

# 肉苁蓉多糖对 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠 CREB 表达的影响

马慧, 尹若熙, 郭敏, 鲍媛, 崔竹海, 李刚\*

(内蒙古医科大学药学院, 呼和浩特 010110)

**[摘要]** **目的:** 观察肉苁蓉多糖 (CDPS) 对 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠学习记忆的影响及可能的机制。**方法:** 昆明种小鼠 90 只, 随机分为 6 组, 即正常对照组, 模型组, CDPS 低、中、高剂量组 (25, 50, 100 mg·kg<sup>-1</sup>), 阳性对照组, 每组 15 只。模型组、CDPS 组及阳性对照组皮下注射 150 mg·kg<sup>-1</sup> 的 *D*-半乳糖建立衰老小鼠模型, 正常对照组给予等量生理盐水; 同时, CDPS 各组灌胃给予相应浓度的 CDPS 药液, 阳性对照组给予 10 mg·kg<sup>-1</sup> 吡拉西坦, 正常对照组及模型组给予等量蒸馏水。连续给药 6 周后, 采用水迷宫、跳台实验测定小鼠学习记忆能力; 试剂盒检测小鼠脑组织超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量; HE 染色观察脑组织海马区神经元细胞形态学变化; 免疫组织化学染色检测 cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB) 的表达水平。**结果:** 在水迷宫实验中, 各给药组与模型组比较, 逃避潜伏期和第 1 次到达站台时间均明显缩短且穿越站台次数增加 ( $P < 0.05$ )。在跳台实验中, 与模型组比较, 各给药组小鼠下台潜伏期显著延长, 错误次数减少 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 各给药组小鼠脑组织 SOD 活性增加, MDA 含量下降 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 各给药组小鼠脑组织海马 CA1 区神经元数量增加, 病理改变减轻; 各给药组小鼠海马区 CREB 表达水平与模型组比较显著增加 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 肉苁蓉多糖可以改善 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠的学习记忆能力, 其机制可能与上调 CREB 表达有关。

**[关键词]** 肉苁蓉多糖; 衰老; 学习记忆; cAMP 反应元件结合蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2014) 20-0137-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200137

## Effect of *Cistanche deserticola* Polysaccharides on Expression of CREB in *D*-galactose Induced Aging Model Mice

MA Hui, YIN Ruo-xi, GUO Min, BAO Yuan, CUI Zhu-hai, LI Gang\*

(College of Pharmacy of Inner Mongolian Medical University, Hohhot 010110, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of *Cistanche deserticola* polysaccharides herb (CDPS) on learning and memory ability of *D*-galactose (*D*-gal) induced aging mice and possible mechanisms. **Method:** Ninety mice were randomly assigned into control group, model group, CDPS low, middle and high dose group (25, 50, 100 mg·kg<sup>-1</sup>), positive control group, 15 mice in each group. The model, CDPS and positive control groups were injected 150 mg·kg<sup>-1</sup> *D*-gal subcutaneously to establish aging-mouse model, and the control group was given the same volume of saline water; meanwhile, the CDPS groups were administered orally corresponding concentrations of CDPS liquid and positive control group was given 10 mg·kg<sup>-1</sup> piracetam, while the control and the model groups were given the same volume of distilled water. After six weeks of continuous administration, the water maze performance and step-down passive avoidance test were applied to determine learning and memory ability of mice. Moreover, superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content in brain tissue of mice were detected by kits. Morphological changes of neurons in the hippocampus of brain tissue were observed with HE staining. Furthermore, the expression level of cAMP response element binding protein (CREB) was examined by immunohistochemistry. **Result:** In water maze performance, CDPS (25, 50, 100 mg·kg<sup>-1</sup>)

**[收稿日期]** 20140221 (013)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (81260650)

**[第一作者]** 马慧, 在读研究生, 从事神经药理研究, Tel: 0471-6653134, E-mail: mahui48186225@126.com

**[通讯作者]** \* 李刚, 教授, 从事神经药理、新药药理研究, Tel: 0471-6653134, E-mail: cnmmligang@hotmail.com

significantly decreased latency and the first time arrived platform and increased travel times in *D*-gal-treated mice. In step-down passive avoidance test, the step down latency was significantly prolonged and the number of errors was decreased in CDPS (25, 50, 100 mg·kg<sup>-1</sup>) group compared to those in the *D*-gal-control group. In addition, CDPS (25, 50, 100 mg·kg<sup>-1</sup>) significantly increased the activity of SOD and decreased the level of MDA in the brain tissues of *D*-gal-treated mice. At the same time, CDPS increased the number of neuron in hippocampal CA1 of mouse brain and ameliorated the pathological changes according to HE staining and CDPS (25, 50, 100 mg·kg<sup>-1</sup>) increased CREB expression levels in the hippocampus of mice comparing with those in *D*-gal-control group.

**Conclusion:** CDPS can improve the learning and memory ability of *D*-gal induced aging model mice, and the mechanism may be related to increasing CREB expression.

[**Key words**] *Cistanche deserticola* polysaccharides; aging; learning and memory; CREB

肉苁蓉为列当科植物肉苁蓉或管花肉苁蓉干燥带鳞叶的肉质茎。咸性温,具有补肾阳、益精血、润肠通便和延缓衰老等功能<sup>[1]</sup>,在我国已有两千多年的使用历史。现代药理学表明,肉苁蓉除具有传统的补肾壮阳作用外,在抗衰老方面也展现了良好的应用前景,但其抗衰老作用研究多集中于皂苷类成分,而肉苁蓉多糖(*Cistanche deserticola* polysaccharides, CDPS)作为活性成分之一研究报道多集中于免疫系统,在中枢神经药理学作用及机制报道相对较少,CDPS对于学习记忆的影响研究少有文献报道。尽管之前有研究<sup>[2]</sup>表明肉苁蓉多糖具有调节衰老小鼠机体氧化/抗氧化平衡的功能,消除*D*-半乳糖引起自由基产生的增多,具有抗氧化及延缓衰老的作用,但其对于学习记忆的影响的机制并未阐明。

学习和记忆是动物中枢神经系统高级活动的一种方式,也是动物赖以生存和进化发展的关键,是构成智能的要素。学习记忆的中枢定位于大脑,在信息的获得、巩固和记忆中起关键作用。随着社会人口老龄化,老年病比例增加,衰老、老年痴呆等带来的学习记忆障碍问题日益突出。

本研究采用皮下注射*D*-半乳糖建立小鼠衰老模型,运用行为学、组织病理学、免疫组织化学等检测方法,观察肉苁蓉多糖对*D*-半乳糖致衰老模型小鼠学习记忆能力、脑组织生化指标、海马区神经元细胞形态学变化及cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)表达的影响,阐述CDPS对于*D*-半乳糖致衰老模型小鼠学习记忆能力的影响,并初步探讨肉苁蓉多糖改善学习记忆的可能机制,为肉苁蓉多糖促智作用的进一步研究做出贡献。

## 1 材料

**1.1 动物** 昆明种小鼠, SPF级, 4周龄, 体重

(20±2)g,雌雄各半,购自内蒙古大学实验动物中心,合格证号SCXK(蒙)2002-0001,饲养于内蒙古医科大学动物实验室,自由摄食饮水,12h明暗交替照明。

**1.2 药品与试剂** 肉苁蓉 *Cistanche deserticola*,阿拉善盟,药材经内蒙古医科大学生药教研室王晓琴教授鉴定。肉苁蓉多糖,参照文献[3]方法进行提取并参照文献[4]进行含量测定,含量测定结果为90%。*D*-半乳糖(国药集团化学试剂有限公司,批号F20110615),吡拉西坦(上海华源安徽仁济制药有限公司,批号120108),SOD,MDA试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20130308),兔源CREB单克隆抗体(Cell Signaling),免疫组化染色超敏试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司,批号1303019710),其余试剂均为分析纯。

**1.3 仪器** 通道式水迷宫(实验室自制),Morris水迷宫、跳台动物行为测试系统(上海吉量软件科技有限公司),680型酶标仪(美国伯乐),PL-203型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),3K15型台式冷冻离心机(德国Sigma),TU-1901型紫外分光光度计(上海精密仪器仪表有限公司),RM2135型石蜡切片机(德国Lecia)。

## 2 方法

**2.1 动物筛选** 采用通道式水迷宫筛选动物。指引每只动物从指定入水点到出口2次,进行测试,若120s内找到出口则保留,未找到则淘汰。

**2.2 分组与给药** 动物按体重随机分为6组(每组15只),即正常对照组、模型组、CDPS低、中、高剂量组、阳性对照组。CDPS低、中、高剂量组分别灌胃(*ig*)给予25,50,100 mg·kg<sup>-1</sup>肉苁蓉多糖,阳性对照组*ig*给予10 mg·kg<sup>-1</sup>吡拉西坦,正常对照组和模型组给予等体积蒸馏水;模型组、各给药组和阳性对照组皮下注射(*sc*)*D*-半乳糖150 mg·kg<sup>-1</sup>,正常对照组

sc 等体积生理盐水,每天 1 次,连续给药 6 周,最后 1 d 注射 D-半乳糖 2 h 后,进行行为学检测。

**2.3 Morris 水迷宫行为测试** Morris 水迷宫为一直径 120 cm、高 50 cm 的圆柱形水池,其内部被分为 4 个大小相等的象限,在其中的一个象限中央放置一直径为 9.5 cm 的平台。实验过程中控制水温在  $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。连续训练 4 d,每天训练两次,第 1 天将平台所在象限作为入水点,第 2,3 天将平台旁边的象限作为入水点,第 4 天将平台对侧象限作为入水点。训练结束后,进行定位航行测试,记录小鼠在 60 s 内寻找到平台的时间即逃避潜伏期。定位航行实验结束后,撤去平台,将小鼠从平台对侧象限面向池壁放入水中,测其在 60 s 内跨原平台所在位置的次数(即穿越站台次数)和第 1 次到达原平台的时间。

**2.4 跳台试验** 跳台装置为 60 cm × 12 cm × 33 cm 的被动回避反应箱,四周用黑色塑料板分隔,箱底为可通电的铜栅(40 V),反应箱的右前角置一直径和高均为 4.5 cm 的绝缘橡皮垫,作为小鼠回避电击的安全台。实验时将小鼠放入跳台实验仪中,训练小鼠受到电击跳上平台躲避伤害性刺激,24 h 后重新测试,记录小鼠第 1 次跳下平台的潜伏期和 5 min 内的错误次数,比较不同组间小鼠记忆成绩的差异。

**2.5 脑组织 SOD,MDA 检测** 行为学实验完成后,小鼠断头处死,迅速取出脑组织,加 9 倍体积生理盐水,制成 10% 脑组织匀浆,离心后取上清严格参照南京建成生物工程公司试剂盒说明书方法步骤测定总蛋白、MDA 含量及 SOD 活性。

**2.6 HE 染色** 行为学实验完成后,取小鼠处死,迅速取脑组织中间切块于 4% 多聚甲醛溶液固定 24 ~ 48 h,制备脑组织石蜡切块,4 μm 切片,进行 HE 染色,在光镜下进行观察。

**2.7 免疫组织化学染色** 脑组织石蜡切块 3 μm 切片,常规脱蜡至水,高温高压修复后滴加试剂 A(内源性过氧化物酶阻断剂)孵育 10 min,PBS 冲洗后滴加试剂 B(动物非免疫血清)孵育 10 min 后滴加一抗(CREB,1:2 000)4 °C 过夜,PBS 冲洗后依次滴加试剂 C(生物素标记的羊抗鼠/兔 IgG)和试剂 D(链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶)孵育 10 min 后 PBS 冲洗,DAB 显色,苏木素复染,常规封片。结果采用 Image J 软件进行灰度值分析。

**2.8 统计学处理** 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,多个实验组比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 对 D-半乳糖致衰老模型小鼠学习记忆的影响

**3.1.1 Morris 水迷宫实验** 在 Morris 水迷宫定位航行实验中,模型组小鼠逃避潜伏期明显延长,而肉苁蓉多糖各剂量组与模型组比较逃避潜伏期均显著缩短( $P < 0.05$ );在空间探索实验中,肉苁蓉多糖组与模型组比较,小鼠第 1 次到达站台时间显著缩短而穿越站台次数增加( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 肉苁蓉多糖对水迷宫试验小鼠学习记忆能力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	逃避潜伏期 /s	首次到达 站台时间/s	穿越站台 数/次
正常	-	23.8 ± 13.4	19.5 ± 13.1	2.7 ± 1.4
模型	-	41.1 ± 19.7 <sup>1)</sup>	34.4 ± 21.5 <sup>1)</sup>	1.5 ± 1.3 <sup>1)</sup>
CDPS	25	20.5 ± 12.4 <sup>2)</sup>	18.8 ± 16.5 <sup>2)</sup>	2.7 ± 1.8 <sup>2)</sup>
	50	14.2 ± 10.1 <sup>2)</sup>	13.0 ± 9.0 <sup>2)</sup>	3.2 ± 1.3 <sup>2)</sup>
	100	19.2 ± 13.4 <sup>2)</sup>	18.0 ± 13.4 <sup>2)</sup>	2.7 ± 0.7 <sup>2)</sup>
吡拉西坦	10	16.9 ± 10.2 <sup>2)</sup>	11.6 ± 8.4 <sup>2)</sup>	2.7 ± 1.6 <sup>2)</sup>

注:与正常对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

**3.1.2 跳台实验** 模型组与正常对照组比较,小鼠下台潜伏期明显缩短,同时错误次数增加,而肉苁蓉多糖各剂量组与模型组相比,小鼠的下台潜伏期明显延长而错误次数显著减少( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 肉苁蓉多糖对跳台试验小鼠学习记忆能力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	下台潜伏期 /s	错误数 /次
正常	-	76.8 ± 44.5	2.4 ± 1.5
模型	-	11.9 ± 11.6 <sup>1)</sup>	4.0 ± 3.1 <sup>1)</sup>
CDPS	25	68.1 ± 70.1 <sup>2)</sup>	1.6 ± 1.5 <sup>2)</sup>
	50	74.0 ± 72.5 <sup>2)</sup>	1.8 ± 1.3 <sup>2)</sup>
	100	96.0 ± 85.2 <sup>2)</sup>	2.3 ± 1.3 <sup>2)</sup>
吡拉西坦	10	45.1 ± 25.6	2.3 ± 1.1 <sup>2)</sup>

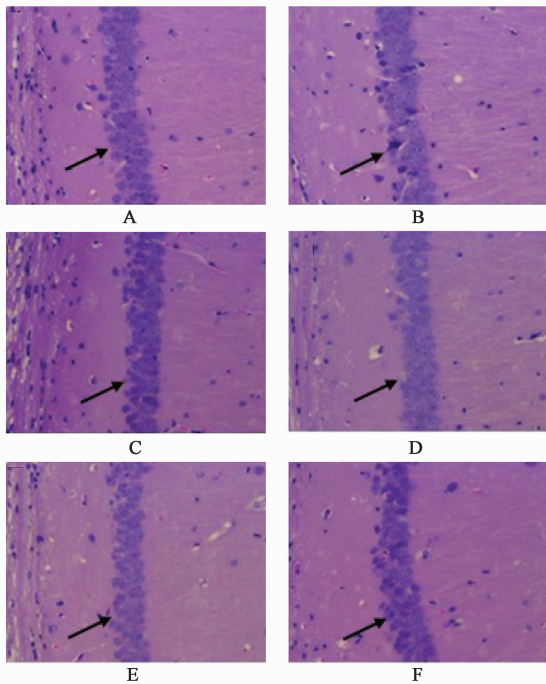
**3.2 对 D-半乳糖致衰老模型小鼠 SOD,MDA 的影响** 与正常对照组比较,模型组小鼠脑组织 SOD 活性下降,同时 MDA 含量增加,而肉苁蓉多糖各剂量组小鼠脑组织 SOD 活性与模型组比较显著增加,MDA 含量明显下降( $P < 0.05$ )。见表 3。

**3.3 对 D-半乳糖致衰老模型小鼠海马区神经细胞形态学的影响** 正常对照组小鼠脑组织海马 CA1

表 3 肉苁蓉多糖对 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠脑组织 SOD,MDA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	SOD /U·mg <sup>-1</sup>	MDA /nmol·mg <sup>-1</sup>
正常	-	311.8 ± 64.3	9.6 ± 2.2
模型	-	167.9 ± 74.1 <sup>1)</sup>	12.4 ± 1.7 <sup>1)</sup>
CDPS	25	269.1 ± 49.2 <sup>2)</sup>	10.3 ± 1.3 <sup>2)</sup>
	50	418.0 ± 166.6 <sup>2)</sup>	10.2 ± 1.4 <sup>2)</sup>
	100	340.4 ± 120.1 <sup>2)</sup>	9.1 ± 1.3 <sup>2)</sup>
吡拉西坦	10	425.0 ± 208.7 <sup>2)</sup>	9.4 ± 1.2 <sup>2)</sup>

区神经元排列整齐,形态正常,细胞着色均匀。给予 *D*-半乳糖后,小鼠海马 CA1 区细胞排列紊乱,神经元丢失,部分退变的神经元呈现凋亡特征:细胞固缩、深染甚至出现空泡化,神经元变性明显。而肉苁蓉多糖各剂量组明显改善这些病理变化,使被损伤的神经元得以恢复。见图 1。

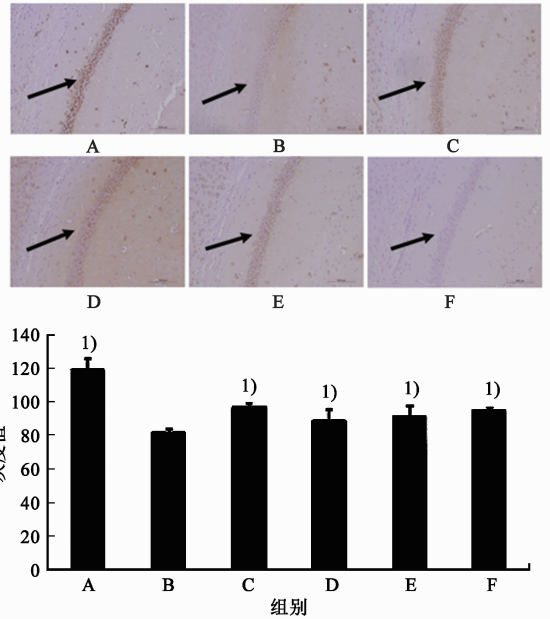


A. 正常对照组; B. 模型组; C. CDPS 25 mg·kg<sup>-1</sup>;  
D. CDPS 50 mg·kg<sup>-1</sup>; E. CDPS 100 mg·kg<sup>-1</sup>;  
F. 吡拉西坦 10 mg·kg<sup>-1</sup>组(图 2 同)

图 1 肉苁蓉多糖对 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠海马区神经细胞形态学的影响(HE, ×400)

3.4 对 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠海马区 CREB 蛋白表达的影响 与正常对照组比较,模型组小鼠脑组织海马 CA1 区 CREB 蛋白免疫反应阳性细胞明显减少、且着色变浅,灰度值与空白组比较有显著性差异( $P < 0.05$ ),而肉苁蓉多糖各剂量组与模型组

比较小鼠脑组织海马 CA1 区 CREB 蛋白免疫反应阳性细胞明显增加、且着色变深,表达水平明显上升( $P < 0.05$ )。见图 2。



与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$

图 2 肉苁蓉多糖对 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠海马区 CREB 蛋白表达的影响(×200)

#### 4 讨论

海马是学习记忆的关键脑区,参与了多种形式的学习和记忆,成年海马齿状回存在神经发生,可以产生新生的神经元,新生的神经元成熟后参与整合到已经存在的神经环路中,可以补充和替代衰老的细胞而发挥生理功能<sup>[5]</sup>。随着年龄增加,哺乳动物的神经发生能力逐渐降低,因为没有足够的新生神经元细胞来替换衰老和死亡的神经元,就可能导老年性退行性疾病的发生,如早老性痴呆,老年人的记忆力持续下降,认知情感发生改变等。

研究表明<sup>[6-8]</sup>,*D*-半乳糖亚急性中毒状态下,体内产生大量超氧阴离子自由基,对组织产生过氧化损害,这种生化和组织结构的变化与自然衰老表现基本吻合。本实验行为学实验结果表明,*D*-半乳糖模型组动物学习记忆能力明显下降。同时,*D*-半乳糖模型组动物脑组织 SOD 活性下降,MDA 含量增加。提示 *D*-半乳糖通过过氧化损害产生神经毒性,可模拟衰老所致的记忆障碍特征,提示本实验动物模型造模成功。给予 CDPS 治疗后,与模型组比较,小鼠学习记忆能力明显改善,脑组织 SOD 活性增加,MDA 含量下降,说明 CDPS 具有改善衰老模型小鼠学习记忆障碍的作用,并推测这种作用是通过

CDPS 的抗氧化作用来实现的。

近年发现,神经退行性疾病患者的特定神经组织具细胞凋亡的形态学特征,提示细胞凋亡可能参与这些疾病的病变过程<sup>[9]</sup>。还有人发现 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠神经元结构发生衰老性变化<sup>[10]</sup>。本实验结果显示,*D*-半乳糖模型组小鼠脑组织海马 CA1 区神经元丢失,细胞固缩、深染,而肉苁蓉多糖各剂量组明显改善这些病理变化,提示其机制可能是抑制神经元凋亡,从而达到抑制脑衰的发展。

CREB 是一种真核生物细胞核内转录因子,被认为与大鼠的学习记忆有关,在新的蛋白质的合成过程中起很重要的作用<sup>[11]</sup>。Nagakura<sup>[12]</sup>等发现痴呆大鼠在水迷宫训练后逃避潜伏期延长,海马等脑区的 CREB 的含量有所下降。还有研究表明  $\alpha\beta$  产生的氧化应激可能在 CREB 蛋白表达的下调起到一定的作用在转基因小鼠<sup>[13]</sup>。Takeo 等<sup>[14]</sup>发现,持续性脑缺血会引起 cAMP-PKA-CREB 信号转导通路受损,导致学习记忆能力下降;与正常大鼠相比,缺血性脑损伤大鼠在水迷宫训练后逃避潜伏期延长,同时海马区细胞 CREB 含量有所下降。在本研究中,*D*-半乳糖组 CREB 表达减少,神经元排列较为紊乱,与以往研究一致。肉苁蓉多糖各剂量组 CREB 表达较 *D*-gal 组显著增加,凋亡细胞减少,推测肉苁蓉多糖可能通过上调神经元内 CREB 表达并启动一系列 CREB 信号转导通路激活 CREB,促进神经元存活以及神经元形态和功能恢复,减少细胞凋亡,从而达到改善学习记忆功能效应。

综上,本研究中我们发现了肉苁蓉多糖改善衰老小鼠学习记忆能力的又一新的机制,即上调脑内海马区 CREB 的表达水平。本实验研究结果在一定程度上说明了肉苁蓉多糖具有提高学习记忆的能力,这种作用与其抗氧化、抗凋亡及上调 CREB 表达水平有关,但 CREB 的表达与激活途径的具体机制以及与抗氧化、抗凋亡之间的关系有待进一步深入研究阐明。

#### [参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社,2010:90.  
[2] 吴波,付玉梅. 肉苁蓉多糖对衰老小鼠脂质过氧化的

影响[J]. 广州医学院学报,2004,32(4):27.

- [3] 吴波,黄敏,马迎军. 肉苁蓉水溶性多糖的分离纯化及分析[J]. 广州医学院学报,2006,34(1):58.  
[4] 麻景梅,宋新波,张丽娟,等. 肉苁蓉多糖含量测定[J]. 辽宁中医药大学学报,2012,14(8):100.  
[5] Palmer T D,Willhoite A R,Gage F H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis [J]. J Comp Neurol, 2000,425(2):479.  
[6] 张常娥,魏伟,刘英华,等. *D*-半乳糖亚急性衰老大鼠模型的建立及评价[J]. 中国老年学杂志,2012,32(4):742.  
[7] 袁带秀,兰康云,张永康. 杜仲粕对 *D*-半乳糖致衰老小鼠学习记忆能力的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013,33(17):4188.  
[8] 陈莹,才媛,王琦. 裂褶菌胞外多糖对 *D*-半乳糖致衰老小鼠学习记忆及代谢产物的影响[J]. 中国药理学通报,2012,28(2):274.  
[9] 邓锦波,牛艳丽,皇甫超,等. 神经细胞凋亡在脑发育和神经退行性疾病中的作用[J]. 医学研究杂志, 2010,39(8):9.  
[10] 李质馨,窦肇华,鲁质博,等. 胎脑提取液对衰老小鼠大脑皮质神经元的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2004,13(2):214.  
[11] 江刚,舒斯云,包新民,等. 学习记忆过程中磷酸化的 CREB 在大鼠脑纹状体内的表达[J]. 中国临床康复, 2004,8(7):1232.  
[12] Nagakura A, Niimura M, Takeo S. Effects of a phosphodiesterase IV inhibitor rolipram on microsphere embolism-induced defects in memory function and cerebral AMP signal transduction system in rats[J]. Br J Pharmacol,2002,135(7):1783.  
[13] Pugazhenth S, Wang M, Pham S, et al. Downregulation of CREB expression in Alzheimer's brain and in  $\alpha\beta$ -treated rathippocampal neurons[J]. Mol Neurodegener, 2011,6:60.  
[14] Takeo S, Niimura M, Miyake-Takagi K, et al. A possible mechanism for improvement by a cognition-enhancer nefiracetam of spatial memory function and cAMP-mediated signal transduction system in sustained cerebral ischaemia in rats[J]. Br J Pharmacol,2003,138:642.

[责任编辑 聂淑琴]