

groups(2.5、5、10 mg/kg)。Mice were administered with corresponding drugs for continuous 28 days, once/day. The cardiac function indexes [heart rate (HR), left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular shortening fraction (FS), left ventricular wall thickness (LVWT) and left ventricular end-systolic volume (LVESV)] in each group were detected. The contents of heart damage markers such as serum creatine kinase (CK), creatine kinase isoenzyme (CK-MB) and myoglobin (Mb), inflammatory factor such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and nitric oxide synthase (iNOS) were detected by ELISA method. HE staining was performed to observe myocardial damages. The caspase-3, caspase-9 and MEK/ERK phosphorylation levels were detected by RT-PCR and Western blotting. **Results:** Compared with the control group, significant cardiomyocytes damage was observed in CVB3 model group, levels of HR, LVEF, FS and LVWT were significantly decreased ($P < 0.05$), the number of inflammatory cells in myocardial tissues, the levels of LVESV, Mb, CK, CK-MB, caspase-3, caspase-9, IL-6, TNF- α , IL-1 β , iNOS, MEK and ERK phosphorylation were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with CVB3 model group, cardiomyocytes damage was significantly alleviated in peiminine group, levels of HR, LVEF, FS and LVWT were significantly increased ($P < 0.05$), the number of inflammatory cells in myocardial tissues, the levels of LVESV, Mb, CK, CK-MB, caspase-3, caspase-9, IL-6, TNF- α , IL-1 β , iNOS, MEK and ERK phosphorylation were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Peiminine can protect myocardial damage in neonatal mice with CVB3 myocarditis, inhibit cardiomyocyte apoptosis, improve cardiac function, and relieve inflammation level, which may be related to inhibition of MEK/ERK phosphorylation.

Key words Peiminine, Coxsackie virus B myocarditis, MEK/ERK, Apoptosis, Inflammation reaction

基于脑内能量调节的人参对东莨菪碱致痴呆小鼠记忆障碍改善作用*

李根林 张露露 吴宿慧** 李寒冰 王凤娟 吕依妍

(河南中医药大学 河南省仲景方药健康衰老产业工程研究中心 郑州 450046)

摘要 目的: 研究人参对东莨菪碱致痴呆小鼠学习记忆障碍改善的可能作用特点。方法: 90 只 SPF 级 ICR 小鼠经水迷宫筛选后随机分为 6 组, 即空白对照组、模型对照组、阳性对照多奈哌齐 3 mg/kg 组、人参水煎液 3.21、1.61、0.8 g/kg 剂量组。每天上午 9 点测体重后腹腔注射东莨菪碱造模, 下午 2 点灌胃给药, 连续 16 d。实验结束时, 经 Morris 水迷宫观察小鼠的学习记忆能力。处死动物, 取脑, 经 HE 和尼氏染色观察海马病理改变 ($n = 6$), 同时 ELISA 法测定脑组织中 ATP、 H_2O_2 、NADP、ACh、AChE 水平。结果: 与空白对照组相比, 模型对照组小鼠水迷宫穿越平台次数显著降低, H_2O_2 、AChE 水平显著上升, ATP、ACh 水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 海马神经元损伤较重, 细胞排列紊乱; 与模型对照组相比, 多奈哌齐 3 mg/kg、人参水煎液 0.8、1.61、3.21 g/kg 给药后可使水迷宫穿越平台次数明显增加, H_2O_2 、AChE、NADP 水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 海马神经元损伤有效改善, 细胞排列整齐有序。结论: 人参可以通过下调大脑内 H_2O_2 引起的氧化应激反应、调节胆碱能神经递质活性及修复海马神经元的损伤来改善痴呆小鼠的学习记忆障碍。

关键词 人参; 记忆障碍; 胆碱能神经; 氧化型辅酶 II (NADP)

DOI:10.13412/j.cnki.zyyj.2020.01.012

阿尔兹海默病 (AD, Alzheimer's disease) 是一种起病隐匿的大脑能量代谢障碍导致的一种神经系统退行性疾病^[1], AD 主要的临床表现为记忆力减退、认知功能障碍、行为异常等^[2], 我国传统医学认为脑为“髓之海”“清窍之府”, 若脑失所养, 则清窍失灵, 神识迷蒙, 遂致痴呆发生。本课题组前期研究表明: AD 被称为三型糖尿病, 与大脑能量代谢障碍关系密切^[3], 尤其是线粒体功能下降时会促使大脑代谢障碍, 进一步导致 AD 的发生与发展。中药人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎^[4], 《神农本草经》记载: “人参主补五脏, 安精神……生津益智”, 在 AD 的治疗中, 具有明显的优势。现代药理研究表明: 人参及其活性物质具有改善记忆力、降血糖、调节机体功能稳态等多方面的作用, 且具有一定拟胆碱作用^[5-6]。且人参总皂苷可以改善 β -淀粉样蛋白 (25~35) 诱导的海马神经细胞毒性^[7]、Rb1 改善淀粉样蛋白诱导的 PC12 细胞

毒性^[8]、Rhl 对 AD 小鼠认知障碍的改善作用^[9]等相关研究, 但针对病因复杂的 AD, 人参整体入药如何通过多靶点、多途径改善 AD 患者大脑内能量代谢异常而发挥治疗优势, 目前的研究证据相对较少。

基于此, 本研究将依据 AD 造模的常规途径, 研究人参整体入药时对东莨菪碱致痴呆小鼠记忆障碍型 AD 的胆碱能神经功能、脑内能量代谢障碍等的改善作用, 为人参整体入药生津益智的科学内涵提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验药物 5 年生人参购自盛实百药业有限公司靖宇县人参种植基地, 经河南中医药大学中药资源鉴定教研室陈随清教授鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干

* 基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81503363); 河南省科技厅科技研发专项 (编号: 192102310173)。

** 通讯作者

作者

简介: 李根林, 硕士, 教授。Email: lgl88@hactem.edu.cn。

燥根和根茎,为《中国药典》2015版收载的正品。称取人参80 g,常温下加10倍量纯水煎煮1 h,过滤,滤渣加800 mL水再次煎煮40 min,合并两次滤液,浓缩至80 mL,浓度为含生药1 g/mL,放置-20℃冰箱中保存备用。用时稀释成浓度分别为0.04、0.08、0.16 g/mL人参水煎液的给药溶液。盐酸多奈哌齐片(重庆植恩药业有限公司生产,批号:20171201E3052,规格:5 mg/片),研磨后加蒸馏水溶解后超声,配制成0.15 mg/mL的溶液备用。氢溴酸东莨菪碱注射液(遂成药业股份有限公司,批号:1702011,规格:1 mL:0.3 mg)。

1.2 动物 ICR小鼠,SPF级,雄性,体重35 g~40 g,购于北京维通利华实验动物有限公司,动物生产合格证号:SCXK(京)2016-0006。按照动物伦理委员会要求饲养于河南中医药大学SPF级动物房(动物伦理批准号:DWLL2018030060),环境温度控制在(25±2)℃,光周期为12 L:12 D,适应性饲养3 d,开始实验。

1.3 试剂 小鼠氧化型辅酶Ⅱ(NADP) ELISA试剂盒(批号:201806020)、小鼠乙酰胆碱(ACh) ELISA试剂盒(批号:201806020),购自上海钰博生物科技有限公司;乙酰胆碱酯酶(AChE)试剂盒(批号:20180612)、过氧化氢(H₂O₂)试剂盒(批号:20180620)、ATP含量试剂盒(批号:20180622),购自南京建成生物工程研究所。

1.4 仪器 Morris水迷宫(S/N:ZH006500183);YMT-400小鼠Y迷宫,成都泰盟软件有限公司;Thermo赛默飞Multiskan GO全波长酶标仪(Thermo Scientific);Olympus BX61型电动显微镜(日本Olympus公司)。

1.5 方法

1.5.1 实验分组及给药 ICR小鼠,给药前用Morris水迷宫进行筛选,剔除反应不敏感的小鼠(90 s内不能找到平台的)后,

称重,按照体重随机分为6组。分别为模型对照组、空白对照组、多奈哌齐组、人参水煎液高、中、低剂量组各13只。每天上午9点称重后,按照0.2 mL/10g的给药体积,模型对照组与给药组均腹腔注射东莨菪碱注射液,空白组腹腔注射等体积生理盐水,每天1次,共给药16 d^[10];每天下午2点,除空白对照组和模型对照组灌胃等体积纯水外,人参水煎液高、中、低剂量组灌胃给药剂量分别为3.21 g/kg、1.61 g/kg、0.80 g/kg(相当于人用临床等效剂量24倍、12倍、6倍),阳性对照组盐酸多奈哌齐给药剂量为3 mg/kg^[11]。

1.5.2 行为学指标测定 Morris水迷宫实验^[12,13]具体操作步骤如下:剔除找不到站台的小鼠,筛选过后给药,实验结束前,对动物进行为期4 d的定位航行实验后,进行空间探索实验,实验过程中,水池周围参照物保持不变,通过分析小鼠穿越平台次数来反应小鼠学习记忆能力。

1.5.3 大脑功能指标测定 为了减少食物对各指标的影响,处死前一天晚上20点开始禁食12 h。给药后第19 d,摘眼球取血,颈椎脱臼法处死小鼠,在冰上立即取出脑组织,称重。匀浆后用ELISA法测定小鼠脑内氧化型辅酶Ⅱ(NADP)^[12]、乙酰胆碱(ACh)、乙酰胆碱酯酶(AChE)、过氧化氢(H₂O₂)、三磷酸腺苷(ATP)含量水平。

1.5.4 脑组织病理学形态观察 取出小鼠脑组织后,HE染色观察脑组织细胞形态,尼氏染色观察脑组织神经元损伤程度和尼氏小体丰富程度^[15,16],对小鼠海马病理切片进行评价。海马病理组织学评分=海马排列有序程度评分+细胞间隙大小评分+胞体形态正常程度评分;海马尼氏染色病理学评分=神经元损伤程度评分+尼氏小体丰富程度评分。评价标准见表1、2。

表1 海马病理组织学指数评分标准

海马排列有序程度	细胞间隙大小	胞体形态损伤程度	得分/分
CA1-4区及齿状回的椎体细胞层细胞带结构完整,分层明显。	细胞排列紧密	神经元体积较大,形态规则,结构清晰,胞浆透明。	0
CA1-4区及齿状回的椎体细胞层细胞带结构有缺失,不够完整,分层不明显。	细胞排列间隙较宽	部分神经元胞体较小,形态较不规则,胞浆染色较深。	1
CA1-4区及齿状回的椎体细胞层细胞带结构缺失,不完整,分层不明显。	细胞排列间隙宽	部分神经元胞体小,形态不规则,胞浆染色深。	2

表2 海马尼氏染色病理组织学指数评分标准

神经元损伤程度	尼氏小体丰富程度	得分/分
神经元正常,核仁明显,着色均匀。	尼氏小体数量较多,着色均匀。	0
神经元损伤较轻,细胞核核少量深染固缩,仍保留较多形态结构正常的神经元。	部分细胞和周围尼氏小体破碎消失。	1
神经元数量较少,胞体皱缩,出现深染,细胞结构受损,不清晰。	尼氏小体数量少,着色不均匀。	2

1.5.5 数据处理 采用SPSS19.0进行数据资料的统计学处理,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA),组间两两比较采用LSD法;等级资料比较采用Kruskal-Wallis H(K)秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人参水煎液对东莨菪碱致痴呆小鼠体重与行为学指标的影响 与空白对照组相比,模型对照组小鼠体重明显降低($P < 0.05$),水迷宫穿越平台次数明显减少($P < 0.05$),表明造模成功。与模型对照组相比,人参水煎液各组小鼠体重明显升高,多奈哌齐3 mg/kg组、人参水煎液各组小鼠穿越平台次数明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见表3。

表3 人参水煎液对东莨菪碱致痴呆小鼠模型体重及行为学指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=13$)

分组	剂量/ (g/kg)	体重/ (g)	水迷宫穿越平台次数/ (次)
空白对照		38.0 ± 1.5 *	5.0 ± 1.1 *
模型对照		36.3 ± 1.5	3.9 ± 0.9
多奈哌齐	3 × 10 ⁻³	37.2 ± 1.5	5.3 ± 1.3 *
人参水煎液	3.21	37.9 ± 2.3 *	5.4 ± 2.2 *
	1.61	37.8 ± 1.3 *	5.7 ± 0.9 *
	0.8	37.0 ± 1.3	5.0 ± 1.4 *

与模型对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (下同)。

2.2 人参水煎液对东莨菪碱致痴呆小鼠模型大脑能量代谢的影响 与空白对照组相比,模型对照组 ATP 水平明显降低 ($P < 0.05$)、 H_2O_2 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型对照组相比,多奈哌齐、人参水煎液各组 H_2O_2 及 NADP 水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表4。

表4 人参水煎液对东莨菪碱致痴呆小鼠模型大脑能量代谢相关指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

分组	剂量/ (g/kg)	ATP/ ($\mu\text{mol/g}$)	H_2O_2 / (mmol/g)	NADP/ ($\mu\text{mol/L}$)
空白对照	0	0.82 ± 0.29 *	3.73 ± 1.18 *	0.41 ± 0.14
模型对照		0.53 ± 0.17	8.88 ± 2.12	0.49 ± 0.07
多奈哌齐	3 × 10 ⁻³	0.57 ± 0.17	4.93 ± 1.23 *	0.37 ± 0.06 *
人参水煎液	3.21	0.66 ± 0.16	4.55 ± 1.52 *	0.43 ± 0.10
	1.61	0.52 ± 0.08	5.60 ± 1.30 *	0.37 ± 0.07 *
	0.8	0.52 ± 0.13	5.68 ± 2.31 *	0.37 ± 0.07 *

2.3 人参水煎液对东莨菪碱致痴呆小鼠模型大脑胆碱能神经递质的影响 与空白对照组相比,模型对照组 Ach 水平明显降

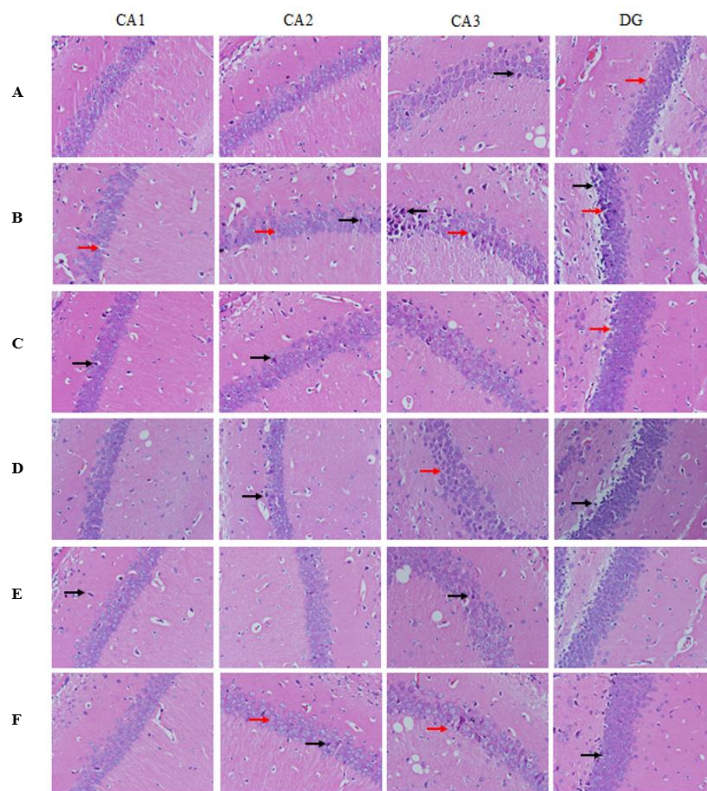
低 ($P < 0.05$), AChE 水平明显升高 ($P < 0.01$);与模型对照组相比,人参水煎液 3.21 g/kg 组 Ach 含量明显降低 ($P < 0.05$),各剂量组 AChE 水平显著降低 ($P < 0.01$)。见表5。

表5 人参水煎液对东莨菪碱致痴呆小鼠模型大脑胆碱能神经递质的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

分组	剂量/(g/kg)	ACh/(nmol/L)	AChE/(U/mg)
空白对照	0	2.66 ± 0.32 *	0.48 ± 0.09 *
模型对照		2.25 ± 0.17	0.68 ± 0.21
多奈哌齐	3 × 10 ⁻³	2.45 ± 0.40	0.56 ± 0.07
人参水煎液	3.21	2.54 ± 0.47 *	0.41 ± 0.09 *
	1.61	2.30 ± 0.20	0.47 ± 0.03 *
	0.8	2.17 ± 0.34	0.42 ± 0.10 *

2.4 人参水煎液对小鼠大脑组织病理形态的影响

2.4.1 HE 染色结果 秩和检验 Kruskal-Wallis H(K) 结果表明:空白对照组小鼠海马 CA1-4 (CA1、CA2、CA3、CA4) 区及齿状回(DG)的椎体细胞层细胞带结构完整,分层明显,细胞排列紧密,神经元形态规则,结构清晰,胞浆透明;与空白对照组相比,模型对照组小鼠海马 CA1-4 区及齿状回的椎体细胞层细胞带结构缺失,不完整,分层不明显,细胞间隙增大,部分神经元胞体小,形态不规则,胞浆染色深;与模型对照组相比,多奈哌齐 3 mg/kg 组、人参水煎液 0.8、1.61、3.21 g/kg 组小鼠 CA1-4 区及齿状回的椎体细胞层细胞带结构较完整,分层明显,细胞排列紧密,神经元体积较大,形态较规则,结构清晰,胞浆透明。见图1表6。



A: 空白对照; B: 模型对照; C: 多奈哌齐 3 mg/kg; D: 人参水煎液 3.21 g/kg; E: 人参水煎液 1.61 g/kg; F: 人参水煎液 0.8 g/kg; 黑色箭头: 细胞萎缩呈空泡状; 红色箭头: 细胞间隙增大。

图1 人参水煎液对东莨菪碱致痴呆小鼠模型海马组织病理形态的影响(HE, ×400)

表6 人参水煎液对东莨菪碱致痴呆小鼠模型海马 HE 染色病理评分的影响(n =6)

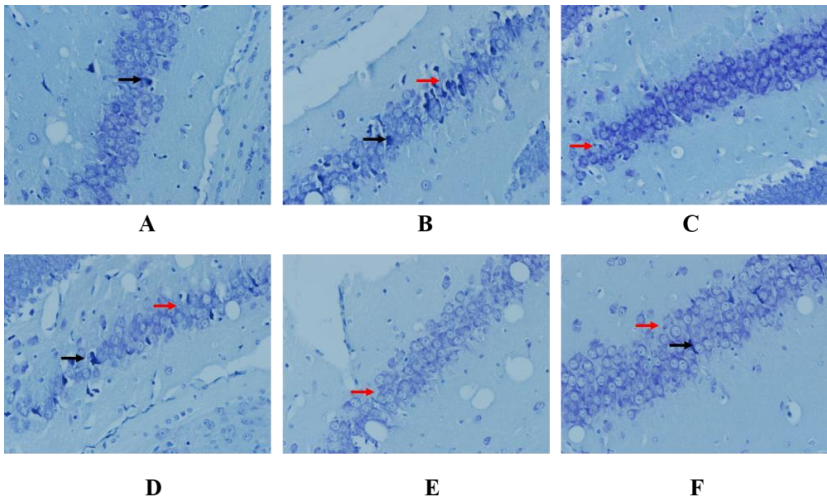
分组	剂量/ (g/kg)	海马 HE 染色病理评分 / 评分占比 / (%)				H*	P
		1-2	2-3	3-4	4-5		
空白对照	0	1 / 16.67	4 / 66.67	1 / 16.67	0 / 0.00	18.40	<0.01
模型对照		0 / 0.00	0 / 0.00	3 / 50.00	3 / 50.00		
多奈哌齐	3 × 10 ⁻³	1 / 16.67	2 / 33.33	3 / 50.00	0 / 0.00		
人参水煎液	3.21	1 / 16.67	4 / 66.67	0 / 0.00	1 / 16.67		
	1.61	5 / 83.33	1 / 16.67	0 / 0.00	0 / 0.00		
	0.8	3 / 50.00	2 / 33.33	1 / 16.67	0 / 0.00		

2.4.2 尼氏染色结果 秩和检验 Kruskal-Wallis H(K) 结果表明: 空白对照组脑海马区神经元排列整齐密集, 胞体饱满, 着色较深, 核大而圆, 可见较多尼氏小体。而模型对照组大鼠脑海马 CA4 区神经元数量稀少, 着色浅, 胞体萎缩呈空泡状, 尼氏小

体少见。而人参水煎液 0.8、1.61、3.21 g/kg 组脑海马区神经元恢复较好, 数量多, 胞体较为饱满, 着色较深, 核较大而圆, 可见较多尼氏小体, 特别是人参水煎液 1.61 g/kg 组更能明显恢复尼氏小体, 见图 2 表 7。

表7 人参水煎液对东莨菪碱致痴呆小鼠模型海马尼氏病理组织学指数评分的影响(n =6)

分组	剂量/ (g/kg)	海马尼氏染色病理评分 / 评分占比 / (%)				H*	P
		0-1	1-2	2-3	3-4		
空白对照	0	2 / 33.33	3 / 50.00	1 / 16.67	0 / 0.00	15.78	<0.01
模型对照		0 / 0.00	2 / 33.33	2 / 33.33	2 / 33.33		
多奈哌齐	3 × 10 ⁻³	2 / 33.33	3 / 50.00	1 / 16.67	0 / 0.00		
人参水煎液	3.21	1 / 16.67	5 / 83.33	0 / 0.00	0 / 16.67		
	1.61	2 / 33.33	4 / 66.67	0 / 0.00	0 / 0.00		
	0.8	2 / 33.33	4 / 66.67	0 / 0.00	0 / 0.00		



A: 空白对照; B: 模型对照; C: 多奈哌齐 3 mg/kg; D: 人参水煎液 3.21 g/kg; E: 人参水煎液 1.61 g/kg; F: 人参水煎液 0.8 g/kg; 黑色箭头: 细胞萎缩呈空泡状; 红色箭头: 细胞间隙增大。

图2 人参水煎液对东莨菪碱致痴呆小鼠模型海马尼氏体的影响(HE , ×400)

3 讨论

中枢胆碱能神经能系统在大脑学习记忆方面发挥重要的作用^[17], 东莨菪碱阻断中枢 M 胆碱受体, 引起胆碱能系统功能障碍, 出现记忆力减退、学习能力下降等一系列行为学改变, 是制备中枢胆碱能神经受损致痴呆动物模型的常用方法。在测试记忆障碍型 AD 治疗药物的有效性中广泛使用^[18-19]。本实验旨在采用东莨菪碱造记忆障碍型 AD 模型^[20-21], 研究人参对模型小鼠的学习记忆障碍改善的可能作用特点, 实验中运用 Morris 水迷宫检测后得知造模成功, 在给予药物处理后, 人参水煎液 1.61、3.21 g/kg 组与模型对照组相比, 小鼠的水迷宫穿越平台次数明显增加, 表明人参整体入药时对东莨菪碱致痴呆小鼠的记忆障碍有一定的改善作用。

本实验以胆碱能神经功能为出发点, 结合小鼠脑内能量代谢障碍的状态, 尽可能阐述人参改善记忆障碍的作用特点。众所周知, 中枢胆碱能递质对学习记忆具有十分重要的调节作用, ACh 与学习记忆关系最为密切, 人体缺少 ACh 会加速脑细胞的衰老, 使记忆力显著下降, 我们发现, 人参水煎液能提高脑组织 ACh 水平, 同时, 显著降低了 AChE 水平; 提示人参水煎液可以通过降低 AChE 水平、减少 ACh 水解来改善小鼠的学习记

忆功能, 与文献报道一致^[24]。在小鼠大脑的功能变化上, NADP 是线粒体内膜上氧化型辅酶 II, 是机体中维持氧化系统和抗氧化系统平衡的关键电子对, 主要功能是作为细胞代谢相关的氧化还原反应中的辅酶和细胞电子传递反应中的普通电子载体(信号分子), 参与氧化应激反应时快速转变为 NADPH, 在某些情况下, NADPH 还可以通过 NADPH 酶的活性将其电子转移到分子氧, 从而促进氧化应激的产生。过度刺激后的 NADPH 和电子传递链也会导致 ROS 的过量产生。H₂O₂ 具有细胞毒性, 若细胞内 H₂O₂ 水平上升, 则会产生细胞毒性, 造成细胞损伤。ATP 作为细胞内贮能的高能磷酸化合物^[23], 能与 ADP 的相互转化保证细胞各项生命活动的能量供应, 故 NADP 作为大脑细胞线粒体氧化磷酸化过程中的关键酶, 把电子传递过程中以产生的衡量大脑内的能量代谢水平的指标 ATP 和氧化过程中产生的衡量大脑内的氧化损伤状态的指标 H₂O₂ 联系起来。在本实验中, 我们发现: 模型对照组小鼠大脑内 NADP、H₂O₂ 含量有所增加, 可能会导致 ROS 的过量产生, 造成大脑细胞的氧化损伤而呈现出记忆障碍的 AD 状态。而人参各给药组与多奈哌齐均可降低痴呆小鼠脑组织中 NADP、H₂O₂ 含量, 缓解脑细胞内线粒体的氧化损伤, 改善由氧化损伤造成的记忆损失状态。但是我们也发现人参水煎液 3.21 g/kg 组虽然增加了小鼠脑组织

中 ATP 含量,但与模型对照组相比没有显著性差异,个中原因,我们将继续通过实验验证探讨。

另外,HE 和尼氏染色病理结果进一步印证人参整体入药的功效:与模型对照组相比,人参水煎液组小鼠海马 CA1-4 区及齿状回的椎体细胞层细胞带完整,分层明显,细胞排列紧密,神经元形态规则,结构清晰,尼氏小体明显增多^[17-25];提示人参水煎液可以抑制神经细胞的凋亡和退化,具有神经保护作用,对东莨菪碱致痴呆小鼠的学习记忆障碍有一定的防治作用。

综上所述,人参水煎液具有改善小鼠学习记忆障碍作用,该作用可能与改善胆碱能神经活性、降低 H_2O_2 水平、缓解脑细胞内线粒体的氧化损伤及抑制神经细胞的凋亡与退化有关,该结果可为人参的临床应用提供重要依据。

参考文献

- [1]Scheltens P,Blennow K,Breteler M M,et al. Alzheimer's disease. Lancet, 2016, 388(10043): 505-517.
- [2]Liguori C,Pierantozzi M,Chiaravallotti A,et al. When Cognitive Decline and Depression Coexist in the Elderly: CSF Biomarkers Analysis Can Differentiate Alzheimer's Disease from Late-Life Depression. Front Aging Neurosci, 2018, 10: 38.
- [3]吴宿慧,李寒冰,陈晓晖,等.胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路:"整合效应"治疗阿尔茨海默病潜在途径及人参的治疗特点及优势.中国老年学杂志,2018,38(23): 5867-5871.
- [4]于大猛,瞿融,范欣生."十八反"药物在历版《中国药典》中的演变.江苏中医药,2019,51(1): 68-70.
- [5]李倩,柴艺汇,高洁,等.人参现代药理作用研究进展.贵阳中医学院学报,2019,41(5): 89-92.
- [6]陈璐,冉磊.人参皂苷防治阿尔茨海默病的作用机制研究进展.中西医结合心脑血管病电子杂志,2018,16(17): 9.
- [7]张国双,王志涛,赵琦,等.人参总皂苷对 β -淀粉样蛋白_(25~35)诱导的海马神经细胞毒性的保护作用.中国老年学杂志,2016,36(18): 4438-4439.
- [8]Zeng X S,Jia J J,Ma L F. Gensenoside Rb1 protects rat PC12 cells from oxidative stress-induced endoplasmic reticulum stress: the involvement of thioredoxin-1. Mol Cell Biochem, 2015, 410(1~2): 239-246.
- [9]毕云枫,陶伟明,王溪竹,等.人参皂苷 Rb1 对 AD 小鼠认知障碍的改善作用食品工业科技,2019,40(24): 300-304.
- [10]Chen B H,Park J H,Kim D W,et al. Melatonin Improves Cognitive Deficits via Restoration of Cholinergic Dysfunction in a Mouse Model of Scopolamine-Induced Amnesia. 2018,9(8): 2016~2024.
- [11]蔡浩斌,潘华峰,郑浩涛,等.壮精合剂改善东莨菪碱小鼠模型认知功能的机制.中华中医药杂志,2019,34(4): 1372-1375.
- [12]Liu Y L,Chen W T,Lin Y Y,et al. Amelioration of amyloid-beta-induced deficits by Dcr3 in an Alzheimer's disease model. Mol Neurodegener, 2017, 12(1): 30.
- [13]Dong W,Wang R,Ma L N,et al. Influence of age-related learning and memory capacity of mice: different effects of a high and low caloric diet. Aging Clin Exp Res, 2016, 28(2): 303-311.
- [14]Shao C Z,Xia K P. Sevoflurane anesthesia represses neurogenesis of hippocampus neural stem cells via regulating microRNA 183 mediated NR4A2 in newborn rats. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(4): 3864-3873.
- [15]Safar M M,Arab H H,Rizk S M,et al. Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells Protect Against Scopolamine-Induced Alzheimer-Like Pathological Aberrations. Mol Neurobiol, 2016, 53(3): 1403-1418.
- [16]Fei J,Gao L,Li H H,et al. Electroacupuncture promotes peripheral nerve regeneration after facial nerve crush injury and upregulates the expression of glial cell-derived neurotrophic factor. Neural regeneration research, 2019, 14(4): 673-682.
- [17]周莉萍,张效科,王飞.中药防治糖尿病认知功能障碍的实验研究进展.中国实验方剂学杂志,2019,25(12): 227-234.
- [18]刘荣强,陈云慧,张天娥,等.阿尔茨海默病动物模型的研究进展.西部医学,2019,31(2): 326-329.
- [19]Manral A,Meena P,Saini V,et al. DADS Analogues Ameliorated the Cognitive Impairments of Alzheimer-Like Rat Model Induced by Scopolamine. 2016,30(3): 407-426.
- [20]Gong Z,Huang J,Xu B,et al. Urolithin A attenuates memory impairment and neuroinflammation in APP/PS1 mice. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 62-74.
- [21]Qi Y,Cheng X,Jing H,et al. Effect of Alpinia oxyphylla-Schisandra chinensis herb pair on inflammation and apoptosis in Alzheimer's disease mice model. J Ethnopharmacol, 2019, 237: 28-38.
- [22]余圆圆,陈钧.微波炮制白果对 APP/PS1 转基因老年痴呆小鼠学习记忆能力的影响.中成药,2018,40(1): 1-7.
- [23]杨菲,高文慧,范春兰,等. NAD/NADP 及其介导氧化应激在神经退行性疾病中的作用.现代生物医学进展,2018,18(22): 4382-4385 + 4381.
- [24]Sorral M E,El Sayed N. Protective effect of valproic acid in streptozotocin-induced sporadic Alzheimer's disease mouse model: possible involvement of the cholinergic system. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2017, 390(6): 581-593.
- [25]Liu W,Guo J,Mu J,et al. Rapamycin Protects Sepsis-Induced Cognitive Impairment in Mouse Hippocampus by Enhancing Autophagy. Cell Mol Neurobiol, 2017, 37(7): 1195-1205.

The Effect of Ginseng to Improve Memory Disturbance in Scopolamine-Induced Dementia via Energy Regulation in Mice Brain*

Li Genlin, Zhang Lulu, Wu Suhui**, Li Hanbing, Wang Fengjuan, Lü Yiyang
(Henan University of Chinese medicine, Henan Zhongjing Recipe Health and
Aging Industry Engineering Research Center, Zhengzhou 450046)

Objective: To explore the possible effect of Ginseng on the improvement of learning and memory impairment in scopolamine-induced dementia mice. **Methods:** 90 SPF-grade ICR mice were randomly divided into 6 groups after water maze screening: the control group, scopolamine hydrobromide group (the model group), 3 mg/kg donepezil group (the positive control drug group), Ginseng decoction groups (3, 21,

1.61、0.8 g/kg doses)。After weighed at 9 am every day, scopolamine hydrobromide was injected intraperitoneally to establish the model, then administration was given orally at 2 pm for 16 days. At the end of the experiment, the learning and memory abilities of mice were observed through a Morris water maze. Animals were subsequently sacrificed, brains were removed, and hippocampal pathological changes were observed by HE and Nissl staining (n=6). At the same time, levels of ATP, H₂O₂, NADP, Ach and AchE were determined by ELISA.

Results: Compared with the control group, the number of water maze crossing platforms in the model group was significantly reduced, levels of H₂O₂ and AchE were significantly increased, the levels of ATP and ACh were significantly reduced (P<0.05 or P<0.01), hippocampal neurons were more severely damaged, and cell arrangement disordered. Compared with the model group, after administration of 3 mg/kg donepezil and Ginseng decoction groups (3.21、1.61、0.8 g/kg), the times of the water maze crossing the platform were increased significantly, the levels of H₂O₂, AchE and NADP were decreased significantly (P<0.05 or P<0.01), the hippocampal neuron damage was effectively improved, and the cells were arranged neatly and orderly. **Conclusion:** Ginseng can improve learning and memory impairment in dementia mice by down-regulating H₂O₂ levels, regulating cholinergic neurotransmitter activity, and repairing scopolamine-induced hippocampal neuron damage.

Key word Ginseng, memory impairment, cholinergic nerve, NADP

黄芪注射液对小鼠 4T1 乳腺癌细胞移植瘤 CyclinD1、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的影响*

郭超¹, 丁涛², 党文呈³, 张立¹, 司晓丽^{1**}

(¹甘肃中医药大学, 兰州 730000; ²甘肃省教育厅高等学校服务中心, 兰州 730000;

³兰州大学临床医学院, 兰州 730000)

摘要 目的: 通过构建小鼠 4T1 乳腺癌细胞移植瘤 Balb/c 小鼠模型, 探讨黄芪注射液对移植瘤 CyclinD1、Bcl-2 及 Caspase-3 蛋白表达的影响。方法: 体外培养小鼠乳腺癌 4T1 细胞, 注射接种于 Balb/c 小鼠右侧腹股沟皮下构建乳腺癌移植瘤模型。50 只成瘤小鼠随机分为模型对照组、黄芪注射液 2.60 g/kg、5.20 g/kg、10.40 g/kg 组和顺铂 2.5 × 10⁻³ g/kg 组。观察黄芪注射液对移植瘤生长的影响; HE 染色观察移植瘤形态改变; 流式细胞仪分析移植瘤细胞周期; 免疫组织化学法检测移植瘤组织细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) 蛋白表达; Western Blot 法检测移植瘤组织 CyclinD1 蛋白及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Cleaved caspase-3 蛋白水平。结果: 不同浓度黄芪注射液对小鼠乳腺癌移植瘤生长有显著抑制作用, 黄芪注射液 2.6 g/kg、5.2 g/kg、10.4 g/kg 抑瘤率分别为 9.1%、27.3%、45.5%。与模型对照组相比较, 黄芪注射液 5.2 g/kg、10.4 g/kg 组及顺铂组移植瘤体积和体质量明显降低 (P<0.05 或 P<0.01), G₁ 期细胞比例明显增高, S 期细胞比例显著降低 (P<0.05 或 P<0.01)。黄芪注射液 2.6 g/kg、5.2 g/kg、10.4 g/kg 组、顺铂组移植瘤组织 CyclinD1 阳性区域吸光度值显著降低, CyclinD1、Bcl-2 蛋白水平明显下调, 而 Cleaved caspase-3 蛋白水平显著上调 (P<0.05 或 P<0.01)。结论: 黄芪注射液对小鼠 4T1 乳腺癌细胞移植瘤生长有显著抑制作用, 其机制与黄芪注射液下调 CyclinD1 蛋白表达, 促进肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞增殖有关。

关键词 黄芪注射液; 乳腺癌; 移植瘤; 细胞周期蛋白 D1; 凋亡相关因子

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 2012 年全球女性癌症新病例及死亡人数排名第一位, 全球范围内新病例 1 671 100 例, 死亡人数达到 521 900 例, 分别占癌症发病总数的 25%、癌症相关死亡人数的 15%^[1]。手术切除、放化疗效果并不十分理想, 并伴有严重的放化疗不良反应, 加重患者心理及身体负担。黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* Fisch. Bge. Var. mongholicus (Bge.) Hsian 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* Fisch. Bge. 的干燥根。具有补气升阳、益气固表、利水、活血等功效, 含黄芪苷、黄芪多糖、氨基酸、黄酮等多种有效成份^[2,3]。大量研究证实黄芪具有免疫调节、抑制肿瘤生长的作用。黄芪

能够有效诱导鼻咽癌 CNE2 细胞凋亡, 上调 Caspase-3、Caspase-8、Bax 蛋白表达, 下调 Bcl-2 表达, 同时增加 CD3⁺、CD4⁺ T 淋巴细胞及 CD4⁺/CD8⁺ 的比例^[4]。黄芪提取物能够下调 p-PI3K、p-GS3Kβp-Akt、p-mTOR 水平, 诱导凋亡, 对人乳腺癌 MCF-7、SK-BR-3 及 MDA-MB-435 细胞株具有显著抑制作用^[3]。

近年来, 黄芪注射液被广泛应用于肿瘤辅助治疗。40 例乳腺癌保乳手术联合黄芪注射液治疗后, 外周血肿瘤标记物、T 淋巴细胞亚群 CD8⁺、炎症因子 IL-6、TNF-α、CRP 均显著低于对照组^[5]。体外抑瘤实验显示黄芪注射液呈剂量依赖性抑制人鼻咽癌 CNE-1 细胞增殖, 增加 G₀/G₁ 期肿瘤细胞比例, 降低 S 期

* 基金项目: 甘肃省高等学校科研项目 (2016A-047); 甘肃省中医药管理局科研课题 (GZK-2015-53); 甘肃中医学院中青年基金项目 (NO. ZQ2014-5)。

** 通讯作者: 司晓丽, 讲师, 在读博士, 主要从事中西医结合临床研究 E-mail: 18031080@qq.com;

作者简介: 郭超,

副教授, 硕士研究生, 主要从事中西医结合临床研究。E-mail: 61501723@qq.com。