

实验研究

参知健脑方对缺氧致认知功能障碍大鼠
脑线粒体损伤的保护机制研究吴 琼¹ 张淑静¹ 张宇晨¹ 邢恩龙¹ 杨傲然² 胡京红¹ 葛东宇¹ 黄 翔¹ 田 昕¹

(1 北京中医药大学, 北京, 100029; 2 首都医科大学附属北京康复医院, 北京, 100144)

摘要 目的:从线粒体角度观察参知健脑方对缺氧致认知功能障碍大鼠线粒体损伤的保护机制的研究。方法:将老年大鼠随机分为 3 组,建立缺氧致线粒体损伤的认知功能障碍模型组以及参知健脑方(SZJ)干预组,并用 Morris 水迷宫对大鼠的学习记忆能力进行检测。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测线粒体细胞色素氧化酶(COX)的活性、8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)、 β -淀粉样前体蛋白(β APP)及 β -淀粉样蛋白($A\beta_{1-42}$)的含量,观察 4 个指标与认知功能障碍之间的关联性,进而观察缺氧对模型组脑线粒体的影响及 SZJ 干预组对脑线粒体的保护作用。结果:持续低压缺氧造模脑组织中 APP、 $A\beta_{1-42}$ 含量模型组与正常组、SZJ 干预组间均有统计学意义($P < 0.01$),8-OHdG 含量模型组与正常组、SZJ 干预组间比较有统计学意义($P < 0.01$),SZJ 干预组与正常组间比较有统计学意义($P < 0.05$),COX 含量正常组与模型组间比较有统计学意义($P < 0.01$)、模型组与 SZJ 干预组比较有统计学意义($P < 0.05$)。结论:参知健脑方可以抑制 APP、 $A\beta_{1-42}$ 的积累、DNA 氧化损伤、增强脑线粒体 COX 的活性,从而保护线粒体发挥神经保护作用,进一步改善缺氧对认知功能障碍学习记忆能力的影响为参知健脑方的临床应用提供实验支持。

关键词 认知功能障碍;缺氧;线粒体;参知健脑方

**Study on the Protective Mechanism of Shenchi Jiannao Fang on Mitochondrial Injury
of Rats with Cognitive Impairment Induced by Hypoxia**

Wu Qiong¹, Zhang Shujing¹, Zhang Yuchen¹, Xing Enlong¹, Yang Aoran², Hu Jinghong¹,
Ge Dongyu¹, Huang Xiang¹, Tian Xin¹(1 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2 Beijing Rehabilitation Hospital
of Capital Medical University, Beijing 100144, China)

Abstract **Objective:** To observe the protective mechanism of Shenchi Jiannao (SZJN) on mitochondrial injury rats with cognitive impairment induced by hypoxia. **Methods:** The aged rats were randomly divided into three groups to establish cognitive impairment model groups of mitochondrial injury induced by hypoxia, and SZJN intervention group, and the learning and memory abilities of rats were detected by Morris water maze. ELISA was used to measure the activity of mitochondrial cytochrome oxidase (COX), and contents of 8-OHdG, β -APP and $A\beta_{1-42}$. The correlation between the 4 indexes and cognitive dysfunction was observed to further observe the effect of hypoxia on the mitochondria of the model group and the protective effect of SZJN intervention group on cerebral mitochondria. **Results:** In brain tissue of models induced by continued hypobaric hypoxia, the contents of APP and $A\beta_{1-42}$ in model group had significant difference when compared with normal group and SZJN intervention group. The content of 8-OHdG in model group was significantly different when compared with normal group and SZJN intervention group ($P < 0.01$), and that of SZJN intervention group was significantly different when compared with normal group ($P < 0.05$). There was a significantly difference in the content of COX when compared between normal group and model group ($P < 0.01$), and was also significantly different between model group and SZJN intervention group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Shenchi Jiannao Fang could inhibit the accumulation of APP, $A\beta_{1-42}$ and DNA oxidative damage, strengthen the activity of mitochondrial COX, so that can protect the neuroprotective effect of mitochondria to further improve the effect of hypoxia on learning and memory of cognitive impairment, providing experimental support for clinical application of SZJN.

基金项目:国家自然科学基金项目(81202684)

作者简介:吴琼(1991.03—),女,医学硕士,医师,北京中医药大学在读硕士研究生,研究方向:中医药防治心脑血管病的机制研究,E-mail: 772007609@qq.com

通信作者:田昕(1978.06—),女,医学博士,副主任医师,北京中医药大学副教授,研究方向:中医药防治心脑血管病的机制研究,E-mail: tianxin0618@126.com

Key Words Cognitive impairment; Hypoxia; Mitochondria; Shenzhi Jiannao Fang

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.10.033

认知功能障碍(Cognitive Impairment, CI)是指认知功能受到不同程度的损害状态,重者如各种类型痴呆,轻者如轻度 CI 等。CI 在中医文献中无专门记载,但依据其临床表现如记忆力下降等,可归属于中医学的“痴呆”“健忘”“善忘”“呆病”等病症范畴。痴呆病位在脑,毒邪内停为标,正气亏虚为本,其基本病机是本虚标实、虚实夹杂。治疗上应以“未病先防,既病防变”的观点为指导,采用扶正解毒的治则,应用具有益气养血、滋阴清热功效的中药复方参知健脑方(SZJ)^[1]。

缺氧时,线粒体呼吸链电子传递及氧化磷酸化发生障碍,进而导致电子传递链上酶活性抑制,ATP 合成减少、自由基产生增多等多种途径损害细胞,致神经元坏死或凋亡而出现临床认知功能下降表现^[2]。前期实验研究表明参知健脑方可明显改善 A β 所诱导的人神经母细胞瘤细胞株的神经毒性^[3],并能有效的改善 AD 大鼠模型的行为学。本研究将在既往研究基础上通过缺氧建立 CI 大鼠模型,观察 SZJ 对缺氧致 CI 模型大鼠学习记忆能力、线粒体细胞色素氧化酶(COX)的活性、 β -淀粉样前体蛋白(β APP)、 β -淀粉样蛋白(A β_{1-42})的含量以及 8 羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)为标记物检测线粒体 DNA 损伤。本实验将从线粒体角度进一步观察参知健脑方对缺氧致 CI 大鼠线粒体损伤的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康老年雌性 SD 大鼠,11~13 月龄,购自军事科学院,许可证书号:SCXK(军)2012-0004。本实验过程均遵守美国国立卫生院倡导的实验动物关怀和使用指导原则,即以减少(Reduction)、替代(Replacement)和优化(Refinement)为核心的动物实验“3R”原则。动物饲养于北京中医药大学实验动物室,温度 22℃,相对湿度 55%~70%,自由进食饮水。

1.1.2 药物 参知健脑方(SZJ)组分:人参、知母、赤芍,以上生药均由北京同仁堂医药有限责任公司提供。全方由人参、知母、赤芍 3 味中药组成,根据课题前期细胞部分^[4]通过正交设计实验筛选出的最佳配比为人参:知母:赤芍=2:2:1。

1.1.3 试剂与仪器 组织线粒体分离试剂盒 C3606(碧云天,中国)、蛋白质定量试剂盒(BCA 法)

购自北京普利莱基因技术有限公司。大鼠 β 淀粉样蛋白 1-42(A β_{1-42})、大鼠淀粉样前体蛋白(β APP)、大鼠 8 羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)、大鼠细胞色素氧化酶(COX) ELISA Kit 均购自 CUSABIO,中国。普通氮气由北京市氧利来科技发展有限公司提供。小白鼠缺氧装置 XBS-02 改装版由杭州艾普仪器设备有限公司提供, Morris 水迷宫行为学自动观察析系统(淮北正华生物仪器设备有限公司)。电动玻璃均浆机 DY89-II(宁波新芝生物科技股份有限公司);高速冷冻离心机(Thermo,美国), MK3 型酶标仪(Thermo,美国),台式恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂);小功率超声破碎仪(Sonics,美国)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将 36 只健康老年雌性 SD 大鼠随机分为 3 组,每组 12 只,分别是正常组、模型组、SZJ 干预组。正常组($n=12$),在正常环境中以普通饲料、饮水饲养 8 周,每天加与 SZJ 干预组等体积的生理盐水灌胃;模型组($n=12$),每日持续低压缺氧 7 h,以普通饲料、饮水饲养 8 周,加与 SZJ 干预组等体积的生理盐水。实验期间模型组每天进入持续低压缺氧舱 7 h,向缺氧舱内循环充入氮气,每次循环为 8 min,通过控氧仪监测缺氧舱内的氧浓度以控制输气和排气装置,使每一次循环缺氧舱内氧浓度控制在 8%~10% 之间进行直接缺氧造模^[5]。SZJ 干预组($n=12$),每日在造模前按体重灌胃中药液(SZJ),其余同模型组。干预组($n=12$),每日在造模前按体重灌胃中药液(SZJ),其余同模型组。

1.2.2 给药方法 SZJ 全方由人参、知母、赤芍 3 味中药组成,根据课题前期细胞部分^[4]通过正交设计实验筛选出的最佳配比为人参:知母:赤芍=2:2:1,即人参 24 g、知母 24 g、赤芍 12 g,相当于生药 2.45 g/(kg·d)据此计算出大鼠每天的灌胃量。

1.2.3 检测指标与方法 用 Morris 水迷宫对大鼠的学习记忆能力进行检测。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测线粒体细胞色素氧化酶(COX)的活性、8 羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)、 β -淀粉样前体蛋白(β APP)及 β -淀粉样蛋白(A β_{1-42})的含量,观察 4 个指标与 CI 之间的关联性,进而观察缺氧对模型组脑线粒体的影响及 SZJ 干预组对脑线粒体的保护作用。

1.2.4 大鼠体质量及学习记忆能力的检测 造模

周期为 8 周,每天测量 1 次体重,观察大鼠体重的变化。分别在造模的第 2、4、6、8 周进行 Morris 水迷宫检测大鼠的认知功能,评价其学习记忆能力。Morris 水迷宫装置为一直径为 120 cm,高约 70 cm 的圆形桶,将第 3 象限设置为目标象限(Target Quadrant)在距离圆心 15 cm 处放置一直径 10 cm 高 30 cm 的圆柱,此处为逃生目标区,液面在圆柱上 2 cm。在整个实验期间其位置保持不变。训练时水温保持在 $(21 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ 左右^[6]。实验过程中水池及周围环境保持不变。圆形桶上方 150 cm 处固定一摄像机全程记录动物运动轨迹。定位航行实验(Place Navigation)大鼠连续训练 5 d,每次实验大鼠在 4 个不同象限中将头朝池壁放入水池,每天次序不同,任其游泳,直至找到平台。空间探索实验(Spatial Probe)实验第 6 天进行空间探索实验,撤去平台,将大鼠从任意一个入水点放入水中,记录其在 2 min 内游泳的轨迹,计算其跨越目标象限内的“原平台象限游泳时间/总时间、穿越平台次数”此实验反映大鼠的空间定向能力。

1.2.5 大鼠脑组织中线粒体提取 采用组织线粒体分离试剂盒 C3606(碧云天,中国)分离出组织线粒体,严格按照说明书操作。第八周行为学实验结束后迅速断头取脑,在预先紫外灭菌、消毒的超净台内,冰上取脑,完整剥离脑组织后,将双侧海马、皮质取出称重。用 PBS 洗涤组织 1 次,加入分离试剂 A(1 mg/10 μg),在冰浴上进行匀浆,匀浆 10 次左右,把匀浆在 1 000 g,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min,小心把上清转移到另一离心管中,在 3 500 g,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,小心去除上清,沉淀即为分离得到的线粒体,加入适量线粒体储存液重悬线粒体,通常每 100 mg 组织获得的线粒体可以用 40 μL 相应的线粒体储存液重悬。将分离好的组织线粒体放入 -80°C 冰箱保存,待测。

1.2.6 裂解组织提取蛋白及该蛋白浓度的测定 取出分离好了的线粒体进行组织裂解提取蛋白,11 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,取沉淀去上清,加入 NaCl 重悬,超声破碎 5 次,10 s/次,计时 30 min 每隔 5 min 震荡 1 次,10 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 取上清待用。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定线粒体中的蛋白浓度,严格按照说明书操作并计算浓度。

1.2.7 大鼠脑线粒体 APP、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 、COX 的含量和 8-OHdG 损伤的检测 将组织裂解提取出来的线粒体蛋白用酶联免疫吸附实验双抗体夹心法测定 COX、8-OHdG 的含量。在大鼠 APP、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 、COX、8-OHdG 抗体包被的微孔中分别加入含 APP、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 、COX、8-

OHdG 的标准品和样品,与辣根过氧化物酶标记的 APP、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 、COX、8-OHdG 抗体结合形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,温育、洗涤、彻底洗涤后甲基联苯胺(TMB)显色,在反应终止前 5 min 内用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度(OD 值)。使用专业制作曲线软件 Curve Expert1.3 进行分析,计算出样本浓度。

1.3 统计学方法 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行组间比较,各项指标中,计量变量采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,检验水准取 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义,以 $P < 0.01$ 为有显著统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体质量变化 如图 1 所示,在偶数周时进行水迷宫测试,故正常组大鼠的体重呈现上下波动周期规律。模型组、SZJ 干预组大鼠体重在偶数周时下降的明显,与偶数周进行行为学检测体力消耗有关。进行缺氧造模的模型组、SZJ 干预组大鼠的体重整体呈现降低的趋势,但 SZJ 干预组下降趋势较模型组缓和。在第七周时 SZJ 干预组大鼠体重明显回升,而模型组大鼠体重在缺氧状态下持续降低。

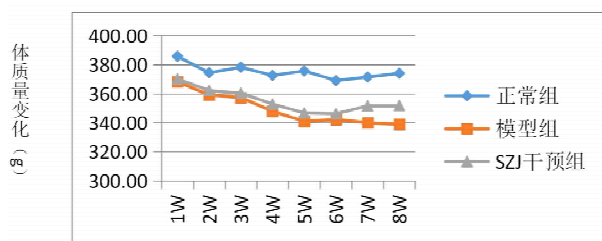


图 1 大鼠体重监测趋势

2.2 大鼠学习记忆能力的检测 持续低压缺氧造模第八周时空间探索环节中原平台象限游泳时间/总时间与穿越平台次数比较来测评大鼠的空间记忆能力。见表 1。模型组与正常组、SZJ 干预组间均有统计学意义($P < 0.05$),可作为缺氧致大鼠 CI 的模型,SZJ 干预组与正常组组间比较均无统计学意义。

表 1 空间探索原平台象限游泳时间/总时间、穿越平台次数比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	原平台象限游泳时间/总时间	穿越平台次数
正常组	0.295 ± 0.032	16.33 ± 1.03
模型组	$0.224 \pm 0.039^*$	$11.67 \pm 4.37^*$
SZJ 干预组	$0.292 \pm 0.050^{\Delta}$	$17.00 \pm 1.41^{\Delta}$

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

2.3 大鼠 APP、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 、COX、8-OHdG 的表达检测 持续低压缺氧造模脑组织中 APP、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 含量浓

度/脑组织蛋白浓度比较,模型组与正常组、SZJ 干预组间均有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 脑组织中 $A\beta_{1-42}$ 含量浓度/脑组织蛋白浓度
($\bar{x} \pm s, n = 6$)、脑组织中 APP 含量浓度/
脑组织蛋白浓度($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	$A\beta_{1-42}$ 含量浓度/ 脑组织蛋白浓度	APP 含量浓度/ 脑组织蛋白浓度
正常组	0.034 ± 0.011	0.869 ± 0.541
模型组	$0.178 \pm 0.042^{**}$	$4.497 \pm 1.051^{**}$
SZJ 干预组	$0.061 \pm 0.034^{\Delta\Delta}$	$1.564 \pm 0.297^{\Delta\Delta}$

注:与正常组比较 $^{**}P < 0.01$,与模型组比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

持续低压缺氧造模脑组织中 8-OHdG 含量浓度/脑组织蛋白浓度模型组与正常组、SZJ 干预组间比较有统计学意义($P < 0.01$),SZJ 干预组与正常组间比较有统计学意义($P < 0.05$),COX 含量浓度/脑组织蛋白浓度正常组与模型组间比较有统计学意义($P < 0.01$)、模型组与 SZJ 干预组比较有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 脑组织中 8-OHdG、COX 含量浓度/
脑组织蛋白浓度($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	8-OHdG 含量浓度/ 脑组织蛋白浓度	COX 含量浓度/ 脑组织蛋白浓度
正常组	0.017 ± 0.008	0.151 ± 0.079
模型组	$0.086 \pm 0.010^{**}$	$0.483 \pm 0.066^{**}$
SZJ 干预组	$0.033 \pm 0.017^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.394 \pm 0.308^{\Delta}$

注:与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$,与正常组比较 $^{**}P < 0.01$,与模型组比较, $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.01$

3 讨论

中医学认为,气是构成、维持人体生命活动最基本的物质,随着年龄的增长,老年人阳气逐渐衰败,气的推动、防御、营养、温煦作用减弱。物质代谢速度减慢,体内产生瘀血、痰湿等病理产物,阻碍了人体的正常生理功能。《黄帝内经》中有“阳气者,精则养神”,而气虚会导致元神失养,神不能外驭五官九窍和机体,最终形成老年痴呆^[7]。MCI 为本虚标实之证,在肾、心、脾 3 脏虚损的基础上,兼有痰、瘀等实邪^[8]。SZJ 由人参、赤芍、知母组成,人参,益气健脾,调神益智,补充人体之精气可增后天之源,在此用以扶正。根据中药治疗老年痴呆病的用药频次归纳分析可知中药功效检索分类中排在第一位的是人参现代研究表明人参皂苷能有效改善 AD 动物的认知能力、 $A\beta$ 诱导细胞毒性和氧化应激水平^[9-10]。芍药,清热凉血、散瘀止痛,在此用以散瘀凉血通脑络,现代研究表明芍药苷能改善 AD 大鼠的行为学和脑线粒体复合酶活性^[11],降低氧化应激水平对 AD 大鼠发挥神经保护作用^[12]。知母,清热泻火、滋

阴润燥,在此用以清热以祛毒,现代研究表明知母皂苷能显著的改善 $A\beta$ 诱导的痴呆大鼠的学习和记忆能力^[13]。本课题前期实验细胞部分证实参知健脑方组分能有效的保护缺氧诱导的细胞死亡,改善线粒体 DNA 损伤,抑制毒性线粒体 $A\beta$ 积累^[4]。

AD 与氧化应激密切相关,这一点已经毋庸置疑^[14],已知氧化应激的产生是由于活性氧的产生过多超出了其消除能力所致,而在众多细胞器中,线粒体是活性氧产生的主要位点,超过 90% 的活性氧产生于线粒体,其中线粒体电子传递链的复合体 I 和复合体 III 是活性氧产生的主要位点,故而线粒体特别易受氧化应激的损伤。另外,从一些研究报道^[15-16]可知, $A\beta$ 与磷酸化的 Tau 蛋白作为 AD 的重要病理特征,其在增加活性氧的产生,提高 AD 的氧化应激水平也发挥了作用。考虑到 $A\beta$ 和磷酸化的 Tau 蛋白可以直接引起线粒体功能障碍,从以上两点很容易怀疑氧化应激可以引起线粒体功能障碍,氧化应激使蛋白、脂质和核酸过氧化^[17]。氧化应激除了引起 mtDNA 和线粒体能量代谢相关的损伤,也引起了线粒体动力学相关的损伤^[18]。由于氧化应激对线粒体各方面的损伤作用,故而知氧化应激确实可以导致线粒体功能障碍。mtDNA 易受到活性氧的损伤,损伤的 mtDNA 主要表现为 mtDNA 点突变、缺失及同源异型性或异质性改变^[19]。研究^[20-21]认为 mtDNA 的突变与老化密切相关,mtDNA 与 CI 也有着密切关系。

本实验为避免药物因素对缺氧致 CI 模型的干扰选取自然衰老的老年鼠为实验对象。实验中制造缺氧的老年动物模型,可造成大鼠的体重持续缓和下降,水迷宫空间探索显示持续低压缺氧可造成空间记忆能力受损伤,而 SZJ 可从多靶点发挥对线粒体的保护机制,改善空间记忆能力。老龄动物脑组织内可出现淀粉样斑块以及学习记忆衰退^[22]。大量体外实验表明 $A\beta$ 主要通过线粒体途径引起神经元凋亡^[23]。不论是在体内还是体外, $A\beta$ 神经毒引起的死亡和诱导的神经细胞凋亡都已经被证实^[24]。而本实验中持续缺氧导致 APP、 $A\beta_{1-42}$ 含量增多,而过度表达的 APP 会影响线粒体蛋白输运通道的正常运行,从而导致线粒体功能紊乱。其中在 $A\beta$ 的神经毒性中占据主导地位^[25]的 $A\beta_{1-42}$,在缺氧时刺激线粒体膜并导致其通透性增加,位于线粒体膜内的细胞色素 C 释放到细胞质中,作为细胞凋亡诱导因子,促使神经元细胞凋亡导致大鼠则出现一系列的 CI。8-羟基脱氧鸟苷作为 DNA 氧化损伤产物是

广泛用于研究疾病中氧化损伤机制的关键标志物^[26],缺氧导致 8-OHdG 产量增多即氧化损伤产物增多,造成 mtDNA 缺失或突变,缺氧产生的 8-OHdG 越多对大鼠的认知功能影响越大。

综上所述,本实验研究表明 SZJ 可以抑制 APP、A β_{1-42} 的积累,增强线粒体细胞色素氧化酶 (COX) 的活性并减缓 DNA 氧化损伤,从而发挥对线粒体的作用,进一步改善缺氧对 CI 学习记忆能力的影响,为 SZJ 的临床应用提供实验支持,为中药治疗 CI 提供了新思路。SZJ 对缺氧模型线粒体虽有一定保护的作用,但是对于缺氧造成的氧化损伤的保护作用不明显,说明缺氧致 mtDNA 缺失或突变可能是不可逆的,SZJ 能否从多靶点改善线粒体 DNA 的损伤及其机制还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 杨傲然,范吉平,田昕. 参知健脑片治疗阿尔茨海默病的作用机制探讨[J]. 辽宁中医杂志,2006,33(10):1258-1259.
- [2] Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders[J]. Neuron,2008,60(5):748-766.
- [3] 钟华,杨傲然,王宝见,等. 参知健脑片组分对 β 淀粉样蛋白致 SH-SY5Y 细胞凋亡的保护作用[J]. 山东医药,2009,49(31):22-24.
- [4] 牛美英,和欣,胡京红,等. 参知健脑方组分对缺氧 SH-SY5Y 细胞的神经保护机制研究[J]. 湖北中医药大学学报,2016,18(3):1-4.
- [5] 王红阳. 间歇低氧对大鼠认知功能和 p38MAPK/神经细胞凋亡通路影响[D]. 天津:天津医科大学,2011,10-12.
- [6] Charles V Vorhees, Michael T Williams. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nature Protocols,2006,1(2):848-858.
- [7] 王玉璧,郭蕾,窦志芳,等. 关于老年痴呆病的中医病因病机探讨[J]. 中华中医药学刊,2011,29(4):743-745.
- [8] 牛智领,牛好敏,刘远洪,等. 天智颗粒治疗缺血性脑小血管病轻度认知障碍的效果观察[J]. 中国医药,2014,9(7):986-988.
- [9] Liu JF, Yan XD, Qi LS, et al. Ginsenoside Rd attenuates A β_{25-35} induced oxidative stress and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons[J]. Chem Biol,2015(239):12-18.
- [10] Ong WY, Farooqui T, Koh HL, et al. Protective effects of ginseng on neurological disorders[J]. Front Aging Neurosci,2015,16(7):129.
- [11] Zhou J, Zhou L, Hou D, et al. Paeonol increases levels of cortical cytochrome oxidase and vascular actin and improves behavior in a rat model of Alzheimer's disease[J]. Brain Res,2011,4(1388):141-

- 147.
- [12] Lan Z, Chen L, Fu Q, Ji W, et al. Paeoniflorin attenuates amyloid beta peptide induced neurotoxicity by ameliorating oxidative stress and regulating the NGF mediated signaling in rats[J]. Brain Res,2013,1(1498):9-19.
- [13] 陈勤,胡雅儿,夏宗勤. 知母皂甙元对脑内注射 β -淀粉样肽痴呆模型大鼠的影响[J]. 上海第二医科大学学报,2001,21(5):401.
- [14] Swomley AM, Butterfield DA. Oxidative stress in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: evidence from human data provided by redox proteomics[J]. Arch Toxicol,2015,89(10):1669-1680.
- [15] Butterfield DA, Swomley AM, Sultana R. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression[J]. Antioxid Redox Signal,2013,19(8):823-835.
- [16] Naini SM, Soussi-Yanicostas N. Tau Hyperphosphorylation and Oxidative Stress, a Critical Vicious Circle in Neurodegenerative Tauopathies? [J]. Oxid Med Cell Longev,2015,2015:151979.
- [17] Wang X, Wang W, Li L, et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease[J]. Biochim Biophys Acta,2014,1842(8):1240-1247.
- [18] Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease[J]. Free Radical Biology and Medicine,2013,62:90-101.
- [19] Keogh MJ, Chinner y PF. Mitochondrial DNA mutations in neurodegeneration[J]. Biochim Biophys Acta,2015,1847(11):1401-1411.
- [20] Pinto M, Moraes CT. Mechanisms linking mtDNA damage and aging[J]. Free Radic Biol Med,2015,85:250-258.
- [21] Sondheimer N, Zollo O, Van Deerlin V, et al. Analysis of cerebrospinal uid mitochondrial DNA levels in Alzheimer disease[J]. Ann Neurol,2014,75(3):458-460.
- [22] 徐剑文,俞昌喜. 阿尔茨海默病实验性动物模型的研究进展[J]. 国外医学老年医学分册,2008,29(3):97-103.
- [23] Li NM, Liu QH, Qiao JT, et al. A β_{31-35} -induced neuronal apoptosis is mediated by JNK-dependent extrinsic apoptosis pathway[J]. Neurosci Bull,2009,25(6):361-366.
- [24] 汪志刚,戚仁斌,李卫,等. $\alpha 7$ 烟碱样乙酰胆碱受体拮抗剂减轻淀粉样 β 蛋白诱导的 PC12 细胞损伤的机制研究[J]. 中国病理生理杂志,2011,27(5):916-922.
- [25] Roger N, Rosenberg MD. Translational research on the way to effective therapy for Alzheimer disease[J]. AichGenPsychiatry,2005,62(11):1186-1192.
- [26] 朴恩道,徐立红. 8-OHdG 在医学领域的应用与研究进展[J]. 中国细胞生物学学报,2012,34(5):493-499.

(2016-12-25 收稿 责任编辑:徐颖)