

生慧汤通过调节神经递质改善阿尔茨海默病模型小鼠 认知损伤和昼夜节律紊乱

龙清华¹, 赵宾宾², 丁莉², 王平^{2*}

(1. 湖北民族大学 风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室, 医学部, 湖北恩施 445000;

2. 湖北中医药大学 老年医学研究所, 武汉 430065)

[摘要] 目的:观察生慧汤对阿尔茨海默病(AD)小鼠血清中神经递质含量的影响,并探讨其改善AD认知损伤和昼夜节律紊乱的机制。方法:将27只APP/PS1小鼠随机分为模型组、多奈哌齐组和生慧汤组,另将9只野生型C57BL/6JNju正常小鼠设为空白组。多奈哌齐组($0.92 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和生慧汤组($13.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)分别灌服多奈哌齐和生慧汤,空白组和模型组灌服等体积的纯水,各组连续灌胃4周。采用Morris水迷宫实验和自主活动实验评估小鼠的认知功能和昼夜节律。采用液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)技术检测小鼠血清中乙酰胆碱(ACh)、胆碱乙酰转移酶(ChAT)、去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)、谷氨酸(Glu)、5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)和多巴胺(DA)的表达水平。结果:与空白组比较,模型组小鼠的平台潜伏期、游泳距离、初次抵达平台时间、光照活动时间、黑暗活动时间和总活动时间显著增加($P < 0.01$),穿越平台次数和目标象限游泳时间则显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组和生慧汤组小鼠的平台潜伏期、游泳距离、初次抵达平台时间、光照活动时间、黑暗活动时间和总活动时间减少($P < 0.05, P < 0.01$),穿越平台次数和目标象限游泳时间增加($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组比较,模型组小鼠血清中ACh、ChAT的表达水平显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组和生慧汤组小鼠血清中ACh、ChAT的表达水平增加($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组比较,模型组小鼠血清中Glu的表达水平显著增加($P < 0.01$),NE、5-HIAA和DA的表达水平显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,生慧汤组小鼠血清中Glu的表达水平降低($P < 0.05$),NE、5-HIAA和DA的表达水平增加($P < 0.05, P < 0.01$);多奈哌齐组小鼠血清中NE、Glu、5-HIAA、DA的表达水平较模型组变化不明显,且差异没有统计学意义。各组小鼠血清中E的表达水平变化不明显,且差异没有统计学意义。结论:生慧汤可改善AD小鼠的认知损伤和昼夜节律紊乱,其机制可能与其调节神经递质有关。

[关键词] 阿尔茨海默病; 生慧汤; 神经递质; 学习记忆; 昼夜节律

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R742 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)22-0016-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221940 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220722.1519.002.html>

[网络出版日期] 2022-07-25 9:40

Shenghuitang Mitigates Cognitive Impairment and Circadian Rhythm Disturbance in Mouse Model of Alzheimer's Disease via Regulating Expression Levels of Neurotransmitters

LONG Qinghua¹, ZHAO Binbin², DING Li², WANG Ping^{2*}

(1. Medical School, Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of

Rheumatic Diseases, Hubei Minzu University, Enshi 445000, China;

2. Institute of Geriatrics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Shenghuitang on serum levels of neurotransmitters in the mouse model of Alzheimer's disease (AD) and explore the mechanism of Shenghuitang in mitigating the

[收稿日期] 2022-06-06

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(82130119);湖北省自然科学基金青年项目(2021CFB206);湖北民族大学高水平科研成果校内培育项目(PY21015)

[第一作者] 龙清华,博士,讲师,硕士生导师,从事中医药防治脑病及老年脑病研究,E-mail: 287201413@qq.com

[通信作者] *王平,博士,教授、主任医师,博士生导师,从事脑病及老年脑病中医药防治规律研究,E-mail: pwang54@aliyun.com

cognitive impairment and circadian rhythm disturbance of AD. **Method:** Twenty-seven APP/PS1 dementia mice were randomly assigned into a model group, a donepezil ($0.92 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group, and a Shenghuitang ($13.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) group. Another nine wild-type C57BL/6JNju mice was set as the control group. The mice were administrated with corresponding drugs by gavage and the control and model groups were given the same volume of pure water. Every group was continuously treated for 4 weeks. The cognitive function and circadian rhythm of mice were evaluated by Morris water maze test and open field test. The liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was employed to determine the expression levels of acetylcholine (ACh), choline acetyltransferase (ChAT), norepinephrine (NE), epinephrine (E), glutamate (Glu), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), and dopamine (DA) in the serum. **Result:** Compared with the control group, the modeling increased the escape latency, swimming distance, time of first arrival on the platform, activity time of light environment, activity time of dark environment, and total activity time ($P < 0.01$), while it decreased the number of crossing the platform and the swimming time in the target quadrant ($P < 0.01$). Compared with the model group, donepezil and Shenghuitang decreased the escape latency, swimming distance, time of first arrival on the platform, activity time of light environment, activity time of dark environment and total activity time ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while they increased the number of crossing the platform and the swimming time in the target quadrant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the control group, the modeling down-regulated the expression levels of ACh and ChAT in the serum ($P < 0.01$). Compared with the model group, donepezil and Shenghuitang up-regulated the expression levels of ACh and ChAT in the serum ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the control group, the modeling up-regulated the expression level of Glu in the serum ($P < 0.01$) and down-regulated the expression levels of NE, 5-HIAA, and DA ($P < 0.01$). Compared with the model group, Shenghuitang down-regulated the expression level of Glu ($P < 0.05$) and up-regulated the expression levels of NE, 5-HIAA, and DA ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expression levels of NE, Glu, 5-HIAA, and DA in the donepezil group did not change significantly compared with those in the model group. The expression level of E showed no significant difference among different groups. **Conclusion:** Shenghuitang may ameliorate the cognitive impairment and circadian rhythm disturbance of AD mice by regulating the levels of neurotransmitters in the serum.

[Keywords] Alzheimer's disease; Shenghuitang; neurotransmitter; learning and memory; circadian rhythm

当前我国罹患阿尔茨海默病(AD)的患者持续增加,一项流行病学调查显示我国AD患者已突破1 000万人^[1-2]。然而,AD治疗药物种类有限,且AD的新药研发也屡遭失败。中医学认为AD属于衰老相关疾病,并已建立起AD的理法方药体系。近年来,诸多研究也相继证实中医药对AD具有一定的治疗潜力。但中药成分的复杂性极大地限制了中医药的推广和应用,因此有必要更为深入地挖掘中医药防治AD的作用机制。

目前,学术界以 β 淀粉样蛋白(A β)级联损伤假说、Tau蛋白过度磷酸化假说、胆碱能损伤假说、载脂蛋白E(ApoE)假说、神经炎症假说、线粒体功能障碍假说解释了AD发病的机制^[3-4]。尽管AD的病理机制已取得鼓舞人心的进展,但现被批准抗AD的药物仍以神经递质为基础。AD对症治疗药物多奈哌齐、利瓦斯明和加兰他敏为乙酰胆碱酯酶抑制

剂,可通过抑制乙酰胆碱(ACh)的降解而增加神经元中ACh的水平,并改善AD的认知功能^[5-6]。AD中、重度治疗药物美金刚则为谷氨酸受体拮抗剂,可通过作用N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)和谷氨酸通路而改善AD的认知功能^[7]。神经递质为神经元相互联系的媒介,神经递质摄取和存储障碍时则会引起神经递质代谢紊乱,从而引起认知损伤。目前,脑内被鉴定出的神经递质主要有胆碱类、单胺类、氨基酸类及神经肽类物质,其中胆碱类和氨基酸类神经递质与AD学习记忆关系最为密切。

本课题组长期致力于中医药防治AD的基础和临床研究,课题组前期研究发现AD发病多与脾肾亏虚、心神失养、痰蒙脑窍有关,并证实补肾健脾、养心安神和祛痰开窍代表方生慧汤可多层次、多系统和多靶点的改善AD的认知功能和病理损伤^[8-10]。

尽管生慧汤对AD已显示一定的治疗作用,但其作用机制仍有待于深入研究。本研究将以课题组前期已多次使用的APP/PS1小鼠为AD模型,并给予模型小鼠生慧汤治疗,治疗结束后,将通过Morris水迷宫实验和自主活动实验观察小鼠的认知功能和昼夜活动节律,并利用液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)技术检测小鼠血清中ACh、胆碱乙酰转移酶(ChAT)、去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)、谷氨酸(Glu)、5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)、多巴胺(DA)的表达水平,从而进一步揭示生慧汤防治AD的科学内涵。

1 材料

1.1 动物 27只SPF级5月龄雄性APP/PS1双转基因痴呆小鼠,体质量(25±3)g,9只相同月龄野生空白对照C57BL/6JNju小鼠,体质量(25±3)g,均购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK(京)2014-0004。动物实验获得湖北中医药大学动物伦理委员会审核批准,伦理审批号81573865。饲养于湖北中医药大学老年医学研究所,动物房温度(23±2)℃,室内湿度(55±5)%,动物可自由饮水和饮食。适应性饲养1周后,进行药物干预。

1.2 药物及试剂 生慧汤药物由熟地黄30g、山茱萸12g、人参9g、石菖蒲1.5g、白芥子6g、远志6g、酸枣仁15g、柏子仁15g、茯神9g组成,所有中药饮片均购自湖北中医药大学黄家湖医院,并经湖北中医药大学药学院游秋云教授鉴定合格;多奈哌齐片(卫材药业有限公司,批号1706065);甲醇、乙腈(美国Fisher Scientific公司,批号分别为163629、161387);甲酸(美国ACS恩科化学公司,批号FA-3116-0500);ACh、ChAT、NE、E、Glu、5-HIAA、DA、3,4-二羟基苯胺氢溴酸盐(DHBA)对照品(美国Sigma-Aldrich公司,批号分别为1008501、A2056、PHR1384、Y0000740、49601、H-093、PHR1090、858781)。

1.3 仪器 Morris-ZH型水迷宫和ZH-ZFT型自发活动视频分析系统(安徽正华生物仪器设备有限公司);RE-2000E型旋转蒸发仪(郑州华特仪器设备有限公司);Eppendorf 5810R型低温高速离心机(德国Eppendorf公司);BEH C₁₈型色谱柱(美国Waters公司);1290 Infinity II型高效液相色谱仪、6420 Triple Quad型三重四极杆质谱仪、Waldbronn Analytical Division B4型色谱工作站(德国Agilent Technologies公司)。

2 方法

2.1 生慧汤水煎液制备 混合生慧汤中药饮片,加入8倍体积的纯水,浸泡30min后加热煮沸,回流提取30min,过滤药液。再次加入6倍体积的纯水,加热煮沸,文火煎煮20min,过滤药液。混合2次药液,用旋转蒸发仪将药物浓缩成含生药1.35g·mL⁻¹的水煎液,封装置4℃保存备用。

2.2 动物分组及给药 将APP/PS1双转基因痴呆小鼠随机平均分为模型组、多奈哌齐组和生慧汤组,每组9只。另将9只野生型C57BL/6JNju小鼠设为空白组。根据课题组前期研究及临床等效剂量计算多奈哌齐组和生慧汤组的给药剂量^[8-12]。多奈哌齐组以0.92mg·kg⁻¹的剂量灌胃多奈哌齐水溶液,生慧汤组以13.5g·kg⁻¹的剂量灌胃生慧汤水煎液,空白组和模型组以20mL·kg⁻¹的剂量灌胃等体积纯水。各组每日灌胃1次,连续4周。

2.3 Morris水迷宫评估小鼠的认知功能 参考本课题组前期用于检测小鼠认知功能的实验方法,进行Morris水迷宫实验^[9-12]。简而言之,本实验分为定位航行实验和空间探查实验,二者分别统计平台潜伏期、游泳距离及穿越平台次数、目标象限游泳时间、初次抵达平台时间。

2.4 自主活动实验观察小鼠的昼夜活动节律 参考课题组前期研究,采用自发活动视频分析系统分析小鼠24h昼夜活动节律的变化^[13]。分别于21点、0点、3点和6点记录小鼠的黑暗活动时间,9点、12点、15点和18点则记录小鼠的光照活动时间。每个整点观察6min,其中前3min用于适应性训练,后3min用于实验统计。分析小鼠每个整点的光照活动时间、黑暗活动时间及总活动时间。

2.5 LC-MS/MS检测小鼠血清中神经递质的表达水平

2.5.1 色谱条件 色谱柱:BEH C₁₈柱(2.1mm×100mm,1.7μm),柱温30℃。流动相:0.1%甲酸水溶液(溶剂A)和乙腈(溶剂B)。梯度洗脱:0~4min,2%溶剂B;6min,80%溶剂B;8~10min,90%溶剂B。流速:0.3mL·min⁻¹。

2.5.2 质谱条件 参考本课题组前期用于神经递质检测的质谱条件^[14],将气体温度设置为350℃,气体流量设置为10L·min⁻¹,毛细管设置为4000V,雾化器压力设置为30psi。在电喷雾正离子多反应监测(MRM)模式下进行ACh、ChAT、NE、E、Glu、5-HIAA、DA的MS采集。用于定量的离子反应分别为m/z 145.8→m/z 86.8(ACh)、m/z 105.0→m/z

61.2 (ChAT)、 m/z 169.7→ m/z 151.8 (NE)、 m/z 183.8→ m/z 165.8 (E)、 m/z 147.7→ m/z 129.7 (Glu)、 m/z 191.8→ m/z 145.7 (5-HIAA)、 m/z 153.8→ m/z 136.7 (DA)。

2.5.3 神经递质对照品及质控样本的制备 取神经递质对照品 2.5 mg, 加入甲醇水溶液(含 0.1% 甲酸) 5 mL, 充分溶解后置 -20 °C 冻存储存。取适量的神经递质母液, 加入不同体积的初始流动相稀释原液(0.1% 甲酸水溶液-乙腈 98:2), 并将 ACh、ChAT、NE、E、5-HIAA、DA 稀释成 0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1 $g \cdot L^{-1}$ 的梯度质量浓度工作液, Glu 则被稀释成 0.5、1、2、5、10、20、50 $g \cdot L^{-1}$ 梯度质量浓度工作液。另用甲醇水溶液将内标 DHBA 稀释成 10 $mg \cdot L^{-1}$ 的工作液。

2.5.4 血清处理 行为学检测后, 摘眼球取血, 以 12 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min(离心半径 7.5 cm), 取上清液。各样本血清取 100 μL , 加入预冷甲醇溶液 300 μL (含 0.1% 甲酸)和内标工作液 10 μL , 漩涡震荡混匀 1 min。4 °C、15 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 10 min(离心半径 8.9 cm), 取上清液, 并在氮气流下蒸发干燥。干燥后, 加入初始流动相原液 100 μL (0.1% 甲酸水溶液-乙腈 98:2) 稀释, 转移至自动进样瓶。应用

LC-MS/MS 系统分析, 进样量为 10 μL 。

2.5.5 神经递质定量分析 以神经递质质谱峰面积与内标质谱峰面积的比值为纵坐标, 神经递质的浓度为横坐标, 绘制神经递质检测的标准曲线, 并最终求得血清中神经递质的含量。

2.6 统计学方法 运用统计软件 SPSS 23.0 分析实验数据, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Shapiro-Wilk 检验和 Levene 检验对实验数据进行正态性和方差齐性分析。符合正态分布且方差齐性, 多组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD); 符合正态分布, 但方差不齐, 多组间两两比较采用 Tamhane's T^2 法。不符合正态性, 则采用 Kruskal-Wallis H 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 AD 小鼠认知功能的影响 与空白组比较, 模型组小鼠的平台潜伏期、游泳距离及初次抵达平台时间显著增加($P < 0.01$), 穿越平台次数和目标象限游泳时间显著减少($P < 0.01$); 与模型组比较, 多奈哌齐组和生慧汤组小鼠的平台潜伏期、游泳距离及初次抵达平台时间明显减少($P < 0.05, P < 0.01$), 穿越平台次数和目标象限游泳时间明显增加($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 生慧汤对 AD 小鼠认知功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 1 Effect of Shenghuitang on cognitive function of AD mice ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	平台潜伏期 /s	游泳距离 /cm	穿越平台次数/次	目标象限游泳时间/s	初次抵达平台时间/s
空白组		10.28±3.29	479.88±62.89	6.95±0.86	19.93±2.97	9.52±2.21
模型组		19.36±3.39 ¹⁾	604.26±48.19 ¹⁾	4.13±0.64 ¹⁾	13.28±2.52 ¹⁾	17.24±2.69 ¹⁾
多奈哌齐组	9.2×10 ⁻⁴	13.25±3.07 ³⁾	539.45±49.37 ²⁾	5.09±0.94 ²⁾	17.68±4.18 ³⁾	13.39±2.22 ³⁾
生慧汤组	13.5	14.33±3.16 ³⁾	531.64±45.23 ³⁾	4.97±0.92 ²⁾	17.04±2.46 ²⁾	13.06±2.09 ³⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05, ^3)$ $P < 0.01$ (表 2-表 5 同)

3.2 对 AD 小鼠昼夜活动节律的影响 与空白组比较, 模型组小鼠的光照活动时间、黑暗活动时间和总活动时间显著增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 多奈哌齐组和生慧汤组小鼠的光照活动时间、黑暗活动时间和总活动时间减少($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

3.3 对 AD 小鼠血清中 ACh、ChAT 的影响 与空白组比较, 模型组小鼠血清中 ACh、ChAT 的表达水平显著减少($P < 0.01$); 与模型组比较, 多奈哌齐组和生慧汤组小鼠血清中 ACh、ChAT 的表达水平明显增加($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。各组小鼠血清中 ACh、ChAT 检测色谱图见增强出版附件材料。

3.4 对 AD 小鼠血清中 NE、E 的影响 与空白组比

表 2 生慧汤对 AD 小鼠光照活动时间、黑暗活动时间和总活动时间的的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Table 2 Effect of Shenghuitang on light activity time, dark activity time and total activity time of AD mice ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	光照活动时间	黑暗活动时间	总活动时间
空白组		281.59±37.13	333.83±29.71	646.82±46.19
模型组		351.47±33.29 ¹⁾	490.08±27.01 ¹⁾	841.27±66.79 ¹⁾
多奈哌齐组	9.2×10 ⁻⁴	301.83±24.98 ³⁾	451.20±34.54 ³⁾	748.23±60.55 ³⁾
生慧汤组	13.5	315.77±26.47 ²⁾	428.04±20.17 ²⁾	722.74±46.91 ³⁾

较, 模型组小鼠血清中 NE 的表达水平显著减少($P < 0.01$); 与模型组比较, 生慧汤组小鼠血清中 NE 表达显著增加($P < 0.01$), 多奈哌齐组小鼠血清中 NE 表

表3 生慧汤对AD小鼠血清中ACh、ChAT表达的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)
Table 3 Effect of Shenghuitang on expressions of ACh and ChAT in serum of AD mice ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ACh	ChAT
空白组		4.10±0.51	436.61±42.62
模型组		2.60±0.65 ¹⁾	294.53±54.67 ¹⁾
多奈哌齐组	9.2×10 ⁻⁴	3.32±0.55 ³⁾	360.14±27.15 ³⁾
生慧汤组	13.5	3.51±0.27 ²⁾	356.95±32.19 ³⁾

达减少,但差异没有统计学意义。此外,各组小鼠血清中E的表达水平变化不明显,差异没有统计学意义。见表4。各组小鼠血清中NE、E检测色谱图见增强出版附件材料。

3.5 对AD小鼠血清中Glu、5-HIAA、DA的影响

与空白组比较,模型组小鼠血清中Glu的表达水平显著增加($P<0.01$),5-HIAA和DA的表达水平显

表4 生慧汤对AD小鼠血清中NE、E表达的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)
Table 4 Effect of Shenghuitang on expressions of NE and E in serum of AD mice ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NE	E
空白组		461.19±38.25	30.07±2.66
模型组		406.14±27.73 ¹⁾	31.71±3.18
多奈哌齐组	9.2×10 ⁻⁴	394.49±36.58	34.17±4.62
生慧汤组	13.5	471.43±28.41 ³⁾	30.79±3.84

著减少($P<0.01$);与模型组比较,生慧汤组小鼠血清中Glu的表达水平显著降低($P<0.01$),5-HIAA和DA的表达水平显著增加,差异具有统计学意义($P<0.01$),多奈哌齐组小鼠血清中Glu、5-HIAA、DA的表达水平有所变化,但差异没有统计学意义。见表5。各组小鼠血清中Glu、5-HIAA、DA检测色谱图见增强出版附件材料。

表5 生慧汤对AD小鼠血清中Glu、5-HIAA、DA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Glu	5-HIAA	DA
空白组		387.82±41.67	23 629.78±2 122.25	13.99±0.84
模型组		527.93±33.29 ¹⁾	17 856.45±1 449.94 ¹⁾	11.51±0.38 ¹⁾
多奈哌齐组	9.2×10 ⁻⁴	486.65±39.41	19 470.84±1 870.66	12.22±0.29
生慧汤组	13.5	459.72±38.03 ³⁾	20 655.14±2 001.33 ³⁾	12.36±0.67 ³⁾

4 讨论

生慧汤源于陈士铎《辨证录·健忘门》,并由熟地黄一两、山茱萸四钱、人参三钱、酸枣仁五钱、柏子仁五钱、茯神三钱、远志二钱、石菖蒲五分、白芥子二钱组成。生慧汤中熟地黄、山茱萸补肾填精生髓以治肾水不足,人参补肾健脾以治脾肾亏虚,酸枣仁、柏子仁、茯神、远志养心化痰安神以治心神失养,石菖蒲、白芥子祛痰开窍以治痰蒙脑窍,全方共奏补肾健脾、养心安神和祛痰开窍之功。陈士铎^[15]认为生慧汤为“治健忘之圣药”,且“日用一剂,不特却忘,并有延龄之庆”。课题组前期研究证实生慧汤可改善AD小鼠的认知损伤和昼夜节律紊乱,亦能改善睡眠剥夺模型的认知功能、神经元和突触损伤^[8-10,13,16]。本研究Morris水迷宫实验发现,生慧汤减少了AD小鼠的平台潜伏期、游泳距离及初次抵达平台时间,同时还增加了小鼠的穿越平台次数和目标象限游泳时间,这说明生慧汤可以改善AD小鼠的认知功能。此外,自主活动实验证实生慧汤可以减少AD小鼠的光照活动时间、黑暗活动时间和总活动时间,这说明生慧汤可以缓解AD小鼠的昼夜活动节律紊乱。上述实验结果与前期研究结论

一致,均证实生慧汤可改善AD小鼠的认知功能和昼夜节律^[9-10,13]。

神经递质为神经元之间,神经元与效应细胞之间传递信息的化学物质,被认为神经信号转导的关键。神经病理学研究表明,AD涉及不同大脑区域的神经元丢失以及不同神经递质的改变。目前已证实胆碱能系统、谷氨酸能系统、5-羟色胺(5-HT)能系统、 γ -氨基丁酸能系统、多巴胺能系统都参与了AD的认知、昼夜节律及其病理过程^[7]。AD尸检表明,胆碱能系统、谷氨酸能系统及5-HT能系统的缺陷出现在AD的早期阶段, γ -氨基丁酸能系统、多巴胺能系统的缺陷则出现在AD后期阶段^[17]。胆碱能损伤假说为较早的AD病理机制,目前临床尚在使用的多奈哌齐、利瓦斯明、加兰他敏、石杉碱甲等乙酰胆碱酯酶抑制剂都是基于此假说而研发的^[5-6]。上述药物可通过抑制ACh的降解而增加神经元中ACh的水平,并改善AD的认知功能^[18]。这一过程,ChAT对ACh的合成和稳态至关重要。本研究发现,AD小鼠血清中ACh、ChAT的水平显著减少,而生慧汤则可增加小鼠血清中ACh、ChAT的水平。这说明生慧汤可以改善AD小鼠胆碱能损伤。5-HT

广泛分布于前额叶皮层、海马等脑区,并参与调节AD的抑郁、焦虑、睡眠-觉醒周期^[19]。此外,5-HT还参与调节前额叶皮层、海马的长期和短期记忆。有研究证实,AD患者和AD动物模型脑内5-HT及其代谢产物5-HIAA的表达量明显减少^[7]。本研究也发现,AD小鼠血清中5-HIAA的含量显著减少,而生慧汤则可增加小鼠血清中5-HIAA的含量。DA具有调节AD行为思想、运动方向、学习记忆及突触可塑性的作用^[20]。此外,DA还可通过调节氧化应激反应、能量代谢参与AD的病理进程^[21]。本研究发现,AD小鼠血清中DA的含量显著减少,而生慧汤则可增加小鼠血清中DA的含量。Glu为脑内兴奋性的神经递质,其产生神经毒性可造成神经元死亡^[22]。近年来,研究还发现Glu参与调节AD昼夜节律和铁死亡^[23-24]。美金刚为经典的谷氨酸受体拮抗剂,并可通过作用于NMDAR和Glu通路而改善AD的认知功能^[6-7]。本研究发现,AD小鼠血清中Glu的含量显著增加,而生慧汤则可抑制小鼠血清中Glu的表达。单氨类神经递质也参与了AD的病理进程,其中NE研究较多。NE主要在脑内蓝斑(LC)区合成,可调节与海马和皮层相关的学习记忆。研究证实LC区沉积的老年斑和神经元纤维缠结可抑制NE合成,并诱导AD神经炎症反应、血脑屏障损伤和认知障碍^[25-26]。本研究发现,AD小鼠血清中NE的含量显著减少,而生慧汤则可增加小鼠血清中NE的含量。此外,E也是脑内重要的单氨类神经递质,但E与AD的关系尚不清晰。本研究也发现,各个小鼠血清中E的含量变化不明显。

综合上述实验结果,生慧汤可以改善AD认知损伤及昼夜节律紊乱,其机制可能与其调节神经递质有关。目前,大多数研究多应用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测神经递质的含量,但该方法精确度差、误差大、成本高^[27-28]。本研究则通过应用LC-MS/MS技术建立起了一套新的神经递质检测技术,该技术建立后,可用于神经递质的精确定量,且后续检测成本低廉。但受制于研究者技术水平,本研究尚未建立起5-HT、GABA的检测技术。因此,课题组将进一步优化LC-MS/MS的检测条件,并建立起5-HT、GABA等其他神经递质的检测技术。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] JIA J, WEI C, CHEN S, et al. The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide

[J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(4):483-491.

- [2] JIA L, DU Y, CHU L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: A cross-sectional study [J]. *Lancet Public Health*, 2020, 5(12):e661-e671.
- [3] SCHELTENS P, DE STROOPER B, KIVIPELTO M, et al. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397(10284):1577-1590.
- [4] SERRANO-POZO A, DAS S, HYMAN B T. APOE and Alzheimer's disease: Advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(1):68-80.
- [5] JU Y, TAM K Y. Pathological mechanisms and therapeutic strategies for Alzheimer's disease [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(3):543-549.
- [6] VAZ M, SILVESTRE S. Alzheimer's disease: Recent treatment strategies [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 887:173554.
- [7] KANDIMALLA R, REDDY P H. Therapeutics of neurotransmitters in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57(4):1049-1069.
- [8] 张美娅,王平,游秋云,等. 生慧汤对APP/PS1双转基因AD模型小鼠海马慢性炎症的影响[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(2):339-342.
- [9] 龙清华. 补肾调心健脾法防治失眠健忘的理论探讨及生慧汤对APP/PS1痴呆小鼠神经发生的作用研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2020.
- [10] 张美娅,王平,游秋云,等. 生慧汤对APP/PS1双转基因痴呆模型小鼠下丘脑区生物钟基因Bmal1及海马IL-6, TNF- α 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(20):7-12.
- [11] 龙清华,赵宾宾,丁莉,等. 基于PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路探讨酸枣仁汤对APP/PS1双转基因痴呆小鼠海马神经元突触损伤的改善作用[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5):2546-2551.
- [12] 龙清华,丁莉,赵宾宾,等. 酸枣仁汤通过抑制APP/PS1双转基因小鼠海马神经炎症发挥神经保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(20):1-6.
- [13] 丁莉. 昼夜节律的中医理论探讨及生慧汤对APP/PS1痴呆小鼠昼夜节律的影响[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2016.
- [14] ZHAO B B, CHEN L L, LONG Q H, et al. Preventive effects of escitalopram against anxiety-like depressive behaviors in monosodium glutamate-treated rats subjected to partial hepatectomy [J]. *Front Psychol*, 2019, 10:2462.
- [15] 陈士铎. 辨证录[M]. 北京:中国中医药出版社,

- 2020:162.
- [16] 谭爱华,龙清华,王平,等. 生慧汤对慢性睡眠剥夺模型小鼠的神经保护作用及其机制[J]. 中国中西医结合杂志,2022,42(1):56-60.
- [17] PRAKASH A, KALRA J, MANI V, et al. Pharmacological approaches for Alzheimer's disease: Neurotransmitter as drug targets [J]. Expert Rev Neurother,2015,15(1):53-71.
- [18] HAMPEL H, MESULAM M M, CUELLO A C, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease[J]. Brain, 2018, 141(7):1917-1933.
- [19] LU J, ZHANG C, LV J, et al. Antiallergic drug desloratadine as a selective antagonist of 5HT2A receptor ameliorates pathology of Alzheimer's disease model mice by improving microglial dysfunction [J]. Aging Cell,2021,20(1):e13286.
- [20] PAN X, KAMINGA A C, WEN S W, et al. Dopamine and dopamine receptors in Alzheimer's disease: A systematic review and network Meta-analysis [J]. Front Aging Neurosci,2019,11:175.
- [21] NOBILI A, LA BARBERA L, D'AMELIO M. Targeting autophagy as a therapeutic strategy to prevent dopamine neuron loss in early stages of Alzheimer disease[J]. Autophagy, 2021, 17(5):1278-1280.
- [22] MATTHEWS D C, MAO X, DOWD K, et al. Riluzole, a glutamate modulator, slows cerebral glucose metabolism decline in patients with Alzheimer's disease [J]. Brain, 2021, 144(12):3742-3755.
- [23] KUMAR D, SHARMA A, TALIYAN R, et al. Orchestration of the circadian clock and its association with Alzheimer's disease: Role of endocannabinoid signaling[J]. Ageing Res Rev,2022,73:101533.
- [24] ASHRAF A, JEANDRIENS J, PARKES H G, et al. Iron dyshomeostasis, lipid peroxidation and perturbed expression of cystine/glutamate antiporter in Alzheimer's disease: Evidence of ferroptosis [J]. Redox Biol,2020,32:101494.
- [25] JACOBS H I L, RIPHAGEN J M, RAMAKERS I H G B, et al. Alzheimer's disease pathology: Pathways between central norepinephrine activity, memory, and neuropsychiatric symptoms[J]. Mol Psychiatry, 2021, 26(3):897-906.
- [26] LIU Q, XI Y, WANG Q, et al. Mannan oligosaccharide attenuates cognitive and behavioral disorders in the 5xFAD Alzheimer's disease mouse model via regulating the gut microbiota-brain axis [J]. Brain Behav Immun,2021,95:330-343.
- [27] FU J, ZHANG H, LIU S, et al. An integrated strategy using LC-MS/MS combined with in vivo microdialysis for the simultaneous determination of lignans of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. Fructus and endogenous neurotransmitters: Application in pharmacokinetic and pharmacodynamic studies [J]. Food Funct,2021,12(19):8932-8945.
- [28] WANG L S, ZHANG M D, TAO X, et al. LC-MS/MS-based quantification of tryptophan metabolites and neurotransmitters in the serum and brain of mice[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1112:24-32.

[责任编辑 孙丛丛]