

裴海鸾,马贝贝,王婷婷,等. 开心散对双侧海马 CA1 区注射 $A\beta_{1-42}$ 致 AD 大鼠的治疗作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(10): 78-90, 141.

Pei HL, Ma BB, Wang TT, et al. Therapeutic effect and mechanisms of Kaixin San in AD rats induced by bilateral $A\beta_{1-42}$ injection into the CA1 area of the hippocampus [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(10): 78-90, 141.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.10.010

开心散对双侧海马 CA1 区注射 $A\beta_{1-42}$ 致 AD 大鼠的治疗作用及机制研究

裴海鸾¹, 马贝贝¹, 王婷婷¹, 李瑞吉¹, 刘金辉¹, 于尚玥¹, 娄天宇¹, 左泽平², 田时秋¹, 李依林¹, 王晨晓¹, 田颖颖¹, 田 骄¹, 赵新月¹, 刘 闯¹, 郭玉东³, 王 晶^{1*}, 王志斌^{2*}

(1.北京中医药大学中药学院,北京 102488;2.北京同仁堂研究院,北京 100071;
3.北京市药品检验研究院,北京 102200)

【摘要】 目的 考察开心散对双侧海马 CA1 区注射 $A\beta_{1-42}$ 致 AD 大鼠的治疗效果,初步明晰其作用机制。**方法** 以“ β -淀粉样蛋白毒性学说”为依据,使用脑立体定位仪在 SD 大鼠双侧海马 CA1 区注射 $A\beta_{1-42}$ 寡聚肽段,从而复制 AD 大鼠模型。将痴呆大鼠随机分为模型组、石杉碱甲组、开心散低剂量组、中剂量组与高剂量组,每组 10 只。另取 10 只大鼠颅内注射等量的生理盐水为假手术组,正常大鼠 10 只作为空白对照组。连续灌胃给药 30 d。通过 Morris 水迷宫行为学测试观测大鼠学习记忆成绩的变化;HE 染色及 Nissl 染色观察脑组织病理形态;ELISA 法检测脑组织中胆碱能神经递质 (ACh、AChE、ChAT)、炎症因子 (TNF- α 、IL-6、IL-1 β) 及 β -淀粉样蛋白 (APP、 $A\beta_{1-40}$ 、 $A\beta_{1-42}$) 的含量;IHC 法解析皮层、海马组织中 tau 蛋白及 GSK-3 β 的表达水平;Western blot 法察看脑组织中 BAX 与 BCL-2 的表达程度。**结果** 与模型组相比,开心散干预组大鼠逃避潜伏期明显缩短,穿越平台次数增多,在目标象限的停留时间及游泳路程所占百分比均有增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);皮层、海马组织神经元数量增多,形态结构趋于正常,且尼氏小体数量增加,胞浆着色变深;脑组织中 AChE 活性减弱,ChAT 及 ACh 含量明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、APP、 $A\beta_{1-40}$ 及 $A\beta_{1-42}$ 的含量显著下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);皮层、海马组织中 tau 蛋白及 GSK-3 β 的阳性表达量皆有所下降 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);BAX 蛋白的表达水平趋于下降,且 BCL-2/BAX 的比值有不同程度的升高趋势 ($P>0.05$)。**结论** 开心散对 AD 损伤大鼠的痴呆症状与脑组织损伤有较好的治疗效果,其作用机制涉及到胆碱能系统的修复、炎症因子释放的抑制、 β -淀粉样蛋白的清除及 tau 蛋白磷酸化水平的调控。

【关键词】 开心散;AD 大鼠;脑组织;治疗作用;作用机制

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 10-0078-13

Therapeutic effect and mechanisms of Kaixin San in AD rats induced by bilateral $A\beta_{1-42}$ injection into the CA1 area of the hippocampus

PEI Hailuan¹, MA Beibei¹, WANG Tingting¹, LI Ruiji¹, LIU Jinhui¹, YU Shangyue¹, LOU Tianyu¹, ZUO Zeping²,
TIAN Shiqiu¹, LI Yilin¹, WANG Chenxiao¹, TIAN Yingying¹, TIAN Jiao¹, ZHAO Xinyue¹, LIU Chuang¹,
GUO Yudong³, WANG Jing^{1*}, WANG Zhibin^{2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China.

2. Beijing Tongrentang Research Institute, Beijing 100071. 3. Beijing Institute for Drug Control, Beijing 102200)

【基金项目】 北京中医药大学科研发展基金 (2019-ZXFZJJ-099)。

【作者简介】 裴海鸾 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 内分泌药理及神经药理。E-mail: phl980430@163.com

【通信作者】 王晶 (1973—), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 消化药理及呼吸药理。E-mail: wangj@bucm.edu.cn

王志斌 (1966—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药质量控制标准及药理毒理研究。E-mail: wangzhibin4804@126.com

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective To examine the therapeutic effect of Kaixin San in rats with AD caused by bilateral $A\beta_{1-42}$ injection into CA1 area of the hippocampus, and to preliminarily clarify its mechanisms. **Methods** Using the “ β -amyloid protein toxicity theory”, the rat model of AD was established by bilaterally injecting $A\beta_{1-42}$ oligopeptide segments in the CA1 region of the hippocampus of SD rats using a brain stereotaxic instrument. The rats were randomly divided into model, Hupezine A, Kaixin San low, middle and high dose groups, with 10 rats in each group. Another 10 rats were subjected to intracranial injection of an equal amount of physiological saline as the sham operation group and 10 normal rats were used as the blank control. The rats were subjected to continuous intragastric administrations for 30 days. Changes in learning and memory performance were observed by the Morris water maze behavioral test. HE and Nissl staining was used to visualize pathological morphology of the brain. The contents of cholinergic neurotransmitters (ACh, AChE and ChAT), proinflammatory factors (TNF- α , IL-6 and IL-1 β), and β -amyloid protein (APP, $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$) in brain tissue were measured by ELISA. Expression of tau protein and GSK-3 β in cortical and hippocampal tissues was detected by IHC. BAX and BCL-2 expression in brain tissues was measured by Western blot. **Results** Compared with the model group, rats in the Kaixin San treatment groups had a significantly shorter escape latency, an increased number of platform crossings, and an enhanced dwell time and percentage of swimming distance to the total distance in the target quadrant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The numbers of neurons in cortical and hippocampal tissues were increased, the morphological structure tended to be normalized, the number of Nissl bodies increased, and the cytoplasm darkened. AChE activity was attenuated, and ChAT with ACh levels were significantly increased in brain tissue ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). TNF- α , IL-6, IL-1 β , APP, $A\beta_{1-40}$ and $A\beta_{1-42}$ contents were decreased markedly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Expression of tau protein and GSK-3 β in both cortical and hippocampal tissues was downregulated ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). BAX protein expression decreased, and the ratio of BCL-2/BAX tended to increase to various degrees ($P > 0.05$). **Conclusions** Kaixin San has a good therapeutic effect on dementia symptoms and brain tissue damage in AD-injured rats, and its mechanisms involve the repair of the cholinergic system, inhibition of proinflammatory factor release, clearance of β -amyloid protein, and regulation of tau protein phosphorylation.

【Keywords】 Kaixin San; AD rats; brain tissue; therapeutic effect; mechanism

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种起病隐匿并进行性发展的神经系统退行性疾病, 该病多发于 65 岁以上的老年人, 病者在患病后 7~10 年内即不可避免地走向死亡^[1-2]。AD 患者临床表现为长时间的认知功能衰退、情节记忆与身体机能持续恶化、精神行为和睡眠-觉醒周期混乱, 伴随明显的语言系统缺陷、情绪波动异常以及严重的生活能力丧失。AD 典型的病理特征为 β -淀粉样蛋白 (amyloid beta-protein, $A\beta$) 的积聚与沉积^[3]、tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)^[4]、慢性神经炎症^[5]以及显著的突触损伤与神经元丢失^[6]。全球现今约有 4400 万人罹患 AD, 随着社会人口老龄化的加剧与 AD 病患者趋于年轻化, 预计在 2050 年 AD 病人数量将增至 1 亿。疾病的迅速发展在毁坏个人健康与家庭安定的同时, 也为社会工作与全球经济带来沉重负担。

开心散记载于唐代药王孙思邈所著的《备急千金要方·卷十四·小肠腑》中, 主治“好忘”, 由人参、远志、石菖蒲及茯苓四味中药组成。开心散复

方中人参大补元气, 安神益智; 远志祛痰开窍, 解郁宁心, 二者共用可除邪气, 养心血, 散痰涎, 利九窍, 补脏腑之精亏, 使耳目聪明, 强志不忘。茯苓利水渗湿, 健脾宁心; 石菖蒲开窍豁痰、化湿、醒神益智, 两药配伍可化血积, 治痹痛, 定心气, 去痰阻, 理五脏经络之气乱、湿浊, 使精神通透, 心脑畅明。由此全方共奏益气养心、补虚、化痰、除湿利窍及安神益智之功, 这与 AD“脏腑亏损, 髓海空虚, 瘀血、痰浊阻塞经络脑窍”的病因病机格外契合, 因此常被用于临床治疗“善忘”病症。

近年来, 国内学者对开心散靶向痴呆的药理学研究愈发关注, 但多集中于网络药理学预测^[7]、效应物质发掘^[8]及单一信号通路如氧化应激^[9]、神经炎症^[10]、脑内神经再生^[11]的验证, 关于开心散经典药理活性的多环节考察仍为罕见。因此, 本研究拟采用双侧海马 CA1 区注射 $A\beta_{1-42}$ 造模损伤 SD 大鼠为研究对象, 并参照 AD 发生发展的相关学术论点设立检测因素与靶标, 对开心散复方抗痴呆的药理活性进行较为全面地考证与筛查, 以期为经典古方的进一步开发及深层次的通路挖掘提供数据支撑。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级体重为(260~300)g 的 SD 大鼠,雌雄各半,70 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[SCXK(京)2016-0011],动物饲养在北京市药品检验研究院[SYXK(京)2020-0041],本研究由北京市药品检验所实验动物伦理委员会审查通过,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

石杉碱甲片(河南太龙药业股份有限公司,批号:190304);开心散浸膏粉(由上海绿谷生命园医药有限公司提供,批号:190301)。

$A\beta_{1-42}$ (BIOSS, 货号:bs-0107P);二甲亚砜(DMSO)(国药集团化学试剂有限公司,批号:20180404);甲苯胺蓝染液(货号:G1032)、苏木精-伊红染液(货号:G1003)、GSK-3 β (货号:GB11099)、Tau(货号:GB11178)、 β -actin(货号:GB12001)及 BAX(货号:GB11690)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;BCL-2(Affinity,货号:BF9103)。乙酰胆碱(ACh)试剂盒(货号:CEA912Ge)、乙酰胆碱转移酶(ChAT)试剂盒(货号:SEB929Ra)、乙酰胆碱酯酶(AChE)试剂盒(货号:SEB447Ra)、淀粉样前体蛋白(APP)试剂盒(货号:SEB020Ra)、 $A\beta_{1-40}$ 酶联免疫吸附试剂盒(货号:CEA864Ra)、 $A\beta_{1-42}$ 酶联免疫吸附试剂盒(货号:CEA946Ra)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)检测试剂盒(货号:SEA133Ra)、白介素-6(IL-6)检测试剂盒(货号:SEA079Ra)及白介素-1 β (IL-1 β)检测试剂盒(货号:SEA563Ra)均由武汉云克隆科技股份有限公司提供。

Morris 水迷宫(中国医学科学院药物研究所制,型号:DMS-2);脑立体定位仪(北京众实迪创科技发展有限公司,型号:ZS-FD/S);KDS Legato130 微量注射泵(美国 KD scientific 公司);微型手持式颅钻(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,型号:78001);高速组织研磨仪(Servicebio,型号:KZ-II);酶标检测仪(BioTeK,型号:Epoch)。

1.3 实验方法

1.3.1 AD 大鼠的模型制备

(1) $A\beta_{1-42}$ 寡聚体的繁育

将 1 mg 的 β -淀粉样蛋白 1-42 片段($A\beta_{1-42}$)溶于 44 μ L 的二甲亚砜(DMSO)中,再缓慢加入 PBS 溶液(456 μ L),边加边轻摇混匀,定容到所需浓度

(2 μ g/ μ L)。封口膜封好后,将溶液放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中繁育 7 d,使其聚集老化。

(2) 动物术前筛选

将大鼠适应性喂养 7 d 后进行筛选,经 Morris 水迷宫实验判别其空间学习记忆能力,淘汰游泳行为过于迟钝的大鼠,将筛选出的正常大鼠随机分为 3 组:空白组 10 只,假手术组 10 只,其余归入造模组。

(3) 手术过程

大鼠麻醉后,将其置于脑立体定位仪上进行固定;定位手术区,局部备皮,酒精消毒;剪开大鼠头部皮肤,切口沿中线分布,长度约 15 mm,将颅骨表面粘膜拨开固定,使颅骨充分暴露;参照《大鼠脑立体定位图谱》^[12],确定前囟位点并标记,钻孔位点定位于前囟后方 3.6 mm,旁开 2 mm,以 1.0 mm 钻头钻孔;注射点定位于大鼠海马 CA1 区,即自钻孔位垂直颅骨表面向内进针约 4.3 mm;恒速垂直注射,双侧各注射 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体 5 μ L,以 1 μ L/min 的速度持续注射 5 min,注射后留针 5 min,再缓慢撤针,以确保溶液充分弥散;操作结束后,用牙科水泥封闭钻孔,以青霉素粉涂于切口处以防感染,随后缝合切口,碘伏擦拭消毒;将大鼠置于电热毯上等候苏醒,使其平稳度过术后虚弱期。假手术组大鼠参照上述操作注射等量的生理盐水。术后恢复 3~7 d。

(4) 痴呆大鼠判别

用 Morris 水迷宫定位航行实验测试其逃避潜伏期,以空白组大鼠 4 次训练的平均逃避潜伏期(学习成绩)作为参考值(所有空白大鼠学习成绩的平均值记为 A),并计算出同 1 d 内每只造模大鼠的平均逃避潜伏期(记为 B),若 $(B-A)/B > 20\%$ 则判定造模成功,归为痴呆大鼠。

1.3.2 分组及给药

将 50 只判定造模成功的痴呆大鼠按逃避潜伏期随机分为 5 组:模型组、石杉碱甲组(0.046 mg/kg)、开心散低剂量组(11.48 mg/kg)、开心散中剂量组(22.96 mg/kg)与开心散高剂量组(45.92 mg/kg),每组 10 只。连续灌胃给药 30 d,每日 1 次。空白组、假手术组与模型组给予等量的纯化水。

1.3.3 Morris 水迷宫行为学测试

(1) 定位航行试验

试验共历时 5 d,每天定于固定时间段,每个时间段训练 4 次。4 次训练即将动物分别从 4 个不同的起始点(不同象限)放入水中。动物找到平台后或 120 s 内找不到平台(潜伏期记为 120 s),则由实

验者将其拿上平台,在平台上休息 15 s,再进行下一次试验。每日以动物 4 次训练测得逃避潜伏期的平均值作为动物当日的学习成绩。前 2 d 的定位航行试验作为适应性游泳训练以熟悉迷宫环境,统计动物在第 3、4、5 天的学习成绩变化。

(2) 空间探索试验

第 6 天撤除原平台,将动物任选 1 个入水点放入水中,所有动物必须为同一入水点,记录动物在 2 min 内跨越原平台的次数、在目标象限的停留时间、目标象限的游泳路程及游泳总路程,计算得出目标象限游泳路程所占总路程的百分比(目标象限游泳路程/游泳总路程)。

1.3.4 标本采集

Morris 行为学测试结束后,每组随机选取 4 只大鼠,低温环境下快速断头取脑,置于冰砖上矢状切割脑组织,左侧半脑组织用 4% 的多聚甲醛溶液固定,4℃ 保存,用于病理染色及免疫组化分析;右侧半脑低温下进行海马和皮层的分离,并将海马、皮层分别用锡箔纸包裹,置于冻存管,−80℃ 保存,备用于 Western blot 检测;剩余的各组大鼠在低温环境下快速断头取脑,以冷生理盐水清洗去除残血,滤纸吸干后用锡箔纸包裹,−80℃ 冻存,以供 ELISA 检测。

1.3.5 HE 染色与 Nissl 染色

采用 HE 染色及 Nissl 染色法观察各组大鼠脑组织的病理形态与损伤状况,在 400 倍成像下查看皮层、海马组织各区域神经元的数量、结构与排列,并分析尼氏小体的数目与着色深浅,截图采集图像。

1.3.6 酶联免疫吸附法(ELISA)

样本处理:准确称取待测脑组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入 9 倍体积 0.9% 的生理盐水,并放入匀浆珠,冰水浴条件机械匀浆,制成 10% 的脑组织匀浆,低温(4℃)离心 10 min (3500 r/min),分离上清液备检。

检测指标:胆碱能神经递质(ACh、ChAT 及 AChE)、炎症因子(TNF-α、IL-6 及 IL-1β)及 β-淀粉样蛋白(APP、Aβ₁₋₄₀ 及 Aβ₁₋₄₂)。

1.3.7 免疫组化染色分析(IHC)

采用 IHC 法检测大脑组织中 tau 蛋白、GSK-3β 的表达水平:在 400 倍成像下分别截取海马及皮层区域内互不重叠的 3 个视野,分别测量每张切片中海马及皮层区域各 3 个视野阳性表达的积分光密度(integrated optical density, IOD)值,IOD 值越高,代表阳性表达越强。

1.3.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)

使用 Western blot 法测定皮层、海马组织中 BAX、BCL-2 的表达程度:分析目标条带的光密度值,将目的条带灰度值/内参条带灰度值的比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

所有数据均采用 SAS 8.2 软件进行处理,各组数列均呈正态分布时,数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 ANOVA 进行单因素方差分析,同时用 LSD-*t* 检验法进行组间的多重比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 开心散对 AD 大鼠学习记忆能力的影响

2.1.1 开心散对 AD 大鼠逃避潜伏期的影响

定位航行实验结果显示,与空白组或假手术组相比,模型组大鼠在第 3、4、5 天的逃避潜伏期明显延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。相较于模型组,在第 3 天,开心散低、中、高剂量组逃避潜伏期明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);第 4 天,石杉碱甲组、开心散低、中剂量组逃避潜伏期显著缩短($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);第 5 天,石杉碱甲组、开心散中剂量组逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$)(结果见表 1、图 1)。

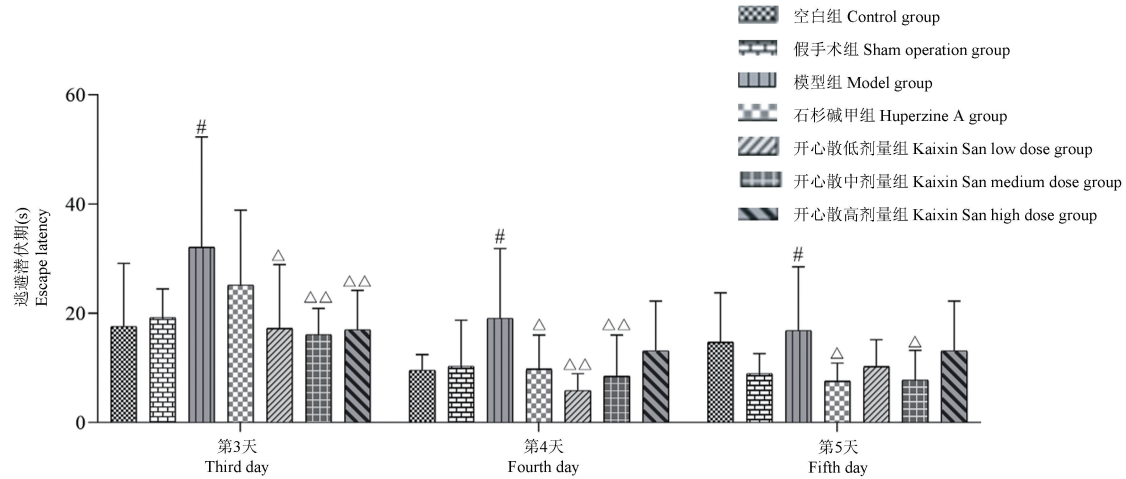
2.1.2 开心散对 AD 大鼠空间探索能力的影响

与空白组或假手术组相比,模型组穿越平台次数、目标象限停留时间及游泳路程所占百分比均明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);相较于模型组,开心散中、高剂量组的穿越平台次数增加($P < 0.05$);开心散低、高剂量组的目标象限停留时间与游泳路程所占百分比均明显提升($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(结果见表 2、图 2)。

2.2 开心散对 AD 大鼠脑组织病理形态的影响

2.2.1 HE 染色

HE 染色结果显示,空白组、假手术组大鼠皮层神经元边界清晰,形态规则;海马组织神经元数量丰富、排列紧密,形态结构正常。与空白组相比,模型组皮层、海马组织均可见神经元皱缩,皮质细胞数量明显减少,细胞间隙增大;海马组织细胞排列散乱无序,细胞层数减少,形态不规则,甚至出现核仁消失。相较于模型组,各给药组脑组织病理形态有不同程度的改善,皮层神经元数量增多,皱缩状态缓解;海马区域细胞排列较整齐,细胞层数增加,形态结构趋于正常(结果见图 3)。



注:与空白组或假手术组相比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 1 开心散对 AD 大鼠逃避潜伏期的影响

Note. Compared with the control group or sham operation group,[#] $P < 0.05$. Compared with the model group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

Figure 1 Effect of Kaixin San on escape latency in AD rats

表 1 开心散对 AD 大鼠逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Kaixin San on escape latency in AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	n	逃避潜伏期(s) Escape latency		
			第 3 天 Third day	第 4 天 Fourth day	第 5 天 Fifth day
空白组 Control group	/	9	17.59±11.17	9.52±2.91	14.74±9.01
假手术组 Sham operation group	/	8	19.26±5.19	10.26±8.47	8.92±3.70
模型组 Model group	/	10	32.11±20.17 [#]	19.11±12.74 [#]	16.86±11.66 [#]
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.046	9	25.22±13.65	9.74±6.30 Δ	7.56±3.29 Δ
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	8	17.22±11.70 Δ	5.85±3.10 $\Delta\Delta$	10.19±4.99
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	7	16.11±4.80 $\Delta\Delta$	8.41±7.62 $\Delta\Delta$	7.76±5.44 Δ
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	10	17.02±7.20 $\Delta\Delta$	13.10±9.13	13.11±9.13

注:与空白组或假手术组相比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

Note. Compared with the control group or sham operation group,[#] $P < 0.05$. Compared with the model group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

表 2 开心散对 AD 大鼠空间探索能力的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Kaixin San on spatial exploration ability of AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	n	穿越平台次数(次) Number of crossing platform	目标象限停留时间(s) Target quadrant residence time	目标象限路程所占百分比(%) Percentage of target quadrant path
空白组 Control group	/	9	6.56±1.88	50.79±8.47	40.27±5.71
假手术组 Sham operation group	/	8	7.13±2.10	51.76±10.15	40.27±6.38
模型组 Model group	/	10	5.20±2.86 [#]	44.05±6.54 [#]	32.93±7.78 [#]
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.0460	9	5.67±1.58	46.98±5.79	37.99±5.17
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	8	5.88±2.23	51.99±9.04 Δ	40.25±6.84 Δ
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	7	8.14±3.53 Δ	48.67±7.80	37.29±5.53
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	10	7.60±2.01 Δ	54.73±6.64 $\Delta\Delta$	41.92±5.05 $\Delta\Delta$

注:与空白组或假手术组相比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

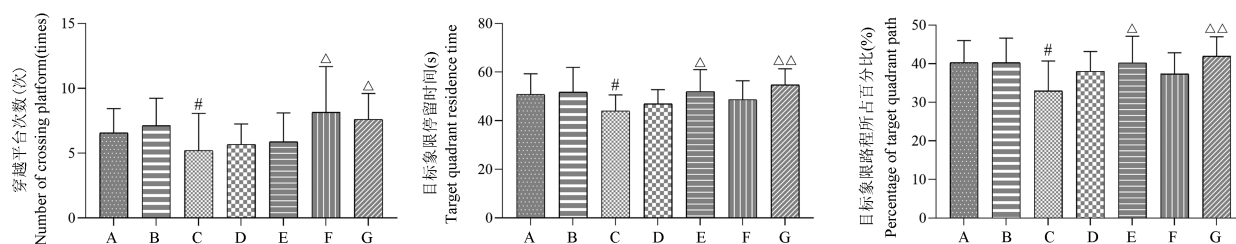
Note. Compared with the control group or sham operation group,[#] $P < 0.05$. Compared with the model group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$.

2.2.2 Nissl 染色

Nissl 染色结果显示,空白组、假手术组大鼠皮层及海马组织神经元排列整齐、均匀,细胞结构完整;尼氏小体数量丰富,形态正常,尼氏物质呈深蓝色颗粒或斑块状染色。与空白组相比,模型组皮层、海马中尼氏小体数量明显减少,染色变浅,神经元排列散乱且间隙明显增大。相较于模型组,各给药组脑组织病理状况有不同程度的改善,其皮层及海马组织中尼氏小体数量增加,且海马 CA1 区细胞排列紧密整齐,胞浆着色变深(结果见图 4)。

2.3 开心散对 AD 大鼠脑组织中胆碱能神经递质的影响

与空白组或假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 ChAT 的活性及 ACh 的含量均明显降低, AChE 的活性升高,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。相较于模型组,开心散低、高剂量组 ACh 的含量明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);石杉碱甲组、开心散低、中剂量组 ChAT 的活性增强,且 AChE 的活性显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(结果见表 3、图 5)。

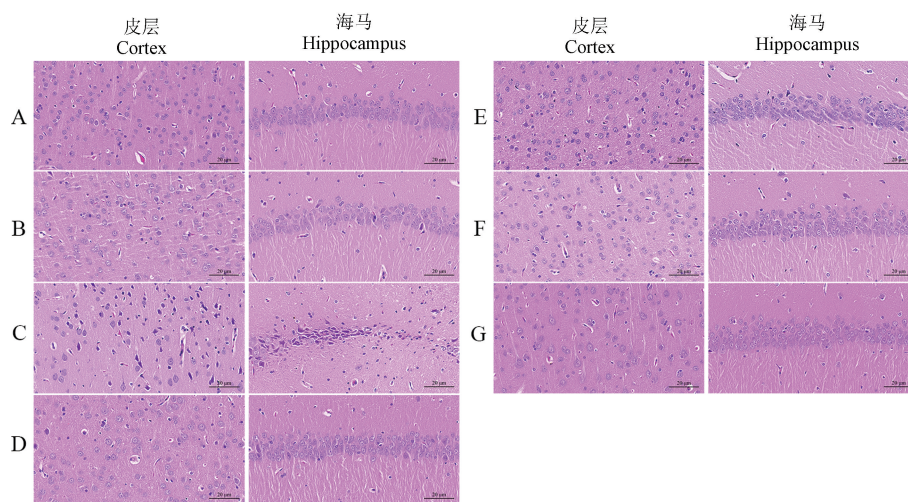


注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。与空白组或假手术组相比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比,^Δ $P < 0.05$,^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。

图2 开心散对 AD 大鼠空间探索能力的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group. Compared with the control group or sham operation group, [#] $P < 0.05$. Compared with the model group, ^Δ $P < 0.05$, ^{ΔΔ} $P < 0.01$.

Figure 2 Effect of Kaixin San on spatial exploration ability of AD rats

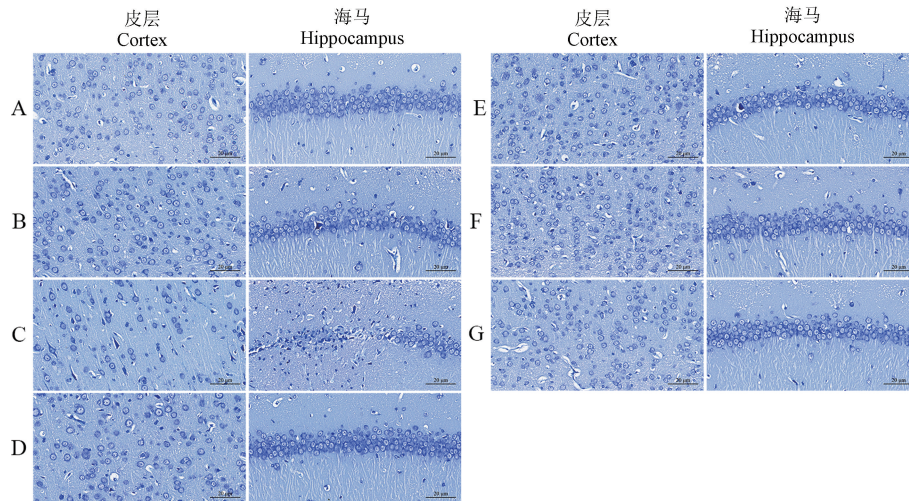


注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。

图3 开心散对 AD 大鼠脑组织病理形态的影响(HE 染色)

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group.

Figure 3 Effect of Kaixin San on pathological morphology of brain tissue in AD rats (HE staining)

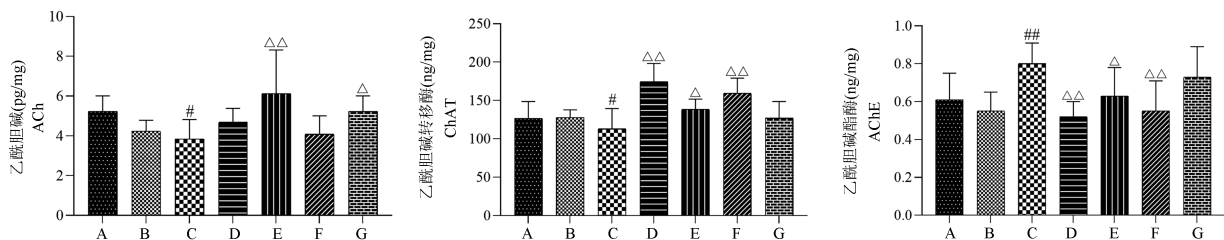


注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。

图4 开心散对 AD 大鼠脑组织病理形态的影响(Nissl 染色)

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group.

Figure 4 Effect of Kaixin San on pathological morphology of brain tissue in AD rats (Nissl staining)



注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。与空白组或假手术组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与模型组相比, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图5 开心散对 AD 大鼠胆碱能神经递质的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group. Compared with the control group or sham operation group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with the model group, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$.

Figure 5 Effect of Kaixin San on cholinergic neurotransmitter in AD rats

表3 开心散对 AD 大鼠胆碱能神经递质的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Kaixin San on cholinergic neurotransmitter in AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	ACh (pg/mg)	ChAT (ng/mg)	AChE (ng/mg)
空白组 Control group	/	5.23±0.78	126.29±22.26	0.61±0.14
假手术组 Sham operation group	/	4.24±0.54	127.70±10.20	0.55±0.10
模型组 Model group	/	3.84±0.98 [#]	113.12±26.33 [#]	0.80±0.11 ^{##}
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.046	4.68±0.70	174.64±23.47 $\Delta\Delta$	0.52±0.08 $\Delta\Delta$
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	6.13±2.19 $\Delta\Delta$	138.43±13.36 Δ	0.63±0.15 Δ
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	4.08±0.92	159.35±19.74 $\Delta\Delta$	0.55±0.16 $\Delta\Delta$
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	5.23±0.78 Δ	127.07±21.50	0.73±0.16

注:与空白组或假手术组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$;与模型组相比, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

Note. Compared with the control group or sham operation group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. Compared with the model group, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$.

2.4 开心散对 AD 大鼠脑组织中炎症因子的影响

与空白组或假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 等炎症因子的含量明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。相较于模型组,

石杉碱甲组、开心散低剂量组 TNF- α 的含量明显下降($P<0.05$);石杉碱甲组、开心散低、中剂量组 IL-1 β 与 IL-6 的含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(结果见表 4、图 6)

表 4 开心散对 AD 大鼠脑组织炎症因子的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 4 Effect of Kaixin San on inflammatory factors in brain tissue of AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	TNF- α (pg/mg)	IL-1 β (pg/mg)	IL-6 (pg/mg)
空白组 Control group	/	8.58 $\pm$ 2.76	8.62 $\pm$ 1.35	7.32 $\pm$ 1.46
假手术组 Sham operation group	/	8.38 $\pm$ 1.53	8.24 $\pm$ 0.86	6.32 $\pm$ 0.58
模型组 Model group	/	13.30 $\pm$ 2.19 ^{##}	11.51 $\pm$ 1.26 ^{##}	10.03 $\pm$ 1.62 ^{##}
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.046	9.46 $\pm$ 2.63 $^{\Delta}$	7.99 $\pm$ 1.69 $^{\Delta\Delta}$	7.60 $\pm$ 1.66 $^{\Delta}$
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	9.52 $\pm$ 3.37 $^{\Delta}$	9.24 $\pm$ 1.57 $^{\Delta}$	7.23 $\pm$ 2.00 $^{\Delta}$
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	13.24 $\pm$ 2.44	8.50 $\pm$ 2.54 $^{\Delta\Delta}$	6.81 $\pm$ 2.49 $^{\Delta\Delta}$
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	10.22 $\pm$ 3.10	10.63 $\pm$ 1.75	8.35 $\pm$ 2.31

注:与空白组或假手术组相比,^{##} $P<0.01$;与模型组相比, $^{\Delta}$ $P<0.05$, $^{\Delta\Delta}$ $P<0.01$ 。

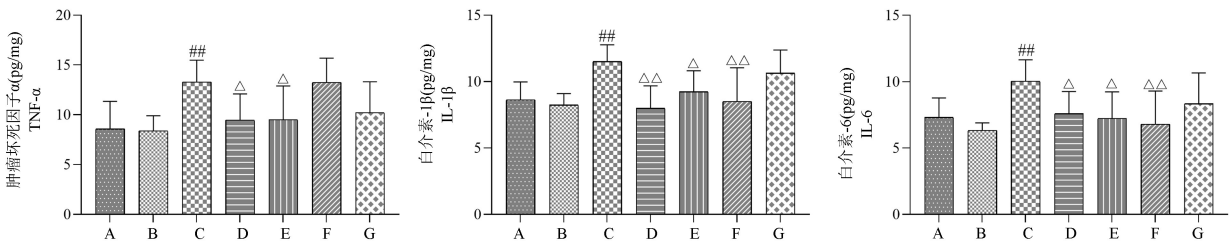
Note. Compared with the control group or sham operation group,^{##} $P<0.01$. Compared with the model group, $^{\Delta}$ $P<0.05$, $^{\Delta\Delta}$ $P<0.01$.

表 5 开心散对 AD 大鼠脑组织中 β -淀粉样蛋白含量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 5 Effect of Kaixin San on β -amyloid protein content in brain tissue of AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	APP (ng/mg)	A β_{1-40} (pg/mg)	A β_{1-42} (pg/mg)
空白组 Control group	/	1.07 $\pm$ 0.20	32.25 $\pm$ 9.67	16.43 $\pm$ 3.53
假手术组 Sham operation group	/	1.07 $\pm$ 0.19	27.64 $\pm$ 7.89	14.18 $\pm$ 1.98
模型组 Model group	/	1.83 $\pm$ 0.22 ^{##}	40.38 $\pm$ 6.81 [#]	22.25 $\pm$ 3.64 ^{##}
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.046	1.09 $\pm$ 0.16 $^{\Delta\Delta}$	30.25 $\pm$ 6.46	13.82 $\pm$ 3.65 $^{\Delta\Delta}$
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	1.06 $\pm$ 0.32 $^{\Delta\Delta}$	33.98 $\pm$ 14.58	21.71 $\pm$ 8.60
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	1.62 $\pm$ 0.56	26.19 $\pm$ 9.53 $^{\Delta}$	12.35 $\pm$ 3.15 $^{\Delta\Delta}$
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	1.24 $\pm$ 0.37 $^{\Delta\Delta}$	30.31 $\pm$ 5.32	16.35 $\pm$ 2.24 $^{\Delta}$

注:与空白组或假手术组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组相比, $^{\Delta}$ $P<0.05$, $^{\Delta\Delta}$ $P<0.01$ 。

Note. Compared with the control group or sham operation group,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$. Compared with the model group, $^{\Delta}$ $P<0.05$, $^{\Delta\Delta}$ $P<0.01$.



注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。与空白组或假手术组相比,^{##} $P<0.01$;与模型组相比, $^{\Delta}$ $P<0.05$, $^{\Delta\Delta}$ $P<0.01$ 。

图 6 开心散对 AD 大鼠脑组织炎症因子的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group. Compared with the control group or sham operation group,^{##} $P<0.01$. Compared with the model group, $^{\Delta}$ $P<0.05$, $^{\Delta\Delta}$ $P<0.01$.

Figure 6 Effect of Kaixin San on inflammatory factors in brain tissue of AD rats

2.5 开心散对 AD 大鼠脑组织中 β -淀粉样蛋白含量的影响

与空白组或假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 APP、 $A\beta_{1-40}$ 及 $A\beta_{1-42}$ 的含量明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);相较于模型组,石杉碱甲组、开心散低、高剂量组 APP 的含量显著下降($P<0.01$);开心散中剂量组 $A\beta_{1-40}$ 的含量降低($P<0.05$);石杉碱甲组、开心散中、高剂量组 $A\beta_{1-42}$ 的含量均明显减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$) (结果见表 5、图 7)。

2.6 开心散对 AD 大鼠脑组织中 tau 蛋白磷酸化的影响

2.6.1 开心散对 AD 大鼠皮层、海马组织中 tau 蛋白表达水平的影响

与空白组或假手术组相比,模型组大鼠皮层、海马组织中 tau 蛋白棕黄色阳性表达产物明显增多,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);相较于模型组,开心散中剂量组皮层组织中 tau 蛋白的阳性表达量显著下降($P<0.05$);石杉碱甲组、开心散低剂量组海马组织中 tau 蛋白的表达水平均有下

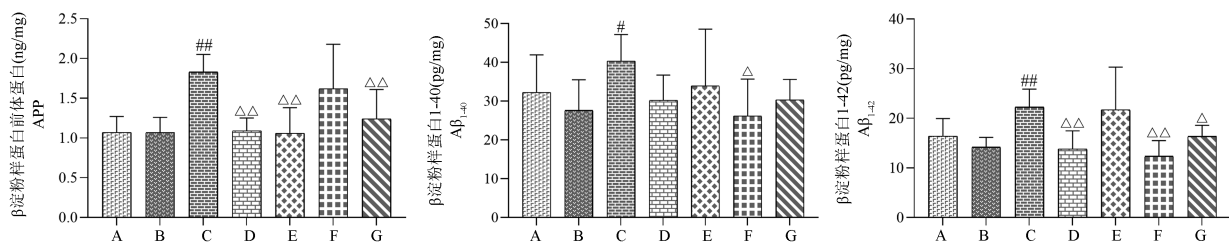
调($P<0.05$) (结果见表 6、图 8、图 9)。

2.6.2 开心散对 AD 大鼠皮层、海马组织中 GSK-3 β 表达水平的影响

与空白组或假手术组相比,模型组大鼠皮层、海马组织中 GSK-3 β 棕黄色免疫阳性产物明显增多,差异有统计学意义($P<0.05$);相较于模型组,石杉碱甲组、开心散高剂量组皮层组织中 GSK-3 β 阳性表达量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);石杉碱甲组、开心散低、中、高剂量组海马组织中 GSK-3 β 表达水平均下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(结果见表 7、图 10、图 11)

2.7 开心散对 AD 大鼠脑组织中 BCL-2 与 BAX 表达水平的影响

与空白组或假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 BAX 蛋白的相对表达量升高,且 BCL-2/BAX 的比值下降,但差异无统计学意义($P>0.05$)。相较于模型组,各给药组脑组织中 BAX 蛋白的表达水平趋于下调($P>0.05$),且 BCL-2/BAX 的比值有不同程度的升高趋势($P>0.05$) (结果见表 8、图 12、图 13)。



注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。与空白组或假手术组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$;与模型组相比, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ 。

图 7 开心散对 AD 大鼠脑组织中 β -淀粉样蛋白含量的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group. Compared with the control group or sham operation group, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$. Compared with the model group, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$.

Figure 7 Effect of Kaixin San on β -amyloid protein content in brain tissue of AD rats

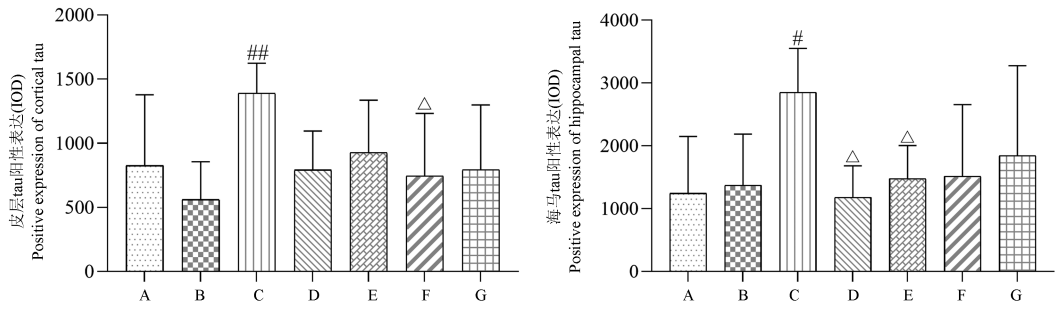
表 6 开心散对 AD 大鼠脑组织中 tau 蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

Table 6 Effect of Kaixin San on the expression of tau in brain tissue of AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	皮层 (IOD) Cortex	海马 (IOD) Hippocampus
空白组 Control group	/	826.97 $\pm$ 552.16	1244.68 $\pm$ 906.16
假手术组 Sham operation group	/	561.62 $\pm$ 295.79	1374.30 $\pm$ 814.44
模型组 Model group	/	1390.36 $\pm$ 233.98 $^{##}$	2849.53 $\pm$ 702.32 $^{\#}$
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.046	792.01 $\pm$ 304.28	1181.80 $\pm$ 500.61 $^{\Delta}$
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	928.21 $\pm$ 408.26	1479.75 $\pm$ 523.92 $^{\Delta}$
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	747.18 $\pm$ 486.63 $^{\Delta}$	1515.77 $\pm$ 1139.74
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	793.42 $\pm$ 505.62	1845.28 $\pm$ 1432.42

注:与空白组或假手术组相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$;与模型组相比, $^{\Delta}P<0.05$ 。

Note. Compared with the control group or sham operation group, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$. Compared with the model group, $^{\Delta}P<0.05$.

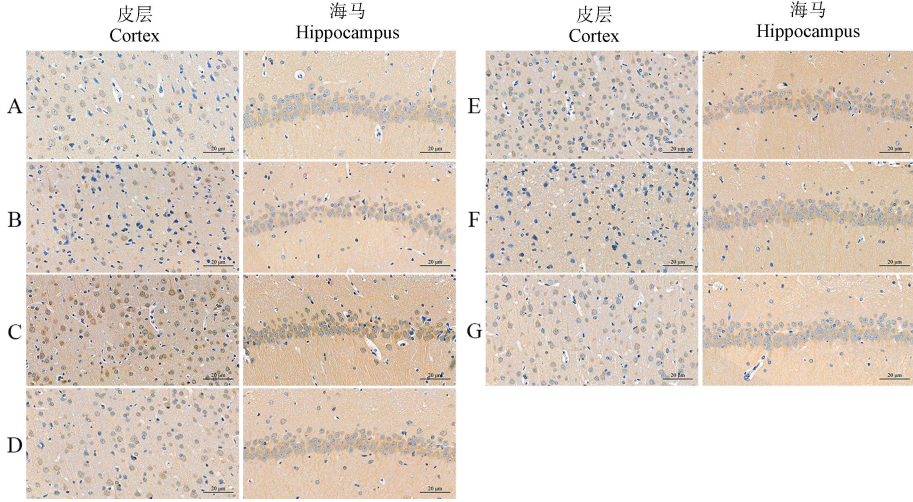


注: A:空白组; B:假手术组; C:模型组; D:石杉碱甲组; E:开心散低剂量组; F:开心散中剂量组; G:开心散高剂量组。与空白组或假手术组相比, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; 与模型组相比, [△] $P<0.05$ 。

图 8 开心散对 AD 大鼠脑组织中 tau 蛋白表达水平的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group. Compared with the control group or sham operation group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$. Compared with the model group, [△] $P<0.05$.

Figure 8 Effect of Kaixin San on the expression of tau in brain tissue of AD rats



注: A:空白组; B:假手术组; C:模型组; D:石杉碱甲组; 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 9 开心散对 AD 大鼠脑组织中 tau 蛋白表达水平的影响

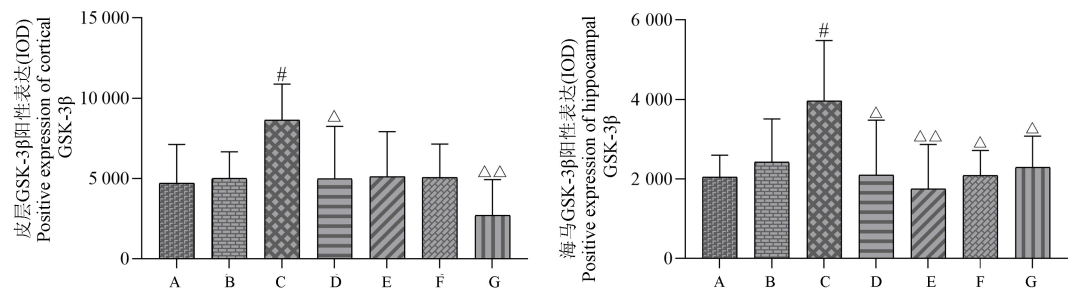
Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group.

Figure 9 Effect of Kaixin San on the expression of tau in brain tissue of AD rats

表 7 开心散对 AD 大鼠脑组织中 GSK-3 β 表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)
Table 7 Effect of Kaixin San on GSK-3 β expression in brain tissue of AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	皮层 (IOD) Cortex	海马 (IOD) Hippocampus
空白组 Control group	/	4693.20 $\pm$ 2424.03	2047.70 $\pm$ 554.39
假手术组 Sham operation group	/	5004.02 $\pm$ 1654.56	2421.76 $\pm$ 1088.99
模型组 Model group	/	8641.52 $\pm$ 2230.49 [#]	3967.49 $\pm$ 1515.58 [#]
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.046	4974.27 $\pm$ 3274.99 [△]	2102.58 $\pm$ 1375.84 [△]
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	5113.12 $\pm$ 2794.35	1752.94 $\pm$ 1119.70 ^{△△}
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	5068.12 $\pm$ 2072.73	2091.91 $\pm$ 627.92 [△]
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	2692.39 $\pm$ 2236.57 ^{△△}	2290.97 $\pm$ 785.73 [△]

注: 与空白组或假手术组相比, [#] $P<0.05$; 与模型组相比, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ 。
Note. Compared with the control group or sham operation group, [#] $P<0.05$. Compared with the model group, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$.

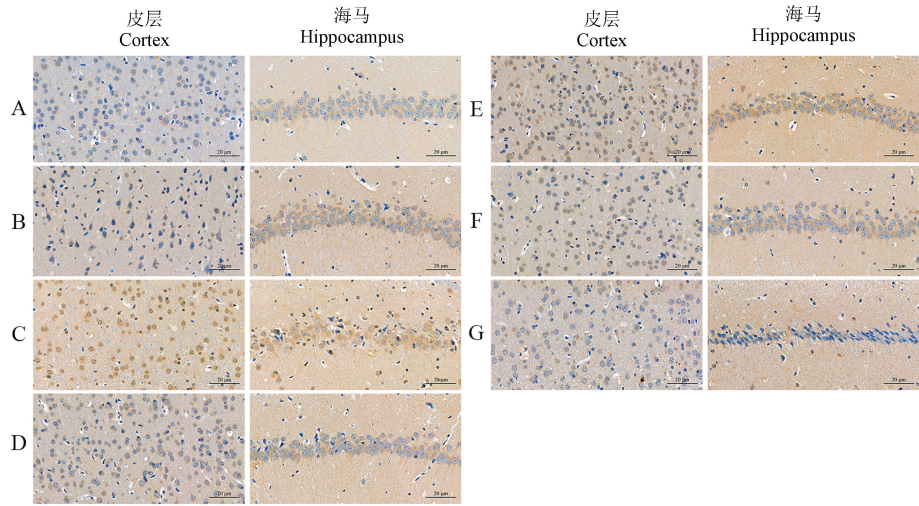


注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。与空白组或假手术组相比,[#]*P*<0.05;与模型组相比,^Δ*P*<0.05,^{ΔΔ}*P*<0.01。

图 10 开心散对 AD 大鼠脑组织中 GSK-3β 表达水平的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San medium dose group. Compared with the control group or sham operation group, [#]*P*<0.05. Compared with the model group, ^Δ*P*<0.05, ^{ΔΔ}*P*<0.01.

Figure 10 Effect of Kaixin San on GSK-3β expression in brain tissue of AD rats



注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组。

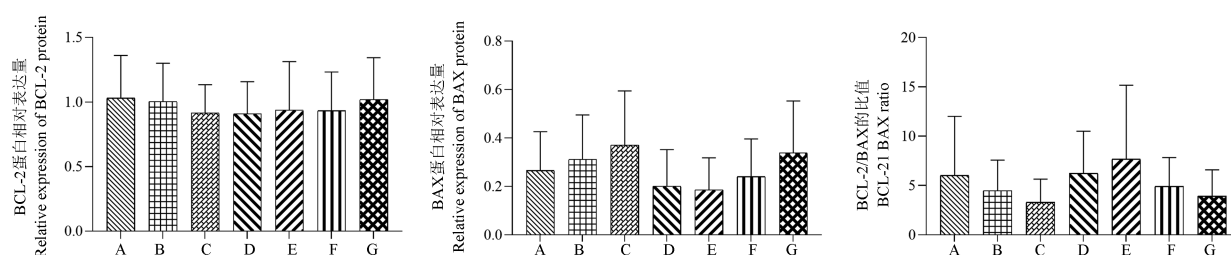
图 11 开心散对 AD 大鼠脑组织中 GSK-3β 表达水平的影响

Note. A, Control group. B, Shamoperation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group.

Figure 11 Effect of Kaixin San on GSK-3β expression in brain tissue of AD rats

表 8 开心散对 AD 大鼠脑组织中 BCL-2 及 BAX 表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)
Table 8 Effect of Kaixin San on expression of BCL-2 and BAX in brain tissue of AD rats

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dosage	BCL-2	BAX	BCL-2/BAX
空白组 Control group	/	1.030±0.331	0.266±0.160	6.032±5.970
假手术组 Sham operation group	/	1.004±0.296	0.312±0.183	4.478±3.089
模型组 Model group	/	0.916±0.219	0.371±0.223	3.298±2.352
石杉碱甲组 Huperzine A group	0.046	0.909±0.248	0.201±0.151	6.227±4.265
开心散低剂量组 Kaixin San low dose group	11.480	0.938±0.374	0.186±0.132	7.675±7.486
开心散中剂量组 Kaixin San medium dose group	22.960	0.933±0.299	0.241±0.155	4.914±2.918
开心散高剂量组 Kaixin San high dose group	45.920	1.019±0.324	0.339±0.214	3.920±2.667

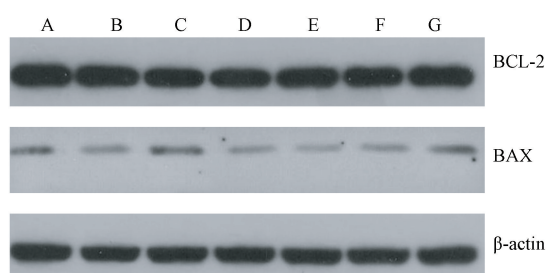


注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;E:开心散低剂量组;F:开心散中剂量组;G:开心散高剂量组

图 12 开心散对 AD 大鼠脑组织中 BCL-2 及 BAX 表达水平的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group.

Figure 12 Effect of Kaixin San on expression of BCL-2 and BAX in brain tissue of AD rats



注:A:空白组;B:假手术组;C:模型组;D:石杉碱甲组;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 13 开心散对 AD 大鼠脑组织中 BCL-2 及 BAX 表达水平的影响

Note. A, Control group. B, Sham operation group. C, Model group. D, Huperzine A group. E, Kaixin San low dose group. F, Kaixin San medium dose group. G, Kaixin San high dose group.

Figure 13 Effect of Kaixin San on expression of BCL-2 and BAX in brain tissue of AD rats

3 讨论

Morris 水迷宫作为现今应用最广泛的考察啮齿类动物空间学习与长期记忆的行为学测试^[13],提供了一套评估不同认知域功能的灵活方式,其中最广为人知的隐藏平台训练(定位航行)和空间探索检验可有效评测鼠类的空间记忆与记忆保持能力^[14]。本研究中,经开心散治疗后, $A\beta_{1-42}$ 造模后的大鼠水迷宫各项测试成绩有较明显提升,说明开心散可在一定程度上改善机体的认知导航能力。

AD 作为一类中枢神经系统渐进性衰退病症,从起病、发展到恶化、死亡的整个过程均涉及到特有的病理生理学改变,HE 染色与 Nissl 染色可通过简单的染料组合揭示细胞细节与超微结构分布,借此可推断神经元的功能状态与畸变信息^[15]。病理

形态观察证实,相较于模型组,给药组大鼠皮层、海马组织病理状况有所改善,神经元数量增多,尼氏小体数目增加,形态结构趋于正常,表明开心散可缓解 AD 动物的脑组织损伤,恢复神经元的生理功能。

ACh 参与大脑信息处理的神经传导,与人体的记忆行为及学习认知功能密切相关。AD 的病变伴随着脑内 ACh 的“合成-传递-摄取”链失衡、ChAT 与 AChE 的活性失常,胆碱能神经系统出现明显缺陷,进而导致机体学习记忆功能障碍^[16]。ELISA 检测证明,经开心散干预的 AD 大鼠脑组织中 AChE 活性降低,ChAT 与 ACh 的含量上升,进一步揭示了开心散对胆碱能神经传递的靶向作用,间接维持 ACh 合成、降解过程的动态平衡。

慢性免疫炎症反应是 AD 发生并且逐渐恶化的关键诱因^[17-19],随着机体年龄的增长和 $A\beta$ 的持续生成与集聚,小胶质细胞(MG)与星形胶质细胞(AS)在长期慢性活化过程中被过度激活,导致炎症细胞因子如 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的大量生成与释放,脑组织局部炎症反应加重,神经元受损、变性甚至死亡^[20]。研究过程中观察到,AD 大鼠经开心散治疗后,脑组织中的炎症因子含量均下降,证明开心散可抑制促炎因子的过度释放,由此减轻脑内炎症微环境的毒性效应。

$A\beta$ 是由淀粉样前体蛋白(APP)水解生成的正常代谢物,在 β -分泌酶和 γ -分泌酶的剪辑切割下,APP 可降解为以 $A\beta_{1-40}$ 和 $A\beta_{1-42}$ 为代表的 $A\beta$ 肽段^[21]。在健康机体内, $A\beta$ 的产生与降解可保持动态平衡;然而当机体发生衰老、受到物理或化学损伤时,会导致“ $A\beta$ -APP”代谢链失常, $A\beta$ 因此聚积沉淀形成弥漫性的神经炎斑^[22]。经给药治疗后的

AD 鼠脑内 A β 相关蛋白含量均有降低,表明开心散可减少 A β 的异常蓄积,使其生成与清除状态趋于平衡。

Tau 蛋白是一类与微管相关的组分,可与微管结合促进其稳定并组装成束,协助神经细胞间的物质转运^[23]。由于机体的衰老和致病因素的入侵,蛋白激酶如 GSK-3 β 活性的失衡,促使 tau 蛋白的异常修饰和过度磷酸化,进而毁坏了微管的结构和稳定性,轴突运输、信号传导等生理功能损坏,最终导致神经元的变性死亡和痴呆的发生^[24]。开心散干预后的 AD 大鼠皮层、海马组织内 tau 蛋白及其磷酸化激酶 GSK-3 β 的表达水平明显下调,证明开心散可调控 tau 蛋白磷酸化水平,维护中枢神经系统的正常运转。

BCL-2 蛋白质大家族主导着细胞对诱发凋亡的各种刺激及损害的敏感性与抵抗力^[25]。根据结构同源性与其功能可分为抗凋亡蛋白(以 BCL-2 为代表)与促凋亡蛋白(以 BAX 为代表)^[26],BCL-2 与 BAX 在大脑中的比例介导着神经元的存活^[27]。研究发现,开心散治疗后的 AD 大鼠脑组织中 BAX 蛋白的表达量有所降低,且 BCL-2/BAX 的比值趋于升高,表明开心散在一定程度上可干涉凋亡因子对神经元的毁伤,进而减少其凋亡的发生。

然而,本研究旨在对开心散抗痴呆的药理活性进行全面筛查与验证,所采用的海马 CA1 区注射 A β_{1-42} 寡聚体致痴呆模型只能复制 AD 的部分症状与病因,且研究所设立的指标与靶点较为宽泛,缺乏针对单一神经功能系统或完整信号蛋白通路的侧重考查,还需在后续研究中加以补充探索。

由以上可知,开心散对双侧海马 CA1 区注射 A β_{1-42} 造模大鼠的痴呆症状与脑组织损伤有较好的治疗作用和缓解效果,其作用机制涉及到胆碱能神经递质、炎症因子、 β -淀粉样蛋白、tau 蛋白磷酸化水平以及凋亡因子等多靶点、多通路的靶向调控与干预,此研究也进一步证实开心散抗痴呆的药理活性,其作为治疗“好忘”的经典古方具备进一步挖掘的价值。

参考文献:

- [1] 贾亚泉,宋军营,曾华辉,等.阿尔茨海默病动物模型研究进展[J].中国实验动物学报,2021,29(3):381-386.
- [2] 陈晓培,王虹,李瑞晨,等.姜黄素对阿尔茨海默病小鼠海马 InR 和 IGF1R 表达的影响[J].中国实验动物学报,2013,21(1):27-31,95-96.
- [3] 牟朝清,马进.阿尔茨海默病的病因病机研究进展[J].山西医药杂志,2019,48(4):435-438.
- [4] 刘金颖,孙林琳,钱园园,等.阿尔茨海默病性别差异及其机制研究[J].中风与神经疾病杂志,2020,37(2):190-192.
- [5] Azizi G, Mirshafiey A. The potential role of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2012, 34(6):881-895.
- [6] 胡建庆,赵俊,卢梦晗,等.“通督启神”针法治疗阿尔茨海默病的理论探讨[J].世界科学技术-中医药现代化,2020,22(8):2634-2640.
- [7] 毕婷婷,战丽彬,张栎婧.基于中药整合药理学平台探究开心散治疗 AD 的物质基础与作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(16):135-141.
- [8] 初航,卢盛文,孔玲,等.基于中医方证代谢组学的开心散干预老年痴呆症大鼠的效应物质动态分析[J].世界科学技术-中医药现代化,2016,18(10):1653-1669.
- [9] 刘江华,杨晶,张京兰,等.开心散对 A β_{1-42} 诱导 Alzheimer 病大鼠模型 Keap-1/Nrf2/MnSOD 信号通路的作用[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(5):25-32.
- [10] 王彬斌,冯晓晓,恩特扎尔·别克,等.开心散对 APP/PS1 小鼠神经炎症和 A β 沉积的作用研究[J].中草药,2021,52(24):7511-7519.
- [11] 李妍,时悦,李巍,等.开心散调控 PI3K/Akt/GSK3 β 信号通路促进 AD 模型小鼠脑内神经再生[J].中药药理与临床,2020,36(5):73-78.
- [12] 包新民,舒斯云.大鼠脑立体定位图谱[M].北京:人民卫生出版社;1991.
- [13] Ran LY, Xiang J, Zeng XX, et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis indicated that neurotoxicity of rats with chronic fluorosis may be in mechanism involved in the changed cholinergic pathway and oxidative stress[J]. J Trace Elem Med Biol, 2021, 64:126688.
- [14] Yang G, Qian C, Zhang C, et al. Hepcidin attenuates the iron-mediated secondary neuronal injury after intracerebral hemorrhage in rats[J]. Transl Res, 2021, 229:53-68.
- [15] Chan JK. The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology[J]. Int J Surg Pathol, 2014, 22(1):12-32.
- [16] Armstrong DM, Saper CB, Levey AI, et al. Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase[J]. J Comp Neurol, 1983, 216(1):53-68.
- [17] Diniz BS, Teixeira AL, Ojopi EB, et al. Higher serum sTNFR1 level predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2010, 22(4):1305-1311.
- [18] McGeer EG, McGeer PL. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy[J]. J Alzheimers Dis, 2010, 19(1):355-361.

(下转第 141 页)