

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.17.014

黑逍遥散对 APP/PS1 双转基因小鼠海马 CREB1 蛋白及其磷酸化表达的影响

马春林¹, 吴红彦^{2,3*}, 崔淑梅¹, 朱凯敏¹, 刘佳楠⁴, 兰美华³, 王爱琳⁵

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃省兰州市城关区定西东路 35 号, 730000; 2. 深圳市罗湖区人民医院; 3. 深圳市罗湖区中医院; 4. 甘肃省定西市第二人民医院; 5. 上海中医药大学附属龙华医院)

摘要 目的 探讨黑逍遥散治疗阿尔茨海默病的可能作用机制。方法 30 只 APP/PS1 双转基因雄性小鼠随机分为模型组、盐酸多奈哌齐组、黑逍遥散组, 每组 10 只。同月龄、同种系的野生型 C57BL/6 雄性小鼠 10 只设为空白组。黑逍遥散组给予黑逍遥散 6 g/(kg·d) 灌胃, 盐酸多奈哌齐组给予盐酸多奈哌齐片 3.25 mg/(kg·d) 灌胃, 模型组、空白组给予双蒸水 0.2 ml/10 g 灌胃, 各组均每日灌胃 1 次, 连续 3 个月。采用 Morris 水迷宫于实验结束第 1~5 天进行定位航行实验观察逃避潜伏期, 第 6 天开展空间搜索实验记录跨原平台次数。采用免疫组化法检测小鼠海马 CA1、CA3 及 DG 区环腺苷酸应答元件结合蛋白 1 (CREB1) 及磷酸化环腺苷酸应答元件结合蛋白 1 (p-CREB1) 表达。结果 与空白组比较, 模型组小鼠第 1~5 天逃避潜伏期明显延长, 第 6 天跨原平台次数明显减少, 小鼠海马 CA1、CA3 及 DG 区 CREB1 及 p-CREB1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 盐酸多奈哌齐组和黑逍遥散组各时间点逃避潜伏期均缩短, 第 6 天跨原平台次数明显增加, 小鼠海马 CA1、CA3 及 DG 区 CREB1、p-CREB1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。黑逍遥散组和盐酸多奈哌齐组各指标组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 黑逍遥散可能通过调节海马 CREB1 及其磷酸化表达发挥防治阿尔茨海默病的作用。

关键词 阿尔茨海默病; 黑逍遥散; 环腺苷酸应答元件结合蛋白 1

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是一种与年龄相关的神经退化性疾病, 据流行病学数据显示, 目前全世界有 4680 万人罹患此病, 而我国已有 950 余万 AD 患者, 约占世界总病例数的 1/4^[1], 对社会经济和医疗保障体系造成巨大冲击。黑逍遥散出自清代高鼓峰《医宗己任编》, 具有肝脾肾并调、气血精兼顾、充养神窍、通利脑络的功效, 能够减轻 AD 患者症状^[2]。前期研究表明, 该方对 AD 模型动物和细胞具有调节中枢单胺类神经递质、抗氧化应激、抗炎、保护神经元等多靶点防治效果^[3-5]。环腺苷酸应答元件结合蛋白 (CREB) 是真核细胞生物细胞核中一种重要的核转录因子, 既是细胞外信号调节酶信号通路的核内作用靶点, 也是胞内磷脂酰肌醇激酶信号通路的核内作用靶点^[6]。其可与环腺苷酸反应元件结合,

调节基因转录^[7]、影响细胞发育及参与学习记忆的形成和稳定^[8-10]等。有研究表明, AD 小鼠的脑组织中环腺苷酸应答元件结合蛋白 1 (CREB1) 的活性显著降低^[11]。给老年大鼠导入外源性 CREB 基因能增加其表达, 进而提高老年大鼠认知能力^[12]。本实验采用 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠模型和同月龄同种系 C57BL/6 小鼠, 研究 CREB1 和磷酸化环腺苷酸应答元件结合蛋白 1 (p-CREB1) 在小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区的表达情况, 以探讨黑逍遥散的可能干预机制。本研究经甘肃中医药大学伦理委员会批准 (批号: 2017-105)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 APP/PS1 双转基因 4 月龄雄性小鼠 30 只, 同月龄同种系 C57BL/6 小鼠 10 只, 体重 (25 ± 5) g, 均由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2014-0004。小鼠饲养于甘肃中医药大学 SPF 级动物实验

基金项目: 国家自然科学基金 (81660760); 兰州市 2015 年人才创新创业扶持项目 (2015-RC-24)

* 通讯作者: wu. hy@163. com, 15693111686

中心, 温度 20℃, 湿度 40%, 昼夜时间设定为 7: 00/19: 00, 自由饮水。

1.2 药物

黑逍遥散由熟地黄、北柴胡、当归、白芍、茯苓、白术、生姜、甘草、薄荷, 按照 7.5 : 5 : 5 : 5 : 5 : 5 : 4 : 1 比例配伍而成。采取传统水煎法, 除薄荷外, 其他药物放入 10 倍于中药的冷水浸渍 3 h, 然后加热煮沸 1 h, 放入薄荷后再煎煮 5 min, 滤出水煎溶液, 药渣中再添加 6 倍量水煮沸 1 h, 滤出水煎溶液, 融合两次煎液, 真空旋蒸浓缩至含生药 1 g/ml 浓度的黑逍遥散水煎液, 无菌条件装瓶, 4℃ 储存备用。盐酸多奈哌齐片 (5 mg/片), 卫材 (中国) 药业有限公司, 批号: 1604043。

1.3 主要试剂和仪器

CREB1 小鼠单克隆抗体 (货号: YM428)、p-CREB1 小鼠多克隆抗体 (货号: YP0856), 均为 Immuno Way 公司产品; 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) (货号: ZB-2301), 中杉金桥生物技术有限公司。

Morris 水迷宫视频跟踪系统 (成都泰盟科技有限公司, MT-200 型), 超薄切片机 (瑞典 LKB 公司, 2088 型), 电脑生物组织摊烤片机 (浙江金华市科研仪器设备有限公司, KT 型), 光学显微镜 (日本 OLYMPUS 株式会社, CKX21 型)。

1.4 动物分组及给药

将 30 只 APP/PS1 双转基因小鼠采用随机数字表法分为模型组、黑逍遥散组和盐酸多奈哌齐组, 每组 10 只; 同月龄同系种 10 只 C57BL/6 小鼠作为空白组。黑逍遥散组给予黑逍遥散 6 g/(kg·d) 灌胃, 盐酸多奈哌齐组给予盐酸多奈哌齐片 3.25 mg/(kg·d) 灌胃, 用药剂量按照人和动物体表面积比进行换算^[3], 相当于 60 kg 成人每日剂量的 5 倍。模型组、空白组给予双蒸水 0.2 ml/10 g 灌胃。各组均每日灌胃 1 次, 连续 3 个月。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 Morris 水迷宫行为学检测^[4] 分别于实验结束第 1~5 天进行定位航行实验, 每天将小鼠面向池壁放入水中, 实验时长设置为 120 s, 找到平台时间为逃避潜伏期, 若超时长未找到平台, 引导小鼠至平台停留片刻, 其逃避潜伏期计为 120 s。实验结束后第 6 天开展空间搜索实验, 撤去水池中的平台, 小鼠面向池壁放入无平台的水池中自由游泳, 时长设置为 120 s, 设备会自动识别规定时长

内小鼠游经原平台区域相应位置及次数并记录, 即跨越平台数。

1.5.2 脑组织海马区 CREB1、p-CREB1 蛋白表达

采用免疫组织化学染色法检测, 各组采用随机数字表法选取 8 只小鼠大脑组织, 调设切片机温度为 60℃, 切片厚度 5 μm, 将石蜡切片脱蜡至水后进行抗原修复, 并灭活内源性过氧化物酶, 阻断非特异性反应, 加 CREB1 小鼠单克隆抗体 (1 : 200) 和 p-CREB1 小鼠多克隆抗体 (1 : 100), 并将载玻片置于孵育盒 4℃ 冰箱过夜。取出孵育盒, 室温放置 30 min, 37℃ 培养箱中孵育 30 min, PBS 缓冲液冲洗 3 min 3 次, 滴加按 1 : 500 配置好的适量辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L), 37℃ 恒温培养箱内孵育 15 min, 取出后 PBS 缓冲液冲洗 3 min 3 次, 滴加显色剂, 经复染色、脱水透明后, 树胶封片, 光镜下利用 Image-Pro Plus 6.0 进行图像的分析处理, 测量阳性表达细胞的平均光密度值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行分析, 计量数据符合正态分布以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较方差齐用 LSD 检验, 方差不齐用 Dunnett's T3 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠不同时间 Morris 水迷宫行为学检测结果比较

实验过程中模型组小鼠死亡 2 只, 盐酸多奈哌齐组死亡 1 只。表 1 示, 与空白组比较, 模型组小鼠第 1~5 天逃避潜伏期明显延长, 第 6 天跨原平台次数明显减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 盐酸多奈哌齐组和黑逍遥散组小鼠第 4 天逃避潜伏期亦明显长于空白组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而其他时间点与空白组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 盐酸多奈哌齐组和黑逍遥散组各时间点逃避潜伏期均缩短, 第 6 天跨原平台次数明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。黑逍遥散组和盐酸多奈哌齐组各指标组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组小鼠海马 CA1、CA3 及 DG 区 CREB1、p-CREB1 蛋白表达平均光密度值比较

CREB1、p-CREB1 阳性表达多出现在神经元细胞浆或核位置, 呈现黄色或棕黄色颗粒。表 2 示, 与空白组比较, 模型组小鼠海马 CA1、CA3 及

表 1 各组小鼠 5 天逃避潜伏期和第 6 天跨原平台次数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	逃避潜伏期 (s)					跨原平台次数
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	
空白组	10	49.30 ± 43.92	59.20 ± 52.87	43.80 ± 42.41	13.30 ± 12.44	20.40 ± 23.89	5.80 ± 2.25
模型组	8	120.00 ± 0.00**	114.25 ± 10.65*	116.75 ± 9.19**	119.38 ± 1.768**	112.25 ± 11.54**	1.00 ± 1.41**
盐酸多奈哌齐组	9	81.78 ± 41.04 [△]	72.56 ± 42.01 [△]	61.56 ± 45.71 [△]	66.67 ± 42.55** ^{△△}	48.67 ± 51.31 ^{△△}	5.11 ± 2.93 ^{△△}
黑逍遥散组	10	66.80 ± 49.76 [△]	56.00 ± 49.38 ^{△△}	49.90 ± 50.01 ^{△△}	59.40 ± 53.85** ^{△△}	48.30 ± 35.72 ^{△△}	5.50 ± 2.22 ^{△△}

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 各组小鼠海马组织不同区域 CREB1、p-CREB1 蛋白表达平均光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CREB1			p-CREB1		
		CA1 区	CA3 区	DG 区	CA1 区	CA3 区	DG 区
空白组	8	20.94 ± 0.04	21.20 ± 1.46	52.62 ± 0.61	20.47 ± 1.41	19.21 ± 1.31	41.87 ± 5.33
模型组	8	7.92 ± 0.31**	10.82 ± 0.75**	25.14 ± 1.03**	11.15 ± 1.36**	7.43 ± 1.23**	22.00 ± 1.32*
盐酸多奈哌齐组	8	18.73 ± 0.54** ^{△△}	18.18 ± 0.98 ^{△△}	44.69 ± 1.49** ^{△△}	17.71 ± 1.21 ^{△△}	14.73 ± 0.90** ^{△△}	30.22 ± 1.28** [△]
黑逍遥散组	8	19.61 ± 1.05 ^{△△}	20.56 ± 1.25 ^{△△}	43.64 ± 1.59** ^{△△}	19.20 ± 2.28 ^{△△}	14.98 ± 1.99** ^{△△}	33.22 ± 3.74 [△]

注: CREB1, 环腺苷酸应答元件结合蛋白 1; p-CREB1, 磷酸化环腺苷酸应答元件结合蛋白 1; 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

DG 区 CREB1 及 p-CREB1 蛋白表达平均光密度值显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 盐酸多奈哌齐组小鼠海马 CA1 及 DG 区 CREB1 蛋白表达平均光密度值低于空白组, CA3 及 DG 区 p-CREB1 蛋白表达平均光密度值低于空白组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 黑逍遥散组 DG 区 CREB1 及 CA3 区 p-CREB1 蛋白表达平均光密度值亦低于空白组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 盐酸多奈哌齐组和黑逍遥散组小鼠海马 CA1、CA3 及 DG 区 CREB1、p-CREB1 蛋白表达平均光密度值显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而黑逍遥散组和盐酸多奈哌齐组各区 CREB1、p-CREB1 蛋白表达平均光密度值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

有研究表明, APP/PS1 双转基因小鼠 3 月龄时大脑内未检测到明显老年斑, 但已存在记忆缺陷的表现, 而到 4~5 月龄时其大脑皮层开始出现老年斑, 此小鼠模型模拟了人类早发型 AD 的部分疾病特征, 可用于预防或治疗 AD 的药理实验研究^[13]。此外, 该模型小鼠在 6 月龄之前的死亡率较高^[14]。本实验中模型组小鼠死亡 2 只, 而黑逍遥散组无死亡发生, 说明黑逍遥散可能改善 AD 模型小鼠的生存状况、降低 APP/PS1 双转基因 AD 小鼠非正常死亡率, 但需要扩大样本量进一步研究证实。

中医学认为, AD 与古文中所记载的“痴呆”“呆病”类似, 病位虽然在脑, 但与肝、肾、脾三脏密切相关, 以脏腑虚损为本, 痰瘀阻络为实^[17]。黑逍遥散中熟地黄、当归、白芍肝肾同补, 滋阴养血, 柔肝缓急为君; 白术、茯苓、生姜健脾化浊,

益气和胃为臣; 薄荷佐柴胡疏肝解郁、调畅气机; 柴胡疏肝解郁, 使肝气调达, 气血条畅而为佐; 甘草调和诸药为使。诸药合用肝肾同补, 肝脾并调, 气血兼顾, 共奏疏肝养血、健脾益肾之功。诚如《医宗己任编》所云“黑逍遥散, 实为肝郁肾虚, 年高体弱者之相宜也”^[18]。本研究 Morris 水迷宫检测结果显示, 模型组小鼠逃逸潜伏期明显增加, 跨原平台次数显著减少, 说明 AD 模型小鼠已经存在严重的学习记忆能力和行为学障碍; 盐酸多奈哌齐组和黑逍遥散组小鼠的逃逸潜伏期明显缩短, 跨原平台次数显著增加, 证实黑逍遥散能够提高 AD 小鼠的学习和记忆能力, 其效果与盐酸多奈哌齐片相当。

海马结构主要由海马及其邻近颞叶区的齿状回 (DG 区) 和下托组成, 依据细胞形态和皮质发育差异, 又将海马分成 CA1、CA2、CA3、CA4 四个扇形区, 信息进入海马时, 由齿状回流入 CA3 区, 再经 CA1 区到脑下托, 并在每个区域输入附加信息在最后两个区域输出^[19]。研究发现, 长时程增强作用是学习和记忆形成与维持的微观模式, 长时性记忆需要合成新蛋白质参与维持^[20]。CREB 是参与学习记忆功能的关键因子, 许多信号通路与其交汇^[21]。CREB 的生物活性受磷酸化的调控, 是多种蛋白激酶的磷酸化底物, 当海马区 CREB 功能遭到破坏时, 小鼠的空间记忆出现明显缺陷^[22], AD 小鼠海马组织 CREB 活性显著降低^[11]。本研究结果显示, 黑逍遥散干预后, 小鼠海马 CA1、CA3、DG 区 CREB1、p-CREB1 蛋白的相对表达量均有不同程度增强, 并且与盐酸多奈哌齐片效果相当。因

此推断,黑逍遥散可能是通过调节 CREB1 及其磷酸化表达,进而发挥防治 AD 的作用。

参考文献

- [1] CHEN YG. Research progress in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Chin Med J (Engl), 2018, 131(13): 1618-1624.
- [2] 吴红彦,王虎平,王彩霞. 黑逍遥散对老年性痴呆的防治作用及其机制研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4): 912-913.
- [3] 吴红彦,李海龙,张云,等. 黑逍遥散对东莨菪碱致痴呆小鼠模型的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(10): 35-37.
- [4] 李海龙,王虎平,刘建鸿,等. 黑逍遥散对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 AD 大鼠模型脑组织和血清 SOD, GSH-Px 及 MDA 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(21): 186-189.
- [5] 吴红彦,李海龙,顾静,等. 黑逍遥散对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 AD 模型大鼠脑组织神经递质及海马病理改变的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(16): 4417-4420.
- [6] 吴红彦,李海龙,顾静,等. 黑逍遥散对阿尔茨海默病大鼠海马基因表达谱的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(11): 1345-1351.
- [7] JOHANNESSEN M, DELGHANDI MP, MOENS U. What turns CREB on [J]. Cell Signal, 2004, 16(11): 1211-1227.
- [8] KULIK G, KLIPPEL A, WEBER MJ. Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt [J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(3): 1595-1606.
- [9] YIN JC, WALLACH JS, DEL VECCHIO M, et al. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in Drosophila [J]. Cell, 1994, 79(1): 49-58.
- [10] BARTSCH D, GHIRARDI M, SKEHEL PA, et al. Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change [J]. Cell, 1995, 83(6): 979-992.
- [11] 王玲,李先发,陈蒙,等. 阿尔茨海默病与野生型小鼠海马中 CREB1 活性差异研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2016, 36(8): 956-959, 990.
- [12] MOURAVLEV A, DUNNING J, YOUNG D, et al. Somatic gene transfer of cAMP response element-binding protein attenuates memory impairment in aging rats [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(12): 4705-4710.
- [13] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算 [J]. 南昌大学学报(医学版), 1997, 39(4): 41.
- [14] 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): 3289-3290.
- [15] 宗园媛,王晓映,王海林,等. APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病小鼠模型的老年斑及行为学动态分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(9): 8-11.
- [16] XIONG H, CALLAGHAN D, WODZINSKA J, et al. Biochemical and behavioral characterization of the double transgenic mouse model (APP^{swe}/PS1^{dE9}) of Alzheimer's disease [J]. Neurosci Bull, 2011, 27(4): 221-232.
- [17] 谢宁,谢芳,姚辛敏,等. 老年痴呆从五脏论治的临床研究进展 [J]. 哈尔滨医药, 2017, 37(2): 187-189.
- [18] 高鼓峰. 医宗己任编 [M]. 唐文吉,唐文奇,校注. 北京: 学苑出版社, 2011: 27.
- [19] 王玮,赵小贞. 中枢神经功能解剖学 [M]. 北京: 科学出版社, 2013: 128-130.
- [20] BRIGHTWELL JJ, SMITH CA, NEVE RL, et al. Long-term memory for place learning is facilitated by expression of cAMP response element-binding protein in the dorsal hippocampus [J]. Learn Mem, 2007, 14(3): 195-199.
- [21] MOZZACHIODI R, BYRNE JH. More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory [J]. Trends Neurosci, 2010, 33(1): 17-26.
- [22] PITTENGER C, HUANG YY, PALETZKI RF, et al. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory [J]. Neuron, 2002, 34(3): 447-462.

Effect of *Heixiaoyao Powder* (黑逍遥散) on CREB1 Protein and Its Phosphorylation Expression in Hippocampus of APP/PS1 Double Transgenic Mice

MA Chunlin¹, WU Hongyan^{2,3}, CUI Shumei¹, ZHU Kaimin¹, LIU Jianan⁴, LAN Meihua³, WANG Ailin⁵

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000; 2. People's Hospital of Luohu District, Shenzhen; 3. Chinese Medicine Hospital of Luohu District, Shenzhen; 4. Second People's Hospital of Dingxi City, Gansu Province; 5. Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of action of *Heixiaoyao Powder* (黑逍遥散) in the treatment of Alzheimer's disease. **Methods** A total of 30 APP/PS1 double transgenic male mice were randomly divided into a model group, a donepezil hydrochloride group and a *Heixiaoyao Powder* group, with 10 rats in each

group. Ten wild-type C57BL/6 male mice of the same age and same strain were set as blank group. The *Heixiaoyao Powder* group was given 6 g/(kg · d) by intragastric administration, and donepezil hydrochloride was given 3.25 mg/(kg · d) to the donepezil hydrochloride group. The model group and the blank group were given double distilled water 0.2 ml/10 g by gavage. All groups were intragastrically administered once a day for 3 months. The Morris water maze was used to observe the escape latency during the 1st to 5th day of the experiment, and the space search experiment was recorded on the 6th day to record the number of times across the original platform. The expression of cyclic adenosine responsive element binding protein 1 (CREB1) and phosphorylated cyclic adenosine responsive element binding protein 1 (p-CREB1) in mouse hippocampal CA1, CA3 and DG regions were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the blank group, the escape latency of the model group was significantly prolonged on the 1st to 5th day, and the number of trans-platforms was significantly decreased on the 6th day. The expression of CREB1 and p-CREB1 protein in the hippocampus CA1, CA3 and DG areas was significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the escape latency of the donepezil hydrochloride group and the *Heixiaoyao Powder* group was shortened at each time point, and the number of trans-platforms increased significantly on the 6th day. The expression of CREB1 and p-CREB1 protein in the hippocampus CA1, CA3 and DG areas of the mice increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was no significant difference between the indicators of *Heixiaoyao Powder* and Donepezil Hydrochloride ($P > 0.05$). **Conclusion** *Heixiaoyao Powder* may play a role in the prevention and treatment of Alzheimer's disease by regulating hippocampal CREB1 and its phosphorylation expression.

Keywords Alzheimer's disease; *Heixiaoyao Powder* (黑逍遥散); adenosine responsive element binding protein 1

(收稿日期: 2018-12-04; 修回日期: 2019-05-22)

编辑: 邓 媛

腰痛宁胶囊临床研究与应用征文通知

腰痛宁胶囊是颈复康药业集团有限公司生产的治疗腰腿痛的首选药品之一。为了总结腰痛宁胶囊多年来研究及临床应用经验,更好地指导临床用药,中医杂志社与颈复康药业集团有限公司联合主办此次有奖征文活动,现将有关事项通知如下。

一、征文内容

1. 腰痛宁胶囊治疗腰椎间盘突出症、坐骨神经痛、腰肌劳损、腰肌纤维炎、风湿性关节痛,症见腰腿痛、关节痛及肢体活动受限等病症的临床经验、体会与分析; 2. 腰痛宁胶囊临床用量、用法的研究与经验总结; 3. 腰痛宁胶囊组方研究、药理研究与探讨; 4. 腰痛宁胶囊临床扩大应用范围的探讨与研究; 5. 名医名家应用腰痛宁胶囊治疗腰椎间盘突出症等腰腿痛经验总结与分析; 6. 包括但不限于以上内容文章。

二、征文要求

1. 来稿未公开发表,字数不低于3000字,并附单位介绍信; 2. 文章中涉及到的计量单位、实验数据等须采用法定标准方法表示; 3. 文题下署作者姓名、单位、通讯地址、邮编、联系电话等,请以Word形式投送电子稿件,不接受纸质投稿。

三、奖励办法

由全国中医药界知名专家组成评审委员会,将评出一等奖1~2篇,每篇奖励5000元; 二等奖5~10篇,每篇奖励4000元; 三等奖10~15篇,每篇奖励3000元; 优秀奖若干篇,每篇奖励价值500元的精美礼品一份。获奖者将获得由主办单位颁发的获奖证书、奖金或礼品,获奖文章达到刊用标准者将在《中医杂志》等期刊上发表,其他获奖文章达到标准者将在《中医杂志》增刊发表,并赠送样刊1册。评选结果将在颈复康药业集团有限公司官网、《中医杂志》《中国医药报》《中国中医药报》等媒体上公布。主办单位将邀请部分获奖者免费参加颁奖大会及学术交流与知名专家现场交流。颁奖大会具体时间、地点另行通知。

本次征文不收取任何费用,来稿请于2019年12月31日前发至邮箱: jtcmm@163.com。联系地址: 北京市东直门内南小街16号中医杂志社,联系人: 22号编辑,邮编: 100700,电话: (010) 64035632。