

# 六味地黄汤对快速衰老小鼠认知功能及 Wnt3a、GSK-3 $\beta$ 表达的影响

吴琨鹏<sup>1</sup>, 易健<sup>1</sup>, 彭千元<sup>1</sup>, 汤艳<sup>1</sup>, 黄昕<sup>2</sup>, 刘柏炎<sup>2\*</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.益阳医学高等专科学校,湖南益阳 413000)

**【摘要】**目的 研究六味地黄汤对 D-半乳糖(D-gal)致快速衰老小鼠认知功能及 Wnt3a、GSK-3 $\beta$  表达的影响。方法 以 500 mg/(kg·d)的 D-半乳糖颈部皮下注射复制快速衰老小鼠模型,将动物随机分为正常组,模型组,六味地黄(简称六味)高、中、低剂量组, VitE 组,给予相应干预,历时 8 周。观察小鼠的体质量变化,采用 Morris 水迷宫实验评价小鼠的认知功能,免疫组化法、RT-qPCR 法检测 Wnt3a、GSK-3 $\beta$  的表达。结果 六味地黄汤对快速衰老小鼠体质量及水迷宫实验的影响:模型组与正常组比较,差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ );各用药组与模型组比较,差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ );六味高剂量组与其他用药组比较,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );六味地黄汤对快速衰老小鼠认知功能及 Wnt3a、GSK-3 $\beta$  表达的影响:模型组与正常组比较,差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ ),各用药组与模型组比较,差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ ),六味高剂量组与其他用药组比较,差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ )。结论 六味地黄汤可以有效改善 D-半乳糖致快速衰老小鼠的学习记忆障碍;增加衰老小鼠 Wnt3a 的表达,激活 Wnt 信号通路,下调 GSK-3 $\beta$  的表达可能是六味地黄汤延缓衰老健脑益智的作用机制。

**【关键词】** 六味地黄汤;认知功能;Wnt3a;GSK-3 $\beta$ ;抗衰老;熟地黄;山药;山茱萸

**【中图分类号】**R285.5 **【文献标识码】**A **【文章编号】**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.03.003

## Effects of Liuwei Dihuang Decoction on Recognition and the Expression of Wnt3a and GSK-3 $\beta$ in Senescence Accelerated Mice

WU Kunpeng<sup>1</sup>, YI Jian<sup>1</sup>, PENG Qianyuan<sup>1</sup>, TANG Yan<sup>2</sup>, LIU Baiyan<sup>2\*</sup>

(1.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2.Yiyang Medical College, Yiyang, Hunan 413000, China)

**【Abstract】** Objective To study the effect of Liuwei Dihuang Decoction (LWDHD) on recognition, Wnt3a and GSK-3 $\beta$  in D-galactose induced senescence accelerated mice. Methods The senescence accelerated mice were injected 500 mg/(kg·d) of D-galactose subcutaneously copy rapid, the animals were randomly divided into normal group, model group, high dose, medium dose and low dose of LWDHD groups and VitE group, which were given different processing. After gavage 10 mL/(Kg·d) for eight weeks, the mice body quality change was changed, cognitive function in mice was evaluated by line Morris water maze experiment, the expression of Wnt3a and GSK-3 $\beta$  were detected by immunohistochemical and RT-qPCR methods. Results Compared with normal group and other groups, the weight gain of body mass in model group was lesser ( $P<0.05$ ), the incubation period was longer and cross platform times was more ( $P<0.05$ ); Compared with normal group, the differences of the body quality increases, the incubation period and cross platform number in high dose of LWDHD group were not statistically significant ( $P>0.05$ ); Compared with VitE group, the body quality and the ability of learning and memory in low dose of LWDHD group have no statistical significance ( $P>0.05$ ); The high dose of LWDHD group and other groups were statistically significant ( $P<0.05$ ). The result showed high consistency by immunohistochemical method and RT-qPCR detection. Compared with the model group, the low expression of Wnt3a, high activity of GSK-3 $\beta$  in high dose of LWDHD group, the difference was statistically significant ( $P<0.01$ ); Compared with the medium and low dose of LWDHD groups and VitE group, the high

**【收稿日期】**2015-09-11

**【基金项目】**国家自然科学基金项目(81202694),湖南省自然科学基金项目(2015JJ2105)。

**【作者简介】**吴琨鹏,女,在读硕士研究生,从事中医药防治心脑血管疾病研究。

**【通讯作者】**\* 刘柏炎,男,教授,博士研究生导师,E-mail:liubaiyan@126.com。

expression of Wnt3a and low activity of GSK-3 $\beta$  in the high dose of LWDHD group were statistically significant ( $P<0.01$ ).

**Conclusion** Liuwei Dihuang Decoction can improve the learning and memory diorders in D-galactose induced senescence accelerated mice. The mechanism of Liuwei Dihuang Decoction in anti-aging and promoting intelligence could be increasing the Wnt3a expression in aging mice, activation of Wnt signaling pathways, and down-regulating GSK-3 $\beta$  expression.

〔**Keywords**〕 Liuwei Dihuang Decoction; cognitive function; Wnt3a; GSK-3 $\beta$ ; anti-aging; Radix Rehmanniae Preparata; Rhizoma Dioscoreae; Fructus Corni

衰老是伴随年龄逐渐出现的机体退行性变化,其中脑衰老是一种不可避免的老化现象,核心症状就是认知功能障碍。随着社会老龄化加重,流行病学研究表明认知功能障碍发病率越来越高,已经成第四大致死因素。中医学认为,脑为髓之海,肾藏精生髓通于脑,肾精充足,则髓海得养,神机运转如常,反之,肾精亏损,髓海空虚,则脑的功能失常。六味地黄丸是中医药补益肾精的经典方剂,出自于宋代钱乙的《小儿药证直诀》,药理学及临床研究表明六味地黄汤可明显改善年龄相关性认知功能障碍<sup>[1-2]</sup>。本研究则通过建立快速衰老模型,观察六味地黄汤对衰老小鼠认知能力及 Wnt3a、GSK-3 $\beta$  表达的影响,探讨六味地黄汤抗衰老的可能机制,为临床用药提供理论支持。

## 1 材料

### 1.1 动物

昆明种成年小白鼠 40 只,雄性,健康清洁级,体质量(20 $\pm$ 2) g,动物购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,购进后常规喂养,合格证号:SCXK(湘)2011-0003。

### 1.2 药物

六味地黄汤:熟地黄 24 g,干山药 12 g,山茱萸 12 g,泽泻 9 g,茯苓 9 g,牡丹皮 9 g。购自湖南中医药大学杏林药房。按传统方法煎煮,浓缩至每毫升 4 g 生药,4  $^{\circ}$ C 冷藏备用。

### 1.3 试剂

D-半乳糖、SP-9 000 (武汉博士德生物公司); Wnt3a、GSK-3 $\beta$  免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物公司); 维生素 E 注射液 (江西博莱大药厂 1 mL: 5 mg); 逆转录试剂盒 (Thermo),qPCR 试剂盒 (TaKaRa),trizol(ambion)。

### 1.4 仪器

TP-1000 电子天平 (中国湘仪天平仪器厂);水迷宫动物行为学习记忆系统(法国 Viewpoint);BX-51 光学显微镜及数码摄影数字彩超图像分析仪系

统(日本 Olympus 公司),realplex2 荧光定量 PCR 仪(德国艾本德公司),232HK 离心机(德国 HERMLE 公司),BG-AUHWIDI 核酸水平电泳仪(北京百晶生物技术有限公司),BD106 核酸蛋白浓度测定仪(英国 BioDrop 公司),T100 梯度 PCR 扩增仪、XRS+imager 化学发光系统(美国 BioRad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组及给药

适应性喂养 2 周后,小鼠死亡 4 只。余 36 只随机分为正常组,模型组,六味地黄(简称六味)高剂量组、中剂量组、低剂量组,VitE 组,每组 6 只。除正常组以外的小鼠予每日颈部皮肤 75%酒精消毒后,D-半乳糖 0.5 g/(kg $\cdot$ d)颈部皮下注射,正常组小鼠予生理盐水相同体积皮下注射,周期为 8 周,复制快速衰老小鼠模型。中剂量组相当于 60 kg 体质量人体表面积临床等效剂量,高、中、低剂量组灌胃量分别为 2、1、0.5 g/(kg $\cdot$ d),空白组、模型组每天给予等容积蒸馏水灌胃,阳性对照组给予 VitE 注射液灌胃 [100 mg/(kg $\cdot$ d)],各组灌胃体积均为 10 mL/(kg $\cdot$ d),灌胃 8 周,治疗前及治疗后均用 Morris 水迷宫系统测定大鼠的学习记忆功能的变化。第 8 周行水迷宫试验后所有小鼠行断颈法处死,取脑组织采用免疫组化、RT-qPCR 方法检测小鼠脑内 Wnt3a、GSK-3 $\beta$  的表达。

### 2.2 观察体质量变化

所有动物自由进食,饮水,活动,每周称质量并记录体质量变化。

### 2.3 行为学测试

2.3.1 定位航行实验 实验共历时 5 d,每天固定时间段,每个时间段训练 4 次。第 1 次训练时,将小鼠远离目标象限面向池壁放入池中,记录小鼠找到平台的时间(逃避潜伏期),后 3 次即将小鼠分别从其余 3 个不同象限放入水中,历时 2 min。2 min 内找不到平台者潜伏期记录为 120 s,每次训练间隔 20 s。4 次训练潜伏期的平均值作为小鼠当日的学

习成绩<sup>[3]</sup>。

2.3.2 空间探索实验 第6天撤除平台,将小鼠从任意一区入水,记录小鼠在2 min内跨越原平台的次数<sup>[4]</sup>。

#### 2.4 检测小鼠脑内 Wnt3a、GSK-3 $\beta$ 的含量

2.4.1 免疫组化方法检测 将保存在4%多聚甲醛中的脑组织取出,梯度脱水,石蜡切片,烤片(65℃)2 h后,常规脱蜡至水;高温柠檬酸盐液煮沸修复2 min,切片放入3%过氧化氢溶液中浸泡10 min灭活内源性过氧化物酶;0.01 mol/L PBS 泡洗3 min $\times$ 3次;滴加正常山羊血清封闭15 min,并用PBS作空白对照;分别加入两种抗体(Wnt3a和GSK-3 $\beta$ ,浓度均为1:100),各100  $\mu$ L 37℃(2 h);0.01 mol/L PBS 泡洗3 min $\times$ 3次;加入通用

型生物素化二抗100  $\mu$ L,37℃15 min,0.01 mol/L PBS 泡洗3 min $\times$ 3次;加入过氧化物酶标记链霉卵白素100  $\mu$ L,37℃20 min,0.01 mol/L PBS 泡洗3 min $\times$ 3次;滴加DAB显色剂,梯度酒精脱水,中性树胶封片。再于光学显微镜200倍镜下随机选取6个不重复视野,由图像分析系统测算阳性细胞表达数量。

2.4.2 RT-qPCR 检测 mRNA 的相对量 用trizol提取总RNA;于核酸蛋白浓度测定仪上测定RNA的溶度和质量;行RNA琼脂糖凝胶电泳,见两条明显的28 S、18 S的区带;采用两步法逆转录cDNA;20  $\mu$ L体系扩增qPCR。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值进行相对定量,反映目的基因表达水平,其数值越大,表达越强。详见表1。

表1 聚合酶链式反应物引物序列及反应温度、扩增长度

基因	引物	序列	温度(℃)	产物长度
Wnt3a	Forward	5'-CACCTCCCATCCCCTTCCTA-3'	59.7	111bp
	Reverses	5'-CCGTCTGCTCAAGTGTCCCT-3'	59.8	
Gsk-3 $\beta$	Forward	5'-AGGCTGTGTGTGGCTGAAT-3'	57.8	113bp
	Reverses	5'-TTTGCTCCCTTGGTGT-3'	55.8	
$\beta$ -actin	Forward	5'-GCCCTGGCTCCTAGCACC-3'	64.1	73bp
	Reverses	5'-CCACCAATCCACACAGACTACTTG-3'	62.0	

根据qPCR仪自动分析并计算结果,qPCR结果以Ct值表示,相对定量采用比较Ct法;以 $\beta$ -actin基因为管家基因, $\Delta C_t$ 为目的基因和管家基因的Ct值差。 $\Delta\Delta C_t$ 表示对照组与处理组间的 $\Delta C_t$ 差异。

#### 2.5 数据处理与统计分析

实验数据为计量资料,用“ $\bar{x}\pm s$ ”描述,使用SPSS17.0统计软件处理,符合正态性及方差齐性者用单因素方差分析;若方差不齐,则用Tamhane's T2检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 六味地黄汤对小鼠体质量变化的影响

随着D-半乳糖颈部皮下注射时间的延长,模型组小鼠毛色明显暗淡无光泽,神倦嗜睡,体质量增加缓慢,呈现出明显衰老体征。各组小鼠初始体质量分析无统计学差异( $P>0.05$ );而终末体质量模型组与正常组、用药组比较差异有显著统计学意义( $P<0.01$ );各组终末体质量及增质量均与正常组比较有

统计学意义( $P<0.05$ ),六味高剂量组与VitE组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。详见表2。

表2 六味地黄汤对小鼠体质量的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6, g$ )

组别	初始体质量	终末体质量	增质量
正常组	19.9 $\pm$ 0.1	50.5 $\pm$ 3.5	30.5 $\pm$ 3.5
模型组	20.0 $\pm$ 0.4	39.4 $\pm$ 3.3**	19.4 $\pm$ 3.3**
六味高剂量组	19.9 $\pm$ 0.2	46.2 $\pm$ 2.6* $\blacktriangle$	29.2 $\pm$ 2.5* $\blacktriangle$
六味中剂量组	19.9 $\pm$ 0.2	45.2 $\pm$ 2.1* $\blacktriangle$ $\#$	26.2 $\pm$ 2.2* $\blacktriangle$ $\#$
六味低剂量组	19.7 $\pm$ 0.7	44.2 $\pm$ 2.2* $\blacktriangle$ $\#$	24.4 $\pm$ 2.7* $\blacktriangle$ $\#$
VitE组	20.1 $\pm$ 0.6	45.0 $\pm$ 4.1* $\blacktriangle$ $\#$	23.3 $\pm$ 0.5* $\blacktriangle$ $\#$
F值	0.508	16.663	15.847
P值	0.768		0.006

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较 $\blacktriangle$  $P<0.05$ , $\blacktriangle$  $P<0.01$ ;与六味高剂量组比较, $\#P<0.05$ 。

#### 3.2 六味地黄汤对小鼠学习记忆能力的影响

定位航向实验:造模前各组小鼠组间无差异( $P>0.05$ ),造模后小鼠潜伏期明显延长,平均逃避潜伏期,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。模型组小鼠的平均逃避潜伏期较其他5组明显延长( $P<0.01$ ),具有显著统计学意义。六味高剂量组与中剂量组、低剂量

组、VitE组三组平均潜伏期比较具有显著性差异( $P<0.01$ )。

空间探索实验:造模前各组小鼠跨台次数无差异( $P>0.05$ )造模后次数减少,组间差异有统计学意义( $P<0.01$ )。模型组大鼠的跨台次数明显少于其他5组,具有显著统计学意义( $P<0.01$ );六味中剂量组与低剂量组及VitE比较具有统计学意义( $P<0.05$ )。详见表3。

表3 六味地黄汤对小鼠潜伏期及跨台次数的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	逃避潜伏期(s)		跨台次数(次/120 s)	
	前	后	前	后
正常组	18.6±5.9	19.8±9.0	14.5±1.1	14.0±2.0
模型组	18.6±6.7	101.5±13.2**	13.7±2.2	3.8±1.3**
六味高剂量组	18.6±6.4	30.5±9.1▲▲	14.0±2.0	13.5±2.2▲▲
六味中剂量组	19.3±6.3	49.5±8.9▲▲■	13.8±1.5	10.0±1.0▲▲■
六味低剂量组	18.8±5.8	62.3±5.8▲▲■	14.0±2.1	7.8±1.4▲▲■●
VitE组	19.5±6.9	64.1±11.1▲▲■	14.2±1.7	7.8±1.1▲▲■●
F值	0.728	52.235	0.145	23.901
P值	0.608	0.000	0.980	0.000

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,▲▲ $P<0.01$ ;与六味高剂量组比较,### $P<0.01$ ;与六味中剂量组比较,● $P<0.05$ 。

### 3.3 六味地黄汤对小鼠脑内 Wnt3a、Gsk3 $\beta$ 表达的影响

3.3.1 免疫组化方法 与正常组比较模型组,Wnt3a阳性细胞数少,Gsk-3 $\beta$ 阳性细胞数多,差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ ),用药各组与模型组比较,Wnt3a表达多,Gsk-3 $\beta$ 表达少,差异具有显著意义( $P<0.01$ ),组间内,六味高剂量组与其他用药组比较,Wnt3a表达多,而GSK-3 $\beta$ 表达较少,差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ ),六味中剂量组与VitE组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),详见表4。

3.3.2 RT-qPCR Wnt3a、GSK-3 $\beta$ 的表达呈负相关,模型组Wnt3a mRNA相对量少,GSK-3 $\beta$ mRNA相对量多,差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ ),组间内,六味高剂量组与其他用药组比较,Wnt3a mRNA相对量多,而GSK-3 $\beta$ 表达较少,差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ ),六味中剂量组与VitE组比较,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),详见表4。

## 4 讨论

人口老龄化趋势增加了老年认知功能障碍的患病率,早期干预治疗是延缓衰老的最有效的措施。中医学认为,肾和脑的关系最密切,“肾生髓,通于

表4 六味地黄汤对快速衰老小鼠脑内 Wnt3a、GSK-3 $\beta$  表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	Wnt3a		GSK-3 $\beta$	
	阳性细胞数	mRNA 相对量	阳性细胞数	mRNA 相对量
正常组	91.6±7.4	5.7±0.3	58.3±6.2	0.3±0.1
模型组	74.6±10.4**	1.0±0.2**	98.0±8.2**	1.0±0.1**
六味高剂量组	112.6±18.2▲▲	5.8±0.6*▲▲	56.7±6.4▲▲	0.3±0.1*
六味中剂量组	91.1±7.7▲▲■	4.6±0.3▲▲■	70.2±10.3▲▲■●	0.4±0.2▲▲■
六味低剂量组	90.0±14.0▲▲■	4.5±0.7▲▲■	72.5±10.9▲▲■	0.5±0.1▲▲■
VitE组	88.8±5.9▲▲■●	3.1±0.7▲▲■●	73.4±9.3▲▲■●	0.6±0.2▲▲■●
F值	6.767	7.125	102.9	10.5
P值	0.000			

注:与正常组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,▲▲ $P<0.01$ ;与高组比较,### $P<0.01$ ;与中组比较,● $P<0.05$ 。

脑”说明肾精是脑生成的物质基础,脑为髓海,补肾益精中药能生髓壮骨,亦可护脑益智健脑,这些是毋庸置疑的<sup>[5-7]</sup>。因此治疗衰老性认知功能障碍多从补肾填精论治。六味地黄汤是滋补肝肾的经典名方,能健脑益智,长期给予六味地黄汤可改善空间记忆能力及部分改善条件性逃避反应能力,促进神经干细胞的增殖,促进认知功能的恢复<sup>[8]</sup>,但对其作用机制尚不明确。

在Wnt信号通路中Wnt3a是最常见的Wnt家族配体,它与细胞膜上的受体Frizzled结合,抑制下游GSK-3 $\beta$ 的活性,使细胞内 $\beta$ -catenin数量增多,后者达到一定水平后进入细胞核,与TCF/LEF结合,激活转录因子,诱导相应的靶基因的表达,激活经典的Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路,进而对细胞的增殖分化及细胞周期进行调节<sup>[9]</sup>。经典的Wnt信号通路在细胞间粘附及分化方面发挥着重要作用,是神经发育的一条重要通道<sup>[10]</sup>。在体外神经干细胞培养过程中,加入有活性的Wnt3a蛋白可减少神经球的形成,促进神经干细胞向神经元及神经胶质细胞的分化<sup>[11]</sup>。脑缺血损伤下再灌注组的Wnt3a的表达明显高于假手术组,其是损伤细胞增殖的重要激活剂<sup>[12-13]</sup>,GSK-3 $\beta$ 是经典的通路上一个重要的负性调控因子,其活性升高可抑制Wnt通路,使得GSK-3 $\beta$ 对p-eatenin的磷酸化修增强并促进其降解,进而促进细胞的凋亡<sup>[14]</sup>,GSK-3 $\beta$ 引起神经元凋亡的关键,在老化的神经细胞中GSK-3 $\beta$ 的含量明显增多<sup>[15]</sup>。

VitE是体内不可获缺的抗氧化的维生素,脑损伤后局部活性氧大量升高,而VitE干预后,SOD含量增加,MDA含量下降,小鼠学习记忆能力明显改善<sup>[16]</sup>,VitE亦调节Ca<sup>2+</sup>的稳态,抑制抗氧化应激导致



的 mtDNA 的损伤从而改善 D-半乳糖诱致衰老小鼠学习记忆障碍<sup>[17]</sup>,故实验以 VitE 作为阳性对照组。本实验表明 D-半乳糖颈部皮下注射后小鼠认知功能下降模型建立,各用药组与模型组在体质量、增重,逃避潜伏期、垮台次数及 Wnt3a、GSK-3 $\beta$  表达方面的差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),其中,六味地黄汤高剂量组增重多,逃避潜伏期短、垮台次数多, Wnt3a 表达显著,而 GSK-3 $\beta$  含量少,与其他各组比较差异具有显著统计学意义( $P<0.01$ ),实验结果显示了六味地黄汤抗衰老的积极作用,结合当前的研究,我们推断提高 Wnt3a 的表达,抑制 GSK-3 $\beta$  的含量,激活 Wnt 经典信号通路是六味地黄汤改善认知功能障碍的可能机制。

#### 参考文献:

- [1] 陈 丽,周忠志,何泽云.六味地黄丸对慢性肾脏病研究的新进展[J].湖南中医药大学学报,2013,33(8):104-107.
- [2] 李君玲,周 恒,林丽娜.六味地黄丸辅助治疗延缓老年痴呆症 40 例观察[J].中西医结合心脑血管病杂志,2014,12(1):117-118.
- [3] 朱丹彤,肖 波,谢光洁.化学点燃癫痫大鼠在水迷宫中学习记忆能力的测定[J].卒中与神经疾病,2003,10(1):36-39.
- [4] 王俊亚,张冬梅.Morris 水迷宫实验的测试方法介绍及注意事项[J].现代医药卫生,2012,28(21):3 289-3 290.
- [5] 易亚乔,葛金文,邓奕晖.从肾论治血管性痴呆临床疗效的 Meta 分析[J].湖南中医药大学学报,2013,33(11):93-97.
- [6] 贺文彬,张俊龙,陈乃宏.“肾-髓-脑”生物轴理论初探[J].中医杂志,2015,56(14):1 182-1 184.
- [7] 刘 宏,贾 彦,仲丽丽.左归丸对惊恐伤肾 MCAO 大鼠 BDNF 及其受体的影响[J].中医药信息,2015,32(4):10-14.
- [8] 易 健,刘柏炎,蔡光先.超微六味地黄汤对老年痴呆大鼠认知功能和脑组织碱性成纤维生长因子表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):139-142.
- [9] Zhu ZZ, Yin JH, Guan JJ, et al. Lithium stimulates human bone marrow derived mesenchymal stem cell proliferation through GSK-3 $\beta$  dependent  $\beta$ -catenin/Wnt pathway activation. FEBS Journal,2014, 23(281):5 371-5 389.
- [10] Wang L, Liu Y, Li S. Wnt signaling pathway participates in valproic acid-induced neuronal differentiation of neural stem Cells. Int J Clin Exp Pathol 2015,8(1):578-585.
- [11] Muroyama Y, Kondoh H, Takada S. Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(4): 915-921.
- [12] 张利美,周小青,刘旺华.丹龙醒脑方促进脑缺血再灌注损伤大鼠神经干细胞增殖与  $\beta$ -catenin、Wnt-3a 表达及其机制的研究[J].湖南中医药大学学报,2015,35(1):7-10.
- [13] 罗时鹏,余资江,肖朝伦.小鼠缺血再灌注损伤后海马齿状回 Wnt1、Wnt3a 的表达变化 [J]. 中国老年学杂志,2013,33(11):2 578-2 581.
- [14] Choi YK, Kim YS, Choi IY, et al. 25-hydroxycholesterol induces Mitochondria-dependent apoptosis via activation of glycogen synthasekinase-3beta in PCI2 cells [J]. Free Radio Res, 2008, 42(6):544-553.
- [15] 王淑敏,陈林林,王 伟.LiCl 通过抑制 GSK-3 $\beta$  的活性防治 AD 的研究[J].中国医学前沿杂志(电子版),2014,6(7):17-19.
- [16] 潘天荣,张艳青,钟明奎.甲状腺素和维生素 E 干预对甲减大鼠认知能力的影响及机制探讨[J].中国慢性病预防与控制,2010,18(5):496-499.
- [17] 曲 娟,方文娟,李 冰.维生素 E 对 D-半乳糖诱致衰老小鼠脑抗氧化能力、钙稳态和线粒体 DNA(mtDNA)损伤的影响[J].中国病理生理杂志,2008,24(3):523-526.

(本文编辑 杨 瑛)