

· 经典名方 ·

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

龙清华, 丁莉, 赵宾宾, 徐波, 谭爱华, 王平*
(湖北中医药大学 老年医学研究所, 武汉 430065)

[摘要] **目的:**观察酸枣仁汤对 APP/PS1 小鼠海马神经炎症的影响,并探讨其神经保护的可能机制。**方法:**将小鼠随机分为空白组,模型组,多奈哌齐组(0.92 mg·kg⁻¹),酸枣仁汤低、高(12.96,25.92 g·kg⁻¹)剂量组。各组连续给药 30 d 后,采用尼氏染色观察各组小鼠海马齿状回(DG)区病理形态的变化,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测各组小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)表达水平,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组小鼠海马中 TNF- α ,IL-1 β 的 mRNA 表达水平,采用免疫组化(IHC)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组小鼠海马中胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和离子钙结合蛋白(IBA1)蛋白表达水平。**结果:**与空白组比较,模型组小鼠海马 DG 区颗粒细胞排列不均匀,细胞丢失明显,部分神经元胞内尼氏体消失或固缩,血清中 TNF- α ,IL-1 β 含量显著升高($P < 0.01$),小鼠海马中 TNF- α ,IL-1 β mRNA 表达显著升高($P < 0.01$),海马 DG 区中 GFAP,IBA1 蛋白表达显著上调($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组、酸枣仁汤低、高剂量组小鼠海马 DG 区颗粒细胞排列稍整齐,神经元丢失减轻,且胞内尼氏体消失或固缩情况好转,小鼠血清中 TNF- α ,IL-1 β 含量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),小鼠海马中 TNF- α ,IL-1 β mRNA 表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),小鼠海马 DG 区中 GFAP,IBA1 蛋白表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**酸枣仁汤能改善 APP/PS1 双转基因小鼠神经元丢失,其机制可能与其调节小鼠海马神经炎症有关。

[关键词] 酸枣仁汤;阿尔茨海默病;神经炎症;神经保护;机制

[中图分类号] R2-0;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)20-0001-06

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.20191936

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190617.1320.019.html>

[网络出版时间] 2019-06-19 09:46

Suanzaoren Tang Exerts Neuroprotective Effect by Inhibiting Hippocampal Neuroinflammation in APP/PS1 Double Transgenic Mice

LONG Qing-hua, DING Li, ZHAO Bin-bin, XU Bo, TAN Ai-hua, WANG Ping*
(Institute of Geriatrics, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Suanzaoren Tang on hippocampal neuroinflammation in APP/PS1 mice and to explore its possible mechanism of neuroprotection. **Method:** The mice were randomly divided into blank group, model group, donepezil group (0.92 mg·kg⁻¹), Suanzaoren Tang low and high-dose groups (12.96, 25.92 g·kg⁻¹). After 30 days of continuous administration in each group, pathological changes of dentate gyrus (DG) in hippocampus of mice in each group were observed by Nissl staining. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in serum of each group were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression levels of TNF- α and IL-1 β in hippocampus of each group. The expression levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionic calcium binding protein 1 (IBA1) in hippocampus of each group

[收稿日期] 20180425(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81573865,81703972)

[第一作者] 龙清华,在读博士,从事中医药防治老年病研究,E-mail:287201413@qq.com

[通信作者] *王平,教授,主任医师,博士生导师,从事中医衰老理论及老年病证治疗规律研究,E-mail:pwang54@aliyun.com

were detected by immunohistochemical staining (ICH) and Western blot. **Result:** Compared with blank group, the granule cells in DG region were unevenly arranged in model group, with obvious cell loss, and the nissl bodies in some neurons disappeared or condensed, serum TNF- α and IL-1 β content significantly increased ($P < 0.01$), mice hippocampus of TNF- α and IL-1 β mRNA expression quantity significantly increased ($P < 0.01$), levels of GFAP and IBA1 in the hippocampal DG region were significantly up-regulated ($P < 0.01$). Compared with model group, the granule cells in the hippocampal DG region were slightly aligned in donepezil group, Suanzaoren Tang low and high-dose groups, neuron loss of ease, and intracellular austenite disappear or pyknotic conditions improve, the expressions levels of TNF- α and IL-1 β in the serum were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the expression levels of TNF- α and IL-1 β mRNA in the hippocampus were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), protein expression levels of GFAP and IBA1 in the hippocampal DG region were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Suanzaoren Tang can improve neuronal loss in APP/PS1 double transgenic mice, and its mechanism may be related to the regulation of hippocampal neuroinflammation in mice.

[**Key words**] Suanzaoren Tang; Alzheimer's disease; neuroinflammation; neuroprotection; mechanism

阿尔茨海默病(AD)是以认知功能障碍和睡眠障碍为主要临床症状的退行性神经系统疾病^[1]。老年斑沉积、神经原纤维缠结和神经元丢失是其主要病理特征,近几年,国际医药巨头针对老年斑沉积和神经原纤维缠结进行了许多新药开发,但这些新药在Ⅱ期或Ⅲ期临床大都遭遇了失败,这些经验迫使人们不得不重新审视神经元丢失这一病理特征^[2-4]。AD本身伴有神经元丢失,同时睡眠障碍也会加剧神经元丢失,因此改善神经元丢失有可能抑制AD病理进程和改善其睡眠状况^[5-6]。最近研究发现^[7-8],成人后大脑海马DG区神经干细胞(NSC)可持续分化、增殖和补充新的神经元,但海马新生神经元在成为成熟神经元的过程中受多重脑内微环境的影响,如神经炎症、神经营养水平等,其中小胶质细胞和星形胶质细胞引起的神经炎症被广泛提及。

酸枣仁汤源自《金匱要略》,由酸枣仁、茯苓、知母、川芎和生甘草组成,主治阴血亏虚、虚热内扰引起失眠症,也可以改善失眠引起的学习记忆障碍^[9]。目前学术界大都是研究酸枣仁汤对睡眠剥夺引起学习记忆障碍的作用机制,而对于AD伴睡眠障碍研究较少,本课题组开创性的利用酸枣仁汤干预AD伴睡眠障碍,并发现酸枣仁汤可以改善6月龄APP/PS1双转基因痴呆小鼠的学习记忆力和睡眠障碍^[10-12]。为进一步验证酸枣仁汤是否通过抑制APP/PS1小鼠海马神经炎症和改善神经元丢失从而改善学习记忆障碍和睡眠障碍,本实验拟在前期的研究基础上,通过尼氏染色观察APP/PS1小鼠神经元病理形态,同时对海马中关键炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β)及海马中炎症关键蛋白离子钙结合蛋白(IBA1),胶原

纤维酸性蛋白(GFAP)进行检测,以确定酸枣仁汤对6月龄APP/PS1小鼠海马神经炎症的影响,并探讨其保护神经的可能机制。

1 材料

1.1 动物 32只SPF级雄性5月龄APP/PS1(B6)双转基因痴呆小鼠,8只SPF级雄性5月龄空白对照小鼠,二者均为C57BL/6JNju背景小鼠,购于南京大学南京生物医药研究院,合格证号SCXK(苏)2015-0001,合格证编号201602611。动物饲养于湖北中医药大学老年医学研究所动物房,动物房温度控制在(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度控制在50%左右,小鼠可自由摄食和饮水,本实验获得湖北中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.2 药物及制备 盐酸多奈哌齐片,卫材(中国)药业有限公司,批准文号国药准字H20050978,批号1606052;酸枣仁汤由炒酸枣仁30g,茯苓6g,知母9g,川芎6g,生甘草3g组成,饮片购自劲牌生物医药有限公司,并经湖北中医药大学药学院游秋云教授鉴定符合药用标准。饮片经2次煎煮后进行浓缩,最终浓缩成质量浓度为0.75g \cdot mL⁻¹和1.5g \cdot mL⁻¹的药液,分装灭菌后4 $^{\circ}$ C保存备用。

1.3 试剂 尼氏(Nissl)染色液(北京Beyotime公司,批号C0117);小鼠TNF- α ,IL-1 β 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海欣博盛生物科技有限公司,批号分别为M190314-102a,M170516-001a);trizol试剂(美国Life Technologies公司,批号157802);PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser, Premix TaqTM Version 2.0(日本Takara公司,批号分别为AK3201,A6601A);胶质纤维酸性蛋白(GFAP)兔抗鼠抗体,离子钙结合蛋白(IBA1)兔

抗鼠抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G二抗(武汉 Servicebio 公司,批号分别 GB11096, GB12105, GB12002)。

1.4 仪器 TGL-16M 型高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机设备有限公司);SpectraMax® M2 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);SpectroArt 200S 型核酸蛋白测定仪(德国 Hellma 公司);MiniAmp 型热循环仪,QuantStudio 3 型实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);DYY-5D 型电泳仪,Trans-Blot SD 型转膜仪,GelDoc XR+ 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组 小鼠适应性饲养 1 周后,采用 SPSS 19.0 统计软件生成随机数字表,将 5 月龄 APP/PS1 双转基因痴呆小鼠分为模型组、多奈哌齐组、酸枣仁汤低、高剂量组,每组 8 只。将空白对照小鼠设置为空白组,共 8 只。

2.2 给药 空白组和模型组按 20 mL·kg⁻¹灌胃生理盐水。多奈哌齐组按 0.92 mg·kg⁻¹灌胃盐酸多奈哌齐片配成的药液,酸枣仁汤低、高剂量组分别按照 12.96,25.92 g·kg⁻¹灌胃酸枣仁汤制成的药液,参考课题组前期实验确定各组小鼠给药剂量^[10],给药容积均为 20 mL·kg⁻¹,各组连续给药 30 d。

2.3 指标检测

2.3.1 Nissl 染色 观察各组小鼠海马病理形态变化 灌胃结束后,每组随机选取 3 只小鼠进行病理染色取材。3% 水合氯醛经腹腔注射麻醉(10 mL·kg⁻¹),4% 多聚甲醛溶液经心脏灌注,端头取脑,置 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h。固定好后行石蜡包埋,5 μm 厚度切片。采用二甲苯和梯度乙醇进行脱蜡和脱水。采用 Nissl 染色液染色 10 min,再以 95% 乙醇分化,最后中性树脂封片。显微镜下观察各组小鼠海马 DG 区病理形态变化,并进行图像采集。

2.3.2 ELISA 检测血清中 TNF-α, IL-1β 表达水平 各组剩余小鼠摘眼球取血,置 4 °C 离心机,以 12 000 r·min⁻¹离心 15 min,吸取上清液以检测各组小鼠血清中 TNF-α, IL-1β 表达水平,检测方法按各 ELISA 试剂盒说明书进行。

2.3.3 Real-time PCR 检测海马中 TNF-α, IL-1β mRNA 表达水平 摘眼球取血后,端头取脑,冰上分离海马,置液氮速冻后转移至 -80 °C 冰箱保存。取海马 30 mg,置 1.5 mL 离心管中,加入 trizol 1 mL 提

取海马总 mRNA,提取后用核酸蛋白测定仪检测各样品纯度,当纯度为 1.8 ~ 2.0 进行逆转录;用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒对纯度合格样本逆转录合成 cDNA;按照 Premix Taq™ Version 2.0 试剂盒添加荧光试剂后,再置于 Real-time PCR 仪进行实时荧光定量反应。反应条件设置为 94 °C 4 min,94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 30 s,72 °C 10 min,共 40 个循环。分析 Real-time PCR 实验过程中各样本的 C_t 值,以 2^{-ΔΔC_t} 表示 mRNA 相对表达水平。各目的基因及内参 β-肌动蛋白(β-actin)均由武汉 Servicebio 公司设计和合成,基因序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列	长度/bp
TNF-α	上游 5'-CCGATTTGCCATTTTCATACCAG-3'	232
	下游 5'-TCACAGAGCAATGACTGCCAAG-3'	
IL-1β	上游 5'-AATCTCACAGCACATCAA-3'	152
	上游 5'-AGCCATACTTTAGGAAGACA-3'	
β-actin	上游 5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3'	171
	上游 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'	

2.3.4 免疫组化检测海马中 IBA1, GFAP 表达水平

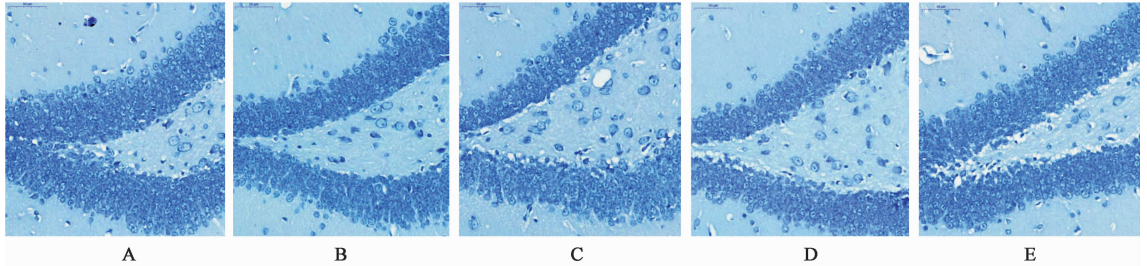
取上述用于 Nissl 染色的脑组织进行石蜡包埋,海马冠状切片和脱水。分别按 1:200 和 1:150 稀释 GFAP 一抗和 IBA1 一抗,并均匀滴加至切片上,37 °C 孵育 1 h,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;1:1 000 稀释二抗,并均匀滴加至切片上,37 °C 孵育 15 min,用 PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;冲洗后用 DAB 显色 5 min,再次用 PBS 冲洗,再依次复染、脱水、透明和封片。镜下观察切片,选取同部位切片进行拍照,再用 Image Pro-Plus 6.0 软件进行图像处理,计算各切片积分吸光度 IA。

2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马中 IBA1, GFAP 蛋白表达水平 称取海马 20 mg,用 RIAP 裂解液提取各样本总蛋白,提取后用 BCA 蛋白测定试剂盒检测各组蛋白浓度;配置 10% SDS-PAGE 凝胶,各孔加样 40 μg,依次进行电泳和转膜;稀释一抗 GFAP(1:200)和一抗 IBA1(1:150)及内参 GAPDH(1:2 000),并将稀释后的抗体和转膜胶片置于抗体孵育盒中 4 °C 冰箱孵育过夜。洗膜,稀释二抗(1:1 000),将稀释后的抗体和转膜胶片置抗体孵育盒 37 °C 孵育 1 h。洗膜、封闭并向转膜胶片滴加 ECL 显色液。用凝胶成像系统曝光各组条带,并有 Image J 分析各组条带灰度值。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件处理各组数据,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,方差齐性时,多组间比较采用 LSD 法,方差不齐时,多组间比较采用 Tamhane's T2 法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠海马病理形态的影响 空白组小鼠



A. 空白组;B. 模型组;C. 多奈哌齐组;D. 酸枣仁汤低剂量组;E. 酸枣仁汤高剂量组(图 2~4 同)

图 1 酸枣仁汤对小鼠海马 DG 区病理形态的影响(Nissl, $\times 400$)

Fig.1 Effect of Suanzaoren Tang on pathological morphology of DG region in hippocampus of mice(Nissl, $\times 400$)

3.2 对小鼠血清中 TNF- α , IL-1 β 含量的影响 与空白组比较,模型组小鼠血清中 TNF- α , IL-1 β 含量显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组、酸枣仁汤低、高剂量组小鼠血清中 TNF- α , IL-1 β 含量明显降低($P < 0.05, P < 0.01$);与酸枣仁汤低剂量组比较,酸枣仁汤高剂量组小鼠血清中 TNF- α , IL-1 β 含量改变不明显。见表 2。

表 2 酸枣仁汤对小鼠血清中 TNF- α , IL-1 β 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effect of Suanzaoren Tang on expression of TNF- α and IL-1 β in serum of mice($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF- α	IL-1 β
空白	-	38.80 \pm 6.94	46.68 \pm 14.80
模型	-	53.18 \pm 7.76 ¹⁾	68.06 \pm 7.48 ¹⁾
多奈哌齐	9.2 $\times 10^{-4}$	42.07 \pm 8.03 ³⁾	55.32 \pm 11.88 ²⁾
酸枣仁汤	12.96	44.68 \pm 5.30 ²⁾	46.55 \pm 8.53 ³⁾
	25.92	45.05 \pm 8.03 ²⁾	53.03 \pm 12.65 ²⁾

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 3~5 同)。

3.3 对小鼠海马中 TNF- α , IL-1 β mRNA 表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠海马中 TNF- α , IL-1 β mRNA 表达显著上调($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组、酸枣仁汤低、高剂量组小鼠海马中 TNF- α , IL-1 β mRNA 表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$);与酸枣仁汤低剂量组比较,酸枣仁汤高剂量组小鼠海马中 TNF- α , IL-1 β mRNA 表达改变不明显。见表 3。

海马 DG 区颗粒细胞排列均匀整齐,未见明显的细胞丢失,胞内尼氏体丰富。模型组小鼠海马 DG 区颗粒细胞排列不均匀,有明显的细胞丢失,部分神经元胞内尼氏体消失或固缩。多奈哌齐组、酸枣仁汤低、高剂量组小鼠海马 DG 区颗粒细胞排列稍整齐,神经元丢失减轻,且胞内尼氏体消失或固缩情况好转,见图 1。

表 3 酸枣仁汤对小鼠海马 TNF- α , IL-1 β mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of Suanzaoren Tang on mRNA expression of TNF- α and IL-1 β in hippocampus of mice($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TNF- α	IL-1 β
空白	-	0.38 \pm 0.14	0.57 \pm 0.17
模型	-	0.62 \pm 0.17 ¹⁾	0.94 \pm 0.11 ¹⁾
多奈哌齐	9.2 $\times 10^{-4}$	0.43 \pm 0.13 ²⁾	0.69 \pm 0.18 ³⁾
酸枣仁汤	12.96	0.46 \pm 0.14 ²⁾	0.63 \pm 0.09 ³⁾
	25.92	0.47 \pm 0.13 ²⁾	0.68 \pm 0.15 ³⁾

3.4 对小鼠海马中 GFAP, IBA1 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠海马 DG 区中 GFAP, IBA1 蛋白的表达显著上调($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组、酸枣仁汤低、高剂量组小鼠海马 DG 区中 GFAP, IBA1 表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$);与酸枣仁汤低剂量组比较,酸枣仁汤高剂量组小鼠海马 DG 区中 GFAP, IBA1 表达改变不明显。见图 2, 3 和表 4。

3.5 对小鼠海马中 GFAP, IBA1 蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠海马中 GFAP, IBA1 蛋白表达显著上调($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组、酸枣仁汤低、高剂量组小鼠海马中 GFAP, IBA1 蛋白表达明显降低($P < 0.05, P < 0.01$);与酸枣仁汤低剂量组比较,酸枣仁汤高剂量组小鼠海马中 GFAP, IBA1 表达量改变不明显。见图 4, 表 5。

4 讨论

传统观点认为成人后脑内神经细胞缺乏再生能

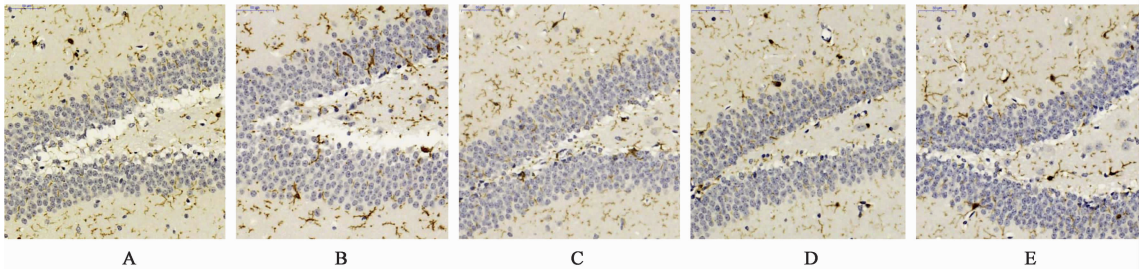


图 2 酸枣仁汤对小鼠海马 DG 区 IBA1 表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of Suanzaoren Tang on IBA1 expression in DG region of hippocampus of mice(IHC, ×400)

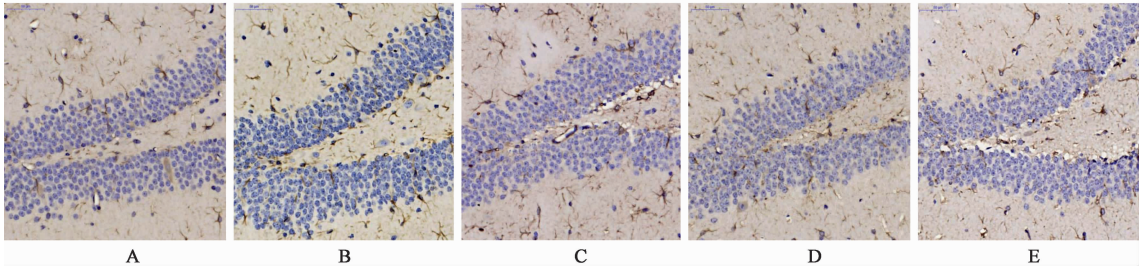


图 3 酸枣仁汤对小鼠海马 DG 区 GFAP 表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Suanzaoren Tang on expression of GFAP in DG region of hippocampus of mice(IHC, ×400)

表 4 酸枣仁汤对小鼠海马 IBA1, GFAP 的 IA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of Suanzaoren Tang on IA of IBA1 and GFAP in hippocampus of mice($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	IBA1 ($\times 10^3$)	GFAP ($\times 10^3$)
空白	-	0.91 ± 0.34	0.87 ± 0.24
模型	-	1.51 ± 0.25 ¹⁾	1.39 ± 0.37 ¹⁾
多奈哌齐	9.2×10^{-4}	1.01 ± 0.19 ²⁾	0.97 ± 0.25 ³⁾
酸枣仁汤	12.96	1.15 ± 0.32 ²⁾	1.01 ± 0.23 ²⁾
	25.92	1.11 ± 0.34 ²⁾	0.98 ± 0.33 ³⁾

表 5 酸枣仁汤对小鼠海马 IBA1, GFAP 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effect of Suanzaoren Tang on expression of IBA1, GFAP proteins in hippocampus of mice($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	IBA1/GAPDH	GFAP/GAPDH
空白	-	0.41 ± 0.12	0.58 ± 0.14
模型	-	0.65 ± 0.08 ¹⁾	0.91 ± 0.16 ¹⁾
多奈哌齐	9.2×10^{-4}	0.51 ± 0.11 ²⁾	0.70 ± 0.19 ²⁾
酸枣仁汤	12.96	0.48 ± 0.12 ³⁾	0.64 ± 0.14 ³⁾
	25.92	0.51 ± 0.16 ²⁾	0.68 ± 0.17 ³⁾

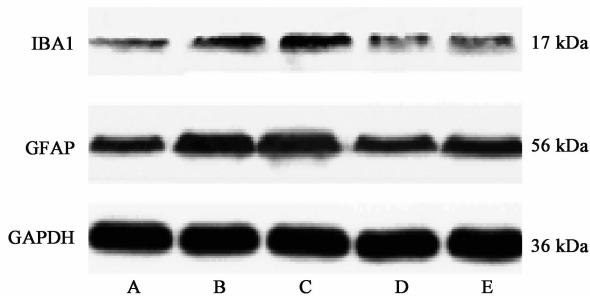


图 4 小鼠海马 IBA1, GFAP 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of IBA1, GFAP protein expression in hippocampus of mice

力,但近年来研究者发现成人后大脑海马 DG 区 NSC 可持续增殖并分化成新的神经元,这些新生的神经元在经历迁移、成熟和整合等多个阶段后会不断地补充丢失的神经元^[13]。现有研究证实 AD 患者和 AD 动物模型都存有明显的神经发生^[4]。神经发生过程受多种因素调节,脑内神经炎症水平和

神经营养水平等都会影响神经发生,而 AD 脑内微环境复杂,涉及神经毒性、神经炎症和神经营养多种影因素,因此改善 AD 脑内微环境对于神经发生具有重要意义^[14]。本实验通过 Nissl 染色发现,给予模型动物酸枣仁汤后小鼠海马 DG 区神经元丢失得到改善,这说明酸枣仁汤可以改善痴呆小鼠神经元丢失的病理特征,但其机制有待于进一步探讨。

AD 脑内存在广泛的炎性反应,这些炎性反应一方面抑制新生神经元的增殖、分化和成熟,从而不利于补充新的神经元,另一方面神经炎症又可使神经营养代偿水平升高,也不利于神经元的新生,总之抑制 AD 脑内神经炎症水平对于改善神经元丢失具有重要意义^[15]。AD 脑内神经炎症水平与脑内神经胶质细胞和星形胶质细胞过度激活有关。神经胶质细胞和星形胶质细胞对于中枢神经系统起双重调节

作用,生理状态下,二者密切监视脑内神经微环境以及及时清除衰老的神经元和神经毒性物质,病理状态下,二者可神经毒性物质被过度激活诱发神经炎症^[16]。神经胶质细胞和星形胶质细胞被 $A\beta$ 等神经毒性物质过度激活后会促使促炎性因子 $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ 强表达从而促进神经的凋亡,另一方面也可抑制神经元的增殖、分化和成熟^[17]。IBA1 和 GFAP 分别为小胶质细胞和星形胶质细胞活化的标志性蛋白,二者的表达水平代表着脑内神经炎症水平^[18]。本实验发现模型小鼠血清和海马中促炎性因子 $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ 明显升高,同时海马 DG 区 IBA1 和 GFAP 的表达水平也显著升高,这说明模型小鼠海马存有明显的神经炎症。给予模型动物酸枣仁汤后,小鼠血清和海马中促炎性因子 $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ 降低,同时海马 DG 区 IBA1 和 GFAP 的表达水平也降低,这说明酸枣仁汤可以抑制 APP/PS1 双转基因痴呆小鼠脑内神经炎症。Nissl 染色发现酸枣仁汤可以改善小鼠神经元丢失,结合上述实验结果,课题组推断酸枣仁汤改善 APP/PS1 双转基因小鼠神经元丢失可能与其抑制海马神经炎症有关。

酸枣仁汤为治疗失眠症的经典名方,不仅可以改善失眠症患者的睡眠状况,还可以改善失眠症引起的健忘,但其作用机制不详,本实验也为研究酸枣仁汤改善睡眠障碍和认知功能障碍提供了一定的思路。多奈哌齐为美国食品与药物管理局(FDA)批准的用于治疗 AD 症状的治疗药物,具有抑制胆碱酯酶的作用。近年来研究者发现多奈哌齐也具有神经保护的作用,其机制可能与抑制脑内氧化应激有关^[19]。本研究发现多奈哌齐与酸枣仁汤作用相似,都可以抑制脑内神经炎症水平和改善神经元丢失,这说明酸枣仁汤有可能是通过抑制脑内炎症水平而发挥神经保护作用。

[参考文献]

[1] Nirzhor S S R, Khan R I, Neelotpol S. The biology of glial cells and their complex roles in Alzheimer's disease; new Opportunities in therapy[J]. *Biomolecules*, 2018, 8(3): 1-14.

[2] 郑易林, 谢琼, 肖立, 等. 抗阿尔茨海默病药物研发进展[J]. *药学进展*, 2019, 43(2): 100-110.

[3] Morello M, Landel V, Lacassagne E, et al. Vitamin D improves neurogenesis and cognition in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(8): 6463-6479.

[4] 蒋宁, 张林, 徐玫, 等. 阿尔茨海默病患者来源的诱导性多能干细胞的建立及其在发病机制及新药研究中

的初步应用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(9): 737-738.

[5] Baazaoui N, Iqbal K. A Novel Therapeutic approach to treat Alzheimer's disease by neurotrophic support during the period of synaptic compensation[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 62(3): 1211-1218.

[6] 郝元元, 刚宝芝. 阿尔茨海默病与睡眠障碍[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2018, 25(2): 134-137.

[7] FANG Y, GAO T, ZHNAG B, et al. Recent advances: decoding Alzheimer's disease with stem cells[J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10(1): 3114-3119.

[8] Tzeng T T, CHEN C C, CHEN C C, et al. The cyanthin diterpenoid and sesterterpene constituents of hericium erinaceus mycelium ameliorate Alzheimer's disease-related pathologies in APP/PS1 transgenic mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 1-14.

[9] 王新, 冯诗瑶, 吴昊, 等. 张仲景治虚烦不眠方之证治概要与方药分析[J]. *中国民族民间医药*, 2019, 28(3): 59-62.

[10] 薄文集. 痴呆与失眠相关性的中医理论探讨及酸枣仁汤对 APP/PS1 双转基因小鼠的干预作用[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.

[11] 房蕴歌, 商利娜, 田雷, 等. 酸枣仁汤研究进展[J]. *医学研究与教育*, 2017, 34(3): 61-67.

[12] 杨楠, 叶晓川. 酸枣仁汤的神经药理作用及分子机制研究进展[J]. *湖北中医药大学学报*, 2017, 19(3): 114-117.

[13] XU X F, WANG Y C, ZONG L, et al. Elevating integrin-linked kinase expression has rescued hippocampal neurogenesis and memory deficits in an AD animal model[J]. *Brain Res*, 2018, 95(16): 65-77.

[14] 姜霞. 空间学习对 AD 模型鼠海马突触可塑性及神经发生的影响[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.

[15] Minett T, Classey J, Matthews F E, et al. Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology[J]. *J Neuroinflamm*, 2016, 13(1): 135.

[16] 彭也, 朱天碧, 张钊, 等. 阿尔茨海默病的免疫调控研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(4): 445-451.

[17] 尹超, 游秋云, 张美娅, 等. 生慧汤对慢性睡眠剥夺小鼠学习记忆及海马 $IL-6$, $TNF-\alpha$, $COX-2$ 基因表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(1): 96-100.

[18] Bachstetter A D, Van Eldik L J, Schmitt F A, et al. Disease-related microglia heterogeneity in the hippocampus of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and hippocampal sclerosis of aging[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2015, doi:10.1186/S40478-015-0209-z.

[19] 刘文. 多奈哌齐药理及临床应用及其进展[J]. *天津药理学*, 2014, 26(3): 64-67.

[责任编辑 孙丛丛]