

黄水枝醇提物对小鼠学习记忆障碍的影响及作用机制[△]

蒋先慧^{1*}, 张金娟², 周涛¹, 廖尚高¹, 何迅^{1#}(1. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学基础医学院, 贵阳 550025)

中图分类号 R965; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)10-1198-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.10.08



摘要 目的 探究黄水枝醇提物(以下简称“TPE”)对小鼠学习记忆障碍的影响及作用机制。方法 将雄性昆明小鼠随机分为正常组、模型组、阳性组(盐酸多奈哌齐 4 mg/kg)和 TPE 低、中、高剂量组(150、300、600 mg/kg), 每组 10 只。给药组小鼠每天灌胃相应药液 1 次, 正常组和模型组小鼠每天灌胃水 1 次, 连续 22 d; 第 17 天, 给药组与模型组小鼠腹腔注射氢溴酸东莨菪碱(3 mg/kg)以建立学习记忆障碍模型。以 Morris 水迷宫实验对小鼠空间学习记忆能力进行评估, 以苏木精-伊红染色对小鼠海马组织细胞形态进行观察, 检测各组小鼠脑组织中乙酰胆碱酯酶(AChE)、乙酰胆碱转移酶(ChAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平以及海马组织中磷酸化 Tau 蛋白(p-Tau)、 β 淀粉样前体蛋白裂解酶 1(BACE1)、淀粉样前体蛋白(APP)的相对表达量。结果 阳性组和 TPE 中、高剂量组小鼠的逃避潜伏期(训练第 4~5 天)均较模型组显著缩短, 穿过平台次数和目标象限运动距离百分比均较模型组显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 各给药组小鼠海马 CA1 区中神经元有所增多, 固化萎缩状态的神经元有所减少, 神经元排列趋于紧密; 阳性组和 TPE 中、高剂量组小鼠脑组织中 ChAT、SOD 水平均显著升高, AChE、MDA、IL-6、TNF- α 水平和海马组织中 p-Tau、BACE1、APP 蛋白的相对表达量均显著降低($P < 0.05$)。结论 TPE 可改善东莨菪碱诱导的小鼠学习记忆障碍, 其机制可能与平衡大脑胆碱能系统, 缓解氧化应激损伤, 改善炎症反应, 抑制 p-Tau、BACE1、APP 蛋白的过度表达有关。

关键词 黄水枝醇提物; 学习记忆障碍; 乙酰胆碱酯酶; 东莨菪碱; 小鼠

Effects and mechanism of the ethanol extract of *Tiarella polyphylla* on learning and memory impairment in mice

JIANG Xianhui¹, ZHANG Jinjuan², ZHOU Tao¹, LIAO Shanggao¹, HE Xun¹(1. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects and mechanism of the ethanol extract of *Tiarella polyphylla* (“TPE”) on learning and memory impairment in mice. **METHODS** Male Kunming mice were randomly divided into normal group, model group, positive group (donepezil hydrochloride 4 mg/kg) and TPE low-dose, medium-dose and high-dose groups (150, 300, 600 mg/kg), with 10 mice in each group. Drug administration groups were given relevant medicine intragastrically once a day, and normal group and model group were given water intragastrically once a day, for consecutive 22 d. On the 17th day, administration groups and model group were intraperitoneally injected with scopolamine hydrobromide (3 mg/kg) to establish a model of learning and memory impairment. The learning and memory ability of the mice were evaluated by the Morris water maze. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used for morphological observation of hippocampus cells of the mice. The levels of acetylcholinesterase (AChE), choline acetyltransferase (ChAT), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in cerebral tissue as well as the relative expression of phosphorylated Tau protein (p-Tau), β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1) and amyloid precursor protein (APP) in hippocampus tissue were all detected. **RESULTS** The escape latency of mice in positive group, TPE medium-dose and high-dose groups were all significantly shortened than the model group on the 4th to 5th day of training, while the times of crossing platform and the percentage of movement distance in target quadrant were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the neurons in the hippocampal CA1 region of mice were increased to varying degrees in administration groups, the neurons in solidified and atrophic state decreased, and the arrangement of neurons tended to be close; the levels of ChAT and SOD in cerebral tissue were significantly increased in positive group and TPE medium-dose and high-dose groups; the levels of AChE, MDA, IL-6, the levels of TNF- α and relative expression of p-Tau, BACE1 and APP in hippocampus tissue were decreased significantly ($P <$

[△] 基金项目: 贵州省科技计划项目科技创新人才团队(No. 黔科合平台人才[2020]5006)

* 硕士研究生。研究方向: 中药制剂工艺及质量控制。E-mail: jxh53594@163.com

通信作者: 教授, 硕士生导师, 硕士。研究方向: 中药物质基础及质量控制。E-mail: 2812878586@qq.com

0.05). **CONCLUSIONS** TPE can improve the learning and memory impairment induced by scopolamine in mice, and the mechanism may be related to balancing the brain cholinergic system, alleviating oxidative stress injury, improving inflammatory response, and inhibiting the overexpression of p-Tau, BACE1 and APP.

KEYWORDS *Tiarella polyphylla* ethanol extract; learning and memory impairment; acetylcholinesterase; scopolamine; mice

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种发生于中枢神经的进行性退行性疾病,其临床主要表现为记忆障碍、失语、失认、视空间功能受损、行为改变等。目前,AD的发病机制尚未阐明,主要包括胆碱能损伤假说、氧化应激损伤假说、 β 淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)毒性假说、Tau蛋白假说等^[1]。临床治疗AD的首选药物主要是针对胆碱能损伤的乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)抑制剂,包括卡巴拉汀、多奈哌齐、石杉碱甲等^[2]。由此可见,AChE抑制剂仍是治疗AD的有效药物。但上述药物有不同的副作用,例如卡巴拉汀会引起神经系统异常、精神障碍、肝功能异常等^[3];多奈哌齐会引起头晕、失眠、呕吐、食欲不振、腹泻等^[4];石杉碱甲可引发头晕、恶心、食欲缺乏、腹痛等^[5]。因此,寻找安全、有效、副作用较小的药物很有必要。

黄水枝 *Tiarella polyphylla* D. Don 是虎耳草科黄水枝属植物,以全草入药,具有清热解毒、活血祛瘀、消肿止痛的作用,用于临床治疗痈疽肿毒、跌打损伤、肝炎、咳嗽气喘等^[6]。本课题组前期预实验发现,黄水枝醇提取物(*T. polyphylla* ethanol extract, 以下简称“TPE”)对AChE有较强的抑制活性;另有研究表明,黄水枝甲醇提取物对血浆胆碱酯酶具有较强的抑制活性^[7],但其是否影响学习记忆能力尚未见报道。为此,本研究采用腹腔注射东莨菪碱建立学习记忆障碍小鼠模型,观察TPE对其学习记忆能力的影响,并初步探讨可能的作用机制,旨在为进一步推动黄水枝的开发利用提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ELX800型酶标仪(成都锦世昌祥科技有限公司)、TGL16M型医用离心机(湖南凯达科学仪器有限公司)、DYY-6C型电泳系统(北京六一生物科技有限公司)、WMT-100S型Morris水迷宫系统(四川成都泰盟科技有限公司)、MF53型光学显微镜(广州市明美光电技术有限公司)、Tanon-5200型数码凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司)等。

1.2 主要药材与试剂

黄水枝药材(干品,采于2020年11月)由昆明采智生物技术有限公司提供,经贵州医科大学龙庆德副教授鉴定为真品。

伊红染色液(批号G1002)、苏木精染色液(批号G1004)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;氢溴酸东莨菪碱(批号M1112A,纯度>98%)、盐酸多奈哌齐(阳性对照药物,批号D0918A,纯度>98%)均购自大连美仑生物技术有限公司;微板法测定超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒和比色法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)、AChE试剂盒(批号分别为20210708、20201230、20210519)均购自南京建成生物工程研究所;乙酰胆碱转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)酶联免疫吸附测定试剂盒(批号2021061541M)购自上海泛柯实业有限公司;白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附测定试剂盒(批号分别为L210413814、L210423372)均购自武汉云克隆科技股份有限公司;兔源磷酸化Tau蛋白(phosphorylated Tau protein, p-Tau)、 β 淀粉样前体蛋白裂解酶1(β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, BACE1)、淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)单克隆抗体(批号分别为4000001573、4000000696、4000000465)均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;兔源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体(批号22w8364)购自美国Affinity公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)二抗(批号G201217)购自杭州华远生物技术有限公司;其余试剂均为分析纯或化学纯,水为纯净水。

1.3 实验动物

SPF级雄性昆明小鼠60只,体质量为(20 \pm 2)g,由贵州医科大学动物实验中心提供,动物生产许可证号为SCXK(黔)2018-0001。实验期间,所有小鼠均在光照12h/黑暗12h、温度18~22℃、相对湿度50%~60%条件下饲养并自由摄食、饮水,适应性饲养1周后用于正式实验。本实验方案经贵州医科大学动物伦理委员会审核批准(批准号1711020),严格遵循相关准则操作^[8]。

2 方法

2.1 TPE制备

取黄水枝药材(干品)适量,以10倍量的75%乙醇回流提取1h \times 3次,合并3次提取液,减压浓缩,冷冻干燥后得到TPE(提取率为17%,每1g相当于生药

5.88 g)。

2.2 动物分组、给药与造模

将小鼠随机分为6组,即正常组、模型组、阳性组和TPE低、中、高剂量组,每组10只。阳性组小鼠灌胃盐酸多奈哌齐4 mg/kg(以水为溶剂,剂量参考文献[9-10]设置),TPE各剂量组小鼠分别灌胃相应药液150、300、600 mg/kg(以水为溶剂,剂量参照《中华本草(第9册)》中黄水枝的临床平均给药剂量^[6],按人与小鼠的体表面积换算而得),正常组与模型组小鼠灌胃等体积水。每天早上给药1次,连续22 d。于给药后第17~22天进行Morris水迷宫实验,并在水迷宫训练前30 min对给药组和模型组小鼠腹腔注射氢溴酸东莨菪碱3 mg/kg(以生理盐水为溶剂)以建立学习记忆障碍模型^[11];正常组小鼠腹腔注射等体积生理盐水。

2.3 Morris水迷宫实验

于给药后第17天,各组小鼠腹腔注射东莨菪碱或生理盐水,然后参考文献[11]方法进行Morris水迷宫实验。迷宫中水温为(25±2)℃,水面高出平台1 cm,平台置于第Ⅱ象限中心位置,以Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ任一象限为入水点将小鼠放入水池。对每组小鼠进行为期5 d的定位航行实验,每天2次,训练60 s。若小鼠在60 s内找到平台,使其在平台停留10 s,记录其找到平台所用时间,作为逃避潜伏期;若小鼠60 s内未找到平台,将其引导至平台并停留10 s,将其逃避潜伏期记为60 s。于给药后第22天进行空间搜索实验。撤掉平台,水池环境保持不变,小鼠从第Ⅳ象限入水,持续60 s,记录各组小鼠穿过平台次数、目标象限运动距离百分比。

2.4 脑组织形态观察

Morris水迷宫实验结束后,将各组小鼠颈椎脱位处死。取小鼠脑组织以生理盐水洗净,每组随机取4只小鼠右半脑组织于4%多聚甲醛溶液中固定保存,剩余脑组织和其余小鼠脑组织均置于-20℃冰箱中保存。取固定于4%多聚甲醛溶液中的右半脑组织,石蜡包埋,切片,经苏木精-伊红染色后,置于显微镜下观察各组小鼠海马组织细胞形态变化。

2.5 脑组织相关指标测定

取各组小鼠冻存的脑组织,加入9倍体积的预冷生理盐水制成匀浆,于4℃下以10 000 r/min离心10 min,取上清液。按照试剂盒说明书操作,测定各组小鼠脑组织中AChE、ChAT、SOD、MDA、IL-6、TNF-α水平。

2.6 海马组织中p-Tau、BACE1、APP蛋白表达测定

采用Western blot法进行测定。每组随机取4只小鼠冻存的海马组织,处理为细小组织后,加入适量组织

裂解液,于冰上裂解2 min,以10 000 r/min离心10 min,取上清液,以二喹啉甲酸法测定总蛋白浓度。用10%分离胶分离蛋白并转移到聚偏氟乙烯膜上。用含5%脱脂奶粉的TBST溶液封闭2 h,加入含相应一抗的稀释液(稀释比例均为1:1 000),4℃孵育过夜;次日,室温孵育1 h后,用TBST溶液洗膜3次,再加入辣根过氧化物酶标记的IgG二抗(稀释比例为1:10 000),室温孵育2 h后,用TBST溶液洗膜3次,以化学发光法显色,并置于凝胶图像分析系统下成像。使用Image J 1.8.0软件分析蛋白灰度值,以GAPDH为内参计算目标蛋白的相对表达量。

2.7 统计学分析

采用SPSS 26.0软件对数据进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 TPE对小鼠学习记忆能力的影响

3.1.1 定位航行实验 随着训练天数的延长,各组小鼠的逃避潜伏期均呈缩短趋势。训练第1天,各组小鼠的逃避潜伏期比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);训练第2~5天,模型组小鼠的逃避潜伏期均较正常组显著延长($P<0.05$),提示东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍模型建立成功;训练第3~5天,阳性组和TPE低(训练第3天除外)、中(训练第3天除外)、高剂量组小鼠的逃避潜伏期均较模型组显著缩短($P<0.05$)。结果见表1。

表1 各组小鼠逃避潜伏期测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
正常组	51.86±15.14	41.52±16.40	37.50±15.50	43.23±14.75	32.38±14.83
模型组	56.50±4.61	53.09±11.18 ^a	50.68±13.86 ^a	53.13±13.13 ^a	50.91±13.54 ^a
阳性组	52.10±11.45	40.31±16.23 ^b	33.37±14.76 ^b	38.88±16.05 ^b	25.06±15.46 ^b
TPE高剂量组	49.10±14.93	49.27±15.92	40.12±16.53 ^b	31.53±14.07 ^b	26.88±12.11 ^b
TPE中剂量组	49.91±14.31	54.19±13.11	58.40±4.11	40.89±14.73 ^b	35.75±16.58 ^b
TPE低剂量组	53.82±12.15	48.31±15.01	53.80±9.07	26.91±13.06 ^b	40.27±18.31 ^b

a:与正常组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$

3.1.2 空间搜索实验 与正常组比较,模型组小鼠的穿过平台次数和目标象限运动距离百分比均显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,阳性组和TPE中、高剂量组小鼠的穿过平台次数和目标象限运动距离百分比均显著升高($P<0.05$)。结果见表2。

综合定位航行实验和空间搜索实验结果发现,中、高剂量的TPE能够改善学习记忆障碍模型小鼠的学习记忆能力。

3.2 TPE对小鼠脑组织形态的影响

正常组小鼠的海马CA1区神经元排列紧密,形态完整,细胞膜与细胞核清晰。与正常组比较,模型组小鼠

表2 各组小鼠穿过平台次数和目标象限运动距离百分比测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	穿过平台次数	目标象限运动距离百分比/%
正常组	2.50±0.55	41.21±11.46
模型组	0.33±0.52 ^a	28.53±4.68 ^a
阳性组	1.33±0.52 ^b	38.00±5.43 ^b
TPE高剂量组	1.67±0.82 ^b	39.82±9.01 ^b
TPE中剂量组	1.50±1.05 ^b	35.84±5.55 ^b
TPE低剂量组	1.17±0.98	30.88±9.03

a: 与正常组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$

的神经元数量减少,排列较为松散,小部分神经元呈固化萎缩状态,且可见大量坏死,细胞质嗜酸性增强,细胞核固缩、溶解、消失。与模型组比较,阳性组和TPE低、中、高剂量组小鼠的神经元有所增多,固化萎缩状态的神经元有所减少,神经元排列趋于紧密,提示TPE能够改善学习记忆障碍模型小鼠海马CA1区神经元的病理形态。结果见图1。

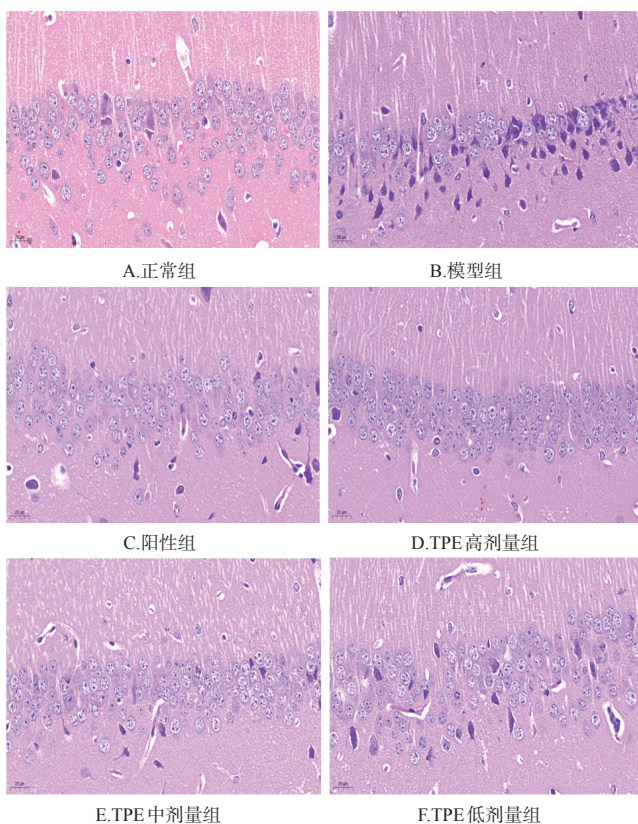


图1 各组小鼠海马CA1区神经元病理变化的显微图(苏木精-伊红染色,×400)

3.3 TPE对小鼠脑组织中胆碱能系统指标AChE和ChAT水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠脑组织中AChE水平显著升高,ChAT水平显著降低($P<0.05$);与模型组比较,阳性组和TPE中、高剂量组小鼠脑组织中AChE水平均显著降低,ChAT水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表3。

表3 各组小鼠脑组织中AChE和ChAT水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	AChE/(U/mg prot)	ChAT/(pmol/L)
正常组	8.76±1.21	318.96±16.91
模型组	11.30±1.71 ^a	270.81±14.34 ^a
阳性组	8.32±1.65 ^b	297.38±23.38 ^b
TPE高剂量组	7.52±2.35 ^b	296.83±9.62 ^b
TPE中剂量组	9.07±2.01 ^b	288.63±11.15 ^b
TPE低剂量组	10.00±2.57	279.92±11.74

a: 与正常组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$

3.4 TPE对小鼠脑组织中氧化应激指标SOD和MDA水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠脑组织中SOD水平显著降低,MDA水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,阳性组和TPE中、高剂量组小鼠脑组织中SOD水平均显著升高,MDA水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表4。

表4 各组小鼠脑组织中SOD和MDA水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	SOD/(U/mg prot)	MDA/(nmol/mg prot)
正常组	10.33±1.11	1.52±0.24
模型组	8.39±0.61 ^a	2.16±0.29 ^a
阳性组	9.98±1.44 ^b	1.49±0.30 ^b
TPE高剂量组	10.29±1.56 ^b	1.78±0.37 ^b
TPE中剂量组	9.35±0.80 ^b	1.91±0.17 ^b
TPE低剂量组	8.38±2.43	2.10±0.32

a: 与正常组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$

3.5 TPE对小鼠脑组织中炎症细胞因子IL-6和TNF-α水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠脑组织中IL-6、TNF-α水平均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,阳性组和TPE中、高剂量组小鼠脑组织中IL-6、TNF-α以及TPE低剂量组小鼠脑组织中IL-6水平均显著降低($P<0.05$)。结果见表5。

表5 各组小鼠脑组织中IL-6和TNF-α水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	IL-6/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)
正常组	22.95±7.40	71.42±7.10
模型组	46.35±6.90 ^a	95.62±13.22 ^a
阳性组	18.64±6.36 ^b	72.15±10.54 ^b
TPE高剂量组	19.55±6.37 ^b	66.71±10.13 ^b
TPE中剂量组	21.67±7.79 ^b	70.11±12.49 ^b
TPE低剂量组	27.02±7.79 ^b	101.40±12.30

a: 与正常组比较, $P<0.05$; b: 与模型组比较, $P<0.05$

3.6 TPE对小鼠海马组织中p-Tau、BACE1、APP蛋白表达的影响

与正常组比较,模型组小鼠海马组织中p-Tau、BACE1、APP蛋白的相对表达量均显著升高($P<0.05$);与模型组比较,阳性组和TPE中、高剂量组小鼠海马组织中p-Tau、BACE1、APP蛋白的相对表达量以及TPE低

剂量组小鼠海马组织中 APP 蛋白的相对表达量均显著降低 ($P < 0.05$)。结果见图 2、表 6。

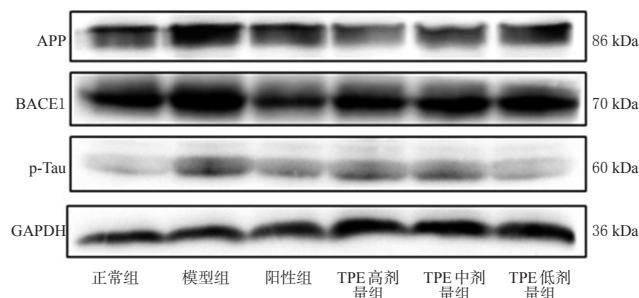


图 2 各组小鼠海马组织中 p-Tau、BACE1、APP 蛋白表达的电泳图

表 6 各组小鼠海马组织中 p-Tau、BACE1、APP 蛋白相对表达量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	p-Tau/GAPDH	BACE1/GAPDH	APP/GAPDH
正常组	0.52 ± 0.29	2.29 ± 0.25	1.40 ± 0.25
模型组	1.16 ± 0.20 ^a	2.88 ± 0.28 ^a	2.13 ± 0.15 ^a
阳性组	0.68 ± 0.31 ^b	2.18 ± 0.26 ^b	1.76 ± 0.44 ^b
TPE 高剂量组	0.84 ± 0.15 ^b	1.98 ± 0.23 ^b	1.19 ± 0.30 ^b
TPE 中剂量组	0.86 ± 0.13 ^b	2.00 ± 0.38 ^b	1.24 ± 0.30 ^b
TPE 低剂量组	0.94 ± 0.34	2.64 ± 0.20	1.54 ± 0.24 ^b

a: 与正常组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$

4 讨论

有研究指出, AD 的病理学特征包括受影响的脑区产生广泛的氧化应激、胆碱功能障碍、淀粉样斑块、神经元纤维缠结以及神经元丢失等^[12]。为寻求有效的防治手段, 研究者从不同机制出发, 开发了不同的体外动物模型, 其中腹腔注射东莨菪碱致胆碱能系统功能障碍、氧化应激增加而使学习记忆能力下降的建模方法, 因具有操作简便、经济的优点而被广泛应用于 AD 学习记忆损伤的研究领域^[12]。基于此, 本研究采用该方法建立学习记忆障碍小鼠模型, 初步探讨 TPE 的相关作用。

为探究 TPE 对小鼠学习记忆能力下降的保护作用是否与脑内神经元损伤有关, 本研究采用苏木精-伊红染色法观察了小鼠海马组织细胞形态。结果显示, 与模型组比较, 各药物组小鼠海马 CA1 区的神经元均有所增多, 固化萎缩状态的神经元均有所减少, 且神经元排列趋于紧密, 提示 TPE 能够显著改善学习记忆障碍模型小鼠海马组织的病理形态。

胆碱能系统损伤被认为是 AD 发生的重要因素^[13]。AD 的临床症状与乙酰胆碱含量的减少密切相关^[14-15]。ChAT 是合成乙酰胆碱的关键酶, AChE 能迅速分解乙酰胆碱, 故通过抑制 AChE 水平、增强 ChAT 水平可增加乙酰胆碱含量, 从而改善认知功能^[16-17]。本研究结果显示, TPE 能够显著降低学习记忆障碍模型小鼠脑组织中 AChE 水平并提高 ChAT 水平, 表明 TPE 可能通过调节脑

组织中 AChE、ChAT 的水平来维持胆碱能系统的功能。

有研究表明, 炎症因子在 AD 进展过程中会促进淀粉样斑块转化为神经炎症斑块并扩散, 促进 APP 蛋白降解以产生大量的 A β ; IL-6 水平升高会使钙离子流入 Tau 蛋白, 并使后者磷酸化水平发生改变; TNF- α 由被 A β 激活的胶质细胞分泌, 对神经元具有毒性, 可增加血脑屏障的通透性, 促进淋巴细胞透过血脑屏障, 进而引起中枢系统的一系列神经炎症反应^[18-20]。由此可见, 炎症因子在 AD 的发生及发展中起着重要作用。本研究结果显示, TPE 能够显著抑制学习记忆障碍模型小鼠脑组织中 IL-6、TNF- α 水平的升高, 表明 TPE 可能通过降低炎症反应来改善小鼠的学习记忆障碍。

氧化应激是 AD 发生发展中的重要环节之一^[21-22]。大脑主要由脂质组成, 具有较高的耗氧率, 故易受活性氧自由基的攻击^[23-24]。MDA 是一种重要的脂质过氧化产物, 其水平高低可反映体内脂质过氧化的程度^[25]; SOD 能有效清除活性氧自由基, 其水平高低能反映机体清除自由基的能力^[26]。本研究结果显示, TPE 能够抑制学习记忆障碍模型小鼠脑组织中 SOD 水平的降低并抑制 MDA 水平的升高, 表明 TPE 可能通过缓解氧化应激损伤来改善小鼠的学习记忆障碍。

BACE1 是切割 APP 生成 A β 的关键酶, A β 在大脑中异常沉积形成的淀粉样斑块和 Tau 蛋白过度磷酸化所导致的神经纤维缠结是 AD 的特殊病理改变, 在 AD 的发展过程中至关重要^[27]。为了进一步阐明 TPE 保护东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的作用机制, 本研究采用 Western blot 法探究了 TPE 对小鼠海马组织中 p-Tau、BACE1 和 APP 蛋白表达的影响。结果显示, TPE 能够抑制学习记忆障碍模型小鼠海马组织中 p-Tau、BACE1、APP 蛋白的过度表达, 表明 TPE 可能通过改善 p-Tau 蛋白过度表达来改善小鼠的学习记忆障碍。

综上所述, TPE 可改善东莨菪碱诱发的小鼠学习记忆障碍, 其机制可能与平衡大脑胆碱能系统, 缓解氧化应激损伤, 改善炎症反应, 抑制 p-Tau、BACE1、APP 蛋白的过度表达有关。但 TPE 是一个成分复杂的粗提取物, 其发挥药效的物质基础还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 陈云慧, 张天娥, 龚圆渊, 等. 基于泛素-蛋白酶体途径探讨当归芍药散“肝脾同调-血水同治”治疗阿尔茨海默病的作用机制[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2020, 22(1): 93-100.
- [2] 陈静. 基于网络药理学探讨温脾通络开窍汤治疗阿尔茨海默病的作用机制[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2021.
- [3] 薛伟宁. 重酒石酸卡巴拉汀对难治性精神分裂症手术后

- 短期认知减退的疗效分析[D].西安:第四军医大学,2009.
- [4] 吴倩.网络药理学探究基础中药复方联合多奈哌齐治疗阿尔茨海默病的潜在靶点与作用机制[D].广州:暨南大学,2020.
- [5] 任晓蕾,张海英,李玉珍.石杉碱甲治疗轻、中度阿尔茨海默病有效性和安全性的Meta分析[J].中国药房,2010,21(10):909-913.
- [6] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草:第9册[M].上海:上海科学技术出版社,1999:2520-2521.
- [7] 刘慧,孟爱荣,彭春喜,等.黄水枝属药理学研究概况[J].安徽农业科学,2014,42(35):12472-12473.
- [8] 实验动物管理条例[J/OL].实用器官移植电子杂志,2016,4(2):66-67[2022-04-23].<https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?FileName=YZQG201602002&DbName=CJFQ-2016>.
- [9] 郭志清,罗雅琪,戴瑛,等.姜黄素类化合物固体分散体对小鼠学习记忆障碍的作用研究[J].中药药理与临床,2018,34(6):64-69.
- [10] 姜舒,易湘茜,沈关媛,等.槲钱含片对东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的改善作用研究[J].中国药房,2019,30(1):36-39.
- [11] 孙芮芮.芪蛭通络胶囊改善东莨菪碱致小鼠记忆障碍的研究[D].太原:山西中医药大学,2020.
- [12] 李晓青,赵佳奇,田雅娟,等.远志、石菖蒲及其对药改善记忆的物质基础和作用机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(3):190-199.
- [13] 曹鑫馨,董秤均,杨燕,等.黄连解毒汤对A β_{1-42} 诱导AD大鼠学习记忆能力及胆碱能系统的影响[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(10):23-30.
- [14] 朱晓婷.解毒益智方对阿尔茨海默病双转基因小鼠行为学及大脑皮层内 β -淀粉样蛋白沉积及BACE1表达影响的研究[D].长春:长春中医药大学,2021.
- [15] 孙成成.基于线粒体相关蛋白通路探讨参麻益智方对血管性认知障碍大鼠的作用机制[D].北京:中国中医科学院,2021.
- [16] 王微,叶虔臻,项婷,等.香水莲花提取物对东莨菪碱诱导记忆障碍小鼠学习记忆能力的影响[J].天然产物研究与开发,2019,31(2):299-305.
- [17] 王颖,李忠辉.海参磷脂对阿尔兹海默病模型大鼠认知功能的影响[J].中国临床研究,2019,32(7):915-918.
- [18] 牛利,韩德五,许瑞龄,等.高糖高脂饮食诱导大鼠代谢综合征模型并发阿尔茨海默样变[J].中国比较医学杂志,2015,25(8):27-30,43,84.
- [19] CRIBBS D H, BERCHTOLD N C, PERREAU V, et al. Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study[J]. J Neuroinflammation, 2012, 9(1): 179.
- [20] AMINOFF M J, DAROFF R E. Encyclopedia of the neurological sciences[M]. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier, 2014:552-564.
- [21] SHI Q L, GIBSON G E. Oxidative stress and transcriptional regulation in Alzheimer's disease[J]. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2007, 21(4): 276-291.
- [22] BUTTERFIELD D A, REED T, NEWMAN S F, et al. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment[J]. Free Radic Biol Med, 2007, 43(5): 658-677.
- [23] HUANG W J, ZHANG X, CHEN W W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease[J]. Biomed Rep, 2016, 4(5): 519-522.
- [24] 赵丽萍,缪林清,蒋鹭莲,等.针刺改善阿尔茨海默病氧化应激机制的研究现状与思考[J].世界科学技术-中医药现代化,2020,22(8):2670-2678.
- [25] PEZZIA C, SANDERS C, WELCH S, et al. Psychosocial and behavioral factors in acetaminophen-related acute liver failure and liver injury[J]. J Psychosom Res, 2017, 101: 51-57.
- [26] 孙小茗,左晓彬,王春宇,等.螾蜊菊内酯对乙酰氨基酚致小鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国比较医学杂志,2019,29(6):86-91.
- [27] 陶晴.弓形虫 Chinese 1 型 WH6 虫株通过对海马神经元的影响导致小鼠认知行为异常[D].合肥:安徽医科大学,2020.

(收稿日期:2021-12-28 修回日期:2022-04-24)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅