

# 复方地黄对 AD 大鼠学习记忆及 Wnt 通路 相关蛋白表达的影响

姚宏波, 王月静, 廉洁, 张萌, 孙丽慧\*

(齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**[摘要]** **目的:**观察复方地黄对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠学习记忆及 Wnt 通路相关蛋白表达的影响,探讨其作用机制。**方法:**采用 Morris 水迷宫筛选出健康 Wistar 大鼠,随机分为正常组,模型组,复方地黄高、低剂量(3.37, 1.35 g·kg<sup>-1</sup>)组,加兰他敏(0.6 mg·kg<sup>-1</sup>)组。双侧海马区注射  $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )<sub>23-35</sub>造模(每侧 10  $\mu$ L),注射后第 9 天,ig 相应药物,持续 30 d。采用水迷宫检测大鼠的学习记忆能力,用免疫组化、免疫印迹及实时荧光定量 PCR 检测大鼠海马 Wnt 通路相关蛋白轴蛋白(Axin)及细胞周期蛋白(Cyclin D<sub>1</sub>)表达。**结果:**模型组大鼠逃避潜伏期和首次到达原平台象限的时间均较正常组显著增多( $P < 0.01$ )。与模型组比较,加蓝他敏组及复方地黄高、低剂量组大鼠逃避潜伏期和首次到达原平台象限的时间明显减少( $P < 0.05$ )。复方地黄高剂量组较加兰他敏组首次到达原平台象限的时间减少( $P < 0.05$ )。免疫组化结果显示阳性表达 Axin 在胞质,Cyclin D<sub>1</sub> 在胞核。免疫印迹法及实时荧光定量 PCR 结果显示,与正常组大鼠比较,模型组大鼠海马 Axin mRNA 及蛋白表达显著增高( $P < 0.01$ );与模型组比较,复方地黄高、低剂量组及加兰他敏组大鼠海马 Axin mRNA 及蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ),Cyclin D<sub>1</sub> mRNA 及蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ )。**结论:**复方地黄可以改善 AD 模型大鼠学习记忆能力,其作用机制可能与降低 AD 大鼠海马 Wnt 通路相关蛋白 Axin,增强 Cyclin D<sub>1</sub> 表达密切相关。

**[关键词]** 阿尔茨海默病; 复方地黄; Wnt; 轴蛋白; 细胞周期蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)13-0107-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2016130107

## Effects of Compound Rehmanniae Radix on Learning and Memory Ability and Expression of Wnt Passway Associated Proteins in Hippocampus of Rats with Alzheimer's Disease

YAO Hong-bo, WANG Yue-jing, LIAN Jie, ZHANG Meng, SUN Li-hui\*

(Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of compound Rehmanniae Radix on learning and memory abilities, as well as expressions of Wnt pathway associated proteins in Alzheimer's disease (AD) model rats. **Method:** The 60 healthy Wistar rats were screened by Morris water maze, and randomly divided into 5 groups: normal group, model group, compound Rehmanniae Radix low does (1.35 g·kg<sup>-1</sup>) group, compound Rehmanniae Radix high does (3.37 g·kg<sup>-1</sup>) group and galanthamine (0.6 mg·kg<sup>-1</sup>) group,  $n = 12$  in each group. The AD models were induced by injecting A $\beta$ <sub>23-35</sub> in the bilateral hippocampus, 10  $\mu$ L for each side at one time. On 9<sup>th</sup> day after injection of A $\beta$ <sub>23-35</sub>, the rats in compound Rehmanniae Radix groups and galanthamine group were given with corresponding medicines by intragastric administration for a course of 30 days. The water maze test was used to evaluate the learning and memory ability in rats, the positioning and quantitative expressions of Wnt pathway associated proteins (Axin) and cell cycle proteins (Cyclin D<sub>1</sub>) in hippocampus were detected by immunohistochemistry, Western blot and Real-time PCR. **Result:** As compared with the normal group, the escape

**[收稿日期]** 20160115(002)

**[基金项目]** 齐齐哈尔市科技局项目(SFGG-201409)

**[第一作者]** 姚宏波, 硕士, 讲师, 从事中西医结合防治老年痴呆研究, Tel:0452-2663167, E-mail:22868204@qq.com

**[通讯作者]** \* 孙丽慧, 硕士, 教授, 从事中西医结合防治老年痴呆研究, Tel:18604529916, E-mail:369426303@qq.com

latency and the time to first reach the original platform quadrant were significantly more in model group ( $P < 0.01$ ). As compared with the model group, the escape latency and the time to first reach the original platform quadrant were significantly reduced in galanthamine group and compound *Rehmanniae Radix* groups ( $P < 0.05$ ). As compared with galanthamine group, the time to first reach the original platform quadrant was reduced in compound *Rehmanniae Radix* high dose group ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemistry results showed that, positive expression was in cytoplasm for Axin and in nucleus for Cyclin D<sub>1</sub>. Western blot and Real-time PCR test results showed that, as compared with the normal group, the protein and mRNA expression levels of Axin in hippocampus were significantly increased in the model group ( $P < 0.01$ ), as compared with the model group, the protein and mRNA expression levels of Axin in hippocampus were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), while the protein and mRNA expression levels of Cyclin D<sub>1</sub> were significantly increased in compound *Rehmanniae Radix* groups and the galanthamine group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Compound *Rehmanniae Radix* can improve the ability of learning and memory in AD rats, and its mechanism may be closed related to reducing the expression of Wnt pathway related proteins Axin and enhancing the expression of Cyclin D<sub>1</sub> in hippocampus of AD rats.

[ **Key words** ] Alzheimer's disease; compound *Rehmanniae Radix*; Wnt; Axin; Cyclin D<sub>1</sub>

阿尔茨海默病(AD)是中枢神经系统退行性疾病,主要表现为学习记忆能力损害<sup>[1]</sup>。脑内老年斑形成、含有 tau 蛋白的神经元纤维缠结以及神经元缺失变性是其 3 大病理学特征<sup>[2]</sup>。中医学认为 AD 是一个多因素相互作用的疾病,发病机制主要为肾精亏虚、痰浊阻窍、瘀血阻滞。复方中药在延缓脑衰老方面有丰富的理论和经验<sup>[3]</sup>。复方地黄有滋阴养血、益肾健脾、祛痰清瘀的作用<sup>[4]</sup>,已有报道用此药防治 AD 取得较好的效果<sup>[5-6]</sup>。但基于 Wnt 通路研究复方地黄对 AD 的治疗作用,目前未见报道。Wnt 信号分子与神经变性疾病,与 AD 的发生发展过程密切相关<sup>[7]</sup>,在经典 Wnt 途径中  $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)是主要的胞浆内效应分子<sup>[8]</sup>,细胞周期蛋白(Cyclin D<sub>1</sub>)为 Wnt 信号转导通路下游重要的靶基因。本研究检测复方地黄对 AD 模型大鼠学习记忆及 Wnt 信号转导通路相关蛋白轴蛋白(Axin)及 Cyclin D<sub>1</sub> 的影响,揭示复方地黄防治 AD 的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 6~8 月龄清洁级雄性 Wistar 大鼠,体重(220 ± 20)g,由哈尔滨医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(黑)2013-0001。

**1.2 试剂** 兔抗 Axin 抗体一抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号 bs-2439R);兔抗 Cyclin D<sub>1</sub> 抗体一抗,羊抗兔 IgG,免疫印迹 ECL 检测试剂,DAB 显色法检测试剂盒(武汉博士德生物工程公司,批号分别为 BA0770-2,BA1003,SA1022,SA2022); $\beta$ -淀粉样蛋白( $A\beta$ )<sub>23-35</sub>,RNA 抽提试剂盒(Sigma 公司,批号分别为 A4559,T9424);SYBR Green Real-time PCR Super Mix(Invitrogen 公司,批号 11762100);氢

溴酸加兰他敏(陕西森弗生物技术有限公司,批号 H20061112),用蒸馏水配置成 0.12 g·mL<sup>-1</sup> 的药液;复方地黄按文献方法制备<sup>[9]</sup>,经齐齐哈尔市中医医院药局主任药剂师贾旭鉴定,熟地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 块根经蒸法加工炮制而成,茯苓为多孔菌科茯苓真菌 *Poriacocos Schw* 的干燥菌核,何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* 的干燥块根,泽泻为泽泻科植物泽泻 *Alisma orientalis* 的干燥块根,龟板为龟科动物乌龟 *Chinemys reeresii* 的腹甲等,中药饮片加 8 倍量的水浸泡 2 h 后煎煮,第 1 次煎煮 2 h,第 2 次煎煮 1.5 h,合并 2 次滤液,浓缩至含生药 1 g·mL<sup>-1</sup>。

**1.3 仪器** DMS-2 型 Morris 水迷宫实验系统(中国医学科学院药物研究所);ZH-蓝星 B 脑型立体定位仪(徽正华生物仪器设备有限公司)。

## 2 方法

**2.1 分组** Wistar 雄性大鼠按 Morris 水迷宫定位航行实验进行筛选,除去先天愚型,筛选出 60 只,随机分为正常组,模型组,复方地黄低、高剂量组,加兰他敏组,每组 12 只。

**2.2 造模** 除正常组外,各组大鼠麻醉,脑立体定位仪固定,暴露顶骨,根据大鼠脑立体定位仪图谱<sup>[10]</sup>,选择大鼠海马区进行  $A\beta$ <sub>23-35</sub> 注射,注射部位:前囟后 3.5 mm,中线外侧 2.0 mm,硬脑膜下 2.7 mm。每侧 10  $\mu$ L,5 min 内注完,注完后留针 5 min,术后用牙托粉封固骨孔,缝合皮肤,消炎处理。注射  $A\beta$ <sub>23-35</sub> 后第 8 天进行水迷宫定位航行实验,检测造模是否成功。

**2.3 给药** 注射  $A\beta$ <sub>23-35</sub> 后第 9 天开始给药。复方

地黄低、高剂量组参照文献[11] ig 药液 1.35, 3.37 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 相当于临床剂量的 6, 15 倍; 加兰他敏组 ig 氢溴酸加兰他敏 0.6 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>; 正常组和模型组 ig 等量蒸馏水; 均给药 30 d。

**2.4 大鼠行为学检测** Morris 水迷宫水池等分为 4 个象限, 1 个象限正中设平台象限<sup>[12]</sup>。前 4 天定位航行实验中大鼠每次自入水直至寻找到平台并爬上平台的时间(s)为逃避潜伏期。第 1 天不设立平台, 自由游泳 120 s, 共 2 次。第 2~4 天, 上、下午各进行 1 次定位航行实验, 将大鼠在非平台象限任一点面向水池壁方向放入水中, 同一大鼠总是在同一象限放入, 记录逃避潜伏期。每次结束后, 为加强大鼠记忆, 将大鼠放在平台上 15 s。第 5 天开始进行空间探索实验, 撤去平台, 将大鼠从同一个象限放入水中, 测验大鼠对原平台的记忆, 记录其第 1 次到达原平台位置的时间<sup>[13]</sup>。将 6 次逃避潜伏期均 > 120 s 者视为先天愚型。在造模结束后第 7 天记录逃避潜伏期检测造模是否成功。在末次给药(注射 Aβ<sub>23-35</sub> 后第 39 天)结束后, 再次进行定位航行实验和空间探索实验, 以记录的 6 次逃避潜伏期的平均值为平均逃避潜伏期。

**2.5 免疫组化检测相关蛋白表达** 水迷宫结束 24 h 后, 每组取 4 只大鼠麻醉, 开胸后从左心室插管至升主动脉, 生理盐水 80 mL 灌流冲洗, 灌注固定, 取脑组织 4 °C 固定 2 h。海马区组织石蜡切片。切片用二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水, 抗原修复, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理, 封闭, 加入兔抗 Axin 或 Cyclin D<sub>1</sub> 抗体(1:100), 4 °C 孵育过夜, 漂洗, 加入羊抗兔 IgG(1:200) 室温孵育 2 h, 显色, 封片, 拍照<sup>[14]</sup>。

**2.6 免疫印迹法检测相关蛋白表达** 水迷宫结束 24 h 后, 每组取 4 只大鼠处死, 取海马组织, 提取蛋白, 测定蛋白浓度, 蛋白变性, 电泳, 转膜, 加入一抗(1:500)孵育, 二抗孵育, 化学发光法检测, 凝胶成像仪成像; 以 β-actin 为内参, 结果用目标条带吸光度/β-actin 条带吸光度表示蛋白相对表达<sup>[15]</sup>。

**2.7 实时荧光定量 PCR 检测相关 mRNA 表达** 水迷宫结束 24 h 后, 每组取 4 只大鼠海马组织, 应用试剂盒提取细胞总 RNA, 按逆转录反应试剂盒说明操作合成 cDNA。按试剂盒说明操作进行实时定量 PCR 扩增反应<sup>[16]</sup>, 引物序列: Axin(452 bp) 上游 5'-ACCGAAATACATTCTTATAAC-3'; 下游 5'-TCCATACCTA ACTCTCTC-3'。Cyclin D<sub>1</sub>(181 bp) 上游 5'-CCATGTCTGAGAGACTGGTCT-3', 下游 5'-GCAAGAATGTGCCAGACTCA-3'。β-actin(182 bp)

上游 5'-AGGGAAATCGTGCCTGACAT-3', 下游 5'-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3'。结果以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 表示。

**2.8 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 统计, 数据采用 One-Way ANOVA 进行方差分析, 两两比较采用 LSD 法。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 复方地黄对 AD 模型大鼠学习记忆的影响** 造模后, 模型组平均逃避潜伏期及首次到达原平台象限的时间较正常组显著延长 ( $P < 0.01$ )。治疗后, 与模型组比较, 复方地黄组及加兰他敏组平均逃避潜伏期及首次到达原平台象限的时间均明显缩短 ( $P < 0.05$ ); 复方地黄高剂量组首次到达原平台象限的时间较加兰他敏组明显减少 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

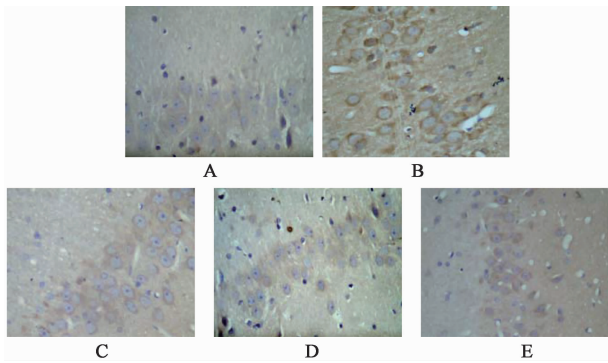
表 1 复方地黄对 AD 模型大鼠学习记忆的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )  
Table 1 Effect of compound Rehmanniae Radix on learning and memory abilities in AD model rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/ g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup>	平均逃避 潜伏期	首次到达原平台 象限时间
正常	-	25.41 ± 3.78	18.82 ± 2.92
模型	-	41.32 ± 7.29 <sup>1)</sup>	36.28 ± 9.68 <sup>1)</sup>
复方地黄	1.35	33.18 ± 5.73 <sup>2)</sup>	28.95 ± 7.43 <sup>2)</sup>
	3.37	34.25 ± 5.59 <sup>2)</sup>	22.56 ± 5.04 <sup>2,3)</sup>
加兰他敏	0.6 × 10 <sup>-3</sup>	35.34 ± 4.84 <sup>2)</sup>	27.72 ± 4.97 <sup>2)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 与加兰他敏组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$  (图 3, 表 2 同)。

**3.2 复方地黄对 AD 模型大鼠海马 CA1 区 Axin 及 Cyclin D<sub>1</sub> 蛋白表达的影响** Axin 蛋白主要在胞质内表达, 模型组胞质呈棕黄色颗粒增多, 核固缩, 核仁不明显; 而复方地黄低高剂量组和加兰他敏组细胞内棕黄色颗粒表达减少。Cyclin D<sub>1</sub> 蛋白主要在胞核表达, 模型组细胞核固缩, 排列不规则, 细胞间隙扩大, 核内棕黄色颗粒表达减少; 复方地黄低高剂量组和加兰他敏组细胞可见充满棕黄色颗粒的胞核。见图 1, 2。

**3.3 复方地黄对 AD 模型大鼠海马 CA1 区相关蛋白表达的影响** 正常组大鼠海马组织 Axin 及 Cyclin D<sub>1</sub> 表达信号较弱; 模型组大鼠 Axin 蛋白表达显著增强 ( $P < 0.01$ ), 复方地黄低、高剂量组和加兰他敏组 Axin 蛋白表达较模型组明显减弱 ( $P < 0.05$ ), Cyclin D<sub>1</sub> 蛋白表达较模型组明显增强 ( $P < 0.05$ )。见图 3。



A. 正常组; B. 模型组; C~D. 复方地黄低、高剂量组; E. 加兰他敏组 (图 2, 3 同)

图 1 各组大鼠海马 CA1 区 Axin 蛋白表达 (免疫组化,  $\times 400$ )  
Fig. 1 Effect of compound Rehmanniae Radix on Axin protein expression in CA1 area of hippocampus in each group (IHC,  $\times 400$ )

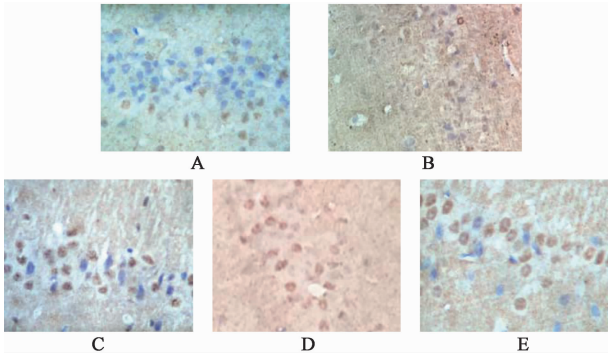


图 2 各组大鼠海马 CA1 区 Cyclin D<sub>1</sub> 蛋白的表达 (免疫组化,  $\times 400$ )  
Fig. 2 Effect of compound Rehmanniae Radix on Cyclin D<sub>1</sub> protein expression in CA1 area of hippocampus in each group (IHC,  $\times 400$ )

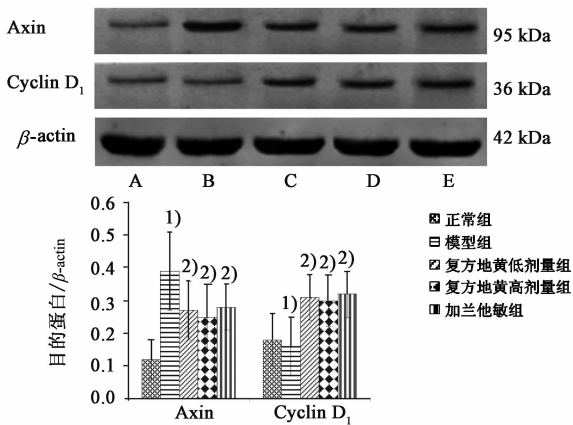


图 3 各组大鼠海马 Axin 及 Cyclin D<sub>1</sub> 蛋白表达  
Fig. 3 Effect of compound Rehmanniae Radix on Axin and Cyclin D<sub>1</sub> protein expressions in hippocampus in each group

**3.4 复方地黄对 AD 模型大鼠 Axin, Cyclin D<sub>1</sub> mRNA 表达的影响** 与正常组大鼠比较, 模型组大鼠海马 Axin mRNA 扩增倍数显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 复方地黄低、高剂量组和加兰他敏组大鼠海马 Axin mRNA 扩增倍数明显下降 ( $P <$

0.05), 而 Cyclin D<sub>1</sub> 明显增加 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 复方地黄对 AD 模型大鼠海马 Axin 及 Cyclin D<sub>1</sub> mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

**Table 2 Effect of compound Rehmanniae Radix on mRNA expressions of Axin and Cyclin D<sub>1</sub> in hippocampus in each group** ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	Axin	Cyclin D <sub>1</sub>
正常	-	0.72 $\pm$ 0.21	0.86 $\pm$ 0.18
模型	-	1.63 $\pm$ 0.23 <sup>1)</sup>	0.76 $\pm$ 0.29
复方地黄	1.35	1.18 $\pm$ 0.26 <sup>2)</sup>	1.22 $\pm$ 0.30 <sup>2)</sup>
	3.37	1.15 $\pm$ 0.31 <sup>2)</sup>	1.21 $\pm$ 0.28 <sup>2)</sup>
加兰他敏	0.6 $\times 10^{-3}$	1.20 $\pm$ 0.25 <sup>2)</sup>	1.29 $\pm$ 0.23 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

AD 的发病危险因素之一为突触丢失诱导的神经元死亡<sup>[17]</sup>, 而 Wnt 信号通路的激活可以促进神经之间突触的发生, 而使神经元免受伤害。Wnt/ $\beta$ -catenin 通路中细胞质内大量游离  $\beta$ -catenin 通过核膜进入细胞核, 启动 Wnt 信号通路, 并作用于相关靶基因。Axin 为正常体轴形成的抑制物, 通过将糖原合成激酶-3 $\beta$  (Gsk-3 $\beta$ ), 和底物  $\beta$ -catenin 相结合, 促进  $\beta$ -catenin 的磷酸化, 后经泛素化途径而降解, 从而降低胞质内游离  $\beta$ -catenin 水平, 抑制 Wnt 通路转导。Wnt 通路的激活可以启动 Cyclin D<sub>1</sub> 转录<sup>[18]</sup>。Cyclin D<sub>1</sub> 是调节神经元离开 G<sub>0</sub> 进入 G<sub>1</sub> 期的关键分子。用 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的激活剂或 Wnt 配体作用后可通过增强  $\beta$ -catenin 及该通路靶基因中存活基因 (如 Cyclin D<sub>1</sub>) 的表达而减弱 A $\beta$  的神经毒性, 从而对细胞起保护作用<sup>[19]</sup>。对 Cyclin D<sub>1</sub> 的调控机制进行研究有助于认识 Cyclin D<sub>1</sub> 在 AD 病理中的作用<sup>[20]</sup>。本研究发现, 模型组 Axin 表达增强, 从而使胞质内游离的  $\beta$ -catenin 降解增加, Wnt 信号通路受抑制, 而 Cyclin D<sub>1</sub> 的表达有所下调。治疗后, 各组 Axin 表达明显下调, 对胞质内游离  $\beta$ -catenin 的降解减少, 导致游离的  $\beta$ -catenin 增多, Wnt 通路被激活, 促进神经元之间突触的发生。说明复方地黄可能通过激活 Wnt 通路, 调控细胞周期, 从而对神经元发挥保护作用。但其作用机制是否是通过增加  $\beta$ -catenin 的稳定性, 降低 Caspase-3 的活性, 从而抑制细胞凋亡, 提高细胞存活率, 还需进一步研究。

中医临床中, 老年痴呆的病因为风扰、气滞、血瘀、亏虚等。病理性质多为本虚标实、虚实夹杂。主要临床表现为脾肾两虚、气血两虚、阴阳两虚证<sup>[21]</sup>。肾精亏虚证临床上主要表现为善忘、表情呆板、腰膝酸软、倦怠思卧、体质虚弱、齿枯发焦、免疫力低下、内分泌失调、性功能减退<sup>[22]</sup>。中医“肾生髓, 脑为髓

海”的理论指导临床应用补肾中药防治痴呆和提高记忆能力。熟地黄为复方地黄首推,性甘、微温,归肝、肾经,具有补血滋阴,填精益髓的功效,临床常用其补肾益精生髓的作用来防治 AD<sup>[23]</sup>。同时其对于化学药品所致记忆障碍模型小鼠具有增强其学习记忆和空间记忆能力的作用<sup>[24]</sup>。龟板为君,补肾主骨生髓充脑,滋补肾阴;次用山药、山茱萸、人参、何首乌为臣,以补脾气益肾精,气阴两生,君臣共济;再用牡丹皮、泽泻、茯苓、丹参为佐,调和五脏气血,滋补不会太过;最后用石菖蒲、远志为使,以引药入清窍,充脑安神<sup>[25]</sup>。研究表明,复方地黄能增强 Wnt 信号通路的传导,验证了从“益肾健脾、祛痰清瘀”治疗 AD 的理论可行性。阳性药物加兰他敏作为第 2 代乙酰胆碱酯酶抑制剂,用于治疗轻、中度 AD,临床有效率为 50% ~ 60%<sup>[26]</sup>。

综上,本研究认为复方地黄治疗 AD 模型大鼠,可以明显改善 AD 大鼠的学习记忆能力,其机制可能通过改变 Wnt 信号相关蛋白的表达,而发挥其恢复神经功能的作用,改善 AD 的症状。

[参考文献]

[1] 袁电杰,张印发,姚春香. 灵芝多糖对阿尔茨海默病模型大鼠海马内突触及突触素表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):151-155.

[2] 韦云,刘剑刚,李浩,等.  $\gamma$ -分泌酶、淀粉样前体蛋白和早老蛋白 1 在阿尔采末病中相关性的研究进展[J]. 中国药理学通报,2014,30(2):167-169.

[3] 杨斌. 复方地黄对老年痴呆动物模型学习记忆能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):195-197.

[4] 刘丹阳,侯魁元. 复方地黄对快速老化痴呆小鼠脑组织凋亡机制的实验研究[J]. 医学研究杂志,2011,40(6):66-70.

[5] 冯靖涵,蔡宝昌,过伟峰,等. 中医药治疗阿尔茨海默病的实验研究进展[J]. 南京中医药大学学报,2012,28(4):394-396.

[6] 李林,张兰. 中药治疗阿尔茨海默病的作用特点[J]. 生物化学与生物物理进展,2012,39(8):816-828.

[7] Angers S, Moon R T. Proximal events in Wnt signal transduction[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2009,10(7):468-477.

[8] Nelson W J, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways [J]. Science, 2004, 303(5663):1483-1487.

[9] 张海燕,刘忠锦,廉洁,等. 复方地黄对老年痴呆大鼠学习记忆及海马 GDNF mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(10):280-283.

[10] 陈生弟,王刚. 阿尔茨海默氏病的昨天、今天和明天:痴呆研究的历史、现状和展望[J]. 中国现代神经疾

病杂志,2010,4(2):147-149.

[11] 刘吉成,牛英才,朱坤杰. 复方地黄对脑老化大鼠学习记忆能力和脑组织 SOD 活性的影响[J]. 中国老年学杂志,2008,28(21):2098-2099.

[12] 何绘敏,王滨,马晓凯,等. Morris 水迷宫训练后即早基因 c-Fos 及 c-Jun 在大鼠丘脑前核的表达[J]. 解剖科学进展,2012,18(3):255-258.

[13] 武海霞,吴志刚,刘红彬,等. Morris 水迷宫实验在空间学习记忆研究中的应用[J]. 神经药理学报,2014,4(5):30-35.

[14] 周华. 针灸预处理对老年痴呆模型大鼠 Wnt 转导通路影响的实验研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2009.

[15] 肖绪武,何绘敏,孙谨,等. Morris 水迷宫训练后丘脑前核胞外信号调节蛋白激酶表达的变化[J]. 解剖科学进展,2012,18(4):329-332.

[16] 陈攀,徐志伟,敖海清,等. 四逆散、六味地黄丸诱导神经干细胞增殖及对 c-myc mRNA, Cyclin D<sub>1</sub> mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(23):137-141.

[17] Zhou Y, Luo Y, Dai J. Axonal and dendritic changes are associated with diabetic encephalopathy in rats: an important risk factor for Alzheimer's disease [J]. J Alzheimer's Dis, 2013, 34(4):937-947.

[18] 吴明,朱元贵,陈晓春,等. Wnt 信号传导通路在阿尔茨海默病防治中的作用[J]. 国际神经病学神经外科学杂志,2009,36(6):525-529.

[19] Beaulieu J M, Marion S, Rodriguiz R M, et al. A beta-arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior [J]. Cell, 2008, 132(1):125-136.

[20] 熊萍,杜艳军,夏微光,等. 电针加艾灸对 AD 模型大鼠海马细胞周期调节因子 CyclinD1、p16INK4a 的影响[J]. 湖北中医杂志,2012,34(11):27-28.

[21] 林善花,韩莹,王喜军. 中药及其复方制剂在老年性痴呆中的研究进展[J]. 中医药信息,2015,32(3):129-131.

[22] 王红梅,宋彩梅,刘新民,等. 六味地黄丸对肾虚型老年痴呆动物模型的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):112-116.

[23] 孙文贤,安红梅. 熟地黄及其复方在老年性痴呆治疗中的作用[J]. 中华中医药学刊,2014,32(4):766-768.

[24] 朱妍,徐畅. 熟地黄活性成分药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药,2011,7(11):173-175.

[25] 孙丽慧,费洪新,纪慧. 复方地黄对老年痴呆小鼠形态影响和相关增殖因素变化的研究[J]. 中华中医药学刊,2009,27(12):2605-2606.

[26] 朱奇,李振涛,纪宇,等. 加兰他敏治疗阿尔茨海默病作用机制的研究进展[J]. 天津药学,2005,17(3):38-40.

[责任编辑 张丰丰]