

本文引用:曹颖颖,张绍兰,杨楠,李青,李红,王雪佼.补肾益志方通过 $\beta$ 淀粉样蛋白和tau蛋白调节大鼠阿尔茨海默病的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2022,42(8):1271-1276.

## 补肾益志方通过 $\beta$ 淀粉样蛋白和tau蛋白调节 大鼠阿尔茨海默病的实验研究

曹颖颖,张绍兰,杨楠,李青,李红,王雪佼\*  
(昆明市中医医院,云南昆明 650011)

**[摘要]** **目的** 观察补肾益志方对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)大鼠模型的作用及其对 $\beta$ 淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ )和tau蛋白的影响。**方法** 通过A $\beta$ 25-35建立AD大鼠模型,给予补肾益志方(13.00、6.50、3.25 g/kg)、多奈哌齐治疗,设为假手术组、模型组、补肾益志方低剂量组、补肾益志方中剂量组、补肾益志方高剂量组、阳性组。Morris水迷宫实验检测大鼠的逃避潜伏期、目标象限游泳时间、游泳总路程及自主活动时间;HE染色法观察大鼠海马组织的病理变化;ELISA法、Western blot法检测海马组织中A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、磷酸化tau蛋白(p-tau)的含量及蛋白表达。**结果** 与假手术组相比,模型组逃避潜伏期、目标象限游泳时间、游泳总路程和自主活动时间均显著升高( $P<0.05$ );与模型组相比,补肾益志方低、中、高剂量组逃避潜伏期、目标象限游泳时间、游泳总路程和自主活动时间均显著降低( $P<0.05$ )。模型组海马损伤最严重,补肾益志方低、中、高剂量组海马均有明显好转,补肾益志方高剂量组海马与假手术组最接近。模型组海马中A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau的含量和蛋白表达均显著高于假手术组( $P<0.05$ ),补肾益志方低、中、高剂量组海马A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau的含量和蛋白表达均显著低于模型组( $P<0.05$ )。**结论** 补肾益志方可改善AD大鼠的学习记忆能力,其机制与抑制A $\beta$ 和tau蛋白有关。

**[关键词]** 补肾益志方;阿尔茨海默病; $\beta$ 淀粉样蛋白;tau蛋白;学习记忆能力;海马;Morris水迷宫实验

**[中图分类号]**R285.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.08.008

### Experimental study of Bushen Yizhi Recipe regulating Alzheimer's disease in rats through $\beta$ -amyloid and tau proteins

CAO Yingying, ZHANG Shaolan, YANG Nan, LI Qing, LI Hong, WANG Xuejiao\*

(Kunming Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming, Yunnan 650011, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effect of Bushen Yizhi Recipe on Alzheimer's disease (AD) rat model and its effect on  $\beta$ -amyloid protein (A $\beta$ ) and tau protein. **Methods** AD rat model was established by A $\beta$ 25-35, and treated with Bushen Yizhi Recipe (13.00, 6.50, 3.25 g/kg) and Donepezil. Sham operation group, model group, Bushen Yizhi Recipe low-dose group, Bushen Yizhi Recipe medium-dose group, Bushen Yizhi Recipe high-dose group and positive group were set up in the experiment. Morris water maze experiment was used to detect the escape latency, target quadrant swimming time, total swimming distance and free activity time of rats. The pathological changes of rat hippocampal tissue were observed by HE staining. The content and protein expression of A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 and phosphorylated tau (p-tau) in hippocampal tissue were detected by ELISA and Western blot. **Results**

**[收稿日期]**2021-11-16

**[基金项目]**云南省应用基础研究计划项目[2015FB205(-041)]。

**[第一作者]**曹颖颖,男,硕士,副主任医师,研究方向:老年病中医、中西医结合诊治。

**[通信作者]**\*王雪佼,女,硕士,主治医师,E-mail:pymqsjoyun@21cn.com。

Compared with the sham operation group, the escape latency, target quadrant swimming time, total swimming distance and free activity time of the model group were significantly increased ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the escape latency, target quadrant swimming time, total swimming distance and free activity time of rats in the Bushen Yizhi Recipe low-dose, medium-dose, high-dose groups were significantly reduced ( $P<0.05$ ). The hippocampal injury of rats in the model group was the most serious, the hippocampal injury of rats was significantly improved in Bushen Yizhi Recipe low-dose, medium-dose, high-dose groups, and the hippocampal injury of rats in the Bushen Yizhi Recipe high-dose group was the closest to that in the sham operation group. The content and protein expression of A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, p-tau were significantly higher than those in the sham operation group ( $P<0.05$ ). The content and protein expression of A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, p-tau were significantly lower than those in the model group in Bushen Yizhi Recipe low-dose, medium-dose, high-dose groups ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Bushen Yizhi Recipe can improve the learning and memory ability of AD rats, and its mechanism may be related to the inhibition of A $\beta$  and tau proteins.

[**Keywords**] Bushen Yizhi Recipe; Alzheimer's disease;  $\beta$ -amyloid protein; tau protein; learning and memory ability; hippocampus; morris water maze experiment

认知障碍(cognitive impairment, CI)是指记忆、语言、视觉空间、行动、理解和判断等功能中的一个或多个方面存在障碍<sup>[1-2]</sup>。60%以上的CI患有阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)<sup>[3]</sup>。随着中国人口步入老龄化,AD患者日益增多,但目前尚缺乏有效的治疗方法。大量临床研究证实,中药可以改善AD患者的认知功能、情感状态,延缓 $\beta$ 淀粉样蛋白( $\beta$ -amyloid protein, A $\beta$ )和tau蛋白的病变,调节胆碱能神经递质的代谢,提高患者的生活质量<sup>[4-6]</sup>。云南省名中医李青主任医师继承了明清以来医家对“痴呆”的认识,结合自身临床经验,提出了“痴呆从肾虚血瘀论治”的学术思想,认为老年人肾中精气亏虚、脑髓失充,同时又因年老体衰、正气不足、血运无力而致气血痰瘀互结,上犯颠顶,蒙蔽清窍,导致头脑灵性渐失,而成本病<sup>[7-8]</sup>。本病病位在脑,病性为本虚标实、虚实夹杂,病理机制以肾气亏虚、肾精不足为本,以瘀血阻络、痰浊蒙窍为标,而益气补肾、活血益志为本病的基本治疗原则<sup>[9]</sup>。补肾益志方理论上有助于本病的治疗,但是其发挥作用的机制尚不清楚。在长期的临床实践中,补肾益志方对AD的认知功能改善的疗效得到很多患者的认可,但是其发挥治疗作用的具体作用机制尚有待进一步确定。本研究旨在探索补肾益志方对AD大鼠认知功能的影响及其与A $\beta$ 、tau蛋白之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物 60只12月龄SPF级SD雌性大

鼠,体质量230~280g,购自北京维通利华实验动物中心,许可证号:SCXK(京)2020-0035。

1.1.2 主要药物、试剂与仪器 补肾益志方(何首乌15g,黄精15g,黄芪30g,山茱萸15g,熟地黄15g,五味子15g,当归15g,丹参15g,赤芍15g)由本院制剂室提供。盐酸多奈哌齐片(重庆植恩药业有限公司,国药准字:H20010723,批号:HD008003,规格:5mg $\times$ 7片);A $\beta$ 25-35(美国Sigma公司,货号:131602-53-4);HE染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:C0105S);A $\beta$ 40检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,货号:ml003106);A $\beta$ 42检测试剂盒(上海恒远生物科技有限公司,货号:H-11672);p-tau蛋白ELISA试剂盒(上海江莱生物技术有限公司,货号:JL46213-96T);兔抗A $\beta$ 40多克隆抗体(货号:tcea11340)、HRP标记的二抗(货号:C0151)均购自美国Cell Signaling Technology公司;兔抗A $\beta$ 42多克隆抗体(英国Biorbyt公司,货号:orb593224);兔抗p-tau单克隆抗体(美国Invitrogen公司,货号:MN1020)。Morris水迷宫实验系统(武汉一鸿科技公司,型号:YH-WM-M/R);凝胶成像系统(美国BioRad公司,型号:Doc<sup>TM</sup>XR+1708195)。

### 1.2 方法

1.2.1 分组与处理 将所有大鼠足料足水,适应性饲养1周。随机分为6组,每组10只,分别标记为假手术组、模型组、补肾益志方低剂量组、补肾益志方中剂量组、补肾益志方高剂量组、阳性组。除假手术组外,其余大鼠均进行AD模型制造<sup>[10]</sup>。

大鼠AD模型的制造方法:麻醉后的大鼠左右

两侧的侧脑各注射 5  $\mu\text{L}$  的 A $\beta$ 25–35, 留针 3 min。结束后进行消炎, 连续肌内注射青霉素 3 d。进行 Morris 水迷宫实验和自主活动时间监测, 造模组大鼠的逃避潜伏期、目标象限游泳时间、游泳总路程和自主活动时间均明显延长, 则说明建模成功<sup>[1]</sup>。

给药方案: 建模后, 补肾益志方低、中、高剂量组分别采用补肾益志方(13.00、6.50、3.25 g/kg)每日灌胃给药 1 次, 连续 60 d; 阳性组采用多奈哌齐(10 mg/kg)灌胃, 1 d/次, 连续 60 d; 假手术组、模型组均每日灌胃等剂量的生理盐水, 连续 60 d。

戊巴比妥钠麻醉大鼠, 眼眶静脉采血(-20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用), 断颈法处死, 剥离海马组织, 液氮保存或 4% 多聚甲醛溶液浸泡。

1.2.2 Morris 水迷宫实验<sup>[2]</sup> 大鼠末次给药的次日进行学习训练。使用 Morris 水迷宫实验系统对大鼠进行适应性学习, 每天 4 次(间隔至少 20 min), 连续训练 5 d。第 6 日开始记录大鼠的逃避潜伏期、目标象限游泳时间、游泳总路程, 每组大鼠按照同样的方法测试, 并记录成绩, 取平均值。

1.2.3 自主活动时间检测<sup>[3]</sup> 各组大鼠在末次给药后, 用自主活动记录仪监测大鼠 5 min 的自主活动情况。监测的前 5 min 不记录, 为大鼠适应时间。后 5 min 开始记录大鼠的活动时间, 取平均值。自主活动的区域包括中央区、周边区、总区域。自主活动包括大鼠的卫生清理、站立、采食饮水等。

1.2.4 HE 染色观察大鼠海马组织 取出 4% 多聚甲醛固定 24 h 的海马组织, 用浓度梯度的乙醇(30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%) 脱水, 二甲苯作透明剂置换出组织中的乙醇, 再用溶化的石蜡包埋组织块, 待蜡块冷却固定, 用于切片、展片、脱蜡、染色。染色过程按照 HE 染色试剂盒说明书要求操作, 染色后用乙醇脱水, 二甲苯透明, 最后用树脂胶封固切片, 显微镜下观察。

1.2.5 ELISA 法检测大鼠血清中 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 的含量 将采集的新鲜大鼠血浆, 3000 r/min 离心 3 min(离心半径 3 cm), 取血清做样本, 严格按照 ELISA 试剂盒使用说明操作要求操作, 测定血清样本 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 的含量。

1.2.6 Western blot 法检测海马组织 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 蛋白 将无菌研磨的海马组织用 RIPA 裂解

液充分裂解, 提取总蛋白。使用 BCA 定量试剂盒测定蛋白浓度, 沸水浴煮沸 10 min 对蛋白进行变性。用变性后的蛋白上清进行 SDS-PAGE 蛋白电泳上样。将胶上的蛋白用转膜仪湿转至 NC 膜, 并用含有 2.5% 脱脂奶粉的封闭液室温封闭处理 2 h。洗膜后, 滴加稀释的一抗溶液(兔抗 A $\beta$ 40 多克隆抗体、兔抗 A $\beta$ 42 多克隆抗体、兔抗 p-tau 单克隆抗体, 稀释比例均为 1:1000), 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。洗膜, 滴加稀释的二抗溶液(HRP 标记的二抗, 稀释比例为 1:500), 于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 孵育 2 h。洗膜, 滴加 ECL 发光液显影, 曝光。用目的条带的灰度值与内参 GAPDH 条带的灰度值之间的比值表示目的蛋白的表达情况。

1.2.7 统计学处理 实验中的数据均使用统计学专用软件 SPSS 22.0 进行统计分析, 计量资料使用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。3 组以上的数据之间的比较使用单因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 补肾益志方对 AD 大鼠学习记忆能力的影响

与假手术组相比, 模型组大鼠逃避潜伏期、目标象限游泳时间、游泳总路程均显著升高(P<0.05); 与模型组相比, 补肾益志方低、中、高剂量组及阳性组大鼠逃避潜伏期、目标象限游泳时间、游泳总路程均显著降低(P<0.05); 与补肾益志方低剂量组相比, 补肾益志方中、高剂量组及阳性组大鼠逃避潜伏期、游泳总路程均显著降低(P<0.05), 补肾益志方高剂量组及阳性组大鼠目标象限游泳时间显著降低(P<0.05); 补肾益志方中、高剂量组及阳性组大鼠逃避潜伏期、目标象限游泳时间、游泳总路程比较, 差异无统计学意义(P>0.05)。详见表 1。

表 1 各组大鼠逃避潜伏期、目标象限游泳时间和总路程比较( $\bar{x}\pm s$ , n=10)

分组	逃避潜伏期/s	目标象限游泳时间/s	游泳总路程/cm
假手术组	33.13 $\pm$ 4.02	30.17 $\pm$ 5.34	189.36 $\pm$ 42.65
模型组	70.15 $\pm$ 7.03*	53.14 $\pm$ 5.54*	2 122.36 $\pm$ 205.12*
补肾益志方低剂量组	50.26 $\pm$ 4.87 <sup>#</sup>	47.69 $\pm$ 6.14 <sup>#</sup>	1 536.67 $\pm$ 189.54 <sup>#</sup>
补肾益志方中剂量组	42.78 $\pm$ 4.67 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	45.46 $\pm$ 6.06 <sup>#</sup>	650.69 $\pm$ 102.35 <sup>#<math>\Delta</math></sup>
补肾益志方高剂量组	40.35 $\pm$ 5.04 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	43.24 $\pm$ 5.26 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	644.37 $\pm$ 98.61 <sup>#<math>\Delta</math></sup>
阳性组	40.51 $\pm$ 4.88 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	43.53 $\pm$ 5.02 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	649.21 $\pm$ 78.96 <sup>#<math>\Delta</math></sup>

注: 与假手术组比较, \*P<0.05; 与模型组比较, <sup>#</sup>P<0.05; 与补肾益志方低剂量组比较,  <sup>$\Delta$</sup> P<0.05。

## 2.2 补肾益志方对 AD 大鼠自主活动时间的影

响与假手术组相比,模型组大鼠自主活动时间显著升高( $P<0.05$ );与模型组相比,补肾益志方低、中、高剂量组及阳性组大鼠自主活动时间均显著降低( $P<0.05$ );与补肾益志方低剂量组相比,补肾益志方中、高剂量组及阳性组大鼠自主活动时间均显著降低( $P<0.05$ );补肾益志方中、高剂量组及阳性组大鼠自主活动时间比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见表2。

表2 各组大鼠自主活动时间比较( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

分组	活动时间/s
假手术组	70.36±17.14
模型组	150.15±21.45*
补肾益志方低剂量组	122.46±18.36 <sup>#</sup>
补肾益志方中剂量组	91.45±11.34 <sup>#△</sup>
补肾益志方高剂量组	90.35±12.28 <sup>#△</sup>
阳性组	92.11±10.03 <sup>#△</sup>

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与补肾益志方低剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

## 2.3 补肾益志方对 AD 大鼠海马组织的影响

假手术组大鼠海马组织神经元排列紧密、规则;模型组大鼠海马组织神经元数量稀少,排列疏松,呈现空泡样变;补肾益志方低、中、高剂量组大鼠海马组织神经元排列紧密,补肾益志方高剂量组、阳性组大鼠海马组织神经元最接近假手术组。详见图1。

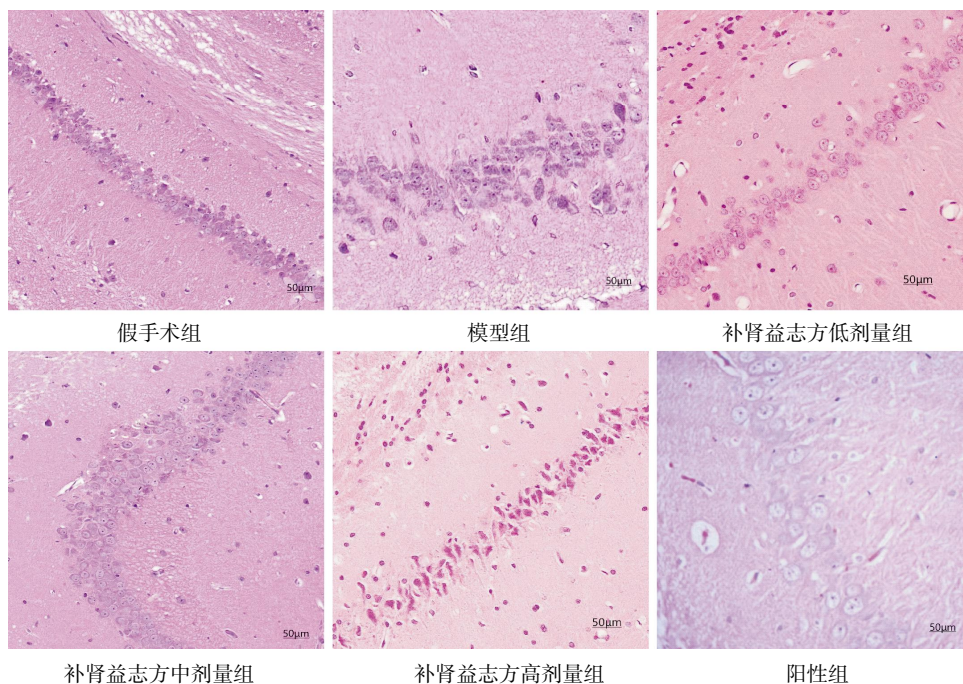


图1 各组大鼠海马组织 HE 染色( $\times 200$ )

## 2.4 补肾益志方对 AD 大鼠血清中 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 含量的影响

与假手术组相比,模型组大鼠血清中 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 的含量均显著升高( $P<0.05$ );与模型组相比,补肾益志方低、中、高剂量组及阳性组大鼠血清中 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 的含量均显著降低( $P<0.05$ );与补肾益志方低剂量组相比,补肾益志方中、高剂量组及阳性组大鼠血清中 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 的含量均显著降低( $P<0.05$ );补肾益志方中、高剂量组及阳性组大鼠血清 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 的含量比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。详见表3。

表3 各组大鼠血清中 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 含量比较( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

分组	A $\beta$ 40/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	A $\beta$ 42/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	p-tau/( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ )
假手术组	217.10±31.12	36.84±5.05	17.32±4.12
模型组	376.33±45.76*	69.43±8.22*	42.31±6.19*
补肾益志方低剂量组	358.78±41.72 <sup>#</sup>	63.34±7.29 <sup>#</sup>	38.44±6.21 <sup>#</sup>
补肾益志方中剂量组	275.39±32.55 <sup>#△</sup>	49.57±5.48 <sup>#△</sup>	31.35±3.58 <sup>#△</sup>
补肾益志方高剂量组	248.79±29.65 <sup>#△</sup>	43.45±5.37 <sup>#△</sup>	26.69±3.64 <sup>#△</sup>
阳性组	249.06±26.54 <sup>#△</sup>	45.05±5.11 <sup>#△</sup>	27.09±3.02 <sup>#△</sup>

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与补肾益志方低剂量组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

## 2.5 补肾益志方对 AD 大鼠海马组织 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 蛋白表达量的影响

与假手术组相比,模型组大鼠海马组织 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 的蛋白表达量均显著升高( $P<0.05$ );与模型组相比,补肾益志方低、中、高剂量组及阳性组

大鼠海马组织 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 的蛋白表达量均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与补肾益志方低剂量组相比, 补肾益志方中、高剂量组及阳性组大鼠海马组织 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 蛋白表达量均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 补肾益志方中、高剂量组及阳性组大鼠海马组织 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 的蛋白表达量比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。详见图 2、表 4。

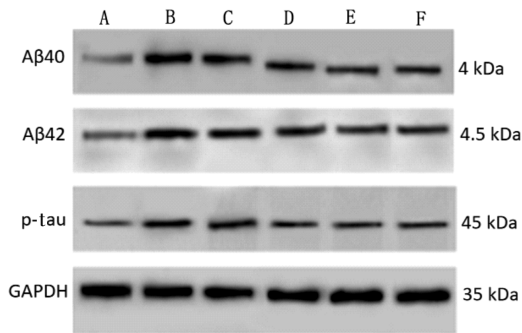


图 2 各组大鼠海马组织 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 的蛋白条带图  
注:A.假手术组;B.模型组;C.补肾益志方低剂量组;D.补肾益志方中剂量组;E.补肾益志方高剂量组;F.阳性组。

表 4 各组大鼠海马组织 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 蛋白表达量比较 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

分组	A $\beta$ 40	A $\beta$ 42	p-tau
假手术组	0.24 $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.05	0.17 $\pm$ 0.04
模型组	0.74 $\pm$ 0.09*	0.65 $\pm$ 0.03*	0.42 $\pm$ 0.05*
补肾益志方低剂量组	0.66 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>	0.49 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>	0.35 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>
补肾益志方中剂量组	0.34 $\pm$ 0.06 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	0.41 $\pm$ 0.06 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	0.23 $\pm$ 0.05 <sup>#<math>\Delta</math></sup>
补肾益志方高剂量组	0.29 $\pm$ 0.04 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	0.40 $\pm$ 0.04 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	0.21 $\pm$ 0.04 <sup>#<math>\Delta</math></sup>
阳性组	0.34 $\pm$ 0.06 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	0.48 $\pm$ 0.05 <sup>#<math>\Delta</math></sup>	0.27 $\pm$ 0.06 <sup>#<math>\Delta</math></sup>

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与补肾益志方低剂量组比较, <sup>$\Delta$</sup>  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

据报道,山茱萸环烯醚萜苷对 APP/PS1/tau 三转基因诱导的 AD 老年小鼠具有十分显著的认知功能改善作用,并促进脑内突触相关蛋白的表达<sup>[14]</sup>。何首乌二苯乙烯苷和黄精对 CI 均有治疗功效。在治疗 CI 的处方中,当归、赤芍也是广泛使用的中药组合,有研究表明,当归芍药散用于治疗 AD 等神经退行性疾病也具有较好的功效<sup>[15]</sup>。LIN 等<sup>[16]</sup>在对 83 位 AD 患者的研究中报道,使用调补心肾方治疗后,患者痴呆综合征评分较对照组明显降低,临床上初步验证了中药复方制剂改善 AD 患者 CI 的有效性。本研究所用补肾益智方在临床上给很多患者带来福音,但是其发挥作用的具体机制及药物成分尚不清楚。

本研究建立了 AD 大鼠模型,观察大鼠的学习记忆能力变化发现,模型组大鼠的逃避潜伏期、目标象限游泳时间、游泳总路程和自主活动时间都明显延长,说明建模成功。而经过补肾益志方给药治疗后,大鼠的上述指标均明显降低,趋向假手术组,再次验证了补肾益志方对 AD 患者的治疗价值。通过 HE 染色观察大鼠海马组织发现,不同剂量补肾益志方治疗的大鼠海马组织都有不同程度的改善,并且补肾益志方高剂量组大鼠的海马组织恢复得最好。A $\beta$  蛋白及 tau 蛋白作为 AD 的明星因子,猜测其有可能参与补肾益志方的药理作用机制。

AD 是一种进行性神经退行性疾病,其特征是记忆丧失和多种认知障碍<sup>[17-19]</sup>。几十年的深入研究表明,多种细胞变化与 AD 的发展有关,包括线粒体损伤、突触功能障碍、A $\beta$  和 p-tau 的形成和积累<sup>[20]</sup>。最近大量研究表明,A $\beta$  和 p-tau 诱导的缺陷性自噬和丝裂吞噬是 AD 发病机制中的突出变化,并且 A $\beta$  和 p-tau 水平随年龄的增加而升高<sup>[21]</sup>。多年来,普遍认可的 AD 发病机制为 A $\beta$  的沉积会加速疾病进程,并引发级联的有害反应,如 tau 病理和神经退行性变<sup>[22]</sup>。有研究报道,基于调补心肾理论的益气补肾活血方对临床 180 位老年轻度 CI 患者有治疗作用,通过 Western blot 法检测发现,治疗后患者血清中 tau 蛋白的表达明显受到抑制<sup>[23]</sup>。本研究通过 ELISA 法和 Western blot 法检测了大鼠海马中 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 的表达,发现补肾益志方给药的大鼠海马中 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 的表达均明显下降,且补肾益志方高剂量组大鼠海马最接近假手术组大鼠,说明补肾益志方有助于改善 AD 患者认知功能,可能与抑制 A $\beta$ 40、A $\beta$ 42、p-tau 相关。

综上所述,补肾益志方可减轻 AD 大鼠的认知功能损害,其作用机制与抑制 A $\beta$ 、p-tau 表达有关,为补肾益志方在 AD 患者中的临床应用奠定了理论基础。

### 参考文献

- [1] MORLEY J E. An overview of cognitive impairment[J]. Clinics in Geriatric Medicine, 2018, 34(4): 505-513.
- [2] WANG Z, DONG B. Screening for cognitive impairment in geriatrics[J]. Geriatric Medicine Clinics, 2018, 34(4): 515-536.

- [3] BRADBURN S, MURGATROYD C, RAY N. Neuroinflammation in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: A meta-analysis[J]. *Ageing Research Reviews*, 2019, 50(3): 1-8.
- [4] PEI H, MA L N, CAO Y, et al. Traditional Chinese medicine for Alzheimer's disease and other cognitive impairment: A review[J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2020, 48(3): 487-511.
- [5] SONG J X, MALAMPATI S, ZENG Y, et al. A small molecule transcription factor EB activator ameliorates beta-amyloid precursor protein and tau pathology in Alzheimer's disease models[J]. *Aging Cell*, 2020, 19(2): e13069.
- [6] YAN B, WANG J, XUE Z, et al. Chinese medicinal herbs in the treatment of diabetic cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 2018(9): 7541406-7541416.
- [7] 王 玮,靳贺超,耿秀超,等.血管性痴呆肾虚血瘀证病证结合大鼠模型的建立[J].*中国中医基础医学杂志*,2020,26(6):748-752.
- [8] 李富周,贺春香,余婧萍,等.当归芍药散改善 APP<sup>swe</sup>/PS1 $\Delta$ E9 转基因小鼠学习记忆能力及机制研究[J].*湖南中医药大学学报*,2020,40(9):1094-1100.
- [9] 易亚乔,何清湖,刘 检,等.基于 SIRT1/NF- $\kappa$ B 炎症通路探讨加味脑泰方对血管性痴呆大鼠学习记忆及海马组织病理形态的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2019,39(6):684-688.
- [10] LI L, XU S, LIU L, et al. Multifunctional compound AD-35 improves cognitive impairment and attenuates the production of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in an A $\beta$ 25-35-induced rat model of Alzheimer's disease[J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2017, 56(4): 1403-1417.
- [11] LI H J, WANG T Z, HOU C, et al. Artemether attenuates A $\beta$ 25-35-induced cognitive impairments by downregulating A $\beta$ , BACE1, mTOR and tau proteins[J]. *Clinical Laboratory*, 2021, 67(10):1-13.
- [12] TIAN H, DING N, GUO M, et al. Analysis of learning and memory ability in an Alzheimer's disease mouse model using the morris water maze[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2019, 29(152):12-24.
- [13] LIU Y S, JIN S, YANG Y T, et al. Cognitive dysfunction associated with activation of the mTOR signaling pathway after TSH suppression therapy in rats[J]. *Endocrine Journal*, 2020, 67(10): 1063-1070.
- [14] 杨翠翠,包训杰,张 丽,等.7月龄及16月龄APP/PS1/tau三转基因小鼠脑内突触相关蛋白的变化及山茱萸环烯醚萜苷的影响[J].*首都医科大学学报*,2020,41(3):391-396.
- [15] LUO Y, WANG Q, ZHANG Y. A systems pharmacology approach to decipher the mechanism of danggui-shaoyao-san decoction for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 178(2): 66-81.
- [16] LIN Z Y, HUANG T W, HUANG J S, et al. Tiaobu Xinshen Recipe (调补心肾方) improved mild cognitive impairment of Alzheimer's disease patients with Xin (Heart) and Shen (Kidney) deficiency[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2020, 26(1): 54-58.
- [17] ATRI A. The Alzheimer's disease clinical spectrum: Diagnosis and management[J]. *The Medical Clinics of North America*, 2019, 103(2): 263-293.
- [18] SORIA LOPEZ J A, GONZÁLEZ H M, LÉGER G C. Alzheimer's disease[J]. *Handbook of Clinical Neurology*, 2019, 167: 231-255.
- [19] TIWARI S, ATLURI V, KAUSHIK A, et al. Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2019, 14(6): 5541-5554.
- [20] 王 蒙,唐迪莹,李欣欣,等. $\beta$ 淀粉样蛋白及tau蛋白相关机制在阿尔茨海默病中的研究进展[J].*中国老年学杂志*,2017,12(37): 3101-3103.
- [21] REDDY P H, OLIVER D M. Amyloid beta and phosphorylated tau-induced defective autophagy and mitophagy in Alzheimer's disease[J]. *Cells*, 2019, 8(5): 488.
- [22] BUSCHE M A, HYMAN B T. Synergy between amyloid-beta and tau in Alzheimer's disease[J]. *Nature Neuroscience*, 2020, 23(10): 1183-1193.
- [23] 马 琳,孙 莉,项 颀.基于调补心肾理论对益心气补肾精法改善认知功能作用机制的研究[J].*中国中医药现代远程教育*, 2018,16(9): 52-54.

(本文编辑 周 旦)