

二仙汤对去卵巢大鼠认知障碍的影响

王莹, 杨硕, 谢慧慧, 刘波*

(江西中医药大学药学院, 江西省中药药理学重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**观察二仙汤对去卵巢大鼠引起的认知障碍作用及初步机制探讨。**方法:**将雌性SD大鼠按体质量随机分成假手术组,模型组,阳性药戊酸雌二醇组($0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),二仙汤高、中、低剂量组(相当生药量 $12, 8, 4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。除假手术组外,其他组动物均以去卵巢复制认知障碍模型,经阴道涂片筛选后,每日1次给药,连续90 d后,以Mirrors水迷宫实验检测大鼠认知能力,比色法检测大鼠大脑皮质乙酰胆碱酯酶(AchE),乙酰胆碱转移酶(ChAT),总超氧化物歧化酶(T-SOD),丙二醛(MDA)水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马和大脑皮质区域的雌激素 α 受体蛋白表达。**结果:**与假手术组比较,模型组逃避潜伏期随着试验次数显著增多($P < 0.01$),在原平台象限停留时间减少($P < 0.05$),ChAT活性降低($P < 0.01$)且AchE活性升高($P < 0.05$),大脑皮质区域的雌激素 α 受体表达显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,二仙汤能缩短模型大鼠逃避潜伏期,增加空间探索试验时穿过原目标平台的次数和原目标平台象限停留时间比例,以及增加ChAT活性,降低AchE活性,雌激素 α 受体表达显著增加($P < 0.01$)。**结论:**二仙汤能改善去卵巢致大鼠认知障碍,其机制可能与中枢胆碱活性和雌激素等有关。

[关键词] 二仙汤; 去卵巢大鼠; 认知障碍; 药物作用

[中图分类号] R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)17-0114-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181729

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180619.1519.001.html>

[网络出版时间] 2018-06-19 16:27

Effect of Erxiantang on Cognitive Impairment in Ovariectomized Rats

WANG Ying, YANG Shuo, XIE Hui-hui, LIU Bo*

(School of Pharmacy, Jiangxi Province Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Erxiantang on ovariectomized-induced cognitive impairment in rats. **Method:** Female SD rats were randomly divided into sham group, control group, positive estradiol valerate group ($0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), low-dose Erxiantang group (equivalent raw drug dosage of $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), medium-dose Erxiantang group (equivalent raw drug dosage of $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and high-dose Erxiantang group (equivalent raw drug dosage of $4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). The rats were ovariectomized except for the sham group rats. All of the animals were administered with drugs for 90 days after vaginal smear screening. The cognitive ability of rats was evaluated by the Mirrors water maze test. The contents and active of acetylcholinesterase (AchE), acetylcholinesterase (ChAT), total superoxide dismutase (T-SOD), and malondialdehyde (MDA) of rat cerebral cortex were detected by colorimetry. The expression of estrogen receptor protein in the hippocampus and the cortex regions were detected by Western blot. **Result:** Compared with the sham-operated group, the escape latency of the model group increased significantly with the rise in the number of trials ($P < 0.01$), the residence time in the original platform quadrant was decreased ($P < 0.05$), the activity of ChAT was decreased ($P < 0.01$),

[收稿日期] 20180324(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560723);江西省自然科学基金项目(20151BAB205072)

[第一作者] 王莹,在读硕士,从事老年病防治研究,Tel:0791-87118919, E-mail: 1157887478@qq.com

[通信作者] *刘波,博士,副教授,硕士生导师,从事老年病防治研究,Tel:0791-87118919, E-mail: liuboxtcm@163.com

the activity of AchE was increased ($P < 0.05$), and the expression of estrogen receptor α in the cerebral cortex was significantly reduced ($P < 0.01$); compared with the control group, the rats escape latency in control groups was shorten by Erxiantang. The frequency of passing through the original target platform and the ratio of residence time in the original target platform quadrant increased. The activity of ChAT increased significantly, while the activity of AchE decreased. The expression of estrogen receptor α significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Erxiantang can improve the cognitive impairment in ovariectomized rats, and the mechanism may be related with cholinesterase and estrogen in central nervous system.

[**Key words**] Erxiantang; ovariectomized rats; cognitive impairment; drug effect

随着社会老龄化的发展,越来越多的老年人出现轻度认知障碍(MCI)^[1],主要表现为注意力不集中,反应迟钝,学习记忆能力下降等,若不及时进行干预治疗,可能进一步发展成阿尔茨海默病(AD)影响老年人的生活质量。近年来发现,老年人认知障碍发病率明显增加,多伴随慢性阻塞性肺疾病、糖尿病等疾病^[2],与传统医学五脏中的肾有关^[3]。《黄帝内经·素问·上古天真论篇》:“女子七七,任脉虚,太冲脉衰少,天癸竭,地道不通,故形坏而无子也。”说明更年期妇女肾气逐渐衰弱,天癸将竭,精血不足,引起反应迟钝,记忆力减退等一系列症状。因此,研究绝经所引起认知障碍的机制以及寻找有效防治药物对提高老年人健康水平有重要意义。

中医学认为,肾气通于脑,肾藏精生髓,充于脑,脑为髓之海。肾精充足时,髓海满,则大脑思维敏捷,反应灵活,记忆力强。近年来,补肾法已广泛应用于临床防治轻度认知障碍^[4-5]。二仙汤是张伯讷教授针对妇女更年期综合征所研制的名方^[6],方中仙茅、淫羊藿为君,辅以巴戟天为臣药,知母、黄柏为佐药,当归为使药。全方温补与寒泻同行,壮阳与滋阴共用,阴阳相互制约。本课题组一直研究二仙汤对去卵巢大鼠更年期综合征作用^[7-8],首次应用二仙汤对去卵巢大鼠认知方面进行研究,且有实验表明应用二仙汤进行治疗更年期精神疾病取得良好疗效^[9],但二仙汤治疗更年期妇女认知障碍的机制尚不清楚。本研究采用摘除卵巢诱导大鼠认知障碍模拟更年期女性的认知能力减弱,从动物行为学观察各组之间大鼠的认知能力的差异,检测大脑皮质的乙酰胆碱酯酶(AchE),乙酰胆碱转移酶(ChAT),总超氧化物歧化酶(T-SOD),丙二醛(MDA)水平及海马和皮质部位的雌激素 α 受体蛋白表达,分析二仙汤防治去卵巢大鼠认知障碍的作用及初步机制。

1 材料

1.1 动物 6~8个月龄 SPF 级雌性 SD 大鼠购于湖南斯莱克实验动物有限公司,合格证号 SCXK

(湘)2016-0002。实验过程严格按照江西中医药大学医学伦理委员会相关规定饲养处理(伦理委员会审查编号 JZLLSC20170223002),大鼠进入动物房室温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,自由饮水、摄食,适应 1 周后用于实验。

1.2 药物及试剂 二仙汤组成中药包括淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归、知母、黄柏,实验所用以上中药饮片均购于江西樟树天齐堂中药饮片有限公司,经江西中医药大学药学院中药鉴定组付小梅副教授鉴定均为正品,符合 2015 年版《中国药典》规范。AchE, ChAT, T-SOD, MDA 测试盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20170704, 20170707, 20170704, 20170707);戊酸雌二醇(拜耳医药保健有限公司,批号 306A);RIPA 高效裂解液,BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司,批号分别为 RA223336A, RD231234);PMSF(北京索莱宝科技有限公司,批号 RE2173411);兔单克隆雌激素受体 α (ER α)抗体(美国 Abcam 公司,批号 GR3175557-3); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Affinity 公司,批号 5216j70)。

1.3 仪器 Mirrors 水迷宫(中国医学科学院北京药物研究所),3-18K 型台式高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司),ELX800 型吸收光酶标仪(美国 Bio-Tek 仪器有限公司),721 型紫外可见分光光度计(上海欣荣仪器有限公司),PowerPac 系列电泳仪和转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 二仙汤的制备 二仙汤组成中药淫羊藿-仙茅-巴戟天-当归-知母-黄柏依照 2:2:2:2:1:1 比例分别称取对应中药饮片,根据中药煎煮标准,双蒸水浸泡 30 min,液面高出药材 2~5 cm,以武火煮沸后再改用文火煎煮 30 min,过滤收集药液,加水按前法重复煎煮 1 次,将 2 次药液合并,浓缩为二仙汤高、中、低质量浓度提取液($1.2, 0.8, 0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

2.2 模型复制、分组和给药 实验大鼠按体质量随机分为 6 个组分别为模型组、假手术组、戊酸雌二醇

组(0.8 mg·kg⁻¹),二仙汤高、中、低剂量组(12,8,4 g·kg⁻¹)。模型复制以 10% 水合氯醛(3 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,分别在两侧脊尽肋角的正下方 1 cm 左右处剪开,将脂肪组织拉出,摘除卵巢,分层缝合。假手术组则按上述方法找到卵巢并翻起,但不切除卵巢,复位后分层缝合。术后参照文献[10]方法,以大鼠阴道涂片无动情期为卵巢彻底摘除大鼠即可用于实验。根据实验分组,戊酸雌二醇组和二仙汤高、中、低剂量组分别灌胃相应剂量的药物,模型组和假手术组则灌胃相应剂量的生理盐水,给药容量为 10 mL·kg⁻¹,每日 1 次,连续灌胃给药 90 d。

2.3 Mirrors 水迷宫检测 水面高度高于透明平台上方 2~3 cm,温度为 19~20 ℃,水池包括 I, II, III, IV 4 个象限。按照经典水迷宫实验方法,前 4 d 进行定位航行实验,第 5 天则开展空间探索实验。大鼠定位航行实验,主要是记录大鼠寻找平台的时间,即为逃避潜伏期。大鼠空间探索实验,则是记录大鼠 60 s 内穿过原平台所在位置的次数及在原平台所在象限停留的时间。

2.4 样本收集 大鼠麻醉后,沿中线剪开头皮,暴露并剪开头盖骨,掀开脑膜,将脑剥离,沿大脑矢状线分别往左右两边分开大脑皮层,分离出海马,分别收集大脑皮质、海马,-20 ℃ 保存备用。

2.5 大脑皮质 MDA, SOD, ChAT, AchE 检测 取大脑皮质,根据质量-体积 1:9 进行匀浆,制成 10% 匀浆,分别以分光光度计在相应波长检测样本的吸光度 A,参照各生化试剂盒说明书分别计算各样本 AchE, ChAT, T-SOD, MDA 的活性或含量。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 ERα 蛋白

表达 分别精密称取大脑皮质、海马组织,研磨并加入裂解液 1 mL(RIPA 裂解液-PMSF 100:1),4 ℃ 低温 2 000 r·min⁻¹ 离心 30 min 取上清液,以 BCA 试剂盒测定各样品蛋白浓度。各样本蛋白以 5:1 比例加入相应量的 loading buffer 煮沸后 -80 ℃ 保存备用。配置 10% 的 SDS-PAGE 分离蛋白,根据分子量切胶转至 PVDF 膜上,用 5% 的 BSA 封闭 150 min,一抗(1:1 000)4 ℃ 孵育过夜,室温下孵育二抗(1:4 000)2 h,滴加发光液后用胶片进行曝光,使用成像仪器拍照分析目的蛋白灰度值与 β-actin 灰度值的比值进行统计分析,检测大脑皮质、海马组织中 ERα 蛋白的表达。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间均值进行 t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对去卵巢大鼠水迷宫定位航行实验逃避潜伏期的影响 随着航行实验次数的增多,模型组与假手术组比较,逃避潜伏期显著升高(P < 0.01)。与模型组比较,第 1 天二仙汤低剂量组明显降低(P < 0.05),戊酸雌二醇组和二仙汤高剂量组显著降低(P < 0.01),第 3 天戊酸雌二醇组显著降低(P < 0.01),第 4 天二仙汤低剂量组有明显降低(P < 0.05),戊酸雌二醇组和二仙汤高剂量组显著降低(P < 0.01)。在空间探索实验中,各组在原目标平台所在象限停留时间百分比与模型组比较,二仙汤低剂量组有显著升高(P < 0.01),可见学习过程中,二仙汤能提高大鼠的学习记忆能力。见表 1,2。

表 1 二仙汤对去卵巢大鼠水迷宫定位航行实验逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Erxiantang on escapement latency of water maze positioning navigation experiments in ovariectomized rats($\bar{x} \pm s, n = 8$) s

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
假手术	-	33.07 ± 14.13	23.37 ± 13.48	12.49 ± 6.87	12.09 ± 6.95
模型	-	39.34 ± 17.87	27.87 ± 15.58	22.91 ± 14.56 ²⁾	20.37 ± 10.08 ²⁾
戊酸雌二醇	8 × 10 ⁻⁴	23.10 ± 13.61 ⁴⁾	19.32 ± 11.38	14.27 ± 7.60 ⁴⁾	13.62 ± 7.85 ⁴⁾
二仙汤	12	22.36 ± 11.17 ⁴⁾	19.81 ± 8.02	20.78 ± 10.08	13.06 ± 6.61 ⁴⁾
	8	36.29 ± 16.83	30.71 ± 14.47	23.10 ± 9.73	17.26 ± 9.54
	4	28.66 ± 20.45 ³⁾	25.39 ± 18.66	19.20 ± 13.65	14.10 ± 7.92 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01;与模型组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01(表 2~4 同)

3.2 对去卵巢大鼠大脑皮质 AchE, ChAT, T-SOD, MDA 水平的影响 与模型组比较,各组大鼠的皮质部位 AchE 活性均不同程度被抑制(P < 0.05),

ChAT 活性则明显增强(P < 0.05),说明二仙汤可能通过抑制 AchE 活性,提高乙酰胆碱含量,提升胆碱能神经功能,促进学习记忆。与模型组比较,二仙汤

表 2 二仙汤对去卵巢大鼠水迷宫空间探索实验的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of Erxiantang on water maze space exploration experiment in ovariectomized rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	平台频率/次	累计持续时间/s	累计持续时间比例/%
假手术	-	3.00 ± 1.07	19.75 ± 7.08	32.89 ± 11.80
模型	-	2.00 ± 1.32	14.99 ± 5.96 ¹⁾	24.96 ± 9.92 ¹⁾
戊酸雌二醇	8×10^{-4}	3.13 ± 1.92	15.72 ± 4.69	26.18 ± 7.82
二仙汤	12	2.64 ± 1.39	16.67 ± 5.43	27.77 ± 9.05
	8	2.86 ± 2.25	17.11 ± 6.86	28.50 ± 11.43
	4	3.14 ± 2.38	21.30 ± 5.53 ⁴⁾	35.47 ± 9.20 ⁴⁾

各给药组 T-SOD 有不同程度提高,但无显著差异性,而 MDA 也无显著性降低,说明二仙汤对

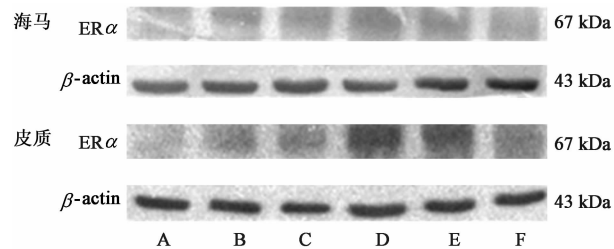
大脑皮质部位氧化应激的改善作用并不明显。见表 3。

表 3 二仙汤对去卵巢大鼠大脑皮质 AchE, ChAT, T-SOD, MDA 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of Erxiantang on levels of AchE, ChAT, T-SOD and MDA in cerebral cortex of ovariectomized rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	AchE/ $U \cdot mg^{-1}$	ChAT/ $U \cdot g^{-1}$	T-SOD/ $U \cdot mg^{-1}$	MDA/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
假手术	-	0.24 ± 0.07	80.30 ± 34.36	114.52 ± 24.84	1.36 ± 0.24
模型	-	0.30 ± 0.06 ¹⁾	42.03 ± 22.98 ²⁾	94.60 ± 23.23	1.26 ± 0.33
戊酸雌二醇	8×10^{-4}	0.21 ± 0.03 ³⁾	47.26 ± 29.82 ¹⁾	111.89 ± 20.14	1.25 ± 0.33
二仙汤	12	0.23 ± 0.03 ³⁾	59.56 ± 20.36	102.54 ± 11.84	1.21 ± 0.14
	8	0.23 ± 0.04 ³⁾	50.40 ± 21.16	100.89 ± 22.27	1.18 ± 0.25
	4	0.23 ± 0.05 ³⁾	48.39 ± 19.48 ¹⁾	100.45 ± 15.89	1.21 ± 0.19

3.3 对去卵巢大鼠海马及皮质区域 ER α 蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组在大脑皮质区域能明显降低 ER α 受体的表达。与模型组比较,无论是在大脑皮质区域还是海马区域,二仙汤各剂量组均能显著提高 ER α 受体的表达($P < 0.01$),且具有一定的剂量依赖性。见图 1 及表 4。



A. 模型组; B. 假手术组; C. 戊酸雌二醇组; D. 二仙汤高剂量组; E. 二仙汤中剂量组; F. 二仙汤低剂量组

图 1 二仙汤对去卵巢大鼠海马及皮质区域 ER α 蛋白表达的影响
Fig. 1 Effect of Erxiantang on ER α protein expression in hippocampus and cortex of ovariectomized rats

4 讨论

去卵巢致大鼠认知障碍模型是模拟妇女绝经后认知功能减退的方式^[11],其病理机制目前还未阐明。现代医学认为妇女绝经后认知功能减退多与下

表 4 二仙汤对去卵巢大鼠海马及皮质区域 ER α 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of Erxiantang on ER α protein expression in hippocampus and cortex of ovariectomized rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	海马区域 ER α / β -actin	大脑皮质区域 ER α / β -actin
假手术	-	0.588 ± 0.162	0.547 ± 0.062
模型	-	0.523 ± 0.041	0.351 ± 0.040 ²⁾
戊酸雌二醇	8×10^{-4}	0.715 ± 0.156	0.661 ± 0.079 ⁴⁾
二仙汤	12	1.149 ± 0.192 ⁴⁾	0.991 ± 0.006 ⁴⁾
	8	1.206 ± 0.159 ⁴⁾	0.964 ± 0.016 ⁴⁾
	4	0.894 ± 0.077 ⁴⁾	0.701 ± 0.120 ⁴⁾

丘脑-垂体-性腺轴平衡紊乱雌激素分泌较少^[12]、胆碱能神经递质减少^[13]、氧化损伤^[14]等有关,临床上通常以雌激素替代疗法进行治疗,本实验也以戊酸雌二醇作为阳性药。

乙酰胆碱是中枢神经系统中与学习记忆相关密切的神经递质,大多是胆碱和乙酰辅酶 A 通过 ChAT 的作用合成, AchE 可以将乙酰胆碱降解为胆碱和乙酸而失去活性。AchE 和 ChAT 的活性通常可作为认知能力的客观指标。本研究同样发现,去

卵巢后大鼠大脑皮质 AchE 活性明显增强, ChAT 活性极显著降低。而且水迷宫检测也发现去卵巢后大鼠学习记忆能力明显减弱, 这些结果都说明 AchE, ChAT 活性与认知能力相关, 与文献报道一致^[15]。研究进一步发现, 二仙汤能提高去卵巢大鼠的学习记忆能力, 且降低去卵巢大鼠大脑皮质 AchE 活性, 并提高 ChAT 活性, 这说明二仙汤改善去卵巢大鼠认知障碍的机制可能与抑制大脑皮质 AchE 活性, 增强 ChAT 活性, 增加乙酰胆碱含量, 提高胆碱能神经功能有关。

SOD 是氧化应激防御系统中抗氧化因子, 具有抑制过氧化物酶, 增强抗氧化防御能力的作用^[16]。有资料显示二仙汤有抗自由基的作用^[17], 能提高血清 SOD 的活性。但本实验结果表明, 与模型组比较, 二仙汤有增高大脑皮质 SOD 活性的趋势, 但无显著差异, 而对大脑皮质 MDA 的含量则无明显改变, 这说明二仙汤不能及时改善大脑皮质的氧化应激。

雌激素具有改善认知障碍的作用^[18]。雌激素主要通过雌激素受体结合发挥相应的生理效应。雌激素受体包括 α 受体和 β 受体, 在机体的分布各有不同^[19], 即使是针对与学习记忆相关的大脑皮质和海马区域的雌激素受体分布也有不同, 有认为与雌激素 β 受体有关^[20-21], 更有研究发现雌激素 α 受体在中枢参与学习能力形成是起关键作用的^[22-23]。本研究发现去卵巢后大脑皮质和海马区域雌激素 α 受体表达明显降低, 说明学习记忆能力与雌激素 α 受体表达相关。而二仙汤能呈剂量依赖性增加去卵巢大鼠海马和皮质区域雌激素 α 受体表达, 说明二仙汤提高学习记忆能力可能与雌激素作用有关。

综上所述, 二仙汤能明显提高去卵巢大鼠学习记忆能力, 其机制可能与增加大脑皮层和海马区域雌激素 α 受体的表达, 降低大脑皮质 AchE 的活性, 提高 ChAT 的活性有关。

[参考文献]

[1] CHENG Y W, CHEN T F, CHUI M J. From mild cognitive impairment to subjective cognitive decline: conceptual and methodological evolution [J]. *Neuropsych Dis Treat*, 2017, 13: 491-498.

[2] Alosco M L, Spitznagel M B, Josephson R, et al. COPD is associated with cognitive dysfunction and poor physical fitness in heart failure [J]. *Heart Lung*, 2015, 44(1): 21-26.

[3] 张雅萍, 王兴臣, 付强, 等. 轻度认知障碍中医证候流

行病学研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2007, 30(10): 709-712.

[4] 解冰川, 时军, 赵康, 等. 补肾益脑方联合左旋多巴胺治疗肝肾不足, 痰瘀阻络证帕金森病 40 例临床分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(11): 186-189.

[5] 胡科, 张保朝, 贾东佩. 健脑补肾丸联合银杏叶片治疗轻度认知功能障碍 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(23): 160-163.

[6] 张艳霞, 郭霞珍. 郭霞珍教授二仙汤的临床应用体会 [J]. *中国当代医药*, 2015, 22(4): 109-113.

[7] 谢珍, 刘波, 徐彭, 等. 二仙汤及其拆方对去卵巢大鼠更年期综合征的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(20): 5691-5693.

[8] 刘志文, 刘波, 吴琪, 等. 二仙汤对去卵巢骨质疏松大鼠股骨蛋白质组的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(13): 2558-2563.

[9] 许凤全, 郑瑀, 许琳洁, 等. 加味二仙汤联合心理疏导对更年期抑郁症女性单胺类神经递质的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(7): 789-794.

[10] 龙梓, 刘丹霞, 廖华卫, 等. 健骨片对去卵巢骨质疏松大鼠骨代谢、骨微结构及骨强度的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(9): 116-121.

[11] Gibbs R B, Chipman A M, Hammond R, et al. Galanthamine plus estradiol treatment enhances cognitive performance in aged ovariectomized rats [J]. *Horm Behav*, 2011, 60(5): 607-616.

[12] Rettberg J R, YAO J, Brinton R D. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body [J]. *Front Neuroendocrin*, 2014, 35(1): 8-30.

[13] 周慧荣. 脑内乙酰胆碱与认知活动关系的探析 [J]. *中国现代药物应用*, 2013, 7(11): 68-69.

[14] 周红伟, 章军建. 氧化损伤与轻度认知障碍 [J]. *国外医学·神经病学神经外科学分册*, 2004, 31(5): 468-470.

[15] WANG Y, WANG H, CHEN H. AchE inhibition-based multi-target-directed ligands, a novel pharmacological approach for the symptomatic and disease-modifying therapy of Alzheimer's disease [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2016, 14(4): 364-375.

[16] 宋玉菲, 付剑亮. 阿尔茨海默病与氧化应激 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2015, 42(3): 290-293.

[17] 刘永胜, 赵丽慧. 二仙汤的研究及临床应用 [J]. *光明中医*, 2010, 25(4): 741-742.

[18] Luine V N. Estradiol and cognitive function: Past, present and future [J]. *Horm Behavior*, 2014, 66(4): 602-618.

[19] Foster T C. Role of estrogen receptor alpha and beta expression and signaling on cognitive function during

- aging[J]. Hippocampus,2012, 22(4): 656-669.
- [20] Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen J A, et al. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential [J]. Steroids, 2014, doi: 10.1016/j.steroids.2014.06.012.
- [21] Almey A, Milner T A, Brake W G. Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females [J]. Horm Behav, 2015,74:125-138.
- [22] WANG C, ZHANG F, JIANG S, et al. Estrogen receptor- α is localized to neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease[J]. Sci Rep,2016, doi: 10.1038/srep20352.
- [23] Hwang C J, YUN H M, Park K R, et al. Memory impairment in estrogen receptor α knockout mice through accumulation of amyloid- β peptides[J]. Mol Neurobiol, 2015,52(1):176-186.

[责任编辑 周冰冰]