地黄对阿尔茨海默病小鼠行为学的影响 及其对血脑屏障的保护作用

赵大鹏, 陆韵薇, 于顾然

南京中医药大学附属医院神经内科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨中药地黄对阿尔茨海默病模型小鼠日常活动能力和恐惧记忆能力的行为学影响及其对血脑屏障的保护作用。方法:38只4月龄APP/PS1双转基因小鼠随机分为模型对照组(给予等渗氯化钠溶液)、地黄小剂量组(给予地黄 $5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和地黄大剂量组(给予地黄 $12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),连续灌胃给药3个月,每日给药1次。分别采用筑巢实验和条件恐惧实验检测小鼠日常活动能力和恐惧记忆能力;硫黄素T染色检测小鼠皮层和海马CA1区 β 淀粉样蛋白(A β)沉积;免疫荧光双重标记染色检测小鼠皮层和海马CA1区血管内皮完整性及血脑屏障渗出情况。结果:与模型对照组比较,地黄小、大剂量组日常活动能力均明显改善(均 $P<0.01$);地黄大剂量组恐惧记忆能力明显提高($P<0.01$);地黄大剂量组皮层和海马CA1区A β 沉积量明显减少,面积占比明显减小,地黄小剂量组海马CA1区A β 沉积面积占比也减小(均 $P<0.05$);地黄小、大剂量组大脑皮层CD34阳性面积占比显著增加,纤维蛋白原阳性面积占比显著减小(均 $P<0.05$);地黄大剂量组海马CA1区CD34阳性面积占比显著增加,纤维蛋白原阳性面积占比显著减小(均 $P<0.05$)。结论:中药地黄可以提高模型小鼠的日常活动能力及恐惧记忆功能,减少脑内A β 沉积,且大剂量时效果更为显著;其机制可能与降低血脑屏障通透性、保护血脑屏障完整性有关。

[关键词] 阿尔茨海默病;地黄;日常活动能力;条件性恐惧记忆; β 淀粉样蛋白;血脑屏障;转基因小鼠

[中图分类号] R285 **[文献标志码]** A

Effects of *Radix Rehmanniae* on behavior and blood-brain barrier in Alzheimer's disease mice

ZHAO Dapeng, LU Yunwei, YU Guran (Department of Neurology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Corresponding author: YU Guran, E-mail: dr.ygrdf@163.com, <https://orcid.org/0000-0000-0003-0588-3183>

收稿日期:2021-03-03 接受日期:2021-07-05 网络预发表日期:2021-10-22

基金项目:国家自然科学基金(81573771)

第一作者:赵大鹏,博士研究生,主要从事神经退行性变性疾病中西医结合治疗研究;E-mail: zhaodapeng0302@163.com; <https://orcid.org/0000-0003-0588-3183>

通信作者:于顾然,教授,博士生导师,主要从事神经退行性变性疾病中西医结合治疗研究;E-mail: dr.ygrdf@163.com; <https://orcid.org/0000-0002-9356-8695>

0002-9356-8695

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the effects of *Radix Rehmanniae* on behavior and blood brain barrier (BBB) in Alzheimer's disease mice. **Methods:** Thirty-eight 4-month-old APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into three groups: model group, *Radix Rehmanniae* low-dose group and *Radix Rehmanniae* high-dose group. Saline, *Radix Rehmanniae* $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and *Radix Rehmanniae* $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ were given to each group by continuous gavage once a day for three months, respectively. The changes in activities of daily live and fear conditioning memory behavior of mice were examined by nesting behavior test and fear conditioning test, respectively. The β -amyloid protein ($\text{A}\beta$) depositions in cortex and hippocampal CA1 area of mice were detected by thioflavin T staining. The CD34 and activities fibrinogen (Fib) immunofluorescence double staining were used to determine the vascular endothelial integrity and BBB exudation. **Results:** Compared with model mice, activities of daily live were significantly improved in *Radix Rehmanniae* low-dose and high-dose groups (both $P < 0.01$), the fear memory ability was significantly increased in *Radix Rehmanniae* high-dose group ($P < 0.01$). The amount of $\text{A}\beta$ deposition in cortex and hippocampal CA1 decreased significantly in *Radix Rehmanniae* high-dose group, the area ratio decreased significantly; the area ratio of $\text{A}\beta$ deposition in hippocampal CA1 region in *Radix Rehmanniae* low-dose group also decreased (all $P < 0.05$). The proportions of CD34 positive area of cortex in low and high dose *Radix Rehmanniae* groups increased, the percentage of fibrinogen positive area decreased (all $P < 0.05$). The proportion of CD34 positive area in hippocampal CA1 region in *Radix Rehmanniae* high-dose group was significantly increased, the percentage of fibrinogen positive area decreased significantly (both $P < 0.05$). **Conclusions:** *Radix Rehmanniae*, especially high-dose can improve the activities of daily live and fear conditioning memory function of APP/PS1 mice, reduce the deposition of $\text{A}\beta$ in brain. The mechanism may be related to the reduction of BBB permeability and the protection of the integrity of BBB.

[**Key words**] Alzheimer's disease; *Radix Rehmanniae*; Activity of daily live; Fear conditioning memory; Amyloid β -protein; Blood-brain barrier; Transgenic mice

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2021, 50(5): 553-560.]

[**缩略语**] 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD); 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-dinidino-2-phenylindole, DAPI); β 淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, $\text{A}\beta$)

AD是一种以进行性认知损害和性格改变为特征的神经退行性变性疾病,日常活动能力受损及行为精神症状的出现往往给AD患者及照料者带来沉重的负担。目前治疗AD的常规药物并不能阻断疾病进程,因此寻找一种新的药物已成为临床研究的热点^[1]。祖国医学有着简便效廉的特点,且中药具有多靶点、不良反应小等优势,受到广泛关注。AD属于祖国医学中“痴呆”的范畴,

其基本病机为髓海不足、神机失用,其根本多为肾精亏虚、髓减脑消,故治疗也多用补虚扶正、充髓养脑的方法^[2]。在众多补肾益精药物中,地黄为古今医家所重用^[3],《神农本草经》描述其能“逐血痹,填骨髓,长肌肉”。

血脑屏障是血液与脑组织间的特殊屏障,可以阻止有害物质进入脑内损伤神经元。血脑屏障损伤是AD等神经退行性变性疾病患者脑部重要

的病理特征之一^[4]。因此,保护血脑屏障具有重要意义。本团队前期的体外研究结果显示,以地黄为君药的中药复方“补肾益精方”的含药血清以及地黄主要成分梓醇对血脑屏障均有保护作用^[5-6],且单味中药地黄的水煎剂也具有显著的神经保护功效^[7]。本研究进一步就单味中药地黄改善APP/PS1模型小鼠的日常活动能力和恐惧记忆能力等行为学进行观察,并探讨其在体内对血脑屏障的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂及仪器

38只4月龄雄性APP/PS1双转基因AD模型小鼠B6C3-Tg(APP^{swe}/PSEN1^{dE9})购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,许可证号为SCXK(苏)2018-0008。小鼠饲养于南京中医药大学无特定病原体级的动物实验屏障系统中,12 h光暗交替,温度为 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$,湿度为 $(50 \pm 5)\%$,自由饮水和摄食。所有实验程序均经南京中医药大学动物伦理委员会审批,并严格按照美国《实验动物饲养管理和使用指南》^[8]执行。

中药地黄颗粒(生、熟地黄比例1:1)为江阴天江药业有限公司产品(批号18112551);硫磺素T为上海源叶生物科技有限公司产品;兔抗纤维蛋白原 α 链单克隆抗体、鼠抗CD34单克隆抗体、山羊抗兔二抗、山羊抗大鼠二抗为英国Abcam公司产品;Nestlet棉花压片 $5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ 为南京何苗生物技术有限公司产品;ACH-100 Coulbourn恐惧条件系统为美国Coulbourn Instruments产品;莫里斯水迷宫视频分析系统为安徽正华生物仪器设备有限公司产品;Nikon ECLIPSE Ni荧光正置显微镜为日本尼康公司产品。

1.2 实验分组及取材

4月龄AD模型小鼠用随机数字表随机分为模型对照组(13只)、地黄小剂量组(12只)和地黄大剂量组(13只)。地黄颗粒溶解于等渗氯化钠溶液中,根据中药药理学通用粗略换算公式^[9],地黄小剂量组给予地黄 $5\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,地黄大剂量组给予地黄 $12\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。模型对照组给予等渗氯化钠溶液。各组均灌胃给药3个月,至小鼠7月龄时行筑巢实验、条件恐惧实验,再将小鼠以颈椎脱臼法处死后断头取脑,于左侧大脑半球前 $-1.70 \sim -2.30\text{ mm}$ 以 $5\text{ }\mu\text{m}$ 的厚度进行冠状位连续切

片。每组随机选取6只小鼠的大脑切片行染色分析。

1.3 筑巢行为实验检测模型小鼠日常活动能力

模型对照组、地黄小剂量组、地黄大剂量组各有9、12和13只小鼠进行筑巢行为实验,具体方法参考文献^[10]。测试第1天于夜节律开始前2 h(约17:00)将 $5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ 的2张压缩棉放置于笼中,分别于2、24、48 h按照文献^[11]中的评分标准进行评分。结果采用盲法打分,并统计小鼠的筑巢分数。

1.4 条件恐惧实验检测模型小鼠恐惧记忆能力

模型对照组、地黄小剂量组、地黄大剂量组各有7、10和12只小鼠进行条件恐惧实验。第1天为恐惧记忆形成。将小鼠放入实验箱中,关闭箱门。开启条件恐惧系统软件进行训练:首先小鼠在箱内自由活动3 min以适应环境;然后开启声音刺激(Tone音,2.5 Hz,85 dB),持续30 s;紧跟电刺激(0.75 mA),持续2 s;接着无声音刺激和电刺激2 min。以上声音刺激—电刺激—无任何刺激过程重复6次(共7次,时长1244 s)。第2天为恐惧记忆关联期,将小鼠放入实验箱中,关闭箱门。去掉声音刺激和电刺激,小鼠自由活动,时长1200 s。第3天进行恐惧记忆测试。在试验箱对角线加上纸板以改变之前的实验环境,在栅栏上放上纸板,使小鼠脚底触觉发生变化。设置测试条件:恐惧箱内室灯打开,放入小鼠自由活动并适应3 min;开始声音刺激(2.5 Hz,85 dB),持续30 s;停止2 min不给予任何刺激;再次给予声音刺激。整个过程共进行10次,总时长为1680 s,实验过程中保证外部环境安静。统计各组僵直时间百分比。

1.5 硫磺素T染色观察模型小鼠大脑 $\text{A}\beta$ 沉积情况

将小鼠大脑切片浸泡于多聚甲醛10 min,然后置于磷酸盐缓冲液(酸碱度为7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5 min。用50%乙醇配制0.3%硫磺素T溶液,用滤纸过滤,室温孵育8 min。将玻片置于磷酸盐缓冲液中在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5 min。切片甩干后滴加DAPI染液,室温避光孵育10 min。最后,用抗荧光淬灭封片剂封片。将制备好的硫磺素T染色切片置于荧光显微镜下用40倍视野观察并采集图像。每张切片随机选取皮层2个视野,海马CA1区1个视野,应用ImageJ软件分析每个视野中 $\text{A}\beta$ 沉积量和沉积面积占比(阳性总面积/统计场总面积)。

1.6 免疫荧光双重标记染色观察血脑屏障渗出情况

将小鼠大脑切片浸泡于多聚甲醛中10 min,然后置于磷酸盐缓冲液中在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5 min。滴加山羊血清50 μ L,室温孵育20 min,封闭非特异性结合位点。滴加一抗(1:100稀释)50 μ L,37 $^{\circ}$ C下湿盒孵育2 h,磷酸盐缓冲液浸洗3次,每次5 min。滴加二抗50 μ L,37 $^{\circ}$ C下避光孵育1 h,磷酸盐缓冲液浸洗3次,每次5 min。每张切片滴加DAPI染液50~100 μ L,室温避光放置5 min。最后用抗荧光淬灭封片剂封片。将制备好的切片置于荧光显微镜下用200倍视野观察并采集图像。每张切片随机选取皮层2个视野,海马CA1区1个视野观察,应用ImageJ软件分析每个视野中的阳性面积占比,即阳性总面积/统计场总面积。

1.7 统计学方法

采用GraphPad Prism 5 软件进行统计分析。正态分布的计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析,两两比较用最小差异法检验;非正态分布的计量数据以中位数(上下四分位数)[$M(Q_1, Q_3)$]表示,采用秩和检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 地黄可以改善AD模型小鼠的日常活动能力

筑巢2 h时,地黄小剂量组筑巢评分高于模型对照组($P<0.05$);筑巢24、48 h时,地黄小、大剂量组筑巢分数均高于模型对照组(均 $P<0.01$)。见表1。结果提示,地黄可以改善小鼠的日常活动能力。

2.2 地黄可以改善AD模型小鼠的恐惧记忆能力

模型对照组、地黄小剂量组和地黄大剂量组僵直时间百分比分别为(36.66 $\pm$ 12.95)%、(39.65 $\pm$ 13.74)%和(64.08 $\pm$ 11.08)%,其中地黄

大剂量组僵直时间百分比较模型对照组和地黄小剂量组均增加(均 $P<0.01$),地黄小剂量组僵直时间百分比较模型对照组也有所增加,但差异无统计学意义($P>0.05$)。结果提示,大剂量地黄可以提高AD模型小鼠的恐惧记忆能力。

2.3 地黄可以减少AD模型小鼠大脑A β 沉积

各组小鼠的皮层和海马CA1区均可见A β 沉积。与模型对照组比较,地黄大剂量组皮层和海马CA1区A β 沉积量明显减少,面积占比均减小(均 $P<0.05$);地黄小剂量组海马CA1区A β 沉积面积占比减小($P<0.05$)。与地黄小剂量组比较,地黄大剂量组大脑皮层的A β 沉积量明显减少($P<0.01$)。见图1和表2。结果提示,地黄可以促进A β 的清除,减少其在大脑中的沉积。

2.4 地黄可以保护AD模型小鼠血脑屏障内皮完整、减少血脑屏障渗出

免疫荧光双重标记染色结果显示,各组大脑皮层和海马CA1区均可见CD34及纤维蛋白原阳性表达。与模型对照组比较,地黄小、大剂量组大脑皮层CD34阳性面积占比均增加,纤维蛋白原阳性面积占比均减小(均 $P<0.05$);地黄大剂量组海马CA1区CD34阳性面积占比显著增加,纤维蛋白原阳性面积占比显著减小(均 $P<0.05$)。与地黄小剂量组比较,地黄大剂量组皮层CD34阳性面积占比显著增加($P<0.01$)。见图2和表3。结果提示,中药地黄可以保护血脑屏障的完整性,减少血脑屏障的渗出。

3 讨 论

祖国医学认为“痴呆”的基本病机为肾精亏耗、脑髓失养、神机失用,临床往往表现为呆傻愚笨、智能低下。又因肾在志为恐,肾虚亦表现为惊恐焦虑,严重影响日常生活功能,故补肾是治疗痴呆不可忽视的一面^[3]。中药地黄具有益精填髓的作用,《本草经疏》誉其为“补肾家之要药,益阴

表1 筑巢实验中各组小鼠不同时间段的评分比较

Table 1 Scores of nesting behavior in each group

组 别	<i>n</i>	[$M(Q_1, Q_3)$ 或($\bar{x}\pm s$)]		
		2 h	24 h	48 h
模型对照组	9	0.000(0.000,0.500)	0.500(0.250,1.000)	1.333 $\pm$ 1.031
地黄小剂量组	12	0.500(0.500,0.500)*	1.750(1.000,0.250)**	2.458 $\pm$ 0.620**
地黄大剂量组	13	0.500(0.000,0.500)	1.500(1.000,0.250)**	2.538 $\pm$ 0.628**

与模型对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$.

血之上品”，《本草纲目》中论述其可“填骨髓，长肌肉，生精血，补五脏之内伤不足，通血脉，利耳目”。现代药理学研究显示，地黄在治疗老年痴呆方面具有抗氧自由基、改善细胞内钙失衡、保护线粒体、改善神经递质功能、抑制细胞凋亡、调节神经内分泌等作用^[12]。但关于中药地黄对血脑屏障保护性研究较少，而AD的发病与血脑屏障的结构及功能的损伤又密切相关^[13]，因此研究血脑屏障的保护作用对AD的防治具有重要意义。

绿色荧光为β淀粉样蛋白阳性染色。模型对照组皮层和海马CA1区β淀粉样蛋白沉积量较多，地黄小剂量组和地黄大剂量组皮层及海马CA1区β淀粉样蛋白沉积量较模型对照组减少，尤以地黄大剂量组减少更为明显。标尺=100 μm。

图1 各组大脑皮层和海马CA1区β淀粉样蛋白硫黄素T染色结果

Figure 1 Thioflavin T staining of amyloid β-protein in cortex and hippocampus CA1 area

APP/PS1 双转基因小鼠是AD的有效评价模型。该模型可以较好地模拟细胞外Aβ沉积等AD的神经病理学特征，对AD的研究价值较大，是目前作为AD实验中最常用的模型动物^[14]。日常活动能力减退及记忆力下降严重影响了AD患者的生活。本研究采用筑巢实验和条件恐惧实验分别测试模型小鼠的日常活动能力和恐惧记忆能力。筑巢是小鼠的日常行为，其生理学基础复杂，可受内侧前额叶皮质、海马等脑区的控制^[15-16]。条件恐惧实验是基于经典的条件反射理论而建立的，即将一种条件性刺激和一种非条件性刺激相联系，以形成关联性学习记忆，从而测定动物的学习、不愉悦记忆经历和环境暗示之间关联的能力。条件恐惧实验常被用来评价动物的条件性恐惧记忆^[17]。本文资料显示，中药地黄可以明显改善AD小鼠的日常活动能力和恐惧记忆能力。

AD的病因迄今不明，研究发现与脑内Aβ异常沉积有关^[18]。在以往开展的各种临床和基础研究也说明Aβ是AD发病的关键环节^[19]。Aβ级联假说首次提出了以Aβ为主要成分的老年斑在细胞外沉积可能是AD发病机制的主要启动因素^[20]。大部分AD患者脑内Aβ升高是由脑组织对Aβ清除障碍所引起。美国学者发现纤维性Aβ沉淀内有β折叠结构^[21]，这些β折叠结构是与硫黄素结合的关键分子基础。硫黄素可以和Aβ中β折叠结构特异性结合，在激发光下呈现绿色荧光。硫黄素T染色结果显示，中药地黄可以有效减少Aβ在脑内的沉积。相关研究表明，脑中约90%的Aβ通过血脑屏障转移入血，并经过肝脏降解^[11]，在Aβ转运中起到重要作用。血脑屏障主要由脑微血管内皮细胞及内皮细胞间的紧密连接蛋白、周细胞、完整的基膜和胶质细胞足突组成^[22]。其中，脑微血管内皮细胞是脑内与外周血之间进行物质交换的主要场所，是构成其基本结构和维持其功

表2 各组大脑皮层和海马CA1区β淀粉样蛋白沉积量和面积占比

[M(Q ₁ , Q ₃)或(̄x ± s)]					
组 别	n	皮 层		海马CA1区	
		沉积量	面积占比	沉积量	面积占比
模型对照组	6	6.00(4.00,10.00)	0.64(0.32,1.20)	3.00(2.00,7.00)	0.46 ± 0.28
地黄小剂量组	6	4.00(3.25,10.00)	0.27(0.14,0.46)	1.00(0.75,2.50)	0.12 ± 0.13*
地黄大剂量组	6	1.50(1.00,2.00)***	0.13(0.00,0.28)*	1.00(1.00,1.25)*	0.12 ± 0.08*

与模型对照组比较，*P<0.05，**P<0.01；与地黄小剂量组比较，***P<0.01。

绿色荧光为CD34阳性表达,红色荧光为纤维蛋白原阳性表达。A:与模型对照组比较,地黄小剂量组和地黄大剂量组皮层CD34阳性面积明显增加,纤维蛋白原阳性面积明显减少;与地黄小剂量组比较,地黄大剂量组皮层CD34面积明显增加。B:与模型对照组比较,地黄小剂量组和地黄大剂量组海马CA1区CD34阳性面积增加,纤维蛋白原阳性面积减少,以地黄大剂量组更为显著。DAPI:4',6-二脒基-2-苯基吡啶。标尺=100 μm。

图2 各组大脑皮层和海马CA1区CD34、纤维蛋白原免疫荧光双重染色结果

Figure 2 Immunofluorescence double staining of CD34 and fibrinogen in cortex and hippocampus CA1 in each group

表 3 各组大脑皮层和海马CA1区CD34和纤维蛋白原阳性面积占比比较
Table 3 CD34 and fibrinogen positive area proportion in cortex and hippocampus CA1 area in each group

组 别	n	皮 层		海马CA1区	
		CD34		纤维蛋白原	
		CD34	纤维蛋白原	CD34	纤维蛋白原
模型对照组	6	0.124(0.083,0.200)	0.313(0.167,0.444)	0.136(0.087,0.217)	0.209±0.025
地黄小剂量组	6	0.295(0.197,0.358)*	0.111(0.067,0.146)**	0.202(0.148,0.415)	0.117±0.073
地黄大剂量组	6	0.431(0.324,0.551)***	0.092(0.080,0.104)**	0.442(0.313,0.665)*	0.110±0.043*

与模型对照组比较,*P<0.05,**P<0.01;与地黄小剂量组比较,***P<0.01.

能的最关键部分,在整个血脑屏障中起着重要作用^[23]。Aβ通过损伤脑微血管内皮细胞与紧密连接蛋白及相关转运蛋白的表达引起血脑屏障的功能异常及其通透性增加^[24]。一方面,高渗透性的血脑屏障使得外周循环中的神经毒素、致病微生物、炎症因子及免疫应答产物等进入脑内,引发并加剧AD病情发展^[25]。另一方面,AD患者脑内Aβ可以介导血脑屏障上紧密连接蛋白及相关转运蛋白的异常表达,导致脑内Aβ跨血脑屏障清除率大大降低,Aβ在脑内大量聚集,使神经元及内皮细胞损伤甚至凋亡,从而加剧AD病情^[26]。在血管内皮细胞标记物中,CD34抗原作为一种高度糖基化I型跨膜蛋白特异性最高,是最敏感的内皮细胞标记物^[27]。纤维蛋白原是人正常血浆蛋白成分,对细胞无毒副作用,不受浓度、电荷及巨噬细胞的影响,能更真实准确地反映血管的通透状态^[28],近年来作为内源性示踪剂被广泛采用。在中枢神经系统中,血脑屏障独特的屏障机制可以严格调控血液中的蛋白进入神经系统,正常情况下中枢神经系统中检测不到纤维蛋白原的存在。但在AD、缺血缺氧、放射性损伤等情况下血脑屏障被破坏^[29],血液中可溶性纤维蛋白原则可沉积于脑组织中。本研究以CD34标记微血管,以纤维蛋白原作为内源性示踪剂观察血脑屏障渗出情况。结果显示,中药地黄可以减轻血脑屏障的渗出,对血脑屏障有一定的保护作用。

综上所述,中药地黄特别是大剂量地黄可以较好地维护脑内微血管的完整,降低血脑屏障的通透性,加大脑内Aβ清除,改善AD模型小鼠的日常活动能力和恐惧记忆功能。本研究为中药地黄保护血脑屏障的体内机制提供了一定的实验依据,可为补肾益精法治疗AD提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] FAROUK F M, OOI L, LAW C S W, et al. Dual-target-directed ligand displaying selective butyrylcholinesterase inhibitory and neurite promoting activities as a potential therapeutic for Alzheimer's disease[J]. **Chemistry Select**, 2020, 5(36): 11229-11236.

[2] 周仲英. 中医内科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 180.

ZHOU Zhongying. **Internal medicine of traditional Chinese medicine**[M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2003: 180. (in Chinese)

[3] 芦 锰,周雨慧,李晓宁,等. 基于数据挖掘中医药治疗阿尔茨海默病用药规律研究[J]. **中国中药杂志**,2021, 46(6): 1558-1563.

LU Meng, ZHOU Yuhui, LI Xiaoning, et al. Research on regularity of traditional Chinese medicine in treatment of Alzheimer's disease based on data mining[J]. **China Journal of Chinese Materia Medica**, 2021, 46(6): 1558-1563. (in Chinese)

[4] TROMPETERO A, GORDILLO A, DEL PILAR M C, et al. Alzheimer's disease and Parkinson's disease: a review of current treatment adopting a nanotechnology approach[J]. **Curr Pharm Des**, 2018, 24(1): 22-45.

[5] 王丹丹. “补肾益精方”含药血清对血脑屏障的影响及该方治疗轻度认知功能障碍的疗效评价[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.

WANG Dandan. Evaluate the effect of serum containing Bushenyijingfang on the blood-brain barrier and the clinical study of Bushenyijingfang on mild cognitive impairment[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2016. (in Chinese)

[6] 刘晨阳. 梓醇对纤维状Aβ₁₋₄₂介导的体外血脑屏障的损伤具有保护作用[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.

LIU Chenyang. Catalpol provides a protective effect on fibrillary Aβ₁₋₄₂-induced barrier disruption in an in vitro model of the blood-brain barrier[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2018. (in Chinese)

[7] 陆韵薇,于顾然,符布清. 生地黄酒煎剂对H₂O₂诱导的PC12细胞凋亡的保护作用研究[J]. **江苏中医药**, 2016, 48(10): 103-105.

LU Yunwei, YU Guran, FU Bqing. Protective effect of

- Radix Rehmanniae Recen* water decoction on H_2O_2 -induced apoptosis of PC12 cells[J]. **Jiangsu Journal of Traditional Chinese Medicine**, 2016, 48(10): 103-105. (in Chinese)
- [8] National Research Council (US), Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research (US), et al. **Guide for the care and use of laboratory animals**[M]. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press, 2011.
- [9] 陈 奇. 中药药理研究方法学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 1261-1263.
CHEN Qi. **Research Methods in Pharmacology of Chinese Materia Medica**[M]. 3rd ed. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2011: 1261-1263. (in Chinese)
- [10] WESSON D W, WILSON D A. Age and gene overexpression interact to abolish nesting behavior in Tg2576 amyloid precursor protein (APP) mice[J]. **Behav Brain Res**, 2011, 216(1): 408-413.
- [11] LEWARCH C L, HOEKSTRA H E. The evolution of nesting behaviour in *Peromyscus* mice[J]. **Anim Behaviour**, 2018, 139: 103-115.
- [12] 崔 瑛. 怀庆熟地黄益智作用研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2002.
CUI Ying. Experimental study on mechanism of promoting intelligence with Huaqing Shudihuang [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2002. (in Chinese)
- [13] KOOK S Y, SEOK HONG H, MOON M, et al. Disruption of blood-brain barrier in Alzheimer disease pathogenesis[J/OL]. **Tissue Barriers**, 2013, 1(2): e23993.
- [14] WILCOCK D M, COLTON C A. Anti-amyloid- β immunotherapy in alzheimer's disease: relevance of transgenic mouse studies to clinical trials[J]. **J Alzheimer Dis**, 2008, 15(4): 555-569.
- [15] SZCZYPKA M S, KWOK K, BROTH M D, et al. Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice[J]. **Neuron**, 2001, 30(3): 819-828.
- [16] DEACON R M, CROUCHER A, RAWLINS J N. Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice[J]. **Behav Brain Res**, 2002, 132(2): 203-213.
- [17] UYS J D, STEIN D J, DANIELS W M, et al. Animal models of anxiety disorders[J]. **Curr Psychiatry Rep**, 2003, 5(4): 274-281.
- [18] 吴 江. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 331.
WU Jiang. **Neurology**[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2010: 331. (in Chinese)
- [19] SELKOE D J, HARDY J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years[J]. **EMBO Mol Med**, 2016, 8(6): 595-608.
- [20] HARDY J A, HIGGINS G A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis[J]. **Science**, 1992, 256(5054): 184-185.
- [21] STROUD J C, LIU C, TENG P K, et al. Toxic fibrillar oligomers of amyloid- β have cross- β structure[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2012, 109(20): 7717-7722.
- [22] DANEMAN R, PRAT A. The blood-brain barrier[J]. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2015, 7(1): a020412.
- [23] 常 铮, 许继平. 脑血管内皮细胞与神经系统变性病关系的研究进展[J]. **临床医学工程**, 2010, 3(17): 151-153.
CHANG Zheng, XU Jiping. Progress in study on relationship between brain microvascular endothelial cells and nervous system degenerative diseases[J]. **Clinical Medicine & Engineering**, 2010, 3(17): 151-153. (in Chinese)
- [24] YAMAZAKI Y, KANEKIYO T. Blood-brain barrier dysfunction and the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. **Int J Mol Sci**, 2017, 18(9): 1965.
- [25] MONTAGNE A, BARNES S R, SWEENEY M D, et al. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus[J]. **Neuron**, 2015, 85(2): 296-302.
- [26] SAGARE A P, BELL R D, ZLOKOVIC B V. Neurovascular dysfunction and faulty amyloid β -peptide clearance in Alzheimer disease[J]. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2012, 2(10): a011452.
- [27] 柏树令, 赵 丹. CD34抗原的生物学特性及其临床应用[J]. **解剖科学进展**, 2005, 11(1): 54-56, 60.
BAI Shuling, ZHAO Dan. Biological features of CD34 antigen and its clinical application[J]. **Progress of Anatomical Sciences**, 2005, 11(1): 54-56, 60. (in Chinese)
- [28] RYU J K, DAVALOS D, AKASSOGLU K. Fibrinogen signal transduction in the nervous system[J]. **J Thromb Haemost**, 2009, 7(Suppl 1): 151-154.
- [29] 田书娟, 吴卫平. 纤维蛋白沉积与多发性硬化和周围神经损伤关系研究现状[J]. **脑与神经疾病杂志**, 2008, 16(2): 149-151.
TIAN Shujuan, WU Weiping. The relationship between fibrin deposition and peripheral nerve injury in multiple sclerosis[J]. **Journal of Brain and Nervous Diseases**, 2008, 16(2): 149-151. (in Chinese)

[本文编辑 沈 敏 余 方]