

· 经典名方 ·

## 四君子汤对阿尔茨海默病大鼠行为学及海马 神经元能量代谢功能的影响

刘旭东\*, 王凌志, 刘慧慧, 马丹, 刘文俊, 于化新, 王路, 单德红  
(辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

**[摘要]** **目的:** 观察阿尔茨海默病大鼠行为学及线粒体变化,探讨四君子汤治疗阿尔茨海默病大鼠行为学及对海马神经元线粒体能量代谢变化的机制。**方法:** 将 60 只雄性 SPF 级大鼠随机分为正常组,模型组,四君子汤低、中、高剂量组(3.24, 6.48, 12.56 g·kg<sup>-1</sup>),双氢麦角碱组(0.27 mg·kg<sup>-1</sup>),每组 10 只。正常组不干预,饮食正常,其余大鼠以 200 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量向腹部注射 D-半乳糖,每日注射 1 次,共计 6 周。采用 Morris 水迷宫实验检测大鼠认知功能;采用泰盟 TM-Vision 行为学实验系统观察大鼠行为学变化;采用透射电镜观察海马神经元线粒体结构;采用比色法检测大鼠线粒体复合物 C I, C II, C III, C IV 活性;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马线粒体单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)蛋白表达。**结果:** 与正常组比较,模型组大鼠潜伏逃避期时间增加,穿越次数减少,运动距离增加,运动时间增多,中心停留时间增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),线粒体 C II, C III, C IV 活性下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),AMPK 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与模型组比较,四君子汤中、高剂量组及双氢麦角碱组大鼠潜伏逃避期时间减少,穿越次数明显增加,运动距离明显减少,运动时间明显减少,中心停留时间明显减少( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );四君子汤中剂量组与模型组比较线粒体复合物 C II, C IV 活性升高,AMPK 蛋白表达下调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),四君子汤高剂量组线粒体复合物 C II, C III 活性明显升高,AMPK 蛋白表达明显下调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:** 阿尔茨海默病大鼠行为学异常,可能与中枢海马能量代谢及线粒体功能下降有关,四君子汤有治疗作用。

**[关键词]** 阿尔茨海默病; 行为学; 海马; 线粒体; 单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK); 四君子汤

**[中图分类号]** R2-0;R285; R289; R74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)16-0001-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20191538

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190418.1129.009.html>

**[网络出版时间]** 2019-04-19 10:50

## Effect of Sijunzi Tang on Behavior and Energy Metabolism of Hippocampal Neurons in Rats with Alzheimer's Disease

LIU Xu-dong\*, WANG Ling-zhi, LIU Hui-hui, MA Dan, LIU Wen-jun,  
YU Hua-xin, WANG Lu, SHAN De-hong  
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the changes of behavior and mitochondria in Alzheimer's disease (AD) rats, and to explore the mechanism of Sijunzi Tang in the treatment of AD rats' behavior and the changes of mitochondrial energy metabolism in hippocampal neurons. **Method:** The 60 male SPF grade rats were randomly divided into normal group, model group, low, medium and high dose group of Sijunzi Tang (3.24, 6.48, 12.56 g·kg<sup>-1</sup>), and dihydroergot group (0.27 mg·kg<sup>-1</sup>), 10 rats in each group. The normal group received no intervention and had a normal diet. The rest of the rats were injected with D-galactose to the abdomen at a dose of 200 mg·kg<sup>-1</sup> once a day for 6 weeks. Morris water maze experiment was used to detect the cognitive function of rats. Tm-Vision behavioral experiment system was used to observe the behavioral changes of rats, and the hippocampal neuronal line structure was observed by transmission electron microscope. Mitochondrial complex

**[收稿日期]** 20190124(005)

**[基金项目]** 辽宁省科技厅博士启动基金项目(201601192)

**[通信作者]** \*刘旭东,博士,副教授,从事中医药对中枢神经及消化系统研究, Tel:024-31207089, E-mail: adong11@163.com

colorimetry was adopted to detect rats C I, C II, C III, C IV activity. Western blot was used to detect the expression of mitochondrial adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) protein in the hippocampus. **Result:** Compared with normal group, model group rats latent escape period time increasing, through fewer, movement distance, movement time increasing, center residence time increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), mitochondria C II, C III, C IV activity decline ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), The AMPK protein expression increased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with model group, Sijunzi Tang medium and high dose group and dihydroergot decoction group showed decreased latency, increased crossing times, decreased exercise distance, decreased exercise time, and decreased center residence time ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with model group C II, mitochondrial complex C IV activity increases, AMPK protein expression lowered ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), Sijunzi Tang high dose group of mitochondrial complex C II, C III activity increased significantly, AMPK protein expression significantly lowered ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The abnormal behavior of AD rats may be related to the decrease of central hippocampal energy metabolism and mitochondrial function. Sijunzi Tang has therapeutic effect.

**[Key words]** Alzheimer's disease; behavior; hippocampus; mitochondria; monophosphate-activated protein kinase (AMPK); Sijunzi Tang

阿尔茨海默病(AD)患者常伴随着中枢神经退行性病变,表现为健忘。AD 在我国的发病也逐渐增加,对患者家庭及社会造成较大的负担。AD 好发于老年人,病变的部位多为海马,现在研究发现,海马能量代谢障碍可能是 AD 发病的原因之一,其中和线粒体能量代谢最为密切的物质单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)可以作为感受细胞应激刺激的感受器,在调节细胞的能量代谢及对中枢退行性疾病有一定的保护作用<sup>[1]</sup>。最新文献报道,AMPK 在 AD 发病过程中,可以通过调节自身的表达,从而影响 AD 大鼠中枢线粒体功能<sup>[2]</sup>。对于中医药是否可以调节 AMPK,进而治疗 AD 鲜有报道。

AD 中医又称之为“老年呆病”,其中老年患者“脾虚”为发病的病机之一,中医在治疗 AD 方面有较为可行的思路。脾为后天之本,脾主“思”,说明脾与记忆有关,也说明脾与海马关系密切。研究发现,脾气虚大鼠海马线粒体损伤、产能减少<sup>[3]</sup>,但通过补脾,是否改善 AD 大鼠中枢能量代谢鲜有报道。线粒体作为细胞重要的细胞器,产能是其最为重要的功能之一,如果产能异常就会引起神经物质转运、细胞代谢等功能异常。在前期的实验中发现,四君子汤可以调节中枢神经元线粒体的能量代谢变化,改变脾虚大鼠的行为<sup>[4]</sup>。因此笔者观察了 AD 大鼠行为学及海马神经元线粒结构及能量代谢变化,给予大鼠四君子汤治疗,观察补脾方是否能改善 AD 大鼠行为学及线粒体的能量代谢。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性 SD 雄性大鼠 60 只,体质量

( $200 \pm 10$ ) g,购于辽宁省本溪市实验动物中心。室温  $18 \sim 23$  °C,相对湿度 45% ~ 55%,自由饮水进食,适应性饲养 1 周后开始实验。动物获得辽宁中医药大学动物伦理委员会批准。

**1.2 药物与试剂** 四君子汤(药物组成:党参片、茯苓、白术、炙甘草),本实验所用四君子汤为丸剂,由湖北广仁药业有限公司生产,批号 20120401。双氢麦角碱(瑞士山得士药厂与天津华津制药制药厂,卫药准字 X-156 号);线粒体呼吸链复合物 C I, C II, C III, C IV 活性检测试剂盒(北京索莱宝生物技术有限公司,批号分别为 BC0515, BC3230, BC3240, BC0940); AMPK 抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab32047, ab181602);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(武汉博士德生物技术有限公司,批号 ba1056)。

**1.3 仪器** Morris 水迷宫, TM-Vision 行为学实验系统(成都泰盟科技有限公司); JEM-1011 型透射电镜(日本电子公司); iMark 型酶标仪, 042BR14173 型电泳仪, Trans-Blot Turbo Transfer System 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组与模型制备** 将 60 只大鼠随机分为正常组,模型组,四君子汤低、中、高剂量组,双氢麦角碱组,每组 10 只;正常组不予干预,饮食水正常,四君子汤灌胃剂量依据人与大鼠换算比例计算<sup>[5]</sup>计算。模型组造模方法为以  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的剂量向大鼠腹部注射 D-半乳糖,每日 1 次,连续 6 周。四君子汤

低、中、高剂量组造模方法同模型组,连续 6 周,在第 5 周大鼠灌胃给予四君子汤悬浊液,用粉碎机将四君子丸粉碎,按 1:3,1:1.5,1:0.75 加入蒸馏水,灌胃前加热至 37 ℃。每天灌胃 2 次,早晚各 1 次,持续 2 周。双氢麦角碱组造模方法同模型组,连续 6 周。在第 5 周大鼠以 0.01 mL·g<sup>-1</sup>灌胃给予双氢麦角碱混悬液,混悬液质量浓度为 0.027 g·L<sup>-1</sup>,每天灌胃 2 次,早晚各 1 次,持续 2 周,以大鼠逃避潜伏期时间增加和穿越平台次数减少作为 AD 成模标准。

**2.2 旷场实验方法检测大鼠行为学** 采用泰盟 TM-Vision 行为学实验系统检测,依据参考文献[6]进行。依据软件设定实验箱为 25 个正方形小格,边长为 10 cm,每只大鼠放入实验箱中心后开始计时,每只大鼠计时时间为 5 min;观察大鼠行为学指标:运动距离、运动时间、停留在中心、角落、周边的时间,双上肢抬起后放下为 1 次垂直活动,结束后用乙醇擦拭实验箱,乙醇蒸发后放入下 1 只。

**2.3 Morris 水迷宫实验检测大鼠认知功能<sup>[7]</sup>** 在大鼠给药第 37~42 天进行 Morris 水迷宫实验。实验开始前,水迷宫中灌入温水,水温 27~30 ℃,水深超过平台 2 cm。在训练的第 1 天,大鼠被置于平台上 10 s,使其了解此安全区域的存在,然后将大鼠按顺序正对平台的固定位置放入水中,记录大鼠从入水开始到找到平台并爬上平台的时间(即为逃避潜伏期),时间设定为 90 s;每天训练 1 次,共训练 4 次。第 5 天正式检测大鼠逃避潜伏期,第 6 天去掉平台,记录 90 s 内大鼠穿过平台区的次数(即为穿越平台数/次)。

**2.4 透射电镜观察各组大鼠海马神经元线粒体超微结构** 大鼠腹腔注射 20% 乌拉坦(4 mL·kg<sup>-1</sup>)麻醉后,4 ℃下用手术刀片将海马切成约 1 mm 立方体小块,固定、漂洗后,用 1% 锇酸固定,脱水、环氧包埋聚合后采用超薄切片机切片,3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染,透射电镜观察并拍片。

**2.5 比色法检测海马线粒体呼吸链 C I ~ IV 活性** 测定准备,将待测样品置于冰槽里设定好分光光度计(温度为 30 ℃),波长 600 nm,间隔 60 s,读数 6 次(共 5 min),并置零;背景对照测定,移取 780 μL 缓冲液(Reagent A),到新的比色皿加入反应液(Reagent B) 100 μL,加入底物液(Reagent D) 20 μL,混匀后放进 30 ℃培养箱里静置 3 min,加入阴性液(Reagent C) 100 μL,混匀后即刻放入分光光度计检测;样品活性测定,移取缓冲液(Reagent A) 780 μL 到新的比色皿,加入反应液(Reagent B)

100 μL,加入底物液(Reagent D) 20 μL,混匀后放进 30 ℃培养箱里静置 3 min,加入 100 μL 待测样品,混匀后即刻放入分光光度计检测,此为样品活性读数;依据试剂盒公式计算样品活性。CI~IV 活性依次采用比色法依据说明书进行检测。

**2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马线粒体 AMPK 蛋白的表达** 取低温冻存的海马组织 15~35 mg,加入裂解液 150~250 μL,冰上研磨后 4 ℃,1 万 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,吸取上清备用。根据 BCA 法检测每粒海马蛋白浓度,凝胶电泳、转膜、切膜、封闭 2 h,加入 1:2 000 稀释的 AMPK 抗体稀释液 4 mL,4 ℃摇床过夜。TBST 洗膜,加入 4 mL HRP 标记的山羊抗兔二抗稀释(1:3 000),GAPDH(1:1 万)盒内加入 HRP 标记山羊抗鼠二抗(1:3 000) 4 mL,室温(20~30 ℃)摇床孵育、洗膜,曝光显影。应用 AlphaView SA 软件进行数据处理,应用目的蛋白与内参蛋白的方法计算蛋白的相对表达量。

**2.7 统计学方法** 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析。结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 四君子汤对 AD 大鼠学习记忆能力的影响** 与正常组比较,模型组大鼠的逃避潜伏期显著延长( $P < 0.01$ ),穿越平台数明显减少( $P < 0.05$ );与模型组比较,四君子汤中、高剂量组大鼠的逃避潜伏期明显缩短( $P < 0.05$ ),穿越平台数明显增加( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),双氢麦角碱组大鼠逃避潜伏期显著缩短( $P < 0.01$ ),穿越平台数显著增加( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 四君子汤对 AD 大鼠学习记忆影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of Sijunzi Tang on learning and memory in AD rats( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	潜伏逃避期/s	穿越数/次
正常	-	19.8 ± 9.6	11.1 ± 2.9
模型	-	40.2 ± 15.1 <sup>2)</sup>	6.7 ± 4.3 <sup>1)</sup>
四君子汤	3.24	36.1 ± 14.3	7.4 ± 2.5
	6.48	33.8 ± 12.6 <sup>3)</sup>	8.8 ± 2.6 <sup>3)</sup>
	12.56	31.5 ± 11.3 <sup>3)</sup>	9.8 ± 2.7 <sup>4)</sup>
双氢麦角碱	0.000 27	27.4 ± 10.1 <sup>4)</sup>	10.4 ± 3.4 <sup>4)</sup>

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

### 3.2 四君子汤对 AD 大鼠行为学的影响

**3.2.1 四君子汤对 AD 大鼠活动的影响** 与正常组比较,模型组大鼠运动距离明显增大( $P < 0.05$ ),

运动时间明显增多 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 四君子汤中、高剂量组大鼠运动距离显著减小

( $P < 0.01$ ), 运动时间显著减少 ( $P < 0.01$ ), 双氢麦角碱组大鼠运动时间显著减少 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 四君子汤对 AD 大鼠活动的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of Sijunzi Tang on activity of AD rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	运动距离/cm	运动时间/s	垂直活动次数/次
正常	-	1 233.976 ± 4 128.077	63.221 ± 14.021	25.8 ± 7.598
模型	-	13 089.032 ± 2 764.426 <sup>1)</sup>	69.261 ± 9.120 <sup>1)</sup>	26.0 ± 4.989
四君子汤	3.24	13 577.676 ± 2 186.144	73.534 ± 6.924	27.6 ± 5.641
	6.48	10 117.209 ± 3 442.550 <sup>4)</sup>	59.559 ± 18.134 <sup>4)</sup>	26.4 ± 8.127
	12.56	10 622.357 ± 3 482.162 <sup>4)</sup>	61.487 ± 16.978 <sup>4)</sup>	24.5 ± 7.276
双氢麦角碱	0.000 27	11 540.079 ± 4 449.602 <sup>4)</sup>	65.141 ± 12.386 <sup>4)</sup>	26.7 ± 4.218

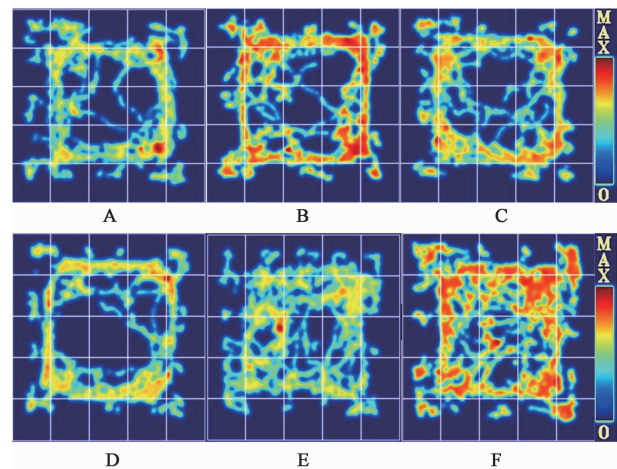
3.2.2 四君子汤对 AD 大鼠不同区域停留时间的影响 与正常组比较, 模型组大鼠中心停留时间明显增多 ( $P < 0.05$ ), 周边停留时间明显减少 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 四君子汤中、高剂量组中心

停留时间明显减少 ( $P < 0.05$ ), 四君子汤低、中、高剂量组大鼠周边停留时间明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 双氢麦角碱组大鼠中心停留时间及周边停留时间均明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 3 和图 1。

表 3 四君子汤对 AD 大鼠不同区域停留时间的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of Sijunzi Tang on residence time in different regions of AD rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	中心停留时间/s	角落停留时间/s	周边停留时间/s
正常	-	152.303 ± 40.043	24.358 ± 12.588	122.809 ± 30.033
模型	-	159.827 ± 30.595 <sup>1)</sup>	25.521 ± 10.904	114.541 ± 29.180 <sup>1)</sup>
四君子汤	3.24	147.859 ± 19.543	27.755 ± 6.174	126.743 ± 16.938 <sup>3)</sup>
	6.48	150.700 ± 50.831 <sup>3)</sup>	26.403 ± 12.088	122.909 ± 36.064 <sup>3)</sup>
	12.56	153.928 ± 37.539 <sup>3)</sup>	26.145 ± 6.690	133.099 ± 36.291 <sup>4)</sup>
双氢麦角碱	0.000 27	152.254 ± 29.514 <sup>3)</sup>	29.173 ± 8.151	128.126 ± 21.252 <sup>4)</sup>



A. 正常组; B. 模型组; C. 四君子汤低剂量组; D. 四君子汤中剂量组; E. 四君子汤高剂量组; F. 双氢麦角碱组 (图 2~3 同)

图 1 四君子汤对 AD 大鼠不同区域停留时间的影响

Fig. 1 Effect of Sijunzi Tang on residence time in different regions of AD rats

3.3 四君子汤对 AD 大鼠海马神经元线粒体结构的影响 正常组大鼠线粒体结构正常, 模型组及

四君子汤低剂量组大鼠海马神经元线粒体出现空泡化、嵴减少; 四君子汤中、高剂量组及双氢麦角碱组大鼠海马脑神经元线粒体包膜完整, 空泡化减少。见图 2。

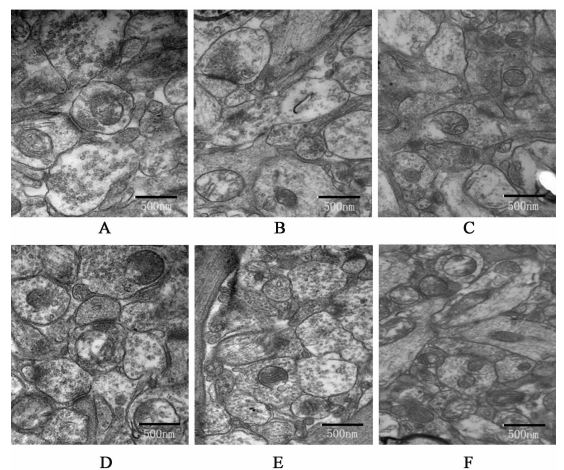


图 2 四君子汤对 AD 大鼠海马神经元线粒体结构的影响 (电镜,  $\times 12\ 000$ )

Fig. 2 Effect of Sijunzi Tang on mitochondrial structure of hippocampal neurons in AD rats (TEM,  $\times 12\ 000$ )

**3.4 四君子汤对 AD 大鼠海马神经元线粒体复合物活性影响** 与正常组比较,模型组 C II 活性明显降低 ( $P < 0.01$ ), C III, C IV 活性明显降低 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,四君子汤中剂量组 C II 活性显著升高 ( $P < 0.01$ ), C IV 活性明显升高 ( $P < 0.05$ );四君子汤高剂量组 C II, C III 活性显著升高 ( $P < 0.01$ );双氢麦角碱组 C III 活性明显升高 ( $P < 0.01$ ), C IV 活性显著升高 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

**3.5 四君子汤对 AD 大鼠海马神经元 AMPK 含量影响** 与正常组比较,模型组 AMPK 含量显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,四君子汤低、中、高剂量组 AMPK 含量显著降低 ( $P < 0.01$ ),双氢麦角碱组 AMPK 含量明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 3,表 5。

#### 4 讨论

AD 是一种进行性的中枢神经系统退行性疾病,临床主要表现为认知功能障碍和记忆功能的减退,患者常常伴有神志淡漠。该病的发病机制不明,目前有以下假说: $\beta$ -淀粉样蛋白假说<sup>[8]</sup>,tau 蛋白假说<sup>[9]</sup>,能量代谢假说<sup>[10]</sup>,氧化应激假说等。应对不同假说实验室造模方法可以根据不同假说模拟致病因素进行造模,各种假说虽然都能部分证明 AD 的发病机制,造模方法也能针对特定的致病因素造模成功,但都不能全面展示疾病的发生发展的全过程。由于 AD 发病,以老年人发病为主,根据中医对于人体在衰老过程中的认识,年老后,由于脾失健运,往往存在脾气不足,先天之精-肾精渐亏、后天之精-

表 4 四君子汤对 AD 大鼠海马神经元线粒体复合物活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of Sijunzi Tang on mitochondrial complex activity of hippocampal neurons in AD rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	C I	C II	C III	C IV
正常	-	22.334 $\pm$ 4.076	25.934 $\pm$ 4.141	20.385 $\pm$ 3.311	71.892 $\pm$ 9.235
模型	-	21.993 $\pm$ 3.942	18.947 $\pm$ 2.684 <sup>2)</sup>	15.587 $\pm$ 3.261 <sup>1)</sup>	63.591 $\pm$ 5.870 <sup>1)</sup>
四君子汤	3.24	20.630 $\pm$ 3.998	19.281 $\pm$ 4.058	16.873 $\pm$ 3.725	60.209 $\pm$ 8.760
	6.48	19.572 $\pm$ 4.244	26.034 $\pm$ 3.724 <sup>4)</sup>	16.873 $\pm$ 3.725	69.484 $\pm$ 7.860 <sup>3)</sup>
	12.56	23.075 $\pm$ 5.156	26.619 $\pm$ 5.194 <sup>4)</sup>	22.885 $\pm$ 4.637 <sup>4)</sup>	66.822 $\pm$ 9.686
双氢麦角碱	0.000 27	23.683 $\pm$ 4.697	21.195 $\pm$ 3.463	23.586 $\pm$ 6.755 <sup>4)</sup>	73.954 $\pm$ 6.002 <sup>3)</sup>

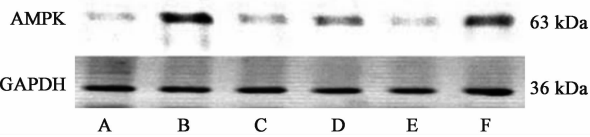


图 3 AD 大鼠海马神经元 AMPK 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of AMPK in hippocampal neurons of AD rats

表 5 四君子汤对 AD 大鼠海马神经元 AMPK 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 5 Effect of Sijunzi Tang on AMPK content in hippocampal neurons of AD rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	AMPK/GAPDH
正常	-	0.568 $\pm$ 0.121
模型	-	0.675 $\pm$ 0.157 <sup>2)</sup>
四君子汤	3.24	0.365 $\pm$ 0.115 <sup>4)</sup>
	6.48	0.389 $\pm$ 0.161 <sup>4)</sup>
	12.56	0.306 $\pm$ 0.112 <sup>4)</sup>
双氢麦角碱	0.000 27	0.546 $\pm$ 0.165 <sup>3)</sup>

脾精渐损,从而引发 AD 的发病。本实验通过 D-半乳糖造模,在造模方法主要模拟老年大鼠中枢神经的退化。中医对 AD 确立了“老年呆病”这一名词。由于 AD 为老年多发病,因此“虚”是 AD 发病之本。

《老年呆病的诊断及疗效评定标准》将老年呆病主要分为虚实二证六型,笔者经查阅文献,发现根据以上证型中医可以有不同治疗法则,包括成方治疗,应用参芪益智颗粒治疗<sup>[11]</sup>;提取剂治疗如应用蓝布正提取物治疗<sup>[12]</sup>等;针灸治疗<sup>[13]</sup>、针加灸治疗<sup>[14]</sup>等实验方法。

本实验通过 D-半乳糖造模,该方法主要模拟老年大鼠中枢神经的退化,表现为中枢兴奋性的降低。通过行为学可以检测大鼠对陌生环境的适应能力及运动能力,能够客观反映中枢系统的兴奋性。由于实验箱外周光线暗,中央明亮,正常组大鼠主要在周边活动,减少到中心区域的活动时间,说明对于陌生环境大鼠有较为强烈的好奇心。AD 大鼠在实验箱中心区域运动时间增多、停留时间增多,周边活动减少,说明 AD 大鼠中枢兴奋性下降,对于外部的关注度降低。在中枢系统,对行为、记忆都起到调控作用的部位主要定位于边缘系统,其中海马作用较大。由于造模后,年老大鼠中枢功能退化,对于机体影响是多系统,多器官的,显然也会影响中枢的功能,包括海马。本研究发经四君子汤干预后,大鼠恢复了对于外部的探索能力,周边活动增多,中心区域活动时

间减少,说明大鼠恢复了对于外部环境探索能力和好奇心,所以四君子汤对于提高 AD 大鼠中枢兴奋性,恢复其对于外部的好奇心有一定的治疗作用。

中医理论认为脾的功能之一是“主运化”,通过脾的运化能力,可以把胃消化后的营养物质转化为精微物质,生成气血后为机体利用。现代研究已经证明了,营养物质在小肠吸收后,进入细胞在细胞器-线粒体,氧化磷酸化才能产生供给机体的能量。因此认为,中医的“脾主运化”与线粒体能量生成存在密切联系。线粒体通过线粒体膜的复合体传递电子,产生能量,通过实验发现,模型组线粒体复合体活性下降,说明产生能量减少。而四君子汤中剂量及高剂量组,可以提高复合体活性,增加神经元的产能。

AMPK 作为一种酶,最主要的功能作为细胞的能量代谢感受器,参与调节能量代谢、细胞的应激。当机体代谢失衡或者受到应激刺激,AMPK 会提高自身蛋白酶的活性,增加 ATP 生成<sup>[15]</sup>,在线粒体保护方面,AMPK 可首先激活相关因子,调节线粒体数量和质量<sup>[16]</sup>。最新的研究表明,AMPK 可以抑制 ATP 合成酶抑制蛋白的表达,这一研究表明,AMPK 的激活,可以刺激氧化呼吸链的活性,促进能量的生成。海马作为机体的高级中枢部位,对内脏功能、记忆、思维都有强大的调控能力,如果体内外各种因素引起能量产生不足,将引起海马对各个功能的调节紊乱<sup>[17]</sup>。本实验结果显示模型组大鼠 AMPK 含量提高,进一步说明模型组产能减少,为了对抗代谢失衡,提高了 AMPK 表达。而四君子汤中剂量及高剂量组治疗组大鼠 AMPK 含量降低,说明四君子汤可以增加中枢能量产生,改善 AD 大鼠中枢的能量代谢紊乱,恢复正常。

四君子汤药物组成为党参片、茯苓、白术、炙甘草 4 味中药组成,是出自《太平惠民和剂局方》的经典补脾方药,在治疗 AD 鲜有报道。本实验证明,四君子汤对 AD 大鼠在行为学及能量代谢调节方面有较明显的作用。四君子汤可能通过补脾作用,促进 AD 大鼠中枢能量生成,改善中枢的能量代谢紊乱,调节线粒体复合体活性及 AMPK 表达可能是其作用的机制。

#### [参考文献]

[1] Vingtdeux V, Chandakkar P, ZHAO H, et al. Novel synthetic small-molecule activators of AMPK as enhancers of autophagy and amyloid-beta peptide degradation[J]. FASEB J, 2010, 25(1):219-231.  
[2] Majd S, Jht P. Oxidative stress and decreased mitochondrial superoxide dismutase 2 and peroxiredoxin

1 and 4 based mechanism of concurrent activation of AMPK and mTOR in Alzheimer's disease [J]. Curr Alzheimer Res, 2018, 19(10): 764-776.  
[3] 刘文俊,陈伟仁,宋囡,等. 脾气虚模型大鼠海马与下丘脑神经元线粒体分裂因子和线粒体分裂蛋白 1 的表达 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(11): 1356-1360.  
[4] 刘旭东. 四君子汤介导 cAMP-AMPK 通路对脾气虚证大鼠海马呼吸链酶活性影响研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2015.  
[5] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.  
[6] 刘旭东, 刘文俊, 孙大宇, 等. 脾气虚证模型大鼠神疲乏力的客观化评价 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 699-701.  
[7] 刘明, 刘杨, 邓颖, 等. 蓝布正提取物对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马 NT-3, BDNF 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(17): 154-158.  
[8] Kopeikina K J, Carlson G A, Pitstick R, et al [J]. Tau accumulation causes mitochondrial distribution deficits in neurons in a mouse model of tauopathy and in Human Alzheimer's disease brain [J]. Am J Pathol, 2011, 179(4): 2071-2082  
[9] Ferreira S T, Lourenco M V, Oliveira M M, et al. Soluble amyloid-beta oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease [J]. Front Cell Neurosci, 2015, 9(16): 191.  
[10] Waqar A. Overlapped metabolic and therapeutic links between Alzheimer and diabetes [J]. Mol Neurobiol, 2013, 47(1): 399-424.  
[11] 秦莉霞, 吴倩, 夏鹏, 等. 参芪益智颗粒对  $A\beta_{1-42}$  双侧海马注射阿尔茨海默病模型大鼠 PI3K/AKT 信号通路的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2018, 20(12): 2161-2166.  
[12] 刘明, 刘杨, 邓颖, 等. 蓝布正提取物对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马 NT-3, BDNF 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(17): 154-158.  
[13] 陶一鸣, 杜艳军, 田青, 等. 电针对阿尔茨海默病大鼠齿状回星形胶质细胞和白细胞介素-10 表达及其共定位的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(4): 874-878.  
[14] 刘静, 杜艳军, 周清莲, 等. 针灸对阿尔茨海默病大鼠海马区蛋白酪氨酸激酶-2/信号转导和转录激活因子-3 信号通路的影响 [J]. 针刺研究, 2019, 44(2): 79-84.  
[15] Pilon G, Dallaire P, Marette A. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs [J]. J Biol Chem, 2004, 279(20): 20767-20774.  
[16] 王懿, 张艳, 礼海. 益气活血方干预 PGC-1 $\alpha$  调控心肌细胞能量代谢重构的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(6): 169-173.  
[17] Ueno H, Nakazato M. The mechanistic relationship between the vagal afferent pathway, central nervous system and peripheral organs in appetite regulation [J]. J Diabetes Investig, 2016, 7(6): 812-818.

[责任编辑 孙丛丛]