

本文引用: 王小菊, 王智贤, 张文将, 易健, 陈博威, 盛望, 李宇翔, 刘柏炎, 王行宽. 三补方对自然衰老小鼠认知功能及脂质过氧化损伤的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(3): 357-364.

三补方对自然衰老小鼠认知功能及脂质过氧化损伤的影响

王小菊^{1,2}, 王智贤^{1,2}, 张文将³, 易健^{1,2}, 陈博威^{1,2}, 盛望^{1,2}, 李宇翔^{1,2}, 刘柏炎^{4*}, 王行宽^{1,2}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208;

3. 陕西中医药大学, 陕西咸阳 712046; 4. 湖南省中医药研究院, 湖南长沙 410006

[摘要] **目的** 观察三补方对自然衰老小鼠认知功能的影响, 探讨潜在病理因素和三补方(Sanbu Decoction, SBD)的作用及其可能作用机制。**方法** 18只18月龄自然衰老健康SPF级野生型C57BL/6小鼠, 雌雄各半, 随机分为衰老组(WT-Aged)、多奈哌齐组(WT-Donepezil)、三补方组(WT-SBD), 另选6只3月龄小鼠为青年对照组(WT-Young)。WT-Young小鼠不灌胃, WT-Aged小鼠用蒸馏水灌胃, 其余用相应药物处理, 灌胃45 d。灌胃结束前6 d采用水迷宫实验, 记录潜伏期时间、穿越平台次数和平台所在象限游泳路程。用HE染色观察海马神经元形态变化, 免疫组织化学法测定小鼠脑海马组织Tau、p-Tau、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、神经上皮干细胞蛋白(neuroepithelial stem cell protein, Nestin)表达水平, 检测试剂盒检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。**结果** 与WT-Young相比, 第2日起WT-Aged逃逸潜伏期延长($P<0.05$), 穿越平台次数和平台所在象限经过的路程减少($P<0.05$); 与WT-Aged相比, WT-Donepezil第3~5日和WT-SBD第4~5日逃逸潜伏期缩短($P<0.05$), 穿越平台次数和在平台所在象限经过的路程增多($P<0.05$)。WT-Aged小鼠出现海马神经元排列紊乱和大面积的神经元坏死, 细胞质嗜酸性增强, 细胞核固缩、溶解、消失。与WT-Aged小鼠相比, WT-Donepezil和WT-SBD小鼠神经元损伤减少, 排列较为紧密, 退化固缩的细胞数量则明显减少, 少部分细胞可见核固缩及细胞浆嗜酸性变。与WT-Young相比, WT-Aged Tau、p-Tau和GFAP表达增多($P<0.05$), Nestin表达减少($P<0.05$), SOD、GSH-Px活性降低($P<0.05$), MDA含量升高($P<0.05$)。与WT-Aged相比, WT-Donepezil和WT-SBD p-Tau、GFAP表达减少($P<0.05$), WT-SBD SOD、GSH-Px活性升高($P<0.05$), MDA含量降低($P<0.05$)。**结论** 三补方可以降低自然衰老小鼠脑海马组织p-Tau表达, 减弱星形胶质细胞活化水平, 降低脂质过氧化反应, 发挥脑保护抗衰老作用, 提高老年小鼠学习记忆能力, 改善衰老小鼠的衰老状态, 延缓衰老进程。

[关键词] 自然衰老; 认知功能; 脂质过氧化损伤; 三补方; 枸杞子; 黄芪; 茯苓

[中图分类号] R285

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.03.003

Effects of Sanbu Decoction on cognitive function and lipid peroxidation damage in naturally aging mice

WANG Xiaojun^{1,2}, WANG Zhixian^{1,2}, ZHANG Wenjiang³, YI Jian^{1,2}, CHEN Bowei^{1,2}, SHENG Wang^{1,2},

LI Yuxiang^{1,2}, LIU Baiyan^{4*}, WANG Xingkuan^{1,2}

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China; 4. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006

[Abstract] **Objective** To observe the effects of Sanbu Decoction (SBD) on the cognitive function of naturally aging mice, and

[收稿日期] 2023-08-27

[基金项目] 长沙市自然科学基金项目(kq2202456); 湖南中医药大学校级课题(2019XJJ041, 2022CX143, 2022CX31)。

[通信作者] * 刘柏炎, 男, 博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: liubaiyan@126.com。

to explore the involved potential pathological factors, as well as the action of SBD and its possible mechanism. **Methods** Eighteen healthy SPF wild-type C57BL/6 naturally aging mice, half female and half male, aged 18 months, were randomized into aging group (WT-Aged), donepezil group (WT-Donepezil), SBD group (WT-SBD), and another six mice aged three months were selected as the young control group (WT-Young). WT-Young group was not treated. WT-Aged group were treated with distilled water, and the rest groups with corresponding drugs, by gavage for 45 days. During the six days before the end of gavage, Morris water maze test was performed, and the escape latency, platform crossing times, and the swimming distance in the platform quadrant were recorded. HE staining was carried out to observe the morphologic changes of hippocampal neurons of the mice. Immunohistochemistry was applied to measuring the expression levels of Tau, p-Tau, glial fibrillary acidic protein (GFAP), and neuroepithelial stem cell protein (Nestin) in the hippocampal tissue of the mice. The detection kits were used to check the activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) and the content of malondialdehyde (MDA). **Results** Compared with WT-Young group, the escape latency of WT-Aged group was prolonged from the 2nd day ($P<0.05$), and the platform crossing times and the swimming distance in the platform quadrant were reduced ($P<0.05$); compared with WT-Aged group, the escape latency of WT-Donepezil group on the 3rd to 5th day and WT-SBD group on the 4th to 5th day was shortened ($P<0.05$), and platform crossing times and the swimming distance in the platform quadrant were increased ($P<0.05$). The hippocampal neurons in WT-Aged group showed disordered arrangement and large areas of necrosis, enhanced acidophilia in the cytoplasm, and pyknosis, dissolution, and disappearance of the nuclei. Compared with WT-Aged group, the hippocampal neurons in WT-Donepezil and WT-SBD groups showed reduced damage and compact arrangement, and the degenerated and pyknotic cells were significantly decreased, with a small minority showing karyopyknosis and cytoplasmic acidophilic change. Compared with WT-Young group, the expressions of Tau, p-Tau, and GFAP in WT-Aged group increased ($P<0.05$), the expression of Nestin and the activity of SOD and GSH-Px decreased ($P<0.05$), and the content of MDA was elevated ($P<0.05$); compared with WT-Aged group, the expressions of p-Tau and GFAP decreased in WT-Donepezil and WT-SBD groups ($P<0.05$), and the activity of SOD and GSH-Px in WT-SBD group increased ($P<0.05$) while the content of MDA was lowered ($P<0.05$). **Conclusion** SBD can reduce the expression of p-Tau in the hippocampus of naturally aging mice, weaken the activation level of astrocytes, and reduce lipid peroxidation, which can improve the learning and memory abilities of senile mice, alleviate their aging state, and delay the aging process, thus playing the roles of brain protection and anti-aging.

[**Keywords**] natural aging; cognitive function; lipid peroxidation damage; Sanbu Decoction; Gouqizi (Lycii Fructus); Huangqi (Astragali Radix); Fuling (Poria)

衰老是多因素影响下机体各组织器官形态和功能退变的复杂生物学过程,脑是受衰老影响最大的器官之一^[1-2]。脑的衰老会破坏神经网络原有平衡,引起注意力不集中、学习和记忆功能下降、决策力和理解力受损等一系列认知功能障碍。如任其不管,病情可能会进展为阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD),严重时可能会失去语言和认知能力,人格和行为发生改变^[3-5],对社会、家庭和个人都伤害极大,也会成为严重的医疗卫生和社会问题^[6-7]。

氧化应激脂质过氧化反应是脑衰老认知障碍的重要病理改变。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)能够阻断脂质过氧化链反应,是机体细胞抵御 ROS 损害的第一道防线^[8]。谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)能够催化过氧化氢分解,减少氧自由基产生,特异性地降低脂质过氧化,从而提高机体的抗氧化能力。SOD 和 GSH-Px 既能够通过协同加强,清除机体内的自由基,又能减轻机体自由基损伤,还可以协同降低丙二醛(malondi-

aldehyde, MDA)含量,共同减轻脂质过氧化程度^[9-10]。

由于脑衰老进展不可逆性及治疗效果不佳,如果能够早期防治,将延缓该病的发生发展。中医药在延缓衰老方面具有不可替代的优势,此外,中医药还有毒副作用小、作用靶点多的优势,因此,中医药延缓衰老的作用越来越受到重视。

早期临床观察发现,三补方(中药组方枸杞子、黄芪、茯苓)有较好疗效,能够显著改善脑衰老患者记忆能力,提高生活质量^[11]。然而,三补方改善认知功能障碍的作用机制尚未可知。因此,本研究采用自然衰老小鼠模拟衰老认知功能障碍模型,探索三补方的认知改善作用,并研究其可能的作用机制,以期三补方的进一步研发应用奠定基础。

1 材料

1.1 实验动物

健康 SPF 级野生型 C57BL/6 小鼠 24 只,雌雄各半,从南京大学生物模式中心引入,动物许可证号

为 SCXK(苏)2015-0001。课题组自行繁殖后自行鉴定饲养,青年小鼠 3 月龄,体质量为(24±3) g,老年小鼠 18 月龄,体质量为(35±5) g。饲养环境温度(22±2) °C,相对湿度 50%,自由饮食进水,昼夜光照 12 h 节律交替。小鼠的饲养、手术及取材均严格遵守湖南中医药大学第一附属医院实验动物科学与管理的相关规定。本实验所有的实验方案和操作流程遵守动物福利、动物伦理(伦理审查编号:ZYFY20190417-09)及动物保护等相关原则和规定。

1.2 主要药品、试剂及仪器

三补方(由枸杞子 15 g、黄芪 15 g、茯苓 10 g 组成,购自湖南中医药大学第一附属医院药剂科,药材均符合《中华人民共和国药典》标准(药材鉴定人为湖南中医药大学第一附属医院制剂中心药检室张裕民主任药师);盐酸多奈哌齐[卫材(中国)药业有限公司,批准文号:国药准字 H20050978,批号:1705078];Rabbit monoclonal(EPR2605) to Tau(phospho S404)(英国 Abcam 公司,货号:ab92676);monoclonal(E178) to Tau(英国 Abcam 公司,货号:ab32057);Anti-GFAP Antibody(美国 Proteintech 公司,货号:16825-1-AP);Anti-Nestin Antibody(美国 Proteintech 公司,货号:19483-1-AP)。SOD 试剂盒/羟胺法(测总)(货号:A001-1-1)、MDA 试剂盒(货号:A003-1-2)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)(货号:A005-1-1)均购自南京建成生物工程研究所。Morris 水迷宫测试系统(中国成都泰盟软件有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、给药和处理

普通饲料饲养动物至 18 月龄后开始灌胃。将小鼠分为衰老组(WT-Aged),多奈哌齐组(WT-Donepezil),三补方组(WT-SBD),另取 3 月龄小鼠为青年对照组(WT-Young),每组 6 只小鼠,分别做如下处理。WT-Young:普通饲料饲养至 3 月龄,不灌胃。WT-Aged:普通饲料饲养至 18 月龄,灌胃等体积蒸馏水。WT-Donepezil:普通饲料饲养至 18 月龄,灌胃盐酸多奈哌齐水溶液。WT-SBD:普通饲料饲养至 18 月龄,灌胃三补方汤药。按 60 kg 成人与动物体质量药量折算表换算,即小鼠按 10 mL/(kg·d)剂量进行灌胃,给药剂量根据小鼠每日剂量(g)=成人每日剂量(g)×小鼠体质量与体表面积比值/人体质量与

体表面积比值计算。WT-SBD 给予 5.19 g/(kg·d)制备好的汤药灌胃给药,WT-Donepezil 按 0.65 mg/(kg·d)剂量给予盐酸多奈哌齐溶液灌胃。每日灌胃 1 次,连续灌胃 45 d。本实验死亡小鼠 1 只(为 WT-Aged 小鼠),解剖发现巨脾和腹水,可能是小鼠死亡的原因。死亡的小鼠从同品系同月龄小鼠中按随机数字表法随机抽取,进行补充,对整体实验结果无影响。

灌胃结束前 6 日开始行水迷宫实验,水迷宫测试结束后处死小鼠取材。采用摘眼球取血法取血后,快速用剪刀剪下小鼠头部,置于冰冻台上,低温降低脑内蛋白酶活性。取右半脑的皮质与海马部分装入标记好的 EP 管内,立刻投入液氮速冻,最终转移至-80 °C 保存,待 ELISA 检测。左半脑组织进行固定后,浸入 4%多聚甲醛过夜,再取出行脱水处理,用于 HE 染色和免疫组织化学法(Immunohistochemistry, IHC)检测。

2.2 检测指标

2.2.1 行为学检测 运用经典 Morris 水迷宫实验^[12]来检测小鼠对空间方向和位置的学习记忆能力。

水迷宫实验圆筒直径为 120 cm,高为 50 cm,将圆筒等分为 4 个象限并设置 4 个入水点,在其中一个象限中固定一个直径为 10 cm 的透明平台,平台顶端平面位于圆形水池液面以下 1 cm。每日随机选择入水点顺序,测试环境及平台位置保持不变。圆筒内的水需要用二氧化钛[食品添加剂二氧化钛(浆料型)]染成乳白色,用棍棒搅混至水变成乳白色掩盖平台。水池水温控制在(22±1) °C,以减少来自水温的干扰。实验连续进行,5 d 训练,1 d 测试,共 6 d。

水迷宫实验包括适应性训练、定位航行、空间探索实验。正式实验开始前 1 日进行适应性训练,将小鼠放置在平台上适应 15 s,然后把小鼠均依次放于水迷宫中自由游泳 60 s,剔除游泳技能不好甚至不会游泳的小鼠。然后进行为期 5 d 的定位航行实验,将小鼠快速放入水池。每只小鼠每日每个象限训练 1 次,每日共 4 次,训练历时 5 d。在 60 s 内找到平台后停留 10 s,若未找到平台,则用网兜引导小鼠至平台停留 10 s。记录小鼠第 1 次找到平台的时间。

定位航行实验结束后将平台撤除,开始进行空间探索实验。依次将小鼠分别从原平台所在对侧象限放入水中,记录 60 s 内小鼠逃逸潜伏期、穿越平

台位置的次数、游行原平台所在区域时间、小鼠的游泳速度、运动轨迹、各象限停留时间和路程等参数。实验中选用 60 s 内穿越原平台位置的次数、在原平台象限内停留的路程和轨迹为评估指标。

2.2.2 HE 染色 每组选小鼠左侧脑半球,用 4%多聚甲醛在 4 °C 固定 24 h 后进行石蜡包埋,分离海马组织,制作石蜡切片(5 μm 厚)。切片经二甲苯脱蜡和梯度乙醇水合后,对切片进行 HE 染色,再封片待显微镜观察。

2.2.3 小鼠脑组织 IHC 染色 每组选小鼠左侧脑半球,用 4%多聚甲醛在 4 °C 固定 24 h 后进行石蜡包埋,分离海马组织,制作石蜡切片(5 μm 厚)。先将切片脱蜡至水,再进行热修复抗原;待热修复抗原完成后,进一步灭活内源性酶。分别孵育一抗、二抗,再行 DAB 显色;再用苏木精复染并各级乙醇脱水,上述步骤完成后,取出后置于二甲苯中 10 min,两次,再用中性树胶封片、显微镜观察。

2.2.4 ELISA 试剂盒检测 SOD、GSH-Px、MDA 取冻存小鼠脑组织匀浆,于 2~8 °C 5 000 $\times g$ 离心 5 min,取上清液进行实验,或将上清分装保存于-20 °C 或-80 °C,解冻后的样本应再次离心,然后检测,避免反复冻融。按照试剂盒说明书进行各试剂配制,脑组织样本按照 SOD、GSH-Px、MDA 不同指标的说明书进行操作,操作完成后读取并记录数据。

2.3 数据处理和统计学分析

所有数据均用 SPSS 23.0 统计软件进行处理分析,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,GraphPad Prism 6.0 作

图软件作图。多组比较用单因素方差分析,两两比较方差齐者用 LSD 法,方差不齐者用 Games Howell 法。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。采像为普通的点采像,倍数为 40 \times 40 倍和 10 \times 10 倍,图像分析软件为 IPP(Image-Pro-Plus)。

3 结果

3.1 动物一般情况

青年小鼠灰黑色毛发顺滑亮泽,腹肌紧收,摄食饮水正常、日常行为及反应较为敏捷,精神状态良好。老年小鼠毛发比青年小鼠粗糙、发灰、枯燥,甚至有脱毛现象,部分倦怠慵懒、反应迟钝,部分易激怒,精神状态较青年小鼠差,药物灌胃治疗后均有所改善。

3.2 水迷宫实验

3.2.1 定位航行实验 与 WT-Young 小鼠相比,WT-Aged 小鼠花费更多的时间搜索平台,各组小鼠主要围绕水池边缘探索式游泳,找到水中隐匿平台后,小鼠慢慢学会会有意识寻找平台,出现直驱式搜索情况;与 WT-Young 相比,第 2 日起 WT-Aged 逃逸潜伏期延长($P<0.05$);第 3~5 日,与 WT-Aged 小鼠相比,WT-Donepezil 小鼠逃逸潜伏期缩短($P<0.05$),第 4~5 日,WT-SDB 小鼠逃逸潜伏期缩短($P<0.05$)。详见图 1。

3.2.2 空间探索实验 与 WT-Young 小鼠相比,WT-Aged 小鼠穿越平台次数和在平台所在象限经过的路程减少($P<0.05$);与 WT-Aged 小鼠相比,WT-

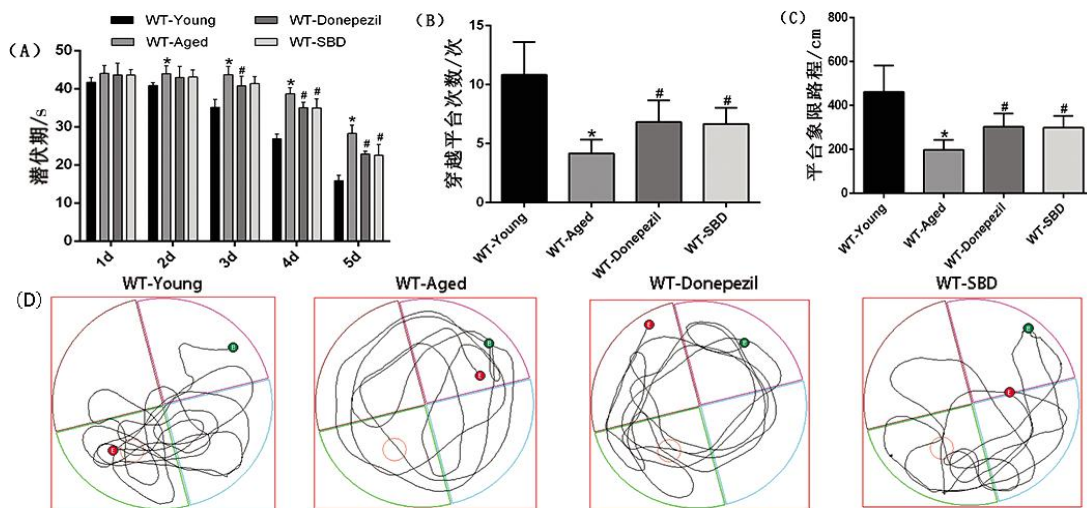


图 1 水迷宫实验检测自然衰老小鼠的空间学习记忆能力($\bar{x}\pm s, n=6$)

注:(A)小鼠的潜伏期实验;(B)小鼠穿越平台次数;(C)小鼠在平台象限的游泳路程;(D)小鼠典型运动轨迹图。与 WT-Young 比较,* $P<0.05$;与 WT-Aged 相比,* $P<0.05$ 。

Donepezil 和 WT-SDB 小鼠穿越平台次数和在平台所在象限经过的路程增多($P<0.05$)。详见图 1。

3.3 三补方对自然衰老小鼠海马神经元结构的影响

WT-Young 小鼠 CA1 区海马神经元多达 3~4 层,排列紧密有序,细胞核和细胞浆清晰可见。与 WT-Young 小鼠相比,WT-Aged 小鼠海马神经元排列紊乱,海马 CA1 区出现大面积的神经元坏死,细胞质嗜酸性增强,细胞核固缩、溶解、消失。与 WT-Aged 小鼠相比,WT-Donepezil 和 WT-SDB 小鼠神经元损伤减少,排列较为紧密,退化固缩的细胞数量则明显减少,少部分细胞可见核固缩及细胞浆嗜酸性变。详见图 2。

3.4 三补方对自然衰老小鼠脑内海马神经元 Tau 蛋白和 p-Tau 蛋白的影响

与 WT-Young 小鼠相比,WT-Aged 小鼠 Tau 蛋

白表达增多($P<0.05$);与 WT-Aged 小鼠相比,WT-Donepezil 和 WT-SDB 小鼠 Tau 蛋白表达减少,差异无统计学意义($P>0.05$)。与 WT-Young 小鼠相比,WT-Aged 小鼠 p-Tau 蛋白表达增多($P<0.05$);与 WT-Aged 小鼠相比,WT-Donepezil 和 WT-SDB 小鼠 p-Tau 蛋白表达减少($P<0.05$)。详见图 3。

3.5 三补方对自然衰老小鼠脑内 GFAP、Nestin 的影响

与 WT-Young 小鼠相比,WT-Aged 小鼠 GFAP 表达升高($P<0.05$);与 WT-Aged 小鼠相比,WT-Donepezil 和 WT-SDB 小鼠 GFAP 表达降低($P<0.05$)。与 WT-Young 小鼠相比,WT-Aged 小鼠 Nestin 表达减少($P<0.05$);与 WT-Aged 小鼠相比,WT-Donepezil 和 WT-SDB 小鼠 Nestin 蛋白表达增高,差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 4。

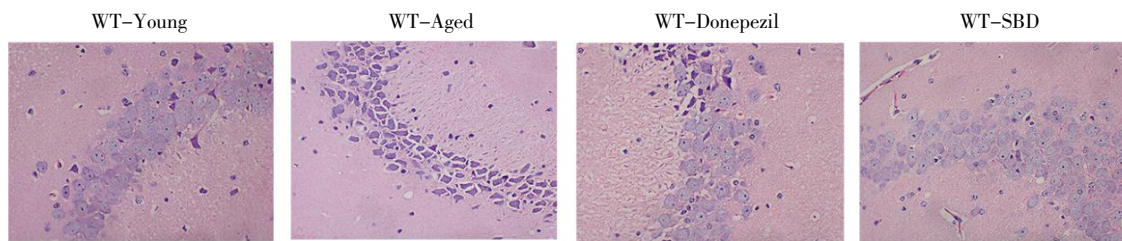


图 2 HE 染色观察三补方对自然衰老小鼠脑内海马 CA1 区形态的影响($\times 400$)

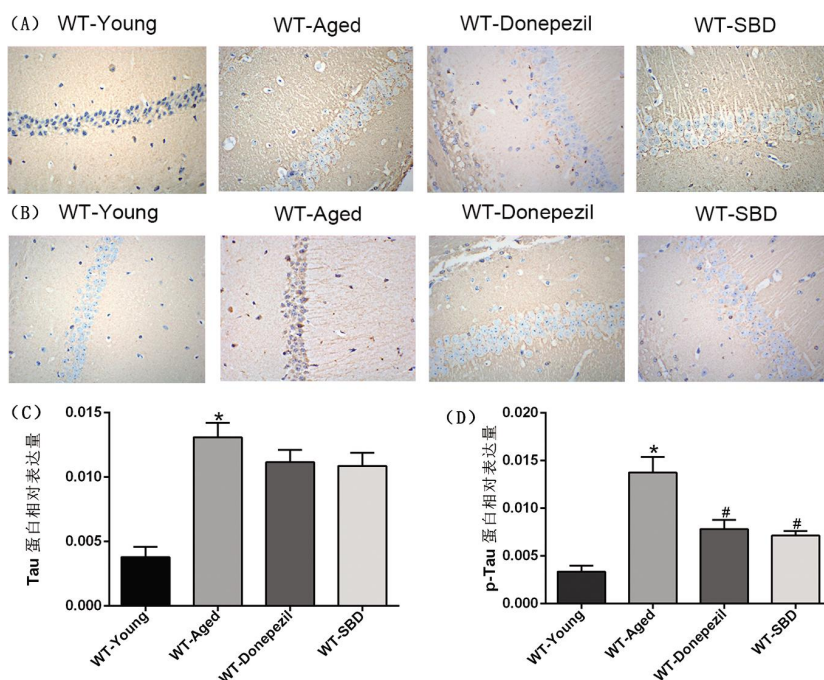


图 3 IHC 观察自然衰老小鼠脑内海马 CA1 区 Tau 蛋白和 p-Tau 蛋白的表达情况($\bar{x}\pm s, n=6, \times 400$)

注:(A)小鼠海马区 Tau 蛋白表达情况;(B)小鼠海马区 p-Tau 蛋白表达情况;(C)小鼠海马区 Tau 蛋白相对表达量;(D)小鼠海马区 p-Tau 蛋白相对表达量。阳性染色为黄色或棕黄色,可深至褐色。与 WT-Young 比较,* $P<0.05$;与 WT-Aged 相比,# $P<0.05$ 。

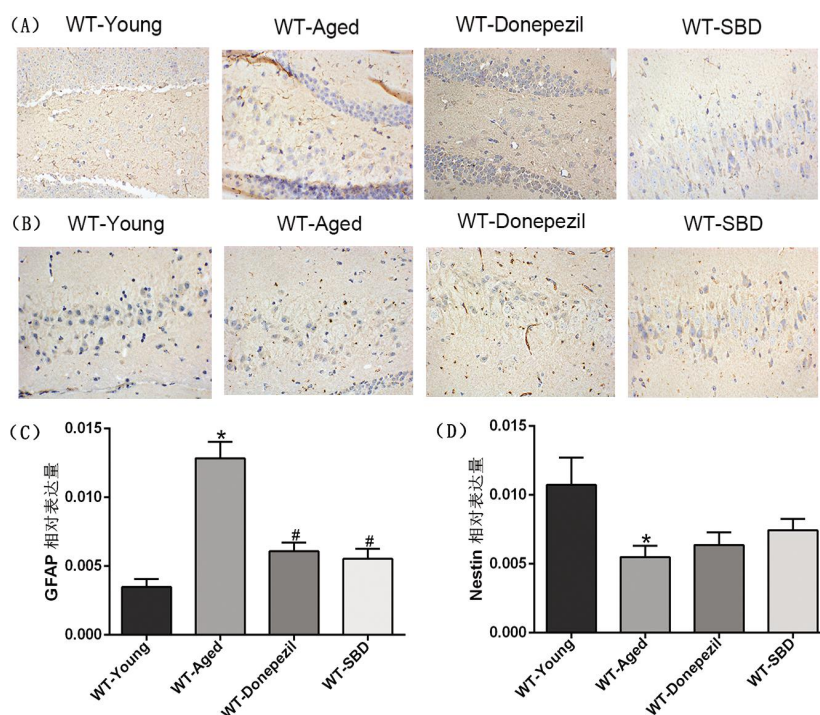


图4 IHC观察自然衰老小鼠脑部海马DG区GFAP蛋白和Nestin蛋白的表达情况($\bar{x}\pm s, n=6, \times 400$)
注:(A)小鼠海马区GFAP蛋白表达情况;(B)小鼠海马区Nestin蛋白表达情况;(C)小鼠海马区GFAP蛋白AOD值;(D)小鼠海马区Nestin蛋白AOD值。与WT-Young比较,* $P<0.05$;与WT-Aged相比,# $P<0.05$ 。

3.6 三补方对自然衰老小鼠脑组织脂质过氧化损伤的影响

与WT-Young小鼠相比,WT-Aged小鼠SOD、GSH-Px活性降低,MDA含量升高($P<0.05$)。与WT-Aged小鼠相比,WT-SBD小鼠SOD、GSH-Px活性升高($P<0.05$),MDA含量降低($P<0.05$)。详见图5。

4 讨论

中医学无脑衰老病名,根据临床特点,脑衰老可归属于“健忘”“呆病”“失神”等疾病范畴,属于老年人高发疾病。本课题组基于前期研究^[11]认为,脑衰老总属肾精亏损、肺气虚衰、脾运失健三者交杂以致损及髓海、伤及清窍、蒙于元神而发病,据此提出“滋肾精、补肺气、健脾运”之法用于健脑抗衰,创治三补

方有较好临床疗效。方中枸杞子能滋补肝肾、益智安神,《本草汇言·卷十》言枸杞子“有十全之妙用”而能达“壮精益神,神满精足”之功,故为方中君药。黄芪为“补气诸药之最”,为臣药,《本草纲目·黄耆》云:“黄芪甘温纯阳,其用有五:补诸虚不足,一也;益元气,二也;壮脾胃,三也;去肌热,四也;排脓止痛,活血生血,内托阴疽,为疮家圣药,五也。”茯苓可健运中焦,能助君药入肾补益真元,又助饮食水谷精微滋先天以生脑髓,并可将髓海之痰浊引而下行,脑窍得以清明,故为佐药。三药合用,脾化健运,肺气固密,肾精充盛,精血充旺,既可培补先天,又能滋养后天,使髓海充足,则脑实神全。现代研究表明,氧化应激脂质过氧化反应是脑衰老的重要致病因素,机体随着年龄增长,抗脂质过氧化能力下降,容易造成

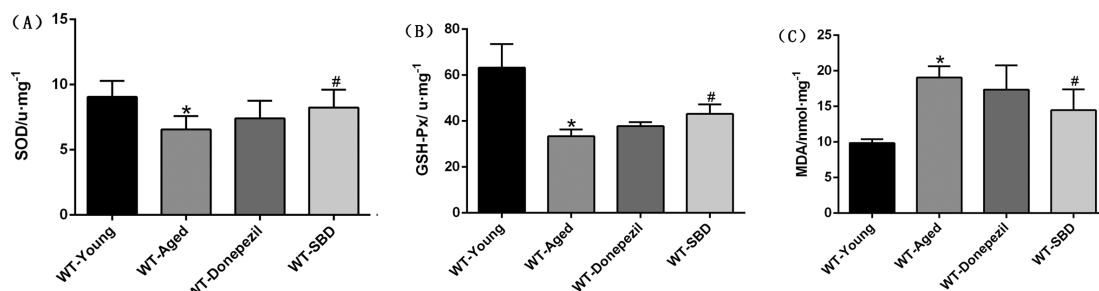


图5 ELISA检测自然衰老小鼠脑部海马区脂质过氧化水平($\bar{x}\pm s, n=6$)

注:(A)小鼠脑部海马区SOD活性水平;(B)小鼠脑部海马区GSH-Px活性水平;(C)小鼠脑部海马区MDA含量。与WT-Young比较,* $P<0.05$;与WT-Aged相比,# $P<0.05$ 。

蛋白质、脂质、核酸积累以及细胞凋亡,从而加速脑组织衰老,导致学习和记忆能力减退^[13-14]。黄芪^[15-17]、枸杞子^[18]、茯苓^[19-20]具有抗衰老、抗氧化等生物活性作用,可以提高血清中SOD活性,降低MDA含量,增强小鼠的空间学习记忆能力。

p-Tau形成的细胞内神经纤维缠结(neurofibrillary tangle,NET)是衰老认知障碍的主要病理标志物之一。Tau蛋白的生物活性主要由其磷酸化程度来调控,过度磷酸化的Tau蛋白稳定性降低,与微管的结合能力下降,并从微管上解离下来,聚集成成对的螺旋纤维丝状结构,沉积聚集在神经细胞的微丝中形成NET,加剧氧化应激反应,触发神经元凋亡增加,导致AD等神经变性疾病的发生。星形胶质细胞在神经系统病理过程及神经元保护中都具有非常重要的作用。GFAP是星形胶质细胞的特异性表达标志物。随着机体衰老及伴随的中枢神经系统老化过程中,神经胶质细胞反应性增生,GFAP活性增强,对氧化应激损伤也非常敏感。Nestin的表达与神经干细胞的增殖和分化密切相关,常被用作神经干细胞的标记蛋白,是神经干细胞或祖细胞的标志物,其活化可能是对神经系统创伤或炎症的一种反应,可能影响神经元和其他细胞类型。随着机体衰老及伴随的中枢神经系统老化,神经胶质细胞反应性增生,GFAP活性增强,对氧化应激损伤也非常敏感。神经干细胞可能在神经系统修复和再生中发挥作用,但其功能可能受到各种因素的调控,Nestin的表

达与神经干细胞的增殖和分化密切相关,常被用作神经干细胞的标记蛋白,是神经干细胞或祖细胞的标志物^[21]。

本研究结果说明自然衰老模型小鼠存在认知功能减退,由黄芪、枸杞子、茯苓组方而成的SBD可以显著改善认知障碍小鼠受损的学习记忆能力。HE和IHC结果表明,SBD治疗还可以减少脑组织p-Tau表达,降低GFAP的活性,减少衰老相关蛋白对脑组织的损害作用,从而发挥保护老年小鼠的学习记忆能力。SBD提高了SOD和GSH-Px活性,降低了MDA含量,体现了SBD在衰老小鼠脑内的抗氧化应激作用。

三补方对自然衰老小鼠认知功能及脂质过氧化损伤的影响机制流程详见图6。

5 结论

随着人口老龄化程度的加剧,衰老及其带来的机体改变引起广泛关注。其中,脑衰老引起的认知功能障碍会为患者及其家庭带来极大的负担。因此,及早预防、及早治疗、延缓病程进展具有重大意义。三补方为临床验方,能通过降低自然衰老小鼠脑海马组织p-Tau表达,减弱星形胶质细胞活化水平,抑制与脑衰老认知障碍的重要病理环节——脂质过氧化反应,改善小鼠认知功能,延缓衰老进程,发挥脑保护作用,可为临证诊治脑衰老认知功能障碍提供一定的中医药治疗思路。

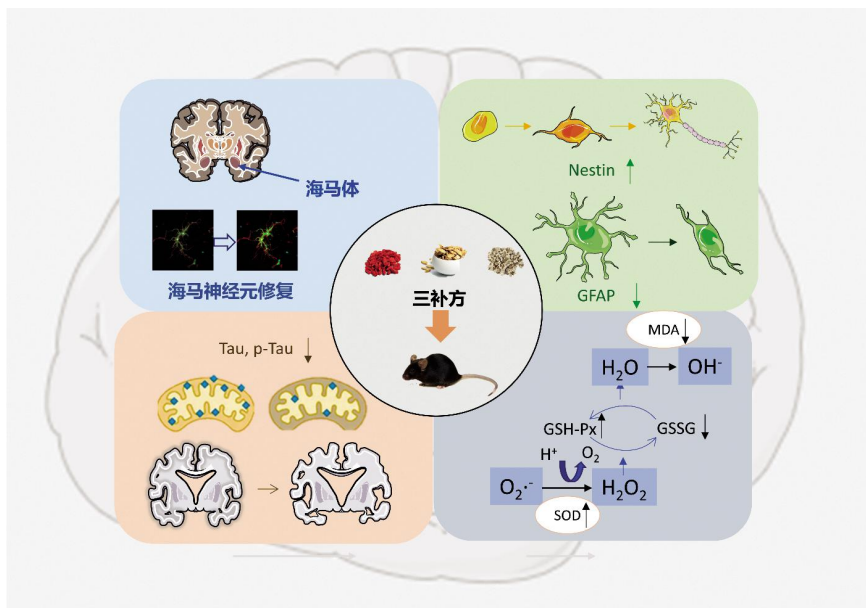


图6 三补方对自然衰老小鼠认知功能及脂质过氧化损伤的影响机制流程图

参考文献

- [1] 李雪, 孙君志, 金毓, 等. 运动干预脑衰老: 新进展与再认识[J]. 科技导报, 2022, 40(10): 49-59.
- [2] 王沐晨, 单思, 高鹏, 等. 基于肠道菌群探讨中医药抗衰老作用的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(2): 718-721.
- [3] MARTINS R N, VILLEMAGNE V, SOHRABI H R, et al. Alzheimer's disease: A journey from amyloid peptides and oxidative stress, to biomarker technologies and disease prevention strategies—gains from AIBL and DIAN cohort studies[J]. Journal of Alzheimer's Disease, 2018, 62(3): 965-992.
- [4] CHIN-CHAN M, NAVARRO-YEPES J, QUINTANILLA-VEGA B. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases[J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2015, 9: 124.
- [5] 杜正彩, 胡润华, 李瑞林, 等. 治疗阿尔茨海默病中药化学成分及机制的研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(5): 236-245.
- [6] BUTTERFIELD D A, BOYD-KIMBALL D. Oxidative stress, amyloid- β peptide, and altered key molecular pathways in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease[J]. Journal of Alzheimer's Disease, 2018, 62(3): 1345-1367.
- [7] 商晓康, 张思萌, 倪军军. 组织蛋白酶 B 参与脑衰老及阿尔兹海默症发生发展研究进展[J]. 遗传, 2023, 45(3): 212-220.
- [8] BALENDRA V, SINGH S K. Therapeutic potential of astaxanthin and superoxide dismutase in Alzheimer's disease[J]. Open Biology, 2021, 11(6): 210013.
- [9] WANG W Z, YIN J, MA X P, et al. Inhibition of mitochondrial fragmentation protects against Alzheimer's disease in rodent model[J]. Human Molecular Genetics, 2017, 26(21): 4118-4131.
- [10] 曹玉成, 王哲, 宋炜熙. 补肾填髓方对阿尔兹海默病模型大鼠学习记忆能力及线粒体氧化应激的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(4): 459-464.
- [11] 王小菊, 朴美虹, 王智贤, 等. 三补方治疗遗忘型轻度认知功能障碍脾肾两虚证的临床观察[J]. 中医药导报, 2021, 27(10): 80-84.
- [12] BÉLANGER M, ALLAMAN I, MAGISTRETTI P J. Brain energy metabolism: Focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation[J]. Cell Metabolism, 2011, 14(6): 724-738.
- [13] CUI Z F, ZHAO X T, AMEVOR F K, et al. Therapeutic application of quercetin in aging-related diseases: SIRT1 as a potential mechanism[J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 943321.
- [14] MICHEL M, BENITEZ-BUELGA C, CALVO P A, et al. Small-molecule activation of OGG1 increases oxidative DNA damage repair by Gaining a new function[J]. Science, 2022, 376(6600): 1471-1476.
- [15] 傅晓燕, 雷珊珊, 李雄英. 黄芪配方颗粒对衰老大鼠认知功能的影响及机制初探[J]. 中药材, 2017, 40(5): 1184-1189.
- [16] 奚佳玉, 苏圆锦, 赵鲲鹏, 等. 黄芪药食同源的研究进展[J]. 华西药理学杂志, 2023, 38(6): 718-724.
- [17] 杨淑惠, 王雨萌, 尹佳婷, 等. 基于不同模式生物评价黄芪的抗衰老作用[J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39(9): 827-838.
- [18] 叶红霞, 齐妍强, 贺颖西, 等. 肉苁蓉总苷与枸杞多糖配伍对不同月龄 C57BL/6J 小鼠促智作用的研究[J]. 中药材, 2023, 46(1): 217-221.
- [19] 冯敏, 郑自明, 万鸣, 等. 茯苓改善小鼠学习记忆功能作用的研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(19): 13-18.
- [20] 梁亦龙, 曾垂省, 王允, 等. 茯苓多糖的抗氧化作用[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(7): 288-289.
- [21] CHATTERJEE P, PEDRINI S, ASHTON N J, et al. Diagnostic and prognostic plasma biomarkers for preclinical Alzheimer's disease[J]. Alzheimer's & Dementia, 2022, 18(6): 1141-1154.

(本文编辑 贺慧斌)