

黑逍遥散对 AD 模型小鼠海马区 APP, PERK 表达的影响

崔淑梅¹, 吴红彦^{1,2,3*}, 马春林¹, 曾庆涛², 刘佳楠⁴, 朱凯敏¹

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 深圳市罗湖区人民医院, 广东深圳 518020;
3. 深圳市罗湖区中医院, 广东深圳 518001; 4. 定西市第二人民医院, 甘肃定西 743000)

[摘要] **目的:** 研究黑逍遥散对阿尔茨海默症(AD)模型小鼠海马神经元内质网应激的影响,包括行为学、组织病理学及淀粉样前体蛋白(APP),类蛋白激酶内质网激酶(PERK)等因子的表达。**方法:** 使用 SPF 级的 4 月龄双转基因(APP/PS1)雄性小鼠 42 只随机分为黑逍遥散高、低剂量组(6,3 g·kg⁻¹),盐酸多奈哌齐组(3.25 mg·kg⁻¹)及模型组 4 组,同种系同月龄 C57BL 小鼠 10 只作为正常组。首先适应环境 1 周,经不同药物干预治疗 2 个月,用 Morris 水迷宫行为学检测每组小鼠的学习和记忆能力;再治疗 1 个月,通过光镜来观察每组小鼠海马区组织病理学改变;免疫组化、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测小鼠海马区细胞内质网组织中 APP,PERK 蛋白及 mRNA 的表达情况。**结果:** 药物干预治疗后,与正常组比较,模型组小鼠的逃避潜伏期显著延长($P < 0.01$);模型组小鼠海马区内神经元严重损伤;模型组 APP,PERK 的表达量显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组小鼠逃避潜伏期均明显缩短($P < 0.05, P < 0.01$);海马区内神经元损伤程度均减轻;APP,PERK 的表达均明显降低($P < 0.05$)。**结论:** 黑逍遥散能够显著改善 AD 小鼠的学习记忆能力,可能与减少内质网过度应激反应等方面来减轻 AD 小鼠认知能力损伤有关。

[关键词] 阿尔茨海默症; 黑逍遥散; 内质网应激

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)22-0008-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192101

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190717.1740.015.html>

[网络出版时间] 2019-07-18 14:57

Effect of Hei Xiaoyaosan on Expressions of APP, PERK in Hippocampus Area of Alzheimer's Dementia Mice

CUI Shu-mei¹, WU Hong-yan^{1,2,3*}, MA Chun-lin¹, ZENG Qing-tao², LIU Jia-nan⁴, ZHU Kai-min¹

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Shenzhen Luohu People's Hospital, Shenzhen 518020, China;

3. Shenzhen Luohu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518001, China;

4. Dingxi Second People's Hospital, Dingxi 743000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Hei Xiaoyaosan on endoplasmic reticulum stress in hippocampal neurons of Alzheimer's disease (AD) model mice, including behavioral, histopathology and amyloid precursor protein (APP), protein kinase endoplasmic reticulum kinase (PERK) expressions. **Method:** The 42 4-month-old SPF-grade double transgenic (APP/PS1) mice were randomly divided into the high-dose group and the low-dose group, the donepezil hydrochloride group and the model group, and 10 C57BL mice of the same age were used as the blank group. Firstly, they were adapted to the environment for one week. After 2 months of treatment with different drug interventions, Morris water maze behavior was used to test the learning and memory abilities of each group of mice. After 1 month of treatment, histopathological changes in the hippocampus of each group of

[收稿日期] 20190329(012)

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金项目(81660760);兰州市 2015 年人才创新创业扶持项目(2015-RC-24)

[第一作者] 崔淑梅, 硕士, 从事方剂作用机制及药效物质基础研究, E-mail: 15294129769@163.com

[通信作者] * 吴红彦, 教授, 博士生导师, 从事方剂作用机制及药效物质基础研究, E-mail: wu.hy@163.com

mice were observed by light microscopy. The expressions of APP, PERK protein and mRNA in the endoplasmic reticulum of hippocampus were detected by immunohistochemistry (IHC) and real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** After drug intervention, compared with the blank group, the escape latency of the AD model group was significantly prolonged ($P < 0.01$), the neurons in the hippocampus of the model group were severely damaged, and the expressions of APP and PERK in the model group were significantly increased ($P < 0.01$). In the comparison model group, the escape latency of the mice in each treatment group was significantly shortened ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the degree of neuronal damage in the hippocampus of each treatment group was alleviated, and the positive expressions of APP and PERK in each treatment group were weakened ($P < 0.05$). **Conclusion:** Hei Xiaoyaosan can significantly improve the learning and memory abilities of AD mice, which may be related to the reduction of the excessive stress response of endoplasmic reticulum to alleviate cognitive impairment in AD mice.

[**Key words**] Alzheimer's disease; Hei Xiaoyaosan; endoplasmic reticulum stress

阿尔茨海默病(AD)是一种最常见的与年龄相关的晚期神经退行性疾病^[1],其特点是隐匿、慢性和进行性的记忆障碍伴随着衰老的积累,同时伴随着斑块、缠结的神经原纤维和神经元的大量丢失^[2]。受AD影响的人口在2015年高达4 400万,假如依旧找不到好的治疗方法,估计到2030年将会增加1倍,2050年甚至高出2倍^[3],所以AD的治疗已经成为人类所必须研究的课题。

神经元中 β -淀粉样蛋白(A β)引起的氧化应激能导致细胞内Ca²⁺浓度增高、线粒体功能障碍和细胞凋亡等^[4-6]。有研究表明老年斑内淀粉样的蛋白肽是其成分^[7],可通过激活细胞内凋亡途径导致神经细胞死亡,ERS途径是新发现的凋亡途径^[8]。AD的大脑病理改变可见显著的神经细胞凋亡,在动物模型和死亡AD患者的尸体中亦有发现^[9-10]。因此,神经元的凋亡机制可能为AD的防治提供明确的靶点。

AD在中医中归属于“痴呆”“健忘”等,病位在脑,与肝肾脾功能紊乱密切相关。“治病之要诀……无论外感内伤……所伤者无非气血”,肝主藏血、主疏泄为根本,宜从肝论其防治^[11],人体之精髓本于先天之精,受后天脾胃之精气濡养,脾胃升降之间的协调平衡又依赖于肝的疏泄功能,所以老年痴呆与肝有密切的关系。《医学心悟》云:“肾主智,肾虚则智不足”,由此表明痴呆的发生机制内包括肾虚髓减。故AD与肝肾密切相关。

黑逍遥散出自清·高鼓峰《医宗己任编》,由熟地黄、北柴胡、当归、白芍、茯苓、白术、薄荷、生姜、炙甘草组成,实为《太平惠民和剂局方》逍遥散加熟地黄而成。诸药合用肝肾同补,肝脾并调,气血兼顾,共奏疏肝养血,益肾健脾之功。结合前期研究结果

可知,通过黑逍遥散对AD模型小鼠药效学以及作用机制等几方面进行实验研究,结果表明其提高了小鼠认知记忆能力,亦调节了脑内相关神经递质活性^[12-14]。故积极开展黑逍遥散治疗AD的临床观察及实验研究具有重大的科学意义和社会价值。本实验则通过探讨黑逍遥散对内质网应激相关因子的干预作用,为本方对AD的治疗提供新的方向。

1 材料

1.1 动物 42只4月龄SPF级双转基因小鼠(APP/PS1),体质量(25 \pm 5)g,正常组选用10只同月龄同种系C57BL/6J小鼠,均由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合格证号SCXK(京)2014-0004。小鼠饲养于甘肃中医药大学SPF级别动物实验中心,许可证号SYXK(甘)2015-0005,温度(24 \pm 1) $^{\circ}$ C和湿度(50%~60%)恒定环境内有规律的12h光照和12h暗周期,饲料由北京科澳协力饲料有限公司提供,自由饮水,适应环境1周后进行灌胃。这些动物的使用是符合国内保护和利用实验动物的标准并且在动物伦理委员会批准(编号2017-105)的实验规程下进行的。

1.2 药物 逍遥散加入熟地黄制备成黑逍遥散,参照2015年版《中国药典》组成药物比例:薄荷-炙甘草-茯苓-当归-白芍-白术-生姜-北柴胡-熟地黄为1:4:5:5:5:5:5:5:7.5。经甘肃中医药大学中药教研室景明教授鉴定,符合2015年版《中国药典》标准。药物煎煮:除薄荷外,其他药物第1次加蒸馏水浸泡4h,再按常规法煎煮2次,第2次最后5min放入薄荷煎煮,每次40min,再融合两次药液,滤出药液加热浓缩至每1mL药液含生药1g的黑逍遥散药液,高温灭菌冷却后封装于高压灭菌的玻璃瓶中,装瓶置4 $^{\circ}$ C冰箱备用,使用时稀释至所需浓度。

盐酸多奈哌齐[卫材(中国)药业有限公司,批号 1604043]。

1.3 试剂 淀粉样前体蛋白(APP),类蛋白激酶内质网激酶(PERK)抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 GTX101336, YT3666);免疫组化试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号 C506333-0010];苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号 C0105);trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 15596026);GoScript™ 逆转录系统,GoTaq® Mix(美国 Promega 公司,批号分别为 0000303542, 0000275172);PCR® STRIP CAPS(美国 Axygen Scientific 公司,批号 05814384),引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列	长度/bp
GAPDH	上游 5'-AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC-3'	90
	下游 5'-CAACAATCTCCACTTTGCCACTG-3'	
APP	上游 5'-AGATCTCGGAAGTGAAGATGGATG-3'	162
	下游 5'-TGATGACAATCACGGTTGCTATG-3'	
PERK	上游 5'-AATCATCAGCACTTTAGATGGACGA-3'	180
	下游 5'-AGGCACAGCTGTAGGTTGGTTTC-3'	

1.4 仪器 MT-200 型 Morris 水迷宫视频跟踪系统, BI-2000 型医学图像分析系统(成都泰盟科技有限公司);LEICA2016 型超薄切片机(德国 Leica 公司);KT 型电脑生物组织摊烤片机(浙江金华市科研仪器设备有限公司);CKX21 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);HC-3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳仪器有限公司);ABI7500 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 将实验小鼠按随机法分为 4 组,所有小鼠均予以灌胃治疗,用药时剂量按照人与小鼠体重质量比例进行换算,黑逍遥散高、低剂量组按 6,3 g·kg⁻¹生药剂量灌胃(相当于 60 kg 成人每日剂量的 5,2.5 倍),盐酸多奈哌齐组每日按照 3.25 mg·kg⁻¹(相当于 60 kg 成人每日剂量的 5 倍),模型组和正常组按同等方式灌纯净水。1 d/次,灌服 3 个月。

2.2 水迷宫(Morris)行为学检测 将 100 cm 的电路 Ar 池内加入适量二氧化钛粉,搅拌均匀,水温保

持在 21 ℃ 左右。一个 10 cm 的圆形平台隐藏在水面下 1 cm 的固定位置。实验前两天进行适应性学习训练,每只小鼠每天进行 2 次游泳练习。第 3 天正式开始测试,所有动物每天进行 2 次游泳实验,中间休息 15 min,连续进行 5 d,小鼠游泳最长时限为 120 s。

2.3 HE 染色观察小鼠海马组织的病理变化 小鼠禁食 12 h 后开颅取脑,将其矢状位一分为二后投入预先配好的固定液中室温固定 2 h,4 ℃ 冰箱固定 1 周。组织经脱蜡、各级乙醇脱水、苏木素染核,分化、水洗、伊红染色后,封片后,光学显微镜下摄影观察。

2.4 免疫组化检测小鼠海马区 APP,PERK 蛋白的表达 将组织石蜡切片脱蜡并且水化后,再经抗原修复,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,加一抗(1:200,4 ℃ 过夜,37 ℃ 复苏 35 min),二抗(1:500,37 ℃,30 min),PBS 冲洗,再进行 DAB 显色(1:20),苏木素染(室温 90 s,返蓝 2 s),不同浓度乙醇脱水,Xylene 透明后封片拍照,并用 Image Pro Plus 软件予以分析其积分吸光度 IA。

2.5 Real-time PCR 检测小鼠海马区 APP,PERK mRNA 的表达 小鼠快速断头处死后取另一侧侧大脑海马区,采用按 trizol 法裂解、匀浆后于 4 ℃ 下离心(12 000 r·min⁻¹,10 min),检测浓度纯度后,依据逆转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,扩增反应(反应条件为 95 ℃ 5 min,95 ℃ 变性 20 s,60 ℃ 退火、延伸 45 s,45 个循环)。实验中每次检测每组设置 3 个复孔,且每个指标反复做 3 次,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,最终基因表达量采用 2^{-ΔΔC_t} 计算。

2.6 统计学处理 所有数据用 SPSS 21.0 软件处理后,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析处理组间对比数据,如方差齐性则采用 LSD,方差不齐采用 Dunnett's T3,以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠一般状态观察 治疗过程中观察每组小鼠的一般状态。比较模型组及其他治疗组,正常组小鼠精神状态良好,毛色滑润,饮食良好且无不正常死亡。模型组小鼠毛色花白脱落,精神状态较差,互相打架,后背部皮肤常有破裂且干尾僵硬,治疗过程中不明原因死亡 2 只。盐酸多奈哌齐组与黑逍遥散高剂量组小鼠状态较好,均死亡 1 只,黑逍遥散低剂量组小鼠也有毛发发白脱落和皮肤皴裂现象,死亡 2 只。

3.2 对 AD 小鼠逃避潜伏期和跨原平台次数的影响 与正常组比较,模型组小鼠逃避潜伏期显著

延长 ($P < 0.01$)。与模型组比较,各治疗组逃避潜伏期明显减短 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2, 图 1, 2。

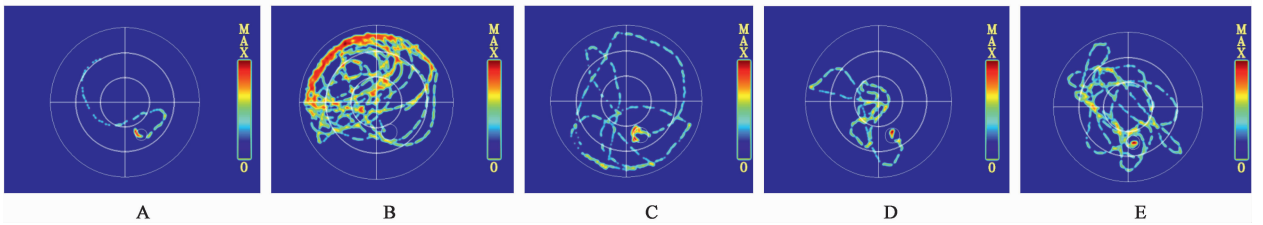
3.3 对 AD 小鼠海马组织病理学的影响 正常组细胞核形态结构正常,细胞排列整齐。与正常组比较,模型组细胞核排列紊乱,形态变大,染色加深,有大量的空泡。与模型组比较,药物组染色较浅,空泡减少,盐酸多奈哌齐组和黑逍遥散高剂量组接近正常组,低剂量组接近模型组。见图 3。

3.4 对 AD 小鼠海马区 APP, PERK 蛋白阳性表达的影响 与正常组比较,模型组海马组织内

表 2 黑逍遥散对 AD 小鼠逃避潜伏期和跨原平台次数的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effect of Hei Xiaoyaosan on escape latency and frequency of crossing original platform in AD mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	逃避潜伏期/s	跨越平台数/次
正常	10	-	31.50 ± 24.99	6.40 ± 3.57
模型	8	-	119.56 ± 1.41 ¹⁾	0.89 ± 1.17 ¹⁾
盐酸多奈哌齐	9	3.25×10^{-3}	52.22 ± 41.15 ³⁾	4.82 ± 2.27 ³⁾
黑逍遥散	10	6	41.00 ± 19.11 ³⁾	5.45 ± 1.92 ³⁾
	9	3	62.77 ± 40.44 ²⁾	3.70 ± 2.49 ²⁾

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



A. 正常组; B. 模型组; C. 黑逍遥散高剂量组; D. 黑逍遥散低剂量组; E. 盐酸多奈哌齐组(图 2~5 同)

图 1 定位航行轨迹

Fig. 1 Positioning and navigation trajectory diagram

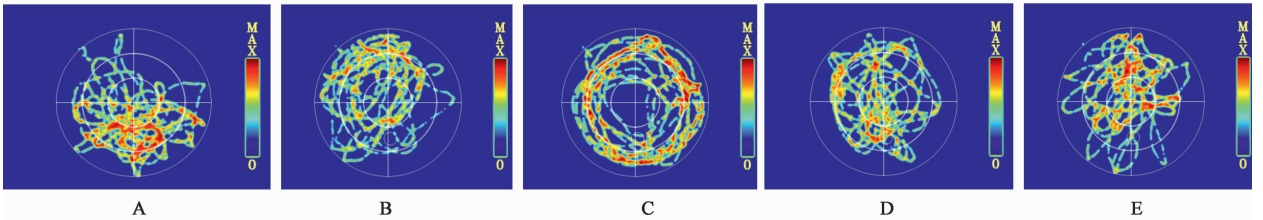


图 2 空间搜索轨迹

Fig. 2 Space search trajectory diagram

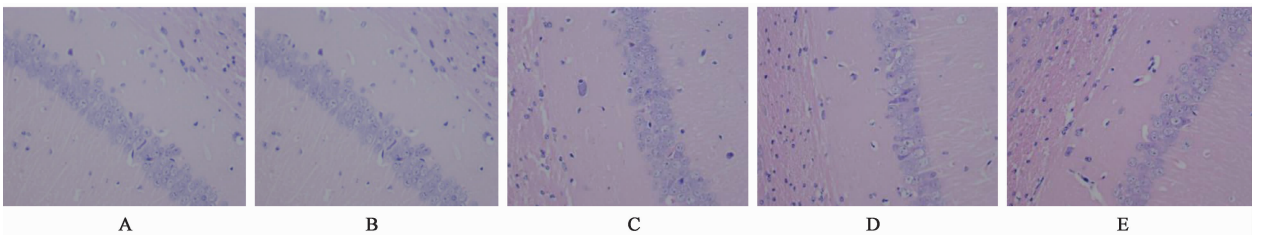


图 3 黑逍遥散对 AD 小鼠海马组织病理学的影响 (HE, ×200)

Fig. 3 Effect of Hei Xiaoyaosan on hippocampal histopathology in AD mice (HE, ×200)

APP, PERK 蛋白的表达量均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较,各给药组 APP, PERK 蛋白的表达量均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3, 图 4, 5。

3.5 对 AD 小鼠海马区 APP, PERK mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组海马组织内 APP, PERK mRNA 的表达均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型

组比较,各治疗组 APP, PERK mRNA 的表达均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

4 讨论

$A\beta$ 来源于 $A\beta$ 前体 (APP)。神经元能够合成大量的 APP, APP 在翻译后进入内质网, APP 本身或转运至神经轴或加工成其他产物包括 $A\beta$, 大量 $A\beta$

表 3 黑逍遥散对 AD 小鼠海马区 APP, PERK 蛋白阳性表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Hei Xiaoyaosan on optical density of APP, PERK proteins in hippocampal tissues of AD mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	APP	PERK
正常	-	0.210 ± 0.015	0.144 ± 0.006
模型	-	0.359 ± 0.038 ¹⁾	0.264 ± 0.004 ¹⁾
盐酸多奈哌齐	3.25 × 10 ⁻³	0.249 ± 0.015 ²⁾	0.192 ± 0.024 ²⁾
黑逍遥散	6	0.244 ± 0.012 ²⁾	0.177 ± 0.006 ²⁾
	3	0.287 ± 0.011 ²⁾	0.221 ± 0.034 ²⁾

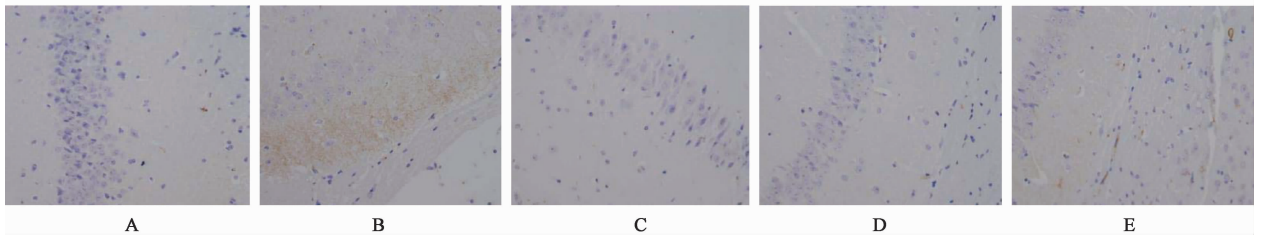


图 4 黑逍遥散对 AD 小鼠海马区 APP 蛋白阳性表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 4 Effect of Hei Xiaoyaosan on optical density of APP proteins in hippocampal tissues of AD mice (IHC, ×200)

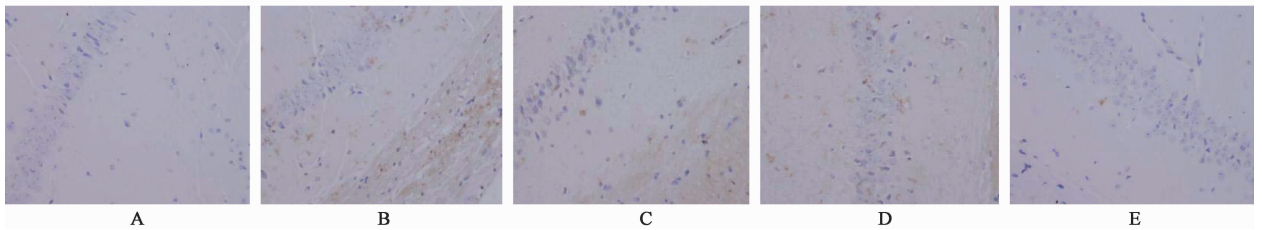


图 5 黑逍遥散对 AD 小鼠海马区 PERK 蛋白阳性表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 5 Effect of Hei Xiaoyaosan on optical density of PERK proteins in hippocampal tissues of AD mice (IHC, ×200)

表 4 黑逍遥散对 AD 小鼠海马组织 APP, PERK mRNA 相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Hei Xiaoyaosan on relative expression of APP and PERK mRNA in hippocampus of AD mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	APP	PERK
正常	-	1.000 ± 0.073	0.417 ± 0.020
模型	-	2.718 ± 0.483 ¹⁾	1.271 ± 0.145 ¹⁾
盐酸多奈哌齐	3.25 × 10 ⁻³	1.304 ± 0.273 ²⁾	0.963 ± 0.071 ²⁾
黑逍遥散	6	1.220 ± 0.236 ²⁾	0.957 ± 0.119 ²⁾
	3	1.525 ± 0.316 ²⁾	1.002 ± 0.073 ²⁾

跨膜蛋白, 随后启动未折叠蛋白反应 (UPR)^[24]。PERK 从结合状态解离并发生二聚化和自身磷酸化 (p-PERK) 而被激活。PERK 是一种重要的丝/苏氨酸蛋白激酶, 是 3 条信号通路中最先被激活的 ERS 感受器^[25], 可被内质网中错误折叠的蛋白激活, 进而抑制错误折叠蛋白的合成, 促进内质网功能的

恢复。由 APP 在内质网内加工产生^[15]。Aβ 因其神经细胞毒性及其在脑组织内的沉积, 所以其在 AD 的发病中占有十分重要的作用^[16-18]。

78 kDa 葡萄糖调节蛋白 (GRP78) 是内质网应激 (ER) 信号通路的初始分子伴侣, 参与了新生多肽的转运, 促进了新蛋白的产生^[19-21]。通常 GRP78 与肌醇依赖酶 1 (IRE1), 转录激活因子-6 (ATF-6) 和 PERK^[22-23] 3 种跨膜蛋白相结合, 这些二聚体在正常情况下保持休眠状态。当产生病理因素时, GRP78 从上述 3 种蛋白质中分离出来, 释放并激活这些

恢复。

ER 应激诱导的内皮细胞凋亡同样与多种人类疾病有关, 包括糖尿病、动脉粥样硬化和神经变性等^[26]。也有越来越多的证据表明 ER 应激在 AD 的进展中起主要作用, 且 PERK 的激活处于 ER 应激的中心位置^[27]。

将外源性 AD 相关基因导入到相关动物细胞, 使其后代通过遗传增加基因表达或突变产物等, 可引起 AD 相关病理性损害^[28]。双转基因鼠能对 AD 的病理变化表现较为具体, 是目前作为常用的实验用鼠。APP/PS1 小鼠 3 月龄时记忆障碍开始, 6 月龄淀粉样病理开始, 9 ~ 10 个月时小鼠出现皮层和海马淀粉样病理和记忆障碍^[29]。所以治疗始于小鼠 3 月龄。

经过课题组多年来的临床及科研研究^[30-37], 可发现黑逍遥散可显著增加乙酰胆碱转移酶 (ChAT) 活性, 减少单胺氧化酶 (MAO), 乙酰胆碱酯酶

(AChE)的活性。对氢溴酸东莨菪碱所诱发的小鼠的学习记忆功能障碍有显著性的改善作用,有效控制 AD 患者炎症因子的表达;黑逍遥散的含药血清可提高 PC12 细胞的活力,减少 LDH 的释放,保护 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞凋亡。黑逍遥散对于 $A\beta_{25-35}$ 诱导的大鼠模型的作用机制与海马中 $A\beta$ 淀粉样蛋白沉积和清除的调节及相关途径有关,涉及调节和保护各种神经元及促进神经再生相关^[13]。能够显著改善 AD 小鼠的学习记忆能力,可能与调节 $A\beta$ 在海马区的异常沉积和降解作用等方面来减轻 AD 小鼠认知能力损伤有关^[14]。

本次实验数据可知,经黑逍遥散治疗后小鼠的逃逸潜伏期明显缩短,所以黑逍遥散可以明显改善小鼠的行为学异常和学习记忆能力;且经药物治疗后的小鼠海马组织病理切片对比模型组神经细胞损伤程度有所减轻,并且黑逍遥散高剂量组与盐酸多奈哌齐组疗效较为明显。双转基因小鼠脑中 APP, PERK 的表达量明显降低。由此可知,AD 小鼠记忆认知异常可能与其海马区内质网应激所引起的细胞凋亡相关,黑逍遥散可能能够修复凋亡的海马区神经细胞,以提高 AD 的小鼠记忆及学习能力。因此,笔者推测黑逍遥散可能有助于改善与 $A\beta$ 和 ER 应激相关的认知功能障碍,但具体作用机制有待于进一步验证。

[参考文献]

[1] 李娟,姚遥,韩怀钦,等. 苦参碱对 LPS 诱导的阿尔茨海默病小鼠模型学习记忆功能和脑内神经炎症的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(24): 134-139.

[2] 董贤慧,柴锡庆. 阿尔茨海默病发病机制研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(20): 5906-5912.

[3] Listed N A. Dementia cases set to triple by 2050 but still largely ignored[J]. Media Centre, 2012, 110(8): 88-92.

[4] Zaghi J, Goldenson B, Inayathullah M, et al. Alzheimer disease macrophages shuttle amyloid-beta from neurons to vessels, contributing to amyloid angiopathy[J]. Acta Neuropathol, 2009, 117(2): 111-115.

[5] 张志辰,温彬宇,高俊峰,等. 地黄黄子调节 PERK/eIF2 α 通路抑制能量代谢障碍 AD 小鼠脑内 β 淀粉样蛋白累积的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 91-98.

[6] 袁旭,李政,王晓天,等. 中药及其有效成分在抗癫痫中的作用与机制[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(1): 9-18.

[7] Kumar D, Ganeshpurkar A, Kumar D, et al. Secretase

inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: long road ahead[J]. Eur J Med Chem, 2018, 148(22): 165-169.

[8] LIU Q, ZHAO D, JI Y X, et al. Lei T role of glucose-regulated protein 78 in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Med Sci, 2016, 36(2): 168-173.

[9] Anderson A J, SU J H, Cotman C W. DNA damage and apoptosis in Alzheimer's disease: colocalization with C-jun immunoactivity. Relationship to brain area and effect of postmortem delay [J]. J Neurosci, 2011, 16(9): 1710-1719.

[10] 许浩,胡祥友,秦松,等. 阿尔茨海默病脑海马凋亡神经元发生率增高[J]. 中国神经科学杂志, 2002, 18(1): 462-465.

[11] 王清任.《医林改错》白话解[M]. 人民军医出版社, 2007: 16-17.

[12] 刘佳楠. 黑逍遥散对 APP/PS1 双转基因小鼠海马区内 $A\beta$ 清除机制的研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2018.

[13] 李海龙,王虎平,刘建鸿,等. 黑逍遥散对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 AD 大鼠模型脑组织和血清 SOD, GSH-Px 及 MDA 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 186-189.

[14] 吴红彦,马春林,崔淑梅,等. 黑逍遥散对 AD 模型小鼠海马 $A\beta$ -(1-42), GSK-3 β , NEP, IDE 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(5): 36-42.

[15] 曹文渊. p18 在 APP 运输和加工过程中的功能研究[D]. 北京: 北京大学, 2013.

[16] Roychaudhuri R, YANG M, Hoshi M M, et al. Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease[J]. J Biol Chem, 2009, 284(8): 47-49.

[17] Yankner B A, LU T. Amyloid beta-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease[J]. J Biol Chem, 2009, 284(8): 47-55.

[18] Zaghi J, Goldenson B, Inayathullah M, et al. Alzheimer disease macrophages shuttle amyloid-beta from neurons to vessels, contributing to amyloid angiopathy[J]. Acta Neuropathol, 2009, 117(2): 111.

[19] Schönthal A H. Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy[J]. Scientifica, 2012, 212(12): 1-26.

[20] ZHANG Q, LIU J, CHEN S, et al. Caspase-12 is involved in stretch-induced apoptosis mediated endoplasmic reticulum stress[J]. Apoptosis, 2016, 21(4): 432-442.

[21] ZHANG X Y, ZHANG T T, SONG D D, et al. Endoplasmic reticulum chaperone GRP78 is involved in autophagy activation induced by ischemic

- preconditioning in neural cells [J]. *Mol Brain*, 2015, 8 (20):1-12.
- [22] Meares G P, Mines M A, Beurel E, et al. Jope RSGlycogen synthase kinase-3 regulates endoplasmic reticulum (ER) stress-induced CHOP expression in neuronal cells[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(11):1621-1628.
- [23] 段冷昕,高杨,吴欣芳,等. 蚯蚓活性组分对内质网应激所致肝细胞凋亡的保护作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(14):2973-2978.
- [24] Badiola N, Penas C, Miñano-Molina A, et al. Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12 [J]. *Cell Death Dis*, 2011, 2(4):149-152.
- [25] Cano-González A, Mauro-Lizcano M, Iglesias-Serret D, et al. Involvement of both Caspase-8 and Noxa-activated pathways in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in triple-negative breast tumor cells [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(8):134-136.
- [26] Adamopoulos C, Farmaki E, Spilioti E, et al. Advanced glycation end-products induce endoplasmic reticulum stress in human aortic endothelial cells [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2014, 52(6):151-160.
- [27] TIAN N X, GAO Y B, WANG X L, et al. Emodin mitigates podocytes apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress through the inhibition of the PERK pathway in diabetic nephropathy [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12:2195-2211.
- [28] 杨植媛. 黑逍遥散对阿尔兹海默病模型大鼠海马组织 $A\beta$ 代谢相关靶点影响 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2014.
- [29] 吴小明, 朱美香, 李如辉. 肝肾二脏与抗衰老的关系探讨 [J]. *甘肃中医*, 2004, 17(3):3-5.
- [30] 吴红彦, 王彩霞. 黑逍遥散对 AD 小鼠脑组织 AchE, ChAT, MAO 活性的影响 [J]. *甘肃中医学院学报*, 2010, 27(2):23-25.
- [31] 吴红彦, 王彩霞. 黑逍遥散对 AD 小鼠学习记忆及抗氧化能力的影响 [J]. *甘肃中医药大学学报*, 2010, 27(1):9-12.
- [32] 杨长生, 吴红彦, 李海龙, 等. 黑逍遥散对阿尔茨海默病模型大鼠行为学及血清肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素-6 和- 1β 的影响 [J]. *西部中医药*, 2015, 28(2):10-12.
- [33] 吴红彦, 王虎平, 王彩霞. 黑逍遥散对老年性痴呆的防治作用及其机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(4):912-913.
- [34] 吴红彦, 李海龙, 张芸, 等. 黑逍遥散含药血清对 $A\beta_{25-35}$ 诱导阿尔茨海默病细胞模型的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2015(1):137-139.
- [35] 吴红彦, 邓健男, 李海龙, 等. 黑逍遥散含药血清对 PC12 两种 AD 模型的 LDH、T-SOD、MDA 的影响 [J]. *云南中医中药杂志*, 2014, 35(9):75-77.
- [36] 吴红彦, 李海龙, 顾静, 等. 黑逍遥散对 $A\beta$ -(25~35) 诱导 AD 模型大鼠脑组织神经递质及海马病理改变的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(16):4417-4420.
- [37] 李海龙. 黑逍遥散对阿尔茨海默病大鼠海马基因表达谱的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(11):1345-1351.

[责任编辑 周冰冰]