

基于 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路探讨四君子汤改善 阿尔茨海默病的作用机制

孙敏燕^{1,2,3}, 魏韶锋^{1,4}, 王晓敏², 高钊涵², 杨建豪¹, 谢子然⁴, 张雨⁴, 郑琴^{1*}

(1. 江西中医药大学 中药改良创新江西省重点实验室, 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;
2. 江西中医药大学 医学院, 南昌 330004; 3. 柳州市中医医院, 广西 柳州 545001;
4. 南昌医学院, 南昌 330052)

[摘要] 目的:旨在基于 Kelch样 ECH 相关蛋白 1(Keap1)/核因子 E₂ 相关因子 2(Nrf2)/血红素加氧酶-1(HO-1)信号通路探讨四君子汤改善由东莨菪碱(SCOP)引发的阿尔茨海默病(AD)小鼠模型及 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞模型的机制。方法:首先在体内实验中,腹腔注射 SCOP(3 mg·kg⁻¹)建立 AD 小鼠模型。Morris 水迷宫与旷场实验评估小鼠学习记忆能力;苏木素-伊红(HE)染色和尼氏染色检测脑组织神经病理结构改变;免疫荧光检测 β 淀粉样蛋白₁₋₄₂(A β ₁₋₄₂)表达水平;免疫组化检测脑组织中磷酸化(p)-Tau 的表达水平;透射电镜观察海马神经元和突触的超微结构。生化法检测海马中乙酰胆碱(ACh)、乙酰胆碱酯酶(AChE)水平、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、乳酸脱氢酶(LDH)水平;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠海马 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路相关 mRNA 和蛋白表达水平。在体外实验中,以 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞建立氧化损伤模型,分别采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法和流式细胞术检测细胞存活率和凋亡率,并通过 Western blot 检测 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路相关蛋白的表达。结果:在体内实验中,与模型组比较,四君子汤组和多奈哌齐组小鼠逃避潜伏期显著缩短($P<0.01$),在目标象限游泳时间、穿过平台次数显著增加,旷场中心区域移动距离和停留时间明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);HE 和尼氏染色显示药物组神经元排列较为整齐,尼氏小体数量明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);A β ₁₋₄₂、p-Tau 的表达水平明显下调($P<0.05$, $P<0.01$);透射电镜结果表明药物组的海马神经元和突触的超微结构损伤有所减轻;MDA、LDH 水平和 AChE 活力明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),SOD、CAT 水平和 ACh 含量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);海马组织中 Keap1 表达量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),Nrf2、HO-1 和 NQO1 表达量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。在体外实验中,与模型组比较,四君子汤含药血清处理组的细胞存活率明显提高($P<0.05$, $P<0.01$),总凋亡率明显降低($P<0.05$, $P<0.01$);给药组中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达明显上调($P<0.05$, $P<0.01$),Keap1 蛋白表达则明显下调($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:四君子汤对 SCOP 导致的 AD 小鼠模型和 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞模型显示出良好的保护作用,其机制可能与通过 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路发挥抗氧化作用有关。

[关键词] 四君子汤; 阿尔茨海默病; 氧化应激; Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(Keap1)/核因子 E₂ 相关因子 2(Nrf2)/血红素加氧酶-1(HO-1)信号通路

[中图分类号] R741;R285;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)17-0023-15

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20250916

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250808.1405.004>

[网络出版日期] 2025-08-08 15:36:39 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Si Junzitang Ameliorates Alzheimer's Disease by Regulating Keap1/Nrf2/HO-1 Signaling Pathway

SUN Minyan^{1,2,3}, WEI Shaofeng^{1,4}, WANG Xiaomin², GAO Kehan², YANG Jianhao¹, XIE Ziran⁴,
ZHANG Yu⁴, ZHENG Qin^{1*}

(1. Jiangxi Key Laboratory for Innovation and Improvement of Traditional Chinese Medicine (TCM),

[收稿日期] 2025-04-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860874);中药制剂技术与装备创新团队项目(CXTD22006);江西中医药大学研究生创新专项(XJ-S202412);江西中医药大学大学生创新训练计划项目(202410412272)

[第一作者] 孙敏燕,硕士,从事中医药防治脑病及内分泌系统疾病的研究,E-mail:1197012599@qq.com

[通信作者] * 郑琴,博士,教授,博士生导师,从事中药新型给药系统(脑部给药系统)的基础研究,E-mail:zhengqin912006@163.com

Key Laboratory of Modern Chinese Medicine Preparation, Ministry of Education,
Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;
2. College of TCM, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;
3. Liuzhou Hospital of TCM, Liuzhou 545001, China;
4. Nanchang Medical College, Nanchang 330052, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanisms through which Si Junzitang (SJZD) ameliorates Alzheimer's disease (AD) induced by scopolamine (SCOP) in mice and the PC12 cell model induced by H_2O_2 based on the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway. **Methods:** In the animal experiments, an AD model was established in mice by intraperitoneal injection of SCOP ($3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Morris water maze and open field tests (OFT) were conducted to assess learning and memory abilities. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Nissl staining were performed to observe pathological changes in neurons. Immunofluorescence was used to detect amyloid β -protein₁₋₄₂ ($A\beta_{1-42}$) expression, and immunohistochemistry was employed to detect phosphorylated (p)-Tau expression. Transmission electron microscopy (TEM) was employed to observe ultrastructural changes in hippocampal neurons and synapses. Biochemical methods were used to measure the levels of acetylcholine (ACh), acetylcholinesterase (AChE), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), and lactate dehydrogenase (LDH). Real-time PCR and Western blot were employed to measure the mRNA and protein levels of molecules in the Keap1/Nrf2/HO-1 pathway in the hippocampus. In the cell experiments, a PC12 cell model of oxidative damage model was established with H_2O_2 . Cell count kit-8 (CCK-8) assays and flow cytometry were adopted to measure cell viability and apoptosis rates, and Western blot was employed to quantify the expression levels of proteins in the Keap1/Nrf2/HO-1 pathway. **Results:** The animal experiments showed that compared with the model group, the SJZD and donepezil groups showed shortened escape latency ($P<0.01$), increased time in the target quadrant and platform crossings, and increased movement distance and duration in the central area of the open field ($P<0.05$, $P<0.01$). HE and Nissl staining showed more organized neurons and increased Nissl bodies in the drug intervention groups ($P<0.05$, $P<0.01$), and the $A\beta_{1-42}$ and p-Tau expression levels were downregulated ($P<0.05$, $P<0.01$). TEM revealed reduced ultrastructural damage in hippocampal neurons and synapses in the drug intervention groups. In addition, the drug intervention groups showed declined levels of MDA, LDH, and AChE ($P<0.05$, $P<0.01$), elevated levels of SOD, CAT, and ACh ($P<0.05$, $P<0.01$), reduced Keap1 expression and increased Nrf2, HO-1, and NQO1 expression in the hippocampus ($P<0.05$, $P<0.01$). The cell experiments showed that compared with the model group, the SJZD-containing serum increased the cell viability ($P<0.05$, $P<0.01$), and decreased total apoptosis rates ($P<0.05$, $P<0.01$). The drug intervention groups showed upregulated protein levels of Nrf2 and HO-1 and downregulated protein level of Keap1 ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** SJZD demonstrates protective effects against SCOP-induced AD in mice and H_2O_2 -induced damage in PC12 cells through antioxidant mechanisms mediated by the Keap1/Nrf2/HO-1 pathway.

[Keywords] Si Junzitang; Alzheimer's disease; oxidative stress; Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway

阿尔茨海默病(AD)是一种最常见的神经退行性疾病,最初表现为学习记忆能力下降,且早期阶段往往不易察觉,而在后期阶段,患者变得烦躁不安并影响行为,如具有攻击性和妄想性,伴有睡眠障碍和推理能力的丧失^[1]。AD是一种获得性认知障碍,其发展程度严重影响日常生活,在老年人中具有很高的死亡率^[2]。据世界卫生组织(WHO)预测,到2050年,全球AD患者将高达1亿人以上^[3]。研究表明, β 淀粉样蛋白($A\beta$)斑块沉积、Tau蛋白过度磷酸化、神经元损伤及死亡、胆碱能神经系统病变、氧化应激、神经炎症和遗传因素等多种机制参与AD的发生发展^[4-7]。然而,目前尚未找到明确有效且无不良反应的AD治疗方法,迫切需要开发治疗AD的新策略。

氧化应激是连接各种AD发病机制和途径的关

键桥梁,其中核因子 E_2 相关因子2(Nrf2)和Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)在众多细胞与器官中扮演着抗氧化应激损伤的核心调控角色^[8]。在生理状态下,Keap1与Nrf2结合使Nrf2失活且易降解,而细胞受活性氧(ROS)攻击时,Nrf2解离并转移至细胞核内,与抗氧化反应元件(ARE)结合并启动下游基因转录与表达^[9]。研究表明槲皮素和冰菖散可以通过调节Keap1/Nrf2/血红素加氧酶-1(HO-1)信号通路改善APP/PS1小鼠的认知障碍和AD样病变^[10-11];麝香水提取物通过调节Keap1/Nrf2/ARE通路减轻erastin诱导的HT22细胞铁死亡^[12];microRNA-592抑制剂通过调控Keap1/Nrf2/ARE信号通路抑制AD细胞模型的氧化应激损伤^[13]。上述结果表明AD的病理过程与Keap1/Nrf2/ARE信号通路密切相关。

随着对AD研究的深入,中药及其提取物防治

AD的作用日益受到重视,研究表明健脾中药具有抗氧化作用,可以清除体内的自由基,减轻氧化应激损伤,在AD的治疗上可能具有天然优势^[14-15]。四君子汤是宋代《太平惠民和剂局方》记载的经典补脾方剂,包括4种传统中药材,由人参(去芦)、白术、茯苓(去皮)、甘草(炙)组成。作为四君子汤的君药,人参在全方中起着重要作用,可预防衰老和延长寿命^[16-17]。人参寡糖通过Nrf2/HO-1信号通路保护神经元免受谷氨酸诱导的氧化损伤^[18]。茯苓酸通过调节miR-155/Nrf2/HO-1轴防止缺氧/复氧诱导的神经元细胞损伤^[19]。白术内酯Ⅲ激活蛋白激酶B(Akt)/Nrf2/HO-1信号通路减轻了大鼠的脑缺血再灌注损伤^[20]。甘草查耳酮B通过抗氧化作用和增强Nrf2通路减轻脑卒中大鼠模型的神经元损伤^[21]。以上证据表明四君子汤的组成成分可以通过氧化途径对疾病起到保护或治疗作用,但四君子汤是否能通过调节氧化应激过程来减轻AD及其机制目前仍缺乏明确的认识。

鉴于此,为了更深入地探讨四君子汤在防治AD方面的作用机制,本实验采用腹腔注射东莨菪碱(SCOP)建立小鼠认知障碍模型,并利用过氧化氢(H₂O₂)诱导的PC12细胞构建氧化损伤模型。基于Keap1/Nrf2/HO-1信号通路,研究四君子汤对AD模型小鼠和细胞的改善作用,旨在为健脾中药防治AD的应用和药物研发提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 60只6~8周龄的SPF级雄性昆明(KM)小鼠,体质量(27±3)g,均从湖南斯莱克景达实验动物有限公司购买,合格证号SCXK(湘)2021-0002。50只SPF级雄性SD大鼠,体质量(275±25)g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(湘)2019-0004。实验动物均饲养于江西中医药大学实验动物科技中心,环境条件设定为温度(22±2)℃,相对湿度50%,12h昼夜交替周期,且小鼠能够自由进食和饮水。在实验开始前,小鼠经过1周的适应期以适应新环境。

1.2 伦理 本研究严格遵守动物实验的伦理准则,并已获得江西中医药大学实验动物伦理委员会的审批,批准编号JZLLSC20210021。

1.3 药物与试剂 人参、白术、茯苓和炙甘草(江中药饮片有限公司,批号分别为200218、200413、200113、180513),经江西中医药大学药学院刘荣华教授鉴定为正品。高分化PC12细胞(上海赛百慷生物技术股份有限公司,批号20231217),传代至第

5代后进行后续实验;多奈哌齐片(陕西方舟制药有限公司,货号H20030583)。苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、脱脂奶粉(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为G1120、D8340);尼氏染色液(碧云天生物科技有限公司,货号C0117);蛋白浓度测定试剂盒与超敏化学发光试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为G2026、G2020);细胞组织快速裂解液(苏州新赛美生物科技有限公司,货号WB3100);过氧化氢酶(CAT)可见光试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)及组织中乙酰胆碱(ACh)、乙酰胆碱酯酶(AChE)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为A007-1-1、A001-3-2、A003-1-2、A020-2-2、A105-1-1、A024-1-1);氢溴酸东莨菪碱(美国MCE生物科技有限公司,货号HY-N0296A);细胞凋亡试剂盒(大连美伦生物技术有限公司,货号MA0218);细胞增殖活性检测(CCK-8)试剂盒(苏州优逸兰迪生物科技有限公司,货号F6012L);核蛋白抽提试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠、HO-1抗体(美国Proteintech公司,货号分别为PK10014、SA00001-1、66743-1-Ig);胎牛血清(苏州依科赛生物科技有限公司,货号FSD500);HRP标记山羊抗兔、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、NAD(P)H醌脱氢酶1(NQO1)抗体、Keap1抗体、p-Tau(S396)抗体(杭州华安生物技术有限公司,货号分别为HA1001、EM21002、ET1702-50、HA721525、ET1611-68);Nrf2抗体(美国CST公司,货号20733);A β_{1-42} 抗体(英国Abcam公司,货号AB201060);总RNA提取试剂盒、逆转录和荧光定量试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司,货号分别为R401-01、R223-01、Q712-02)。

1.4 仪器 VE-586型垂直电泳槽和EPS-200型电泳仪(中国天能仪器江苏有限公司)、Chemi Doc XRS+型凝胶成像分析仪(美国Bio-Rad公司);Gradient A10型超纯水器(美国Millipore公司);RM2016型切片机(上海徠卡仪器有限公司);STRIKE300型旋转蒸发仪(德国ChemTron公司);Infinite M200 Pro型多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);Smart V3.0小动物行为学视频追踪系统(西班牙Panlab公司);NanoDrop 2000型超微量分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司);SCI1000-G型聚合酶链式反应(PCR)梯度基因扩增仪(美国SCILOGEX公司);QuantStudio 5型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(美国赛默飞世尔科技公

司)。FongCyte™型流式细胞仪(北京层浪生物科技有限公司),XR-XM101型Morris水迷宫(上海欣软信息科技有限公司)。

2 方法

2.1 KM小鼠的给药

2.1.1 药物制备 根据原方记载比例3:3:3:2将人参(去芦)、白术、茯苓和炙甘草浸泡30 min后,使用调温型电热套提取药液3次,加入10、8、8倍量纯水,分别提取30 min。合并3次滤液,最终用旋转蒸发仪浓缩为四君子汤低、中、高3个质量浓度(0.33、0.44、0.88 g·mL⁻¹),置于4℃冰箱短期保存备用^[22]。

2.1.2 分组与给药 将KM小鼠随机分为6组,分别为空白组,模型组,四君子汤低、中、高剂量组及盐酸多奈哌齐组(阳性药物)。以四君子汤中剂量为临床等效剂量,根据《药理实验方法学》^[23]中人与小鼠体表面积换算公式,得出四君子中剂量用药量为4.29 g·kg⁻¹,在此基础上低剂量为中剂量的1/2倍,高剂量为中剂量的2倍。阳性药参考相关研究,根据临床等效剂量折算予盐酸多奈哌齐剂量为0.65 mg·kg⁻¹^[24],空白组与模型组接受等量蒸馏水的灌胃处理,该过程每日执行1次,持续进行21 d。

2.2 KM小鼠的模型复制 自给药第8天起,每次灌胃给药完成后30 min,除了空白组和模型组接受相应体积的生理盐水注射外,其他各组小鼠均进行SCOP腹腔注射造模。SCOP可通过拮抗中枢神经系统中的毒蕈碱型乙酰胆碱受体(mAChRs),引发与AD相似的认知功能障碍症状,因此常被用于构建AD模型^[25],小鼠逃避潜伏期延长,在目标象限游泳时间、穿过平台次数显著减少,旷场中心区域移动距离和停留时间减少,以上变化与正常组小鼠有统计学差异即为造模成功。参考文献^[26]报道SCOP造模剂量为3 mg·kg⁻¹,每天腹腔注射1次,连续造模14 d,造模期间持续给药。

2.3 Morris水迷宫试验 水迷宫测试周期为7 d,具体安排如下:适应性训练(第1天),定位航行实验(第2~6天)和空间探索实验(第7天)。适应性训练:水迷宫被划分为4个虚拟象限,其中逃生平台被定位在第三象限内并高于水面1 cm,使用加热棒,让水温保持在(22±2)℃。将小鼠分别从4个象限的入水点面朝池壁放入水中,每次60 s,让其自由游泳以适应水迷宫的实验环境。定位航行实验:实验前,加水直到没过逃生平台1 cm左右的位置,在水中加入适量的无毒黑色墨水排除对小鼠的视觉干扰,搅拌均匀,以隐去平台为度。检测并记录小鼠

逃避潜伏期,即小鼠入水后找到并停留在平台上超过5 s的时间。训练安排:每天训练至少3个不同象限,持续5 d,每次60 s,使用Smart轨迹追踪系统记录小鼠抵达平台所需的时间。若小鼠在60 s内未能寻找到平台,则将其逃避潜伏期设定为60 s,并随后进行15 s的引导。实验第7天移除逃生平台进行空间探索测试,同时详细记录相关数据。定位航行和空间探索实验数据分别按当天不同象限训练结果的平均值进行计算。

2.4 旷场实验 将小鼠置于一个无顶盖的正方体塑料旷场实验箱中(长、宽、高均为40 cm),在实验箱的中心区域设定一个虚拟的“中央分析区”。用Smart轨迹追踪系统记录小鼠运动轨迹,整个观察时段持续5 min。为确保实验结果的准确性,避免小鼠残留的粪便及尿液对后续实验的潜在影响,每完成1只小鼠的测试后,用75%乙醇对旷场实验箱进行清洁。

2.5 HE染色观察海马神经元病理改变 小鼠经麻醉确认无意识后进行心脏灌流,取全脑固定于4%多聚甲醛中24 h后制成石蜡切片。切片经HE染色、脱水和透明后,用中性树胶封片。用光学显微镜初步观察海马CA1、CA3和齿状回(DG)区神经元结构形态,用数字病理切片扫描仪Slide Scan扫描切片,用Slide Viewer阅片软件观察小鼠海马组织病理形态学改变。

2.6 尼氏染色观察海马神经元损伤情况 尼氏染色是利用特定的染料将神经元中的尼氏体染成蓝色,便于准确计算神经元数量变化。将按上述步骤准备好的切片脱蜡并水化后,滴加尼氏染色液,蒸馏水冲洗,70%乙醇稍分化。最后梯度脱水、透明和封片固定。封片干燥后,用光学显微镜初步观察海马CA1、CA3和DG区神经元结构形态,用数字病理切片扫描仪Slide Scan扫描切片,用Slide Viewer阅片软件观察小鼠海马组织病理形态学改变。尼氏染色中用Image-Pro Plus 6.0软件对海马CA1、CA3和DG区神经元计数,计算单位视野内神经元数量=神经元的数量/视野面积,纵坐标数值为各实验组单位视野内神经元数目/空白组单位视野内神经元数均值×100%。

2.7 免疫荧光检测Aβ₁₋₄₂表达量 将脑组织切片脱蜡至水,随后采用微波辐射法进行抗原修复。牛血清白蛋白(BSA)封闭30 min,一抗Aβ₁₋₄₂按照说明书规范(1:200)进行稀释,4℃下孵育过夜,二抗(1:500)孵育1 h,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)

染液后孵育 10 min,孵育全程避光。在 200 倍荧光显微镜下观察海马 CA1、CA3 和 DG 区的 $A\beta_{1-42}$ 表达(阳性表达显示为绿色)并采集图像。

2.8 免疫组化法检测 p-Tau 表达量 从石蜡包埋好的脑组织中切取冠状切片(5 μm 厚),在沸水中煮 8 min 后自然降温至室温,并用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次。用 3% H_2O_2 处理 10 min 以阻断内源性过氧化物酶活性,并在室温下避光孵育 30 min,冲洗后加入封闭液继续孵育。加入 p-Tau 一抗(1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。洗涤后加入二抗于室温孵育 1 h。再次洗涤后添加 DBA 显色剂并在显微镜下观察颜色变化,用双蒸水停止显色反应。在 200 倍光学显微镜下观察海马 CA1、CA3 和 DG 区的 p-Tau 表达及分布。

2.9 透射电镜观察海马超微结构 每组取 3 个标本,麻醉后,将海马组织在冰上分离出来并切割为立方小块。以 2.5% 戊二醛溶液初步固定后用 1% 四氧化锇溶液继续固定,不同浓度乙醇脱水后用环氧树脂 Epon812 包埋。厚度为 1~2 μm 的切片经过甲苯胺蓝染色后进行光学定位,使用透射电镜观察海马神经元和突触的超微结构。

2.10 生化试剂盒检测海马中 ACh 和 AChE 含量 小鼠经麻醉后在冰上迅速分离出海马并将其称质量,用于检测 ACh 和 AChE 的海马组织分别按照 1:9 加入 ACh 试剂盒中的试剂六提取液和生理盐水进行匀浆,测定各组海马组织匀浆液蛋白浓度,用酶标仪读取各组吸光度 A ,按照说明书计算 ACh 含量和 AChE 活力。

2.11 生化试剂盒检测海马中 SOD、MDA、CAT、LDH 水平 取小鼠海马组织,严格遵循 SOD、MDA、CAT 和 LDH 试剂盒说明书进行相关反应检测,使用酶标仪分别于 450、532、405 及 440 nm 波长处测定 A ,计算 SOD、MDA、CAT 和 LDH 的含量变化。

2.12 Real-time PCR 检测海马中 Keap1、Nrf2、HO-1 mRNA 表达 使用 TRIzol 一步法从小鼠海马中提取总 RNA 并测定 RNA 浓度。使用 Premier 引物设计软件设计和筛选每个基因的特异性引物并遵循试剂盒指南进行基因组 DNA 的去除和 cDNA 合成,随后进行 Real-time PCR 扩增反应。逆转录条件 37 $^{\circ}\text{C}$, 15 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保持,引物合成厂家为金斯瑞生物科技有限公司。2^{- $\Delta\Delta\text{C}_t$} 法计算 mRNA 相对表达水平。引物序列见表 1。

2.13 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马中 Keap1、Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达 遵循试剂说

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 CACGATGGAGGGGCCGACTCATC	240
	下游 TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	
Keap1	上游 CAAGGACTACCTGGTGCAGA	128
	下游 TGAGCGACTGTGCGAAGTAA	
Nrf2	上游 CAGTGCTCCTATGCGTGAA	109
	下游 GCGGCTTGAATGTTTGTCT	
HO-1	上游 CCTCACTGGCAGGAAATCA	217
	下游 TCGGGAAGGTAAAAAAGC	

明书提取各组海马组织蛋白并进行蛋白定量法(BCA)定量。取适量样品后实施凝胶电泳操作,采用湿转法转膜,封闭。一抗包括 Keap1(1:1 000)、Nrf2(1:1 000)、HO-1(1:5 000)及 NQO1(1:1 000),孵育过夜及洗膜后孵育二抗(1:5 000),采用超敏化学发光显影法对条带进行扫描后,利用 Image J 软件对目标条带进行定量灰度分析。

2.14 空白血清及四君子汤含药血清的制备 将人参(去芦头)、白术、茯苓、炙甘草按 3:3:3:2 混合,加入 10 倍量水浸泡 30 min 后,进行 30 min 回流提取,过滤后药渣再用 8 倍量水重复提取 2 次,合并 3 次提取液并浓缩为低、中、高 3 个质量浓度(0.147、0.293、0.550 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。选取 50 只 SD 大鼠,20 只为空白血清组,其余 30 只随机分为四君子汤低、中、高剂量组(每组 10 只)。大鼠适应性喂养 1 周后,四君子汤含药血清低、中、高剂量组按 1.485、2.970、5.940 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量灌胃 1 周,空白血清组则灌胃等量蒸馏水。在第 7 天灌胃给药 30 min 后采集血清,经离心、过滤后分装,标记并储存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱以备后续实验。

2.15 检测不同体积分数空白及含药血清对 PC12 细胞活性的影响 将细胞悬液调整至 1×10^5 个/mL 后,接种至 96 孔培养板,每孔 200 μL 。细胞培养 24 h 后,吸尽培养液,根据分组依次加入不同体积分数的血清(均用 1640 基础培养液稀释):其中空白血清组分别加入 5%、10%、15% 和 20% 的空白血清,依据空白血清活性检测结果,排除体积分数为 20% 的血清,故含药血清组分别加入 5%、10%、15% 的四君子汤低、中、高剂量含药血清。另各孔板均设空白组及空白调零孔(加 1640 培养液 200 μL)。作用 24 h 后,吸尽孔中溶液,加入 10% CCK-8 溶液 200 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,用酶标仪在 450 nm 处测

定 A 。细胞存活率计算公式为细胞活力 = $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})$ 。

2.16 检测不同浓度的 H_2O_2 对 PC12 细胞活性的影响 将细胞悬液调整至 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板, 每孔 200 μL 。细胞培养 24 h 后, 更换培养基, 将 H_2O_2 用培养液稀释为 50、100、150、200、250、300、350、400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的终浓度, 作用 24 h。24 h 后取出 96 孔板, 每孔加入 10% CCK-8 溶液 200 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min 后, 用酶标仪在 450 nm 处测定 A , 计算细胞存活率, 以确定 H_2O_2 的半数抑制浓度 (IC_{50})。

2.17 检测四君子汤含药血清对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的保护作用 设空白组 (不含药物和细胞)、空白组 (含细胞, 15% 空白血清)、 H_2O_2 模型组 (15% 空白血清) 及四君子汤低、中、高剂量组, 每组 6 个重复孔。按 2.15 项与 2.16 项铺板步骤种板细胞。当细胞达 80% 融合后, 吸除原液, 给药组加 15% 含药血清 (低、中、高剂量) 200 μL , 空白组和模型组加 15% 空白血清 200 μL , 孵育 24 h。随后, 模型组和给药组加 150 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 (1640 培养液稀释) 损伤 24 h, 空白组加 200 μL 1640 培养液。损伤 24 h 后吸弃旧液, 每孔加 10% CCK-8 溶液 200 μL , 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, 酶标仪 450 nm 测 A , 计算存活率。

2.18 流式细胞术检测 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的凋亡情况 将 5×10^5 个/mL PC12 细胞接种于 6 孔板, 每孔进行四君子汤含药血清预处理及 H_2O_2 诱导凋亡 24 h 后, 收集旧培养液至标记离心管以回收未贴壁细胞。每孔加入无 EDTA 胰酶 500 μL 消化, 用收集的细胞悬液终止反应并吹打收集细胞, 转移至离心管。以 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 用预冷 PBS 清洗并二次离心, 弃上清后加入 1 $\times$ Binding buffer 100 μL 重悬细胞。依次加入 Annexin V-FITC 5 μL 和碘化丙

锭 (PI) 染料 5 μL , 轻轻混匀, 用锡纸包裹, 室温避光孵育 15~20 min。孵育后加入 1 $\times$ Binding buffer 400 μL 混匀, 轻柔操作以避免机械损伤。立即用流式细胞仪检测, 1 h 内完成所有样本的测量。

2.19 Western blot 检测 PC12 细胞中 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达 遵循试剂说明书提取各组细胞蛋白并进行 BCA 定量。取适量样品后实施凝胶电泳操作, 采用湿转法转膜, 封闭。一抗 Keap1、Nrf2 和 HO-1 (稀释比例均为 1:1 000) 孵育过夜及洗膜后孵育二抗, 采用超敏化学发光显影法对条带进行扫描, 利用 Image J 软件对目标条带进行定量灰度分析。

2.20 统计学分析 采用 SPSS 26.0 软件进行数据统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间两两比较, 用单因素方差分析和 Tamhane's T_2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 四君子汤对 AD 小鼠学习记忆能力的影响 在 Morris 水迷宫实验中, 与空白组比较, 模型组小鼠从第 3 天起找到平台所需时间显著延长 ($P < 0.01$), 而在目标象限停留时间及穿越平台的次数均减少 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 给药组小鼠找到平台所需时间日渐减少 ($P < 0.05, P < 0.01$), 目标象限停留时间显著增加 ($P < 0.01$), 同时四君子汤高剂量组小鼠穿越平台次数明显增多 ($P < 0.05$)。见表 2、表 3。在旷场实验中, 模型组小鼠中央区运动距离和中心区停留时间明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较, 四君子汤组小鼠中央区运动距离明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$), 四君子汤中、高剂量组小鼠中央区停留时间显著增加 ($P < 0.01$)。见表 3。表明四君子汤可能改善 AD 小鼠的学习记忆能力。见增强出版附加材料。

表 2 四君子汤对 AD 小鼠逃避潜伏期时间的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Si Junzitang on escape latency of each group of AD mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
空白组		51.21 $\pm$ 4.99	44.15 $\pm$ 4.94	27.68 $\pm$ 4.73	19.72 $\pm$ 7.14	22.14 $\pm$ 2.88
模型组		53.24 $\pm$ 3.51	52.33 $\pm$ 4.51	50.32 $\pm$ 3.34 ²⁾	48.87 $\pm$ 4.45 ²⁾	45.76 $\pm$ 9.83 ²⁾
四君子汤低剂量组	2.145	48.93 $\pm$ 5.01	45.32 $\pm$ 7.25	37.68 $\pm$ 8.72	35.86 $\pm$ 4.52 ³⁾	27.77 $\pm$ 3.89 ⁴⁾
四君子汤中剂量组	4.29	51.03 $\pm$ 5.97	44.27 $\pm$ 3.74	33.03 $\pm$ 6.35 ³⁾	26.58 $\pm$ 7.98 ⁴⁾	24.35 $\pm$ 2.06 ⁴⁾
四君子汤高剂量组	8.58	50.90 $\pm$ 7.11	36.81 $\pm$ 3.73 ³⁾	30.02 $\pm$ 4.28 ⁴⁾	26.94 $\pm$ 4.17 ⁴⁾	23.96 $\pm$ 4.54 ⁴⁾
阳性药组	0.65 $\times 10^{-3}$	50.96 $\pm$ 5.94	34.80 $\pm$ 4.58 ⁴⁾	34.60 $\pm$ 8.91 ³⁾	28.67 $\pm$ 4.56 ⁴⁾	22.11 $\pm$ 3.33 ⁴⁾

注: 与空白组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较 ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3-表 10、表 14-表 16 同)

3.2 四君子汤对 AD 小鼠海马病理改变的影响 HE 和尼氏染色显示, 空白组海马 CA1、CA3 和 DG 区神经元排列紧密, 数量众多, 且形态保持完

好, 结构清晰可辨。胞质内部尼氏小体丰富, 排列有序, 染色均匀一致。模型组海马各个区域可见数量不等的神经元坏死。神经元的细胞核明显固缩

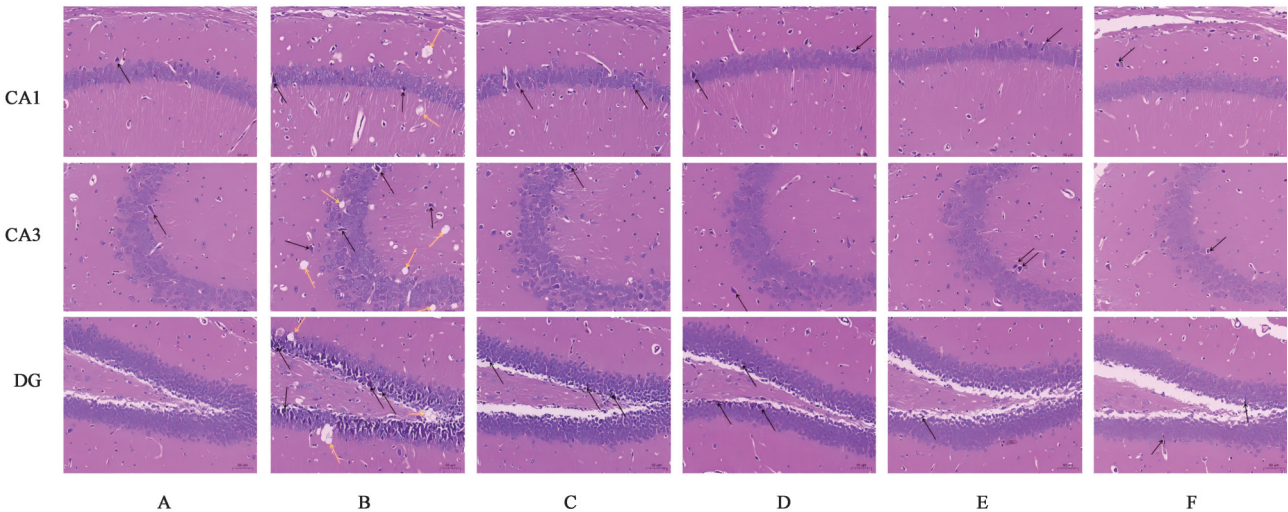
表 3 四君子汤对 AD 小鼠空间探索期和旷场实验的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Si Junzhitang on spatial exploration phase and OFT in AD mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	目标象限停留时间/s	穿台次数/次	中央区运动距离/cm	中央区停留时间/s
空白组		19.66±1.88	6.50±1.88	910.29±178.70	22.87±11.41
模型组		8.11±1.85 ²⁾	2.18±0.72 ²⁾	589.57±52.69 ¹⁾	4.69±1.93 ²⁾
四君子汤低剂量组	2.145	15.57±1.51 ⁴⁾	3.90±0.39	879.32±294.29 ³⁾	13.57±4.28
四君子汤中剂量组	4.29	17.25±1.47 ⁴⁾	5.33±1.35	934.74±172.06 ³⁾	20.84±7.08 ⁴⁾
四君子汤高剂量组	8.58	18.31±1.08 ⁴⁾	5.93±2.28 ³⁾	980.39±186.78 ⁴⁾	21.94±5.99 ⁴⁾
阳性药组	0.65×10 ⁻³	17.90±1.72 ⁴⁾	6.03±2.03 ³⁾	934.55±242.29 ³⁾	19.80±8.59 ⁴⁾

深染,嗜碱性增强。胞质缺损,胞核胞质界限不清晰,细胞排列紊乱,间质内可见形状不规则的空泡。尼氏小体数量显著减少($P<0.01$),尤以 DG 区最为明显。而与模型组比较,给药组则表现出神经元排

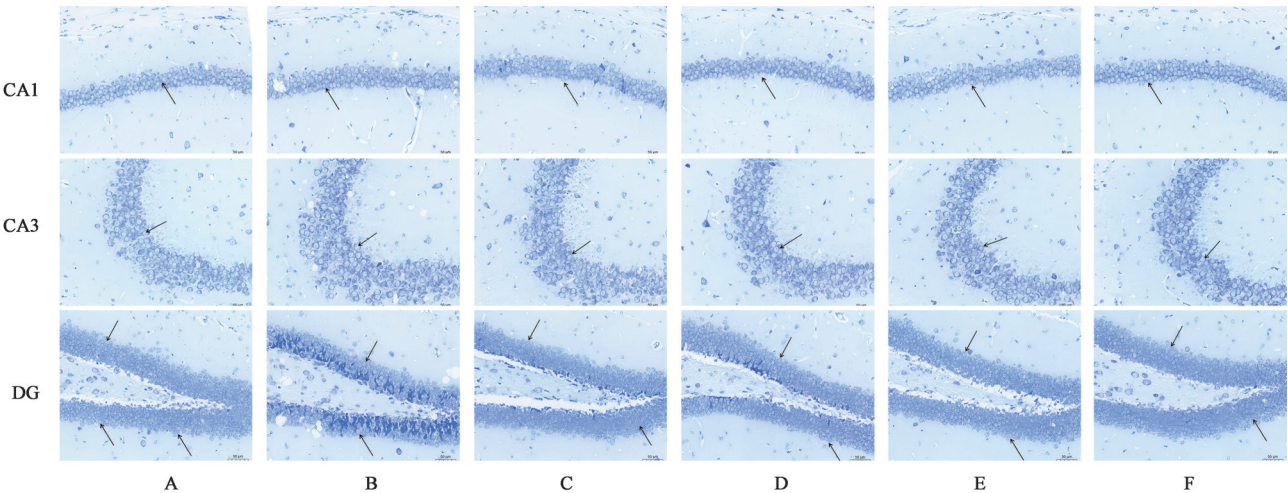
列较为规整,神经元坏死及空泡现象减少,细胞形态与结构相对完整,尼氏小体数量有所增加($P<0.05, P<0.01$)。见图 1、图 2 与表 4。以上结果表明四君子汤可能减轻 AD 小鼠海马区病理损伤。



注:A.空白组;B.模型组;C.四君子汤低剂量组;D.四君子汤中剂量组;E.四君子汤高剂量组;F.阳性药组(图 2-图 10 同);图中黑色箭头所指为神经元细胞核异常;黄色箭头所指为神经元间质空泡化

图 1 四君子汤对 AD 小鼠海马形态学的影响 (HE, ×40)

Fig. 1 Effect of Si Junzhitang on morphology of hippocampus in AD mice (HE, ×40)



注:图中黑色箭头所指为尼氏体

图 2 四君子汤对 AD 小鼠海马神经元数目的影响 (尼氏染色, ×40)

Fig. 2 Effect of Si Junzhitang on number of hippocampal neurons in AD mice (Nissl staining, ×40)

表4 四君子汤对AD小鼠海马神经元数目的影响(尼氏染色)
($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Si Junzitang on number of hippocampal neurons in AD mice (Nissl staining) ($\bar{x}\pm s, n=3$) %

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	CA1	CA3	DG
空白组		99.01±4.52	100.19±1.96	101.29±6.03
模型组		69.82±3.29 ²⁾	65.74±3.18 ²⁾	62.60±6.48 ²⁾
四君子汤低剂量组	2.145	75.54±1.81	69.27±1.48	73.88±5.99 ³⁾
四君子汤中剂量组	4.29	80.67±2.08 ³⁾	82.31±4.55 ⁴⁾	82.42±6.60 ⁴⁾
四君子汤高剂量组	8.58	87.77±3.36 ⁴⁾	88.83±1.12 ⁴⁾	85.27±8.53 ⁴⁾
阳性药组	0.65×10 ⁻³	83.43±4.14 ⁴⁾	88.64±1.41 ⁴⁾	86.10±7.92 ⁴⁾

3.3 四君子汤对AD小鼠海马Aβ₁₋₄₂蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组海马组织中Aβ₁₋₄₂的荧光强度显著升高($P<0.01$);与模型组比较,阳性药组和四君子汤各剂量组Aβ₁₋₄₂荧光强度均有所降低($P<0.05, P<0.01$)。见表5、图3。以上结果表明四君子汤可能通过减少Aβ₁₋₄₂的沉积从而改善AD。

表5 四君子汤对AD小鼠海马Aβ₁₋₄₂表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 5 Effect of Si Junzitang on expression of Aβ₁₋₄₂ in hippocampus of AD mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CA1	CA3	DG
空白组		12.96±0.42	13.13±0.31	12.75±0.39
模型组		17.05±0.93 ²⁾	17.47±0.34 ²⁾	19.70±1.84 ²⁾
四君子汤低剂量组	2.145	15.87±0.37	16.65±0.20	16.36±0.49
四君子汤中剂量组	4.29	15.58±0.85	15.00±0.73	15.52±0.30
四君子汤高剂量组	8.58	15.00±0.62 ³⁾	14.12±0.52 ³⁾	14.39±0.61 ³⁾
阳性药组	0.65×10 ⁻³	13.75±0.56 ⁴⁾	13.99±1.43 ⁴⁾	14.50±0.58 ⁴⁾

3.4 四君子汤对AD小鼠海马p-Tau蛋白的影响 p-Tau主要在海马区表达,表现为浅黄或棕黄色颗粒。空白组小鼠海马组织中p-Tau表达几乎未被检测到,而模型组和给药组海马组织CA1、CA3和DG区均可见不同程度的棕色p-Tau阳性表达。与空白组比较,模型组海马内p-Tau阳性细胞数量显著增加($P<0.01$),形成神经纤维缠结;与模型组比较,阳性药组和四君子汤高剂量组小鼠海马内p-Tau阳性细胞数量明显减少($P<0.05, P<0.01$),且各给药组间无显著性差异。见表6、图4。以上结果表明四君子汤可能通过减少Tau蛋白的磷酸化从而改善AD。

3.5 四君子汤对海马神经元和突触超微结构的影响 空白组神经元形态完整,胞质内细胞器丰富,

突触结构清晰,囊泡明显。模型组神经元胞质不均匀,核膜多处凹陷且局部模糊断裂,线粒体受损,突触结构模糊,突触间隙出现偶联,囊泡减少。各给药组神经元胞质局部空旷,细胞器相对保持完整,突触结构较为清晰,囊泡数量有所增加,病变减轻。以上结果表明四君子汤可能通过减轻海马区神经元损伤,修复突触功能结构从而改善AD。见图5、图6。

3.6 四君子汤对AD小鼠海马ACh、AChE水平的影响 与空白组比较,模型组海马组织中的ACh含量显著降低($P<0.01$),AChE活力显著增高($P<0.01$);与模型组比较,四君子汤中、高剂量组和阳性药组ACh水平明显升高($P<0.05, P<0.01$),AChE活性显著降低($P<0.01$)。以上结果表明四君子汤可能通过调节中枢神经递质ACh来改善AD小鼠的认知记忆功能。见表7。

3.7 四君子汤对AD小鼠海马中SOD、MDA、CAT、LDH水平的影响 与空白组比较,模型组小鼠海马中SOD、CAT活性显著下降($P<0.01$),而MDA含量、LDH活力显著上升($P<0.01$);与模型组比较,四君子汤中、高剂量组和阳性药组小鼠SOD、CAT活性明显增加($P<0.05, P<0.01$),MDA、LDH水平明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表8。表明四君子汤可以降低AD小鼠脑内的脂质过氧化水平,增强抗氧化活性从而改善AD。

3.8 四君子汤对AD小鼠Keap1、Nrf2和HO-1 mRNA表达的影响 Real-time PCR结果显示,与空白组比较,模型组中Nrf2和HO-1的mRNA表达水平显著下降($P<0.01$),Keap1的mRNA表达水平显著上升($P<0.01$);与模型组比较,四君子汤中、高剂量和阳性药组Nrf2、HO-1的mRNA表达水平显著提高($P<0.01$),Keap1的mRNA表达水平显著降低($P<0.01$)。见表9。以上结果表明四君子汤可能在基因层面上对Keap1/Nrf2/HO-1信号通路具有调控作用。

3.9 四君子汤对AD小鼠Keap1、Nrf2、HO-1和NQO1蛋白表达的影响 Western blot分析显示,与空白组比较,模型组中Nrf2、HO-1和NQO1蛋白表达水平显著下降($P<0.01$),Keap1的蛋白表达水平显著上升($P<0.01$);与模型组比较,四君子汤中、高剂量和阳性药组Nrf2、HO-1和NQO1蛋白表达水平明显提高($P<0.05, P<0.01$),四君子汤高剂量和阳性药组Keap1蛋白表达水平明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表10和图7。以上结果表明四君子汤可

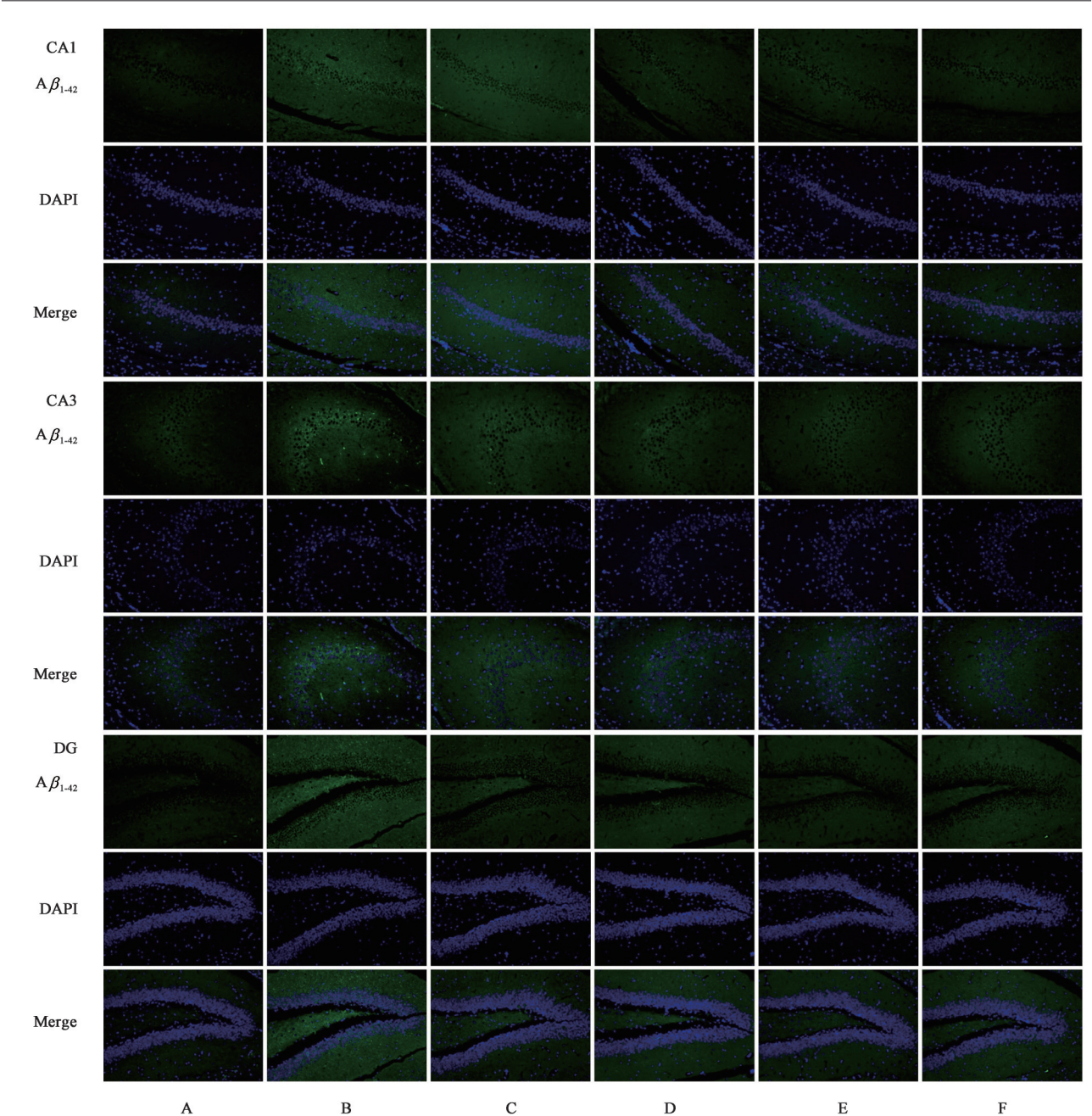


图 3 四君子汤对 AD 小鼠海马 $A\beta_{1-42}$ 表达的影响(免疫荧光, $\times 200$)
Fig. 3 Effect of Si Junzitang on $A\beta_{1-42}$ expression in AD mice (IF, $\times 200$)

表 6 四君子汤对 AD 小鼠海马 p-Tau 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 6 Effect of Si Junzitang on expression of p-Tau in hippocampus of AD mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CA1	CA3	DG
空白组		0.145 5 $\pm$ 0.001 9	0.144 4 $\pm$ 0.001 7	0.144 8 $\pm$ 0.001 8
模型组		0.189 8 $\pm$ 0.018 4 ²⁾	0.204 7 $\pm$ 0.024 3 ²⁾	0.189 9 $\pm$ 0.014 6 ²⁾
四君子汤低剂量组	2.145	0.168 4 $\pm$ 0.002 7	0.169 8 $\pm$ 0.002 4	0.168 3 $\pm$ 0.003 8
四君子汤中剂量组	4.29	0.162 7 $\pm$ 0.003 3	0.165 3 $\pm$ 0.002 0	0.163 6 $\pm$ 0.007 6
四君子汤高剂量组	8.58	0.156 5 $\pm$ 0.003 3 ³⁾	0.158 9 $\pm$ 0.011 3 ³⁾	0.152 6 $\pm$ 0.004 0 ³⁾
阳性药组	0.65 $\times 10^{-3}$	0.152 3 $\pm$ 0.000 4 ⁴⁾	0.153 8 $\pm$ 0.012 1 ⁴⁾	0.150 6 $\pm$ 0.002 5 ⁴⁾

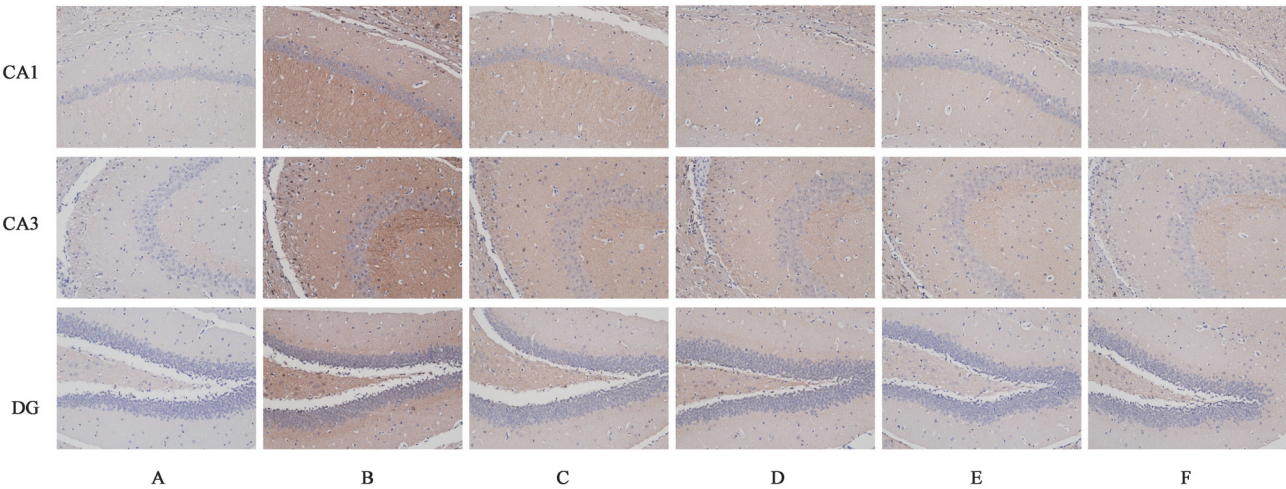
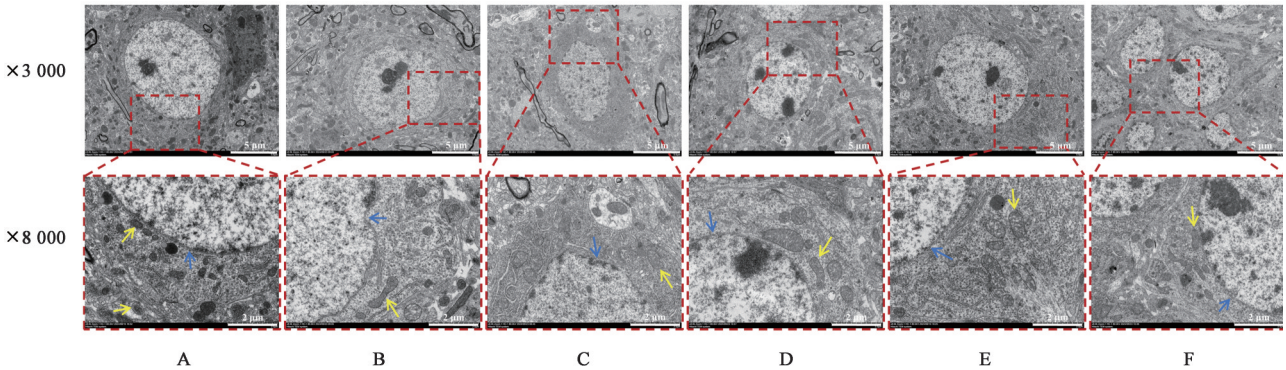
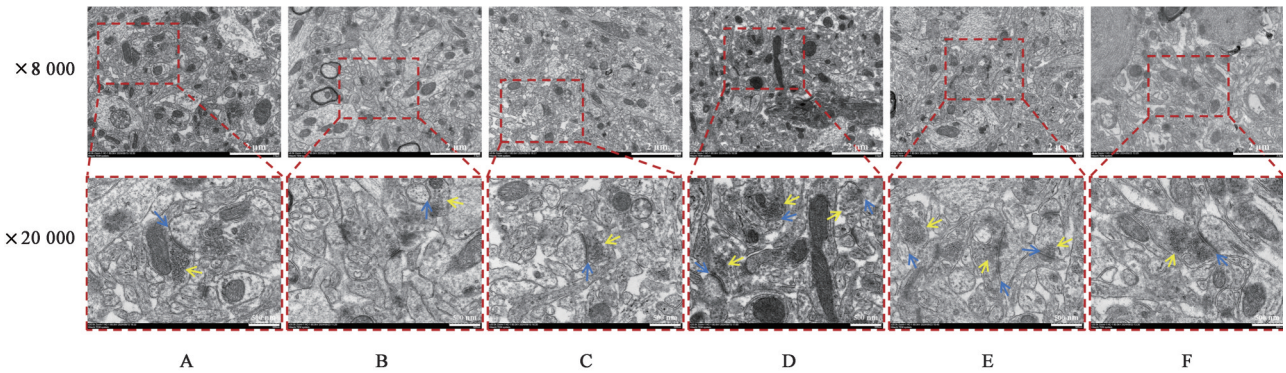


图4 四君子汤对AD小鼠海马p-Tau表达的影响(免疫组化,×200)
Fig. 4 Effect of Si Junzitang on p-Tau expression in AD mice (IHC,×200)



注:图中蓝色箭头为神经元的核膜;黄色箭头为线粒体
图5 四君子汤对AD小鼠海马神经元超微结构的影响(TEM)
Fig. 5 Effect of Si Junzitang on ultrastructure of hippocampal neurons in AD mice (TEM)



注:图中蓝色箭头为突触间隙,黄色箭头为突触囊泡
图6 四君子汤对AD小鼠海马突触超微结构的影响(TEM)
Fig. 6 Effect of Si Junzitang on ultrastructure of hippocampal synapses in AD mice (TEM)

能调控 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路增强小鼠的抗氧化能力,发挥其神经保护作用。

3.10 不同体积分数的空白血清对PC12细胞活性的影响 结果表明,5%、10%、15%空白血清组的细胞活性与空白组比较差异无统计学意义,而20%的

空白血清组的细胞存活率显著升高($P<0.01$)。见表11。因此后续实验在选取给药浓度时排除体积分数为20%的血清浓度。

3.11 四君子汤含药血清和H₂O₂干预PC12细胞的最佳浓度 CCK-8实验结果表明体积分数为15%

表7 四君子汤对AD小鼠海马中ACh、AChE表达水平的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Si Junzitang on expression levels of ACh and AChE in AD mice hippocampus ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ACh含量 /mg·g ⁻¹	AChE活力 /U·mg ⁻¹
空白组		101.60±11.06	0.31±0.10
模型组		72.46±7.39 ²⁾	0.78±0.08 ²⁾
四君子汤低剂量组	2.145	87.79±9.25	0.38±0.05 ⁴⁾
四君子汤中剂量组	4.29	91.03±8.20 ³⁾	0.36±0.11 ⁴⁾
四君子汤高剂量组	8.58	97.79±10.30 ⁴⁾	0.34±0.03 ⁴⁾
阳性药组	0.65×10 ⁻³	97.93±11.80 ⁴⁾	0.31±0.06 ⁴⁾

的四君子汤含药血清对PC12细胞活力影响最佳,

表8 四君子汤对AD小鼠海马中SOD、CAT、MDA、LDH表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of Si Junzitang on expression levels of SOD, CAT, MDA and LDH in AD mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD活力/U·mg ⁻¹	CAT活力/U·mg ⁻¹	MDA含量/μmol·g ⁻¹	LDH活力/U·g ⁻¹
空白组		51.57±12.73	6.30±0.77	9.58±3.04	8 152.29±1 517.92
模型组		23.04±4.03 ²⁾	2.27±0.20 ²⁾	18.80±4.08 ²⁾	14 531.94±1 418.19 ²⁾
四君子汤低剂量组	2.145	34.41±3.54	3.96±0.50 ⁴⁾	12.98±2.68 ⁴⁾	11 807.55±1 693.50 ³⁾
四君子汤中剂量组	4.29	35.77±4.55 ³⁾	4.22±0.36 ⁴⁾	12.72±0.89 ⁴⁾	11 231.47±944.24 ⁴⁾
四君子汤高剂量组	8.58	43.66±6.93 ⁴⁾	4.35±0.49 ⁴⁾	11.04±1.46 ⁴⁾	10 362.92±491.52 ⁴⁾
阳性药组	0.65×10 ⁻³	36.47±4.11 ³⁾	4.04±0.51 ⁴⁾	9.60±1.83 ⁴⁾	8 374.69±927.22 ⁴⁾

表9 四君子汤对AD小鼠海马中Keap1、Nrf2和HO-1 mRNA表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Effect of Si Junzitang on expression levels of Keap1, Nrf2 and HO-1 mRNA in AD mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Keap1	Nrf2	HO-1
空白组		0.96±0.06	0.97±0.04	1.02±0.02
模型组		7.59±0.73 ²⁾	0.06±0.01 ²⁾	0.05±0.01 ²⁾
四君子汤低剂量组	2.145	4.98±0.32 ⁴⁾	0.14±0.01	0.10±0.01 ³⁾
四君子汤中剂量组	4.29	4.23±0.31 ⁴⁾	0.25±0.03 ⁴⁾	0.16±0.01 ⁴⁾
四君子汤高剂量组	8.58	3.97±0.17 ⁴⁾	0.52±0.06 ⁴⁾	0.20±0.02 ⁴⁾
阳性药组	0.65×10 ⁻³	2.14±0.18 ⁴⁾	0.72±0.05 ⁴⁾	0.62±0.03 ⁴⁾

表10 四君子汤对AD小鼠海马Keap1/Nrf2/HO-1通路蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Effect of Si Junzitang on protein expression of Keap1/Nrf2/HO-1 pathway in hippocampus of AD mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Keap1/β-actin	Nrf2/β-actin	HO-1/β-actin	NQO1/β-actin
空白组		0.25±0.01	1.11±0.17	1.18±0.20	1.25±0.13
模型组		1.40±0.19 ²⁾	0.08±0.01 ²⁾	0.13±0.04 ²⁾	0.19±0.10 ²⁾
四君子汤低剂量组	2.145	1.13±0.20	0.22±0.07	0.47±0.15	0.51±0.18 ³⁾
四君子汤中剂量组	4.29	1.00±0.25	0.44±0.08 ³⁾	0.61±0.15 ³⁾	0.72±0.08 ⁴⁾
四君子汤高剂量组	8.58	0.81±0.20 ³⁾	0.66±0.15 ⁴⁾	0.82±0.11 ⁴⁾	0.92±0.11 ⁴⁾
阳性药组	0.65×10 ⁻³	0.54±0.07 ⁴⁾	0.85±0.20 ⁴⁾	0.99±0.10 ⁴⁾	1.05±0.09 ³⁾

3.13 四君子汤含药血清对H₂O₂诱导的PC12细胞凋亡率的影响 与空白组比较,模型组细胞总凋亡

而150 μmol·L⁻¹的H₂O₂在24 h作用下可使PC12细胞存活率接近半数且适合检测含药血清的保护作用,差异具有统计学意义($P<0.01$)。因此,后续实验选择体积分数为15%的含药血清和150 μmol·L⁻¹的H₂O₂作为干预条件,见表12、表13。

3.12 四君子汤含药血清对H₂O₂诱导的PC12细胞的保护作用 CCK-8实验结果显示,与空白组比较,模型组细胞存活率显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,四君子汤含药血清低、中、高剂量组细胞存活率明显提高,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),呈剂量依赖性。见表14。这表明四君子汤含药血清对H₂O₂诱导的PC12细胞具有保护作用。

率显著上升($P<0.01$),表明H₂O₂具有显著的凋亡诱导作用。与模型组比较,经四君子汤中、高剂量含

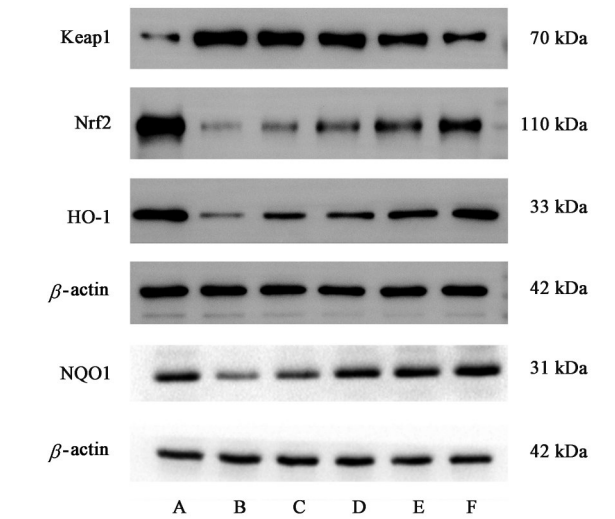


图7 AD小鼠海马Keap1/Nrf2/HO-1通路蛋白表达电泳
Fig. 7 Electrophoresis of protein expression of Keap1/Nrf2/HO-1 pathway in hippocampus of AD mice

表11 不同体积分数空白血清对细胞活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 11 Effect of different volume fractions of blank serum on cell viability ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	体积 分数/%	A	细胞存活率/%
空白组		0.117 1±0.012 3	—
空白血清组	0	1.582 1±0.044 6	100.00±0.00
5%空白血清组	5	1.675 7±0.065 7	105.36±4.73
10%空白血清组	10	1.668 8±0.034 0	105.87±2.01
15%空白血清组	15	1.621 3±0.092 2	101.89±5.95
20%空白血清组	20	1.753 6±0.076 3	110.53±5.47 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表12和表13同)

表12 不同体积分数含药血清对细胞活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 12 Effect of different volume fractions of Si Junzitang containing serum on cell viability ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	体积 分数/%	A	细胞存活率/%
空白组		0.090 0±0.004 5	—
空白血清组	0	0.612 5±0.036 2	100.00±0.00
含药血清低剂量组	5	0.718 0±0.042 0	120.34±5.81 ²⁾
	10	0.743 8±0.046 4	125.22±5.64 ²⁾
	15	0.763 6±0.060 0	128.91±7.00 ²⁾
含药血清中剂量组	5	0.721 0±0.039 0	120.89±3.98 ²⁾
	10	0.752 2±0.062 9	126.88±10.51 ²⁾
	15	0.784 3±0.044 6	133.20±8.95 ²⁾
含药血清高剂量组	5	0.808 3±0.032 9	137.72± 5.60 ²⁾
	10	0.875 7±0.050 7	150.46±3.53 ²⁾
	15	0.879 3±0.028 4	151.41±6.49 ²⁾

表13 不同浓度的H₂O₂对细胞活性的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 13 Effect of different concentrations of H₂O₂ on cell viability ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	细胞存活率/%
空白组		0.103 2±0.002 6	—
空白血清组		1.129 2±0.078 7	100.00±0.00
H ₂ O ₂ 组	50	1.123 9±0.114 0	87.87±9.82 ²⁾
	100	1.082 5±0.096 5	84.31±8.31 ²⁾
	150	0.821 0±0.118 2	57.88±3.82 ²⁾
	200	0.615 6±0.051 5	44.11±4.44 ²⁾
	250	0.450 8±0.035 5	29.91±3.06 ²⁾
	300	0.398 0±0.044 9	25.37±3.86 ²⁾
	350	0.330 4±0.034 7	19.55±2.99 ²⁾
	400	0.301 1±0.025 2	17.02±2.17 ²⁾

表14 四君子汤含药血清对H₂O₂诱导的PC12细胞的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 14 Effect of Si Junzitang-containing serum on H₂O₂-induced damage in PC12 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	A	细胞存活率/%
空白组		0.095 5±0.001 9	—
空白血清组		1.317 5±0.160 7	100.00±0.00
模型组		0.780 1±0.065 0	56.40±4.56 ²⁾
四君子汤低剂量组	1.485	0.923 5±0.137 5	67.59±5.38 ³⁾
四君子汤中剂量组	2.97	0.933 1±0.071 1	69.16±6.97 ³⁾
四君子汤高剂量组	5.94	0.964 8±0.074 9	71.98±9.39 ⁴⁾

药血清预处理的细胞早期凋亡率和总凋亡率显著降低($P<0.01$),这表明四君子汤含药血清对H₂O₂诱导的凋亡具有保护作用,且这种作用可能随剂量增加而增强。见表15、增强出版附加材料。

3.14 四君子汤含药血清对PC12细胞Keap1/Nrf2/HO-1蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组中Nrf2和HO-1蛋白水平显著下降($P<0.01$),Keap1的蛋白水平显著上升($P<0.01$);与模型组比较,四君子汤中、高剂量组中Nrf2和HO-1蛋白水平明显提高($P<0.05, P<0.01$),四君子汤高剂量组Keap1蛋白水平明显降低($P<0.05$),见表16、图8。以上结果表明四君子汤可能通过调控Keap1/Nrf2/HO-1通路减轻H₂O₂诱导的PC12细胞的氧化损伤,发挥其神经保护作用。

4 讨论

AD属中医“痴呆”“健忘”范畴,其病机与脾肾两虚密切相关。《素问·灵兰秘典论》云:“脾胃者,仓

表 15 四君子汤含药血清对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞凋亡率的影响 (x̄±s, n=3)

Table 15 Effect of Si Junzitang containing serum on apoptosis rate of H₂O₂-induced PC12 cells (x̄±s, n=3) %

组别	剂量/g·kg ⁻¹	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
空白组		3.18±0.99	0.95±0.58	4.13±1.08
模型组		29.79±6.48 ²⁾	4.41±3.65	34.20±8.66 ²⁾
四君子汤 低剂量组	1.485	22.65±4.21	2.09±1.83	24.73±5.83
四君子汤 中剂量组	2.97	13.65±4.29 ⁴⁾	1.51±1.14	15.15±5.39 ⁴⁾
四君子汤 高剂量组	5.94	6.92±2.27 ⁴⁾	0.96±0.22	7.87±2.20 ⁴⁾

表 16 四君子汤含药血清对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞 Keap1、Nrf2、HO-1 蛋白表达的影响 (x̄±s, n=3)

Table 16 Effect of Si Junzitang containing serum on Keap1, Nrf2, HO-1 protein expression of H₂O₂-induced PC12 cells (x̄±s, n=3)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Keap1 /β-actin	Nrf2 /β-actin	HO-1 /β-actin
空白组		0.25±0.01	1.11±0.17	1.18±0.20
模型组		1.40±0.19 ²⁾	0.08±0.01 ²⁾	0.13±0.04 ²⁾
四君子汤 低剂量组	1.485	1.13±0.20	0.22±0.07	0.47±0.15
四君子汤 中剂量组	2.970	1.00±0.25	0.44±0.08 ³⁾	0.61±0.15 ³⁾
四君子汤高 剂量组	5.940	0.81±0.20 ³⁾	0.66±0.15 ⁴⁾	0.82±0.11 ⁴⁾

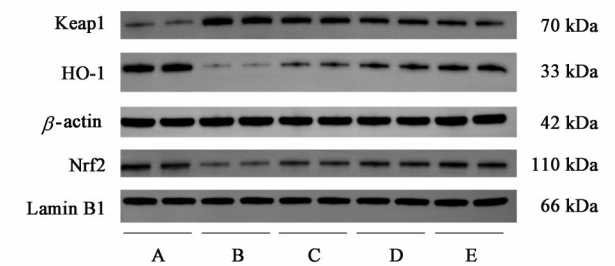


图 8 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞 Keap1/Nrf2/HO-1 通路蛋白表达电泳
Fig. 8 Electrophoresis of Keap1/Nrf2/HO-1 protein expression of H₂O₂-induced PC12 cells

廩之官,五味出焉”,强调脾为后天之本,主运化水谷精微以充养脑髓。《灵枢·天年》曰:“五十岁,肝气始衰,目始不明;六十岁,心气始衰,苦忧悲;七十岁,脾气虚,皮肤枯”,明确指出脾虚为衰老核心病机。脾失健运则气血生化乏源,先天肾精失于濡养,终致髓海空虚、神机失用,发为痴呆。而现代医学亦证实,人体生理功能的下降主要表现新陈代谢功能衰退,体内氧自由基堆积产生氧化损伤从而导

致衰老,因此脾虚与氧化应激等 AD 病理过程密切相关,为“从脾论治”AD 提供了理论依据。四君子汤为补气健脾经典方剂,方中人参为君,大补元气;白术为臣,健脾燥湿;茯苓为佐,渗湿益脾;甘草为使,调和诸药。针对 AD 脾虚核心病机,本方通过恢复脾之运化功能,使水谷精微上输于脑,改善脑髓失养状态,从而改善 AD 的发生。

现代药理学研究证实,氧化应激在认知功能障碍和 AD 的发病中起着重要作用^[27-28]。有研究发现在 AD 患者的大脑、血浆和红细胞中观察到氧化应激标志物^[29-31]。这些结果表明,AD 的进展可能与氧化还原失衡有关。当体内氧化还原平衡被破坏时,SOD 和 CAT 水平降低,MDA 和 LDH 水平增加,导致神经元损伤和记忆功能障碍^[32-33]。同时,Keap1/Nrf2/HO-1 信号轴是维持细胞氧化还原稳态的关键途径,Nrf2 作为抗氧化系统中的主要调控者,可以通过调节下游多种抗氧化蛋白的表达来维持细胞氧化还原稳态^[34-35]。

本研究通过体内外实验系统验证了四君子汤对 AD 模型的神经保护作用。在 SCOP 诱导 AD 小鼠模型中,四君子汤干预显著改善空间记忆能力,降低海马 Aβ₁₋₄₂ 沉积及 p-Tau 蛋白表达,同时调节胆碱能系统平衡。体外 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞实验进一步证实,四君子汤含药血清可提高细胞存活率,降低凋亡率。本研究同样表明四君子汤具有抗氧化作用,在四君子汤组 AD 模型中 SOD 和 CAT 的水平提高,MDA 和 LDH 的水平降低,且经 Real-time PCR 和 Western blot 验证发现与 Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路的激活显著相关。

综上所述,本研究揭示了四君子汤通过调控 Keap1/Nrf2/HO-1 通路改善 AD 的分子机制,为健脾中药在防治 AD 的临床应用中提供了一定的理论支持,但仍存在局限:①未探讨肠道菌群-脾-脑轴等潜在作用途径;②临床转化需进一步验证不同证型 AD 患者的疗效差异;③未来研究可结合代谢组学与单细胞测序技术,系统阐明健脾法干预 AD 的多维调控网络。④本团队将进一步深入研究四君子汤在 SD 大鼠和 KM 小鼠体内的药物代谢动力学过程,包括对更多药物成分的定量分析、代谢产物的鉴定及药物代谢酶和转运蛋白的表达和活性等方面的研究。这将有助于我们更全面地了解四君子汤在不同动物体内的吸收、代谢和排泄差异,从而更准确地评估其在不同实验模型中的应用价值和结果可比性。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPERTO M, et al. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397 (10284): 1577-1590.
- [2] ANONYMOUS. 2024 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2024, 20(5):3708-3821.
- [3] MANCUSO C, SANTANGELO R. Alzheimer's disease and gut microbiota modifications: The long way between preclinical studies and clinical evidence [J]. *Pharmacol Res*, 2018, 129:329-336.
- [4] LIU P P, XIE Y, MENG X Y, et al. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4:29.
- [5] LENG F, EDISON P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: Where do we go from here? [J]. *Nat Rev Neurol*, 2021, 17(3):157-172.
- [6] CHOI G Y, KIM H B, HWANG E S, et al. Naringin enhances long-term potentiation and recovers learning and memory deficits of amyloid-beta induced Alzheimer's disease-like behavioral rat model [J]. *Neurotoxicology*, 2023, 95:35-45.
- [7] NADIGA A, SUMAN, KRISHNA K L. A novel zebrafish model of Alzheimer's disease by aluminium chloride; involving nitro-oxidative stress, neuroinflammation and cholinergic pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 965:176332.
- [8] SUN Y, HUANG J, CHEN Y, et al. Direct inhibition of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction as a potential therapeutic strategy for Alzheimer's disease [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 103:104172.
- [9] CUADRADO A, ROJO A I, WELLS G, et al. Therapeutic targeting of the Nrf2 and KEAP1 partnership in chronic diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(4):295-317.
- [10] CHENG M, YUAN C, JU Y, et al. Quercetin attenuates oxidative stress and apoptosis in brain tissue of APP/PS1 double transgenic AD mice by regulating Keap1/Nrf2/HO-1 pathway to improve cognitive impairment [J]. *Behav Neurol*, 2024, 2024:5698119.
- [11] 郭少博, 朱文慧, 白宇, 等. 冰菖散通过 Nrf2/HO-1 信号通路改善 APP/PS1 阿尔茨海默病小鼠铁死亡及认知功能障碍的研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2024, 40(6):598-607.
- GUO S B, ZHU W H, BAI Y, et al. Bingchang powder ameliorates ferroptosis and cognitive dysfunction via the Nrf2/HO-1 signaling pathway in APP/PS1 Alzheimer's disease mice [J]. *J Nanjing Univ Chin Med*, 2024, 40(6):598-607.
- [12] SONG C, CHU Z, DAI J, et al. Water extract of moschus alleviates erastin-induced ferroptosis by regulating the Keap1/Nrf2 pathway in HT22 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 326:117937.
- [13] WU G D, LI Z H, LI X, et al. microRNA-592 blockade inhibits oxidative stress injury in Alzheimer's disease astrocytes via the KIAA0319-mediated Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway [J]. *Exp Neurol*, 2020, 324:113128.
- [14] DING M R, QU Y J, HU B, et al. Signal pathways in the treatment of Alzheimer's disease with traditional Chinese medicine [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 152:113208.
- [15] 李慧敏, 贺凯, 郑慧, 等. 中医药健脾的保健作用机制及药食资源 [J]. *中草药*, 2020, 51(3):780-787.
- LI H M, HE K, ZHENG H, et al. Health-care mechanism and medicine and food resources of invigorating spleen in traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(3):780-787.
- [16] LI J, HUANG Q, CHEN J, et al. Neuroprotective potentials of Panax ginseng against Alzheimer's disease: A review of preclinical and clinical evidences [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:688490.
- [17] KIM H J, JUNG S W, KIM S Y, et al. Panax ginseng as an adjuvant treatment for Alzheimer's disease [J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42(4):401-411.
- [18] YAN X, CHEN X, FU C, et al. Ginseng oligosaccharides protect neurons from glutamate-induced oxidative damage through the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Food Funct*, 2022, 13(16):8605-8615.
- [19] ZHAI Y, LIU B, WU L, et al. Pachymic acid prevents neuronal cell damage induced by hypoxia/reoxygenation via miR-155/Nrf2/HO-1 axis [J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2022, 82(2):197-206.
- [20] CHEN F, LIN W. Anti-apoptosis effects of codonolactone on cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Investig Med*, 2022, 70(5):1265-1272.
- [21] ZHOU B, WANG H, ZHANG B, et al. Licochalcone B attenuates neuronal injury through anti-oxidant effect and enhancement of Nrf2 pathway in MCAO rat model of stroke [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 100:108073.
- [22] 蔡可珍, 郑琴, 朱徐东, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学与实验验证探讨四君子汤治疗阿尔茨海默病的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(6):1620-1631.
- CAI K Z, ZHENG Q, ZHU X D, et al. Mechanism of Sijunzi tang in treatment of Alzheimer's disease based on UPLC-Q-TOF-MS, network pharmacology and experimental verification [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2023, 48(6):1620-1631.
- [23] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002:920.
- XU S Y, BIAN R L, CHEN X, et al. Pharmacological experimental methodology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002:920.
- [24] 何丽玲, 龙清华, 胡慧, 等. 基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨大补元煎促进 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病小鼠海马神经发生的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(7):8-14.
- HE L L, LONG Q H, HU H, et al. Mechanism of Dabuyuan jian in promoting neurogenesis of hippocampus in APP/PS1 double transgenic dementia mice based on Wnt/ β -catenin

- signaling pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 26(7): 8-14.
- [25] CHOI G Y, LEE I S, MOON E, et al. Ameliorative effect of vanillic acid against scopolamine-induced learning and memory impairment in rat via attenuation of oxidative stress and dysfunctional synaptic plasticity [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 177: 117000.
- [26] ZHAO Y, HE C, HU S, et al. Anti-oxidative stress and cognitive improvement of a semi-synthetic isoorientin-based GSK-3 β inhibitor in rat pheochromocytoma cell PC12 and scopolamine-induced AD model mice via Akt/GSK-3 β /Nrf2 pathway[J]. Exp Neurol, 2024, 380: 114881.
- [27] KOWALCZYK J, KURACH Ł, BOGUSZEWSKA-CZUBARA A, et al. Bergapten improves scopolamine-induced memory impairment in mice via cholinergic and antioxidative mechanisms[J]. Front Neurosci, 2020, 14: 730.
- [28] EMOKPAE O, BEN-AZU B, AJAYI A M, et al. *D*-ribose-*L*-cysteine enhances memory task, attenuates oxidative stress and acetyl-cholinesterase activity in scopolamine amnesic mice[J]. Drug Dev Res, 2020, 81(5): 620-627.
- [29] YOUSSEF P, CHAMI B, LIM J, et al. Evidence supporting oxidative stress in a moderately affected area of the brain in Alzheimer's disease[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 11553.
- [30] COLLIN F, CHEIGNON C, HUREAU C. Oxidative stress as a biomarker for Alzheimer's disease[J]. Biomark Med, 2018, 12(3): 201-203.
- [31] AHMAD S, YANG W, ORELLANA A, et al. Association of oxidative stress and inflammatory metabolites with Alzheimer's disease cerebrospinal fluid biomarkers in mild cognitive impairment [J]. Alzheimers Res Ther, 2024, 16(1): 171.
- [32] IONESCU-TUCKER A, COTMAN C W. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2021, 107: 86-95.
- [33] XU Y M, WANG X C, XU T T, et al. Kai Xin San ameliorates scopolamine-induced cognitive dysfunction[J]. Neural Regen Res, 2019, 14(5): 794-804.
- [34] YAMAMOTO M, KENSLER T W, MOTOHASHI H. The KEAP1-NRF2 system: A Thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis[J]. Physiol Rev, 2018, 98(3): 1169-1203.
- [35] 张健, 李全, 周妍妍. 中药调控 Nrf2 通路防治阿尔茨海默病的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(9): 219-227.
- ZHANG J, LI Q, ZHOU Y Y. Research progress on prevention and treatment of Alzheimer's disease via Nrf2 pathway regulation by traditional Chinese medicine[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(9): 219-227.

[责任编辑 顾雪竹]