

镇心省睡益智方及其精油对 AD 模型小鼠学习记忆的影响

罗俊, 张科楠, 肖帅, 汤丹丰, 吴玲, 郭园园, 郑琴*

(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**观察镇心省睡益智方水提液及其精油对 β 淀粉样前体蛋白基因/早老素基因 (APP/PS1) 双转基因小鼠学习记忆的影响并探讨其可能机制。**方法:**采用 APP/PS1 双转基因痴呆小鼠及同月龄相同遗传背景 C57BL/6JNju 小鼠 2 种小鼠。C57BL/6JNju 小鼠作为正常组, APP/PS1 双转基因痴呆小鼠随机分为模型组, 镇心省睡益智方精油低、高质量浓度组 (12.13, 48.50 mg·L⁻¹), 镇心省睡益智方水提液组 (0.46 g·kg⁻¹), 每组 12 只。每天给药 1 次, 连续给药 22 d。给药结束后采用跳台实验、Morris 水迷宫实验对小鼠行为学能力进行检测, 采用尼氏染色观察海马 CA1 区神经元变化, 采用硫磺素 (ThS) 染色观察海马 DG 区老年斑 (SP) 沉积, 采用免疫组化法检测小鼠脑组织中葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1), 胰岛素受体底物-1 (IRS-1) 的表达, 采用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测小鼠海马组织中乙酰胆碱 (ACH), γ -氨基丁酸 (GABA), 谷氨酸 (GLU) 含量的变化。**结果:**与正常组比较, 模型组小鼠跳台实验潜伏期显著缩短, 错误次数显著增加 ($P < 0.01$), Morris 水迷宫实验定位航行逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.05, P < 0.01$), 海马 CA1 区神经元出现缺失, DG 区出现明显的老年斑沉积 ($P < 0.05$), ACH, GLUT1 含量均显著下降 ($P < 0.01$), GABA, GLU 水平及 IRS-1 的表达均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组均可显著延长小鼠跳台实验潜伏期, 减少跳台错误次数 ($P < 0.01$), 明显降低定位航行小鼠逃避潜伏期 ($P < 0.05, P < 0.01$), 可一定程度保护小鼠海马 CA1 区神经元, 减少 DG 区老年斑沉积 ($P < 0.05, P < 0.01$), 明显增加小鼠脑组织中 ACH, GLUT1 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$), 显著降低 GABA, GLU 水平及 IRS-1 的表达 ($P < 0.01$)。**结论:**镇心省睡益智方水提液及其精油能够改善 APP/PS1 小鼠的学习记忆行为, 保护神经元, 增加脑组织 GLUT1 的表达, 减少脑组织 IRS-1 的表达, 减少老年斑沉积, 升高 ACH 含量, 降低 GABA, GLU 含量, 可能是其防治阿尔茨海默症的机制。

[关键词] 镇心省睡益智方; 阿尔茨海默症; 神经递质; 葡萄糖转运体 1; 胰岛素受体底物-1

[中图分类号] R289; R338.2+4; R743; R745.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)09-0074-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190938

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190122.1121.001.html>

[网络出版时间] 2019-01-23 9:47

Effect of Zhenxin Xingshui Yizhi Fang and Its Essential Oil Extract on Ability of Learning and Memory in Alzheimer's Disease Model Mice

LUO jun, ZHANG Ke-nan, XIAO Shuai, TANG Dan-feng, WU Lin, GUO Yuan-yuan, ZHENG Qin*

(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** The present study was designed to investigate the modulating effect of Zhenxin Xingshui Yizhi Fang and its essential oil extract on cognitive deficits in mice. **Method:** For the purpose of this study 5 months old APP/PS1 double transgenic mice and wild-type C57BL/6JNju were selected as experimental animals. Then APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into model group, essential oil low and high-dose groups (12.13, 48.50 mg·L⁻¹), Zhenxin Xingshui Yizhi Fang group (0.46 g·kg⁻¹). Meanwhile, wild-type C57BL/6JNju mice were used as a normal group. APP/PS1 double transgenic mice were treated with Zhenxin Xingshui Yizhi Fang and its essential oil extract for 22 consecutive days. Mice were subjected to a Morris

[收稿日期] 20181208002

[基金项目] 江西省科技创新人才重点项目 (“5511”工程专项)(20171BCB18001)

[第一作者] 罗俊, 在读硕士, 从事中药新剂型和新技术研究, E-mail: douya677358@163.com

[通信作者] * 郑琴, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型和新技术研究, E-mail: zhengqin912006@163.com

water maze test and a platform test in order to determine their cognitive effect. Nissl's staining was used to observe pathological changes in brain tissue. Meanwhile, senile plaques (SP) were observed by employing Thioflavin-S staining. The expression of glucose transporter 1 (GLUT1) and insulin receptor substrate-1 (IRS-1) were analyzed using immunohistochemistry techniques. The levels of neurotransmitters such as acetylcholine (ACH), glutamate (GLU) and γ -aminobutyric acid (GABA) in the hippocampus were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** The memory function was significantly reduced in model group, and severe brain injury and neuronal apoptosis were also observed in comparison to normal group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, Zhenxin Xingshui Yizhi Fang and its essential oil extract improved previous learning and memory impairments ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the levels of SP, IRS-1, GLU, GABA (except essential oil low dose group) were significantly reduced ($P < 0.01$), meanwhile the levels of ACH and GLUT1 were significantly improved ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** These results indicate that Zhenxin Xingshui Yizhi Fang and its essential oil extract could ameliorate cognitive deficits and GLUT1 and IRS-1 could be a possible therapeutic target for AD. It may be an interesting approach to the treatment of Alzheimer's disease.

[**Key words**] Zhenxin Xingshui Yizhi Fang; Alzheimer's disease; neurotransmitter; glucose transporter 1; insulin receptor substrate-1

阿尔茨海默病(AD)是一种起病隐匿的进行性神经系统退行性疾病,其发病机制尚不清楚。学者对AD机制的观点主要有胆碱能神经元假说, β -淀粉样蛋白(A β)学说和Tau蛋白假说,以及炎症假说、氧化不平衡假说和基因突变假说等^[1]。目前美国食品药品监督管理局(FDA)批准的治疗AD的药物只有5种:四氢氨基吡啶,多奈哌齐,重酒石酸卡巴拉汀,加兰他敏以及N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂美金刚,对AD的治疗起到了重要作用,可以减轻患者的痛苦,但仍不能根治、逆转AD的发展,长期服用还将出现耐受性及不良反应^[2]。关于AD药物的研发并未放缓,但取得的进展却不容乐观,近10年来,未有新药上市,数千的临床试验结果仍不明朗^[3]。寻找新靶点、新疗法成为当下研究治疗AD的热点。近年发现,AD的发生与代谢异常密切相关,被认为是一种代谢性疾病^[4-5]。AD患者大脑灌注不足及脑组织胰岛素通路障碍,将引起颞叶皮层、顶叶皮层明显的糖代谢障碍或代谢转向替代能源^[6-7]。葡萄糖转运体1(GLUT1)作为转运葡萄糖跨过血脑屏障进入脑组织的关键蛋白及胰岛素受体底物-1(IRS-1)作为AD患者公认的胰岛素抵抗生物标记物,对认知功能具有重要影响^[8-9],以此为靶点进行AD治疗研究可能是一种新的途径。

镇心省睡益智方源自《千金翼方》,由远志、石菖蒲、益智仁3味药组成,具有治疗惊悸、嗜睡、健忘的功效,临床可用于治疗嗜睡头昏,精神疲惫^[10-11]。有文献报道,镇心省睡益智方具有促醒及改善大鼠

认知功能的作用^[12],但该方是否具有抗AD的作用,仍有待研究。此外,嗅觉和脑功能之间存在着密切联系。嗅觉通路可通过嗅觉物质乙酰胆碱(ACH),谷氨酸(GLU), γ -氨基丁酸(GABA),5-羟色胺(5-HT)等调控学习记忆、情绪、内脏活动及警觉与睡眠等功能^[13-14]。近年来,国内外学者研究芳香疗法对神经系统的影响^[15]。Moss等^[16]发现利用鼠尾草精油香熏能够改善受试者的认知能力。Jimbo等^[17]采用迷迭香、柠檬香、薰衣草和橙子芳香对痴呆患者进行治疗,提高了AD患者的认知,表明芳香物质吸嗅疗法对改善认知功能具有一定的作用。通过嗅觉通路“吸嗅入脑”可能是一种安全有效的给药方式,而镇心省睡益智方中石菖蒲、益智仁2味中药富含挥发性成分,故本研究选用APP/PS1双转基因小鼠模型,从神经递质、能量代谢角度,选取ACH,GLU,GABA,GLUT1以及IRS-1等脑内相关指标进行了研究,旨在阐明镇心省睡益智方及吸嗅给药精油防治AD的作用及可能的机制,为中药复方防治AD提供依据。

1 材料

1.1 动物 APP/PS1双转基因雄性小鼠,48只,相同遗传背景C57BL/6JNju雌性小鼠12只,鼠龄均为5月龄,SPF级,体质量25~30g,均购自江苏集萃药康生物科技有限公司,合格证号SCXK(苏)2018-0008。SPF屏障环境22.5~23.5℃,湿度60%~65%,12h/12h日夜循环光照条件下适应性饲养1周,期间自由饮水、进食。经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查通过,批准号JZLLSC

2018-0037。

1.2 药物 镇心省睡益智方由远志 15 g, 石菖蒲、益智仁各 2.5 g 组成, 饮片均由江西樟树天齐堂中药饮片有限公司提供, 经江西中医药大学药学院刘荣华教授鉴定为正品。

1.3 试剂 ACH, GLU, GABA 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (中国上海语纯生物科技有限公司, 批号均为 2018/05); 二甲苯, 甲醛, 乙醇, 硼氢化钠 (西安赫特生物有限公司, 批号分别为 171201, 171020, 17111302, 20171201); 尼氏染色液, 硫磺素 (ThS) (德国 Sigma 公司, 批号分别为 ST065-1, RF235299); 兔抗 IRS-1 多克隆抗体 (美国英杰生命技术有限公司, 批号 RF235299); 兔抗 GLUT1 多克隆抗体 (美国密理博公司, 批号 2956779); 兔抗二步法免疫组化试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 批号 E-IR-R213); 中性树胶 (北京索莱宝有限公司, 批号 11081021); 高锰酸钾 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20180410); 草酸 (天津市大茂化学试剂厂, 批号 20171201)。

1.4 仪器 DW-B 型压缩空气雾化吸入器 (江苏双盛医疗器械有限公司); YLS-3TB 型跳台记录仪 (上海京工实业有限公司); Morris 水迷宫 (上海玉研科学仪器有限公司); RM2255 型包埋机, EG1150H 型切片机, HI1210 型摊片机, HI1220 型烘片机 (德国莱卡公司); BX43 型光学显微镜, DM2000 型荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); A-35 型刀片 (日本 Feather 公司); SCIENTZ-192 型高通量组织研磨机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 2K15C 型低温高速离心机 (美国 Sigma 公司); Forma 311 型二氧化碳恒温培养箱 (美国 Thermo Electron Corporation 公司); Elx800 型酶标仪 (美国博腾有限公司)。

2 方法

2.1 镇心省睡益智方水提液的制备 取远志、石菖蒲、益智仁药材适量, 粗粉碎后按原方比例精密称取远志粗粉 300 g, 石菖蒲粗粉 50 g, 益智仁粗粉 50 g 先后倒入圆底烧瓶, 加入 10 倍水, 浸泡 1 h 后提取 1 h, 提取 2 次, 合并滤液, 备用。

2.2 镇心省睡益智方精油的制备 取药材石菖蒲、益智仁适量, 粗粉碎后按照处方比例, 精密称取石菖蒲 100 g, 益智仁 100 g, 参考 2015 年版《中国药典》挥发油乙法进行挥发油提取, 计算挥发油量, 收集挥发油。

2.3 分组及给药 动物适应性饲养 1 周后, 进行跳台实验, 依据首次电击发生时间及 3 min 内错误

次数筛选出学习记忆无显著性差异小鼠, 随机将 APP/PS1 双转基因小鼠分成模型组, 镇心省睡益智方精油低剂量组、高剂量组, 镇心省睡益智方水提液组, 以 C57BL/6JNju 小鼠作为正常组。每组 12 只。吸嗅方法参考文献 [18] 方法, 吸取精油于 DW-B 型压缩空气雾化器中并用蒸馏水分别稀释 80, 20 倍, 置于密闭染毒箱 (80 cm × 80 cm × 65 cm) 中, 使药物充分挥发弥漫整个实验盒内, 再将镇心省睡益智方精油低、高质量浓度组小鼠依次置入染毒箱中, 盖上染毒箱盒盖, 吸嗅 45 min。镇心省睡益智方精油低、高质量浓度组分别按 12.13, 48.50 mg · L⁻¹ 吸嗅给药精油 (镇心省睡益智方精油低、高浓度组按精油质量/蒸馏水体积比例计算)。镇心省睡益智方水提液组以 0.46 g · kg⁻¹ 剂量灌胃 (镇心省睡益智方水提液组剂量系按生药量计算), 正常组、模型组灌以等量的生理盐水 [19]。1 次/d, 连续给药 22 d。

2.4 跳台实验 给药第 16 天, 各组小鼠进行跳台实验。跳台实验进行 2 d。第 1 天进行跳台实验训练, 训练 24 h 后, 第 2 天开始测试, 记录各小鼠第 1 次电击发生时间和 3 min 内错误次数, 期间继续给药 [20]。

2.5 Morris 水迷宫实验 给药第 18 天采用 Morris 水迷宫实验测试小鼠认知能力。水迷宫主要由一直径 120 cm, 高 40 cm 圆桶及自动录像分析系统组成, 期间继续给药 [21]。定位航行实验, 实验训练阶段连续进行 5 d, 每天训练 3 次。训练时, 将小鼠面向池壁从 3 个人水点分别放入水池, 记录小鼠第 3 次从平台对位象限 (第三象限) 入水到找到隐蔽平台并站立于其上所需时间, 作为潜伏期, 用秒 (s) 表示。空间探索实验, 定位航行实验结束后, 第 6 天撤去平台, 从第三象限同一入水点放入水中, 测其 90 s 内穿过原平台象限的时间。

2.6 脑组织样品制备 [22] 取小鼠断头处死后, 分离脑组织。磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗净残留血, 吸水纸吸干液体后称质量, 于液氮速冻后转移至 -80 °C 下保存, 备用。取实验量脑组织, 加入 9 倍体积 PBS 缓冲液, pH 7.4, 配平后放入预冷适配器, 置于研磨机以频率 9.5 Hz, 研磨 20 min。匀浆液以 10 000 r · min⁻¹ 4 °C 离心 10 min, 收集上清液, 备用。

2.7 尼氏染色观察小鼠脑组织形态学变化 小鼠行为学测试完毕后, 心脏灌注处死取脑, 石蜡包埋, 常规石蜡切片脱蜡至水, 将切片放于尼氏染色液中, 染色 30 min; 蒸馏水清洗 2 ~ 3 min; 70% 乙醇分色

20 s; 依次经 70% 乙醇, 80% 乙醇, 95% 乙醇, 各 2 min 脱水; 无水乙醇 2 次, 每次 3 min; 二甲苯 2 次, 每次 5 min; 中性树胶封片, 显微镜下观察观察, 尼氏体呈紫色、细胞核呈淡紫色。

2.8 硫磺素 (ThS) 染色观察小鼠海马老年斑的变化 ThS 用 50% 的乙醇溶解, 配制浓度为 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。脑组织石蜡切片脱蜡, 蒸馏水洗 3 次, 每次 5 min。0.3% KMnO_4 溶液浸泡 3 ~ 5 min, 蒸馏水洗 3 次, 每次 5 min; 1% 草酸浸泡 3 ~ 5 min 至组织溶液内棕色消失; 1% 硼氢化钠浸泡 5 min, 蒸馏水洗 3 次, 每次 5 min; 0.0125% ThS 避光浸泡 7 min; 后用 50% 的乙醇分化 20 s, 转移至 PBS, 阴干, DAPI 封片, 荧光显微镜下观察^[23-24]。

2.9 ELISA 检测小鼠脑组织中 ACH, GLU, GABA 含量 设置标准品空及样本孔, 标准孔各加入不同浓度的标准品 50 μL ; 待测样本孔先加组织上清液 10 μL , 再加样本稀释液 40 μL ; 随后标准品孔和样本孔中每孔加入 HRP 标记的抗体 100 μL , 用封板膜封住, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱孵育 60 min; 弃去液体, 吸水纸拍干, 每孔加满洗涤液, 静置 1 min, 甩去洗涤液, 吸水纸上拍干, 重复 5 次; 每孔加入底物 A, B 各 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min; 每孔加入 50 μL 终止液, 15 min 内, 在 450 nm 波长处测定各孔吸光度 A。

2.10 免疫组化法检测脑组织中 GLUT1, IRS-1 的表达 脱蜡、水化组织切片。置于柠檬酸缓冲液 pH 6.0 的微波盒中, 于微波炉中中火加热 8 min, 对组织切片进行抗原修复。PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。3% H_2O_2 去离子水孵育 10 min, 以阻断内源性过氧化物酶。PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 用吸水纸吸干 PBS, 于玻片上滴加 5% 正常山羊血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 30 min。用吸水纸擦干玻片组织周围的液体, 滴加适当稀释的一抗, GLUT1 (1 : 100), IRS-1 (1 : 50), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。

滴加二抗 (1 : 100), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。滴加 DAB 显色液, 阳性信号为棕黄色或褐黄色。蒸馏水冲洗切片终止显色后复染、脱水、透明、封片。

2.11 统计学方法 数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计, 单因素方差分析, 方差齐时, 组间比较采用 LSD 最小显著性差异法; 方差不齐时, 选择 Tamhane's T_2 检验进行组间比较。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 AD 小鼠跳台实验逃避潜伏期及错误次数的影响 与正常组比较, 模型组小鼠潜伏期显著缩短 ($P < 0.01$), 错误次数显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组逃避潜伏期显著延长 ($P < 0.01$), 错误次数显著减少 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 镇心省睡益智方对小鼠跳台逃避潜伏期及错误次数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Effect of Zhenxin Kingshui Yizhi Fang on escape latency of mice in platform tests ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	逃避潜伏期/s	错误次数/次
正常	-	180	0
模型	-	105.57 \pm 80.50 ¹⁾	4.40 \pm 1.51 ¹⁾
镇心省睡益智方精油	12.13 ³⁾	170.00 \pm 22.36 ²⁾	1.00 \pm 0.57 ²⁾
	48.50 ³⁾	180.00 ²⁾	0 ²⁾
镇心省睡益智方水提液	0.46	158.14 \pm 39.82 ²⁾	1.00 \pm 0.57 ²⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ 单位为 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.2 对 AD 小鼠 Morris 水迷宫定位航行实验逃避潜伏期的影响 各组小鼠在水迷宫的逃避潜伏期均随着训练时间及次数的增加而缩短。与正常组比较, 模型组小鼠逃避潜伏期明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 在实验第 5 天, 各给药组逃避潜伏期明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

表 2 镇心省睡益智方对小鼠 Morris 水迷宫定位航行实验逃避潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 2 Effect of Zhenxin Kingshui Yizhi Fang on escape latency of mice in morris water maze experiment ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常	-	58.25 \pm 37.35	52.57 \pm 28.56	21.14 \pm 9.65	18.28 \pm 7.65	8.00 \pm 6.42
模型	-	90.00 ¹⁾	90.00 ²⁾	80.00 \pm 24.50 ²⁾	78.85 \pm 29.48 ²⁾	78.57 \pm 30.24 ²⁾
镇心省睡益智方精油	12.13 ⁵⁾	79.00 \pm 25.36	52.00 \pm 36.12 ⁴⁾	49.29 \pm 24.66 ³⁾	52.86 \pm 24.73	32.00 \pm 11.79 ⁴⁾
	48.50 ⁵⁾	77.43 \pm 22.94	82.29 \pm 20.41	77.71 \pm 28.34	47.29 \pm 30.73	42.57 \pm 28.41 ³⁾
镇心省睡益智方水提液	0.46	90.00	79.86 \pm 26.84	73.14 \pm 30.80	33.60 \pm 21.48 ⁴⁾	22.83 \pm 13.20 ⁴⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; ⁵⁾ 单位为 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.3 对空间探索实验目标象限停留时间的影响
与正常组比较,模型组目标象限停留时间有所降低,但无显著性差异;与模型组比较,各给药组在目标象限停留时间均有所升高,但无显著性差异。见表 3。

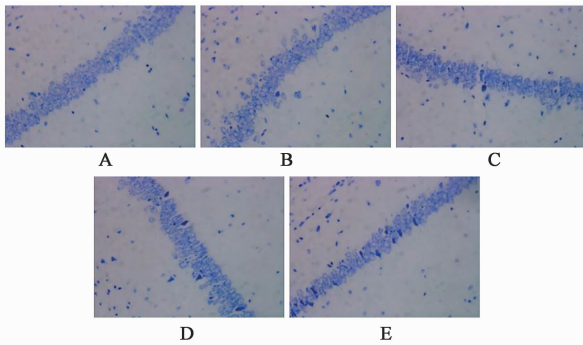
表 3 镇心省睡益智方对小鼠 Morris 水迷宫空间探索实验的影响 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Table 3 Effect of Zhenxin Xingshui Yizhi Fang on spatial probe test of mice in morris water maze experiment ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	目标象限停留时间/s
正常	-	14.62 ± 2.33
模型	-	6.42 ± 1.84
镇心省睡益智方精油	12.13 ¹⁾	12.87 ± 9.73
	48.50 ¹⁾	10.17 ± 3.99
镇心省睡益智方水提液	0.46	10.38 ± 4.77

注: ¹⁾表示单位为 mg·L⁻¹。

3.4 对 AD 小鼠海马 CA1 区神经元的影响 从尼氏染色结果看,正常组小鼠海马 CA1 区神经元排列有序,无明显核固缩。模型组小鼠海马 CA1 区神经元较正常组排列混乱,并具有神经元缺失、核固缩现象。各给药组小鼠海马 CA1 区神经元较模型组排列有序,无明显神经元缺失,但也存在核固缩。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 镇心省睡益智方精油低剂量组; D. 镇心省睡益智方精油高剂量组; E. 镇心省睡益智方水提液组(图 2~4 同)

图 1 镇心省睡益智方对小鼠海马 CA1 区神经元的影响(尼氏, ×400)

Fig. 1 Effect of Zhenxin Xingshui Yizhi Fang on morphology in hippocampal CA1 region in AD mice (Nissl's, ×400)

3.5 对 AD 小鼠海马 DG 区老年斑的影响 硫磺素染色结果显示,与正常组小鼠海马比较,模型组海马 DG 区的老年斑沉积水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠海马 DG 区老年斑沉积水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2, 表 4。

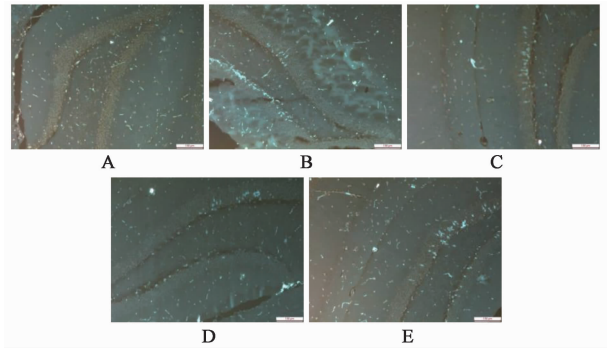


图 2 镇心省睡益智方对小鼠海马 DG 区老年斑的影响(硫磺素, ×400)

Fig. 2 Effect of Zhenxin Xingshui Yizhi Fang on deposition of seruleplaquin hippocampal DG region (ThS, ×400)

表 4 镇心省睡益智方对小鼠海马 DG 区老年斑的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Zhenxin Xingshui Yizhi Fang on deposition of seruleplaquin in hippocampal DG region ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IA
正常	-	0.28 ± 0.06
模型	-	0.41 ± 0.06 ¹⁾
镇心省睡益智方精油	12.13 ⁴⁾	0.24 ± 0.01 ³⁾
	48.50 ⁴⁾	0.25 ± 0.03 ³⁾
镇心省睡益智方水提液	0.46	0.33 ± 0.05 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;⁴⁾表示单位为 mg·L⁻¹。

3.6 对小鼠海马相关神经递质的影响 与正常组比较,模型组 ACH 水平显著降低 ($P < 0.01$), GLU, GABA 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,镇心省睡益智方水提液及镇心省睡益智方精油高、低剂量组 ACH 含量显著升高 ($P < 0.01$), GLU, GABA 的含量显著降低 ($P < 0.01$)。见表 5。

3.7 对 AD 小鼠脑组织 GLUT1 的影响 与正常组比较,模型组小鼠海马中 GLUT1 表达明显降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组小鼠海马中 GLUT1 表达明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 3, 表 6。

3.8 对 AD 小鼠脑组织 IRS-1 的影响 免疫组化结果显示,IRS-1 在小鼠皮层中有大量表达。与正常组比较,模型组小鼠皮层中 IRS-1 表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组皮层中 IRS-1 表达明显降低 ($P < 0.01$)。见图 4, 表 7。

4 讨论

A β 的聚集导致淀粉样老年斑是 AD 的主要致病机制之一,可引发神经纤维缠结、神经元死亡等

表 5 镇心省睡益智方对各组小鼠海马相关递质的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of Zhenxin Xingshui Yizhi Fang on level of neurotransmitter in hippocampus in mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	GABA /μmol·L ⁻¹	ACH /mg·L ⁻¹	GLU /g·L ⁻¹
正常	-	0.85 ± 0.07	81.53 ± 4.43	5.61 ± 0.38
模型	-	1.01 ± 0.15 ¹⁾	73.00 ± 4.65 ¹⁾	6.02 ± 0.32 ¹⁾
镇心省睡益智方精油	12.13 ³⁾	1.00 ± 0.05	86.76 ± 6.00 ²⁾	5.27 ± 0.21 ²⁾
	48.50 ³⁾	0.88 ± 0.09 ²⁾	91.34 ± 8.22 ²⁾	5.44 ± 0.33 ²⁾
镇心省睡益智方水提液	0.46	0.88 ± 0.07 ²⁾	85.37 ± 7.57 ²⁾	5.61 ± 0.21 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$; ³⁾表示单位为 mg·L⁻¹。

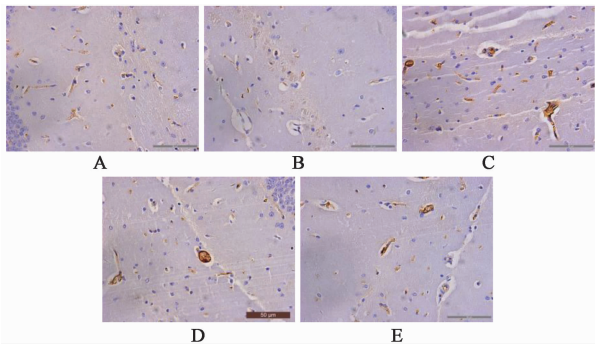


图 3 镇心省睡益智方对小鼠海马中 GLUT1 表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Zhenxin Xingshui Yizhi Fang on expression of GLUT1 in brain tissues of mice(IHC, ×400)

表 6 镇心省睡益智方对小鼠海马中 GLUT1 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of Zhenxin Xingshui Yizhi Fang on expression of GLUT1 in brain tissues of mice($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IA
正常	-	0.32 ± 0.04
模型	-	0.29 ± 0.02 ¹⁾
镇心省睡益智方精油	12.13 ⁴⁾	0.42 ± 0.03 ³⁾
	48.50 ⁴⁾	0.37 ± 0.06 ³⁾
镇心省睡益智方水提液	0.46	0.36 ± 0.05 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; ⁴⁾表示单位为 mg·L⁻¹。

其他病理现象^[25]。APP/PS1 双转基因小鼠能够表达人类突变的 β 淀粉样前体蛋白基因及早老素基因,可在小鼠 3~4 月龄便形成老年斑,随着月龄增加表现出行为学异常系列病理特征,是目前国际上比较通用的 AD 动物模型^[26]。有研究指出,AD 的发生与代谢异常密切相关,被认为是一种代谢性疾病^[4-5]。葡萄糖是脑组织中的主要能源物质,葡萄糖代谢与一般认知反应密切相关,正常情况下,脑能量代谢可通过区域调节调控 γ-氨基丁酸及谷氨酸

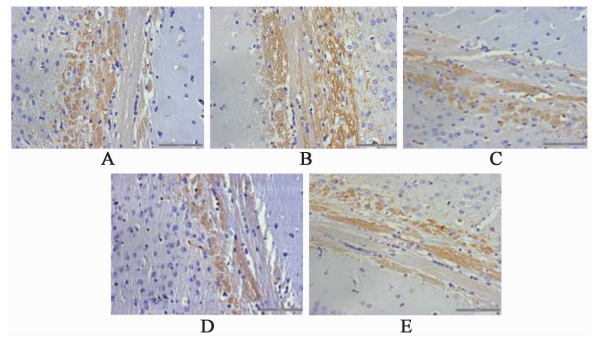


图 4 镇心省睡益智方对小鼠海马中 IRS-1 表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of Zhenxin Xingshui Yizhi Fang on expression of IRS-1 in brain tissues of mice(IHC, ×400)

表 7 镇心省睡益智方对小鼠海马中 IRS-1 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of Zhenxin Xingshui Yizhi Fang on expression of IRS-1 in brain tissues of mice($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IA
正常	-	0.29 ± 0.01
模型	-	0.34 ± 0.03 ¹⁾
镇心省睡益智方精油	12.13 ³⁾	0.28 ± 0.01 ²⁾
	48.50 ³⁾	0.29 ± 0.03 ²⁾
镇心省睡益智方水提液	0.46	0.25 ± 0.02 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$; ³⁾表示单位为 mg·L⁻¹。

的水平,或者通过系统调节周边神经元-下丘脑-垂体-肾上腺素轴,调节外周对葡萄糖的摄取,使脑内葡萄糖浓度维持稳态^[27]。AD 病人脑组织中葡萄糖转运体(GLUTs)水平出现下降,神经元或神经胶质细胞从外周摄取葡萄糖将出现障碍,导致脑能量代谢异常^[28]。同时,合成乙酰胆碱所需的乙酰辅酶 A 在脑组织中几乎由糖代谢通路提供,当脑能量代谢异常时,脑内乙酰胆碱的合成也受阻^[29]。此外,胰岛素介导的脑能量代谢信号转导通路在调节 ATP 的生成方面具有重要作用,IRS-1 在葡萄糖,ATP

代谢中起着负反馈调节作用,当胰岛素信号通路障碍时,将影响神经胶质细胞及神经元上 GLUTs 对葡萄糖的利用,导致能量代谢障碍,促进 AD 的发展^[30]。

本实验结果表明,通过镇心省睡益智方水提液灌胃及其精油吸嗅均对 APP/PS1 双转基因小鼠神经元具有一定保护作用,且能改善小鼠学习记忆行为、脑内 β 聚集及相关神经递质水平。同时,可改善胰岛素信号通路关键分子 IRS-1 及 GLUT1 的表达,提示 AD 的发生与能量代谢异常有密切联系。与文献报道一致^[31]。

镇心省睡益智方源自《千金翼方》,该方由远志、石菖蒲、益智仁 3 味药组成,方中远志安神益智、解郁,为主药;石菖蒲利气通窍、醒神益智,辅以远志开窍启闭宁神;益智仁温脾止泻摄涎,暖肾缩尿固精,辅以主药健脾补肾清心,三药合用,具有健脾补肾、醒神益智之功。现代研究表明,远志、石菖蒲、益智仁中含有远志皂苷元, β -细辛醚, α -细辛醚,丁香酚和异丁香酚,原儿茶酸等活性成分^[32]。有文献报道, β -细辛醚可能通过调节 β 淀粉样前体蛋白的表达,改善 β 蛋白诱导及 APP/PS1 双转基因痴呆模型小鼠的学习记忆能力^[33]。 α -细辛醚能刺激氨基酸转运载体 EAAC1 来减少突触间隙的 GLU 浓度,降低 GLU 兴奋性毒性作用。 α -细辛醚, β -细辛醚同时还具有抑制脑内胆碱酯酶活性作用^[34-35]。丁香酚可能通过改善胆碱乙酰转移酶 (ChAT), GABA, GLU 改善学习记忆功能^[36]。远志提取物可通过增加小鼠脑内葡萄糖的利用,修复压力诱导的记忆缺陷^[39]。这也进一步揭示,镇心省睡益智方及其精油防治 AD 的作用机制可能与减少 β 聚集,改善相关递质水平及能量代谢相关,充分体现了中医药多靶协同的特点。但镇心省睡益智方及其精油具体的物质基础及分子机制还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] PENG D, YUAN X, ZHU R. Memantine hydrochloride in the treatment of dementia subtypes [J]. J Clin Neurosci, 2013, 20 (11): 1482-1485.
[2] 张雅静, 纪勇, 石志鸿. 阿尔茨海默病的药物治疗进展[J]. 中国城乡企业卫生, 2016, 31(5): 15-18.
[3] 毕祥云, 陈学香. 阿尔茨海默病相关治疗的研究进展[J]. 中华保健医学杂志, 2017, 19(3): 275-277.
[4] Demetrius L A, Driver J. Alzheimer's as a metabolic disease[J]. Biogerontology, 2013, 14(6): 641-649.
[5] Monte S M D L, TONG M. Brain metabolic dysfunction

at the core of Alzheimer's disease [J]. Biochem Pharmacol, 2014, 88(4): 548-559.
[6] Blonz E R. Alzheimer's disease as the product of a progressive energy deficiency syndrome in the central nervous system: the neuroenergetic hypothesis [J]. Alzheimers Dis, 2017, 60(4): 1223-1229.
[7] Duara R, Grady C, Haxby J, et al. Positron emission tomography in Alzheimer's disease [J]. Neurology, 1986, 36(7): 879-887.
[8] Denver P, English A, Mcclean P L. Inflammation, insulin signaling and cognitive function in aged APP/PS1 mice [J]. Brain Behav Immun, 2018, doi: 10.1016/j. bbi. 2018. 03. 032.
[9] Choeiri C, Staines W, Messier C. Immunohistochemical localization and quantification of glucose transporters in the mouse brain [J]. Neurosci, 2002, 111(1): 19-34.
[10] [唐]孙思邈. 千金翼方 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 188.
[11] 范昌斌, 杨旭东. 镇心醒睡益智方治疗嗜睡症 14 例 [J]. 基层中药杂志, 2000, 14(3): 61.
[12] 贺密会, 刘明, 周小江, 等. 镇心省睡益智方对快动眼睡眠剥夺大鼠促醒和认知功能的影响 [J]. 解放军药理学学报, 2013, 29(5): 415-419.
[13] 杭天依, 李光武, 徐金勇. 嗅觉通路与大脑关联作用的研究进展 [J]. 立体定向和功能性神经外科杂志, 2013, 26(2): 125-128.
[14] 谭洁, 罗敏敏. 嗅球对嗅觉信息的处理 [J]. 生物物理学报, 2010, 26(3): 194-208.
[15] Dobetsberger C, Buchbauer G. Actions of essential oils on the central nervous system: an updated review [J]. Flavour Fragr J, 2011, 26(5): 300-316.
[16] Moss L, Rouse M, Wesnes K A, et al. Differential effects of the aromas of salvia species on memory and mood [J]. Hum Psychopharmacol Clin Exp, 2010, 25(5): 388-396.
[17] Jimbo D, Kimura Y, Taniguchi M, et al. Effect of aromatherapy on patients with Alzheimer's disease [J]. Psychogeriatrics, 2010, 9(4): 173-179.
[18] 胡泓博, 夏传余, 李光武. 丁香酚吸嗅对 MCAO 模型大鼠脑源性神经营养因子的影响 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 32(1): 28-32.
[19] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 《药理实验方法学》第二版出版发行 [J]. 中国药理学通报, 1992(1): 19.
[20] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 19.
[21] 闫盼盼, 闫国立, 詹向红, 等. Morris 水迷宫实验设计的统计学方法探析 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2): 264-266.

- [22] Kalita J, Kumar V, Misra U K, et al. Memory and learning dysfunction following copper toxicity: biochemical and immunohistochemical basis [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 55(2):1-12.
- [23] Kim H Y, Kim H V, Jo S, et al. EPPS rescues hippocampus-dependent cognitive deficits in APP/PS1 mice by disaggregation of amyloid- β oligomers and plaques[J]. *Nat Commun*, 2016, 7(8997):10755.
- [24] 张玲. HDAC6 在 APP^{swe}/PS1^{dE9} 阿尔茨海默病转基因模型小鼠发病机制中的作用[D]. 北京:北京协和医学院, 2014.
- [25] 郝徐艺, 罗思, 程淑意, 等. 当归芍药散对 AD 细胞模型铜离子介导的 A β 聚集的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(6):45-51.
- [26] Minkeviciene R, Ihalaainen J, Malm T, et al. Age-related decrease in stimulated glutamate release and vesicular glutamate transporters in APP/PS1 transgenic and wild-type mice[J]. *J Neurochem*, 2008, 105(3):584-594.
- [27] Hashimoto E, Ozawa H, Saito T, et al. Impairment of Gs α function in human brain cortex of Alzheimer's disease: comparison with normal aging [J]. *J Neural Transm*, 2004, 111(3):311-322.
- [28] Patching S G. Glucose transporters at the blood-brain barrier: function, regulation and gateways for drug delivery[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 54(2):1046-1077.
- [29] Szutowicz A, Bielarczyk H, Ronowska A, et al. Intracellular redistribution of acetyl-CoA, the pivotal point in differential susceptibility of cholinergic neurons and glial cells to neurodegenerative signals [J]. *Biochem Soc T*, 2014, 42(4):1101-1106.
- [30] PAN J, KAO Y L, Joshi S, et al. Activation of Rac1 by phosphatidylinositol 3-kinase *in vivo*: role in activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells[J]. *J Neurochem*, 2010, 93(3):571-583.
- [31] 何瑛琨. 基于脑能量代谢研究半夏泻心汤的神经保护作用[D]. 北京:北京中医药大学, 2016.
- [32] 卢成淑, 冯宁, 南国, 等. 石菖蒲及其活性成分防治阿尔茨海默病的研究进展[J]. *中草药*, 2016, 47(7):1236-1242.
- [33] GENG Y, LI C, LIU J, et al. Beta-asarone improves cognitive function by suppressing neuronal apoptosis in the beta-amyloid hippocampus injection rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(5):836-843.
- [34] 金虹, 徐国波, 黄毅. 石菖蒲抑酶活性的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(9):2241-2242.
- [35] 吴宾, 方永奇. 石菖蒲益智作用的物质基础及其机理研究[J]. *中医药学刊*, 2004, 22(9):1635-1636, 1641.
- [36] 杨天鹏, 唐敏, 刘巧琼, 等. 丁香酚通过嗅觉通路改善昆明鼠学习记忆的机制[J]. *中国康复医学杂志*, 2007, 22(6):487-489, 508, 477.
- [37] 张陶珍, 荣巍巍, 李清, 等. 远志的研究进展[J]. *中草药*, 2016, 47(13):2381-2389.

[责任编辑 孙丛丛]