

巴利森苷 B 改善慢性束缚所致认知功能减退的作用机制研究

强 萌^{1,2}, 姜 宁², 黄 红², 张亦文², 陈 芳², 李召辉¹, 于 涵¹, 毛 浙¹, 刘新民^{3*}, 吕光华^{1*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

3. 宁波大学新药技术研究院, 浙江 宁波 315000

摘 要: 目的 探究巴利森苷 B 改善慢性束缚 (chronic restraint stress, CRS) 所致认知功能减退的作用及潜在机制。方法 将 72 只 ICR 雄性小鼠随机分为对照组、模型组、多奈哌齐 (1.6 mg/kg) 组和巴利森苷 B 低、中、高剂量 (2、4、8 mg/kg) 组, 每组 12 只。小鼠接受 35 d 束缚造模同时给予药物干预, 第 36 天进行旷场实验、物体认知实验、避暗实验; 采用 UPLC-MS/MS 方法测定海马中乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach)、谷氨酸 (glutamic acid, Glu)、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 水平; 采用 Western blotting 检测海马脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-Akt)/Akt、磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, p-ERK)/ERK 蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组小鼠在新物体识别和新位置识别中的相对辨别指数显著下降 ($P < 0.05$), 入暗潜伏期显著缩短 ($P < 0.01$), 暗室时间显著增加 ($P < 0.001$), 海马中 Glu 水平显著升高 ($P < 0.01$), GABA 和 Ach 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), BDNF、p-Akt/Akt、p-ERK/ERK 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 巴利森苷 B 组小鼠在新物体识别和新位置识别中的相对辨别指数显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 入暗潜伏期显著延长 ($P < 0.05$ 、 0.01), 暗室时间显著减少 ($P < 0.01$ 、 0.001), 海马中 Glu 水平显著降低 ($P < 0.05$), GABA 和 Ach 水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), BDNF、p-Akt/Akt、p-ERK/ERK 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 巴利森苷 B 能够显著改善由 CRS 引起的空间、非空间认知功能障碍, 其机制可能与调控神经递质、促进 BDNF 通路激活有关。

关键词: 巴利森苷 B; 认知障碍; 神经递质; 脑源性神经营养因子; 慢性束缚应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)11-3959-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.11.016

Mechanism of parishin B in improving cognitive impairment induced by chronic restraint stress

QIANG Meng^{1,2}, JIANG Ning², HUANG Hong², ZHANG Yiwen², CHEN Fang², LI Zhaohui¹, YU Han¹, MAO Xi¹, LIU Xinmin³, LYU Guanghua¹

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Institute of Medicinal Plant Development (IMPLAD), Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. Institute of Drug Discovery Technology, Ningbo University, Ningbo 315000, China

Abstract: Objective To investigate the effect and potential mechanism of parishin B on cognitive dysfunction induced by chronic restraint stress (CRS). **Methods** A total of 72 male ICR male mice were randomly divided into control group, model group, donepezil (1.6 mg/kg) group and parishin B low-, medium-, high-dose (2, 4, 8 mg/kg) groups, with 12 mice in each group. Mice were subjected to 35 d of restraint modeling and drug intervention. On the 36th day, open field test, object cognition test and step-through test were conducted; Levels of acetylcholine (Ach), glutamic acid (Glu), γ -aminobutyric acid (GABA) in hippocampus were measured using

收稿日期: 2025-03-12

基金项目: 四川省科技计划项目 (2021YFYZ0012); 国家自然科学基金资助项目 (82274056); 中国医学科学院创新工程 (2021-I2M-1-034); 新疆维吾尔自治区重大科技专项 (2023A02010-3)

作者简介: 强 萌 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与鉴定。E-mail: 1790415094@qq.com

*通信作者: 刘新民 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药神经药理及实验方法。E-mail: liuxinmin@hotmail.com

吕光华 (1965—), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药鉴定及资源研究与利用。E-mail: lugh@cdutcm.edu.cn

UPLC-MS/MS; Protein expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), phosphorylated protein kinase B (p-Akt)/Akt and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (p-ERK)/ERK in hippocampus were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, the relative discrimination index in new object recognition and new position recognition of mice in model group were significantly decreased ($P < 0.05$), the latent period in the dark was significantly shortened ($P < 0.01$), the dark room time was significantly increased ($P < 0.001$), Glu level in hippocampus was significantly increased ($P < 0.01$), GABA and Ach levels were significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$), and the expression levels of BDNF, p-Akt/Akt and p-ERK/ERK proteins were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$); Compared with model group, the relative discrimination index in new object recognition and new position recognition of mice in parishin B group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), the latent period in the dark was significantly prolonged ($P < 0.05, 0.01$), the dark room time was significantly reduced ($P < 0.01, 0.001$), Glu level in hippocampus was significantly reduced ($P < 0.05$), GABA and Ach levels were significantly increased ($P < 0.01, 0.001$), and the expression levels of BDNF, p-Akt/Akt and p-ERK/ERK proteins were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Parishin B could significantly improve spatial and non-spatial cognitive impairment caused by CRS, and its mechanism may be related to regulating neurotransmitters and promoting BDNF pathway activation.

Key words: parishin B; cognitive impairment; neurotransmitters; brain-derived neurotrophic factor; chronic restraint stress

应激是个体在面对生理或心理威胁时产生的常见非特异性反应。现代科学研究已证明,社会性生理压力与记忆障碍之间存在密切相关性^[1]。长期处于应激状态使得机体适应机制失效导致中枢神经系统逐渐受到损伤,从而引起认知功能障碍^[2]。认知功能障碍不仅严重影响个体的日常生活、心理健康和社会交往,往往还与多种慢性病的发生和发展密切相关^[3-4],特别是神经退行性疾病,如阿尔茨海默病、帕金森病和心脑血管疾病等^[5-6]。这些病症不仅给患者带来生理和心理上的痛苦,同时也给家庭和社会带来沉重的负担^[7-8]。目前,临床治疗认知功能损伤的药物大多为胆碱酯酶抑制剂,如多奈哌齐、利伐斯汀等。这些药物虽然能够改善症状,但常伴有恶心、腹泻、厌食和呕吐等不良反应,限制了其临床应用^[9]。因此,寻找一个安全性高、疗效稳定的有效成分,在治疗认知功能障碍的研究中尤为迫切。

中药治疗抑郁和学习记忆损伤已有广泛研究,可通过调节人体对外源性伤害性刺激的抵抗力发挥保护作用,对于应激所致认知功能性损伤的防护具有独特优势^[10-11]。巴利森苷 B 是从兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎中分离出的一种巴利森苷衍生物,是天麻的主要活性成分之一。巴利森苷类成分具有潜在的神经保护作用,对神经系统疾病的治疗具有重要意义^[12-13]。巴利森苷类成分主要通过主动转运的方式被吸收,由于其极性相对较大,在各组织中的分布范围相对较窄,主要经小肠代谢,其代谢产物主要通过尿液排泄,部分可能通过粪便排泄。研究发现,巴利森苷 B 能够有效对抗

东莨菪碱、乙醇致小鼠记忆功能损伤,可以改善脑血管缺血引起的认知功能损伤^[14]。然而,目前关于巴利森苷 B 的研究有限,特别是关于巴利森苷 B 是否可以改善慢性应激引起的认知障碍的作用及其具体的机制尚未见报道。慢性束缚应激 (chronic restraint stress, CRS) 模型通过将动物置于狭小空间并限制其行为和活动,从而模拟人类长期处于封闭空间中产生的生理和心理压力,最终导致记忆损伤,是一种常用的模拟慢性应激致认知障碍的动物模型^[15]。大量文献报道及本课题组前期研究表明,CRS 会引起动物的认知功能障碍,诱发脑内神经递质紊乱、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 水平降低等^[16]。本研究采用 CRS 致认知障碍小鼠模型,研究巴利森苷 B 对 CRS 引起的认知损伤作用及机制,旨在阐明巴利森苷 B 对 CRS 诱导的认知缺损的作用,并为其在环境压力引起的认知损伤中的应用提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠 72 只,体质量 19~22 g,购自北京维通利华实验动物公司,动物生产许可证号 SCXK (京) 2021-0006。动物饲养于中国医学科学院药用植物研究所,12 h 光照/12 h 黑暗,室温 22~25 °C,相对湿度 (55±10)%,自由进食饮水。动物实验遵循实验动物伦理 3R 原则,并经过中国医学科学院药用植物研究所实验伦理委员会审批 (批准号 SLXD-20240710012)。

1.2 药品与试剂

巴利森苷 B (批号 174972-79-3,质量分数≥

98%) 购自成都普思生物科技有限公司; 盐酸多奈哌齐片 (批号 2102079, 10 mg/片) 购自卫材 (中国) 药业有限公司; 乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach, 批号 H7752, 质量分数 $\geq 99\%$)、谷氨酸 (glutamic acid, Glu, 批号 95199, 质量分数 $\geq 99\%$)、 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA, 批号 L40690, 质量分数 $\geq 99\%$)、甘氨酸 (批号 G8898) 均购自美国 Sigma 公司; 甲酸 (批号 A117-50, 质量分数 $\geq 99\%$)、甲醇 (批号 A456-4, 质量分数 $\geq 99\%$)、乙腈 (批号 A955-4, 质量分数 $\geq 99\%$) 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 对乙酰氨基酚 (批号 A32681) 购自上海吉至生化科技有限公司; 三氟乙酸 (批号 T26030) 购自上海吉至生化科技有限公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒 (批号 BC3710)、BeyoECL Moon 发光液 (批号 P0018FM)、Western 一抗稀释液 (批号 P0023A) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 A19065) 购自 Abclonal 公司; 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 抗体 (批号 4685)、p-Akt 抗体 (批号 4060) 购自美国 CST 公司; 细胞外调节蛋白激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 抗体 (批号 ab184699)、p-ERK 抗体 (批号 ab201015) 均购自英国 Abcam 公司; HRP 标记的山羊抗兔二抗 (批号 AS014)、蛋白印迹膜再生液 (批号 CW0056M)、蛋白上样缓冲液 (批号 CW0027S) 均购自江苏康为世纪生物科技股份有限公司。

1.3 仪器

小鼠束缚器、小鼠旷场、小鼠物体认知、小鼠穿梭五合一装置 (中国医学科学院药用植物研究所与安徽正华公司联合研发); Fresco 21 型高速低温离心机 (美国 Thermo Electron 公司); VibraCell 型超声波破碎仪 (美国 Sonics 公司); Ultra Aqueous C₁₈ 色谱柱 (美国 Restek 公司); New Classic MF 型电子分析天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); D1011U 型微量高速离心机 [大龙兴创实验仪器 (北京) 股份公司]; LC-20AT 型超高效液相色谱仪 (日本岛津公司); Qtrap-5500 型质谱仪 (美国 AB Sciex 公司); TS-1 型脱色摇床 (江苏海门市其林贝尔仪器制造公司); Power Pac Basic 型电泳仪、ChemiDoc™ XRS 型凝胶成像系统 (美国 Bio Rad 公司); HH-4 型水浴锅 (常州国华电器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

小鼠适应性饲养 9 d 后, 随机分为对照组、模型组、多奈哌齐 (1.6 mg/kg) 组和巴利森昔 B 低、中、高剂量 (2、4、8 mg/kg) 组, 每组 12 只。将小鼠放入课题组自制小鼠束缚器中, 束缚器顶部以及四周均有孔洞, 来保持束缚器内空气流通, 用束缚器底座将小鼠固定在束缚器中, 保持头部可以活动但不能自由转身的状态即可, 在束缚过程及时观察小鼠的状态, 避免死亡, 束缚时间为 22:00~8:00, 持续束缚 35 d^[17]。造模同时, 各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d。末次给药后, 进行行为学检测。

2.2 旷场实验

旷场实验仪器由 4 个箱子通道组成, 每个箱子通道上方都有光源、摄像头, 可同时监测 4 只动物的活动。并且有摄像头对动物在箱子中的活动进行监测, 通过仪器的自主活动软件分析得到动物 5 min 内的总路程、平均速度来评价小鼠的自主活动性^[18]。

2.3 物体认知实验

物体认知实验分为新物体识别和物体位置识别。适应期和熟悉期结束后, 记录测试期内 5 min 动物分别对新旧物体的探索时间, 并计算相对辨别指数。在新物体识别实验结束后的第 2 天进行新位置识别, 记录测试期内 5 min 动物对新旧位置的物体的探索时间, 并计算相对辨别指数^[19]。

2.4 避暗实验

避暗实验装置分为明室和暗室 2 个区域, 将小鼠从明室放入, 自由活动 3 min 后, 暗室开始通电, 小鼠进入暗室就会遭受电击并逃回明室, 持续 5 min 后获得阶段实验结束; 24 h 后进行巩固阶段实验, 将小鼠背朝通道从明室放入后, 暗室即可通电, 系统记录 5 min 内小鼠第 1 次从明室进入暗室的时间 (即入暗潜伏期) 等指标作为认知障碍评价指标^[20]。

2.5 海马组织中神经递质水平的检测

精密称定 Ach、Glu、GABA 对照品, 分别配制 2 mg/mL 的储备液, 将储备液混匀后, 依次稀释成混合对照品溶液。取海马组织称定质量, 加入超纯水, 冰浴匀浆, 吸取组织匀浆液加入内标液, 混匀后加入三氟乙酸沉淀蛋白, 4 °C 离心后, 吸取上清液。采用本课题组建立的神经递质 UPLC-MS/MS 检测分析方法^[21], 对小鼠海马组织神经递质水平进行检测。

2.6 Western blotting 检测相关蛋白表达

取海马组织称重,加入含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液,匀浆、离心、静置、收集上清,采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后,加入蛋白上样缓冲液,沸水加热 5 min 使蛋白变形。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h,分别加入 BDNF(1:2 000)、Akt(1:1 000)、p-Akt(1:2 000)、ERK(1:1 000)、p-ERK(1:2 000) 抗体,4 ℃ 孵育过夜;洗涤 3 次后加入二抗,室温孵育 60 min,洗涤 3 次,滴加显影液于凝胶成像仪中显影,使用 Image J 软件分析条带灰度值^[22]。

2.7 统计学分析

应用 IBM SPSS 22.0 软件分析实验数据,实验结果用单因素方差分析(One-way ANOVA)组间的差异,通过 LSD analysis 进行两两比较。

3 结果

3.1 巴利森苷 B 对 CRS 小鼠旷场实验的影响

如表 1 所示,在旷场实验中,各组小鼠运动路程及运动时间均无显著差异。

表 1 巴利森苷 B 对 CRS 小鼠旷场实验的影响
($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of parishin B on open field test of CRS mice
($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	总路程/cm	总时间/s
对照	—	1 405.726 ± 138.378	103.245 ± 8.787
模型	—	1 839.126 ± 155.512	128.760 ± 8.050
多奈哌齐	1.6	1 747.004 ± 281.203	119.174 ± 12.457
巴利森苷 B	2	1 827.011 ± 214.749	127.599 ± 9.457
	4	1 592.599 ± 154.931	122.350 ± 11.859
	8	1 709.217 ± 143.833	118.766 ± 6.939

3.2 巴利森苷 B 对 CRS 小鼠物体认知实验的影响

如表 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠新物体相对辨别指数和新位置相对辨别指数显著性降低($P < 0.05$);与模型组比较,巴利森苷 B 低剂量组小鼠新物体相对辨别指数显著升高($P < 0.05$),多奈哌齐组和巴利森苷 B 高剂量组小鼠新位置相对辨别指数显著升高($P < 0.01$)。

3.3 巴利森苷 B 对 CRS 小鼠避暗实验的影响

如表 3 所示,与对照组比较,模型组小鼠入暗潜伏期显著缩短($P < 0.001$),暗室时间显著增加($P < 0.001$);与模型组比较,巴利森苷 B 各剂量组小鼠暗潜伏期显著延长($P < 0.05$ 、0.01),暗室时间

表 2 巴利森苷 B 对 CRS 小鼠物体认知实验的影响
($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of parishin B on object recognition test of CRS mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	新物体相对辨别 指数	新位置相对辨别 指数
对照	—	0.360 ± 0.033	0.138 ± 0.065
模型	—	0.048 ± 0.087*	-0.140 ± 0.106*
多奈哌齐	1.6	0.220 ± 0.062	0.144 ± 0.058 ^{##}
巴利森苷 B	2	0.311 ± 0.053 [#]	-0.002 ± 0.087
	4	0.139 ± 0.048	0.031 ± 0.523
	8	0.268 ± 0.237	0.146 ± 0.064 ^{###}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$, 下表同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; [#] $P < 0.05$

^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs model group, same as below tables.

表 3 巴利森苷 B 对 CRS 小鼠避暗实验的影响
($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effect of parishin B on step-through test of CRS mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	入暗潜伏期/s	暗室时间/s
对照	—	239.167 ± 29.687	1.177 ± 0.616
模型	—	99.800 ± 27.392**	5.035 ± 1.126***
多奈哌齐	1.6	187.727 ± 34.552	1.860 ± 0.620 ^{##}
巴利森苷 B	2	194.167 ± 30.414 [#]	1.651 ± 0.465 ^{###}
	4	203.455 ± 33.321 [#]	1.705 ± 0.496 ^{###}
	8	227.909 ± 31.039 ^{###}	1.371 ± 0.582 ^{###}

显著减少($P < 0.01$ 、0.001),多奈哌齐组小鼠暗室时间显著减少($P < 0.01$)。

3.4 巴利森苷 B 对 CRS 小鼠海马区氨基酸类神经递质水平的影响

如表 4 所示,与对照组比较,模型组小鼠海马中 Glu 水平显著升高($P < 0.01$),GABA 水平显著性降低($P < 0.001$);与模型组比较,巴利森苷 B 低、高剂量组海马中 Glu 水平显著降低($P < 0.05$),多奈哌齐组和巴利森苷 B 高剂量组 GABA 水平显著升高($P < 0.001$)。

表 4 巴利森苷 B 对 CRS 小鼠海马区氨基酸神经递质水平的影响
($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Effect of parishin B on levels of hippocampal amino acid neurotransmitter of CRS mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	Glu/(ng·mg ⁻¹)	GABA/(ng·mg ⁻¹)
对照	—	93.268 ± 2.871	112.695 ± 4.434
模型	—	108.546 ± 3.242**	79.509 ± 2.792***
多奈哌齐	1.6	105.668 ± 3.325	100.617 ± 5.389 ^{###}
巴利森苷 B	2	98.572 ± 2.775 [#]	83.998 ± 3.602
	4	100.243 ± 3.660	84.506 ± 3.963
	8	96.091 ± 2.858 [#]	100.133 ± 4.342 ^{###}

3.5 巴利森苷 B 对 CRS 小鼠海马区胆碱能神经递质水平的影响

如表 5 所示,与对照组比较,模型组小鼠海马中 Ach 水平显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组和巴利森苷 B 中剂量组小鼠海马中 Ach 水平显著升高 ($P<0.01$)。

3.6 巴利森苷 B 对 CRS 小鼠海马区相关信号通路的影响

如图 1 和表 6 所示,与对照组比较,模型组小

表 5 巴利森苷 B 对 CRS 小鼠海马区胆碱能神经递质水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 5 Effect of parishin B on level of hippocampal cholinergic neurotransmitter of CRS mice ($\bar{x} \pm s, n = 12$)		
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Ach/(ng·mg ⁻¹)
对照	—	0.172±0.008
模型	—	0.131±0.004**
多奈哌齐	1.6	0.168±0.010 [#]
巴利森苷B	2	0.127±0.007
	4	0.170±0.012 [#]
	8	0.141±0.008

表 6 巴利森苷 B 对 CRS 小鼠海马区相关信号通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of parishin B on hippocampal correlated signaling pathway of CRS mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)				
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	BDNF/GAPDH	p-Akt/Akt	p-ERK/ERK
对照	—	1.214±0.082	1.114±0.064	1.293±0.070
模型	—	0.870±0.023**	0.773±0.043*	0.697±0.095*
多奈哌齐	1.6	0.974±0.103	1.089±0.125 [#]	1.671±0.096 [#]
巴利森苷B	2	1.160±0.101 [#]	1.178±0.126 [#]	1.483±0.257 [#]
	4	1.046±0.051	1.076±0.076 [#]	1.883±0.218 ^{###}
	8	1.059±0.047	1.273±0.077 ^{###}	2.009±0.235 ^{###}

4 讨论

巴利森苷 B 是天麻中的主要活性成分之一,天麻中巴利森苷类成分可以在体内水解代谢为成天麻素或含游离天麻素的偶联物,天麻素能够透过血脑屏障,但在体内作用时间短;而以巴利森苷形式给药能够延缓吸收半衰期和消除半衰期,从而更持久地发挥对中枢神经系统的保护作用,更有效地改善认知功能障碍^[23]。

CRS 是一种经典的实验模型,常用于模拟长期狭小空间下对认知功能的影响。长期应激会导致氧化应激水平升高,损伤神经系统,最终引发认知功能障碍^[24]。本研究旷场实验中各组小鼠的自主活动性无明显差异,表明各组小鼠的自主活动能力在同一水平上。新物体识别实验和物体位置识别实验根据啮齿类动物对新事物具有接近和探索的欲望本能而设计,能够测试动物在短期内的辨别能力和空

鼠海马中 BDNF、p-Akt/Akt、p-ERK/ERK 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01);与模型组比较,各给药组 p-Akt/Akt、p-ERK/ERK 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),巴利森苷 B 低剂量组 BDNF 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

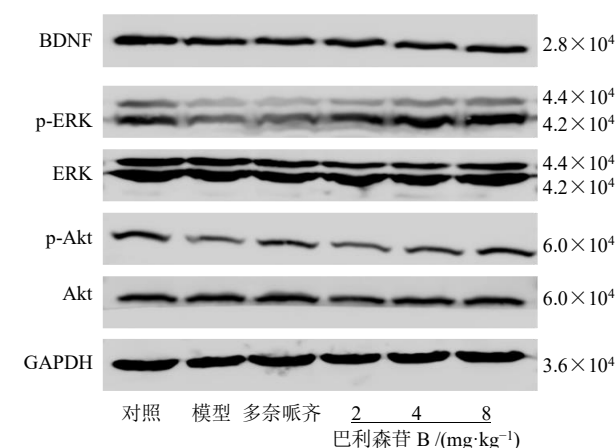


图 1 各组小鼠海马组织相关信号通路蛋白表达

Fig. 1 Expressions of signaling pathway proteins related to hippocampal tissue of mice in each group

间记忆能力^[25]。结果显示,模型组小鼠对新物体和新位置的探索时间显著减少,相对辨别指数显著降低,辨别能力显著损伤;与模型组比较,巴利森苷 B (2 mg/kg) 组对新物体的探索时间显著增加,巴利森苷 B (8 mg/kg) 组对新位置的探索时间显著增加,相对辨别指数显著升高,小鼠的辨别能力增强,表明巴利森苷 B 可以改善 CRS 引起的短期空间和非空间记忆损伤。避暗实验是根据动物嗜暗习性设计的被动惩罚性回避实验,用于测试小鼠对明暗环境的辨别能力以及对安全区域的记忆能力^[26]。本研究中模型组小鼠的入暗潜伏期显著缩短,暗室时间显著增加,表现出对安全区域记忆能力的损伤;给予巴利森苷 B (2、4、8 mg/kg) 后,小鼠入暗潜伏期显著延长,暗室时间显著减少,对明暗环境的辨别能力增强及对安全区域的记忆能力显著改善,但无明显的量效关系,表明巴利森苷 B 可以显著改善

CRS 引起的短期非空间记忆损伤。

Glu 是中枢神经系统中氨基酸类兴奋性神经递质,广泛分布于大脑和脊髓中,Glu 水平的变化与认知功能障碍密切相关,其释放过多可能导致神经元的过度兴奋和产生神经毒性,从而加剧认知功能障碍^[27]。本研究结果显示,与对照组比较,模型组小鼠海马中 Glu 水平显著升高,给予巴利森苷 B(2、8 mg/kg)后 Glu 水平显著降低。GABA 是中枢神经系统中氨基酸类抑制性神经递质,GABA 通过与 GABA_A 和 GABA_B 受体结合,调节神经元的兴奋性和抑制性平衡,从而影响多种认知功能,当 GABA 水平在海马区域显著减少时,会导致神经元的过度兴奋,从而引发认知功能损伤^[28]。本研究结果显示,与对照组比较,模型组小鼠海马中 GABA 水平显著降低,给予巴利森苷 B(8 mg/kg)后 GABA 水平显著升高,表明巴利森苷 B 对 CRS 引起的兴奋性神经毒性具有显著的抑制作用。Ach 在中枢神经系统和外周神经系统广泛存在,参与多种生理功能的调节,海马中胆碱能神经活动减弱与认知功能下降紧密相关且与抑制性和兴奋性神经递质的调控有关^[29-31]。本研究中,与对照组比较,模型组小鼠海马中 Ach 水平显著下降,进而影响记忆和认知功能,给予巴利森苷 B(4 mg/kg)后 Ach 水平显著升高,表明巴利森苷 B 对 CRS 引起的胆碱能系统失衡具有显著的改善作用。

BDNF 是一种重要的神经营养因子,在海马突触可塑性、学习和记忆以及神经元抗逆性中起主要作用^[32-33]。ERK 通路是 BDNF 激活的主要信号通路之一,ERK 的激活促进神经元的分化、突触可塑性以及神经再生^[34]。此外,ERK 通路还参与调节神经元 Glu 的释放,影响突触传递和学习记忆^[35]。Akt 是 BDNF 激活的另一条主要信号通路,Akt 的激活促进神经元的存活、突触可塑性以及神经保护。BDNF 通过酪氨酸激酶受体 B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 激活 ERK 和 Akt 通路,ERK 和 Akt 的磷酸化可以调节多种下游信号分子,影响细胞的生长、增殖、代谢和凋亡^[36]。同时,ERK 的激活可以促进 Akt 的磷酸化,产生交互协同作用。本研究中,与对照组比较,模型组小鼠海马中 BDNF、p-Akt/Akt、p-ERK/ERK 蛋白表达水平显著降低,可能会影响神经元的存活和导致细胞生长受阻;给予巴利森苷 B 后可上调 BDNF、p-Akt/Akt、p-ERK/ERK 表达,但量效关系不明显。表明巴利森苷 B 可能通

过调控 ERK 和 Akt 通路发挥神经元保护作用。

综上,巴利森苷 B 能够显著改善由 CRS 引起的小鼠认知功能障碍,其机制可能与调控神经递质及激活 BDNF 通路有关。本研究为巴利森苷 B 的应用提供了依据,为认知功能障碍的防治提供了新的研究方向和科学依据,为巴利森苷 B 在认知功能改善方面的进一步研究和应用提供了有力支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bowman R E, Beck K D, Luine V N. Chronic stress effects on memory: Sex differences in performance and monoaminergic activity [J]. *Horm Behav*, 2003, 43(1): 48-59.
- [2] 奉新翔, 金鑫, 旷昕. 慢性应激与中枢神经系统疾病研究进展 [J]. *人人健康*, 2022(10): 69-71.
- [3] Gonzales M M, Garbarino V R, Pollet E, *et al.* Biological aging processes underlying cognitive decline and neurodegenerative disease [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(10): e158453.
- [4] Tangalos E G, Petersen R C. Mild cognitive impairment in geriatrics [J]. *Clin Geriatr Med*, 2018, 34(4): 563-589.
- [5] Cai H, Li G C, Hua S S, *et al.* Effect of exercise on cognitive function in chronic disease patients: A Meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials [J]. *Clin Interv Aging*, 2017, 12: 773-783.
- [6] Zheng C L, Xu R. The Alzheimer's comorbidity phenome: Mining from a large patient database and phenome-driven genetics prediction [J]. *JAMIA Open*, 2019, 2(1): 131-138.
- [7] Krivanek T J, Gale S A, McFeeley B M, *et al.* Promoting successful cognitive aging: A ten-year update [J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 81(3): 871-920.
- [8] Park K H, Lim J S, Seo S W, *et al.* Executive summary of the 2019 international conference of Korean dementia association: Exploring the novel concept of Alzheimer's disease and other dementia: A report from the academic committee of the Korean dementia association [J]. *Dement Neurocogn Disord*, 2020, 19(2): 39-53.
- [9] Zhang N, Gordon M L. Clinical efficacy and safety of donepezil in the treatment of Alzheimer's disease in Chinese patients [J]. *Clin Interv Aging*, 2018, 13: 1963-1970.
- [10] 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.
- [11] 陈芳, 姜宁, 黄红, 等. 中药防护航天特因环境应激损伤的研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(12): 3811-3820.
- [12] 王信, 李莉, 杨宝慧, 等. 天麻活性成分巴利森苷 B 对

- 匹鲁卡品致病小鼠痫性行为的干预作用及网络药理学作用机制分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(6): 595-600.
- [13] 于涵, 张俊, 陈碧清, 等. 天麻化学成分分类及其药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(17): 5553-5564.
- [14] 张菊, 宋娜丽, 马克坚. 天麻中巴利森苷类成分药理作用、体内过程研究进展 [J]. 中成药, 2022, 44(7): 2223-2229.
- [15] Ye F, Dong M C, Xu C X, *et al.* Effects of different chronic restraint stress periods on anxiety- and depression-like behaviors and tryptophan-kynurenine metabolism along the brain-gut axis in C57BL/6N mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 965: 176301.
- [16] Li C C, Gan L, Tan Y, *et al.* Chronic restraint stress induced changes in colonic homeostasis-related indexes and tryptophan-kynurenine metabolism in rats [J]. *J Proteomics*, 2021, 240: 104190.
- [17] 黄红. 鲜天麻提取物改善模拟航天应激所致认知功能减退作用及机制研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2022.
- [18] 吕静薇, 宋广青, 董黎明, 等. 物体认知: 基于动物自发行的一种学习记忆评价方法的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(3): 21-27.
- [19] 姜宁, 张亦文, 黄红, 等. 大小鼠学习记忆行为实验方法分类概述 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(6): 839-845.
- [20] Zhang J, Yu C B, Zhang X, *et al.* *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces cognitive dysfunction, mediated by neuronal inflammation via activation of the TLR4 signaling pathway in C57BL/6 mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 37.
- [21] Wang L S, Zhang M D, Tao X, *et al.* LC-MS/MS-based quantification of tryptophan metabolites and neurotransmitters in the serum and brain of mice [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1112: 24-32.
- [22] Chen F, Jiang N, Zhang Y W, *et al.* Protective effect of *Gastrodia elata* Blume ameliorates simulated weightlessness-induced cognitive impairment in mice [J]. *Life Sci Space Res*, 2023, 36: 1-7.
- [23] Tang C L, Wang L, Liu X X, *et al.* Comparative pharmacokinetics of gasterodin in rats after intragastric administration of free gasterodin, parishin and *Gastrodia elata* extract [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 176: 49-54.
- [24] Huang H, Zhang Y W, Yao C H, *et al.* The effects of fresh *Gastrodia elata* Blume on the cognitive deficits induced by chronic restraint stress [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 890330.
- [25] Xu P, Wang K Z, Lu C, *et al.* Protective effect of lavender oil on scopolamine induced cognitive deficits in mice and H₂O₂ induced cytotoxicity in PC12 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 193: 408-415.
- [26] 黄红, 姜宁, 张亦文, 等. 鲜天麻对慢性束缚应激诱导小鼠学习记忆损伤的改善作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(9): 653-654.
- [27] 陈东, 赵贵德, 考宏盛. 缺血性脑卒中发病机制研究新进展 [J]. 国外医学 神经病学神经外科学分册, 2001, 28(1): 32-34.
- [28] Koh W, Kwak H, Cheong E, *et al.* GABA tone regulation and its cognitive functions in the brain [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2023, 24(9): 523-539.
- [29] 彭文杰, 伍大华. 中医药对阿尔茨海默病中枢胆碱能系统影响的研究进展 [J]. 中医药导报, 2015, 21(7): 89-91.
- [30] 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.
- [31] Hampel H, Mesulam M M, Claudio Cuello A, *et al.* The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Brain*, 2018, 141(7): 1917-1933.
- [32] 刘佩, 刘喆. 脑源性神经营养因子在海马学习记忆中的作用 [J]. 长春中医药大学学报, 2009, 25(2): 195-197.
- [33] 刘松楠. 精制清开灵对慢性脑缺血大鼠海马区神经营养因子的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [34] Leal G, Comprido D, Duarte C B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 76 Pt C: 639-656.
- [35] Almeida R D, Manadas B J, Melo C V, *et al.* Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(10): 1329-1343.
- [36] Li Z, Wang H, Xiao G, *et al.* Recovery of post-stroke cognitive and motor deficiencies by Shuxuening Injection via regulating hippocampal BDNF-mediated neurotrophin/Trk signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111828.

[责任编辑 李亚楠]