

培元通脑胶囊对 CI 大鼠工作记忆及海马内谷氨酸及其受体表达的影响

白晶 高永红 高颖

(北京中医药大学东直门医院,北京,100700)

摘要 目的:探讨培元通脑胶囊对脑缺血大鼠工作记忆行为及海马区谷氨酸(Glu)含量、N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B(NMDA Receptor 2B, NR2B)的影响。方法:将 52 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、尼莫地平组和培元通脑组,每组均 13 只。模型组、尼莫地平组和培元通脑组均将双侧颈内动脉结扎制备大鼠脑缺血模型。尼莫地平组和培元通脑组每日分别按体质量给予相应的药物灌胃共治 4 周。采用 Morris 水迷宫实验观察大鼠的工作记忆功能;尼氏染色法观察大鼠海马组织尼氏体表达情况;高效液相色谱法检测海马区 Glu 含量变化,Western blot 法检测大鼠海马区 NR2B 蛋白表达。结果:Morris 水迷宫工作记忆逃避潜伏期假手术组大鼠(第 1 天与第 2 天比较、第 1 天与第 3 天比较 $P > 0.05$,第 1 天与第 4 天比较 $P < 0.05$);模型组大鼠(第 1 天与第 2 天比较、第 1 天与第 3 天比较 $P > 0.05$,第 1 天与第 4 天比较 $P < 0.05$);尼莫地平组大鼠(第 1 天与第 2 天比较、第 1 天与第 3 天比较 $P > 0.05$,第 1 天与第 4 天比较 $P < 0.05$);培元通脑组大鼠(第 1 天与第 2 天比较、第 1 天与第 3 天比较 $P < 0.05$,第 1 天与第 4 天比较 $P < 0.01$)。海马内谷氨酸含量假手术组与模型组比较($P < 0.05$),模型组与培元通脑组比较 $P < 0.05$ 。NMDA2B 受体蛋白表达比较假手术组与模型组、尼莫地平组、培元通脑组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),模型组与尼莫地平组比较($P < 0.05$)与培元通脑组比较($P < 0.01$)。结论:培元通脑胶囊能改善脑缺血大鼠的工作记忆能力,保护神经细胞,其机制可能与上调海马区 Glu、NR2B 表达有关。

关键词 培元通脑胶囊;脑缺血;工作记忆;谷氨酸;N-甲基-D-天冬氨酸受体 2B

Effects of Peiyuan Tongnao Capsules on Working Memory, Glu in Hippocampus and Expression of Its Receptor in Rats with Cerebral Ischemia

Bai Jing, Gao Yonghong, Gao Ying

(Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract Objective: To explore the effects of Peiyuan Tongnao (PYTN) Capsules on working memory, content of Glu in hippocampus and NMDA Receptor 2B (NR2B) in rats with cerebral ischemia (CI). **Methods:** A total of 52 male SD rats were randomly divided into sham operation group ($n = 13$), model group ($n = 13$), nimodipine group ($n = 13$) and PTNY group ($n = 13$). The latter 3 groups were performed with bilateral carotid artery ligation. The nimodipine group and PTNY group were given corresponding drugs daily by gavage for 4 weeks according to body weight. The working memory of the rats was tested by Morris water maze. The expression of Nissl body in hippocampus was observed by Nissl staining. Determination of Glu in hippocampus was conducted by High Performance Liquid Chromatography. The expression level of NR2B was determined by Western blot. **Results:** Morris water maze working memory escape latency: the sham operation group (DAY 1 versus DAY 2, DAY 1 versus DAY 3, $P > 0.05$; DAY 1 versus DAY 4, $P < 0.05$); the model group (DAY 1 versus DAY 2, DAY 1 versus DAY 3, $P > 0.05$, DAY 1 versus DAY 4, $P < 0.05$); the nimodipine group (DAY 1 versus DAY 2, DAY 1 versus DAY 3, $P > 0.05$, DAY 1 versus DAY 4, $P < 0.05$); the PYTN group (DAY 1 versus DAY 2, $P > 0.05$, DAY 1 versus DAY 3, DAY 1 versus DAY 4, $P < 0.05$). The content of Glu in hippocampus: the sham operation group was significantly different from the model group ($P < 0.05$); the model group was significantly different from the PYTN group ($P < 0.05$). The expression of NR2B: the sham group was significantly different from the model group, the nimodipine group and the PYTN group ($P < 0.01$); the model group was significantly different from the nimodipine group ($P < 0.05$); the model group was significantly different from the PYTN group ($P < 0.01$). **Conclusion:** PYTN Capsules were helpful for improving working memory and protecting neurons in rats with cerebral ischemia, whose mechanism may associate with increasing Glu in hippocampus and the expression of NR2B in hippocampus.

基金项目:北京中医药大学东直门医院企业横向科研项目(HX-DZM-2018009)——培元通脑胶囊动物实验研究

作者简介:白晶(1978.05—),女,博士,主任医师,研究方向:中西医结合脑病,E-mail:baijingdoctor@163.com

通信作者:高颖(1963.02—),女,博士,教授,主任医师,博士研究生导师,研究方向:中医药防治脑血管病及中医证候学与疗效评价标准,E-mail:gaoying973@126.com

Key Words Peiyuan Tongnao Capsules; Cerebral ischemia; Working memory; Glu; NMDA receptor 2B

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.09.012

脑组织的存活和发挥功能依赖于血液的持续流动,血液为其提供能量、氧气并带走代谢废物^[1-2],颈颅血管是脑组织血液运行的通道,因此,血液本身及颈颅血管病变都可引起脑组织损伤性疾病,颈动脉狭窄可引起部分脑组织供血不足,物质交换受阻引起脑组织萎缩甚至坏死,进而出现认知功能障碍^[3-4],不仅降低患者生命质量,而且显著缩短卒中患者的生存时间,给家庭及社会带来了沉重的负担,已经成为导致年龄相关的认知障碍和痴呆第二常见原因^[5]。中医学认为,气血不荣,脑髓失充,脑需要气血津液不断的充养、滋润,脑髓失养,则不能发挥统领官骸的功能^[6]。肾为封藏之本,藏精主骨生髓,髓通于脑。“肾充于脑”的观点认为肾能生髓并生精,脑能统髓,髓上充于脑。肾的精微物质充养于脑,为脑发挥功能的物质基础,若肾中精气匮乏,无精充盈,其脑空虚,久之则出现脑老化^[7]。

培元通脑胶囊配方秉承道法自然的原理,在多种交互影响的因素和复杂的稳态系统中取类比象,从肾的脏腑理论出发,认为肾中精气是机体生命活动的根本,对机体各种生理活动均起着极为重要的作用,故治内功能性质的病要先看肾之虚实,扶助肾中正气,佐以祛瘀熄风通络之品,可既病减轻损伤,又可预防在先,防止传变。课题组应用培元通脑胶囊胶囊益肾填精,熄风通络的药理作用治疗脑缺血大鼠,观察其对于脑缺血大鼠认知功能的影响,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康SD大鼠52只,雄性,白色,平均体质量(250±10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号[SCXK(京)2012-0006],饲养于北京中医药大学东直门医院实验动物中心屏障实验室(中医内科学教育部暨北京市重点实验室),温度22~24℃,湿度50%~70%。自由进食、进水,12h明暗交替光照。

1.1.2 药物 培元通脑胶囊(河南羚锐制药有限公司,生产批号:1709192),组方:制何首乌429g、熟地黄286g、天冬286g、醋龟甲46g、鹿茸23g、酒苁蓉114g、肉桂24g、赤芍49g、全蝎48g、烫水蛭96g、地龙49g、炒山楂142g、茯苓48g、炙甘草29g,由上述药物制成干浸膏粉,灌胃时加水配制成溶液。

尼莫地平片[拜耳(中国)有限公司,国药准字H20003010],使用药品研磨器磨成粉末配制成溶液。

1.1.3 试剂与仪器 试剂:NMDA2B受体抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号Anti-NMDAR2B抗体(ab65783)];仪器:Agilent-1200高效液相色谱仪,仪器型号:agilent-1200型,制造商USA Agilent Technologies。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 采用SPSS 24.0统计软件产生随机数字,进行随机分组。将52只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照组(尼莫地平组)、培元通脑组,每组13只。模型制备:双侧颈总动脉结扎法,10%水合氯醛(3 mL/kg体质量)腹腔注射麻醉大鼠。将大鼠固定在白色泡沫垫上,以利于保持大鼠体温。将麻醉后大鼠仰卧于手术台上,取颈部正中切口,沿胸锁乳突肌内侧缘分离肌肉及筋膜,找到颈动脉鞘,将右侧颈总动脉与迷走神经轻轻剥离后应用6~0号灭菌线束将颈总动脉行两端结扎并剪断,左侧颈总动脉行同样手术操作后,缝合颈部切口。模型组、尼莫地平组、培元通脑组均进行相同颈部血管结扎手术,假手术组仅钝性分离双侧颈总动脉无其他操作即缝合颈部切口。颈部手术结束后各组动物均腹腔注射青霉素注射液1 mL防术后感染。

1.2.2 给药方法 依据陈奇主编《中药药理实验方法学》^[10]按照体表面积换算,大鼠的尼莫地平灌胃剂量为8.1 mg/kg,培元通脑胶囊灌胃剂量为0.486 g/kg。每天上午定时灌胃给药(假手术模型组给予相应体质量的饮用水灌胃,尼莫地平组及培元通脑组均给予相应剂量的药物)以外,饲养期间动物自由摄食和饮水。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 行为学测试(Morris水迷宫) 饲养动物至8周时进行Morris水迷宫定位航行训练^[8-9],2d后进行工作记忆测试。1)环境适应:训练开始前24h,让大鼠在没有站台的水迷宫内游泳3min以适应环境;2)训练期:将大鼠背向水池从每个象限的中点放入迷宫中,随机变换每个试次的入水象限,站台的位置保持不变(第Ⅲ象限)。大鼠在60s内找到站台后在上面停留5s,如果大鼠在60s内没有找到

表1 各组更换平台第1天潜伏期平均值与之后每天潜伏期平均值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	第1天	第2天	第3天	第4天
假手术组	17.26 ± 0.38	11.41 ± 4.39*	10.54 ± 4.09*	9.95 ± 4.59 [△]
模型组	31.29 ± 2.69	29.42 ± 0.50*	27.32 ± 4.38*	25.99 ± 1.10 [△]
尼莫地平组	30.04 ± 4.51	25.94 ± 1.37*	23.01 ± 6.59*	17.83 ± 3.49 [△]
培元通脑组	30.49 ± 2.62	26.35 ± 3.52 [△]	22.31 ± 3.73 [△]	18.87 ± 11.54 [▲]

注:逃避潜伏期与第1天比较,* $P < 0.05$;逃避潜伏期与第1天比较,[△] $P < 0.05$;逃避潜伏期与第1天比较,[▲] $P < 0.01$

站台,则将其引导至站台并停留5 s。大鼠每天接受非站台象限入水训练,共2个区块训练(每个区块包括3个试次)。每个试次之间的间隔为60 s,2个block之间的间隔为3 min,共训练3 d。使大鼠学会寻找站台的一般规则;3)工作记忆:参考记忆训练2 d后进行。在参考记忆训练阶段站台位于东北象限位置,第1天变换站台位置至西南象限位置,每天更换站台象限,每天训练3次,即保证除站台所在象限以外的象限均入水1次。入水象限更换次序:第1天-西南象限,第2天-西北象限,第3天-东南象限,第4天-东北象限。

1.2.3.2 尼氏染色 每组其中随机选取5例大鼠取全脑,将海马部位切片制作蜡块,进行尼氏染色,观察海马CA1、CA3、DG区尼氏小体表达情况。

1.2.3.3 生物检测 谷氨酸含量测定:海马样品称重、离心10 min,取上清液,应用美国Agilent 1200高效液相色谱仪(Agilent Chem Station工作站),色谱柱:ZORBAX Eclipse AAA(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);检测波长:激发光波长 $\lambda_{ex} = 340$ nm,发射光波长 $\lambda_{em} = 450$ nm。柱温40 °C,进样量15 μL;Western blot分析:取大鼠右侧海马组织,样本蛋白提取:将组织样品研磨破碎加入适量RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂,磷酸酶抑制剂)进行重悬,冰上裂解30 min进行蛋白提取,转膜方法:PVDF膜转移至电转液中,按照电流300 mA恒流转膜;稀释,培养,一抗洗膜,二抗孵育:用Western blot封闭液稀释二抗(NMDA2B受体抗体,Abcam/ab65783),羊抗兔-HRP 1:5 000稀释,TBST洗膜,条带灰度值采用Quantity One v. 4. 6. 2软件进行读取。

1.3 统计学方法 采用SPSS 24.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较应用方差分析,组内比较应用T检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。大鼠行为学测试结束后断头,取左侧海马高效液相色谱法测定谷氨酸含量,右侧海马进行western blot测定NMDA2B受体测定。

2 结果

2.1 水迷宫第1、2、3、4天逃避潜伏期比较 Morris水迷宫:假手术组大鼠(第1天与第2天比较、第1天与第3天比较 $P > 0.05$,第1天与第4天比较 $P < 0.05$);模型组大鼠(第1天与第2天比较、第1天与第3天比较 $P > 0.05$,第1天与第4天比较 $P < 0.05$);尼莫地平组大鼠(第1天与第2天比较、第1天与第3天比较 $P > 0.05$,第1天与第4天比较 $P < 0.05$);培元通脑组大鼠(第1天与第2天比较、第1天与第3天比较 $P < 0.05$,第1天与第4天比较 $P < 0.01$)。

各组大鼠在适应训练后均能完成空间学习记忆任务,但是,模型组大鼠在完成工作记忆任务寻找站台的潜伏期在第2天和第3天明显长于培元通脑组大鼠,第4天2组干预组与模型组大鼠寻找站台的潜伏期差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

2.2 尼氏染色结果 在尼氏小体表达方面,模型组图片中显示Nissl小体的数量减少甚至消失,细胞皱缩,核固缩,神经细胞排列松散,染色变浅、模糊不清,而尼莫地平组、培元通脑组Nissl小体较多,细胞排列较紧密,染色清楚。

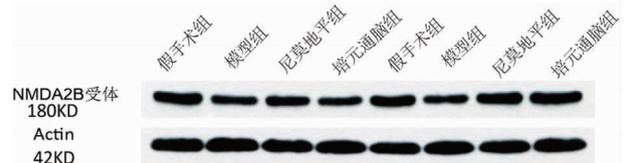


图1 各组海马组织内NMDA2B相对灰度值比较

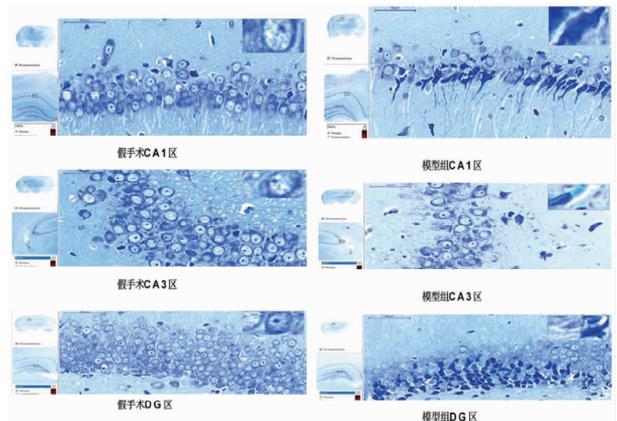


图2 假手术组和模型组比较(尼氏染色,×40)

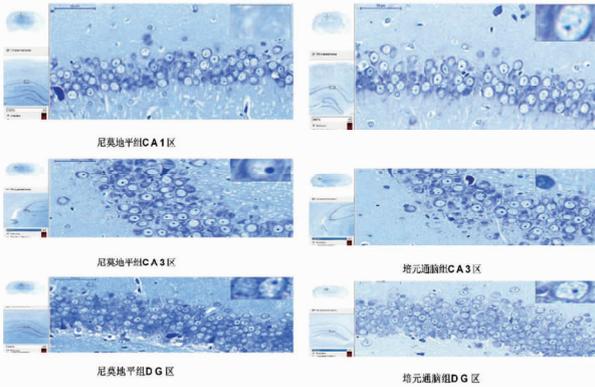


图3 尼莫地平组和培元通脑组比较(尼氏染色, ×40)

2.3 各组海马组织内谷氨酸含量比较 假手术组谷氨酸含量测定高于模型组,差异有统计学意义,与尼莫地平组、培元通脑组比较,差异无统计学意义,模型组与尼莫地平组比较,差异无统计学意义($P = 0.056 > 0.05$),模型组与培元通脑组比较,差异有统计学意义($P = 0.045 < 0.05$),尼莫地平组与培元通脑组比较,差异无统计学意义;各组海马组织内 NMDA2B 受体相对灰度值比较:各组海马组织内 NMDA2B 受体蛋白表达比较模型组与尼莫地平组比较 ($P = 0.036 < 0.05$),与培元通脑组比较 ($P = 0.005 < 0.01$),尼莫地平组与培元通脑组比较 ($P = 0.404 > 0.05$)。见表2。

表2 各组海马组织内谷氨酸含量、NMDA2B 受体相对灰度值 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	海马组织内谷氨酸含量 (mg/g)	NMDA2B 受体相对灰度值
假手术组	1.23 ± 0.11	0.74 ± 0.09
模型组	1.07 ± 0.13*	0.50 ± 0.13*
尼莫地平组	1.20 ± 0.10 [△]	0.64 ± 0.09 [▲]
培元通脑组	1.21 ± 0.18 ^{△▲}	0.65 ± 0.12 ^{△□}

注:假手术组与模型组比较,* $P < 0.05$;模型组与尼莫地平组比较、尼莫地平组与培元通脑组比较,尼莫地平组、与培元通脑组比较,[△] $P > 0.05$;模型组与培元通脑组比较,[▲] $P < 0.05$;与模型组比较,[□] $P < 0.01$

3 讨论

缺血性脑血管病是世界范围内致残致死的主要原因,高危非致残性缺血性脑血管事件(High Risk Non-disabling Ischemic Cerebrovascular Events, HR-NICE)所致认知障碍症状隐匿,不易察觉,影响患者精细工作能力及社会活动,导致患者生命质量下降,已引起医学界高度重视^[11]。我们应用完全永久阻断颈动脉系统供血的大鼠模型^[12-13],能够模拟前脑缺血性损伤^[14],手术前后经激光散斑血流成像仪 PeriCam PSI 观察,假手术组术前术后脑灌注量无明显变化,其他3组术后脑血流灌注均有显著下降。

本研究病机上立论于缺血导致毒损脑络,治疗上以扶正护脑为治疗原则,脑的功能主要是灵机记忆、认知思考等高级神经思维活动,这些功能依赖于脑络的气血渗灌,王永炎院士等^[15-16]提出脑内血络、气络之概念,认为脑气络、血络无法正常推动、调节、统摄血液运行则脑失所养、毒邪内生,而肾为一身阴阳之根本,肾阳不足温煦蒸腾无力,无以温脾,脾不健运聚湿生痰浊;肾阴不足无以化生精血,致生化乏源、髓海空虚、神机失用(《内经精义》《医林改错》),培元通脑胶囊全方配伍有益肾填精、息风通络的作用,该方以制何首乌补肝益肾养血祛风、熟地黄滋阴补血、生精益髓共为君药,滋养肝肾、填补精血、补益肾元;臣药龟甲、天冬共助君药养阴增液、可治液枯内动之虚风平息风阳,鹿茸、酒苁蓉共壮肾阳,以助君药陪补下元;佐药全蝎、地龙、赤芍、水蛭共奏疏通脉络、祛瘀血作用,为佐助之品,肉桂佐助鹿茸肉苁蓉温肾壮阳,同时引火归元防止虚阳浮越,山楂、茯苓防补药之滋腻碍胃,影响脾胃;使药炙甘草调和诸药^[15]。

本研究观察大鼠在水迷宫中完成工作记忆任务的过程,发现在行为学方面各组大鼠在基础训练完成后基本熟悉迷宫环境,但是模型组大鼠逃避潜伏期明显延长。本研究发现培元通脑组大鼠较快适应了站台变化,因此该组大鼠能在第2天试验时在首次发现站台之后即可短时存储站台位置标记,能够使用较短的路径到达平台、逃避潜伏期缩短,而模型组大鼠则在第4天整体逃避潜伏期才改善,肾为作强之官伎巧出焉,水迷宫工作记忆的改善体现了培元通脑益肾填精的作用。

在尼氏小体表达方面,模型组图片中明显显示 Nissl 小体的数量减少甚至消失,细胞皱缩,神经细胞排列松散,而假手术组、尼莫地平组、培元通脑组 Nissl 小体较多,Nissl 小体是神经细胞合成蛋白质的场所,经过改善缺血的治疗能够保护 Nissl 小体,使其发挥功能为神经活动提供必要的蛋白质。

脑的高度复杂性结构是由于存在大量互相交流的细胞,它们可以编码和在一定的距离内传导信息,这种信息在神经系统内的运动,而突触在其中为关键结构^[16],在突触的信息传递中不同的神经递质有着不同的作用,谷氨酸及其受体不论在形态学或功能学的研究都有大量报道^[17],谷氨酸 NMDA 受体兴奋能够增强突触传递的效能,该现象被称为为长时程增强(Long-term Potentiation, LTP),海马的兴奋性突触传递由谷氨酸受体(NMDA 受体)介导^[18],水迷

宫发明者 Richard Morris 等人给大鼠注射 NMDA 受体阻断剂,观察到大鼠不能记住水下平台的位置,为 NMDA 受体依赖性过程在记忆中的作用提供证据。功能性 NMDA 受体需由 NR2 亚单位与 NR1 共同形成四聚体, NR2B C-末端多种蛋白激酶磷酸化位点为 NR2B 的磷酸化和去磷酸化的基础,而蛋白可逆磷酸化是细胞信号转到过程的共同机制^[19],因此,本研究选择进行谷氨酸含量及 NMDA receptor 2B (NR2B)为观察对象。

研究中观察到各组大鼠海马内谷氨酸含量比较:假手术组谷氨酸含量测定高于模型组,差异有统计学意义,与尼莫地平组、培元通脑组比较无差异,模型组与尼莫地平组比较,差异无统计学意义,模型组与培元通脑组比较,差异有统计学意义,尼莫地平组与培元通脑组比较,差异无统计学意义;NMDA2B 受体蛋白表达比较假手术组与模型组、尼莫地平组、培元通脑组比较,差异有统计学意义,模型组与尼莫地平组比较 ($P < 0.05$) 与培元通脑组比较 ($P < 0.01$),尼莫地平组与培元通脑组比较,差异无统计学意义。谷氨酸作为兴奋性神经递质,在本研究中经过培元通脑胶囊的治疗,其在海马内含量较模型组含量升高,尼莫地平组表现平平,但是与培元通脑组差异无统计学意义,但是 NR2B 表达观察组优于模型组,培元通脑组和尼莫地平组之间差异无统计学意义。

因此培元通脑胶囊全方君臣佐使配伍能够达到改善神经元代谢的功能,息风通络作用能改善血流,使精微物质上输于脑,同时改善脑的脉络使其循环废物顺利排出,药物的作用机制可能通过上调脑缺血大鼠海马神经元谷氨酸含量及 NR2B 蛋白表达,改善缺血大鼠在 Morris 水迷宫的表现,体现了益肾填精、肾气充盛进而筋骨强健,动作敏捷,本研究观察到培元通脑胶囊对脑缺血大鼠工作记忆、神经递质及受体均有影响。

研究中发现,培元通脑组与尼莫地平组比较,差异无统计学意义,首先我们考虑两者有比较类似的作用,都能改善微循环,保护神经元;其次,条件限制使得本研究观察例数有限,观察周期较短,未能更全面地发挥药物的作用,以上不足将在我们今后的研究中改良。

参考文献

[1] Daulatzai MA. Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: Key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease[J]. J Neurosci Res, 2017,

95(4):943-972.

- [2] Nelson AR, Sweeney MD, Sagare AP, et al. Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(5):887-900.
- [3] 郑义, 芦钺, 程瑞年. 低剂量 CT 脑灌注及 SPECT 在颈动脉狭窄性短暂性脑缺血发作的应用进展[J]. 中国医学装备, 2016, 13(8): 125-128, 129.
- [4] Kalaria R N, Akinyemi R, Ihara M. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia ☆[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2016, 1862(5):915-925.
- [5] Kalaria RN. Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer's disease [J]. Acta Neuropathol, 2016, 131(5):659-85.
- [6] 鲍远程. 中医脑病的历史沿革及其辨证论治研究[J]. 中医药临床杂志, 2012, 24(11):1029-1034.
- [7] 王米渠. 试论“肾通于脑”的信息神经观[J]. 长春中医学院学报, 1997, 13(2):2-3.
- [8] Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions [J]. Nature, 1982, 297(5868):681-683.
- [9] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2):848-858.
- [10] 陈奇. 中药药理实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社, 1994: 205-207.
- [11] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. Nat Protoc, 2006, 1(2):848-858.
- [12] Gooch J, Wilcock DM. Animal Models of Vascular Cognitive Impairment and Dementia (VCID)[J]. Cell Mol Neurobiol, 2016, 36(2): 233-239.
- [13] Jiwa NS, Garrard P, Hainsworth AH. Experimental models of vascular dementia and vascular cognitive impairment: a systematic review [J]. J Neurochem, 2010, 115(4):814-828.
- [14] Yang Y, Kimura-Ohba S, Thompson J, et al. Rodent Models of Vascular Cognitive Impairment[J]. Transl Stroke Res, 2016, 7(5):407-414.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2015 年版. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:1467-1468.
- [16] 章静波. 格氏解剖学(第 39 版)翻译出版[J]. 基础医学与临床, 2008, 2(7):784.
- [17] Martyn AC, De Jaeger X, Magalhães AC, et al. Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the forebrain causes hyperactivity and deficits in spatial memory and long-term potentiation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(43):17651-17656.
- [18] 贝尔, 康纳斯, 帕拉迪索, 等. 神经科学:探索脑[M]. 北京:高等教育出版社, 2004:137-138.
- [19] 王溢, 姚志彬. NMDA 受体 2B 亚型(NR2B)研究的分子生物学进展[J]. 解剖学研究, 2000, 22(2):131-135.