

开心散对 APP/PS1 小鼠学习记忆能力和突触功能的机制

许玉珉¹, 沈晓明¹, 兰瑞¹, 朱世瑞¹, 张杰¹, 路芳梅², 王保奇^{2*}, 马云枝^{1*}

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000;

2. 河南中医药大学, 郑州 450000)

[摘要] 目的:探讨开心散对 APP/PS1 小鼠学习记忆和突触功能的潜在保护机制。方法:将 60 只 APP/PS1 小鼠随机分为模型组,多奈哌齐(2 mg·kg⁻¹·d⁻¹)组,开心散低、中、高剂量(0.7, 1.4, 2.8 g·kg⁻¹·d⁻¹)组,同月龄同窝野生型小鼠为正常组,每组 12 只。连续灌胃给药 2 个月后进行 Morris 水迷宫实验。采用透射电镜观察海马神经元超微结构。采用比色法检测血清乙酰胆碱(ACh),乙酰胆碱转移酶(ChAT),乙酰胆碱酯酶(AChE)含量和海马活性氧(ROS),丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real time-PCR)检测海马脑源性神经营养因子(BDNF), β -神经生长因子(NGFB),discs 大同源物(DLG)2,DLG4,突触素(SYP)mRNA 的表达。结果:与正常组比较,模型组小鼠逃避潜伏期明显延长,穿越平台次数,目标象限停留时间显著减少($P<0.01$),线粒体数量明显减少,形态各异,排列不规则,部分线粒体明显肿胀,变形,线粒体嵴断裂,胞浆溶解,呈空泡状,细胞碎片较多,血清 ACh,ChAT 含量显著降低,AChE 水平显著升高($P<0.01$),海马 ROS,MDA 明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),SOD,GSH-Px 显著下降($P<0.01$),海马 BDNF,NGFB,DLG2,DLG4,SYP mRNA 水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,多奈哌齐组和开心散中、高剂量组逃避潜伏期明显缩短,穿越平台次数明显增加,目标象限停留时间明显延长($P<0.05$, $P<0.01$),线粒体损伤改善,形态规则,多呈椭圆形,线粒体肿胀、变形减少,线粒体嵴清晰,血清 ACh,ChAT 水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),AChE 活性明显下降($P<0.05$),海马 ROS 水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),MDA 水平明显降低($P<0.05$),SOD,GSH-Px 活性明显增加,海马 BDNF,NGFB,DLG2,DLG4,SYP mRNA 水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),开心散低剂量组目标象限停留时间明显延长,海马 SYP mRNA 水平明显增加($P<0.05$),各组间的游泳速度比较,差异无统计学意义。结论:开心散通过提高突触可塑性相关蛋白表达、减轻海马神经元超微结构损伤、抗氧化应激、调节胆碱能神经递质,改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力,从而发挥神经保护作用。

[关键词] 开心散;阿尔茨海默病;突触可塑性相关蛋白;氧化应激;胆碱能神经递质;学习记忆能力

[中图分类号] R2-0;R743;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)20-0015-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212036

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210819.1126.001.html>

[网络出版日期] 2021-08-19 13:30

Mechanism of Kaixinsan on Learning and Memory Ability and Synaptic Function of APP/PS1 Mice

XU Yu-min¹, SHEN Xiao-ming¹, LAN Rui¹, ZHU Shi-rui¹, ZHANG Jie¹,

LU Fang-mei², WANG Bao-qi^{2*}, MA Yun-zhi^{1*}

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China;

2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the underlying protective mechanism of Kaixinsan on learning, memory, and synaptic function in APP/PS1 mice. **Method:** Sixty APP/PS1 mice were randomly divided into a model group, a donepezil (2 mg·kg⁻¹·d⁻¹) group, and low- (0.7 g·kg⁻¹·d⁻¹), medium- (1.4 g·kg⁻¹·d⁻¹), and

[收稿日期] 20210622(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81904265);河南省科技攻关项目(192102310166);河南省中医药科学研究专项(2019JDZX2017)

[第一作者] 许玉珉,博士,主治医师,从事中医药防治脑病的研究,Tel:0371-66231832,E-mail: xuyumin6688@163.com

[通信作者] * 马云枝,主任医师,从事中医药防治脑病的研究,Tel:0371-66231832,E-mail: mayunzhi6688@163.com;

* 王保奇,博士,副教授,从事中医药防治脑病的研究,Tel:0371-65945879,E-mail: wangbqi@126.com

high-dose ($2.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) Kaixinsan groups, and the wild-type mice of the same age in the same litter were assigned to the normal group, with 12 mice in each group. After continuous intragastric administration for two months, the Morris water maze experiment was performed. The ultrastructure of hippocampal neurons was observed by transmission electron microscopy. The colorimetric assay was used to detect serum content of acetylcholine (ACh), choline acetyltransferase (ChAT), acetylcholinesterase (AChE), and levels of hippocampal reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px). Real-time fluorescence-based quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression of hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF), beta-nerve growth factor (NGFB), discs large homolog (DLG)2, DLG4, and synaptophysin (SYP). **Result:** Compared with the normal group, the model group showed prolonged escape latency, reduced number of crossing platforms, shortened stay in the target quadrant ($P<0.01$), decreased number of mitochondria with different shapes and irregular arrangement, some swollen and deformed mitochondria with broken mitochondrial cristae, endolysis, and cytoplasm vacuole, and more cell debris. Additionally, the model group also displayed reduced serum levels of ACh and ChAT, increased AChE ($P<0.01$), elevated hippocampal ROS and MDA ($P<0.05, P<0.01$), declining SOD and GSH-Px ($P<0.01$), and diminished hippocampal BDNF, NGFB, DLG2, DLG4, and SYP mRNA levels ($P<0.05, P<0.01$). Compared with the model group, the donepezil group, and the medium- and high-dose Kaixinsan groups showed shortened escape latency, increased number of crossing platforms, prolonged stay in the target quadrant ($P<0.05, P<0.01$), improved mitochondrial damage with a regular shape (mainly oval shape), relieved mitochondrial swelling and deformation, and clear mitochondrial cristae. Furthermore, the donepezil group, and the medium- and high-dose Kaixinsan groups also exhibited increased serum ACh and ChAT levels ($P<0.05, P<0.01$), blunted AChE activity ($P<0.05$), reduced hippocampal ROS level ($P<0.05, P<0.01$), declining MDA level ($P<0.05$), potentiated SOD and GSH-Px activities, and up-regulated hippocampal BDNF, NGFB, DLG2, DLG4, and SYP mRNA levels ($P<0.05, P<0.01$). In the low-dose Kaixinsan group, the stay time in the target quadrant was prolonged and the expression of hippocampal SYP mRNA was elevated significantly ($P<0.05$). There was no statistical difference in swimming speed between the groups. **Conclusion:** Kaixinsan can improve the learning and memory ability of APP/PS1 mice by increasing the expression of synaptic plasticity-related proteins, reducing the ultrastructural damage to hippocampal neurons, resisting oxidative stress, and regulating cholinergic neurotransmitters, thereby exerting neuroprotective effects.

[Keywords] Kaixinsan; Alzheimer's disease; synaptic plasticity-related proteins; oxidative stress; cholinergic neurotransmitter; learning and memory ability

阿尔茨海默病(AD)是继心脏病、脑卒中、肿瘤、慢性阻塞性肺疾病之后严重威胁老年人健康的重大疾病^[1]。根据《世界阿尔茨海默病2018年报告》显示,全球AD患者约有5千万,我国65岁以上的老年人群中AD患病率高达3.21%^[2-3]。近年来,围绕 β 淀粉样蛋白($A\beta$)为靶点的新药研发陆续以失败告终^[4]。因此,探索AD的发病机制,寻求有效的防治手段,对改善患者生活质量、减轻家庭及社会负担具有重要的现实意义。

线粒体功能障碍、突触数目减少、神经元损伤是AD认知障碍重要的神经病理学基础^[5]。 $A\beta$ 引起线粒体结构损伤及功能下降,导致神经元能量代谢

障碍。同时, $A\beta$ 诱导突触可塑性抑制,AD相关的突触数量减少,突触可塑性相关蛋白如突触素(SYP),突触后致密物-95(PSD-95),脑源性神经营养因子(BDNF)水平降低,突触间隙增大,突触结构模糊不清,突触效能下降,是学习记忆障碍的重要因素,其损伤程度与AD认知障碍呈正相关^[6-9]。另外, $A\beta$ 在聚集过程中引起氧自由基生成过多,抗氧化酶活性下降,蛋白质、脂质过氧化,影响线粒体功能,进而诱导神经元突触丢失^[10-12]。因此,通过改善线粒体及突触功能,减轻神经元损伤,将是防治AD的有效措施。

近年来,中药及有效成分通过调节突触功能、

保护线粒体、发挥抗AD作用逐步得到验证^[13-15]。开心散出自唐代孙思邈《备急千金要方·卷十四》，由人参、茯苓、石菖蒲、远志组成，具有化痰开窍，健脾宁心，益智安神的功效，主要用于治疗抑郁、痴呆、焦虑、失眠等病证^[16]。研究发现，开心散促进突触前膜突触蛋白1(SYN1)磷酸化^[17]、增加皮质及海马区PSD-95阳性蛋白表达，促进长时程增强，增加突触可塑性，减轻海马神经元凋亡^[18]。开心散通过调节Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Kcap-1)/核因子E₂相关因子2(Nrf2)/锰超氧化物歧化酶(MnSOD)信号通路，缓解A β_{1-42} 诱导的AD大鼠认知障碍^[19]。课题组前期运用网络药理学预测开心散治疗AD的有效活性成分和潜在作用靶点及通路，并证实开心散可减轻东莨菪碱诱导的学习记忆障碍、减轻神经炎症^[20-21]。目前，开心散提高学习能力、改善神经突触功能在APP/PS1动物模型方面的研究较少，其潜在的保护机制尚不明确。因此，本研究拟运用APP/PS1小鼠作为AD动物模型，探讨开心散对APP/PS1小鼠的神经突触保护作用及潜在机制，以期为AD的治疗提供新的理论依据。

1 材料

1.1 动物 72只8月龄SPF级雄性APP/PS1双转基因小鼠、同窝野生型小鼠均购自广东省医学实验动物中心，体质量(28±2)g，动物合格证号SCXK(粤)2018-0002。动物饲养于河南中医药大学动物实验中心SPF动物实验室，温度23~25℃，相对湿度50%~60%，单笼饲养，自由获取食物和水。动物实验方案经河南中医药大学实验动物伦理委员会批准，批准号DWLL202003147。

1.2 药物与试剂 开心散由人参片(吉林/禹州市凯旋药业有限公司，批号190802)，茯苓(安徽/安国市远光药业有限公司，批号045200303)，石菖蒲(湖南/安国润德药业有限公司，批号C20053007)，远志(山西/安国市远光药业有限公司，批号494191101)组成，所有中药饮片均购于河南省顺康仓储服务有限公司，经河南中医药大学第一附属医院中药房赵娅主管药师鉴定均为正品，符合2020年版《中华人民共和国药典》规范；多奈哌齐片(卫材药业有限公司，批号2012045)购于河南中医药大学第一附属医院；活性氧(ROS)，丙二醛(MDA)，超氧化物歧化酶(SOD)，谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)，乙酰胆碱(ACh)，乙酰胆碱转移酶(ChAT)，乙酰胆碱酯酶(AChE)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司，批号分别为20201015，20201017，

20201016，20201014，20201016，20201016，20201017)；总RNA提取试剂盒，逆转录试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司，批号分别为DP425，ER107-02]；SYBR Green PCR Master Mix(美国Thermo Fisher Scientific公司，批号4309155)。

1.3 仪器 WMT-100型Morris水迷宫视频分析系统(成都泰盟科技有限公司)；Microfuge 20 R型冷冻离心机，DU640型紫外分光光度计(美国Beckman公司)；LEICA EG1150 ST5020型自动包埋机，LEICA RM 2265型全自动轮转切片机(德国Leica公司)；Multiskan GO型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)；SW-CJ-ZF型超净工作台(苏州苏洁净化设备有限公司)；272007028型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Applied biosystems公司)；日立H-7650型透射电子显微镜(日本Hitachi公司)。

2 方法

2.1 开心散的制备 参照文献制备方法^[20,22]，开心散由人参片、茯苓、石菖蒲、远志组成，按照3:3:2:2比例投料，石菖蒲加6倍药材量的水加热回流提取8h，收取挥发油后药渣备用；人参以60%乙醇加热回流提取2次，合并提取液过滤备用，人参药渣备用；石菖蒲和人参片药渣与茯苓、远志合药共煎1h，合煎滤液与人参提取液合并，旋转蒸发器减压浓缩，浓缩至含生药量为1g·mL⁻¹溶液，最后将石菖蒲挥发油加入混匀，置于4℃冰箱保存备用。

2.2 分组和给药 将72只小鼠随机分为6组，每组12只：正常组，模型组，多奈哌齐组和开心散低、中、高剂量组。正常组和模型组给予等体积生理盐水灌胃，开心散低、中、高剂量组分别灌胃0.7, 1.4, 2.8 g·kg⁻¹·d⁻¹，多奈哌齐组灌胃2 mg·kg⁻¹·d⁻¹^[23]，连续给药2个月(60d)。

2.3 Morris水迷宫实验 给药结束后进行Morris水迷宫实验，参照文献的实施方法及步骤^[24]。实验内容包括适应性训练、定位航行和空间探索，共进行7d。第1天为适应性训练，练习小鼠站台。第2~6天进行定位航行，以小鼠入水后找到逃生平台所花费的实际时间(即逃避潜伏期)为观察指标，若60s内未找到平台则记录为60s。第7天撤去站台，记录60s内小鼠在原站台所在象限(即第四象限)停留的具体时间、穿越原站台位置的次数及平均游泳速度。

2.4 透射电镜观察APP/PS1小鼠海马神经元超微结构 将小鼠脑切片用0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液

(PBS)冲洗3次,1%锇酸固定(2 h,4 °C),用上述缓冲液洗3次,梯度乙醇和丙酮脱水,环氧树脂 Epon 812包埋,聚合,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅染色,60 V透射电镜下观察拍照并记录。

2.5 比色法检测血清 ACh, AChE, ChAT 含量 将血清以 4 °C, 12 000 r·min⁻¹离心 10 min(离心半径 12 cm,下同),取上清,采用比色法检测血清中 ACh, AChE, ChAT 的含量,检测步骤参照试剂盒说明书。

2.6 比色法检测小鼠海马 ROS, MDA, SOD, GSH-Px 含量 将小鼠海马称质量后于冰上匀浆,4 °C, 12 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清,采用比色法检测海马中 ROS, MDA, SOD, GSH-Px 的含量,检测步骤参照试剂盒说明书。

2.7 Real-time PCR 检测小鼠海马 BDNF, β -神经生长因子(NGFB), discs 大同源物(DLG) 2, DLG4, SYP mRNA 表达 将海马组织加入 TRIzol 1 mL,冰上充分研磨匀浆,离心取上清液,加入三氯甲烷充分混匀后静置,将上清液转移至新的离心管内,加入异丙醇混匀后沉淀,离心 10 min 后管底的白色沉淀即为 RNA,抽吸去除液体,加入 75%乙醇洗涤,离心后将液体抽吸干净,置于超净台上吹 3 min,加入无酶水 15 μ L 溶解 RNA,55 °C 孵育 5 min,用逆转录试剂盒将总 mRNA 逆转录为 cDNA,使用 SYBR Green PCR Master Mix 进行 PCR 扩增,稀释探针及相应引物,依次加入每管中,用 Real-time PCR 仪 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 10 s,反应共进行 40 个循环,记录结果。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,BDNF, NGFB, DLG2, DLG4, SYP 引物由生工生物工程(上

海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

| 引物 | 序列(5'-3') | 长度/bp |
|-------|--------------------------|-------|
| BDNF | 上游 TTATTCATACTTCGGTTGC | 20 |
| | 下游 ATGGGATTACACTTGGTCTC | |
| NGFB | 上游 GGAGCGCATCGAGTTTTGG | 19 |
| | 下游 CCTCACTGCGGCCAGTATAG | |
| DLG2 | 上游 ATGGGAGTTAAAAGGCTGGCT | 21 |
| | 下游 CGATTCCATTCACCGACAAGA | |
| DLG4 | 上游 AGCCCCAGGATATGTGAACG | 20 |
| | 下游 TCACCGATGTGTGGGTTGTC | |
| SYP | 上游 AGTACCCATTCAGGCTGCAC | 20 |
| | 下游 CCGAGGAGGAGTAGTACCA | |
| GAPDH | 上游 AGAGCTACGAGCTGCCTGAC | 20 |
| | 下游 AGCACTGTGTTGGCGTACAG | |

2.8 统计学分析 实验数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 APP/PS1 小鼠逃避潜伏期、穿越平台次数、目标象限停留时间及游泳速度的影响 与正常组比较,模型组小鼠逃避潜伏期明显延长,穿越平台次数显著减少,目标象限停留时间显著缩短($P<0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组和开心散中、高剂量组可明显缩短 APP/PS1 小鼠的逃避潜伏期、增加穿越平台次数、延长目标象限停留时间($P<0.05, P<0.01$),开心散低剂量组可明显延长目标象限停留时间($P<0.05$),各组间的游泳速度比较,差异无统计学差异。见表 2。

表 2 开心散对 APP/PS1 小鼠逃避潜伏期、穿越平台次数、目标象限停留时间及游泳速度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 2 Effect of Kaixinsan on APP/PS1 mice's escape latency, number of crossing platforms, residence time in target quadrant and swimming speed ($\bar{x}\pm s, n=12$)

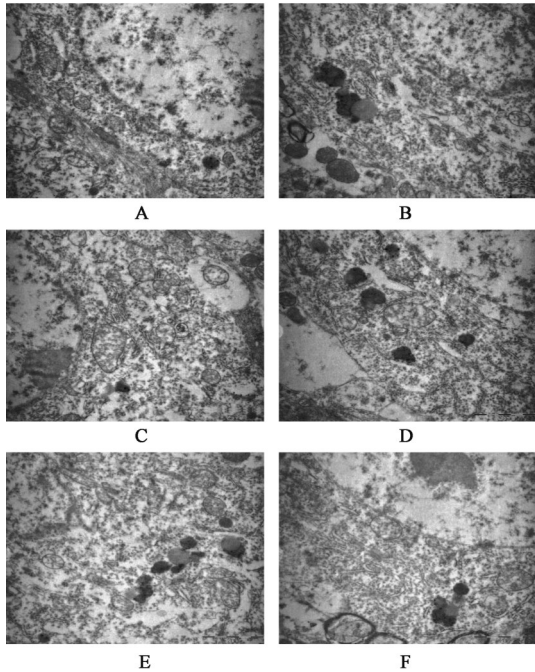
| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 逃避潜伏期/s | 穿越平台次数/次 | 目标象限停留时间/s | 游泳速度/cm·s ⁻¹ |
|------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 正常 | | 34.87±1.79 | 14.12±3.61 | 48.98±7.31 | 12.57±3.89 |
| 模型 | | 48.02±1.27 ²⁾ | 4.34±1.62 ²⁾ | 14.74±7.11 ²⁾ | 14.89±6.72 |
| 多奈哌齐 | 2×10 ⁻³ | 34.55±1.94 ⁴⁾ | 11.39±4.33 ⁴⁾ | 44.34±8.91 ⁴⁾ | 14.66±8.33 |
| 开心散 | 0.7 | 44.79±1.34 | 5.34±2.66 | 21.84±8.11 ³⁾ | 15.57±9.14 |
| | 1.4 | 40.55±1.68 ⁴⁾ | 7.84±4.11 ³⁾ | 29.12±4.35 ⁴⁾ | 15.80±7.35 |
| | 2.8 | 36.57±1.80 ⁴⁾ | 11.09±5.36 ⁴⁾ | 37.49±7.88 ⁴⁾ | 14.22±9.17 |

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表 3~5 同)。

3.2 对 APP/PS1 小鼠海马神经元超微结构的影响 透射电镜下可见,与正常组比较,模型组线粒体

数量明显减少,形态各异,排列不规则,部分线粒体明显肿胀、变形,线粒体嵴断裂,胞浆溶解、呈空泡

状,细胞碎片较多。与模型组比较,多奈哌齐组及开心散低、中、高剂量组可减轻线粒体损伤,形态较规则,多呈椭圆形,线粒体肿胀、变形减少,线粒体嵴清晰。见图1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 多奈哌齐组;D. 开心散低剂量组;E. 开心散中剂量组;F. 开心散高剂量组

图1 开心散对APP/PS1小鼠海马神经元超微结构的影响(电镜,×2万)

Fig. 1 Effect of Kaixinsan on ultrastructure of hippocampal neurons in APP/PS1 mice (TEM, ×2万)

3.3 对APP/PS1小鼠血清ACh, AChE, ChAT水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清ACh, ChAT水平明显降低, AChE水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组和开心散中、高剂量组明显升高ACh, ChAT水平($P<0.05, P<0.01$),明显降低AChE的活性($P<0.05$)。见表3。

3.4 对APP/PS1小鼠海马ROS, MDA, SOD, GSH-Px的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马

ROS, MDA明显升高($P<0.05, P<0.01$), SOD, GSH-Px显著下降($P<0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组和开心散高剂量组明显降低ROS, MDA水平($P<0.05, P<0.01$),明显提高SOD, GSH-Px的活性($P<0.05, P<0.01$)。见表4。

3.5 对APP/PS1小鼠海马BDNF, NGFB, DLG2, DLG4, SYP mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组BDNF, NGFB, DLG2, DLG4, SYP mRNA水平明显下降($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组,开心散中、高剂量组各mRNA表达水平明显升高($P<0.05, P<0.01$),开心散低剂量组SYP mRNA水平明显升高($P<0.05$)。见表5。

4 讨论

突触是学习记忆形成与维持的重要形态学基础,是神经元之间相互联系并借以传递信息的关键结构^[23]。突触的超微结构与学习记忆及认知功能关系密切^[24],突触数量减少、突触信息传递功能减慢、突触可塑性相关蛋白表达减少是AD发病的重要因素^[25]。突触可塑性是突触效能长期变化形成记忆的过程, $A\beta$ 沉积可抑制突触可塑性,减少树突棘和突触密度,引起线粒体功能障碍、神经元损伤及突触丢失^[26]。突触可塑性相关蛋白参与调控突触的生长、发育、成熟等过程,其表达异常会引起认知功能受损^[27]。

SYP为轴突末梢的突触前囊泡膜上所特有,参与突触形成、突触囊泡再循环,维持突触功能的一种钙结合酸性糖蛋白^[28],脑内SYP不足或缺乏时会导学习记忆障碍^[29]。PSD-95为突触后膜上的骨架蛋白,由DLG4基因编码产生,参与树突棘形成、突触连接及信号转导,并维持突触可塑性^[30]。 $A\beta$ 可诱导PSD-95蛋白表达水平下调,进而影响突触可塑性^[31]。突触后致密物93(PSD-93)由DLG2基因编码产生,在皮层和海马表达丰富,DLG2基因突变可影响胆碱受体功能,是AD及帕金森病的易感基

表3 开心散对APP/PS1小鼠血清ACh, AChE, ChAT的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Kaixinsan on serum ACh, AChE and ChAT in APP/PS1 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | ACh/mg·L ⁻¹ | AChE/nmol·L ⁻¹ | ChAT/ng·L ⁻¹ |
|------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 正常 | | 74.11±9.44 | 8.41±1.24 | 38.66±5.88 |
| 模型 | | 54.12±11.42 ²⁾ | 15.18±5.82 ²⁾ | 23.41±4.52 ²⁾ |
| 多奈哌齐 | 2×10 ⁻³ | 68.44±7.93 ⁴⁾ | 11.39±4.33 ³⁾ | 35.19±3.93 ⁴⁾ |
| 开心散 | 0.7 | 55.14±7.96 | 14.14±3.59 | 25.99±4.23 |
| | 1.4 | 61.84±7.93 ³⁾ | 12.94±3.12 ³⁾ | 31.74±6.11 ³⁾ |
| | 2.8 | 63.09±10.31 ³⁾ | 11.79±2.88 ³⁾ | 31.89±4.36 ³⁾ |

表4 开心散对 APP/PS1 小鼠海马 ROS,MDA,SOD,GSH-Px 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Kaixinsan on hippocampal ROS, MDA, SOD, GSH-Px in APP/PS1 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | ROS/nmol·min·g ⁻¹ | MDA/μmol·g ⁻¹ | SOD/U·mg ⁻¹ | GSH-Px/U·mg ⁻¹ |
|------|-----------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常 | | 9.18±1.31 | 2.98±0.33 | 99.98±10.71 | 79.48±14.71 |
| 模型 | | 34.11±6.92 ²⁾ | 7.33±2.41 ¹⁾ | 34.84±8.12 ²⁾ | 19.32±7.12 ²⁾ |
| 多奈哌齐 | 2×10 ⁻³ | 11.39±4.33 ⁴⁾ | 4.12±1.21 ³⁾ | 81.19±12.01 ⁴⁾ | 61.22±11.73 ⁴⁾ |
| 开心散 | 0.7 | 28.34±7.11 | 7.09±0.91 | 39.54±9.96 | 25.11±7.32 |
| | 1.4 | 23.84±4.11 ³⁾ | 6.44±1.32 | 51.84±11.41 ³⁾ | 38.15±10.71 ³⁾ |
| | 2.8 | 17.69±4.46 ⁴⁾ | 5.08±1.48 ³⁾ | 74.09±15.96 ⁴⁾ | 51.79±9.36 ⁴⁾ |

表5 开心散对 APP/PS1 小鼠海马 BDNF,NGFB,DLG2,DLG4,SYP mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Kaixinsan on BDNF,NGFB,DLG2,DLG4,SYP mRNA in hippocampus of APP/PS1 mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | BDNF | NGFB | DLG2 | DLG4 | SYP |
|------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 正常 | | 1.00±0.15 | 1.00±0.14 | 1.00±0.19 | 1.00±0.21 | 1.00±0.11 |
| 模型 | | 0.31±0.09 ²⁾ | 0.39±0.19 ¹⁾ | 0.24±0.07 ²⁾ | 0.49±0.11 ¹⁾ | 0.24±0.17 ²⁾ |
| 多奈哌齐 | 2×10 ⁻³ | 0.89±0.13 ³⁾ | 0.92±0.15 ⁴⁾ | 0.89±0.21 ⁴⁾ | 0.92±0.06 ⁴⁾ | 1.05±0.11 ⁴⁾ |
| 开心散 | 0.7 | 0.44±0.16 | 0.44±0.21 | 0.46±0.16 | 0.48±0.06 | 0.56±0.16 ³⁾ |
| | 1.4 | 0.68±0.08 ³⁾ | 0.82±0.09 ³⁾ | 0.64±0.18 ³⁾ | 0.64±0.08 ³⁾ | 0.86±0.14 ⁴⁾ |
| | 2.8 | 0.79±0.17 ³⁾ | 0.93±0.19 ³⁾ | 0.81±0.16 ⁴⁾ | 0.91±0.13 ⁴⁾ | 0.94±0.12 ⁴⁾ |

因^[32]。神经生长因子(NGF)是一种高效多能的神经细胞生长调节因子,包括 α,β,γ 三种亚基,其中仅有 β 亚基具有生物学活性,参与神经元的生长发育、增殖、再生的调控过程^[33]。BDNF是中枢神经系统分布最广泛的神经调节因子,参与了神经元存活、分化及生长发育。相关研究证实,PSD-93,BDNF,NGF,SYP等蛋白表达水平低下,是认知障碍的重要原因^[35-37]。本研究运用APP/PS1双转基因小鼠作为AD动物模型,随着月龄的增长,脑内 $A\beta$ 沉积日渐增多,其诱导的神经元变性、突触丢失、突触可塑性相关蛋白水平下降等,能够较好的模拟AD的发病机制^[34]。本研究结果发现,与正常组比较,模型组线粒体数量明显减少,形态各异,排列不规整,部分线粒体明显肿胀、变形,线粒体嵴断裂,细胞碎片较多,突触可塑性相关蛋白BDNF,NGFB,DLG2,DLG4,SYP mRNA表达明显下降。

AD患者脑内沉积的 $A\beta$ 和高度磷酸化的微管相关蛋白(tau)可诱导氧自由基生成增加、脂质过氧化,产生氧化应激损伤^[38-39]。在神经老化、基因突变和外界环境等多重因素下,脑内氧化应激损伤明显,ROS,MDA产生过多,SOD,GSH-Px抗氧化能力下降,加速AD患者脑内病理产物的形成^[40]。本研究发现,与正常组比较,模型组小鼠海马内ROS,MDA水平明显增高,SOD,GSH-Px活性明显下降,表明脑内氧化应激损伤显著。ACh是学习记忆的

重要神经递质,AChE和ChAT对ACh的含量起调节作用^[41]。AD患者基底前脑胆碱能神经元数目减少,ACh含量下降,是学习记忆力减退、认知功能障碍的重要发病机制^[42]。本研究中发现,模型组小鼠血清ACh,ChAT显著下降,AChE活性显著升高。因此,通过抑制AChE活性,提高突触间隙ACh的含量,是改善AD模型空间学习记忆和认知功能的有效策略^[43]。

祖国医学认为,脾肾阳虚无力运化湿浊,痰浊闭阻心窍则呆傻愚笨,脾肾虚衰,痰浊阻窍为AD病机的关键^[44]。开心散是临床常用的益智健脑基础方,方中人参大补元气,安神益智;茯苓健脾宁心,利水渗湿;石菖蒲化痰醒神开窍;远志宁心安神,祛痰开窍。针对AD本虚标实的病机特点,开心散健脾益气固其本,化痰开窍祛其标,补中有泻,寓泻于补。既往研究发现,开心散所含的活性成分人参皂苷类,多糖类,皂苷类, α -细辛醚和 β -细辛醚等具有神经保护、抗痴呆作用^[45],与课题组前期的研究结果基本一致^[20-21]。本项研究结果证实,给予开心散后各组线粒体损伤减轻,形态较规则,线粒体肿胀、变形较模型组减少,突触可塑性相关指标BDNF,NGFB,DLG2,DLG4,SYP mRNA表达水平增加,提示开心散具有神经突触保护作用。另外开心散各组SOD,GSH-Px,ACh,ChAT提高,ROS,MDA,AChE水平降低,空间学习记忆能力改善,提示开心

散改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力,可能与抗氧化应激,调节胆碱能神经递质有关。开心散低剂量组与模型组比较,虽部分检测指标无统计学差异,但整体呈现逐步改善趋势。开心散可能是治疗 AD 的潜在药物,但由于复方成分复杂,仍需进一步明确其抗 AD 的物质基础;另外开心散如何发挥抗 AD 的确切机制,仍需进一步明确作用靶点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] GBD 2017 CAUSES OF DEATH COLLABORATORS. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 1736-1788.
- [2] WEIDNER W S, BARBARINO P. The state of the art of dementia research: new frontiers [J]. *Alzheimer's Dement*, 2019, 15(7): 1473.
- [3] JIA J P, WEI C B, CHEN S Q, et al. The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide [J]. *Alzheimer's Dement*, 2018, 14(4): 483-491.
- [4] COSTANDI M. Ways to stop the spread of Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2018, 559(7715): S16-S17.
- [5] OVERK C R, MASLIAH E. Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and lewy body disease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88(4): 508-516.
- [6] FORNER S, BAGLIETTO V D, MARTINI A C, et al. Synaptic impairment in Alzheimer's disease: a dysregulated symphony [J]. *Trends Neurosci*, 2017, 40(6): 347-357.
- [7] PICKETT E K, KOFFIE R M, WEGMANN S, et al. Non-fibrillar oligomeric amyloid- β within synapses [J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 53(3): 787-800.
- [8] 薛彦宇,曹靖宜,沈杨,等. 基于突触可塑性探讨抗阿尔茨海默症作用机制的理论研究 [J]. *中央民族大学学报:自然科学版*, 2021, 30(2): 23-33.
- [9] XU S J, LIU G L, BAO X M, et al. Rosiglitazone prevents amyloid- β oligomer-induced impairment of synapse formation and plasticity via increasing dendrite and spine mitochondrial number [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 39(2): 239-51.
- [10] 张立敏,顾超,安红梅. 氧化应激介导的细胞凋亡在阿尔茨海默病中的作用 [J]. *医学综述*, 2021, 27(9): 1685-1690.
- [11] 刘军. 氧化应激在阿尔茨海默病病理发生中的作用机制与干预策略 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2020, 41(5): 661-668.
- [12] BRAIDY N, ZARKA M, JUGDER B E, et al. The precursor to glutathione (GSH), γ -glutamylcysteine (GGC), can ameliorate oxidative damage and neuroinflammation induced by A β oligomers in human astrocytes [J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 177.
- [13] 黄玉环,刘慧,洪芬芳,等. 中药治疗阿尔茨海默病机制的研究进展 [J]. *南昌大学学报:医学版*, 2019, 59(1): 100-104, 106.
- [14] 侯文书,张力. 中药及其有效成分在治疗阿尔茨海默病作用靶点中的研究进展 [J]. *神经药理学报*, 2018, 8(6): 31-32.
- [15] 陈黔,李雨泓. 中药有效成分治疗阿尔茨海默病研究概况 [J]. *医学综述*, 2020, 26(8): 1588-1592, 1597.
- [16] 孙永康,孙田焯,李明远,等. 开心散现代药理作用及作用机制研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2021, 27(4): 650-654.
- [17] 张博,黄树明,徐红丹,等. Synapsin1 磷酸化参与开心散改善 A β 诱发的小鼠记忆障碍 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2019, 21(11): 2286-2292.
- [18] 狄亚琪,桑旭星,方芳. 开心散对 APP/PS1 转基因小鼠在体 LTP 和 PSD-95 表达的影响 [J]. *中成药*, 2017, 39(3): 471-475.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] LUO Y X, LI D L, LIAO Y F, et al. Systems pharmacology approach to investigate the mechanism of Kai-Xin-San in Alzheimer's disease [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 381.
- [22] CAO Y, HU Y, LIU P, et al. Effects of a Chinese traditional formula Kai Xin San (KXS) on chronic fatigue syndrome mice induced by forced wheel running [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(1): 19-25.
- [23] KIM H G, MOON M, CHOI J G, et al. Donepezil inhibits the amyloid-beta oligomer-induced microglial activation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Neurotoxicology*, 2014, 40: 23-32.
- [24] 李斌,谢淑玲,彭丽燕,等. 3 种拟痴呆动物模型在 Morris 水迷宫行为学测试中学习记忆行为的差异 [J]. *医学研究生学报*, 2014, 27(7): 683-685.
- [25] 王其琼,吕俊玲,胡咏川,等. 阿尔茨海默病致病机制

- 及治疗药物研究新进展[J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(23):1939-1947.
- [26] 谭雪,高莉,任佳,等. 突触可塑性对阿尔茨海默病影响的研究进展[J]. 中国医药导报, 2019, 16(9): 52-55.
- [27] 杜果,何婧,黄燕,等. 突触丢失在认知障碍中的作用[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2017, 19(9): 1004-1006.
- [28] YU W D, LU B W. Synapses and dendritic spines as pathogenic targets in Alzheimer's disease [J]. *Neural Plast*, 2012, 2012(2):247150.
- [29] 夏星,徐治强,彭翔. 姜黄素对APP/PS1双转基因小鼠认知功能、炎症反应及海马区突触素表达的影响[J]. 中国临床神经外科杂志, 2018, 23(9):609-612.
- [30] 陈艳清,陈峥,王伟,等. 神经元中PSD-95的研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 2019, 27(11): 723-727.
- [31] DING J, XI Y D, ZHANG D Z, et al. Soybean isoflavone ameliorates β -amyloid 1-42-induced learning and memory deficit in rats by protecting synaptic structure and function[J]. *Synapse*, 2013, 67(12):856-864.
- [32] 杨新瑞,罗晓光,朱文清,等. DLG2、RBMS3和NAP5基因多态性与中国北方地区汉族帕金森病的相关性[J]. 临床神经病学杂志, 2018, 31(5):324-327.
- [33] MADDURI S, PAPALOIZOS M, GANDER B. Synergistic effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation *in vitro* [J]. *Neurosci Res*, 2009, 65:88-97.
- [34] 尹芳,龚盛强,李富周,等. 阿尔茨海默病基因工程模型鼠的研究现状[J]. 医学综述, 2018, 24(2): 241-247, 253.
- [35] LI N, LI Y, LI L J, et al. Glutamate receptor delocalization in postsynaptic membrane and reduced hippocampal synaptic plasticity in the early stage of Alzheimer's disease [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(6):1037-1045.
- [36] PARKER M J, ZHAO S L, BRETT D S, et al. PSD93 regulates synaptic stability at neuronal cholinergic synapses [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(2):378-88.
- [37] PRICE T J, LOURIA M D, CANDELARIO S D, et al. Treatment of trigeminal ganglion neurons *in vitro* with NGF, GDNF or BDNF: effects on neuronal survival, neurochemical properties and TRPV1-mediated neuropeptide secretion [J]. *BMC Neurosci*, 2005, 6(1):4.
- [38] LONG J M, HOLTZMAN D M. Alzheimer disease: an update on pathobiology and treatment strategies [J]. *Cell*, 2019, 179(2):312-339.
- [39] SIMUNKOVA M, ALWASEL S H, ALHAZZA I M, et al. Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93(9):2491-2513.
- [40] 刘红艳,乔玉峰,薛福平. 干预氧化应激通路靶向治疗糖尿病肾病的新进展[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(17):2174-2178.
- [41] 田由,王雪,艾静. 基底前脑胆碱能神经元功能异常在阿尔茨海默病中的作用相关研究进展[J]. 神经药理学报, 2017, 7(4):53-64.
- [42] HARALD H, M-MARSEL M, CA C, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease [J]. *Brain*, 2018, 141(7):1917-1933.
- [43] 李倩,祝东林,马文颖,等. 多奈哌齐治疗 Alzheimer's 病有效血药浓度及影响因素[J]. 临床神经病学杂志, 2021, 34(1):77-80.
- [44] 龙子弋,时晶,田金洲,等. 痴呆的证候分型研究[J]. 中国医学前沿杂志:电子版, 2012, 4(10):28-35.
- [45] 毕婷婷,战丽彬,张栋婧. 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.

[责任编辑 孙丛丛]