

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.06.012

实验研究

远志散对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆能力及海马紧密连接蛋白表达的影响

李斌, 李佳欣, 郝彦伟, 谢沛俊, 龚道银, 张怡✉

成都中医药大学附属医院, 四川省成都市十二桥路39号, 610072

[摘要] 目的 探讨远志散治疗阿尔茨海默病的可能作用机制。方法 30只快速老化(SAMP8)小鼠随机分为模型组、盐酸多奈哌齐组、远志散组, 每组10只, 另设10只抗快速老化小鼠(SAMR1小鼠)作为空白组。盐酸多奈哌齐组给予2 mg/(kg·d)盐酸多奈哌齐灌胃, 远志散组给予12 g/(kg·d)远志散灌胃, 灌胃量均为10 ml/kg; 空白组、模型组以无菌水10 ml/kg灌胃。各组均每日1次, 连续8周。采用Morris水迷宫实验观察各组小鼠学习记忆能力, HE染色检测海马CA1区神经元病理, 免疫组化检测海马CA1区 β 淀粉样蛋白 $_{1-42}$ ($A\beta_{1-42}$)表达, 硫磺素S(Thioflavine-S)染色观察海马 β 淀粉样蛋白($A\beta$)聚集情况, Western blot法检测海马组织中胞质附着蛋白(ZO-1)、闭锁蛋白5、咬合蛋白表达。结果 与空白组比较, 模型组小鼠Morris水迷宫实验中第2、3、4天逃避潜伏期显著延长, 进入有效区次数和有效区内停留时间显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 病理结果显示小鼠神经细胞层数减少, 固化萎缩的神经元数量明显增加; $A\beta_{1-42}$ 蛋白在海马CA1区有丰富表达, Thioflavine-S荧光强度明显增强; 海马ZO-1、闭锁蛋白5、咬合蛋白表达水平均明显下降($P<0.01$)。Morris水迷宫实验中盐酸多奈哌齐组与远志散组小鼠逃避潜伏期均逐日缩短($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 且第3、4天的逃避潜伏期显著短于同日的模型组, 进入有效区次数和有效区停留时间均较模型组增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 盐酸多奈哌齐组与远志散组小鼠神经元数量均较模型组增加, 固化萎缩的神经元数量均减少; Thioflavine-S荧光强度均较模型组明显减弱, $A\beta_{1-42}$ 蛋白在海马CA1区中均呈低表达; 海马中ZO-1、闭锁蛋白5、咬合蛋白表达水平均高于模型组($P<0.01$)。远志散组与盐酸多奈哌齐组小鼠各指标比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 远志散能提高SAMP8小鼠学习记忆能力, 抑制 $A\beta$ 在海马中异常聚集, 其机制可能与提高海马紧密连接蛋白ZO-1、闭锁蛋白5、咬合蛋白表达和改善血脑屏障功能有关。

[关键词] 阿尔茨海默病; 远志散; β 淀粉样蛋白; 紧密连接蛋白; 血脑屏障

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)是一种慢性神经退行性疾病, 其典型的临床特征是隐袭起病、缓慢进展, 表现为全面性认知功能障碍和学习记忆能力下降。调查显示, 我国60岁及以上人群中痴呆症患者约为1507万例, 其中AD患者约983万例^[1]。大量 β 淀粉样蛋白(amyloid- β , $A\beta$)在脑内的沉积是AD重要的病理学特征之一^[2]。完整的血脑屏障通过微血管内皮受体介导的转运机制

调节脑内 $A\beta$ 的清除, 而血脑屏障功能异常发生于AD的早期阶段^[3]。血脑屏障功能异常可导致 $A\beta$ 转运清除障碍, 促使脑内 $A\beta$ 浓度增高, 加剧了寡聚体与淀粉斑块的形成, 进而引发神经细胞凋亡和AD的发生^[4]。紧密连接是血脑屏障通透性调节的中心环节, 其中胞质附着蛋白(ZO-1)、闭锁蛋白5及咬合蛋白是紧密连接的主要功能蛋白^[5]。

远志散出自《圣济总录》, 具有益气开窍化痰之功, 善治“好忘”之证, 能改善记忆和认知能力^[6-7]。本研究观察远志散对快速老化小鼠(SAMP8小鼠)学习记忆能力、海马紧密连接相关蛋白表达和 $A\beta$ 聚集的影响, 从血脑屏障功能角度

基金项目: 国家自然科学基金(81704024, 82174345); 中国出土医学文献与文物研究中心科研项目(2020c03); 四川省科技计划(2021YJ0435); 四川省中医药管理局中医药科研专项(2021MS058)

✉ 通讯作者: zhangyi2288@163.com

探讨其治疗 AD 的可能机制。本实验通过成都中医药大学动物实验伦理委员会审查(编号:2017-02)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SAMP8 小鼠 30 只, 同性别抗快速老化小鼠 (SAMR1 小鼠) 10 只, 6 月龄, 体质量 (24±2) g, 北京大学医学部实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2016-0010。动物饲养于成都中医药大学中医脏腑病实验室动物房, 温度 22~25 °C, 湿度 50%~70%, 12 h 明暗循环, 自由饮水进食。

1.2 药物

远志散组成: 远志 12 g、石菖蒲 18 g、茯苓 15 g、人参 9 g、黄连 12 g, 由四川新绿药业科技公司制成标准中药免煎颗粒剂, 用无菌水融化成 1.2 g/ml 浓度药液; 盐酸多奈哌齐片, 5 mg/片, 卫材 (中国) 药业有限公司, 批号: 1905030。

1.3 主要试剂及仪器

ZO-1 抗体 (货号: ab190085)、咬合蛋白抗体 (货号: ab216327), Abcam 公司; 闭锁蛋白 5 抗体 (货号: 35-2500), Thermo Fisher 公司; β 淀粉样蛋白₁₋₄₂ ($A\beta_{1-42}$) 抗体 (货号: 805509), Biolegend 公司; β -actin (货号: TA-09)、DBA 显色试剂盒 (货号: ZLI-9018)、正常羊血清 (货号: ZLI-9021), 北京中杉金桥生物技术有限公司; HRP 标记抗兔 IgG (货号: 7074s)、HRP 标记抗小鼠 IgG (货号: 7076s), 美国 CST 公司; 硫磺素 S (Thioflavine-S) (货号: T1892)、苏木素 (货号: H3136)、伊红 (货号: 230251), 美国 Sigma 公司; 水合氯醛 (货号: 302-17-0), 天津市大茂化学试剂厂; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号: P0012), 上海碧云天生物技术有限公司。

Super Maze Morris 水迷宫 (XR-XM101 型, 上海欣软科技有限公司); 全波长多功能酶标仪 (Multiskan GO 型, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 光学显微镜 (ECLIPSE Ci-L 型, 日本 Nikon 公司); 荧光显微镜 (BX53 型)、显微镜成像系统 (DP72 型), 日本 Olympus 公司; 电泳系统 (Power-PAC200 型)、转膜仪 (Trans-Blot 型)、激光成像系统 (Pharos FX 型), 美国 Bio-Rad 公司; 低温离心机 (CF-16RX 型, 日本 Hitach 公司); 石蜡包埋机 (EG1160 型)、石蜡切片机 (RM2135 型), 德国 Leica 公司。

1.4 分组及给药

将 30 只 SAMP8 小鼠采用随机数字表法分为模型组、盐酸多奈哌齐组、远志散组, 每组 10 只, 另将 10 只 SAMR1 小鼠作为空白组。盐酸多奈哌齐组给予 2 mg/(kg·d) 盐酸多奈哌齐片灌胃, 远志散组给予 12 g/(kg·d) 远志散灌胃, 灌胃剂量根据人和动物按体表面积折算的等效剂量比率表^[8]换算得出。空白组、模型组小鼠灌胃等体积无菌水。各组灌胃量均为 10 ml/kg, 每日 1 次, 连续给药 8 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 Morris 水迷宫实验测试学习记忆能力 各组小鼠在给药期的最后 5 天进行 Morris 水迷宫实验, 通过视频图像采集系统将水桶虚拟地呈“十”字平均分为 I、II、III、IV 四个象限, 将圆形站台放置于 IV 象限中央, 保持位置固定不变, 将其余三个象限的池壁中点分别作为入水点。实验持续 5 天, 前 4 天为定位航行实验。每天将小鼠面向池壁, 依次从入水点放入水中, 记录小鼠爬上圆形站台的时间 (即逃避潜伏期), 若 90 s 内未找到则记录为 90 s。每次结束后均将小鼠留滞或放置站台 10 s。第 5 天为空间搜索实验, 撤除圆形站台, 依次从 I、II、III 象限入水点将动物面向池壁放入水中, 分别记录动物 90 s 内穿越原圆形站台所在位置次数和有效区 (圆形站台直径 2 倍范围) 停留时间。

1.5.2 HE 染色观察海马 CA1 区病理形态 Morris 水迷宫实验测试结束后, 每组采用随机数字表法选取 4 只小鼠, 用 3% 水合氯醛 (10 ml/kg) 腹腔注射麻醉后行心脏灌注, 完整取出脑组织, 置于 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片。选取左侧脑组织切片进行苏木素-伊红染色, 光学显微镜下观察各组小鼠海马 CA1 区组织形态并拍照。

1.5.3 免疫组化检测海马中 $A\beta$ 的表达 采用 SP 二步法进行常规脱蜡、阻断内源性过氧化物酶, 5% 正常羊血清封闭, 滴加相应 $A\beta_{1-42}$ 一抗 (1:150) 4 °C 过夜, 滴加二抗 (1:200) 室温孵育 30 min, DAB 显色、苏木素复染、乙醇脱水、透明、中性胶封片, 光学显微镜下观察海马 CA1 区并拍照。

1.5.4 Thioflavine-S 染色观察海马 $A\beta$ 聚集情况 取适量 Thioflavine-S 粉末用 50% 乙醇配制成 0.3% Thioflavine-S 溶液, 混匀, 避光保存。选取右侧脑组织切片, 常规脱蜡漂洗后加 0.3% Thioflavine-S 溶

液于组织上，室温孵育 8 min。经 50% 乙醇、TBS 漂洗后吸去多余的水分，滴加抗淬灭封片剂（含 DAPI）封片，荧光显微镜下观察并拍照。

1.5.5 Western blot 法检测海马 ZO-1、闭锁蛋白 5、咬合蛋白表达 每组剩余 6 只小鼠，颈椎脱臼法处死并迅速断头取脑，剥取双侧完整海马组织，称量 100 mg 海马组织后放入匀浆器中，按 1 ml/100 mg 比例加入预冷的细胞裂解液，冰上充分匀浆。4℃、12 000 r/min，离心半径 8 cm，离心 10 min 收集上清，BCA 法测定蛋白浓度。样品蛋白经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，电转移至 NC 膜，封闭 2 h，分别加入一抗（ZO-1 抗体，1:1000；闭锁蛋白 5 抗体，1:1000；咬合蛋白抗体，1:1000）4℃孵育过夜。次日二抗（1:2000）室温孵育 1 h 后，利用 Pharos FX 激光成像系统及 Quantity one 4.6.9 图像处理分析软件处理，确定其相对含量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计，各组计量数据均符合正态分布，以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间采用重复测量资料的方差分析或单因素方差分析，方差齐行 LSD 检验，方差不齐行 Dunnett's T^s 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 Morris 水迷宫行为学结果比较

表 1 示，随着训练天数的增加，空白组、盐酸多奈哌齐组、远志散组小鼠逃避潜伏期均逐日缩短

($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；模型组仅第 4 天逃避潜伏期较第 3 天显著缩短 ($P<0.01$)。与空白组同时间比较，模型组第 2、3、4 天逃避潜伏期显著延长 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组比较，远志散组、盐酸多奈哌齐组第 3、4 天小鼠的逃避潜伏期均有缩短 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；远志散组与盐酸多奈哌齐组各时间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 示，与空白组比较，模型组小鼠的进入有效区次数和有效区停留时间均显著减少 ($P<0.01$)；与模型组比较，远志散组、盐酸多奈哌齐组小鼠的进入有效区次数和有效区停留时间均增加 ($P<0.05$)；远志散组与盐酸多奈哌齐组进入有效区次数和有效区停留时间差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 2 各组小鼠空间搜索实验结果比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	进入有效区 次数/次	有效区停留 时间/s
空白组	10	2.17±0.48	5.43±1.68
模型组	10	0.83±0.31 ^{a)}	2.64±1.22 ^{a)}
盐酸多奈哌齐组	10	1.67±0.33 ^{b)}	4.36±1.06 ^{b)}
远志散组	10	1.50±0.22 ^{b)}	4.01±1.77 ^{b)}

注：a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

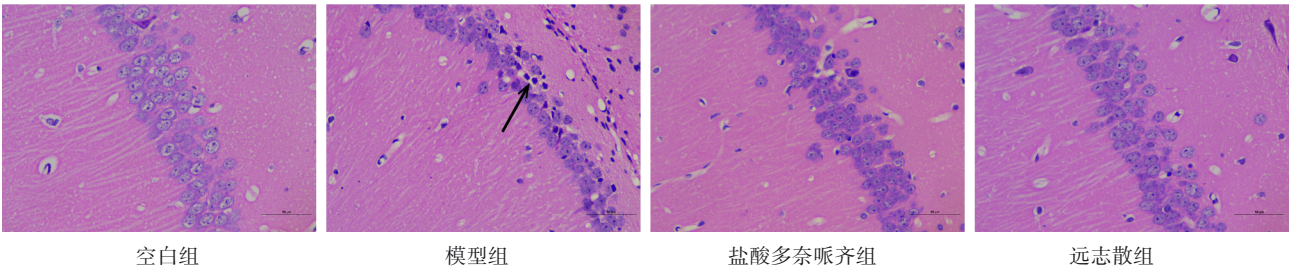
2.2 各组小鼠海马 CA1 区神经元 HE 染色结果

图 1 示，空白组小鼠海马 CA1 区神经元细胞层数多，排列整齐，形态完整，胞核与胞质界限清

表 1 各组小鼠不同时间定位航行实验逃避潜伏期比较 ($s, \bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
空白组	10	58.20±16.64	33.78±4.06 ^{a)}	26.85±6.16 ^{b)}	14.74±4.95 ^{d)}
模型组	10	62.37±15.73	55.96±15.62 ^{e)}	49.72±9.68 ^{f)}	33.15±7.58 ^{d) f)}
盐酸多奈哌齐组	10	51.20±17.71	44.58±21.28 ^{a)}	33.13±17.28 ^{c) g)}	24.13±7.44 ^{d) g)}
远志散组	10	52.63±20.19	46.18±10.52 ^{a)}	32.77±9.79 ^{c) g)}	22.62±5.10 ^{d) h)}

注：a) 与本组第 1 天比较， $P<0.05$ ；b) 与本组第 2 天比较， $P<0.05$ ；c) 与本组第 2 天比较， $P<0.01$ ；d) 与本组第 3 天比较， $P<0.01$ ；e) 与空白组同时间比较， $P<0.05$ ；f) 与空白组同时间比较， $P<0.01$ ；g) 与模型组同时间比较， $P<0.05$ ；h) 与模型组同时间比较， $P<0.01$ 。



注：箭头所示为细胞间隙增宽、核染色加深。

图 1 各组小鼠海马 CA1 区病理学改变 (HE 染色，×400)

晰,核膜核仁清晰;与空白组比较,模型组小鼠神经细胞层数减少,细胞间隙增宽、排列松散,核染色加深、均质呈固化萎缩的神经元数量明显增加,小胶质细胞数量增多。与模型组比较,远志散组小鼠神经元数量增加,细胞层数增多,胞核与胞质界限较清晰,形态结构有明显改善,固化萎缩的神经元数量减少,小胶质细胞数量减少。与模型组比较,盐酸多奈哌齐组小鼠神经元数量增加,排列整齐,结构较清晰,核仁形态完整。

2.3 各组小鼠海马CA1区 $A\beta_{1-42}$ 表达比较

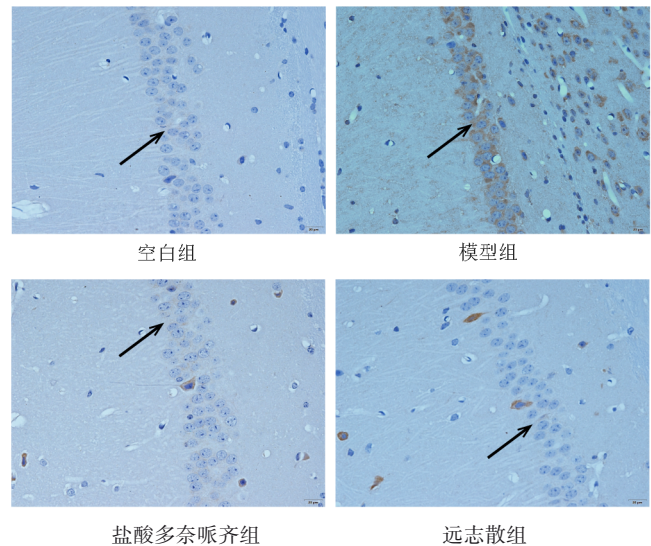
图2示,神经元中棕黄色颗粒为阳性表达,空白组小鼠 $A\beta_{1-42}$ 蛋白在海马CA1区中有少量表达,模型组小鼠 $A\beta_{1-42}$ 蛋白在海马CA1区有丰富表达,远志散组和盐酸多奈哌齐组小鼠 $A\beta_{1-42}$ 蛋白在海马CA1区均呈低表达,两组无明显差异。

2.4 各组小鼠海马 $A\beta$ 聚集情况比较

Thioflavine-S不易与天然的蛋白或小的蛋白聚集结合,而容易与异常聚集形成大团块的蛋白结合。Thioflavine-S染色可检测神经元内异常聚集的蛋白质表达,能特异性地与成熟的 $A\beta$ 结合,标记为绿色荧光。图3示,与空白组比较,模型组Thioflavine-S荧光强度明显增强。与模型组比较,远志散组Thioflavine-S荧光强度减弱,表明远志散一定程度上降低了 $A\beta$ 在脑内聚集;盐酸多奈哌齐组Thioflavine-S荧光强度亦减弱,与远志散组无明显差异。

2.5 各组小鼠海马中ZO-1、闭锁蛋白5、咬合蛋白表达比较

表3示,与空白组比较,模型组小鼠海马ZO-1、闭锁蛋白5、咬合蛋白表达水平明显下降($P <$



注:箭头所示为神经元阳性表达。

图2 各组小鼠海马CA1区中 $A\beta_{1-42}$ 的表达免疫组化法检测结果(IHC, $\times 400$)

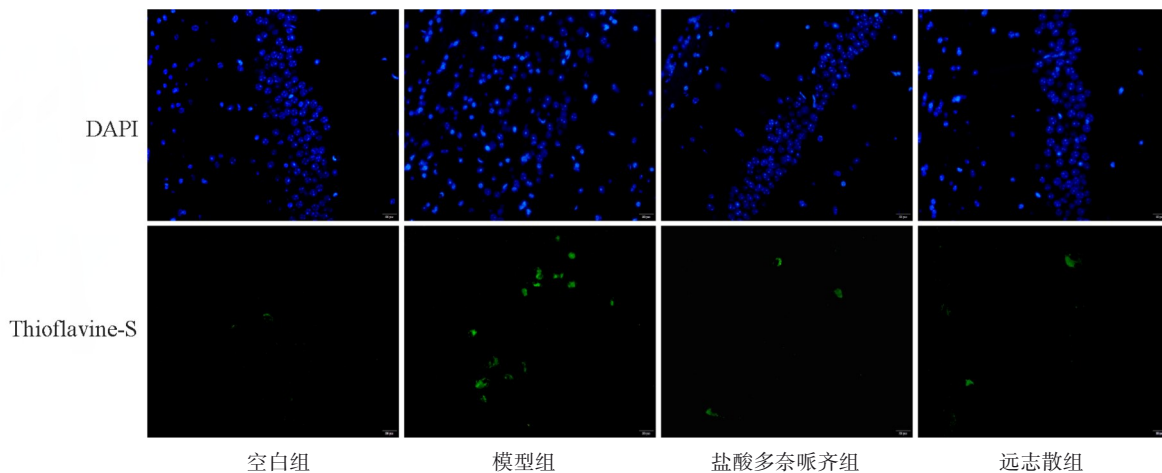
表3 各组小鼠海马ZO-1、闭锁蛋白5、咬合蛋白表达比较 (灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ZO-1	闭锁蛋白5	咬合蛋白
空白组	6	48.14 $\pm$ 2.48	50.42 $\pm$ 3.57	53.80 $\pm$ 4.88
模型组	6	16.08 $\pm$ 1.30 ^{a)}	33.26 $\pm$ 4.80 ^{a)}	18.59 $\pm$ 3.26 ^{a)}
盐酸多奈哌齐组	6	40.60 $\pm$ 3.94 ^{b)}	44.28 $\pm$ 2.45 ^{b)}	43.84 $\pm$ 2.20 ^{b)}
远志散组	6	39.93 $\pm$ 4.26 ^{b)}	43.84 $\pm$ 2.86 ^{b)}	41.69 $\pm$ 2.72 ^{b)}

注:ZO-1,胞质附着蛋白。

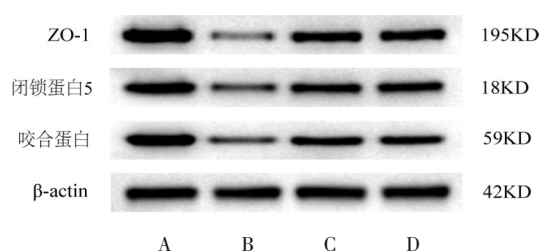
a)与空白组比较, $P < 0.01$; b)与模型组比较, $P < 0.01$ 。

0.01);与模型组比较,远志散组、盐酸多奈哌齐组小鼠海马中ZO-1、闭锁蛋白5、咬合蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$);远志散组与盐酸多奈哌齐组小鼠海马中ZO-1、闭锁蛋白5、咬合蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组小鼠海马中ZO-1、闭锁蛋白5、咬合蛋白电泳图见图4。



注:Thioflavine-S,硫磺素S。

图3 各组小鼠海马 $A\beta$ 聚集情况(Thioflavine-S染色, $\times 400$)



注：A，空白组；B，模型组；C，盐酸多奈哌齐组；D，远志散组；ZO-1，胞质附着蛋白。

图4 各组小鼠海马ZO-1、闭锁蛋白5、咬合蛋白电泳条带图

3 讨论

AD病证多归属于中医学“痴呆”“健忘”“呆病”等范畴。中医学认为，其病位在脑，脑之内外以“窍”相连。“窍”是体内外信息交互之门户，如《素灵微蕴·脏象解》曰：“七窍者，神气之所游行而出入也”。“窍”亦是神机运转之关键，表现为气血津液的运动或流通，窍闭则气机失调或气血逆乱^[9]。《素问·玉机真脏论篇》云：“脾不及则九窍不通。”脑窍归属于九窍，通九窍可通神窍^[10]。老年人脾虚运化不及，精微不布，聚湿为痰；脾虚升降不及，浊阴独留闭阻机窍，如《素问·六微旨大论篇》言：“出入废则神机化灭”，故认为气虚痰蒙窍闭是AD发生的重要环节。针对AD气虚痰蒙窍闭的病机，益气开窍化痰为治疗AD的基本思路。远志散出自宋代《圣济总录》，由远志、石菖蒲、茯苓、人参、黄连5味药物组成，原书记载本方“治健忘，补心气，强力益志”，有益气开窍化痰之功，善治“好忘”之证。现代研究采用数据挖掘方法分析健忘和痴呆的用药规律，发现远志散中的每味药均为高频中药，已作为治疗AD的基础方广泛用于临床^[11]。多项临床报道采用远志散加减方治疗AD疗效确切^[6,12-13]。课题组前期系统开展了远志散干预AD的基础研究，亦证实远志散具有多途径、多靶点的治疗作用^[14-18]。

作为神经-血管单元主要组成部分的血脑屏障在AD发病机制中扮演着重要角色^[19]。血脑屏障的结构破坏和功能异常发生在AD发病的早期，其在“双打击”机制^[20]的影响下又导致Aβ分子的转运清除障碍。在衰老的大脑中，遗传因素、环境因素或其他血管危险因素可导致大脑中的脑微循环受损，此为“第一次打击”，导致血脑屏障的结构和功能发生改变。因血脑屏障功能异常导致脑实质中Aβ转运清除障碍又促成了“第二次打击”，对大脑造成神经毒性作用，进一步加重神经元变性死亡。

血脑屏障主要是由脑毛细血管内皮细胞、周细胞、星形胶质细胞血管周足和基底膜构成，其中血管内皮细胞是血脑屏障的主要结构。紧密连接是位于血管内皮细胞最顶部的蛋白分子复合体结构，将不同形态、性状、大小的血管内皮细胞串联在一起。ZO-1与闭锁蛋白5、咬合蛋白是研究紧密连接的标志蛋白^[21]，在Aβ沉积的毛细血管周围神经炎症反应明显，神经元损伤严重，而该血脑屏障区域的紧密连接蛋白ZO-1、闭锁蛋白5及咬合蛋白数量减少了30%~40%^[22]。

本研究采用的SAMP8小鼠是较为理想的研究AD的自然发病动物模型，4月龄即可出现学习记忆功能衰退，且学习记忆能力随月龄增加不断减退，其在Aβ生成清除代谢异常等方面与AD病理表现具有相似性，而SAMR1则用于SAMP8的阴性对照动物进行研究^[23]。本研究结果显示，随着训练时间的增加，空白组、盐酸多奈哌齐组、远志散组小鼠逃避潜伏期均逐日缩短，模型组仅第4天逃避潜伏期较第3天显著缩短，表明小鼠的学习能力通过训练均有提高，且不同组别小鼠的学习能力不同。模型组小鼠较空白组平均逃避潜伏期显著延长，进入有效区次数和有效区内停留时间显著减少，与既往研究结果^[24]一致。海马是学习记忆功能相关的重要脑区，CA1和CA3区与空间位置、学习记忆密切相关，其中CA1最早出现老化^[25]。本研究中模型组海马CA1区神经细胞层数减少，细胞间隙增宽、排列松散，核染色加深、均质呈固化萎缩的神经元数量明显增加，小胶质细胞数量增多。免疫组化结果可见模型组小鼠Aβ₁₋₄₂蛋白在海马CA1区中有丰富表达，Thioflavin-S荧光强度明显增强，提示SAMP8小鼠海马中存在明显的Aβ异常聚集。经远志散干预后，小鼠逃避潜伏期有缩短，进入有效区次数和有效区停留时间均增加，说明远志散能有效改善SAMP8小鼠的学习和记忆能力；海马CA1区神经元数量较模型组增加，细胞层数增多，胞核与胞质界限较清晰，形态结构有明显改善，固化萎缩的神经元数量均减少，小胶质细胞数量减少，提示远志散对SAMP8小鼠的海马神经元损伤有较好的修复作用；Thioflavin-S荧光强度明显减弱，Aβ₁₋₄₂蛋白在海马CA1区呈低表达，表明远志散在一定程度上降低了Aβ在脑内聚集。Western blot结果显示，模型组小鼠海马组织中ZO-1、闭锁蛋白5、咬合蛋白表达均明显降低，提示SAMP8小鼠海马中紧密连接蛋白减少，血脑屏障结构受损。

相较于模型组,远志散组小鼠海马组织中 ZO-1、闭锁蛋白 5、咬合蛋白表达均明显升高,说明远志散可有效改善 SAMP8 小鼠血脑屏障功能,抑制 A β 在海马中异常聚集。远志散能改善 SAMP8 小鼠 Morris 水迷宫行为学结果、海马 CA1 区神经元形态、A β 1-42 表达及海马紧密连接蛋白表达情况,其作用与盐酸多奈哌齐相当。

综上所述,远志散能提高 AD 小鼠学习记忆能力,抑制 A β 在海马中异常聚集,其机制可能与提高海马紧密连接蛋白表达和改善血脑屏障功能有关。本研究主要针对血脑屏障功能及对 A β 的转运清除作用进行探讨,A β 的清除过程包括中枢途径清除和外周途径清除,后续将进一步探讨远志散促进 A β 在中枢和外周转运清除的可能机制。

参考文献

- [1] JIA L, DU Y, CHU L, et al. Prevalence, risk factors, and management of dementia and mild cognitive impairment in adults aged 60 years or older in China: a cross-sectional study[J]. *Lancet Public Health*, 2020, 5(12): 661-671.
- [2] PANZA F, LOZUPONE M, SERIPA D, et al. Amyloid-beta immunotherapy for alzheimer disease: Is it now a long shot?[J]. *Ann Neurol*, 2019, 85(3): 303-315.
- [3] MONTAGNE A, NATION DA, SAGARE AP, et al. APOE4 leads to blood-brain barrier dysfunction predicting cognitive decline[J]. *Nature*, 2020, 581(7806): 71-76.
- [4] RICCIARELLI R, FEDELE E. The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: It's time to change our mind[J]. *Curr Neuropsychopharmacol*, 2017, 15(6): 926-935.
- [5] DELI MA. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788(4): 892-910.
- [6] LI B, XIE PJ, HAO YW, et al. Yuan-zhi-san inhibits tau protein aggregation in an A β 1-40-induced Alzheimer's disease rat model via the ubiquitin-proteasome system[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(4): 279.
- [7] 李斌,谢沛俊,郭静,等. 加味远志散联合茴拉西坦治疗遗忘型轻度认知障碍(痰浊蒙窍证)的临床研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2021, 48(2): 111-113.
- [8] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1063.
- [9] 张电冲,于智敏. 窍闭探析[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(5): 564-565, 568.
- [10] 郭微艺,蒋薇,赵思琪,等. 基于“脾不及则九窍不通”诠释益气开窍法防治痴呆的科学内涵[J]. *中医杂志*, 2019, 60(20): 1798-1800.
- [11] 刘根,贺文彬,赵子强,等. 基于中医传承辅助平台对老年性痴呆防治方剂核心药物组合的筛选研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(7): 223-228.
- [12] 林丹霞,陈振. 开心散联合盐酸多奈哌齐片对阿尔茨海默病的初步临床研究[J]. *中医临床研究*, 2018, 10(23): 73-75.
- [13] 王健,林水森,周如倩,等. 调心方治疗阿尔茨海默氏病的临床研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2002, 25(3): 51-53.
- [14] 李斌,孙中莉,陈冠儒,等. 远志散对东莨菪碱致记忆获得性障碍模型小鼠行为学和脑内 AchE 活性的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2017, 34(5): 733-736.
- [15] 郭静,李斌,王智超,等. 远志散对 D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆及氧化应激水平的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(9): 2144-2147, 2314.
- [16] 谢沛俊,郝彦伟,郭静,等. 基于 PI3K/AKT/GSK-3 β 通路探讨远志散调控阿尔兹海默病大鼠 tau 蛋白磷酸化的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(11): 167-170, 280-286.
- [17] 郝彦伟,李斌,张怡,等. 基于脑肠肽 Ghrelin 水平探讨远志散对 AD 大鼠学习记忆能力及进食量的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(21): 8-14.
- [18] 李斌,谢沛俊,向劲松,等. 远志散对阿尔茨海默病大鼠空间认知能力的影响及其机制研究[J]. *中药材*, 2020, 43(9): 2238-2243.
- [19] SEGURA-COLLAR B, MATA-MARTINEZ P, HERNÁNDEZ-LAÍN A, et al. Blood-brain barrier disruption: a common driver of central nervous system diseases [J]. *Neuroscientist*, 2021; 1073858420985838. doi: 10.1177/1073858420985838.
- [20] HEINEMANN SD, POSIMO JM, MASON DM, et al. Synergistic stress exacerbation in hippocampal neurons: evidence favoring the dual-hit hypothesis of neurodegeneration [J]. *Hippocampus*, 2016, 26(8): 980-994.
- [21] REINHOLD A, RITTNER H. Barrier function in the peripheral and central nervous system: a review [J]. *Pflugers Arch*, 2016, 469(1): 123-134.
- [22] CARRANO A, HOOZEMANS JJ, VIES SMVAN DER, et al. Neuroinflammation and blood-brain barrier changes in capillary amyloid angiopathy [J]. *Neurodegener Dis*, 2012, 10(1-4): 329-331.
- [23] BUTTERFIELD DA, POON HF. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): a model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease[J]. *Exp Gerontol*, 2005, 40(10): 774-783.
- [24] 杨之雪,唐成林,李小宏,等. 电针调控 SAMP8 小鼠血

脑屏障增强盐酸多奈哌齐对 β -淀粉样蛋白的清除[J].
针刺研究, 2020, 45(4): 281-286.
[25] 杨辉, 钟方敏, 陈燕, 等. 补脑 I 号对阿尔茨海默病模

型小鼠脑内移植骨髓间充质干细胞后海马 VEGF、
BDNF 表达及超微结构的影响[J]. 中医杂志, 2021,
62(15): 1349-1355.

Effects of *Yuanzhi Powder* (远志散) on Learning and Memory and Expression of Tight Junction Proteins in Hippocampus of Alzheimer's Disease Model Mice

LI Bin, LI Jiaxin, HAO Yanwei, XIE Peijun, GONG Daoyin, ZHANG Yi

Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, 610072

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of *Yuanzhi Powder* (远志散) in the treatment of Alzheimer's disease (AD). **Methods** Thirty rapidly aging mice SAMP8 were randomly divided into a model group, donepezil hydrochloride group and *Yuanzhi Powder* group, with 10 rats in each group. Another 10 anti-rapidly aging mice SAMR1 were set as blank group. Donepezil hydrochloride at a concentration of 2 mg/(kg·d) and *Yuanzhi Powder* at a concentration of 12 g/(kg·d) were given by gavage to the corresponding group respectively, while sterile water was administered by gavage in the blank group and the model group. The dose was 10 ml/kg in all groups, and the interventions were administered once daily for 8 weeks. Morris water maze (MWM) was used to test the learning and memory. HE staining was used to detect neuronal pathology in hippocampal CA1 region. The expression of amyloid- β_{1-42} ($A\beta_{1-42}$) in hippocampal CA1 region was detected by immunohistochemistry, while amyloid- β ($A\beta$) aggregation was observed through thioflavine-S staining. Western blotting was used to detect the expression of cytoplasmic attachment protein (ZO-1), claudin-5 and occludin in hippocampus. **Results** Compared to those in the blank group, the escape latency on day 2, 3, 4 in the model group was prolonged significantly, and the number of entries into the target quadrant and the time spent in target quadrant using MWM were significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The pathological results showed the layers of nerve cells decreased and the solidified atrophy neurons increased in the model group. Moreover, $A\beta_{1-42}$ proteins were abundantly expressed in hippocampal CA1 region, the fluorescence intensity of Thioflavine-S was significantly enhanced, and the expression levels of ZO-1, claudin-5 and occludin in the hippocampus were significantly decreased in the model group ($P < 0.01$). The escape latency detected by WMW decreased day by day in the donepezil hydrochloride group and the *Yuanzhi Powder* group, and was significantly shorter than that in the model group on the same day, while on day 3 and day 4, the the number of entries into the target quadrant and the time spent in target quadrant increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to those in the model group, the layers of nerve cells significantly increased, while the solidified atrophy neurons decreased in donepezil hydrochloride group and the *Yuanzhi Powder* group. Moreover, the fluorescence intensity of Thioflavine-S was significantly weakened; $A\beta_{1-42}$ proteins was lowly expressed in the hippocampal CA1 region; and the expression levels of ZO-1, claudin-5 and occludin in the hippocampus were higher ($P < 0.01$). There was no significant differences between *Yuanzhi Powder* group and donepezil hydrochloride group in all outcomes ($P > 0.05$). **Conclusion** *Yuanzhi Powder* can improve the learning and memory and inhibit the abnormal aggregation of $A\beta$ in the hippocampus of SAMP8 mice. The mechanism may be related to its functions of increasing hippocampal tight junction protein ZO-1, occludin-5, and occludin expression and improving blood-brain barrier function.

Keywords Alzheimer's disease; *Yuanzhi Powder* (远志散); amyloid- β ; tight junction protein; blood-brain barrier

(收稿日期: 2021-08-07; 修回日期: 2021-12-26)

[编辑: 王利芬]