

分类号 R22
学校代码 10517

学号 YX19100501134
密级 不保密



硕士学位论文

(学术学位)

基于 Nrf2 信号通路探讨补脑扶神方对 AD 模型大鼠氧化应激的影响

学位申请人：赵芬

学科专业：中医基础理论

指导教师及职称：袁德培 教授

答辩日期：2022年5月22日

二〇二二年五月

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the
Requirements for the Degree of Master**

(Academic Degree)

**The effects of Bunaofushenfang on oxidative stress in
AD model rats based on Nrf2 signal pathway**

Candidate : Zhao Fen

**Major : Basic theory of traditional
Chinese medicine**

Supervisor: Prof. Yuan Depei

**Hubei Minzu University
Enshi 445000, P. R. China**

May, 2022

湖北民族大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律后果，由本人承担。

作者签名（手写）：赵芳 日期：2022年5月22日

学位论文授权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权湖北民族大学可以将本学位论文的全部或部分内 容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

1. 保密□，在_____年解密后适用本授权书。
2. 不保密□。

（请在以上相应方框内打“√”）

作者签名（手写）：赵芳

导师签名（手写）：李廷培

日期：2022年5月22日

日期：2022年5月22日

基于 Nrf2 信号通路探讨补脑扶神方对 AD 模型大鼠氧化应激的影响

【摘要】 目的：探讨补脑扶神方对双侧海马 CA1 区注射 A β ₁₋₄₂ 建立的 AD 模型大鼠氧化应激的影响及其可能机制。**方法：**将 50 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组 (control)、假手术组 (sham)、模型组 (AD)、补脑扶神方组 (AD+bnfsf)、多奈哌齐组 (AD+dnpcq) 5 组，通过双侧海马 CA1 区注射 A β ₁₋₄₂ 建立 AD 模型，正常组不做处理，假手术组同法注射无菌生理盐水。造模 7 天后，sham 组、AD 组双蒸水灌胃，AD+bnfsf 组、AD+dnpcq 组给予相应药液灌胃处理，control 组不灌胃，灌胃持续 4 周。用 Morris 水迷宫观察各组大鼠学习记忆能力；HE 与尼氏染色法观察各组脑海马 CA1 区神经元细胞及尼氏小体的变化情况；试剂盒检测各组大鼠血清、脑海马中 H₂O₂、SOD、GSH-Px、MDA 含量；Western Blot 检测各组大鼠海马中 Nrf2、Keap1、HO-1 蛋白表达。**结果：**1. Morris 水迷宫结果显示：与 control、sham 组相比，AD 组大鼠寻找平台时间明显延长 ($P < 0.01$)，游泳轨迹更为杂乱无序，首次抵达平台的时间延长 ($P < 0.05$)，且穿越平台次数明显减少 ($P < 0.01$)；与 AD 组相比，用药组大鼠潜伏期缩短，寻找平台的时间缩短 ($P < 0.05$)，在游泳过程中有寻找平台的倾向，首次抵达平台的时间缩短，穿过平台的次数增加 ($P < 0.05$)。2. HE 染色结果显示：与 control 组和 sham 组相比，AD 组海马 CA1 区神经元染色不均，排列紊乱，神经元数目明显减少，神经元结构被破坏；经给药治疗后，AD+bnfsf 组海马 CA1 区可见神经元细胞排列较整齐，细胞间距增大，神经元细胞数目较 AD 组增多，神经元细胞结构欠完整；AD+dnpcq 组，可见神经元排列整齐，稍疏松，神经元数目较 AD 组增多，神经元结构基本完整。3. 尼氏染色结果显示：与 control 组和 sham 组相比，AD 组 CA1 区神经元染色颜色深浅不一，排列紊乱，尼氏小体数量减少；各用药组 CA1 区神经元染色较深，细胞排列较整齐，尼氏小体丰富。4. 氧化应激指标结果显示：与 control 组、sham 组相比，AD 组大鼠血清、海马组织 H₂O₂、MDA 含量增高，SOD、GSH-Px 含量下降 ($P < 0.05$)；与 AD 组相比，各用药组血清、海马组织 H₂O₂、MDA 含量下降，SOD、GSH-Px 升高 ($P < 0.05$)。5. WB 结果显示：与 control 组、sham 组相比，AD 组海马组织中 Nrf2

2 及 HO-1 蛋白表达明显降低, Keap1 蛋白表达上升 ($P<0.05$); 与 AD 组相比, 各用药组海马组织中 Nrf2、HO-1 表达上升, Keap1 蛋白表达下降 ($P<0.05$)。

结论: 补脑扶神方能改善 AD 大鼠学习记忆能力, 对 AD 大鼠海马神经元细胞有一定的保护作用, 其机制可能是通过调节 Nrf2 信号通路, 抑制氧化应激反应。

【关键词】 阿尔茨海默病; 氧化应激; 补脑扶神方; 核因子NF-E2相关因子; Kelch样环氧丙烷相关蛋白-1

The effect of bunaofushenfang on oxidative stress in AD model rats based on Nrf2 signal pathway

Abstract: Objective To explore the effect of bunaofushenfang on bilateral lateral ventricle injection of A β ₁₋₄₂ effects of oxidative stress in AD model rats and its possible mechanism. **Methods** Fifty male SD rats were randomly divided into five groups: Normal group (control) , Sham operation group (sham) , Model group (AD) , Bunaofushenfang group (AD+bnfsf) and Donepezil group (AD+dnpq) . The AD model was established by bilateral lateral ventricle injection of A β ₁₋₄₂, the Sham operation group was injected with sterile normal saline in the same way. 7 days after modeling, sham group and AD group were given double distilled water by gavage, and the AD+bnfsf group and AD+dnpq group were treated with the corresponding drug liquid gavage. The normal group was not gavaged, and the gavage continued for 4 weeks. The learning and memory ability of the rats in each group was observed by Morris water maze; the changes of neuronal cells and Nissl bodies in CA1 area of hippocampus of each group was observed by HE and Nissl staining; the contents of H₂O₂, SOD, GSH-Px and MDA in the serum and hippocampus of the rats in each group were detected by kits ;the protein expressions of Nrf2, Keap1 and HO-1 in the hippocampus of rats in each group were detected by Western Blot. **Results** 1 The results of Morris water maze showed that compared with control and sham groups, the time of looking for the platform in AD group was significantly longer ($P<0.01$), the swimming track was more disordered, the time of reaching the platform for the first time was longer ($P<0.05$), and the number of crossing the platform was significantly reduced ($P<0.01$); Compared with AD group, the latency of rats in the treatment group was shortened, the time of looking for the platform was shortened ($P<0.05$), the tendency of looking for the platform during swimming, the time of first arriving at the platform was shortened, and the number of crossing the platform was increased ($P<0.05$). 2. The results of HE staining showed that compared with

control group and sham group, the neurons in hippocampal CA1 area in AD group were stained unevenly, arranged disorderly, the number of neurons decreased significantly, and the neuronal structure was destroyed; After administration, neurons in CA1 area of hippocampus in AD+bnfsf group were orderly arranged, the cell spacing increased, the number of neurons increased and the structure of neurons was incomplete; In AD+dnpq group, neurons are arranged orderly and slightly loose, the number of neurons is more than that in AD group, and the structure of neurons is basically complete. 3. Nissl staining results showed that compared with control group and sham group, the staining color of neurons in CA1 area in AD group was different, arranged disorderly, and the number of Nissl bodies decreased; The neurons in CA1 area in each treatment group were stained deeply, the cells were arranged neatly, and Nissl bodies were abundant. 4. The results of oxidative stress index showed that compared with control group and sham group, the contents of H₂O₂ and MDA in serum and hippocampus increased, and the contents of SOD and GSH-Px decreased in AD group ($P<0.05$); Compared with AD group, the contents of H₂O₂ and MDA in serum and hippocampus decreased, while SOD and GSH-Px increased ($P<0.05$). 5. WB results showed that compared with control group and sham group, the expression of Nrf2 and HO-1 protein in hippocampus of AD group decreased significantly, and the expression of Keap1 protein increased ($P<0.05$); Compared with AD group, the expression of Nrf2 and HO-1 in hippocampus increased and the expression of Keap1 protein decreased in each treatment group ($P<0.05$). **Conclusion** Bunaofushenfang can improve the learning and memory ability of AD rats, and has a certain protective effect on the hippocampal neurons of AD rats. The mechanism may be through regulating the Nrf2 signaling pathway and inhibiting oxidative stress.

Key Words: Alzheimer's disease; Oxidative stress; Bunaofushenfang; Nrf2; Keap1

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
英文缩略词表	VI
前 言	1
理论研究	3
1 祖国医学对 AD 的认识	3
2 现代医学对氧化应激与 AD 关系的认识	6
3 土家族医学对 AD 的认识	8
实验研究	13
1 实验材料	13
2 实验方法	15
3 统计学方法	25
4 实验结果	25
讨 论	31
结 论	34
参考文献	35
综 述	41
参考文献	45
攻读硕士学位期间的研究成果、参加学术会议及获奖	47
致 谢	48

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
AD	Alzheimer disease	阿尔茨海默病
APP	amyloid precursor protein	淀粉样前体蛋白
APS	Phosphate Buffered Saline	过硫酸铵
A β	amyloid β -protein	β -淀粉样蛋白
BSA	Bovine serum albumin	牛血清蛋白
ddH ₂ O	double distilled water	双蒸水
GSH-Px	Glutathione peroxidase	谷胱甘肽过氧化酶
GSK-3 β	glycogen synthase kinase-3 β	糖原合成酶激酶-3
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	过氧化氢
HE	Hematoxylin-eosin Staining	苏木素-伊红染色
HO-1	Heme Oxygenase-1	血红素氧合酶-1
Keap1	Recombinant Kelch Like ECH Associated Protein 1	Kelch 样环氧丙烷相关蛋白-1
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
NFT	Neurofibrillary tangles	神经原纤维缠结
Nissl	Nissl Staining	尼氏染色
Nrf2	Nuclear factor-erythroid 2-related factor2	核因子 NF-E2 相关因子
OD	Optical Density	光密度
OS	oxidative stress	氧化应激
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲液
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
rpm	Rounds Per Minute	转/分
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis	SDS 聚丙烯酰胺凝胶

英文缩略词表

SOD	Superoxide Dismutase	超氧化物歧化酶
SP	Senile Plaques	老年斑
TBST	Tris Buffered Saline with Tween-20	TBST 缓冲液
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
Tris	Tris(hydroxymethyl)methyl aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
β -actin	β -actin antibody	β -肌动蛋白

前 言

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease,AD) 是一种起病隐匿的进行性发展的神经系统退行性疾病。主要病理改变是:细胞外 β 淀粉样蛋白沉积导致的老年斑 (Senile Plaques,SP) 和细胞内 tau 蛋白过度磷酸化导致的神经原纤维缠结 (Neurofibrillary tangles,NFTs)。临床上以记忆障碍、失语、失用、失认、视空间技能损害、执行功能障碍以及人格和行为改变等全面性痴呆表现为特征,病因及发病机制迄今未明。

AD 的病因尚未明确,但研究人员从流行病学角度对 AD 的危险因素进行了总结,包括:遗传因素、年龄、慢性心脑血管疾病、文化程度、生活行为习惯、心理状态和环境暴露等多个因素^[1]。现代科学家们针对 AD 的主要病理特征,提出了“ β 淀粉样蛋白学说”、“Tau 蛋白学说”、“氧化应激学说”等多种发病机制假说^[2-3]。其中 β 淀粉样蛋白学说认为该蛋白异常沉积,可能造成机体的突变、Tau 的大量磷酸化衍生物的形成以及递质的失衡,最终导致机体的记忆出现障碍;Tau 蛋白学说认为正常情况下,Tau 蛋白通常呈现为磷酸化以及去磷酸化的稳态平衡,若过多的磷酸化衍生物富集,以双螺旋形式出现,则最终造成 NFTs,进而导致 AD 的发生;氧化应激学说则认为,当机体的氧化水平超过抗氧化水平,大量自由基在脑部堆积,进而损伤细胞正常功能,且氧化应激的出现早于 AD 患者脑中其他的生物标记物^[4]。

有研究表明,我国 AD 患病率从 1990 到 2018 年呈持续增长趋势,并且随着年龄增长,患病率增长速度较快,同时还存在着西部地区稍高于东部地区,农村地区稍高于城市的分布趋势^[5]。在 2019 年,国际阿尔茨海默病协会估计全球 AD 患者超过 5000 万,到 2050 年,AD 人数将增加到 1.52 亿人,目前每年的 AD 费用估计为 1 万亿美元,到 2030 年这一数字将翻一番^[6]。研究表明,1990-2019 年我国 AD 发病人数、发病率逐年上升,到 2019 年 AD 发病人数为 180.03 万人,且女性发病率、死亡率均高于男性,伤残调整寿命年、伤残损失寿命年在此期间均大幅增长,同时,也发现 AD 的发病呈年轻化趋势^[7]。现在对 AD 患者的照料主要依赖于亲属,而面对患者病情的逐渐加重,在护理过程中最具创伤性的是家属面对患者的受苦、死亡^[8]。

面对 AD 带给患者、家庭、社会的巨大压力,对 AD 的治疗迫在眉睫,目前

市面上的抗 AD 药物包括了胆碱酯酶抑制剂（多奈哌齐、他克林、卡巴拉汀等）、NMDA 受体拮抗剂（美金刚）、A β 抑制剂（Aducanumab）以及肠道菌群调节剂（GV-971）4 类，但这些药物都只能延缓病情发展，且带有严重的副作用，例如他克林有肝毒性，卡巴拉汀有恶心、呕吐等胃肠道不良反应，而 Aducanumab 及 GV-971 在 2019、2021 才被批准上市，GV-971 虽然因 AD 药物紧缺和患者需求被批准上市，但仍被要求继续进行长期安全性有效性研究，若不能保证长期的安全性有效性，药物有可能被撤回^[9]。

传统中医药及民族医药使用草药及复方治疗 AD，具有多成分，多靶点治疗的独特优势，近年来对其治疗 AD 的研究也越来越多。

土家医将 AD 归属于“脑衰”范畴，本课题所采用的补脑扶神方是土家医用于临床治疗脑部疾病的经验方，由白三七、天麻、辣子七组成，方中白三七滋补强壮、散瘀通络，为主药；天麻祛风逐痰，疏通脑筋，为帮药；辣子七活血清热，止惊安神，为信药。白三七、天麻主帮相辅，增加疗效；辣子七具有配引性，既能祛邪，又能引药上行。本方在土家医诊疗实践中有着较长的应用历史，但是缺乏实验研究作为支撑。综上，本研究以双侧海马 CA1 区注射 A β ₁₋₄₂ 复制 AD 模型，探讨补脑扶神方治疗 AD 的可能机制，同时为该方的临床运用提供理论依据。

理论研究

1 祖国医学对 AD 的认识

1.1 痴呆内涵的演变

祖国医学无以 AD 直接命名该疾病的相关记载, AD 属于中医学“痴呆”范畴, 对本症状描述, 散见于“善忘”、“呆病”、“癫证”、“健忘”、“痴呆”等病证中。

对类似症状的描述, 可追溯至《灵枢·天年》, 其中有载: “八十岁……故言善误”; 《灵枢·大惑论》中载“上气不足, 下气有余……故善忘也”; 《素问·调经论》所载“血并于下, 气并于上, 乱而善忘”等。《灵枢·癫狂病》载: “狂始生, ……喜忘苦怒善恐者。”可见, 此时未有痴呆病名表述, 只对其症状有直接描述。

而在后续古籍记载描述中, 痴呆也常做症状描述。如《医家四要·病机约论》云“癫疾始发……甚则精神痴呆, 言语无伦”。可见, 在此处“痴呆”是对疾病症状的描述, 归属于癫疾。《普济方》中说: “瘖者先伤于风……痴呆不语”, 此处痴呆是瘖疾的症状之一。明·皇甫中著的《明医指掌》论述痰证临床表现时有云“……怔忡健忘时惊怖, 癫走痴呆不识人”。以上皆是把痴呆作为症状来表述。

痴呆作为病名, 首次出现在唐代孙思邈的所编的《华佗神方·卷四·华佗治痴呆神方》, 到了宋元时期, “痴呆”作为病名表达更为清晰。宋·琼瑶真人所著《针灸神书》中有载“痴呆之证取气上”。元·王国瑞《扁鹊神应针灸玉龙经》又云“痴呆一症少精神, ……神门独治痴呆病”。而至明朝, 张景岳在《景岳全书》一书中专设痴呆篇, 对痴呆的症状、治疗、愈后都进行了详细描写。清朝, 陈士铎著成《辨证录》与《石室秘录》二书, 其中在《辨证录》设呆病门一篇, 两本书对呆病患者在言语、饮食、情志、认知、睡眠等方面的反常都做出了具体描写。

到了现代, 痴呆作为一个独立疾病论述, 其内涵与已非古代医籍的含义。在 1990 年提出的《老年呆病的诊断、辨证分型及疗效标准》(讨论稿) 中, 确立了“老年呆病”的病名, 并指出其包括老年性痴呆和血管性痴呆等。而在 1997 年, 痴呆作为单独一节第一次出现在高等教育中医药规划类教材《中医内科学》

中，在 2003 年出版的高等教育中医药规划类教材《中医内科学》中延续了 1997 年版的痴呆含义，并增加了以记忆等认知减退为主症这一内容^[10]。

可见，从临床表现上，古籍记载的痴呆与现代中医论述的痴呆有部分重叠，但当注意二者的区别。不可忽视的是，古文献中对“痴呆”“癡”“呆病”“健忘”等记述的诊疗对当代中医治疗痴呆具有重要的指导意义。例如，当患者出现精神障碍或者行为异常时，可以参考“痴呆”“呆病”“癡”的治疗；当患者出现以记忆障碍为主时，可以参考“健忘”的诊治。

1.2 祖国医学对 AD 病因病机的认识

AD 属于中医老年性痴呆范畴，历代医家对本病病位的认识基本统一，即病位在脑。《灵枢·海论》说“脑为髓之海”。李时珍在《本草纲目》中提出“脑为元神之府”。之后，汪昂在《本草备要》中提出：“人之记性，皆在脑中”。隋代杨上善《黄帝内经太素·厥头痛》曰：“头是心神所居”；张锡纯亦云：“人之神明有体用，神明之体合于脑。”可见，对于痴呆病位在脑的认识是统一的，但对病因病机认识则各有不同。

1.2.1 脾肾亏虚

肾藏精，为先天之本，《灵枢·经脉》说：“人始生，先成精，精成而脑髓生”，《素问·逆调论篇》云：“肾不生，则髓不能满”，联系“脑为髓之海”、“肾藏精”等。可知脑髓为肾精所化，同时，《黄帝内经》认为五脏各藏其神，其中，“肾藏志”，“志”包含了识记的意思。《内经精义》有言：“年老肾精虚衰，髓源亏乏，使髓海不充，则神明不清而成呆病矣”。清·程钟龄在《医学心悟》中云：“肾主智，肾虚则智不足，故善忘其前言。”认为肾虚可致智力下降、健忘。综上，可知肾精亏虚，不能充盈脑髓，可致神明不清，智力不足，记忆减退渐成痴呆。

脾为气血生化之源，主运化水谷精微，称其为后天之本。内经认为“脾藏意”、联系“意之所存谓之志”，提示脾与思维记忆关系也至为密切，它既为肾提供了物质基础，也参与记忆的识记，可见脾在记忆中也具有重要地位^[11]。王清任在《医林改错》中说：“灵机记性在脑者，因饮食生气血、长肌肉，精汁之清者，化而为髓，由脊骨上行入脑，名曰脑髓”。脾主升清，精汁之清上行充盈脑髓，记忆正常。故脾的运化功能失常，可以导致后天精气生成不足，同样可导致记忆减退。

1.2.2 痰浊、瘀血

痰浊既是病理产物，又是病理因素。五脏虚损、气血亏虚可以导致痰浊内停，痰浊内生又致气机不畅。元·朱丹溪《丹溪心法·健忘》载：“健忘，精神短少者多，亦有痰者”，认识到痰是痴呆发生的重要病因。清·陈士铎在《辨证录·呆病门》中说：“痰积于胸中，盘踞于心外，使神明不清而成呆病矣”，可以看出陈士铎认为痰留于胸，可致呆病。

汉·张仲景《伤寒论》曰：“阳明证，其人喜忘者，必有蓄血。所以然者，本久有瘀血，故令喜忘”，提示瘀血内停可致喜忘。又有《血证论》云：“心有瘀血，亦令健忘。亦有痰沉留于心包，沃塞心窍，以致精神恍惚，凡事多不记忆者。”明确指出心有瘀、痰可致“健忘”“凡事多不记忆”。

1.2.3 情志不遂

《灵枢·本神》：“肝悲哀动中则伤魂，魂伤则狂忘不精”、“肾盛怒而不止则伤志，志伤则喜忘其前言”，提示情志过极可伤及所藏之神，进而影响记忆。唐·孙思邈在《华佗神方》中记载痴呆的病因“此病患者常抑郁不舒，有由愤怒而成者，有由羞恚而成者”，说明在唐朝时，明确了情志不遂可成痴呆。明·张景岳在《景岳全书》中专设的痴呆篇中记载痴呆的病因为“痴呆症，凡素无痰而或以郁结，或以不遂，或以思虑，或以疑惑，或以惊恐而渐至痴呆。”认为情志抑郁、思虑狐疑、所求不遂或受惊恐等，日久可逐渐引起痴呆。

1.2.4 其他

《本草备要》指出：“小儿善忘，脑未满也”、“老人健忘者，脑渐空也。”提示年龄因素能造成善忘，生理性的善忘是年龄尚小，脑髓未充的缘故，病理性善忘是因脑髓渐空。

明·万全在《幼科发挥》中指出“惊久成痫……若成痴呆，言语错乱，不必治之”。提示痫病可传变为痴呆。

王大纶在《婴童类萃》凡例中记述“如金石之药……多服令儿痴呆”；汪昂于《本草备要》载：“丹砂……多服反令人痴呆”；清·钱峻《经验丹方汇编》曰：“铅粉毒，……妇人打胎，……且生子多痴呆”；清·陆定圃所撰《冷庐医话》中告诫：“婴儿……惊风愈而人遂痴呆，其药多用朱砂故”。以上，提示药物滥用也可导致痴呆。

综上,痴呆病位在脑,其病因病机包括年老体虚、脾肾亏虚以致生精无源,脑髓不充;痰瘀互结,蒙蔽清窍;情志不遂,气机不畅,神明被扰;他邪传变以及药物滥用,损伤脑络等。

2 现代医学对氧化应激与 AD 关系的认识

2.1 氧化应激

氧化应激(oxidative stress,OS)是指体内氧化与抗氧化系统失去平衡,引起组织的分子氧化,造成细胞和组织损伤,其中 OS 多由活性氧(reactive oxygen species, ROS)自由基介导的,包括超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基(HO)等。在生理条件下,ROS 稳态受 ROS 生成系统和细胞抗氧化系统很好地控制^[12-13]。抗氧化防御系统包括几种酶和小分子,如血红素氧合酶-1(HO-1)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶(CAT)、硫氧还蛋白还原酶(TRX)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)家族和醌氧化还原酶 1(NQO 1),这些酶能调节机体的氧化水平处于一个动态平衡的状态。

2.2 氧化应激与 AD

Hamieh Goshtasbi 等^[14]阐述 ROS 和细胞机制不平衡可能会导致大脑中的 OS,而神经细胞和大脑对氧化应激高度敏感。其敏感原因如下:大脑是一个高耗氧量的器官,且大脑中抗氧化酶含量低,加上神经元细胞膜多由不饱和的脂肪酸构成,极易氧化,血脑屏障也阻止了部分抗氧化酶通过,脑内相对过多的金属离子都使得大脑对 OS 特别敏感^[15-16]。当发生氧化失衡时,就会出现 ROS 损伤细胞,在这种情况下,ROS 不受控制,导致细胞代谢过程发生无数变化。这些改变的途径包括功能失调的糖酵解、钙调节、脂质代谢、线粒体过程和哺乳动物雷帕霉素靶点途径失调等^[17]。Jamshed Arslan 等人认为 AD 临床症状出现之前预测氧化损伤的生物分子有助于诊断 AD,其中脂质过氧化在 AD 的早期检测中最有希望,需要注意的是 OS 也是正常衰老的一部分,但高 OS 可能是 AD 的最早迹象之一,诊断 AD 还需要结合家族史和其他影像技术判断^[18]。

而现代实验证明在 AD 患者体内存在着较高水平的 OS^[19],Tramutola A 等人的研究中显示 AD 大脑的特征是蛋白质氧化升高,氧化还原蛋白质组学鉴定出 AD 中的许多脑蛋白被氧化修饰^[20]。且现代研究证实脂质、蛋白质或核酸的过氧化及糖基化终产物水平升高与 AD 相关,且病变主要发生在海马区、内嗅皮层^[21]。

AD 患者的 A β 沉积及 tau 蛋白过度磷酸化与 OS 关系紧密。

A β 是由淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 水解产生, 在 APP 水解时会产生大量的 ROS, 而沉积的 A β 又能造成细胞膜损伤, 诱发 OS, 继续产生 ROS, 使得细胞膜的不饱和脂肪酸发生过氧化, 最终形成过氧化物, 如丙二醛 (Malondialdehyde, MDA), 而 MDA 能进一步破坏膜蛋白功能, 引起 APP 生成 A β , 使 A β 积累增加, 二者互为循环, 导致神经元受损^[22]。

微管相关蛋白 tau 与微管蛋白一起参与构成微管系统, 微管系统是神经元的骨架成分, 参与多种细胞功能。大量 ROS 能造成钙稳态失调, 大量内流的钙离子会过度激活钙离子依赖性蛋白激酶和钙调蛋白激酶, 例如钙调磷酸酶能作用于去磷酸化糖原合成酶激酶-3 β , 造成 tau 的过度磷酸化^[23]。而核 tau 蛋白的某些位点磷酸化, 如苏氨酸-205 位点磷酸化, 可激活核 Ca²⁺/Ca MKIV/CREB 通路, 进而加剧核 tau 蛋白的磷酸化^[24]。

2.3 Nrf2 通路与 AD

核因子 NF-E2 相关因子 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 相关通路是对抗 OS 最重要的防御机制之一。在生理条件下, Nrf2 蛋白受其细胞质抑制剂 Kelch 样环氧丙烷相关蛋白-1 (Keap1) 的调节, 通路激活时, Nrf2 从细胞质移动到细胞核, 与抗氧化反应元件结合, 调节 II 相代谢酶、抗氧化酶等的转录活性, 包括了 NADPH、NQO1、HO-1、胆绿素还原酶、谷胱甘肽家族和硫氧还蛋白系统, 从而发挥抗氧化损伤作用^[25-26]。

而在老年人与 AD 患者大脑中的 Nrf2 及其调控的抗氧化酶都出现了表达下调^[27]。Osama Alsiddig 等人认为 Nrf2 在维持细胞氧化还原稳态和调节炎症反应中起重要作用, 是治疗 AD 的一匹黑马, 激活 Nrf2 可能是一种新的 AD 治疗选择^[28]。现代实验研究也证实, 通过调节 Nrf2 通路能发挥对神经系统的保护作用。Huang Teng-I 等人通过总结 Pub Med、Clinical Key 和 Cochrane 图书馆数据库中 2020 年 6 月前关于针灸、AD 及氧化应激的文献, 发现针灸能通过激活 Nrf2/ARE 通路增加内源性抗氧化酶活性且能减少 ROS 的产生并抑制神经元细胞凋亡, 表现出显著的神经保护和抗氧化作用^[29]。Zhang Xiaoying 等人实验证明多杀菌素通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制 ROS 和 A β ₁₋₄₂ 的产生, 并减少有毒 A β ₁₋₄₂ 寡聚体的形成^[30]。Minna Oksanen 等人证实激活 Nrf2 可增强人类早老素 1 突变的阿尔茨

海默病星形胶质细胞的抗氧化防御能力并改善炎症和减少淀粉样蛋白分泌^[31]。还有一些研究分析了阿里红多糖、艾蒿、异落新妇苷等抑制氧化应激反应,认为其可能机制是激活了 Nrf2 通路,达到改善 AD 大鼠学习记忆能力,保护神经细胞的目的^[32-33]。

综上,激活 Nrf2 信号途径,抑制氧化应激反应也许是治疗 AD 的有效方法之一。

3 土家族医学对 AD 的认识

3.1 土家族医学概述

土家族自称“毕兹卡”,长期居住在武陵山、大娄山、大巴山,以及贵州、湖南、四川(重庆)和湖北省的交汇处,土家族医药源于实践,自成体系,民族特色十分浓烈,千百年来为土家族人民及生活在一起的其他各族人民防病治病做出了巨大的贡献。

土家族医学是以朴素唯物论来认识和探索人体的生理病理变化,特别重视自然界各种变化对人的影响。土家医认为人与自然界的天、地、水三元对应,人之所病,皆人体上中下三元阳不足,加上毒邪乘虚而入,故治则取保元气的培元补元、保元纳元和赶毒的赶风赶气、赶水赶湿、赶火赶毒、排毒清毒。故土家族医学以“天人合一”的整体观为认识基础,以自然界天、地、水,人体的上、中、下“三元”立论^[34],也衍生了毒气学说。

三元学说起源于道教“三元”说,“三元”一词首先出现在北周末年的道教典籍《无上秘要》^[35],土家医的三元论:认为人体的结构主要由身体的三元架构,三元内脏和三元孔窍、身体外“筋、骨、肉”和身体内“气、血、精”组成。其中,上元脏器包括脑、心、肺,三者共居上天,统摄人体气、血、神志,为三元之首^[36-37]。

毒气学说强调“毒气为百病之首,万恶之源”,认为毒邪为多种疾病的致病因素。将毒气分为三类,即天毒、生毒、毒。因气候异常,瘟气流行引起的病称为“天毒疾”;因机体代谢异常,产物代谢不能排出体外而致病的称为“生毒疾”;因接触、服用有毒动植物、矿物质而成疾的称为“毒疾”。而天毒包括风毒、寒毒、火毒、水毒、潮(湿)毒、热毒、瘟毒,生毒包括气毒、血毒、痰毒、脓毒、胎毒,毒包括巴达毒、食毒、虫毒、草毒、尿毒、粪毒,共计 18

种。毒气病总治法是：对抗降解法。依据总治法，提出了攻毒法、败毒法、赶毒法、消毒法、排毒法等 12 种具体治法^[38]。

3.2 土家医对 AD 病因病机的认识

土家医学中无 AD 病名，对其症状描述多见于“脑（神）衰”“脑虚”“蒙忘症”“脑筋不灵”。

脑虚主要为脑髓亏虚，出现脑鸣、失眠、健忘、精神差、神呆；脑筋不灵出现思维障碍、呆笨。土家医认为神精是专供脑神之用物质，神精少而致神志改变，出现失眠多梦、精神差、疲乏、注意力不集中、善忘、思维不灵等症状，而过度用脑、思虑日久，暗耗神精也能导致神衰^[39]。蒙忘症^[27]的临床表现为头昏、忽感意念不清，心神不宁，记不清事情，或早说晚忘，舌质淡、脉沉细或结代。土家医认为其病机多为思虑伤脾，神疲失眠而成蒙忘；遗精早泄，阴虚阳弱，侵扰上元而成蒙忘；或素先天不足，体弱神疲，又苦心劳作，易成蒙忘。由此提出当补中元脾胃，滋下元肝肾，开上元脑窍。李志勇^[25]认为“生毒内生”为痴呆的病机，内生的气、血、痰毒在体内堆积，滞留在上元心脑，致使脑筋不用，而成痴呆。

综上，可知土家医认为痴呆病因包括：三元虚衰、情志、劳伤、生毒四个因素，其中三元虚衰和“生毒内生”为主要原因，三元虚衰，功能失常，可以导致气、血、痰毒等生毒内生；生毒内生也能阻碍三元正常功能，二者可以互为因果，进而形成痴呆。

3.3 土家医学对 AD 的研究进展

虽然土家医学还没有完整的治疗 AD 的系统，但对土家医学治疗 AD 的研究已经开始逐渐出现。

3.3.1 单味药或单味药提取物治疗 AD

谌勤及刘翔宇实验发现，土家医特色药板桥党参能增加突触相关蛋白的表达量及树突棘数量，改善神经元形态和发育情况，同时板桥党参可能通过抑制 PME 表达，提高海马组织中 PP2A 活性；降低 T216-GSK-3 β 表达，抑制 GSK-3 β 活性，进而达到改善 AD 大鼠学习记忆能力^[40-41]。

曾楚华等利用竹节参治疗 A β ₁₋₄₂ 造模形成的 AD 模型大鼠，发现竹节参能提高 AD 大鼠 Drd-2 的表达，下调 GFAP、TNF- α 表达，抑制炎症反应^[42]。

徐娅丽发现鬼箭羽醇提取物对 AD 大鼠能通过抗炎、抗氧化抑制和清除 A β 的生成, 进而改善 AD 大鼠的学习记忆能力^[43]。

3.3.2 土家医方子治疗 AD

土家医习惯把药物方剂称为“方子”, 包括独方子、小方子、大方子。独方子是指由一种药物组成的方剂; 小方子是指两种或者两种以上药物的组成的方剂, 而其品种少或量轻; 品种多或量重的则为大方子^[29]。

土家医将方子的药物组成归纳为“主”、“帮”、“客”、“信”四个要素, 其中“主”药是指对疾病起主要治疗作用, 不可缺少的药物; “帮”药是指协助主药治疗主病的辅助药物, 或是治疗兼病的药物; “客”药有两种含义, 一指克制主药的“过火”, 一指治疗无关重要兼病的“客气”药; “信”药是指“药引子”, 其能引导药物直达病变部位。组方时要根据具体情况来决定四个要素的配伍, 一般来说, 主药和信药不可缺少, 而且主药量大, 信药量少, 但也没有刻板规定^[28]。

天珠散首载于《鄂西药物志》, 由天珠、天麻组成, 是典型的小方子。李志勇等发现天珠散能改善 D-半乳糖拟痴呆小鼠的学习记忆功能, 改善脑组织自由基代谢情况, 对海马区神经元起保护作用^[44-45]。同时宋阔魁等利用天珠散治疗脑供血不足引起的学习障碍, 发现天珠散能减轻神经元的受损情况, 促使神经递质合成, 以此改善学习记忆能力^[46]。

补脑赶毒方由白三七、水菖蒲、岩泽兰三味药组成。实验证明, 补脑赶毒方能减少 AD 大鼠 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 含量, 上调 PI3K、p-AKT、p-P38 蛋白表达, 下调 p-JNK 和 p-ERK 蛋白表达, 即补脑赶毒方可能通过 PI3K/AKT 和 MAPK 通路, 减轻炎症反应以达到保护 AD 大鼠大脑功能的目的^[47]。

3.3.3 补脑扶神方治疗 AD 的理论依据

补脑扶神方由白三七、天麻、辣子七组成, 在《土家族医药》、《实用土家族医药》等多部著作中都有记载, 是土家医治疗头部疾病的经验方, 但文中未对本方命名。而补脑扶神汤载于《群方集》, 由白三七、天麻、白果组成, 有补脑血、扶神气之效, 用于治疗神衰引起的脑虚头昏。

补脑扶神方中白三七滋补强壮、散瘀通络, 为主药; 天麻祛风逐痰, 疏通脑筋, 为帮药; 辣子七活血清热, 止惊安神, 为信药。白三七、天麻主帮相辅, 增

加疗效，辣子七具有配引性，它既有祛邪功效，也有引药上行的作用，全方攻补兼施。

因此，参考补脑扶神汤的方药组成、疗效及方名，把白三七、天麻、辣子七组成的经验方取名为补脑扶神方。

而随着社会的发展，研究人员对方中各组成药物都有一定的现代研究。

白三七：为五加科植物竹节参 *Panax japonicus* C.A.Mey. 的根茎。《实用土家族药物》载其：峻补三元，强腰壮骨，活血疗伤，赶风除湿，赶暑止渴等功效，具备“南三七，北人参”之效；2015版《中华人民共和国药典》上记载其具有滋补强壮，散瘀止痛，止血祛痰的功效；《中药志》曰：“无虚无痰者不宜。”强调本药补虚祛痰之力强。现代研究表明竹节参中化学成分类型主要为三萜皂苷类、多糖类；药理活性研究表明这些成分具有抗溃疡、保肝、镇静抗惊厥、改善神经网络功能、改善学习记忆、抗疲劳、降血脂、保护心脏、抗炎镇痛、抗肿瘤、抗氧化活性等多种作用^[48]。

天麻：为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl 茎块。《药性论》载天麻能治“语多恍惚，多惊失志”，《神农本草经》中描述其“久服益气力”，《日华子本草》中记天麻能“助阳气”“补五劳七伤”“通血脉，开窍”，《本草新编》中记录天麻能“祛外束之邪，逐内避之痰”。可见，前人认为天麻具有补益、逐痰开窍的作用，而现代对天麻的研究越发深入，天麻的化学成分主要有酚类及其苷类、有机酸类、多糖类、甾醇类等^[49]。研究表明，天麻的主要成分天麻素可以通过调节 Wnt 信号通路^[50]、抑制氧化应激及炎症反应^[51-52]、抑制β分泌酶进而减少 Aβ 的产生^[53]、降低前额叶皮质甘丙肽受体 2 (GalR2) 表达^[54]、上调 SIRT 1 和 PGC-1α 表达水平^[55]等来保护神经，改善学习记忆障碍。

辣子七：为爵床科植物 *Peristrophe japonica* (Thunb.) Makino 的全草，又名九头狮子草。《实用土家族药物》记载其主要功效为：疗伤止痛，活血助孕，赶火止惊，败毒消肿。《分类草药性》载其“清火。治咳嗽、气喘，吐血。”《贵阳民间药草》言其能“祛风”、“清热”、“定惊”。《贵州民间方药集》中记载“治小儿惊风。”《闽南民间草药》记录它的效用为“消肿”、“解毒”、“散热”。《四川中药志》指出其能“清肺热，化痰。”《贵州草药》称其为“咳风尘、晕病药”。可知，前人认为辣子七主要有清热活血、化痰、定惊之效，且多

治上焦病变。九头狮子草主要成分是烷烃和甾醇类化合物，现代医学对其药理学研究还不够完善，但也有实验证明其具有抗炎、化痰等作用。罗忠圣等实验发现九头狮子草能降低小鼠耳廓、足跖肿胀度，显著降低炎性足前列腺素 E2 的含量，具有显著的抗炎作用^[56]。梁冰等利用酚红排泄法发现九头狮子草的醇提取物能使小鼠气管的酚红排出量增加，验证其具有祛痰的作用^[57]

实验研究

1 实验材料

1.1 实验动物

50 只 2 月龄 SPF 级雄性 SD 大鼠, 200g±20g, 实验动物源自湖北省实验动物研究中心, 许可证号: SCXK(鄂)2020-0018。置于独立通风隔离笼具中, 适应性喂养一周, 昼夜光线正常交替, 温度与湿度适宜, 给予适量的鼠粮和水, 自由饮食, 2-3 天换一次垫料, 保持动物环境卫生。

1.2 实验药材

补脑扶神方: 由白三七 30g、天麻 30g、辣子七 15g 组成, 白三七、天麻购于湖北民族大学附属民大医院, 辣子七购于同仁堂中药材批发店, 经医学部李厚聪老师鉴定为爵床科植物辣子七(九头狮子草)。

盐酸多奈哌齐片: 购于湖北民族大学附属民大医院, 厂家: 浙江华海药业, 国药准字: H20183417, 规格: 5mg/片。

1.3 主要实验试剂

试剂	厂家
A β ₁₋₄₂	大连美仑
HE 试剂盒	碧云天
尼氏染液	碧云天
SOD 测定试剂盒	南京建成
GSH-Px 测试盒	南京建成
H ₂ O ₂ 测试盒	南京建成
MDA 试剂盒	南京建成
SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒	大连美仑
Anti-NRF2 Rabbit pAb	万类生物
Rabbit Anti-KEAP1 Polyclonal Antibody	博奥森
Rabbit Anti-Heme Oxygenase 1 Polyclonal Antibody	博奥森
Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)	JACKSON(美国)

蛋白预染 marker	THERMO(美国)
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	武汉科瑞
ECL 超敏发光液	武汉科瑞
溴酚蓝	国药集团
2-巯基乙醇	西亚试剂
Ripa 裂解液	博奥龙
PMSF	碧云天
10×PBS	碧云天
中性树胶	力升实验器材
TRIS	金克隆
SDS	BIO FROXX
脱脂奶粉	碧云天
BSA	蓝季科技
氯化钠	国药集团
丽春红染液	碧云天
无水乙醇	国药集团
甲醇	国药集团
PVDF 膜	Millipore
4%多聚甲醛	Bio sharp
冰醋酸	福晨化学
水合氯醛	罗恩化学
吐温 20	国药集团

1.4 主要实验仪器和设备

仪器名称	生产厂家
独立通风隔离笼具	冯氏设备厂
电子天平	上海精密
万用电炉	天津泰斯特
脑立体定位仪	Stoelting
5uL 微量进样针	上海高鸽

Morris 水迷宫系统	中国医学科学院研究所
振荡培养箱	博迅实业
-80℃超低温冷冻储存箱	美菱
卧式冷藏冷冻转换柜	海尔
旋涡混匀器	上海精科
单道移液枪	大龙兴创
优谱超纯水器	华圩科技
全自动制冰机	雪科
高速离心机	上海安亭
高速（冷冻）离心机	Eppendorf(德国)
数显三用恒温水浴箱	金坛市友联仪器研究所
振荡切片机	Leica（德国）
数字摄像显微镜	Nikon（日本）
变速可逆匀浆机	Glas-Col（美国）
超声破碎机	凡帝朗
全波长酶标仪	Thermo（美国）
通用电泳仪电源	Bio-Rad(上海)
小型垂直电泳槽	Bio-Rad(上海)
小型湿转槽	Bio-Rad(上海)
脱色摇床	其林贝尔
Image Quant LAS 4000 成像系统	GE（美国）

2 实验方法

2.1 动物分组

50 只大鼠随机分为空白组（control）、假手术组(sham)、模型组(AD)、补脑扶神方组（AD+bnfsf）、多奈哌齐组(AD+dnpcq)5 组，每组各 10 只，每周记录老鼠体重。

2.2 造模药物制备

A β ₁₋₄₂ 工作液的配制：将 1mg 的 A β ₁₋₄₂ 溶于 500 μ L 的无菌生理盐水中，用封口膜封口防止泄露，混匀离心后，将其置于 37℃温箱中孵育 7 天，使其变成凝

聚态的 $A\beta_{1-42}$ 。孵育完成的 $A\beta_{1-42}$ 可存于 -20°C 冰箱。注意在孵育过程和保存时避光。

10%水合氯醛：先量取 20mL 的 ddH₂O，再称取 2g 水合氯醛加入，置于漩涡振荡混匀器上，充分混匀溶解。

过氧化氢溶液、马应龙痔疮膏分别购于河北建宁药业、马应龙药业；青霉素钠、棉签、碘伏、0.9%的氯化钠溶液来自实验室。

2.3 造模方法

大鼠适应性喂养一周后，除空白组外，其余各组开始造模。

(1) 术前准备：各组老鼠禁食 12 小时，减少术后老鼠肠胀气发生概率；手术器械提前清洗干净，高温消毒；微量进样针在使用前提前固定在脑立体定位仪上，保持进样针与桌面垂直。

(2) 麻醉：注射前需要对老鼠称重并记录，用 10%水合氯醛以 0.35mL/100g 的剂量进行腹腔注射。抓取过程中，实验员注意固定大鼠头部与身体，防止大鼠挣扎咬伤手指；麻醉时，大鼠头低尾高位，注射器倾斜 30-60 度进针，进入腹腔时会有落空感，此时，回抽注射器，观察是否有出血，有出血则需退针，观察针口出血情况，停止麻醉或者调整进针位置重新进针；无出血，则可缓慢推注药液。麻醉约 3-5min 后起效，用镊子或止血钳轻夹大鼠四肢，大鼠无反应则判断麻醉成功。

(3) 备皮与固定：麻醉完成，剃毛器剃掉大鼠头部毛发，露出手术部位。随后，将大鼠固定于脑立体定位仪上，固定时大鼠头部与身体在同一水平且呈一条直线。

(4) CA1 定位：碘伏消毒手术区，实验员一手持镊子夹取手术区皮肤，一手持手术剪，沿大鼠头部前正中线，两耳前，纵向剪开 1cm-1.5cm 的手术切口，分离筋膜，暴露前囟。也可用棉签蘸取过氧化氢溶液，用力擦拭，腐蚀筋膜以充分暴露前囟。参考 Paxinos & Watson 大鼠脑立体定位图谱进行大鼠海马 CA1 区定位^[58]，以前囟“十字缝”交叉点为原点，进样针针头垂直对准原点，移动定位仪臂，定位在原点后 3mm，左右旁开 2.5mm 处，并做好标记。

(5) 钻孔及药物注射：用 20mL 注射器针头钻孔，注意钻孔不时移开针头，观察钻孔情况，避免钻孔太深伤及大脑，导致出血死亡。随后用微量进样器吸取

5 μ L 的 A β ₁₋₄₂, 刺入深度 3.5mm, 5 分钟内缓慢推完药液并留针 5min, 以防药液未被完全吸收而随抽针而流出。另一侧同法。假手术组以相同方法用无菌生理盐水造模。

(6) 缝合与消毒: 缝合伤口前, 涂抹青霉素钠粉末, 缝合伤口后, 碘伏消毒伤口, 创口上涂抹痔疮膏, 促进伤口愈合。

(7) 术后: 大鼠放置在铺好干净垫料的鼠笼中, 同时用取暖器照射大鼠, 直到大鼠清醒。

2.4 药液制备与给药

补脑扶神方水煎液: 参考课题组前期实验^[59], 将所有药材浸入 6 倍的水中, 浸泡 1 小时后开始煎煮, 先武火煮沸, 维持 10 分钟, 后转文火煎煮 30 分钟, 之后倒出药液, 再次同法煎煮。纱布过滤, 合并两次药液, 静置过夜, 取上清, 次日再浓缩定量至 242mL, 可得到含生药 0.31g/mL 的水煎液。水煎液可保存在 4℃ 冰箱, 保存时间不宜超过一周, 每次灌胃前复温。

多奈哌齐混悬液: 取一片 5mg 盐酸多奈哌齐片, 按人与动物剂量比值换算, 大鼠每日剂量为 0.045mg/100g。取一片药先用研钵研碎, 再溶于 111mL 纯水中, 加热搅拌, 得到 0.045mg/mL 的混悬液。密封 4℃ 保存, 给药前复温, 摇匀。

造模结束后, 7 天内要注意观察大鼠术后伤口愈合情况及基本情况, 一切良好则开始分组灌胃给药, 补脑扶神方组给以补脑扶神方水煎液灌胃, 多奈哌齐组给以多奈哌齐悬浊液灌胃, 假手术组与模型组给以 ddH₂O 灌胃, 正常组则不给以任何处理。灌胃剂量为 1mL/100g, 大鼠每周称重, 依体重调整灌胃剂量, 灌胃 4 周。

2.5 Morris 水迷宫行为学实验

灌胃最后一周, 即第四周开始进行水迷宫实验。Morris 水迷宫包括空间探索与定位航行 2 个实验。水迷宫装置由圆形水池、平台、摄像系统和计算机分析系统组成。该实验需要两人操作, 一人操作电脑系统, 一人投放、捞取老鼠。实验开始前, 需要提前调试好设备及实验环境。包括依据电脑分析系统把水池分成四个象限, 确定平台位置 (第三象限), 以及剩下的各个象限边缘的中点, 以此作为动物的入水点; 在房间四面墙上贴上指示性标志, 以方便大鼠记忆; 调试房间光线, 保证摄像系统能采集到大鼠的行动轨迹而大鼠看不见水面下的平台; 调试

水温，维持水温固定温度；将大鼠提前搬入实验房间，以习惯环境等。

2.5.1 定位航行实验

定位航行实验：提前往水池注满清水，清水超过平台 1-2cm，倒入墨汁，将清水完全染黑，一是为了保证大鼠不能看见水面下的平台，二是为了使大鼠与墨水形成反差，摄像系统能清晰采集图像。实验开始时，保持环境安静，随机从一、二、四象限中挑选一个象限，由电脑操作人员倒数计时，倒数结束，另一人同时从投入点位置，将大鼠面朝池壁，轻轻放下，让老鼠开始自由游泳，同时实验员立刻蹲下，防止大鼠将实验员当做记忆点。电脑系统自动记录 60s 内，大鼠第一次到达平台的时间，即逃避潜伏期。若大鼠没能在 60s 内找到平台，实验员用棍子或其他物体将老鼠引到平台上，停留 10-15s，便于大鼠记忆平台位置及周围环境，随后将大鼠捞起，放入笼中，用取暖器为大鼠取暖。一组老鼠完成一个象限训练后，同法进行剩下的两个象限训练，即每只老鼠一天完成三次训练，该实验持续 5 天。

2.5.2 空间探索实验

空间探索实验结束后，休息一天，第二天开始进行空间探索实验，此时，除撤掉水下平台以外，选择任一象限投入大鼠，操作方法同空间探索实验一样，但只进行一次。此时记录大鼠 60s 内第一次抵达平台时间及穿过原平台的次数。

2.6 灌流及取材

水迷宫行为学实验结束后，取材前一天大鼠禁食水 12 小时以上，各组随机挑选三只大鼠灌流，各组剩下 7 只大鼠则进行取血、取海马。

灌流前需提前做好灌流所需材料，包括手术器械、灌流器械、灌流冲洗液（0.9%生理盐水）、灌流固定液（4%多聚甲醛）、做好标记的 50mL 离心管等。生理盐水配制方法：1000mL 双蒸水中加入 9g 氯化钠，充分搅拌溶解。

大鼠麻醉后，取仰卧位固定，先用手找到大鼠胸骨剑突位置，有齿镊提起其下方皮肤，用手术剪剪开皮肤，剪断两侧肋骨，止血钳夹住胸骨，将其向上翻，暴露胸腔，随后小心分离心脏上的包膜，使心脏及血管完全暴露。用止血钳轻轻夹住心脏向下拉直，灌流针从心尖部位直插进主动脉，随后固定灌流针，注意进入血管后，肉眼可见灌流针，此时动作要轻缓，防止针头刺破血管导致灌流失败。灌流针插入主动脉后，完全打开输液管开关，快速灌注生理盐水，可见到右心耳

迅速充盈，此时用有齿镊夹破右心耳，置换血液。置换血液时，可以轻按肝脏，加快置换速度，同时不时用温水冲洗胸腔，使视野清晰，当灌注到肝脏变白或者从心耳流出澄清液体时，冲洗完成。随后可以换成 4%多聚甲醛固定液固定，固定时，灌流速度先快后慢，大鼠会出现四肢震颤，直到全身僵硬，尾巴僵直。灌注完成后，取下大鼠，断头取脑，装入有 4%多聚甲醛溶液的 50mL 离心管中，于 4℃冰箱中再固定。

取血及取海马前，需要提前备好一次性采血针及采血管、好标记的 EP 管、冰袋、冰盒等。大鼠麻醉后，暴露心脏，采血针扎入心尖取血，大鼠大约可取得 4-5mL 血。取血完成后，迅速断头，用手术剪剪开大鼠头部皮肤及筋膜，露出颅骨，换用直止血钳小心分离颅骨直到脑组织完全暴露，过程中小心不要损伤脑组织。随后用眼科镊将脑组织挑出，放在事先准备好的冰袋上，迅速分离海马，装入 EP 管，插入冰盒中。注意从断头到分离海马一定要迅速，防止海马降解。

全部大鼠采血完成后，用低温高速离心机在 4℃环境下，3000r/min 离心 10min，随后将血清倒出分装，冻存于-80℃冰箱待用。海马全部分离后，也存放在-80℃冰箱。

2.7 补脑扶神方对 AD 大鼠海马组织形态的影响

2.7.1 切片

参考文献^[60]，脑组织固定 1 周后进行振荡切片。切片前，提前备好 1×PBS 溶液（将 10×PBS 与双蒸水以 1: 9 的比例配制，比如 100mL 的 10×PBS+900mL 的双蒸水）、502 胶水、刀片、毛笔、培养皿等。

将脑组织从固定液中取出，清水冲洗，滤纸擦干，提前用刀片对脑组织进行的修样：切除小脑及大脑前端，切除大脑前端部分时，需小心薄切，微微暴露海马即可停止。

启动机器，安装好刀片，把刀片调整到最高位置，将脑组织用 502 胶水粘贴在托盘中，稍暴露的海马一面朝上，倒入 1×PBS，液面刚好没过组织即可，调整刀片高度，设置厚度为 25-30 μ m，振幅 0.8mm，以 0.6mm/s 速度切片。切好后，挑选有完整海马的脑组织捞出，放入盛有 PBS 的培养皿中，4℃冰箱备用，但也需尽快进行染色处理，以防组织变质。

2.7.2 染色

染色前配制所需溶液: 0.5%盐酸酒精: 95.5mL 的 70%无水乙醇中加入 0.5mL 浓盐酸; 饱和碳酸锂溶液: 称取 1g 碳酸锂加入 78mL 的双蒸水中, 搅拌混匀; 70%、95%无水乙醇: 用无水乙醇加不同量的双蒸水稀释即可。

将切好的脑组织从冰箱取出, 载玻片一端倾斜插入 1×PBS 中, 用毛笔小心引导到载玻片上, 动作轻柔, 防止损伤脑片, 可以将两个脑片放在一个载玻片上。再将脑片放至 60℃温箱中烘 5-10min。取出后室温放凉, 放凉后开始染色。

HE 染色: 将放凉的脑片放置于苏木素染色液 5-10min, 随后将脑片放于双蒸水中, 动作轻缓的摇晃清洗 2min, 再将脑片放于盐酸酒精中分化, 观察到脑片颜色变红或变粉就可拿出再次水洗, 分化时间大约在 15s 左右, 水洗完成后, 再放入碳酸锂溶液中返蓝数秒, 观察到脑片颜色变蓝就可拿出再次水洗 2min, 再放入伊红染色液中 2min, 随后水洗 2min, 接着放入 95%无水乙醇中脱水两次, 每次 2min, 然后二甲苯透明 2min, 最后, 中性树胶封片。注意封片过程中要避免产生气泡, 若产生的气泡影响后期采图, 可以另外拿一张盖玻片在中性树胶凝固前轻轻挤压盖玻片; 中性树胶凝固之前, 片子保持平放, 以免树胶因重力移动。

尼氏染色: 提前取出 5mL 尼氏染液离心, 取上清, 以免沉淀物影响结果。用移液枪将尼氏染液滴加数滴完全覆盖脑片, 然后将脑片放置 37℃温箱孵育 5min, 弃去染液, 双蒸水冲洗数秒, 接着脱水、透明、封片同 HE 染色一样操作。注意双蒸水冲洗时, 不可直接冲洗脑片, 应冲洗脑片周围, 以流水带走多余染液; 封片后, 仍需避光保存, 防止褪色。

2.8 补脑扶神方对 AD 模型大鼠血清及海马组织氧化应激的影响

2.8.1 样本处理

血清: 解冻后取原液或稀释后测量;

海马匀浆液: 将海马与生理盐水以 1:9 的比例匀浆制备 10%匀浆样本。

具体方法如下: 生理盐水预冷, 提前准备好一个装满冰的小烧杯, 玻璃匀浆管插入烧杯中预冷, 随后将海马与生理盐水依次放入匀浆管中, 一手扶住匀浆管, 一手持烧杯, 开始匀浆, 上下匀浆数十次, 随后转换匀浆方向, 再次匀浆数十次后结束匀浆, 匀浆结束后, 将匀浆液转移到 EP 管中, 离心机 3000r/min 离心 10 分钟, 取上清待测。

2.8.2 BCA 蛋白测定法测定 10%海马组织蛋白浓度

试剂盒组成：试剂 A、试剂 B、蛋白标准品（5mg/mL BSA）

溶液配制：BCA 工作液：试剂 A 与试剂 B 以 50:1 的比例充分混匀，需注意工作液只能在室温稳定 24 小时，所以工作液配制的量需要提前计算好，以免浪费。0.5mg/mL 蛋白标准品：从冰箱取出 5mg/mL 蛋白标准品，待其完全溶解，用稀释液稀释成 0.5mg/mL 蛋白标准品，稀释液选用海马匀浆用的生理盐水，减少实验误差。

具体操作方法如下：①设孔：96 孔板上设标准品孔和样品孔，可用记号笔在板边缘做上记号，以便加样，每孔重复 3 次，最后计算取平均值，减少误差；②标准孔加样：将 0, 1, 2, 4, 8, 16, 20uL 标准品加到标准孔中，没有 20uL 的孔用生理盐水补齐 20uL；③样品孔加样：样品孔先分别加入 10%海马组织 2uL，随后加 18uL 的生理盐水，补齐 20uL，此时海马组织浓度为 1%；④加工作液：最后每一个孔都加入 BCA 工作液 200uL；⑤孵育：将板放于 37℃温箱中，等待 30 分钟。⑥测量及计算：设置波长 562nm，酶标仪测 OD 值，根据绘制的标准曲线计算海马样本蛋白含量。注意加样过程中同一步操作使用同一把移液枪，减少误差，同时过程中要避免产生气泡，如果产生气泡，可用一次性注射器针头刺破气泡。

2.8.3 大鼠海马组织与血清氧化应激指标检测

(1) 大鼠海马组织与血清中过氧化氢（H₂O₂）测定

严格按照 H₂O₂ 试剂盒说明书操作，于 405nm 处，1cm 光径，测各管吸光度，最后依说明书公式计算 H₂O₂ 含量。

(2) 大鼠海马组织与血清中超氧化物歧化酶（SOD）测定

按照 SOD 试剂盒说明书进行检测，酶标仪 450nm 处，测 OD 值，按公式计算 SOD 含量。

(3) 大鼠海马组织与血清中谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）测定

按照 GSH-Px 试剂盒说明书进行检测，最后准备一块 96 孔板，取 250uL 反应液，酶标仪 405nm，测 OD 值，按公式计算 GSH-Px 含量。

(4) 大鼠海马组织与血清中丙二醛（MDA）测定

按照 MDA 试剂盒说明书进行检测，最后准备一块干净的 96 孔板，取上清 200uL，酶标仪 532nm，测 OD 值，按公式计算 MDA 含量。

2.9 补脑扶神方对 AD 模型大鼠海马 Nrf2、Keap1、HO-1 表达的影响

2.9.1 蛋白样本的制备

制备所需试剂：100mM PMSF 配制：将 PMSF 晶体溶于 PMSF 溶剂中，-20℃保存；4×buffer 配制：称取 2.46g Tris，8g SDS，量取甘油 40mL，混合后加 40mL 双蒸水，搅拌溶解，再用双蒸水定容到 100mL，用浓盐酸调整 PH 值至 6.8，室温保存。

将海马从冰箱取出，放入准备好的冰盒中，制备过程中尽量保证匀浆在冰上进行。提前准备一个小烧杯，里面装满冰，将清洗干净的玻璃匀浆管插入烧杯中预冷。对海马进行称重，小心夹入匀浆管中，做好记录，计算出所要添加的裂解液、PMSF、4×buffer 量。按照海马重量 (mg) 与组织裂解液(uL)1:9 的比例加入裂解液，例如海马重量为 40mg，裂解液为 360uL；按照 PMSF 与裂解液 1:100 的比例加入 PMSF，即裂解液 360uL，加入的 PMSF 为 3.6uL；4×buffer 是裂解液与 PMSF 之和的 1/3，即 $363.6/3=121.2$ uL。随后依次加入裂解液与 PMSF，一手拿装冰的烧杯，一手握住匀浆管，启动匀浆机，上下研磨数十次，中间转变匀浆机旋转方向，再次上下研磨数十次，保证组织充分裂解；一个组织匀浆完成后，用移液枪吸取匀浆液，移入事先做好标记的 EP 管，加入 4×buffer，插入冰盒中，随后双蒸水清洗匀浆管与匀浆机的匀浆杆，滤纸擦干，同法继续匀浆。全部组织匀浆完成后，100℃水煮 5 分钟变性，随后离心机 6000r/min 离心 5 分钟，再进行 60Hz 超声 5 分钟，注意超声时一个组织超声结束后，也要及时清洗超声机，以免造成样本混杂污染。超声结束，海马匀浆液-20℃保存。

2.9.2 BCA 蛋白含量测定

方法同 2.8.2。

2.9.3 Western Blot 法检测蛋白表达

(1) WB 所需溶液制备：

5×电泳液：甘氨酸 94g，SDS 5g，Tris 15.1g，搅拌溶于双蒸水定容至 1000mL；

1×电泳液：5×电泳液与双蒸水以 1:4 的比例配制，例如取 200mL 的 5×电泳液，加 800mL 双蒸水；

10×转膜液：1000mL 双蒸水中加入 30.3g Tris、151.1g 甘氨酸，搅拌溶解；

1×转膜液：按 10×转膜液：双蒸水：甲醇溶液=1:7:2 比例配制。

10×TBS: 氯化钠 80g、Tris 24.2g 搅拌溶解于双蒸水中, 最后定容至 500mL;

1×TBST: 10×TBS 100mL 和 900mL 双蒸水混合, 再加入 1.5mL 吐温 20 混合均匀;

1×PBS: 取 9 倍的双蒸水稀释 10×PBS;

一抗稀释液: 0.3g BSA 充分溶解于 10mL 1×PBS, 4℃ 保存;

二抗稀释液: 0.15g BSA 充分溶解于 10mL 1×PBS, 4℃ 保存;

封闭液: 5g 脱脂奶粉加入到 100mL 1×PBS 中, 电磁搅拌器充分搅拌溶解, 配制成浓度为 5% 的脱脂牛奶;

显影液: 按照 A 液与 B 液 1:1 的比例配制, 现配现用, 避光;

10%APS: 取 SDS-PAGE 凝胶试剂盒中的 APS 0.5g, 溶于 5mL 双蒸水中, 混合溶解, 分装存于 -20℃。

(2) 海马样本制备

所需溶液制备: 2%溴酚蓝混合溶液: 称取 0.2g 溴酚蓝加入 10mL 无水乙醇, 混合溶解, 制成 2%溴酚蓝溶液, 再按照溴酚蓝溶液与 2-巯基乙醇 1:3 的比例, 制成 2%溴酚蓝混合物, -20℃ 保存。

从 -20℃ 中取出海马匀浆液、溴酚蓝混合物, 依据 BCA 法测定的蛋白浓度, 将海马匀浆液利用组织裂解液稀释至相同浓度, 例如, 测得蛋白浓度为 35ug/3.8uL, 此时取 152uL 的匀浆液, 蛋白含量为 1400ug, 加入 48uL 裂解液, 得到 200uL 稀释后的样本, 此时样本浓度为 7ug/uL, 同法取其他样本稀释, 这样在后面加样时, 可以使得加样量一致, 减少实验影响因素。随后将稀释后的样本与溴酚蓝混合物按照 10:1 的比例混匀, 得到海马样本, -20℃ 保存。

(3) 制胶

制胶前需清洗干净玻璃板、梳子晾干, 备好制胶架, 随后将玻璃板固定到制胶架上, 注意玻璃板左右、底部要对齐; 随后灌注分离胶, 一块胶灌注 5mL, 灌注完成后加双蒸水或异丙醇满至前玻璃板顶端, 压平液面, 静置 30-60 分钟, 待分离胶与水层中间出现一条清晰的分离线时, 说明分离胶凝好, 可倒掉双蒸水或异丙醇; 接着用滤纸小心擦干玻璃板内的剩余的液体, 注意不要触及分离胶; 灌注浓缩胶至前玻璃板顶端, 缓缓插入梳子, 静置 10-20 分钟, 注意灌浓缩胶与插梳子均需要避免气泡生成, 以免加样孔形状不一或不完整。

10%分离胶配制如下:

凝胶体积 (mL)	各组分体积 (mL)				
	纯水	30% Acr-Bis (29:1)	4×分离胶缓冲液	10% APS	TEMED
10	4.17	3.33	2.5	0.1	0.004
20	8.3	6.7	5	0.2	0.008

5%浓缩胶配制如下:

凝胶体积 (mL)	各组分体积 (mL)				
	纯水	30% Acr-Bis (29:1)	4×浓缩胶缓冲液	10% APS	TEMED
3	1.71	0.51	0.75	0.02	0.002
6	3.42	1.02	1.5	0.06	0.006

(4) 加样及跑胶

将凝固好的凝胶取下，固定到电泳仪上，倒入 1×电泳液至刻度线，小心垂直取出梳子，将制备好的海马样品从-20℃中取出，沸水水煮 5min，离心后加样；每个加样孔加 5μL 样品，最后一孔加入 2μL 预染的 Marker 以分辨蛋白分子量大小。加样完成，设置浓缩胶电泳电压 80V，电泳时间依据 Marker 及蛋白条带跑至分离胶的时间决定，一般在 10-15 分钟内可结束浓缩胶电泳；设置分离胶电泳 120V，以 Marker 及蛋白条带跑至快出胶为限，跑胶时间大约 70 分钟左右。

(5) 转膜

在电泳时，提前裁好 PVDF 膜，并在膜上做好标记，注意 PVDF 膜使用前需浸泡在甲醇中活化，准备好转印夹板、转印海绵、滤纸、胶铲、小镊子浸泡在 1×转膜液中。

电泳完成后，取下玻璃板放入 1×转膜液中，用胶铲小心分离玻璃板，让胶留在玻璃板上，再依据 Marker 提示分子量，小心切下目的蛋白所在的胶体，过程中小心不要损伤胶体，同时保持胶体湿润；将转印夹板黑色面向下，按顺序放置海绵、滤纸、胶体、PVDF 膜、滤纸、海绵，然后夹板夹紧，注意过程中海绵与滤纸、滤纸与胶体、胶体与膜、膜与滤纸均要避免气泡产生以防目的蛋白转膜不完整；将夹板放入转膜槽中，1×转膜液淹没至夹板顶部，注意转膜夹黑色面与转膜槽黑色面对应，设置转膜电流 275mA，时间 90 分钟。注意转膜时可用脸盆或

其他容器盛满冰或冰袋，将转膜槽放入脸盆中，冰或冰袋包围覆盖转膜槽吸收转膜时发出的热量。

(6) 封闭

转膜完成，取下转膜夹，将 PVDF 膜取下放入孵育盒中，倒入 5% 脱脂牛奶，摇床轻摇封闭 1 小时。

(7) 抗体孵育

提前配制好稀释后的一抗、二抗， β -actin 配制比例为 1:10000，Nrf2、keap1、HO-1 均为 1:500-1000，二抗稀释比例为 1:10000，4℃ 保存。

封闭完成，弃去牛奶，PVDF 膜用双蒸水清洗干净，配置好的一抗孵育相应目的条带，保证条带完全浸在一抗中，4℃ 静置过夜。

一抗孵育完成，从 4℃ 冰箱中取出，摇床上中速摇动复温 30 分钟，随后回收一抗，用 1×TBST 溶液于摇床上洗膜 10 分钟，重复 3 次，TBST 洗完后再用双蒸水清洗，直至没有泡沫。将二抗倒入孵育盒中，室温，摇床孵育 1 小时后，回收二抗，洗膜同一抗。

(8) 显影

显影机器提前开启，降温至 -20℃ 使用，降温期间配置好显影液。用移液枪抽吸显影液滴加在膜上，显影液充分覆盖，室温孵育 1-2 分钟，随后条带扫描显影，文件保存为 tiff 格式，image j 软件分析条带灰度值结果。

3 统计学方法

应用统计软件 SPSS 22 处理数据，数据资料用均数±标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示。水迷宫定位航行实验数据为重复测量资料，采用重复测量设计资料的方差分析；其他实验数据满足正态性与方差齐，采用单因素方差分析和 LSD 法进行两两比较；若方差不齐，采用 *t* 检验，若不符合正态性；则采用秩和检验进行分析。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。结果图片由软件 Graph Pad Prism 8 制作。

4 实验结果

4.1 补脑扶神方对 AD 模型大鼠行为学影响

定位航行实验结果：连续训练 5 天，可见各组大鼠寻找到平台的潜伏期逐渐缩短，对平台位置产生记忆，尤其前三天潜伏期时间缩短较快，后两天趋势渐缓；与 control、sham 组相比，AD 组大鼠上平台时间明显延长 ($P < 0.01$)，游泳轨迹

更为杂乱无序；与 AD 组相比，用药组大鼠潜伏期缩短，寻找平台的时间缩短 ($P<0.05$)，在游泳过程中有寻找平台的倾向；与 AD+dnpq 组相比，AD+bnfsf 组大鼠潜伏期延长，但结果无统计学意义 ($P>0.05$)。具体情况见图 1，图 2。

空间探索实验结果：与 control、sham 组相比，AD 组大鼠第一次抵达平台的时间延长 ($P<0.05$)，且穿越平台次数明显减少 ($P<0.01$)；与 AD 组相比，各用药组首次抵达平台的时间缩短，穿过平台的次数增加 ($P<0.05$)，结果有统计学意义；与 AD+dnpq 组相比，AD+bnfsf 组首次抵达平台稍长，穿越次数少于 AD+dnpq 组，但结果无统计学意义 ($P>0.05$)。具体情况见图 3。

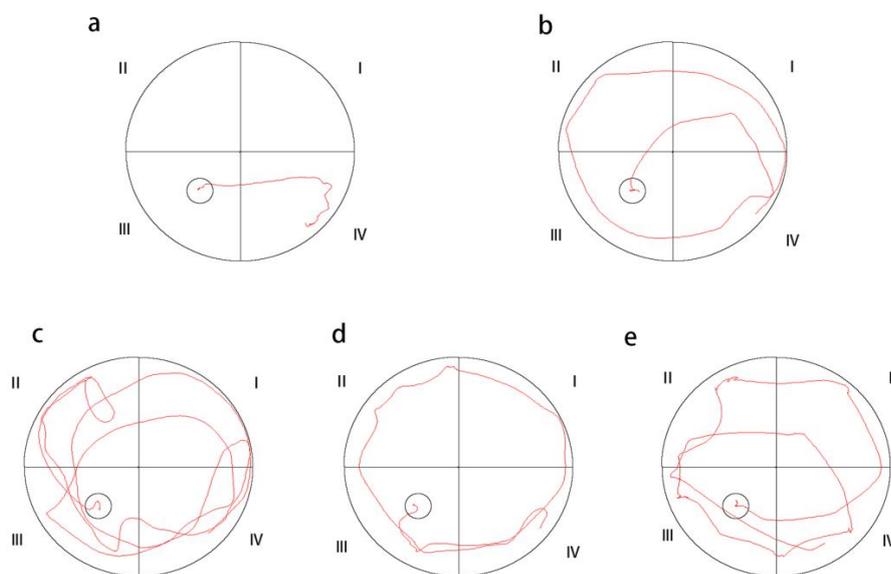


图 1 各组大鼠水迷宫轨迹图

(a: control 组; b: sham 组; c: AD 组; d: AD+bnfsf 组; e: AD+dnpq 组)

Figure1 Water maze track of rats in each group

(a: Control group; b: sham; c: AD group; d: AD+ bnfsf group; 4: AD+ DNPQ group)

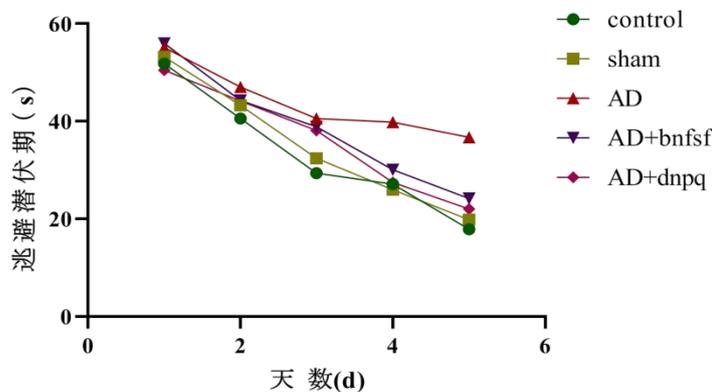


图 2 逃避潜伏期趋势图

Figure2 Escape Latency trend chart

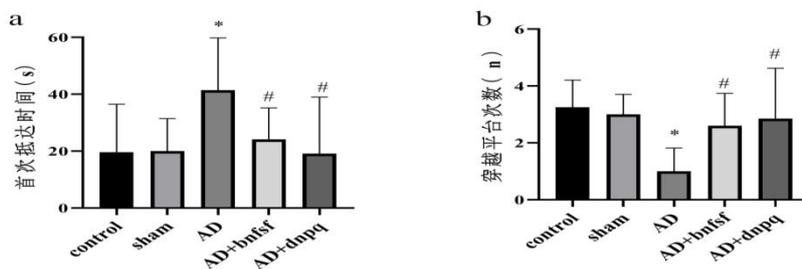


图 3 空间探索实验结果

Figure3 The results of space explore test

(Compared with control、sham Group, * $P < 0.05$; compared with Ad Group, # $P < 0.05$)

4.2 补脑扶神方对 AD 大鼠海马形态的影响

HE 染色：光镜下可见 control 组与 sham 组，CA1 区神经元染色均匀，排列紧密整齐，神经元数目正常，神经元结构完整；与 control 组和 sham 组相比，AD 组 CA1 区神经元染色不均，排列紊乱，神经元数目明显减少，神经元结构被破坏；AD+bnfsf 组 CA1 区可见部分核深染，神经元间隙增大，神经元数目较 AD 组增多，神经元结构欠完整；AD+dnpq 组，可见较少细胞核深染，核固缩，神经元排列整齐，稍疏松，神经元数目较 AD 组增多，神经元结构基本完整。见图 4。

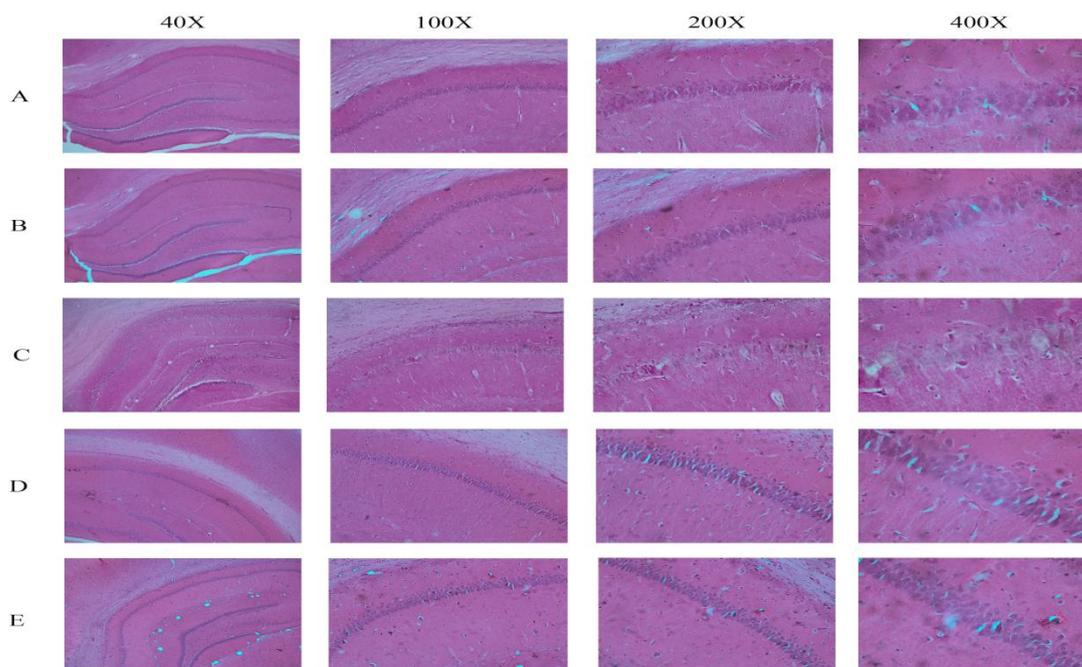


图 4 各组大鼠 CA1 区 HE 染色

(A: control 组; B: sham 组; C: AD 组; D: AD+bnfsf 组; E: AD+dnpq 组)

Figure4 HE staining results of hippo campus in each group rats

(A: Control group; B: sham group; C: AD group; D: AD+bnfsf group; E: AD+dnpq group)

尼氏染色: 光镜下可见 control 组与 sham 组, CA1 区神经细胞染色较深, 分布均匀, 排列整齐, 尼氏小体丰富; 与 control 组与 sham 组相比, AD 组 CA1 区细胞染色颜色深浅不一, 排列紊乱, 尼氏小体数量减少; AD+bnfsf 组 CA1 区可见颜色稍深, 细胞间隙增大, 尼氏小体数目较 AD 组增多; AD+dnpq 组, 可见染色均匀, 神经细胞排列整齐, 外层见细胞稍离散, 尼氏小体丰富。见图 5。

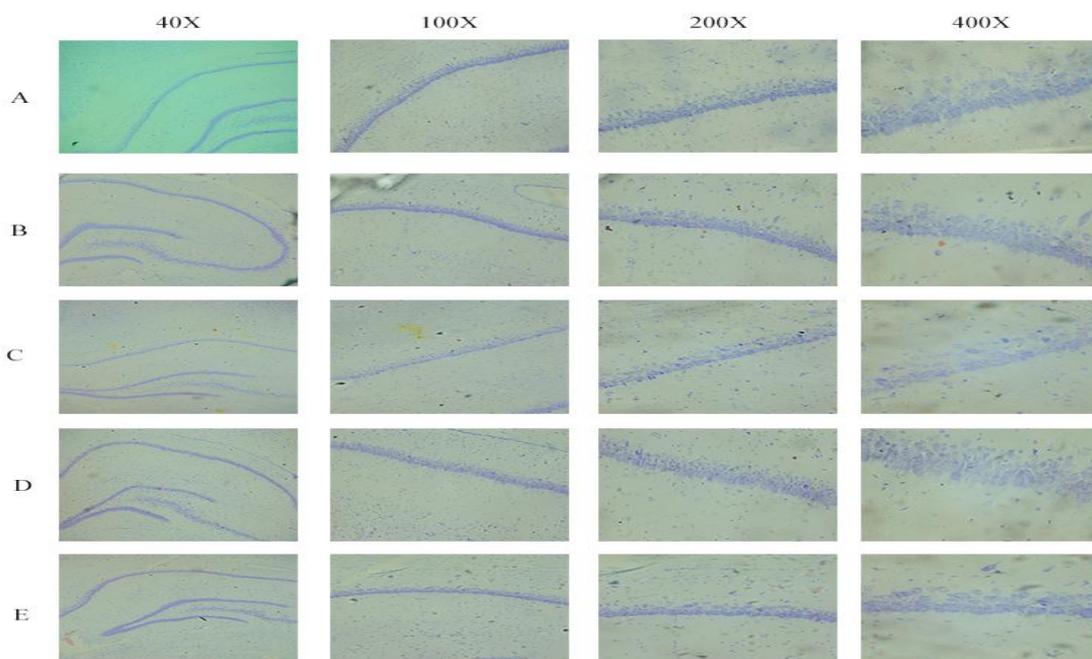


图 5 各组大鼠 CA1 区尼氏染色

(A: control 组; B: sham 组; C: AD 组; D: AD+bnfsf 组; E: AD+dnpq 组)

Figure5 Nissl staining results of hippo campus in each group rats

(A: Control group; B: sham group; C: AD group; D: AD+bnfsf group; E: AD+dnpq group)

4.3 补脑扶神方对 AD 模型大鼠血清及海马组织氧化应激的影响

实验结果显示: 血清中 sham 组的 H_2O_2 、MDA 含量较 control 组稍增高, SOD、GSH-Px 降低, 但无统计学意义 ($P>0.05$); 与 control 组、sham 组相比, AD 组 H_2O_2 、MDA 含量增高, SOD、GSH-Px 含量下降 ($P<0.05$); 与 AD 组相比, 各用药组 H_2O_2 、MDA 含量下降, SOD、GSH-Px 升高 ($P<0.05$), 但用药组之间无统计学差异。具体情况图 6。

海马组织中,可见AD组 H₂O₂、MDA 含量最高, SOD、GSH-Px 含量最低。与 control 组相比, sham 组 H₂O₂、MDA 含量稍升高, SOD、GSH-Px 降低, 但无明显差异 ($P>0.05$); 与 control 组、sham 组相比, AD 组 H₂O₂、MDA 含量升高, SOD、GSH-Px 升高($P<0.05$), 结果有统计学意义; 与 AD 组相比, 用药组 H₂O₂、MDA 含量下降, SOD、GSH-Px 升高($P<0.05$), 结果有统计学意义; 与 AD+dnpq 组相比, AD+bnfsf 组各项结果无统计学意义。具体情况见图 7。

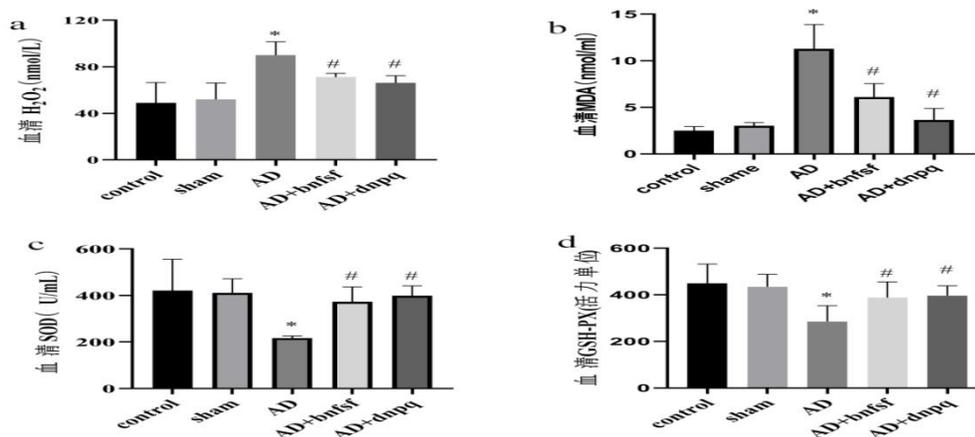


图 6 各组大鼠血清 H₂O₂、SOD、GSH-Px、MDA 含量

(与 control、sham 组相比, $*P<0.05$; 与 AD 组相比, $#P<0.05$)

Figure6 the contents of H₂O₂、SOD、GSH-Px、MDA in serum of rats in each group

(Compared with control group、sham group, $*P<0.05$; compared with AD Group, $#P<0.05$)

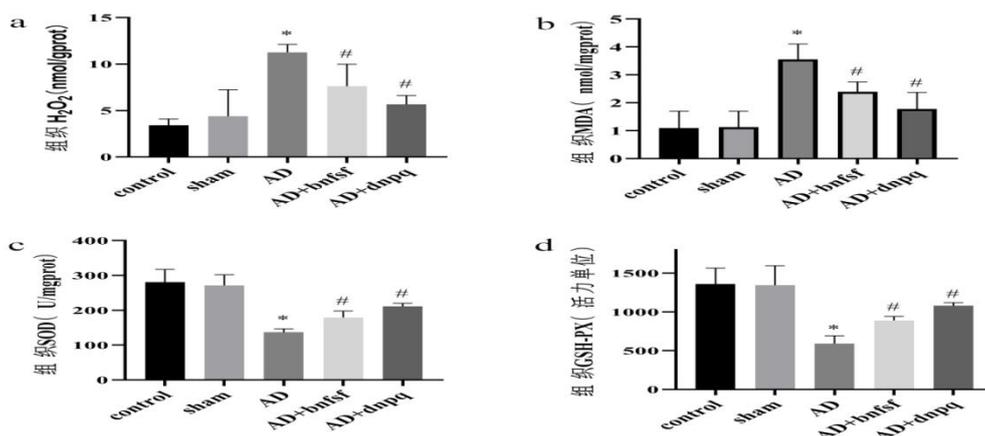


图 7 各组海马 H₂O₂、SOD、GSH-Px、MDA 含量

(与 control、sham 组相比, $*P<0.05$; 与 AD 组相比, $#P<0.05$)

Figure7 the contents of H₂O₂、SOD、GSH-Px、MDA in hippocampus of each group

(Compared with control group、sham group, $*P<0.05$; compared with AD Group, $#P<0.05$)

4.4 补脑扶神方对 AD 模型大鼠海马 Nrf2、Keap1、HO-1 表达的影响

Western Blot 法检测大鼠海马中 Nrf2、Keap1、HO-1 含量。结果可见，与 control 组相比，sham 组 Nrf2、Keap1、HO-1 蛋白表达结果无统计学意义 ($P>0.05$)；与 control 组、sham 组相比，AD 组 Nrf2 及 HO-1 蛋白表达明显降低，keap1 蛋白表达上升($P<0.05$)；与 AD 组相比，各用药组 Nrf2、HO-1 表达上升，Keap1 蛋白表达下降 ($P<0.05$)；与 AD+dnpq 组相比，AD+bnfsf 组各项蛋白表达结果无统计学差异($P>0.05$)。具体见图 8，图 9。

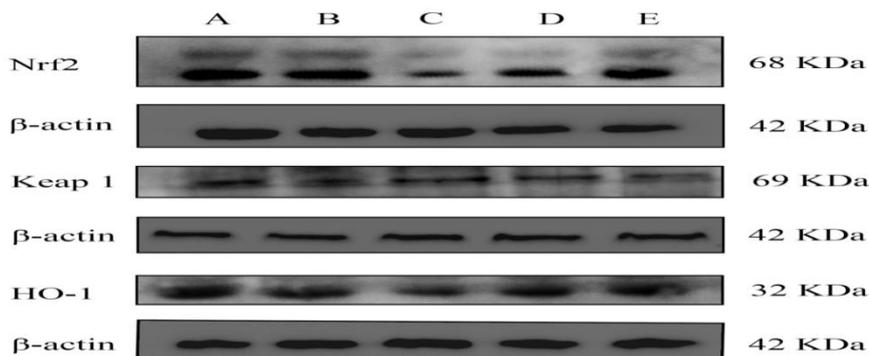


图 8 各组海马 Nrf2、Keap1、HO-1 蛋白的表达情况

(A: control 组; B: sham 组; C: AD 组; D: AD+bnfsf 组; E: AD+dnpq 组)

Figure8 expression of Nrf2, Keap1 and HO-1 proteins in hippocampus of each group

(A: Control group; B: sham group; C: AD group; D: AD+bnfsf group; E: AD+dnpq group)

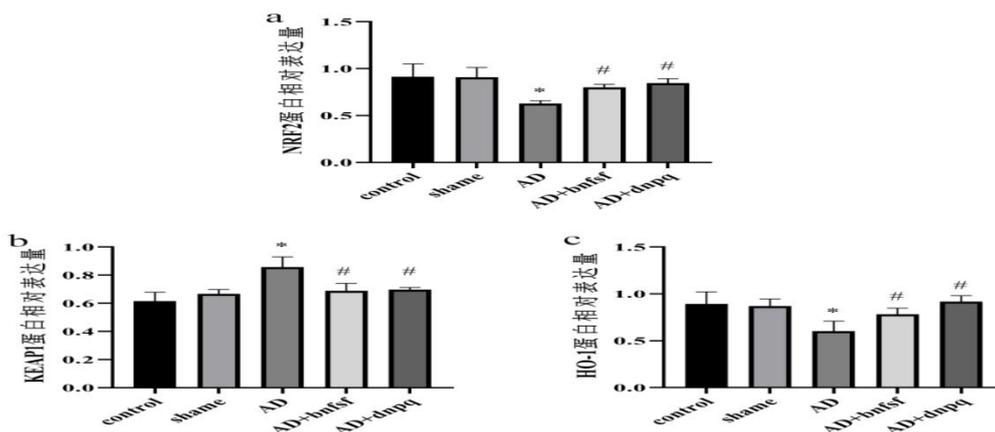


图 9 各组海马 Nrf2、Keap1、HO-1 蛋白相对表达情况

(与 control、sham 组相比, $*P<0.05$; 与 AD 组相比, $\#P<0.05$;)

Figure9 relative expression of Nrf2, Keap1 and HO-1 protein in hippocampus of each group

(Compared with control group、sham group, $*P<0.05$; compared with AD Group, $\#P<0.05$)

讨 论

1 A β_{1-42} 造模的科学性

1984年, GLENNER GG^[61]等第一次发现 A β 的氨基酸顺序与 SP 中的淀粉样物质为同系物, A β 蛋白是由 APP 通过 α 、 β 、 γ 分泌酶裂解生成 A β_{40} 和 A β_{42} , A β 生成增多或清除减少均会造成其大量沉积^[62], A β 的沉积主要发生在大脑的皮层和海马区域, A β_{42} 的毒性强于 A β_{40} , A β_{42} 有利于形成造成 AD 特征的毒性致密纤维状神经炎块斑^[63-64]。而 A β 过度沉积会引起胶质细胞产生炎症反应、增强氧化应激、线粒体功能障碍、细胞凋亡以及胆碱神经元末梢异常等连锁反应^[65]。

目前研究者多通过脑立体定位对单侧或双侧海马、侧脑室、基底前脑等部位注射不同 A β 片段制备 AD 动物模型^[70], 且注射 A β 造模方法较为经典, 运用广泛。

本次实验中, 选择毒性最大的 A β_{1-42} 来建立 AD 模型, 其缺点为必须对动物手术, 对动物产生损伤, 为避免手术带来的偏差, 特设立假手术组与空白组进行对照。而实验结果表明, A β_{1-42} 能损伤大鼠学习记忆能力, 模型组的实验指标均差于其余各组, 由此判断成功建立 AD 模型, 且假手术组与空白组学习记忆能力、实验指标均无统计学差异, 由此排除了手术对实验的影响。

2 实验指标的合理性

2.1 水迷宫检测大鼠学习记忆能力

Morris 水迷宫由英国心理学家 Morris 设计, 其原理是利用老鼠天生的厌水性, 驱动其寻找可以歇息的平台, 用来评价动物的学习记忆能力, 该法目前已经成为评价 AD 模型动物学习记忆能力的经典方法^[66]。

本实验中, 空间探索实验训练共计 5 天, 前三天训练时, 大鼠寻找平台耗时逐渐缩短, 从第四天开始耗时明显缩短, 可见经过前三天训练大鼠对水平平台空间位置的记忆已经形成, 后两天加强了大鼠对水平平台空间位置的学习记忆, 促使大鼠形成反射, 即大鼠从各个象限进入水迷宫都能迅速寻找到水平平台位置。定位航行实验在空间探索实验结束后的第 2 天进行, 记录大鼠 60s 内首次到达平台的时间及穿越平台次数, 以此判断大鼠的记忆能力。实验结果显示, 模型组的逃避潜伏期较空白组及假手术组明显延长, 首次抵达平台耗时也长于空白组及假手术组, 穿越水平平台次数少于空白组及假手术组, 说明 A β_{1-42} 造模成功; 而对比模型组, 各药组的逃避潜伏期缩短, 提示补脑扶神方改善大鼠的学习记忆能力与多奈哌齐

的效果相似。

2.2 病理切片观察 AD 大鼠海马形态学改变

海马是记忆存储的主要部位,海马神经细胞受损对大鼠的学习记忆能力必然产生影响。病理切片能直观看见大鼠海马神经细胞损伤情况。HE 染色能对细胞形态进行直接的观察,光镜下观察到对比正常组、假手术组,模型组大鼠细胞数目减少,排列紊乱,细胞形态破坏严重,进一步证明,AD 模型成功建立;而各药物组的细胞形态优于模型组,提示补脑扶神方对海马 CA1 区神经细胞具有一定的保护作用,且效果与多奈哌齐组相似。

尼氏小体最早由 Nissl 等人于 1892 年发现,其主要分布于神经细胞质中,在细胞突起中很少分布,故其被认为是神经元的特异性标志物,当神经细胞受到损伤时,尼氏小体会出现溶解、消失^[67]。但神经细胞损伤恢复时,尼氏小体也会再次出现。而尼氏小体可以被尼氏染液染成不同程度的蓝紫色,可直观通过颜色深浅来判断尼氏小体的受损情况。尼氏染色结果显示,对比正常组和假手术组,模型组细胞染色浅,排列紊乱,尼氏小体数量明显减少,提示模型组神经元受损情况严重;而经药物治疗后,细胞染色深,尼氏小体数量多,表明补脑扶神方对 AD 模型大鼠的海马神经元有一定的保护作用。

2.3 氧化应激指标及 Nrf2 信号通路相关蛋白选择

随着年龄的增长,体内 Nrf2 呈现降低趋势,而在 AD 患者脑组织中 Nrf2 的表达明显低于正常人^[68],Nrf2 通路是经典的抗 OS 通路,其能通过调控下游蛋白调节机体氧化还原平衡,其中调控的蛋白包括抗氧化酶 SOD、GSH-Px、HO-1 等。HO-1 是血红素降解的限速酶,HO-1 能通过阻止游离血红素介入 OS 以及与其酶解产物 CO、胆红素一起发挥抗氧化的作用;SOD 被认为是生物体中最重要的酶之一,对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,其能将超氧自由基转化为 H₂O₂ 和水,GSH-Px 又可促使 H₂O₂ 转变为水,从而保护细胞免受 OS 损伤^[69]。而 H₂O₂ 作为机体氧自由基之一,在现代研究中常用做造模剂建立细胞氧化损伤模型,探讨药物的神经保护作用^[70-72]。而 MDA 是氧化应激终产物中的一种,是衡量机体氧化损伤的程度的常用指标,可以由 MDA 含量间接反映氧化损伤程度。

实验通过 Western Blot 测定 Nrf2、Keap1、HO-1 蛋白含量,试剂盒测定 H₂O₂、

SOD、GSH-Px、MDA 的含量,来对比各组抗氧化能力以及氧化损伤程度。实验结果可见,模型组海马中 Keap1 蛋白高表达, Nrf2、HO-1 蛋白低表达;而经过药物治疗的各组 Keap1 蛋白含量降低, Nrf2、HO-1 蛋白含量得到提高。模型组大鼠血清和海马组织中 H₂O₂ 和 MDA 含量皆高于空白组与假手术组, SOD 与 GSH-Px 含量低于空白组与假手术组,提示模型组受到氧化损伤;而各药物组 OS 指标结果皆优于模型组,表示补脑扶神方可能通过调节 Nrf2、Keap1 的表达,抑制 OS 反应,减轻海马损伤程度。

综上, A β ₁₋₄₂ 可以成功造模 AD 模型大鼠,造成 AD 模型大鼠血清、海马组织中抗氧化指标降低,氧化损伤指标升高,对海马神经元细胞产生了损伤,降低大鼠学习记忆能力;而经补脑扶神方治疗后,造模大鼠血清、海马组织氧化损伤程度降低,学习记忆能力提高,其可能机制是调控了 Nrf2 信号通路。

从

结 论

补脑扶神方能改善 AD 大鼠学习记忆能力,对 AD 大鼠海马神经细胞有一定的保护作用,其机制可能与调节 Nrf2 信号通路,抑制氧化应激反应有关。

参考文献

- [1] 汪睿彤, 刘珏. 阿尔茨海默病的流行病学研究进展[J]. 中国慢性病预防与控制, 2021, 29(09): 707-711.
- [2] 刘畅, 孟宪勇, 董晓华. 阿尔茨海默症的发病机制及治疗药物研究进展[J]. 神经药理学报, 2020, 10(04): 36-40.
- [3] 张贺鼻, 庆宏. 阿尔茨海默症发病机制及治疗方法研究进展[J]. 科技导报, 2017, 35(10): 52-63.
- [4] 周阳, 严丽荣, 袁少飞, 等. 氧化应激与阿尔茨海默病[J]. 生命科学研究, 2015, 19(03): 265-275.
- [5] 姜双. 基于 Meta 分析的阿尔茨海默病流行病学特征及预测的研究[D]. 延边大学, 2020.
- [6] Alzheimer's Disease International. The World Alzheimer Report 2019: attitudes to dementia[M]. London: Alzheimer's Disease International, 2019:13-16.
- [7] 黄磊, 孟令昊, 欧汝威, 等. 1990—2019 年中国人群阿尔茨海默病与其他痴呆症的疾病负担分析[J]. 现代预防医学, 2021, 48(14): 2515-2519+2537.
- [8] 胡姣姣, 于恩彦, 廖峥雯. 阿尔茨海默病患者家庭照料者负担研究进展[J]. 浙江医学, 2020, 42(11): 1219-1221+1226.
- [9] 滕玉鸥, 曹梦麟, 郁彭, 等. 阿尔茨海默病药物研发进展[J/OL]. 天津科技大学学报, 2022, 02(21): 1-10.
- [10] 温泽淮, 梁伟雄. 痴呆病名源流初探[C]. 2005 全国中医脑病学术研讨会论文汇编, 2005: 370-372.
- [11] 赵厚睿, 王平. 《黄帝内经》健忘病机探讨[J]. 光明中医, 2011, 26(12): 2398-2399.
- [12] Zhang J, Duan D, Song Z L, *et al.* Small molecules regulating reactive oxygen species homeostasis for cancer therapy. *Med. Res. Rev.*2020,41(1):342-394.
- [13] Zhang J, Zhang B, Li X, *et al.* Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase as potential anticancer agents: An update. *Med. Res. Rev.*2019,39(1):5-39.
- [14] Goshtasbi Hamieh, Pakchin Parvin Samadi, Movafeghi Ali, *et al.* Impacts of

- oxidants and antioxidants on the emergence and progression of Alzheimer's disease[J]. *Neurochemistry International*,2021(153):105268.
- [15] 赵虹, 骆庆和, 殷明, 等. 氧化应激与阿尔茨海默病[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(16):4090-4093.
- [16] BelloMedina P C,GonzálezFranco D A,VargasRodríguez I,*et al.* Oxidative stress, the immune response, synaptic plasticity, and cognition in transgenic models of Alzheimer disease[J]. *Neurologia (Barcelona, Spain)*,2021. Sep 8: undefined.
- [17] Rummel Nicole G,Butterfield D Allan. Altered Metabolism in Alzheimer Disease Brain: Role of Oxidative Stress.[J]. *Antioxidants & redox signaling*,2021 Dec 21, undefined.
- [18] Arslan Jamshed,Jamshed Humaira,Qureshi Humaira. Early Detection and Prevention of Alzheimer's Disease: Role of Oxidative Markers and Natural Antioxidants.[J]. *Frontiers in aging neuroscience*,2020,12:231.
- [19] 黄澈. 老年阿尔茨海默病病情分级与氧化应激程度关系探讨[J]. *中国疗养医学*, 2019, 28(09): 906-908.
- [20] A. Tramutola,C. Lanzillotta,M. Perluigi,D. Allan Butterfield. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease[J]. *Brain Research Bulletin*,2016,133:88-96.
- [21] Butterfield D A. Phosphoproteomics of Alzheimer disease brain:insights into altered brain protein regulation of critical neuronal functions and their contributions to subsequent cognitive loss[J]. *Biochim Biophys Acta Molecular Basis Dis*, 2019, 1865(8):2031-2039.
- [22] 邵思迈, 史泓, 余姊阳, 等. 阿尔茨海默病中的β淀粉样肽与氧化应激[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(10): 131-135.
- [23] 王刘清, 窦非, 王友军. 神经元钙信号系统异常与阿尔茨海默病的“钙假说”[J/OL]. *中国生物化学与分子生物学报*: 1-14. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2021.05.1055
- [24] 魏玉苹. 细胞核中 Tau 蛋白磷酸化与核钙信号的交互作用[D]. 华中科技大学, 2017.
- [25] De Haan JB. Nrf2 Activators as attractive therapeutics for diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*,2011,60(11):2683-2684.

- [26] McMahon M, Lamont DJ, Beattie KA, *et al.* Keap1 Perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and ubiquitin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(44):18838-18843.
- [27] Silva-Palacios A, Ostolga-Chavarría M, Zazueta C, *et al.* Nrf2: Molecular and epigenetic regulation during aging[J]. *Ageing Res Rev*, 2018, 47:31-40.
- [28] Osama Alsiddig, Zhang Junmin, Yao Juan, *et al.* Nrf2: a dark horse in Alzheimer's disease treatment[J]. *Ageing Research Reviews*, 2020, 64:101206.
- [29] Huang Teng-I, Hsieh Ching-Liang, Cruz Maria T. Effects of Acupuncture on Oxidative Stress Amelioration via Nrf2/ARE-Related Pathways in Alzheimer and Parkinson Diseases[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021 Apr 26; 2021:6624976.
- [30] Zhang Xiaoying, Wang Jinyu, Gong Guowei, *et al.* Spinosin Inhibits A β 1-42 Production and Aggregation via Activating Nrf2/HO-1 Pathway[J]. *Biomolecules & therapeutics*, 2020, 28(3):259-266.
- [31] Oksanen Minna, Hyötyläinen Ida, Trontti Kalevi, *et al.* NF-E2-related factor 2 activation boosts antioxidant defenses and ameliorates inflammatory and amyloid properties in human Presenilin-1 mutated Alzheimer's disease astrocytes[J]. *Glia*, 2020, 68(3):589-599.
- [32] 苏丽燕·赛力木江, 依木然·马瑞士, 丛媛媛, 等. 阿里红多糖通过激活 Nrf2/ARE 通路改善阿尔茨海默病大鼠海马及脑皮层的氧化应激损伤[J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33(01): 89-96.
- [33] 邵璨. 异落新妇昔通过 Nrf2 相关途径对阿尔茨海默症保护作用的研究[D]. 吉林大学, 2020.
- [34] 李志勇, 赵晖, 裴凌鹏, 等. 血管性痴呆“生毒内生”病机初探[J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(07): 1594-1596.
- [35] 曾楚华, 袁德培, 胡玉萍. 土家医“三元学说”探源[J]. *河南中医*, 2014, 34(12): 2291-2293.
- [36] 朱国豪, 杜江, 张景梅主编. 土家族医药[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2006, 10: 21-26, 95.
- [37] 袁德培, 彭芳胜主编. 中国土家族医药学[M]. 北京: 科学出版社, 2014, 3: 12-19.
- [38] 彭芳胜, 彭慧娟. 土家医毒气病学[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2014, 6:

6-12.

- [39] 彭芳胜. 土家医方剂学[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2007, 4: 428-429.
- [40] 谌勤. 板桥党参通过PP2A信号通路改善AD模型大鼠认知功能障碍研究[D]. 湖北民族大学, 2019.
- [41] 刘翔宇. 板桥党参对激活GSK-3 β 诱导的AD模型大鼠认知功能障碍的保护作用及机制[D]. 湖北民族学院, 2017.
- [42] 曾楚华, 王文晟, 鲁文杰, 等. 竹节参对AD大鼠海马区Drd-2及GFAP、TNF- α 表达的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(04): 1560-1565.
- [43] 徐娅丽. 基于NF- κ B信号通路探究鬼箭羽醇提物对AD大鼠模型学习记忆影响的机制[D]. 湖北民族大学, 2019.
- [44] 毕天, 宋阔魁, 杜文喜, 等. 天珠散对D-半乳糖拟痴呆小鼠的治疗作用[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(11): 2593-2595.
- [45] 李志勇, 毕天, 林灵, 等. 天珠散改善D-半乳糖致拟痴呆小鼠学习记忆能力的作用研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(09): 2056-2058.
- [46] 宋阔魁, 叶田园, 侯金才, 等. 土家药天珠散对脑缺血所致大鼠学习记忆障碍的改善作用[J]. 中草药, 2015, 46(03): 389-395.
- [47] 赵姝蓉. 补脑赶毒方及其拆方对AD大鼠PI3K/AKT和MAPK信号通路的影响[D]. 湖北民族学院, 2018.
- [48] 王开元, 詹志来, 廖天月, 等. 竹节参的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2021, 40(05): 48-59.
- [49] 安中原, 钟斌. 天麻的化学成分与药理活性研究概况[J]. 海峡药学, 2017, 29(06): 22-24.
- [50] 林志川, 文国强, 吕艳, 等. 天麻素对阿尔茨海默症大鼠神经保护作用的研究[J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(08): 1435-1441.
- [51] 张浩, 边诗宇, 高飞, 等. 天麻素对阿尔茨海默病小鼠的脑内氧化应激及tau蛋白磷酸化的影响[J]. 中国现代医生, 2020, 58(17): 33-36+193.
- [52] 杨婷婷, 周红静, 曾晨叶, 等. 新型天麻素衍生物对阿尔茨海默病模型小鼠的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(05): 537-541.
- [53] 周楠楠, 朱燃, 赵雪梅, 等. 天麻素、黄芪总皂苷和芍药苷对阿尔茨海默病模型小鼠脑内 β -淀粉样多肽表达的影响及其机制[J]. 中华病理学杂志, 2016,

- 45(11): 780-785.
- [54] 刘德玲, 李怀斌, 黄锐, 等. 天麻素对阿尔茨海默病大鼠学习记忆能力和前额叶皮质 GalR2 表达的影响[J]. 皖南医学院学报, 2021, 40(05): 426-429.
- [55] Huang Rui, Wu Feng, Zhao Jian, *et al.* Electroacupuncture plus Gastrodin Improves Learning-memory Ability Possibly by Up-regulating Expression of SIRT 1 and PGC-1 α in Hippocampal CA1 Region of Alzheimer's Disease Rats[J]. *Zhen ci yan jiu*, 2018, 43(3): 140-145.
- [56] 罗忠圣, 周镁, 黄秀平, 等. 九头狮子草对小鼠的抑菌、止痒、抗炎作用[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(03): 555-557.
- [57] 梁冰, 李淑芳, 刘迪成. 九头狮子草醇提物的镇咳、祛痰、抗炎作用研究[J]. 贵阳医学院学报, 2003(04): 311-312.
- [58] Paxinos George. 大鼠脑立体定位图谱(第3版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.
- [59] 夏青. 补脑扶神方对 AD 模型大鼠炎症反应及 NF- κ B 蛋白表达的影响[D]. 湖北民族学院, 2018.
- [60] 凌志峰. 柴胡越鞠汤对抑郁症模型大鼠的治疗作用及相关机制研究[D]. 湖北民族大学, 2020.
- [61] Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 120(3): 885-890.
- [62] 田杰, 孙荣欣, 王萍, 等. 阿尔茨海默病的发病机制研究进展[J]. 山东医药, 2018, 58(27): 97-100.
- [63] 李旭峰, 丁小兵. 基于 A β 沉积的阿尔兹海默病的治疗研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(92): 42-43.
- [64] 邓婷, 谢丹妮, 王平, 等. 阿尔茨海默病动物模型建立及评价研究分析[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2020, 34(11): 847-856.
- [65] Sharma P, Srivastava P, Seth A, *et al.* Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies[J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 174: 53-89.
- [66] 董雯, 王守安, 陈秀娇, 等. 阿尔茨海默病动物模型神经行为学评价方法研究进展[J]. 常州大学学报(自然科学版), 2018, 30(05): 87-92.

- [67] 任非非. 基于 AMPK/SIRT1/PGC-1 α 通路研究醒脾解郁方对抑郁大鼠海马神经元突触重塑的影响[D]. 北京中医药大学, 2021.
- [68] 曹惠敏, 余刚. Nrf2 在阿尔茨海默病中的研究现状[J]. 生物化学与生物物理进展, 2015, 42(06): 533-539.
- [69] 胡流芳, 王迎, 任汝静, 等. Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(01): 146-152+166.
- [70] Li Yingchun, Hao Jincheng, Shang Bo, *et al.* Neuroprotective effects of aucubin on hydrogen peroxide-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells via the Nrf2/HO-1 pathway.[J]. *Phytomedicine*, 2021, 87:153577.
- [71] Xi Yufei, Lou Lili, Han Fengying, *et al.* Four pairs of alkaloid enantiomers from *Isatis indigotica* Fortune Ex Land with neuroprotective effects against H₂O₂-induced SH-SY5Y cell injury[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 96(C):103650.
- [72] Kim Woosuk, Kwon Hyun Jung, Jung Hyo Young, *et al.* *Cissus verticillata* Extract Decreases Neuronal Damage Induced by Oxidative Stress in HT22 Cells and Ischemia in Gerbils by Reducing the Inflammation and Phosphorylation of MAPKs[J]. *Plants*, 2021, 10(6):1217.

综 述

中医学治疗阿尔茨海默病的研究进展

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是痴呆最常见的一种类型,以认知功能下降、精神症状和行为障碍、日常生活能力下降等为主要临床表现^[1]。目前,关于AD的发病机制尚未完全明确,临床常用的西药以控制症状、延缓病情进展为主,同时具有单一性且有一定的副作用。

而中医在AD的治疗中具有独特优势,近年来对中医治疗AD的研究越来越多,本文从中医治疗AD的治则治法及中医或中药治疗的AD的研究进展进行综述,为中医药治疗AD的研究提供部分参考。

1 中医对AD病因病机的认识

中医中并无AD的病名,但其相关记载散见于“愚痴”、“健忘”、“癡证”等病证中,依其症状归属于中医“痴呆”范畴。

中医学认为本病多因年老肾衰、禀赋不足、后天失养、七情内伤、久病邪留、中风、外伤而致髓海渐空,元神失养;或邪扰清窍,神机失用而成痴呆。李晓^[2]认为AD主要是心藏神、肾藏精功能失调而成痴呆,心不藏神,神失其位,形神相离发为呆证;以及肾精不足,无以上荣脑窍,脑失濡养而发为痴呆;聂志玲^[3]认为肾虚为AD发病的根本原因,痰浊、瘀血为主要病理因素;杨玉芳^[4]认为AD基本病机总属肝肾亏虚,脏腑功能减退;黄立武^[5]认为AD临床上多见脾肾两亏证、髓海不足证,故AD发病与脾肾关系极为密切;袁梦石^[6]提出“天味地沼”观点,天为肾,地为脾,阳衰阴盛,二者功能失常,发为痴呆,且因女性AD患者体质多见肝气郁结、肝血亏虚,也认为肝为AD发病夙因。可见,本病多虚实夹杂,当辨证治之。

2 痴呆的分期和治则治法

痴呆临床演变可分为平台期、波动期、下滑期三个分期,且交替出现^[7]。

平台期多为虚证,一般病情稳定,其中虚证又各有侧重。常用七福饮滋补肝肾,生髓养脑;还少丹温补脾肾,养元安神;归脾汤益气健脾,养血安神。

波动期多虚实夹杂,常见心肝火旺,痰瘀互阻,病情时轻时重。其中痰浊蒙窍用洗心汤化痰开窍,养心安神;瘀阻脑络则用通窍活血汤活血化瘀,通窍醒神;

心肝火旺则用天麻钩藤饮清心平肝，安神定志。

下滑期多因外感六淫、情志相激，或再发卒中等因素，而致使认知损害加重，此时症候由虚转实，病情由波动转为恶化。方用黄连解毒汤合安宫牛黄丸清热解毒，通络达邪。

本病虚证当健脾补肾以生髓，培补先后天精气，实证当化痰开窍，重在逐痰化浊，活血化瘀，解毒通络。但病情变化多端，当随证治之。

3 单味中药及其提取物治疗 AD

3.1 人参与人参皂苷

人参是治疗痴呆的重要复方中的常用药物，其包含有多种成分，其中对其皂苷类成分的研究居多，已有文献总结人参皂苷 Rg1、Rg2、Rg3、Rg5、Rb1、Rd、Re 以及人参皂苷代谢产物能起到抗 A β 毒性、促进 A β 降解、抗神经炎症、抗细胞凋亡、抗氧化应激和调节神经递质等作用，继而改善学习记忆能力，防治 AD^[8]。

3.2 当归及当归多糖

当归作为常用活血补血药，在治疗 AD 的方剂中也常常出现，而现在也有实验证明当归多糖可以通过促进 A β 的代谢、调节神经递质、自由基代谢、炎症和神经元凋亡的平衡来改善记忆障碍^[9-10]。车敏等^[11]的实验提示当归多糖可能通过抑制内质网应激，减少神经细胞凋亡，从而发挥改善大鼠学习记忆能力的作用。

3.3 淫羊藿及淫羊藿苷

淫羊藿为传统补益药，《本草纲目》中记载，淫羊藿是“命门药”也，肾主命门，淫羊藿具有补肾壮阳、延缓衰老的功效。实验证明，淫羊藿苷可以抑制小胶质细胞、星型胶质细胞活化、抑制 JNK/P38 MAPK 通路、还可能通过调控胰岛素样生长因子-1 受体和 G 蛋白耦联雌激素受体减轻炎症反应^[12-15]。

4 中药复方治疗 AD

近年来中医学将整体观和辨证论治的诊疗理念应用于临床实践，复方与科学实验结合论证疗效的方法也大为施行。

马俊杰等^[16]用龟鹿二仙胶治疗中医诊断为肾虚髓空证的病人，观察其疗效，得出龟鹿二仙胶治疗 AD 的疗效确切，且其还能改善患者血管周围间隙的结论。任可乐等^[17]以龟龄集治疗 AD，能明显改善认知功能障碍，保护脑组织海马结构，调节 AD 大鼠的整体代谢水平。姬令山等^[18]证实地黄饮子可以抑制大鼠神经细胞

凋亡和海马胶质细胞炎性反应。经典方剂当归芍药散的实验结果提示能其在减少 A β 过度沉积、降低 Tau 蛋白异常磷酸化水平、改善氧化应激损伤、抑制炎症反应、调节神经递质、改善肠道菌群等方面均起到作用^[19]。

5 针灸治疗 AD

起源于新石器时期的针灸疗法,在我国已有悠久的历史,而现代研究也表明,针灸对痴呆具有显著的疗效。名老中医秦亮甫教授所创具有补髓聪脑、补益肝肾、调督益智之功的秦氏“头八针”联合多奈哌齐来治疗 AD,主穴选用:百会、印堂、头临泣(双侧)、率谷(双侧)、风池(双侧),结果证明针刺联合多奈哌齐组有效率明显高于多奈哌齐组,能有效改善轻中度 AD 患者的认知障碍,提高患者生活质量^[20-21]。徐子绚等^[22]使用电针治疗 AD 大鼠,选取全国知名针灸专家孙国杰教授研究团队研究的“益肾通督法”法的配穴“百会”“肾俞”来治疗,结果表明电针能改善 AD 大鼠的学习记忆能力,其可能通过调控 GSK-3 β 信号通路相关蛋白表达,抑制 Tau 蛋白磷酸化来实现。马慧慧选取百会、大椎、命门、肾俞、悬钟、太溪穴位,以温针灸疗法来治疗轻中度 AD,显示温针灸能提高患者认知能力和日常生活能力^[23]。

6 其他疗法

除了单味药、方剂、针灸疗法治疗 AD,其他治疗方法也逐渐兴起。例如推拿气功、五音疗法、膳食等。推拿是中医传统的康复手段,易艳兰^[24]认为推拿对早期的痴呆患者认知障碍有改善作用,且有研究表明对轻、中度痴呆的病人进行手部按摩,短期内能有效降低整体激越行为的出现,且能明显减少对躯体的攻击行为^[25]。而五音疗法是以中医五行学说为核心,将宫、商、角、徵、羽五音分别与阴阳、五行、五脏、五志相对应以调节身心的疗法。张绍华等实验发现辨证使用五音疗法后,能显著改善 AD 患者抑郁情绪,且患者血清 5-羟色胺能递质浓度较前升高^[26]。范彬歆统计发现,痴呆的饮食康复对不同证型也有相应的食疗方法,但以顾护脾胃、以资元阳为核心,且以牛乳、粳米、芡实粥、参芪粥等甘温类食物和药膳方为代表^[27]。

7 结语

中医在治疗 AD 上具有多靶点、多机制,毒副作用小的优势,但 AD 起病不易察觉,目前中医也只能缓解 AD 的部分症状,且需辨证论治,故需努力挖掘祖

国文化瑰宝，为治疗 AD 提供更多思路。

参考文献

- [1] 张杰文, 贾建平. 2018 中国痴呆与认知障碍诊治指南(八): 快速进展性痴呆的诊断[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(21): 1650-1652.
- [2] 李晓, 安耀荣, 胡亦明, 等. 从中医学“精”与“神”的关系探讨阿尔茨海默病的病因病机[J]. 中医研究, 2021, 34(12): 9-12.
- [3] 聂志玲, 周小莉. 阿尔茨海默病的中医病因病机探析[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(06): 1443-1444.
- [4] 杨玉芳, 何建成. 基于“肝肾同源”理论的阿尔茨海默病病因病机及治则治法探析[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(12): 52-54.
- [5] 黄立武. 从脾肾齐补、神志共调法论治阿尔茨海默病[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(01): 113-116.
- [6] 罗慧, 袁梦石. 袁梦石以天地转气汤为主治疗中重度阿尔茨海默病经验总结[J]. 中医药临床杂志, 2021, 33(09): 1684-1687.
- [7] 张伯礼, 薛博瑜等主编. 中医内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012, 9: 123-127.
- [8] 杨岩涛, 赵佳柱, 肖佳妹, 等. 人参皂苷治疗阿尔茨海默病的药理作用研究进展[J/OL]. 中国药理学通报, 2021(12): 1638-1643.
- [9] Qian Du, Xiaoyu Zhu, Jieru Si. Angelica polysaccharide ameliorates memory impairment in Alzheimer's disease rat through activating BDNF/TrkB/CREB pathway[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2020, 245(1): 1-10.
- [10] 王虎平, 吴红彦, 李海龙, 等. 当归多糖对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆及 β -淀粉样蛋白代谢的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(04): 51-55.
- [11] 车敏, 安方玉, 王燕, 等. 当归多糖对阿尔茨海默病模型大鼠海马神经元内质网应激的影响[J]. 中医临床研究, 2021, 13(02): 7-11.
- [12] 王冉冉, 朱天瑞, 张凤, 等. 长期淫羊藿苷治疗对 APP/PS1 小鼠神经炎症的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2020, 58(04): 71-77.
- [13] 王梅玲, 甄瑾. 淫羊藿苷对 AD 炎症模型大鼠作用的实验研究[J]. 内蒙古医学杂志, 2016, 48(11): 1291-1294.
- [14] Ke-Wu Zeng, Hong Fu, Geng-Xin Liu, *et al.* Icariin attenuates lipopolysaccha

- ride-induced microglial activation and resultant death of neurons by inhibiting TAK1/IKK/NF- κ B and JNK/p38 MAPK pathways[J]. International Immunopharmacology,2010,10(6):668-678.
- [15] 赵霞. 淫羊藿苷通过抑制炎症反应改善 AD 小鼠学习记忆能力的机制研究[D]. 青岛大学, 2017.
- [16] 马俊杰, 周春祥, 王小龙. 基于龟鹿二仙胶干预阿尔茨海默病血管周围间隙探讨“精生髓”内涵[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11): 106-111.
- [17] 任可乐, 孟祥龙, 祁晓鸣, 等. 基于“肾脑相关”的龟龄集对阿尔茨海默病模型大鼠的作用及其机制研究[J]. 现代药物与临床, 2022, 37(01): 1-10.
- [18] 姬令山, 秦合伟, 王改风, 等. 地黄饮子通过调控 miR-34a-5p 影响细胞凋亡及炎症反应治疗阿尔茨海默病的机制[J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(01): 53-61.
- [19] 陈云慧, 夏军, 刘丹, 等. 当归芍药散治疗阿尔茨海默病的作用机制实验研究进展[J/OL]. 中国实验方剂学杂志: 1-7.
- [20] 周雪, 王月花, 王艳, 等. 秦氏“头八针”结合多奈哌齐治疗阿尔茨海默病认知障碍临床观察[J]. 湖北中医药大学学报, 2021, 23(06): 109-113.
- [21] 王月花, 王艳, 周雪, 等. 秦氏“头八针”为主针药结合治疗阿尔茨海默病的临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(S1): 69-73.
- [22] 徐子绚, 宋杰, 王平, 等. 电针对阿尔茨海默病模型大鼠 GSK3 β 信号通路相关蛋白的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(09): 3023-3031.
- [23] 马慧慧. 基于肾脑相关理论的温针灸治疗轻中度阿尔茨海默病临床研究[D]. 山西中医药大学, 2021.
- [24] 易艳兰, 李艳, 伍婧, 等. 推拿改善早期老年痴呆认知功能障碍浅析[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(23): 18-20.
- [25] 周晶, 倪平, 王朝希, 等. 手部按摩对养老院轻中度痴呆症老人激越行为的影响[J]. 护理学杂志, 2015, 30(17): 1-4.
- [26] 张绍华, 王玉龙, 肖鹏. 五音疗法对老年性痴呆患者抑郁情绪的影响[J]. 湖北中医杂志, 2019, 41(05): 35-37.
- [27] 范彬歆. 痴呆中医康复思想的古籍文献研究[D]. 福建中医药大学, 2019.

攻读硕士学位期间的研究成果、参加学术会议及获奖

1 攻读硕士学位期间的研究成果

1.1 发表论文

- [1] 赵芬,袁德培.基于网络药理学探讨天麻治疗阿尔茨海默症的机制研究[J].益寿宝典,2021(16):0001-0005.
- [2] 吴广阳,唐浪,詹杰,赵芬,黄胜.基于网络药理学探讨竹节参防治肝癌的作用机制[J].大众科技,2022,24(02):114-118.

1.2 参与的课题

- [1] --

2 参加学术会议

- [1] 恩施土家族苗族自治州中医药学会康复技能大赛暨 2020 年学术年会及学术交流

3 获奖

- [1] 2019-2020 学年, 获湖北民族大学一等奖学金;
- [2] 2020-2021 学年, 获湖北民族大学三等奖学金;
- [3] 2021-2022 学年, 获湖北民族大学三等奖学金

致 谢

本以为三年时光漫长，眨眼却已面临毕业。此刻仍然能回想起考研查分时的紧张，也能想起刚踏入研究生生涯的兴奋。

入校后有幸拜入导师袁德培教授门下，在此由衷感谢导师在开题、实验开展、毕业论文撰写时的指导及帮助，也在和老师的相处中学到了许多为人处世的道理，同时深深感谢老师对我的包容。

也衷心感谢袁林老师、曾楚华老师、黄胜老师在学习及实验中给予的细心指导及帮助。

感谢师兄师姐在我实验疑惑的时候及时答疑以及真诚的帮助。

感谢我的同门以及同班研究生詹杰、吴广阳、唐浪、洪岚对我实验中给予的真诚帮助，在生活上给予的关心，能在我实验中碰到问题时及时分享经验，少走弯路，能遇上这么好的同学，是我研究生生涯的幸运。

感谢我的父母一直坚定的支持我完成研究生生涯的学习，感谢父母的无私付出。