

杞参益智方改善 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠学习与记忆能力的效应评价研究

陈杨¹, 朱梓强¹, 陆韞青¹, 郑嘉妮¹, 曹程¹, 仝佳祥¹, 李璇¹, 郭盛¹, 康宏杰², 段金廛¹, 朱悦¹

(1. 南京中医药大学药学院, 江苏省方剂研究重点实验室/江苏省方剂高技术研究重点实验室/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心/江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023; 2. 宁夏枸杞创新中心, 宁夏银川 750000)

摘要:目的 评价杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠学习与记忆能力的改善效应。方法 小鼠皮下注射 D-半乳糖构建亚急性衰老动物模型, 分别给予阳性药多奈哌齐(2 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、杞参益智方低剂量组(1.33 g·kg⁻¹·d⁻¹)、高剂量组(2.67 g·kg⁻¹·d⁻¹), 连续给药 30 d。通过水迷宫和 Y 迷宫实验评价模型小鼠学习与记忆行为; 采用 HE 染色考察模型小鼠海马损伤情况; 采用 TUNEL 法检测小鼠海马组织凋亡情况; 采用 ELISA 法检测小鼠海马组织中氧化应激因子与炎症因子表达水平; 采用 Western blot 法检测小鼠海马凋亡、氧化应激与炎症应激相关信号通路蛋白表达。**结果** 杞参益智方水提取物显著缩短模型小鼠水迷宫测试中潜伏期和上台路程($P < 0.01$), 增加穿越平台次数($P < 0.01$); 增加模型小鼠 Y 迷宫新臂探索时间和次数($P < 0.05$); 抑制模型小鼠海马 TUNEL 荧光表达($P < 0.01$); 上调氧化应激因子超氧化物歧化酶(SOD)活力($P < 0.05$)与谷胱甘肽(GSH)含量($P < 0.05$), 下调丙二醛(MDA)含量($P < 0.05$); 下调白介素(IL)-1 β 、IL-6 与肿瘤坏死因子(TNF- α)表达水平($P < 0.05$, $P < 0.01$); 下调凋亡信号通路蛋白 Cleaved Caspase-3 与 Caspase-3 表达($P < 0.05$), 上调氧化应激信号通路蛋白 Nrf2 与 HO-1 表达($P < 0.05$), 下调炎症应激信号通路蛋白 p-NF- κ B 与 NF- κ B 表达($P < 0.05$)。**结论** 杞参益智方具有改善 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠学习与记忆能力的作用, 可能与其抑制海马氧化应激与炎症应激作用相关。

关键词:杞参益智方; 衰老; 氧化应激; 中枢神经炎症

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2024)02-0145-08

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2024.0145

引文格式: 陈杨, 朱梓强, 陆韞青, 等. 杞参益智方改善 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠学习与记忆能力的效应评价研究[J]. 南京中医药大学学报, 2024, 40(2): 145-152.

Efficacy Evaluation of Qishen Yizhi Formula in Improving the Learning and Memory Ability of D-Galactose Induced Subacute Aging Mice

CHEN Yang¹, ZHU Ziqiang¹, LU Yunqing¹, ZHENG Jiani¹, CAO Cheng¹, TONG Jiaxiang¹, LI Xuan¹, GUO Sheng¹, KANG Hongjie², DUAN Jinao¹, ZHU Yue¹

(1. School of Pharmacy, Jiangsu Province Key Laboratory of Prescription Research, Jiangsu Province Key Laboratory of Prescription High Technology Research, National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Ningxia Innovation Center of Goji R & D, Yinchuan 750000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the effect of Qishen Yizhi formula on improving learning and memory ability in D-galactose subcutaneous injection induced subacute aging mice. **METHODS** Subacute aging mice model mice were developed by D-galactose subcutaneous injection and then treated with positive drug donepezil (2 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and Qishen Yizhi formula water extracts in low (1.33 g·kg⁻¹·d⁻¹) and high dose group (2.67 g·kg⁻¹·d⁻¹). The learning and memory abilities of mice were evaluated using Morris water maze and Y maze tests; HE staining was used to examine hippocampal damage in model mice; TUNEL was used to detect apoptosis of mouse hippocampal tissue; ELISA was used to detect the expression levels of oxidative stress factors and inflammatory factors in the mouse hippocampus tissue; Western blot was used to detect the expression of signaling pathway proteins related to apoptosis, oxidative stress and inflammatory stress in the hippocampus of mice. **RESULTS** The water extract of Qishen Yizhi formula signifi-

收稿日期: 2023-08-16

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFE0201700); 宁夏重点研发计划重点项目(2021BEF02009, 2022BFH02008); 宁夏科技基础条件建设项目(2021DPC05005); 江苏省研究生科研与实践创新计划(SJCX22_0796)

第一作者: 陈杨, 男, 硕士研究生, E-mail: chenyang1999c@163.com

通信作者: 朱悦, 男, 教授, 主要从事中药复方精神与神经药理研究, E-mail: zhuyue@njucm.edu.cn;

段金廛, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源化学与方剂功效物质基础研究, E-mail: dja@njucm.edu.cn

cantly shortened the latency and distance of model mice for reaching the platform in the water maze test ($P < 0.01$), and significantly increased the number of crossing the platform ($P < 0.01$); increased the exploration time and number of the Y maze new arm in model mice ($P < 0.05$); inhibited the TUNEL fluorescence expression in the hippocampus of model mice ($P < 0.01$); upregulated the activity of the oxidative stress factor superoxide dismutase (SOD) ($P < 0.05$) and glutathione (GSH) content ($P < 0.05$), and downregulated malondialdehyde (MDA) content ($P < 0.05$); reduced interleukin (IL)- 1β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF- α) expression levels ($P < 0.05$, $P < 0.01$); decreased the expression of apoptosis signaling pathway proteins Cleaved Caspase-3 and Caspase-3 ($P < 0.05$), upregulated the expression of oxidative stress signaling pathway proteins Nrf2 and HO-1 ($P < 0.05$), and downregulated the expression of inflammatory stress signaling pathway proteins p-NF- κ B and NF- κ B ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Qishen Yizhi formula can improve the learning and memory ability of subacute aging model mice injected with D-galactose, which may be related to its inhibitory effect on hippocampal oxidative stress and inflammatory stress.

KEYWORDS: Qishen Yizhi formula; aging; oxidative stress; neuronal inflammation

全球已进入老龄化社会,老年人口的快速增加导致相关的医疗保健等养老问题日趋严峻^[1]。老年期痴呆症是一种因脑老化导致的中枢神经系统退行性疾病,表现为记忆、智力、语言及日常生活能力等大脑高级功能的全面障碍,尤其以阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)发病率最高。预计到2050年,中国AD患者人数将超过3 000万,给社会和家庭带来巨大的负担与压力^[2]。研究认为,AD患者脑内皮层与海马的 β 淀粉样蛋白(Amyloid- β peptide, A β)沉积导致脑内产生大量氧自由基,加剧氧化应激损伤,氧自由基同时激活小胶质细胞释放大促炎因子产生炎性应激损伤,氧化应激与炎性应激综合作用导致海马神经元凋亡,是AD重要的病理机制^[3-4]。目前AD临床治疗的一线药物主要是胆碱酯酶抑制剂如多奈哌齐与N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-Methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)受体阻断剂美金刚等。然而心功能不全患者慎用或禁用胆碱酯酶抑制剂^[5],同时AD重在预防以及干预窗口应提早到轻度认知功能障碍(Mild cognitive impairment, MCI)阶段也已经取得共识^[6]。

中医根据AD临床表现,将其归属于“健忘”与“痴呆”范畴,并认为患者年龄增长,肾精肝血亏虚,导致心脾失养,运化无力,渐致髓海失养,记忆衰退而成痴呆^[7]。AD病位虽在脑,却与心肝脾肾功能失调密切相关。杞参益智方系在《圣济总录》所载经典方剂二精丸(枸杞子与黄精)的基础上,结合防治AD中药材的用药频次统计分析与现代药理学研究成果,加味人参、益智仁组成,同时有助于改善二精丸滋腻易影响脾胃运化功能的不足。全方滋补肝肾、益精填髓、养心安神。处方组成均为药食两用中药,安全性高,更适合AD的预防与长期用药的要求。本研究通过皮下注射D-半乳糖构建亚急性衰老小鼠模型,评价杞参益智方改善模型动物学习与记忆效用,为开发AD防治产品提供理论科学支持。

1 材料

1.1 实验动物

健康SPF级C57BL/6小鼠,雄性,体质量18~22 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2019-0010。动物在南京中医药大学实验动物中心SPF级环境中常规饲养,本实验获得南京中医药大学动物实验伦理委员会的批准(批准号:202111A045)。

1.2 药材

枸杞子(*Lycium barbarum* L.,批号:2106157)、黄精(*Polygonatum sibiricum* Red.,批号:237200516)、人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.,批号:109200125)、益智仁(*Alpinia oxyphylla* Miq.,批号:45200618)采购于亳州市紫锐药业有限公司,经段金庵教授鉴定为正品药材。

1.3 实验试剂

D-半乳糖(N13GS167640)购自上海源叶生物科技有限公司;多奈哌齐(GD18339)购自萨恩化学技术有限公司;PAGE凝胶快速制备试剂盒(PG112)、三色预染蛋白Marker(180-6003)购自上海雅酶生物医药科技有限公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(P0009)、RIPA裂解液(P0013B)购自上海碧云天生物技术有限公司;小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA试剂盒(AF2132-A)、小鼠白细胞介素(IL)-6 ELISA试剂盒(AF2163-A)、小鼠IL- 1β ELISA试剂盒(AF2040-A)购自湖南艾方生物科技有限公司;小鼠超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(A001-3-2)、还原性谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(A006-2-1)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(A003-4-1)均购自南京建成生物工程研究所。ECL化学发光液(180-5001)购自上海天能公司;抗体 β -actin(66009-1-Ig)、Nrf-2(16396-1-AP)、HO-1(10701-1-LG)、Cleaved Caspase-3(25128-1-AP)购自Proteintech公司;抗体Caspase-3(9662)、NF- κ B p65(8242)与p-NF- κ B p65(3033)购自CST公

司;HRP-Linked Anti-mouse IgG (BA1050)、HRP-Linked Anti-rabbit IgG (BA1054) 均购自博士德公司。

1.4 实验仪器

小鼠脑立体定位仪 (68000) 购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司;动物行为学影像采集系统 (JL-Behv) 购自上海吉量生物科技有限公司;倒置显微镜 (AXIO Vert A1) 购自瑞士 Zeiss 公司;旋转蒸发器 (Rotavapor R-210) 购自瑞士 Buchi 公司;贝克曼离心机 (Microfuge 22R) 购自南京百瑞达生物科技有限公司;组织研磨机 (Tissuelyer-48) 购自上海净业信发展有限公司;多功能酶标仪 (ENSPiRE) 购自 Perkin-Elmer 公司;凝胶成像系统 (ChemiDoc XRS+Imaging System) 购自美国 Bio-Rad 公司;干式恒温金属浴 (SBH130D) 购自英国 STUART 公司。

2 方法

2.1 杞参益智方水提取物的制备

按照处方比例称取枸杞子 50 g, 黄精 50 g, 人参 30 g, 益智仁 30 g, 加入 10 倍量水回流提取 1.5 h, 再加 8 倍量水回流提取 2 次各 1 h, 合并提取液, 浓缩至生药含量为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2 D-半乳糖注射动物模型的建立及给药

将健康雄性小鼠适应性饲养 1 周, 随机分为 5 组, 分别为空白组、模型组、杞参益智方低剂量组、杞参益智方高剂量组和多奈哌齐 (阳性药) 组, 每组 12 只。模型组及各给药组小鼠每天皮下注射 D-半乳糖 $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 空白组小鼠注射等量的生理盐水, 连续造模 6 周^[8]。杞参益智方水提取液用生理盐水分别配制成浓度为 0.5 、 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 多奈哌齐用生理盐水配制成浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。造模第 12 天起, 除空白组和模型组外, 其余各组每日同时以相应的给药量进行灌胃给药, 给药体积均为 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 。给药剂量设置为: 杞参益智方低剂量组 $1.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 杞参益智方高剂量组 $2.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 多奈哌齐组 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。连续给药 30 d。空白组与模型组给予等量生理盐水灌胃。

2.3 行为学检测

给药 30 d 后进行 Morris 水迷宫实验和 Y 迷宫实验, 评价模型小鼠学习与记忆能力, 具体方法参照课题组已发表的文章^[9]。

2.4 TUNEL 染色法检测海马区细胞凋亡

行为学测试结束后, 小鼠颈椎脱臼处死并解剖

取出全脑组织, 生理盐水润洗, 每组取 6 只动物全脑组织, 放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 依次用乙醇进行梯度脱水, 放入二甲苯至透明后包埋, 并用切片机切片, 切片厚度约 $5 \mu\text{m}$, 放于载玻片上展平, 并于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱内烘烤, 制得各组动物脑组织病理切片。将所得的脑组织石蜡切片脱蜡。根据 TUNEL 试剂盒检测步骤进行检测, 并用倒置显微镜进行拍照, 检测各组动物海马区的细胞凋亡水平。

2.5 氧化应激因子表达检测

行为学检测后, 解剖获得海马组织, 称取相应质量的组织, 加入 10 倍量 PBS, 低温研磨, 离心取上清待测, 按照试剂盒说明书检测 SOD 活力和 MDA、GSH 含量。

2.6 致炎因子水平检测

行为学检测后, 解剖获得海马组织, 称取相应质量的组织, 加入 10 倍量 PBS, 低温研磨, 离心取上清待测, 按照 ELISA 试剂盒检测说明书检测 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量。

2.7 Western blot 检测

称取海马组织, 加入 10 倍量含有蛋白酶抑制剂 (Cocktail) 的 RIPA 裂解液, 研磨后冰浴 30 min, 离心取上清, 按照 BCA 试剂盒的步骤测定蛋白浓度, $98 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热 15 min, 使蛋白变性。按照蛋白凝胶试剂盒实验步骤制备 10% 和 12.5% 的 PAGE 凝胶, 120 V 电泳 1.5 h, 300 mA 转膜 2 h, 用 5% 脱脂奶粉放在摇床上封闭 1 h, 加入一抗 (Nrf2 Rabbit mAb、HO-1 Rabbit mAb、Caspase-3 Rabbit mAb、Cleaved Caspase-3 Rabbit mAb 抗体稀释比例为 1 : 2 000; NF- κB p65 Rabbit mAb、p-NF- κB p65 Rabbit mAb 抗体稀释比例为 1 : 1 500; β -actin Rabbit mAb 抗体稀释比例为 1 : 10 000), $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 摇床过夜, 二抗 (HRP-Linked Anti-mouse IgG, HRP-Linked Anti-rabbit IgG, 稀释比例 1 : 10 000) 孵育 1 h, 成像系统曝光并采集。

2.8 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计学软件进行统计分析, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

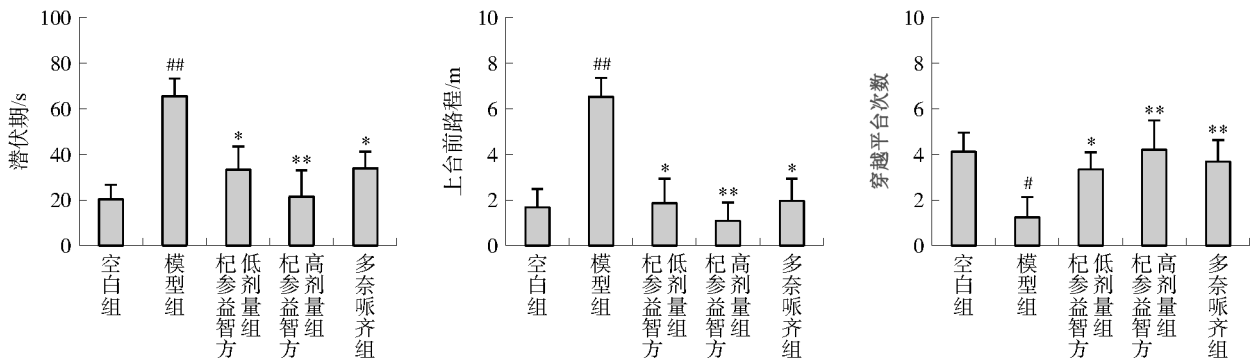
3.1 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠学习与记忆行为的影响

水迷宫实验考察结果如图 1 所示, 与空白组小

鼠相比,模型组小鼠潜伏期与上台前路程显著增加 ($P < 0.01$),穿越平台次数显著减少 ($P < 0.05$),表明 D-半乳糖皮下注射导致了小鼠学习与记忆能力损伤。杞参益智方水提物高、低剂量组显著减少模型小鼠潜伏期和上台前路程 ($P < 0.05, P < 0.01$),穿越平台次数显著增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。其中高剂量组作用趋势强于低剂量组。

Y 迷宫实验结果如图 2 所示,与空白组小鼠相比,模型小鼠的新臂探索时间和次数显著减少 ($P < 0.05, P < 0.01$)。杞参益智方低剂量组和高剂量组均能显著增加模型小鼠新臂探索时间和次数 ($P < 0.05$)。

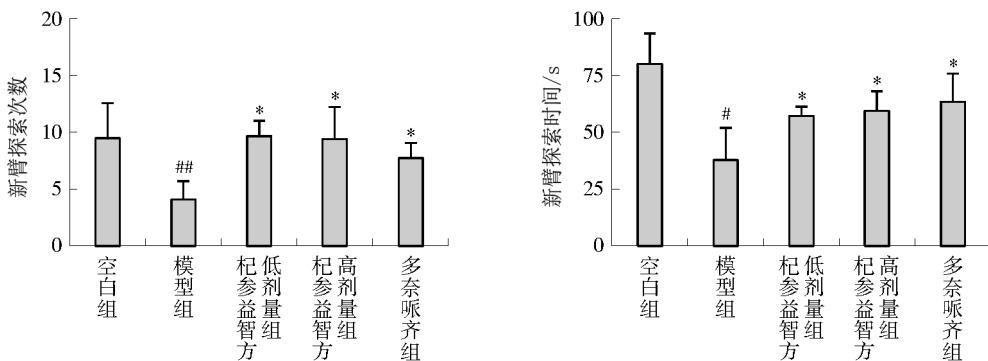
上述研究表明,杞参益智方能够显著改善亚急性衰老模型小鼠受损的学习与记忆能力。



注:与空白组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 8$ 。

图 1 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠水迷宫行为学的影响

Fig. 1 Effect of Qishen Yizhi formula on behaviors of water maze in D-galactose injection induced subacute aging model mice



注:与空白组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 8$ 。

图 2 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠 Y 迷宫行为学的影响

Fig. 2 Effect of Qishen Yizhi formula on behaviors of Y maze in D-galactose injection induced subacute aging model mice

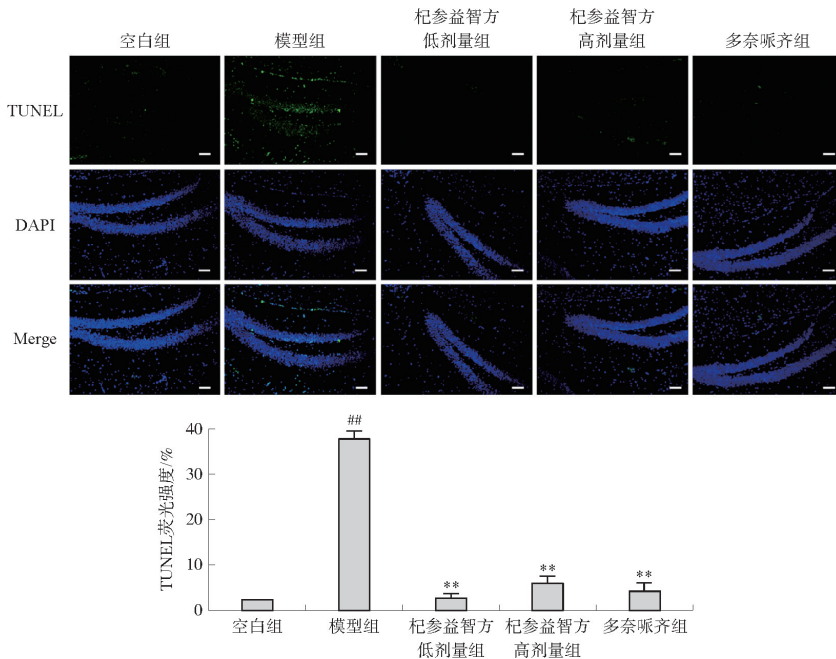
3.2 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠海马组织凋亡的影响

结果如图 3 所示,与空白组小鼠相比,模型组小鼠海马组织凋亡细胞数量显著增多 ($P < 0.01$),杞参益智方低、高剂量组显著减少了模型小鼠海马组织凋亡细胞数量 ($P < 0.01$),作用趋势相似。

3.3 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠海马组织氧化应激因子表达的影响

结果如图 4 所示。模型组较空白组小鼠 SOD

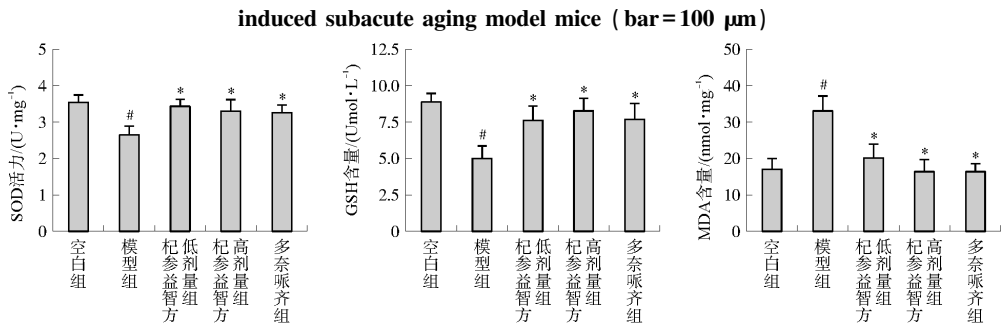
活力和 GSH 含量显著降低 ($P < 0.05$),MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$),表明模型小鼠脑内氧化应激加剧。杞参益智方低、高剂量组均能够显著提高 SOD 活力和 GSH 含量 ($P < 0.05$),显著降低 MDA 含量 ($P < 0.05$),表明杞参益智方能够降低氧化产物的生成,提高抗氧化因子的表达,从而减缓氧化应激。其中高剂量组在提高 GSH 表达与降低 MDA 表达上的作用趋势略强于低剂量组。



注:与空白组比较,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{**} $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 6$ 。

图 3 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老小鼠海马组织凋亡的影响 (标尺 = 100 μm)

Fig. 3 Effect of Qishen Yizhi formula on apoptosis in hippocampus of D-galactose injection induced subacute aging model mice (bar = 100 μm)



注:与空白组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 8$ 。

图 4 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老小鼠海马组织氧化应激因子表达的影响

Fig. 4 Effect of Qishen Yizhi formula on the expression levels of oxidative stress factors in hippocampus of D-galactose injection induced subacute aging model mice

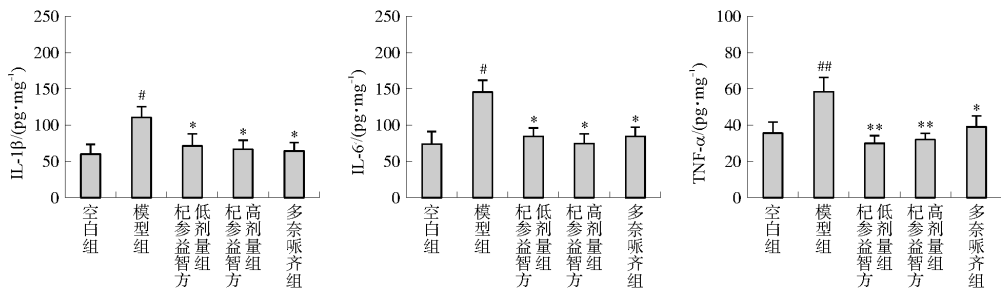
3.4 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠海马炎症因子水平的影响

结果如图 5 所示,与空白组小鼠相比,模型组小鼠海马中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平显著上升 ($P < 0.05, P < 0.01$),杞参益智方能够降低上述致炎细胞因子表达的水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

3.5 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠海马组织凋亡通路蛋白表达的影响

用 Western blot 法检测小鼠海马组织中凋亡通

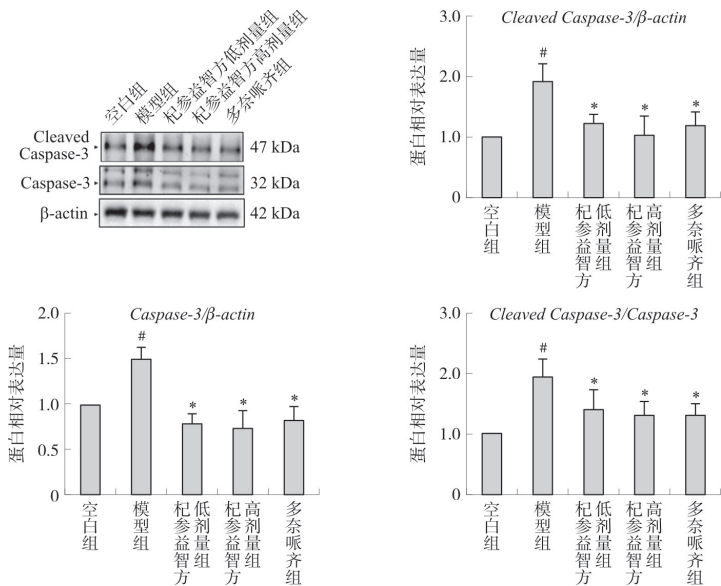
路蛋白 Cleaved Caspase-3 与 Caspase-3 表达,结果如图 6 所示。与空白组相比,模型组小鼠海马 Cleaved Caspase-3 与 Caspase-3 表达均显著升高 ($P < 0.05$),Cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值也显著升高 ($P < 0.05$)。杞参益智方能够显著抑制上述 2 种蛋白的表达 ($P < 0.05$),下调 Cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值 ($P < 0.05$),表明杞参益智方能够抑制海马细胞凋亡通路的激活。高剂量组的作用趋势略强于低剂量组。



注:与空白组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 8$ 。

图 5 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠海马组织炎症因子表达的影响

Fig. 5 Effect of Qishen Yizhi formula on the expression of inflammatory cytokines in hippocampus of D-galactose injection induced subacute aging model mice



注:与空白组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 5$ 。

图 6 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠凋亡通路蛋白表达水平的影响

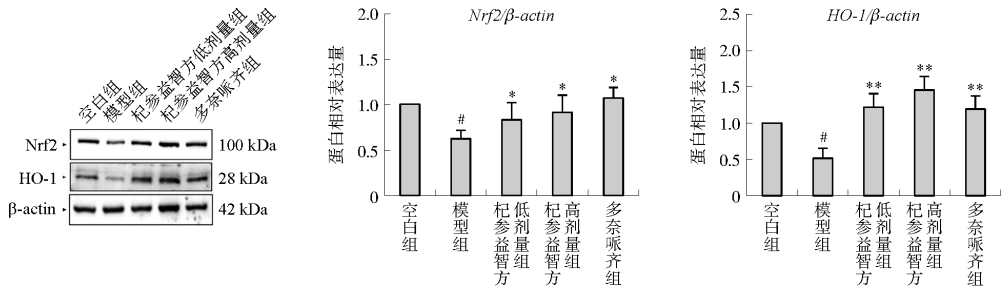
Fig. 6 Effect of Qishen Yizhi formula on the expression of apoptotic proteins in hippocampus of D-galactose injection induced subacute aging model mice

3.6 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠海马组织抗氧化通路蛋白表达的影响

采用 Western blot 法检测受试动物海马组织中抗氧化关键信号通路蛋白 Nrf2 与 HO-1 的表达,结果如图 7 所示。模型组小鼠海马组织蛋白 Nrf2 和 HO-1 的表达水平较空白组显著下调($P < 0.05$)。与模型组相比,杞参益智方显著增加模型动物海马组织 Nrf2 和 HO-1 的表达($P < 0.05, P < 0.01$),提示杞参益智方可通过调控 Nrf2/HO-1 信号通路发挥抗氧化作用。高剂量组的上调作用趋势略强于低剂

3.7 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠海马组织 NF- κ B 蛋白表达的影响

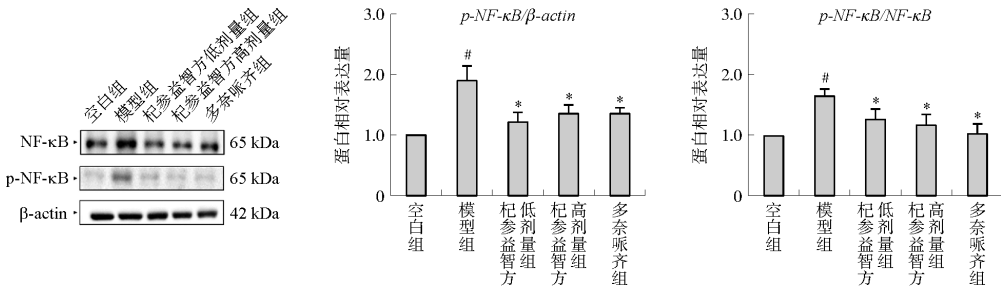
采用 Western blot 法检测小鼠海马组织中炎症通路关键蛋白 NF- κ B 与其磷酸化蛋白 p-NF- κ B 表达,结果如图 8 所示。与空白组相比,模型组小鼠海马 p-NF- κ B 表达与 p-NF- κ B/NF- κ B 比值显著升高($P < 0.05$),杞参益智方能够显著下调 p-NF- κ B 表达与 p-NF- κ B/NF- κ B 比值($P < 0.05$),提示杞参益智方能够抑制海马细胞炎症通路的激活。



注:与空白组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 5$ 。

图 7 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠海马组织 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平的影响

Fig. 7 Effect of Qishen Yizhi formula on the expressions of Nrf2 and HO-1 proteins in hippocampus of D-galactose injection induced subacute aging model mice



注:与空白组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 5$ 。

图 8 杞参益智方对 D-半乳糖注射亚急性衰老模型小鼠海马组织 NF-κB 蛋白表达水平的影响

Fig. 8 Effect of Qishen Yizhi formula on the expressions of NF-κB proteins in hippocampus of D-galactose injection induced subacute aging model mice

4 讨论

迄今为止,1956年 Harman 提出的线粒体自由基学说是衰老损伤发生机制中最具有影响力的学说。该学说认为随着年龄增长,细胞代谢过程中产生的自由基不断增加而清除能力逐渐降低^[10]。ROS 急剧增加,导致抗氧化剂 GSH 和抗氧化酶 SOD 显著降低,氧化剂 MDA 急剧增加,破坏细胞微环境平衡,损害氧化合成酶和脱氢酶,导致线粒体能量转化停止,线粒体通透性增加,Ca²⁺体内平衡被破坏,浓度升高,引起线粒体功能障碍^[11-12]。线粒体是氧化还原的重要场所,线粒体的缺陷会加剧神经变性。大脑相比于人体其他组织的耗氧量更高,因此氧化应激损伤在脑衰老中作用更加凸显^[13]。Nrf2 是细胞抗氧化防御系统的关键蛋白,对神经元氧化损伤的保护起着至关重要的作用^[14]。生理状况下,Nrf2 与抗氧化反应元件相互作用,增强抗氧化酶的表达,调节下游靶基因 HO-1 的表达,发挥抗氧化作用。而氧化应激下氧化还原平衡被破坏,Nrf2/HO-1 信号通路被抑制,导致氧自由基过度增加,引起炎症细胞浸润并导致 NF-κB 信号通路激活,导致 IL-1β、IL-6 与 TNF-α 等炎症介质过度释放。在氧化应激与炎症应激的综合作用下,Caspase 凋亡通路激活,

最终导致细胞凋亡^[15]。同时,Aβ 沉积会激活海马区小胶质细胞,释放大炎症因子^[16],进一步放大小胶质细胞炎症级联反应,与氧化应激损伤交织而最终导致细胞凋亡^[17]。给动物长期连续注射 D-半乳糖会使细胞内半乳糖浓度增高,破坏并消耗机体抗氧化防御系统,加剧自由基脂质过氧化反应,导致脂褐质增多与器官功能减退,出现与自然衰老动物相似的生理生化改变,从而被广泛用于抗衰老药物的研究^[18]。本研究表明,杞参益智方能够增加模型动物海马中 SOD 活力和 GSH 含量($P < 0.05$),降低 MDA 的表达($P < 0.05$),同时提升 Nrf2 与 HO-1 的表达($P < 0.05, P < 0.01$),表现出显著的抗氧化作用。同时该方还能够抑制炎症因子 IL-1β、IL-6 与 TNF-α 的表达水平($P < 0.05, P < 0.01$),下调炎症通路关键蛋白 p-NF-κB 表达与 p-NF-κB/NF-κB 比值($P < 0.05$),并减少模型动物海马区细胞凋亡($P < 0.01$),抑制凋亡通路关键蛋白 Caspase-3 与 Cleaved Caspase-3 表达($P < 0.05$),体现了中药复方多层次、多靶点与多通路调控的综合治疗优势。

杞参益智方是在中医“助气固精,保镇丹田”的经典方剂二精丸基础上加味而成。二精丸中黄精与枸杞子均为中医益精填髓、滋补肝肾之要药,与中医

理论中 AD 疾病肾精亏虚、髓海失养的基本病机高度吻合。但肾精需得元气资助,方能濡养脏腑。人参大补元气,不仅使气血生化有源,还可推动气血上荣于脑。黄精质滋黏腻,易助湿滞气,年老之人本就脾肾功能渐衰,久服有碍脾之嫌,故辅以益智仁温肾以助肾阳,暖脾以滋脾运,又取其芳香之气,补而不滞。四药相合,使肾精得充,气血可化,神志可复。该方四味药均为药食同源的药材,安全性好,有利于长期用药。

杞参益智方中的 4 味药及其活性成分均有改善痴呆模型动物学习与记忆能力的现代报道。枸杞多糖可以改善 APP/PS1 小鼠海马区淀粉样蛋白沉积,改善小鼠受损突触的可塑性,并促进海马神经新生^[19]。黄精中薯蓣皂苷元能够显著改善痴呆大鼠的空间学习记忆能力,降低氧化应激与炎症应激水平,保护神经元免受损伤并抑制乙酰胆碱酯酶活性^[20]。人参所含的多种人参皂苷 Rb₁、Rg₁、Re 等也可通过改善模型小鼠体内氧化应激水平,降低 ROS 的表达,上调 Nrf2/GPX-1/ERK/CREB 信号通路,改善模型小鼠神经损伤^[21-24]。益智仁不同极性提取物能够调节痴呆动物胆碱能系统,改善其学习与记忆能力^[25]。因此杞参益智方改善痴呆模型可能是方中各成分共同作用的结果。

本研究初步评价了杞参益智方改善衰老模型动物学习与记忆能力的效用,后续我们将深入研究方中发挥作用的主要活性成分,并对其作用机制进行进一步深入研究,以期将该方防治老年期痴呆产品开发提供更多的现代科学依据。

参考文献:

[1] 刘丹. 中国人口老龄化发展现状、成因与对策[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(16): 4123-4126.
LIU D. Present situation, causes and countermeasures of population aging in China [J]. Chin J Gerontol, 2022, 42(16): 4123-4126.

[2] 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(9): 707-711.
WANG R T, LIU J. Progress in epidemiological research of Alzheimer's disease [J]. Chin J Prev Contr Chronic Dis, 2021, 29(9): 707-711.

[3] PENG L, BESTARD-LORIGADOS I, SONG W H. The synapse as a treatment avenue for Alzheimer's Disease [J]. Mol Psychiatry, 2022, 27(7): 2940-2949.

[4] LAHOOTI B, CHHIBBER T, BAGCHI S, et al. Therapeutic role of inflammasome inhibitors in neurodegenerative disorders [J]. Brain Behav Immun, 2021, 91: 771-783.

[5] DEVENISH S R A. The current landscape in Alzheimer's disease research and drug discovery [J]. Drug Discov Today, 2020, 25(6): 943-945.

[6] MCWHIRTER L, CARSON A. Functional cognitive disorders: Clinical presentations and treatment approaches [J]. Pract Neurol, 2023, 23(2): 104-110.

[7] 陈慧泽, 谈世进, 孟胜喜. 中西医结合防治阿尔茨海默病的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(12):

2025-2029.
CHEN H Z, TAN S J, MENG S X. Research progress on prevention and treatment of Alzheimer's disease with combination of traditional Chinese and western medicine [J]. Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis, 2021, 19(12): 2025-2029.

[8] 李梦婷, 郑慧丽, 朱梓强, 等. 杞蛎还少方改善 D-半乳糖致亚急性衰老小鼠性激素水平紊乱与睾丸氧化损伤的效用评价研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39(11): 1102-1112.
LI M T, ZHENG H L, ZHU Z Q, et al. Study on efficacy evaluation of Qili Huanshao formula in ameliorating sex hormone disturbance and oxidative damage in testicular of D-galactose-induced subacute aging mice [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2023, 39(11): 1102-1112.

[9] 史乙伟, 陈云, 刘梦秋, 等. 加味开心散对多因素神经损伤痴呆小鼠学习记忆能力的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(1): 44-48.
SHI Y W, CHEN Y, LIU M Q, et al. Research of Jiawei Kaixin San on improving learning and memory abilities of multiple neuronal damage induced dementia mice [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2017, 33(1): 44-48.

[10] HARMAN D. The free radical theory of aging: Effect of age on serum copper levels [J]. J Gerontol, 1965, 20: 151-153.

[11] SELIVANOV V A, VOTYAKOVA T V, PIVTORAIKO V N, et al. Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain [J]. PLoS Comput Biol, 2011, 7(3): e1001115.

[12] TRIGO D, VITÓRIA J J, DA CRUZ E SILVA O A B. Novel therapeutic strategies targeting mitochondria as a gateway in neurodegeneration [J]. Neural Regen Res, 2023, 18(5): 991-995.

[13] ANGELOVA P R. Sources and triggers of oxidative damage in neurodegeneration [J]. Free Radic Biol Med, 2021, 173: 52-63.

[14] GOODFELLOW M J, BORCAR A, PROCTOR J L, et al. Transcriptional activation of antioxidant gene expression by Nrf2 protects against mitochondrial dysfunction and neuronal death associated with acute and chronic neurodegeneration [J]. Exp Neurol, 2020, 328: 113247.

[15] WANG L, ZHANG X, XIONG X X, et al. Nrf2 regulates oxidative stress and its role in cerebral ischemic stroke [J]. Antioxidants, 2022, 11(12): 2377.

[16] DELGADO A, CHOLEVAS C, THEOHARIDES T C. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and beneficial action of luteolin [J]. BioFactors, 2021, 47(2): 207-217.

[17] KALYAN M, TOUSIF A H, SONALI S, et al. Role of endogenous lipopolysaccharides in neurological disorders [J]. Cells, 2022, 11(24): 4038.

[18] ZHANG L L, CHEN C, MAK M S, et al. Advance of sporadic Alzheimer's disease animal models [J]. Med Res Rev, 2020, 40(1): 431-458.

[19] ZHOU Y, DUAN Y H, HUANG S C, et al. Polysaccharides from *Lycium barbarum* ameliorate amyloid pathology and cognitive functions in APP/PS1 transgenic mice [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 144: 1004-1012.

[20] SOM S, ANTONY J, DHANABAL S, et al. Neuroprotective role of Diosgenin, a NGF stimulator, against Aβ (1-42) induced neurotoxicity in animal model of Alzheimer's disease [J]. Metab Brain Dis, 2022, 37(2): 359-372.

[21] LIU M C, BAI X Y, YU S T, et al. Ginsenoside Re inhibits ROS/ASK-1 dependent mitochondrial apoptosis pathway and activation of Nrf2-antioxidant response in beta-amyloid-challenged SH-SY5Y cells [J]. Molecules, 2019, 24(15): 2687.

[22] WU J J, YANG Y, WAN Y, et al. New insights into the role and mechanisms of ginsenoside Rg1 in the management of Alzheimer's disease [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 152: 113207.

[23] ZHANG H, SU Y, SUN Z H, et al. Ginsenoside Rg1 alleviates Aβ deposition by inhibiting NADPH oxidase 2 activation in APP/PS1 mice [J]. J Ginseng Res, 2021, 45(6): 665-675.

[24] CHEN C, ZHANG H F, XU H L, et al. Ginsenoside Rb1 ameliorates cisplatin-induced learning and memory impairments [J]. J Ginseng Res, 2019, 43(4): 499-507.

[25] 石绍淮, 张晨宇, 刘冰, 等. 益智仁不同极性提取物抗老年痴呆作用的研究 [J]. 中国药房, 2013, 24(27): 2507-2510.
SHI S H, ZHANG C N, LIU B, et al. Study on anti-senile dementia function of different polar extracts of *Alpinia oxyphylla* [J]. China Pharm, 2013, 24(27): 2507-2510.

(编辑:杨巍敏)