口老龄化, AD 的发病率急剧增高, 严重影响人类健康^[2]。AD 的发病机制复杂, β 淀粉样蛋白 (amyloid β protein, A β) 沉积和神经炎症在 AD 的病理进程中起着至关重要的作用^[3-4]。AD 在中医学属“呆病”“健忘”“虚劳”等范畴。开心散始载于唐代孙思邈的《备急千金要方》, 由“远志、人参各 4 分, 茯苓 2 两, 石菖蒲 1 两”组成^[5], “主好忘”, 是治疗老年痴呆的基础方。研究表明, 开心散可改善 AD 动物模型的学习记忆能力, 通过影响 A β 生成、保护神经元、调节神经递质、抗氧化等途径发挥作用^[6-8], 在防治 AD 方面具有良好的应用前景, 但其基于 A β 沉积和神经炎症的药理作用还有待于进一步系统研究。本研究选择淀粉样前体蛋白/早老素基因 1 (amyloid precursor protein/presenilin 1, APP/PS1) 双转基因小鼠, 从行为学、A β 沉积、神经炎症等方面评价开心散对 APP/PS1 小鼠的作用, 为其临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 3 月龄 APP/PS1 小鼠和 C57BL/6J 小鼠, 体质量 20~30 g, 购自北京华阜康生物科技有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2020-0004。动物饲养于温度 (25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、湿度 (50 $\pm$ 10) % 的屏障环境内, 自由进食饮水, 每日光照 12 h。动物实验经首都医科大学伦理委员会批准 (批准号 AEEI-2018-101)。

1.2 药材

开心散由人参、茯苓、石菖蒲和远志组成, 人参、茯苓和石菖蒲购自北京能济中药饮片有限公司, 远志购自北京明辉恒通药业有限公司, 经首都医科大学中医药学院李佳副教授鉴定分别为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎、多

孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核、天南星科植物石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott. 的干燥根茎、远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的干燥根。

1.3 药品与试剂

盐酸美金刚片 (批号 797818) 购自丹麦灵北药厂; A β_{1-40} 抗体 (批号 GB11307)、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体 (批号 GB11096)、离子钙接头结合调节分子-1 (ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba-1) 抗体 (批号 GB11105)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 GB11206) 均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒、小鼠白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒、小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒、小鼠乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) ELISA 试剂盒均购自上海蓝基生物科技有限公司; PBS 溶液、苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒、多聚甲醛、二甲苯与中性树胶均购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 3% 双氧水、无水乙醇、丙酮均购自北京化工厂。

1.4 仪器

63031 型水迷宫实验设备 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司); 3K15 型低温高速离心机 (美国 Sigma 公司); 超低温冰箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Bio-Gen PRO200 匀浆仪 (美国 PRO Scientific 公司); Panoramic scan 全自动切片扫描仪 (匈牙利 3DHitech 公司); SpectraMax Plus 385 全波长酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); UC7 超薄切片机 (德国 Leica 公司); E100 显微镜 (日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 开心散的制备

将开心散的 4 味药材饮片粉碎, 过 24 目筛得中药粗粉。按原方比例^[9-12] (人参、远志、石菖蒲、茯苓为 1:1:25:50), 称取药材粉末适量, 加入 12 倍量 70% 乙醇, 浸泡 0.5 h, 加热回流提取 2 h,

滤过; 滤渣继续用 10 倍量 70%乙醇回流提取 1 h, 滤过, 合并 2 次滤液, 减压回收乙醇, 于真空干燥箱干燥, 得到开心散醇提物, 4 °C 保存。取适量开心散醇提物干粉, 用 0.5%羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液配制一定质量浓度的开心散药液, 经高效液相色谱法 (HPLC) 测定, 开心散中含远志呋酮 III 9.3 µg/g、3,6'-二芥子酰基蔗糖 102.0 µg/g、 α -细辛醚 97.1 µg/g、 β -细辛醚 1033.0 µg/g、去氢土莫酸 298.0 µg/g、茯苓酸 410.0 µg/g、松苓新酸 11.7 µg/g。

2.2 动物分组与给药

将雄性 APP/PS1 小鼠随机分为模型组、美金刚 (3.33 mg/kg) 组和开心散低、中、高剂量 (0.33、1.00、3.00 g/kg, 以生药量计) 组, 每组 8 只。以同月龄、相同遗传背景的雄性 C57BL/6J 野生小鼠 16 只作为正常组, 随机分为对照组和对照给药 (开心散 1.00 g/kg) 组, 每组 8 只。适应性饲养 1 周后, 各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 模型组以及对照组 ig 等体积 0.5% CMC-Na 溶液, 1 次/d, 连续 2 个月。给药结束后, 进行 Morris 水迷宫实验^[13]。

2.3 Morris 水迷宫实验

2.3.1 定位航行实验 将平台置于某一象限, 第 1~5 天将小鼠分别从其他 3 个象限面向池壁放入水中, 每日训练 3 次, 记录小鼠入水后 60 s 内站上平台所需时间, 即逃逸潜伏期。小鼠找到平台后使其在平台上休息 10 s, 若规定时间内找不到平台, 则由操作者将其引导上平台, 使其在平台上停留相同时间。

2.3.2 空间探索实验 定位航行实验结束 24 h 后, 撤除平台, 将小鼠从同一入水点放入水中, 记录小鼠在 60 s 内的穿越平台次数、平台象限时间百分比和平台象限路程百分比。

2.4 取材

水迷宫实验结束后, 小鼠吸入异氟烷麻醉后取血, 用于血清炎症因子的检测。取血后每组随机取 3 只小鼠心脏灌注 4%多聚甲醛固定组织, 制备脑组织石蜡包埋切片, 分别进行 HE 染色、刚果红染色和免疫组化实验; 每组剩余的 5 只小鼠取血后处死, 断头取脑, 冰上快速分离海马和皮层, 于液氮中快速冷冻, -80 °C 冻存, 用于 Ach 检测。

2.5 HE 染色法观察小鼠海马 CA1 区神经元形态

取各组小鼠脑组织石蜡切片, 通过常规脱蜡水化后, 进行 HE 染色, 中性树胶封片, 于光学显微镜下观察海马 CA1 区神经元形态并采集图像, 同时

进行神经元计数。

2.6 刚果红染色法检测小鼠脑组织淀粉样斑块的表达

取各组小鼠脑组织石蜡切片, 通过常规脱蜡水化后, 进行刚果红染色, 中性树胶封片, 于光学显微镜下观察并采集图像。每个切片随机选取多个不同视野, 测定淀粉样斑块的吸光度 (A) 值。

2.7 免疫组化法检测小鼠脑组织 $A\beta_{1-40}$ 、GFAP 和 Iba-1 蛋白表达

取各组小鼠脑组织石蜡切片, 常规脱蜡水化, 抗原修复; 放入 3%双氧水溶液孵育后血清封闭, 滴加 $A\beta_{1-40}$ 、GFAP、Iba-1 抗体, 4 °C 孵育过夜; 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体, 室温孵育; 滴加 DAB 显色, 中性树胶封片, 于光学显微镜下观察并采集图像。每个切片随机选取多个不同视野, 测定 $A\beta_{1-40}$ 、GFAP 和 Iba-1 的 A 值。

2.8 ELISA 法检测小鼠血清中炎症因子以及皮层、海马组织 Ach 水平

取各组小鼠血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平。取各组小鼠的皮层和海马组织, 按照组织质量和体积 (1:9) 加入 PBS 溶液, 冰浴下匀浆, 4 °C、3000 r/min 离心, 分离上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 Ach 水平。

2.9 数据分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism v6.0 软件进行统计分析。Morris 水迷宫实验的逃逸潜伏期采用重复测量方差分析, 穿越平台次数采用非参数检验分析。其他数据进行正态分布和方差齐性检验, 若符合正态分布和方差齐, 采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间比较采用 LSD 检验; 若不符合正态分布, 采用非参数检验; 若符合正态分布但方差不齐, 采用 Welch ANOVA 检验, 组间比较采用 Dunnett's T_3 检验。

3 结果

3.1 开心散对 APP/PS1 小鼠学习记忆能力的影响

Morris 水迷宫实验结果见表 1、2。在定位航行实验中, 各组小鼠逃逸潜伏期随着训练天数的增加整体呈下降趋势。与对照组相比, 对照给药组小鼠的学习记忆能力无明显差异; 模型组小鼠在第 2~5 天的逃逸潜伏期明显延长 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 美金刚组小鼠在第 3~5 天的逃逸潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$); 开心散各剂量组小鼠的逃逸潜伏

表 1 各组小鼠定位航行实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 1 Results of positioning navigation test of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	逃逸潜伏期/s				
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
对照	—	54.3 ± 11.2	44.7 ± 13.6	40.7 ± 13.5	37.5 ± 12.4	39.8 ± 17.2
对照给药	1.00	56.9 ± 6.4	47.7 ± 13.2	46.1 ± 5.0	36.4 ± 14.6	37.0 ± 14.5
模型	—	60.0 ± 0.2	59.4 ± 1.6 ^{##}	57.5 ± 4.8 ^{##}	56.8 ± 5.9 ^{##}	54.7 ± 7.0 ^{##}
美金刚	3.33 × 10 ⁻³	57.9 ± 5.4	52.8 ± 6.6	45.8 ± 11.4 [*]	44.7 ± 8.82 [*]	41.3 ± 15.4 [*]
开心散	0.33	57.9 ± 3.9	53.8 ± 12.0	54.3 ± 8.5	49.0 ± 15.0	44.9 ± 17.9
	1.00	59.6 ± 0.8	56.9 ± 4.5	48.6 ± 11.6	48.3 ± 16.7	45.0 ± 15.4
	3.00	59.8 ± 0.5	53.3 ± 9.6	40.7 ± 11.0 ^{**}	40.0 ± 9.01 ^{**}	42.9 ± 11.0 [*]

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

表 2 各组小鼠空间探索实验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Table 2 Results of spatial probe test of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	穿越平台次数/次	目标象限时间百分比/%	目标象限路程百分比/%
对照	—	1.1 ± 0.9	23.4 ± 9.7	28.4 ± 8.7
对照给药	1.00	1.1 ± 0.9	27.5 ± 14.5	28.5 ± 13.3
模型	—	0.1 ± 0.4 [#]	3.1 ± 6.2 ^{##}	6.0 ± 10.4 ^{##}
美金刚	3.33 × 10 ⁻³	1.0 ± 0.8 [*]	19.7 ± 17.5 [*]	22.1 ± 16.1 [*]
开心散	0.33	1.0 ± 1.4	15.3 ± 13.2	19.4 ± 13.2
	1.00	0.9 ± 0.8	13.4 ± 16.6	14.5 ± 15.0
	3.00	1.0 ± 0.8 [*]	18.2 ± 11.6 [*]	25.2 ± 14.2 [*]

期均有所减少, 其中开心散高剂量组小鼠在第 3~5 天的逃逸潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$ 、0.01)。

空间探索实验结果表明, 与对照组相比, 模型组小鼠的穿越平台次数、平台象限时间百分比和平台象限路程百分比均明显减少 ($P < 0.05$ 、0.01); 与模型组相比, 美金刚组小鼠的穿越平台次数、平台象限时间百分比和平台象限路程百分比均明显增加 ($P < 0.05$); 开心散各剂量组小鼠的穿越平台次数、平台象限时间百分比和平台象限路程百分比均增加, 其中开心散高剂量组具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3.2 开心散对 APP/PS1 小鼠海马 CA1 区神经元损伤的影响

如图 1 和表 3 所示, 对照组和对照给药组小鼠

海马 CA1 区神经元染色清楚且均匀, 细胞排列整齐, 细胞核呈圆形, 核仁清晰。与对照组相比, 模型组小鼠的海马 CA1 区神经元数量明显减少 ($P < 0.01$), 细胞排列较为分散, 核固缩现象明显, 核仁不清晰; 与模型组相比, 美金刚组小鼠的海马 CA1 神经元数量明显增多 ($P < 0.01$), 神经元排列较为整齐, 核固缩现象明显改善; 开心散各剂量组小鼠的海马 CA1 区神经元数量均明显增多 ($P < 0.01$), 神经元排列较为规则整齐, 核固缩现象明显得到改善。

3.3 开心散对 APP/PS1 小鼠脑组织淀粉样斑块表达的影响

如图 2 所示, 对照组和对照给药组小鼠的皮层和海马中均未检测到阳性表达, 在其他组小鼠的皮

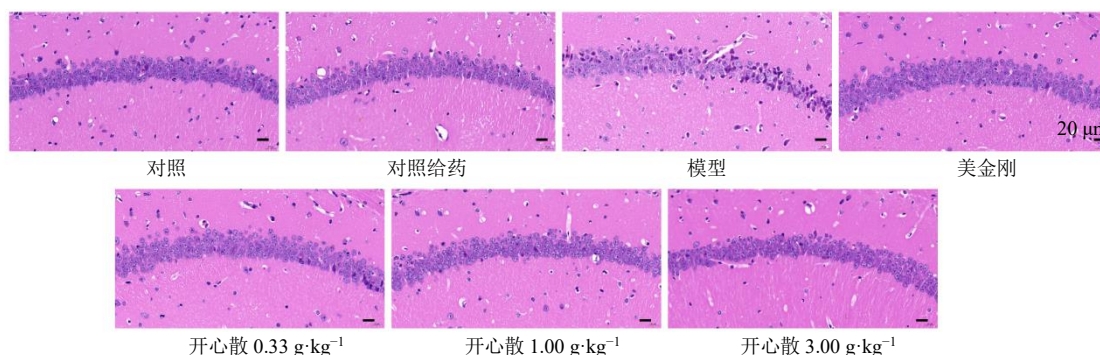


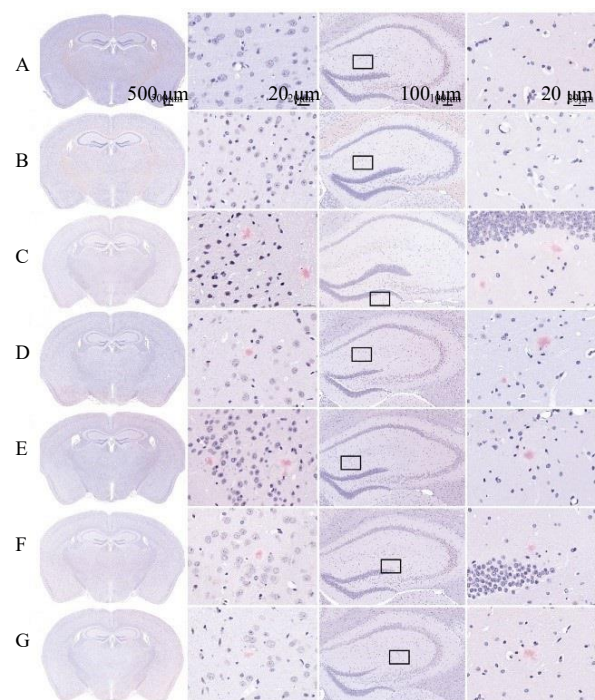
图 1 开心散对 APP/PS1 小鼠海马 CA1 区神经元形态的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Kaixin San on neuron morphology in hippocampal CA1 area of APP/PS1 mice (HE, × 400)

表 3 开心散对 APP/PS1 小鼠海马 CA1 区神经元数量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Kaixin San on number of neurons in hippocampal CA1 area of APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	神经元数量/(个·mm ⁻²)
对照	—	1 978.4 ± 87.3
对照给药	1.00	2 030.1 ± 87.3
模型	—	1 262.4 ± 181.8 ^{##}
美金刚	3.33 × 10 ⁻³	1 685.1 ± 52.7 ^{**}
开心散	0.33	1 633.3 ± 125.1 ^{**}
	1.00	1 598.8 ± 19.9 ^{**}
	3.00	1 771.3 ± 95.4 ^{**}



A-对照组 B-对照给药组 C-模型组 D-美金刚组 E-开心散低剂量组 F-开心散中剂量组 G-开心散高剂量组 图片从左至右依次为全脑 (×20)、皮层 (×630)、海马 (×100)、海马局部放大图 (×630), 黑色框标注局部放大区域, 图 3~5 同

A-control group B-control administration group C-model group D-memantine group E-Kaixin San low-dose group F-Kaixin San medium-dose group G-Kaixin San high-dose group pictures from left to right are the whole brain (×20), cortex (×630), hippocampus (×100) and partial enlargement of hippocampus (×630), partially enlarged area is marked with a black frame, same as figures 3—5

图 2 开心散对 APP/PS1 小鼠脑组织淀粉样斑块表达的影响
Fig. 2 Effect of Kaixin San on expression of amyloid plaques in brain tissue of APP/PS1 mice

层和海马则检测到了呈弥散性分布的粉红色阳性表达, 即淀粉样斑块。分别对海马和皮层中淀粉样斑块阳性表达的 A 值进行半定量分析, 结果见表 4, 与模型组相比, 美金刚组和开心散中、高剂量组小

表 4 开心散对 APP/PS1 小鼠脑组织淀粉样斑块表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Kaixin San on expression of amyloid plaques in brain tissue of APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	淀粉样斑块表达 (A)	
		皮层	海马
对照	—	ND	ND
对照给药	1.00	ND	ND
模型	—	9627 ± 3146	1504 ± 1124
美金刚	3.33 × 10 ⁻³	3802 ± 282 ^{**}	503 ± 625
开心散	0.33	8027 ± 1563	812 ± 201
	1.00	3243 ± 1724 ^{**}	767 ± 301
	3.00	3015 ± 1736 ^{**}	564 ± 496

ND 表示未检测到

ND means not detected

鼠皮层中的淀粉样斑块均明显减少 ($P < 0.01$), 但对海马中淀粉样斑块的表达无明显改善作用。

3.4 开心散对 APP/PS1 小鼠脑组织 Aβ₁₋₄₀ 表达的影响

Aβ₁₋₄₀ 阳性表达为棕褐色。如图 3 和表 5 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠的皮层和海马中 Aβ₁₋₄₀ 阳性表达显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 美金刚组小鼠的皮层和海马中 Aβ₁₋₄₀ 阳性表达明显减少 ($P < 0.05$), 开心散各剂量组小鼠皮层和海马中 Aβ₁₋₄₀ 阳性表达均有所减少, 其中开心散低、中剂量组皮层 Aβ₁₋₄₀ 阳性表达具有显著性差异 ($P < 0.05$),

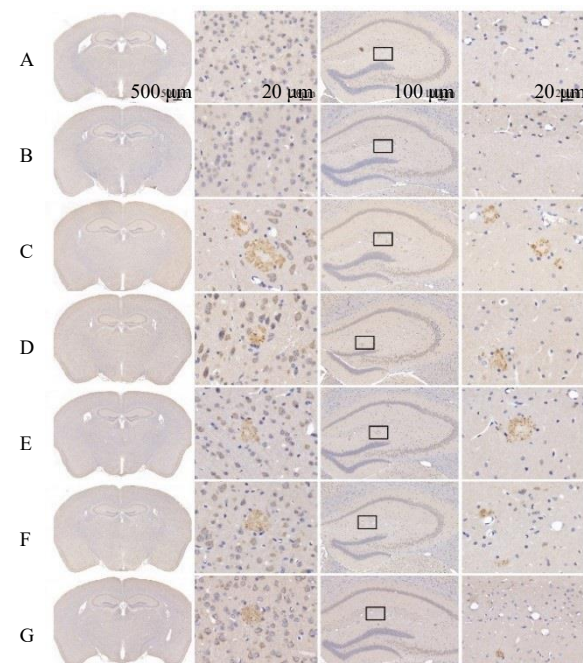


图 3 开心散对 APP/PS1 小鼠脑组织 Aβ₁₋₄₀ 表达的影响
Fig. 3 Effect of Kaixin San on expression of Aβ₁₋₄₀ in brain tissue of APP/PS1 mice

表 5 开心散对 APP/PS1 小鼠脑组织 A β_{1-40} 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 5 Effect of Kaixin San on expression of A β_{1-40} in brain tissue of APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	A β_{1-40} 表达 (A)	
		皮层	海马
对照	—	5270±3160	324±26
对照给药	1.00	5133±1185	280±27
模型	—	39 846±12 580 ^{##}	1821±348 ^{##}
美金刚	3.33×10 ⁻³	16 966±5358*	1025±511*
开心散	0.33	14 615±7362*	1245±631
	1.00	17 508±3210*	648±81*
	3.00	27 571±9859	1064±428*

开心散中、剂量组海马中 A β_{1-40} 阳性表达具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

3.5 开心散对 APP/PS1 小鼠脑组织 GFAP 表达的影响

各组小鼠皮层和海马星形胶质细胞活化标志物 GFAP 的免疫组化实验结果见图 4 和表 6, 阳性表达为棕褐色。与对照组相比, 模型组小鼠皮层和海马中 GFAP 表达明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 美金刚组小鼠皮层中 GFAP 表达明显减少 ($P < 0.01$), 开心散中剂量组海马和皮层中的 GFAP 表达均明显降低 ($P < 0.01$)。

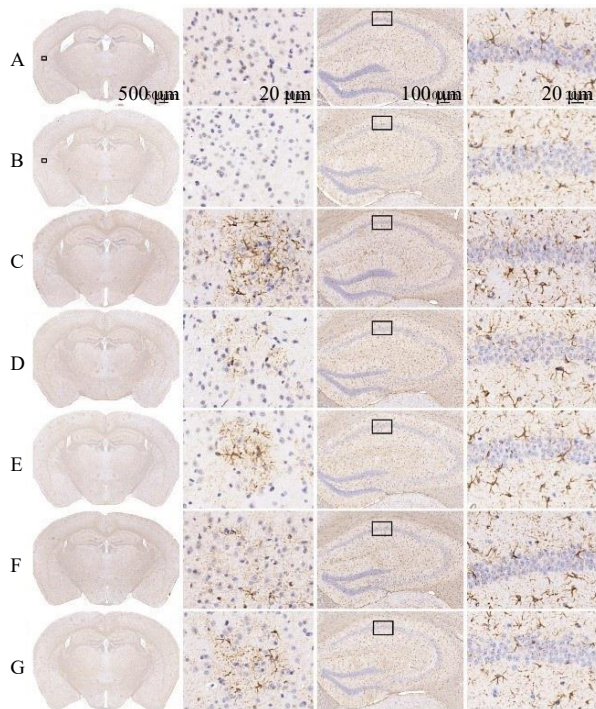


图 4 开心散对 APP/PS1 小鼠脑组织 GFAP 表达的影响
Fig. 4 Effect of Kaixin San on expression of GFAP in brain tissue of APP/PS1 mice

表 6 开心散对 APP/PS1 小鼠脑组织 GFAP 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 6 Effect of Kaixin San on expression of GFAP in brain tissue of APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	GFAP 表达 (A)	
		皮层	海马
对照	—	4961±1589	11 581±3618
对照给药	1.00	4301±1463	11 161±3526
模型	—	12 241±4069 ^{##}	29 747±10 790 ^{##}
美金刚	3.33×10 ⁻³	6228±1099*	28 286±2741
开心散	0.33	11 869±3038	27 884±5122
	1.00	5224±1920**	12 025±7061**
	3.00	10 984±2530	24 291±6069

3.6 开心散对 APP/PS1 小鼠脑组织 Iba-1 表达的影响

各组小鼠皮层和海马小胶质细胞活化标志物 Iba-1 的免疫组化实验结果见图 5 和表 7, 阳性表达为棕褐色。与对照组相比, 模型组小鼠皮层和海马中 Iba-1 的表达明显增加 ($P < 0.05$ 、0.01); 与模型组相比, 美金刚组小鼠海马中 Iba-1 的表达明显减少 ($P < 0.05$), 开心散中剂量组海马和皮层中 Iba-1 表达显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.7 开心散对 APP/PS1 小鼠血清炎症因子水平的影响

如表 8 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠血清

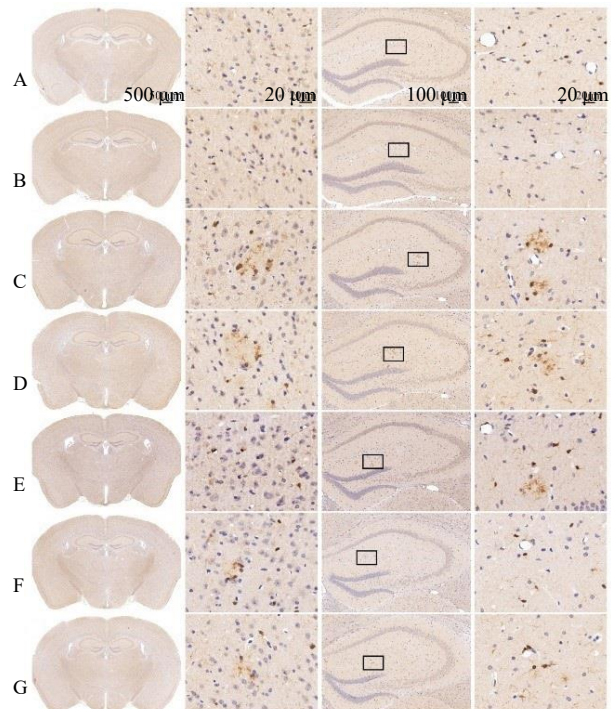


图 5 开心散对 APP/PS1 小鼠脑组织中 Iba-1 表达的影响
Fig. 5 Effect of Kaixin San on expression of Iba-1 in brain tissue of APP/PS1 mice

表 7 开心散对 APP/PS1 小鼠脑组织 Iba-1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of Kaixin San on expression of Iba-1 in brain tissue of APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Iba-1 表达 (A)	
		皮层	海马
对照	—	2155 ± 535	1679 ± 71
对照给药	1.00	1298 ± 233	887 ± 326
模型	—	3590 ± 716 ^{##}	2930 ± 590 [#]
美金刚	3.33 × 10 ⁻³	2166 ± 275	2040 ± 488 [*]
开心散	0.33	2503 ± 1181	1862 ± 633
	1.00	2197 ± 447 ^{**}	1477 ± 387 [*]
	3.00	2808 ± 646	2175 ± 832

表 8 开心散对 APP/PS1 小鼠血清中炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 8 Effect of Kaixin San on inflammatory factors levels in serum of APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	124.6 ± 18.6	106.9 ± 24.0	119.0 ± 12.8
对照给药	1.00	129.9 ± 16.8	108.6 ± 13.1	128.4 ± 17.8
模型	—	156.7 ± 20.7 ^{##}	133.6 ± 28.7 [#]	173.6 ± 26.8 ^{##}
美金刚	3.33 × 10 ⁻³	130.2 ± 19.0 [*]	107.6 ± 16.9 [*]	137.8 ± 21.4 [*]
开心散	0.33	145.8 ± 31.0	118.2 ± 27.2	145.0 ± 35.5
	1.00	133.9 ± 12.1 [*]	112.9 ± 17.2	159.6 ± 26.5
	3.00	123.5 ± 24.1 ^{**}	103.6 ± 26.3 [*]	146.0 ± 34.0 [*]

表 9 开心散对 APP/PS1 小鼠皮层和海马中 Ach 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 9 Effect of Kaixin San on Ach level in cortex and hippocampus of APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Ach/(ng·g ⁻¹)	
		皮层	海马
对照	—	18.0 ± 1.3	12.2 ± 1.3
对照给药	1.00	15.2 ± 0.4	11.3 ± 0.8
模型	—	10.8 ± 2.6 ^{##}	8.9 ± 1.3 ^{##}
美金刚	3.33 × 10 ⁻³	15.8 ± 0.5 ^{**}	9.9 ± 0.8
开心散	0.33	12.5 ± 1.8	9.5 ± 0.7
	1.00	14.8 ± 1.4 ^{**}	9.4 ± 0.9
	3.00	10.6 ± 2.3	8.7 ± 0.7

4 讨论

AD 在中医学属“呆病”“健忘”“虚劳”等范畴。历代中医医家对老年痴呆疾病的症状、病因和病机等都有着全面而深刻的认识，在疾病的治疗上多从补气、益智、安神等方面用药^[14-15]。开心散始载于唐代孙思邈《备急千金要方·卷十四》，为益智方剂，“主好忘”，由“远志、人参各 4 分，茯苓 2 两，石菖蒲 1 两”组成。方中人参具有补气固脱、宁心益智之功效；远志具有安神益智、祛痰、消肿之功效；茯苓具有宁心安神、利水渗湿之功效；石菖蒲具有醒神益智、开窍豁痰之功效^[16]。从数据挖

中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平均明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)；与模型组相比，美金刚组和开心散高剂量组小鼠血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，开心散中剂量组小鼠血清中 TNF-α 水平明显降低 ($P < 0.05$)。

3.8 开心散对 APP/PS1 小鼠皮层和海马中 Ach 水平的影响

如表 9 所示，与对照组相比，模型组小鼠皮层和海马中 Ach 水平均明显下降 ($P < 0.01$)；与模型组相比，美金刚组和开心散中剂量组小鼠皮层中 Ach 水平明显升高 ($P < 0.01$)。

掘角度分析中医药治疗健忘和痴呆的用药规律，人参、远志、茯苓和石菖蒲均为高频使用中药，故可认为开心散治疗老年性痴呆具有历史渊源且是治疗老年痴呆的基础方^[17-18]，其治疗老年痴呆的作用机制值得进一步的研究与探索。

AD 的发病机制复杂，涉及多个病理环节。Aβ 在脑内沉积是 AD 主要的发病机制之一^[19-20]。Aβ 在脑内生成过剩，不能及时得到清除，继而在神经细胞外大量聚集形成淀粉样斑块，引发神经炎症、神经元变性等一系列病理变化，最终导致患者的认知和记忆能力下降^[21]。本研究结果显示，5 月龄 APP/PS1 小鼠皮层和海马中均出现弥散分布的淀粉样斑块，Aβ₁₋₄₀ 表达与对照组相比明显增多。给药 2 个月后，中、高剂量开心散可使 APP/PS1 小鼠皮层中淀粉样斑块表达明显降低，低、中剂量开心散可使 APP/PS1 小鼠皮层中 Aβ₁₋₄₀ 表达明显降低，中、高剂量开心散可使 APP/PS1 小鼠海马中 Aβ₁₋₄₀ 表达明显降低。结果表明，开心散对 APP/PS1 皮层和海马中的 Aβ 沉积具有一定的改善作用，可能通过降低 Aβ₁₋₄₀ 表达发挥作用。

神经炎症也是 AD 的发病机制之一^[22-23]。神经炎症反应主要由脑组织中的免疫细胞异常激活介

导, 星形胶质细胞和小胶质细胞是脑中主要负责免疫调节的细胞, GFAP 和 Iba-1 分别是星形胶质细胞和小胶质细胞活化的标志物^[24-25]。研究表明, 开心散具有降低 AD 小鼠脑组织和血清中炎症因子水平^[26-27]以及通过调控中枢神经炎症系统、抗抑郁的作用^[28-29], 但未见开心散在 APP/PS1 小鼠的抗炎作用报道。本研究结果显示, 5 月龄 APP/PS1 小鼠皮层和海马中 GFAP 和 Iba-1 表达异常增加, 出现星形胶质细胞和小胶质细胞异常活化, 血清中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平增加。中剂量开心散可明显降低 APP/PS1 小鼠皮层和海马中 GFAP 和 Iba-1 表达, 并降低血清中 IL-1 β 水平; 高剂量开心散可明显降低血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平, 表明开心散可缓解星形胶质细胞和小胶质细胞的异常活化, 抑制炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的大量释放。

在 AD 的病理过程中, 炎症反应与 A β 沉积密切相关。A β 沉积可诱导胶质细胞过度激活^[30-31]。小胶质细胞过度激活导致促炎因子大量释放, 对 A β 的清除减少^[32]; 星形胶质细胞被激活后表现出神经毒性作用, 促使炎性介质释放增加, 导致神经变性和突触丢失, 加剧认知障碍^[33], 从而形成恶性循环。开心散具体通过哪些作用靶点和通路抑制胶质细胞活化、炎症反应和 A β 沉积, 有待进一步深入研究。

此外, 有研究表明胆碱能异常与 A β 异常沉积之间存在紧密联系, 胆碱能缺失可能促进 A β 和 tau 的病理改变, 从而导致认知功能障碍^[34]。脑内的 Ach 主要来源于皮层和基底前脑的胆碱能神经元, 在学习记忆与认知功能中起重要作用。FDA 批准上市的 AD 治疗药物主要是胆碱酯酶抑制剂, 它们通过抑制 Ach 水解从而增加脑内 Ach 水平。本研究结果显示, 5 月龄 APP/PS1 小鼠脑组织的皮层和海马脑区均出现 Ach 水平下降, 开心散给药 2 个月后, 中剂量开心散可明显提高大脑皮层中的 Ach 水平, 提示开心散可能通过增加 Ach 的含量发挥改善学习记忆的功能。

综上所述, 本研究发现开心散给药 2 个月可改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆能力, 其作用机制为通过抑制星形胶质细胞和小胶质细胞活化, 降低血清中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平, 改善神经炎症, 降低 A β 的含量, 提高神经递质 Ach 水平, 从而发挥对神经元的保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Knopman D S, Amieva H, Petersen R C, *et al.* Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 1-21.
- [2] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, *et al.* Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397(10284): 1577-1590.
- [3] Graff-Radford J, Yong K X X, Apostolova L G, *et al.* New insights into atypical Alzheimer's disease in the era of biomarkers [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(3): 222-234.
- [4] Leng F D, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: Where do we go from here? [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(3): 157-172.
- [5] 唐·孙思邈撰, 鲁兆麟主校. 备急千金要方 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1997: 222.
- [6] Yi P J, Zhang Z Y, Huang S Q, *et al.* Integrated meta-analysis, network pharmacology, and molecular docking to investigate the efficacy and potential pharmacological mechanism of Kai-Xin-San on Alzheimer's disease [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 932-943.
- [7] Wang N, Jia Y M, Zhang B, *et al.* Neuroprotective mechanism of Kai Xin San: Upregulation of hippocampal insulin-degrading enzyme protein expression and acceleration of amyloid-beta degradation [J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(4): 654-659.
- [8] 李牧函, 张静, 赵润清, 等. 6 首开心散类方对阿尔兹海默病模型小鼠的药理作用及机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(7): 1269-1274.
- [9] Cao C, Xiao J Y, Liu M Q, *et al.* Active components, derived from Kai-Xin-San, a herbal formula, increase the expressions of neurotrophic factor NGF and BDNF on mouse astrocyte primary cultures via cAMP-dependent signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 224: 554-562.
- [10] Zhu Y, Chao C, Duan X Z, *et al.* Kai-Xin-San series formulae alleviate depressive-like behaviors on chronic mild stressed mice via regulating neurotrophic factor system on hippocampus [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1467.
- [11] Zhu Y, Duan X Z, Cheng X X, *et al.* Kai-Xin-San, a standardized traditional Chinese medicine formula, up-regulates the expressions of synaptic proteins on hippocampus of chronic mild stress induced depressive rats and primary cultured rat hippocampal neuron [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 193: 423-432.
- [12] Smriga M, Saito H, Nishiyama N. Hoelen (*Poria cocos* Wolf) and ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer), the ingredients of a Chinese prescription DX-9386, individually promote hippocampal long-term potentiation *in vivo* [J]. *Biol Pharm Bull*, 1995, 18(4): 518-522.
- [13] Vorhees C V, Williams M T. Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of

- learning and memory [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 848-858.
- [14] 易娅静, 于颖, 刘旭, 等. 中医药治疗阿尔兹海默病研究进展 [J]. 中医药学报, 2021, 49(4): 99-105.
- [15] 宋克立, 刘源香. 中医治疗阿尔兹海默病研究进展 [J]. 西部中医药, 2019, 32(4): 148-151.
- [16] 王海霞, 姜宁, 吕静薇, 等. 开心散抗抑郁、改善学习记忆作用及机制研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(14): 3802-3813.
- [17] 纪荣芳, 牛建昭, 许树强, 等. 从数据挖掘角度看中医药治疗健忘与痴呆 [J]. 中日友好医院学报, 2006, 20(6): 337-340.
- [18] 芦锰, 周雨慧, 李晓宁, 等. 基于数据挖掘中医药治疗阿尔兹海默病用药规律研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(6): 1558-1563.
- [19] Busche M A, Hyman B T. Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(10): 1183-1193.
- [20] Greenberg S M, Bacskaï B J, Hernandez-Guillamon M, et al. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease-one peptide, two pathways [J]. *Nat Rev Neurol*, 2020, 16(1): 30-42.
- [21] Panza F, Lozupone M, Logroscino G, et al. A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(2): 73-88.
- [22] Kwon H S, Koh S H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes [J]. *Transl Neurodegener*, 2020, 9(1): 42.
- [23] Ransohoff R M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration [J]. *Science*, 2016, 353(6301): 777-783.
- [24] Taipa R, Ferreira V, Brochado P, et al. Inflammatory pathology markers (activated microglia and reactive astrocytes) in early and late onset Alzheimer disease: A post mortem study [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2018, 44(3): 298-313.
- [25] Price B R, Johnson L A, Norris C M. Reactive astrocytes: The nexus of pathological and clinical hallmarks of Alzheimer's disease [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 68: 101335.
- [26] 师冉, 季旭明, 董丽雪, 等. 开心散对快速老化痴呆小鼠 SAMP8 炎症因子及 β -APP 影响随机平行对照研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2013, 27(13): 101-104.
- [27] Guo S, Wang J, Wang Y, et al. Study on the multitarget synergistic effects of Kai-Xin-San against Alzheimer's disease based on systems biology [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 1707218.
- [28] Qu S, Liu M, Cao C, et al. Chinese medicine formula Kai-Xin-San ameliorates neuronal inflammation of CUMS-induced depression-like mice and reduces the expressions of inflammatory factors via inhibiting TLR4/IKK/NF- κ B pathways on BV2 cells [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 626949.
- [29] Cao C, Liu M, Qu S, et al. Chinese medicine formula Kai-Xin-San ameliorates depression-like behaviours in chronic unpredictable mild stressed mice by regulating gut microbiota-inflammation-stress system [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 261: 113055.
- [30] Kaur D, Sharma V, Deshmukh R. Activation of microglia and astrocytes: A roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease [J]. *Inflammopharmacology*, 2019, 27(4): 663-677.
- [31] Milà-Alomà M, Salvadó G, Gisbert J D, et al. Amyloid beta, tau, synaptic, neurodegeneration, and glial biomarkers in the preclinical stage of the Alzheimer's continuum [J]. *Alzheimers Dement*, 2020, 16(10): 1358-1371.
- [32] Krasemann S, Madore C, Cialic R, et al. The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases [J]. *Immunity*, 2017, 47(3): 566-581.
- [33] Arranz A M, De Strooper B. The role of astroglia in Alzheimer's disease: Pathophysiology and clinical implications [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(4): 406-414.
- [34] Ramos-Rodriguez J J, Pacheco-Herrero M, Thyssen D, et al. Rapid β -amyloid deposition and cognitive impairment after cholinergic denervation in APP/PS1 mice [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2013, 72(4): 272-285.

[责任编辑 李亚楠]