

# 党参-茯苓-甘草水提物通过激活胆碱能信号通路改善痴呆小鼠的学习记忆功能

徐飞飞<sup>1</sup>, 管雅琪<sup>1</sup>, 崔恺<sup>1</sup>, 王立有<sup>1</sup>, 李欣娱<sup>1</sup>, 李钦青<sup>1</sup>, 田雅娟<sup>1</sup>, 楚世峰<sup>2</sup>, 贺文彬<sup>1\*</sup>

(1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 中医脑病学山西省重点实验室, 山西太原 030624)

(2. 中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 该研究深入探讨“药食两用”中药党参、茯苓、甘草水提物改善学习记忆障碍小鼠的作用机制。小鼠随机分为正常组、模型组、党参-茯苓-甘草组(10、20、40 g/kg)和阳性药组(盐酸多奈哌齐, 1.5 mg/kg), 每组10只, 不间断给药30 d(10 mL/(kg·d))。腹腔注射氢溴酸东莨菪碱建立学习记忆障碍模型(2 mg/kg, 5 d), Morris水迷宫实验考察小鼠行为变化; ELISA检测小鼠海马组织中乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)和乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)水平; Western blot测定胆碱能信号通路相关蛋白及磷酸化表达量。结果发现, 与模型组比较, 高剂量组(40 g/kg)小鼠在Morris水迷宫实验中穿过平台次数增加了5.48次, 在第III象限时间、路程分别增加了17.41%、14.39%; 小鼠海马中ACh水平升高了26%, AChE水平降低了11.9%; 中、高剂量组小鼠海马 $\alpha 7$ -nAChR、CaMK II、p-ERK1/2、p-CREB蛋白表达明显增强。这表明党参-茯苓-甘草水提物能够对学习记忆障碍小鼠起到改善作用, 其机制可能与激活海马组织胆碱能突触通路并上调相关蛋白的表达有关。该研究为潞党参、茯苓、甘草这三味“药食两用”中药资源改善学习记忆障碍功效提供研究基础, 为开发山西省道地药材潞党参提供研究方向。

**关键词:** 潞党参; 茯苓; 甘草; 药食同源; 学习记忆障碍; 乙酰胆碱

文章编号: 1673-9078(2021)10-19-29

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.10.0130

## Aqueous Extract of *Radix Codonopsis-Poria cocos-Glycyrrhizae Radix* Improves the Learning and Memory Functions in Mice through

### Activating the Cholinergic Signaling Pathway

XU Fei-fei<sup>1</sup>, GUAN Ya-qi<sup>1</sup>, CUI Kai<sup>1</sup>, WANG Li-you<sup>1</sup>, LI Xin-yu<sup>1</sup>, LI Qin-qing<sup>1</sup>, TIAN Ya-juan<sup>1</sup>, CHU Shi-feng<sup>2</sup>, HE Wen-bin<sup>1\*</sup>

(1.College of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi Key Laboratory of Chinese Medicine Encephalopathy, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030624, China) (2.Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** This research thoroughly investigated the mechanism of action for the aqueous extract of Chinese medicine *Radix Codonopsis-Poria cocos-Glycyrrhizae Radix* to ameliorate the learning and memory impairment in mice. The mice were randomly divided into

引文格式:

徐飞飞,管雅琪,崔恺,等.党参-茯苓-甘草水提物通过激活胆碱能信号通路改善痴呆小鼠的学习记忆功能[J].现代食品科技,2021,37(10):19-29,+290

XU Fei-fei, GUAN Ya-qi, CUI Kai, et al. Aqueous extract of *Radix Codonopsis-Poria cocos-Glycyrrhizae Radix* improves the learning and memory functions in mice through activating the cholinergic signaling pathway [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 19-29, +290

收稿日期: 2021-02-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81473375;81273629); 山西省重点研发计划(国际科技合作)重大区域创新合作项目(201803D421006;201903D421018); 山西省回国留学人员科研资助项目(2013-134)

作者简介: 徐飞飞(1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理与毒理学研究, E-mail: 807534671@qq.com

通讯作者: 贺文彬(1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 脑病防治理论与技术、中药药理学与健康产品, E-mail: hewb@sxtcm.edu.cn

a normal group, a model group, and *Radix Codonopsis-Poria cocos-Glycyrrhizae Radix* treatment groups (10, 20, 40 g/kg) and a positive drug group (donepezil, 1.5 mg/kg), with 10 mice for each group and 30 days of administration without interruption (10 mL/(kg·d)). The learning and memory impairment model was established by the intraperitoneal injection of scopolamine hydrobromide (2 mg/kg for 5 days). The behavioral changes of the mice were examined by the Morris water maze test, and the ACh and AChE levels in the hippocampal tissues of mice were evaluated by ELISA. The protein expression or phosphorylation related to the cholinergic signaling pathway were determined by Western blotting. The results showed that compared with the model group, the high-dose (40 g/kg) mice crossed the platform 5.48 times more, with their time in the third quadrant increased by 17.41% and the distance in the third quadrant increased by 14.39% in the Morris water maze test. The levels of ACh and AChE in the mouse hippocampal tissues of the middle dose group increased by 29% and decreased by 13.7%, respectively. The levels of ACh and AChE in the hippocampus of high-dose mice increased by 26% and decreased by 11.9% ( $p < 0.05$ ), respectively; The expression of  $\alpha 7$ -nAChR, CaMK II, p-ERK1/2, p-CREB proteins in the hippocampus of medium- and high- dose mice increased significantly. These results suggest that the aqueous extract of *Radix Codonopsis-Poria cocos-Glycyrrhizae Radix* can ameliorate learning and memory impairments in mice, and its mechanism of action may be related to the activation of the cholinergic synaptic signaling pathway in the hippocampus and up-regulating the expression of related proteins. This research provides a research foundation for ameliorating learning and memory impairments using traditional Chinese medicine resources such as *Radix Codonopsis*, *Poria cocos* and *Glycyrrhizae Radix*, and a research direction for the development of the authentic medicinal material, *Lu Codonopsis*, in Shanxi province.

**Key words:** *Radix Codonopsis*; *Poria cocos*; *Glycyrrhizae Radix*; medication and food homology; learning and memory impairment; acetylcholine

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是以学习记忆障碍为主要临床症状的进行性神经变性疾病<sup>[1]</sup>。据世界卫生组织 (WHO) 统计, 全球约有 5000 万人患有痴呆症, 而 AD 患者占到 60%~70%<sup>[2]</sup>。AD 的病理改变主要为多种异常蛋白的累积, 如  $\beta$ -淀粉样蛋白 (amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ ) 沉积、tau 蛋白过度磷酸化, 由它们引起的老年斑 (SP) 及神经原纤维缠结 (NFTs) 最终均会诱导胆碱能神经元大量丢失, 所以研究胆碱能系统对学习记忆障碍的治疗具有重要的指导意义<sup>[3,4]</sup>。现今国内外临床批准广泛使用的药物, 如多奈哌齐、利斯地明等, 也均基于“胆碱能学说”作为胆碱酯酶抑制剂对 AD 起到有效的改善作用<sup>[5]</sup>。由于 AD 是逐步发病, 目前并没有治愈 AD 或改变 AD 病程发展的有效方法。近年来研究表明, 发现及治疗疾病的时间晚, 并且临床药物作用靶点过于单一, 可能是造成抗阿尔茨海默病 (AD) 新药临床试验的失败的主要原因; 并且其病理早期 (即学习记忆障碍阶段) 常被忽视, 在此阶段适当干预可减缓病程发展, 所以说对于 AD 的预防大于治疗<sup>[6,7]</sup>。

学习记忆障碍阶段症状主要表现为短期记忆力的下降, 这与中医的“呆病”、“健忘”等病证相似<sup>[8]</sup>。《素问·宣明五气篇》记载“脾藏意与智”, 脑为髓之海, 由脏腑之精气汇聚而成。中医认为“后天之本在脾”, 脾主运化, 为气血生化之源, 可将水谷精微运化至脑, 以养脑髓; 若后天失养, 气血津液运化无力, 不能充养脑髓, 神机失用<sup>[9-11]</sup>。传统中医理论指导下, 中草药, 尤其是“药食同源”类中药, 对疾病的预防具有显著效

果<sup>[12,13]</sup>。党参 (*Radix codonopsis*) 性味甘平, 可补中益气, 健脾养血。茯苓 (*Poria cocos*) 甘淡平, 益脾和胃, 宁心安神。甘草 (*Glycyrrhizae radix*) 甘平, 补脾益气, 调和诸药。蜜炙甘草药性温和, 补脾和胃。党参茯苓相配, 可补脾胃之气而无碍胃之弊, 茯苓性淡, 可渗湿, 顺应脾胃气化。甘草味甘, 斡旋中焦, 平补气血, 全方补而不滞, 滋而不腻, 着眼于中焦, 尤重于脾。脾胃得养则气血生化有源, 气血足则能上充于脑, 脑髓充足则耳目聪明。

党参作为一种补益药被广泛熟知, 是桔梗科草本植物党参 [*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.] 和素花党参 (*Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* Nannf. L. T. Shen) 的干燥根, 其主要活性成分为党参皂苷及党参多糖<sup>[14]</sup>。经数据挖掘研究发现, 中药治疗 AD 的临床及动物实验研究药物中, 补虚药是核心药物的主要类别<sup>[15]</sup>。党参作为补气药, 具有健脾益肺, 养血生津的功效, 近年来研究认为党参除了在血液循环系统及免疫系统中的重要作用外, 其活性成分党参多糖能够增加大脑乙酰胆碱能受体表达、清除自由基, 起到改善记忆的作用<sup>[16]</sup>。在中药治疗 AD 的临床研究中, 茯苓及甘草使用频率分别为 3.58% 和 3.42%; 动物实验研究中, 使用频率分别为 4.65% 和 2.60%, 二者在 33 味常用于治疗 AD 中药中分别排名第五、六位<sup>[15]</sup>。研究提示, 茯苓多糖及甘草酸类成分为两味中药改善学习记忆的主要活性成分<sup>[17,18]</sup>。

本课题组经前期研究, 以“药食同源”中药党参、茯苓、甘草配伍, 发现其水提物能够通过抗氧化及增

强免疫功能起到改善学习记忆障碍的作用<sup>[19]</sup>。中药中含有多种活性成分,能够通过多靶点、多途径,在改善病因不清、发病机制复杂的疾病中发挥优势<sup>[8]</sup>。为深入探究水提物对学习记忆障碍的其他改善途径,现采用腹腔注射氢溴酸东莨菪碱制备小鼠学习记忆障碍模型,验证水提物能否影响经典学说“胆碱能学说”相关靶点。通过 Morris 水迷宫实验观察党参-茯苓-甘草水提物的记忆障碍改善作用,检测海马内乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)水平和乙酰胆碱脂酶(acetylcholinesterase, AchE)活力,测定乙酰胆碱相关蛋白表达量,从胆碱能信号通路探讨党参-茯苓-甘草水提物对小鼠学习记忆障碍的改善作用及机制。本研究补充了潞党参、茯苓、甘草三味中药改善学习记忆障碍的作用靶点及作用途径,为今后“药食两用”中药多靶点预防疾病提供了实验基础,更为中药资源保健功能的开发提供研究方向。

## 1 材料与方 法

### 1.1 受试动物

SPF 级雄性健康昆明(KM)小鼠,八周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0006。小鼠于实验前 7 d 置于清洁级实验室适应环境,自由饮食、摄水。本文所做实验均获得伦理委员会批准。

### 1.2 试剂与仪器

潞党参、茯苓、甘草,药材采购厂家及批号同文献<sup>[19]</sup>;盐酸多奈哌齐,购自卫材(中国)药业有限公司;氢溴酸东莨菪碱,购自湖北佳诺信生物化工有限公司;Ach、AchE 试剂盒(货号:RA20055、MU30372),购自武汉贝茵莱生物科技有限公司; $\alpha 7$ -nAChR 抗体(货号:GTX64511),购自 Gene Tex 公司;CaMKII、ERK1/2、p-ERK1/2、p-CREB、 $\beta$ -actin 抗体(货号为:ab52476、ab17942、ab201015、ab32096、ab8227),均购自 Abcam 公司。

Heraeus Multifuge X1R 高速冷冻离心机,赛默飞世尔科技公司;Waters e2695 高效液相色谱仪、Waters Symmetry C18 液相色谱柱,沃特世科技有限公司;JY92-IIN 超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;VERSA max 酶标仪(BNRO5709),上海美谷分子仪器有限公司;R540 增强型动物麻醉机、ThermoStar 69020 小鼠体温维持仪,深圳市瑞沃德生命科技有限公司;JLBehv-MWMM 大小鼠通用 Morris 水迷宫,上海吉量软件科技有限公司;Champ Chemi

Professional 全自动多色荧光及化学发光凝胶成像系统,北京赛智创业科技有限公司;DYY-6D 电泳仪,北京六一生物科技有限公司;TE77XP 电转仪,豪沃生物科技(上海)有限公司;THZ-92B 气浴恒温箱,上海博讯实业有限公司;CP224C 分析天平,奥豪斯仪器(上海)有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 药液制备

取潞党参粗粉、茯苓粗粉各 100 g,甘草 20 g,按照《中国药典》2015 年版蜜炙法通则 0213 方法对甘草进行炮制。上述药材加 10 倍量的水浸泡 1 h,煎煮 1.5 h。过滤,药渣加 8 倍量水煎煮 1 h。过滤,合并两次滤液,常压浓缩至 1 mL 药液相当于原药材 1 g。依据“人与动物间的等效剂量换算”及课题组前期研究有效剂量,将浓缩液加纯净水稀释至浓度为 10、20、40 g/kg(灌胃剂量为 10 mL/kg),4 °C 冰箱贮存备用。复方党参煎液于 10000 r/min,离心 15 min,得上清液,于低温冷冻干燥机干燥。取干燥品 10 g,用甲醇定容至 20 mL,摇匀,超提取声 1 h,抽滤得续滤液,过 0.22  $\mu$ mol/L 有机微孔滤膜,得供试品溶液,经高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)分析得出中药水提液中成分。

#### 1.3.2 实验动物分组

60 只 KM 小鼠,随机分为 6 组,分别为正常组,模型组,党参-茯苓-甘草低、中、高剂量组(10、20、40 g/kg),阳性药组,每组 10 只。正常组、模型组小鼠每日灌胃生理盐水,党参-茯苓-甘草组分别灌胃 10、20、40 g/kg 的药液稀释液,阳性药组灌胃 1.5 mg/kg 盐酸多奈哌齐,不间断给药 30 d(10 mL/(kg·d))。

#### 1.3.3 Morris 水迷宫行为学测试

参照文献方法<sup>[12]</sup>进行定位航行实验和空间探索实验。定位航行实验自给药第 25 d 至第 29 d 共 5 d,灌胃给药结束后,除空白组腹腔注射生理盐水外,其余各组腹腔注射氢溴酸东莨菪碱(2 mg/kg),30 min 后将各组小鼠从 4 个不同象限的入水点面向池壁放入水中,时间为 120 s。若小鼠在 120 s 内未找到平台,将其引至平台,让动物在平台停留 30 s 后,擦干水分,再放回笼中,每天记录小鼠找到平台的潜伏时间。给药第 30 d 将平台撤除,按照定位航行试验的方法进行空间探索实验,记录 120 s 内小鼠在水池 4 个象限中的游泳路径、时间,计算平台所在象限(第 III 象限)数据占总距离、总时间的百分比及穿越平台的次数,用来反映小鼠对平台所在位置的空间记忆能力,以判断小鼠记忆储存及提取再现能力。

### 1.3.4 酶联免疫实验

空间探索实验结束后, 异氟烷麻醉小鼠。脱颈处死, 迅速于冰上断头取脑, 用生理盐水冲掉血液, 取海马组织, 滤纸擦干后称重, 两侧海马分装备用。一侧海马组织用超声波细胞粉碎机于冰上制成10%的组织匀浆, 低温高速离心机离心(3500 r/min, 10 min, 4 °C), 取上清液储存于-20 °C备用。按照ELISA试剂盒操作步骤测定小鼠海马样品中ACh、AChE的水平。

### 1.3.5 免疫蛋白印迹(Western Blot)实验

将另一侧海马组织按每20 mg组织加入180 μL裂解液的比例加入裂解液, 用超声波细胞粉碎机匀浆直至完全裂解。裂解后的样品4 °C, 12000 r/min, 离心15 min, 取上清, 用BCA试剂盒进行蛋白质定量。将提取的蛋白进行SDS-PAGE电泳分离, 再进行电转使其转移至杂交膜上, 本实验选用PVDF膜。再用5%脱脂奶粉(检测磷酸化蛋白用BSA)环境下封闭2 h。根据说明书稀释抗体, 抗体加入封闭液中稀释到所需浓度, 4 °C孵育过夜, 孵育一抗的膜用TBST洗涤3次, 每次10 min。随后根据用量, 按照1:2000稀释HRP标记的二抗, 与膜室温孵育2 h。用TBST洗涤3次, 每次10 min。洗膜后, 将ECL化学发光液, 加在膜的正反面于凝胶成像系统暗室中进行扫描, 对 $\alpha 7$ -nAChR、CaMK II、ERK1/2、p-ERK1/2、p-CREB以及 $\beta$ -actin蛋白表达量进行可视化。采用Image J 1.50e图像处理软件通过灰度值分析蛋白表达量, 每个蛋白进行三次重复实验(n=3)。

## 1.4 统计学方法

实验数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 采用GraphPad Prism 6.02统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $p < 0.05$ 为有显著差异,  $p < 0.01$ 为有极显著差异。

## 2 结果与讨论

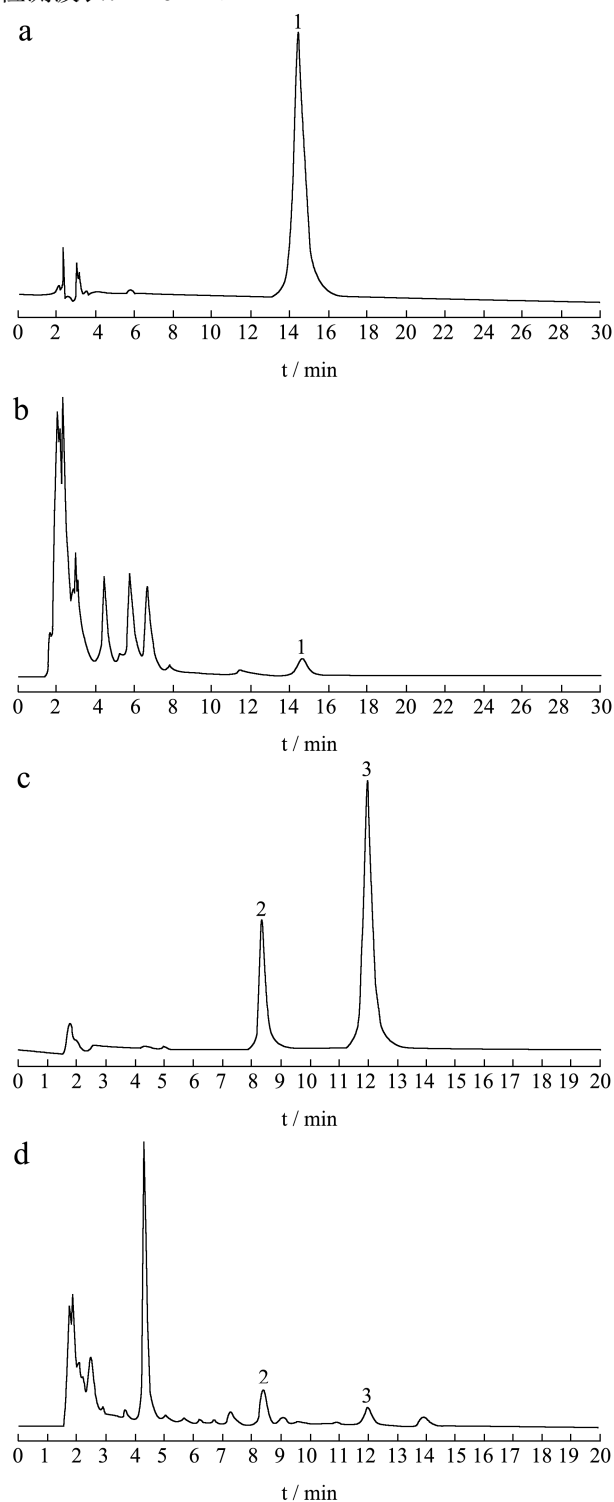
### 2.1 党参-茯苓-甘草水提物成分高效液相色谱

#### 鉴定

经HPLC分析得出参苓草复方水提液中含有少量党参炔苷、猪苓酸C、去氢土莫酸、甘草苷、甘草素、甘草酸铵成分。党参成分党参炔苷色谱图见图1a、b。精密称取干燥至恒重的党参炔苷对照品适量, 加甲醇定容, 制成含党参炔苷0.0377 mg/mL的对照品溶液。色谱柱为Waters Symmetry C18柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.4%磷酸(B), 等度洗

脱(0~30 min, 22% A), 流速1.0 mL/min, 柱温30 °C, 进样量10 μL, 检测波长: 267 nm。

茯苓成分猪苓酸C、去氢土莫酸色谱图见图1c、d。精密称取干燥至恒重的猪苓酸C、去氢土莫酸对照品适量, 加甲醇定容, 制成含猪苓酸C 0.0707 mg/mL、去氢土莫酸0.0328 mg/mL的对照品溶液。流动相为乙腈(A)-0.5%磷酸(B), 等度洗脱(0~30 min, 70% A), 检测波长: 246 nm。



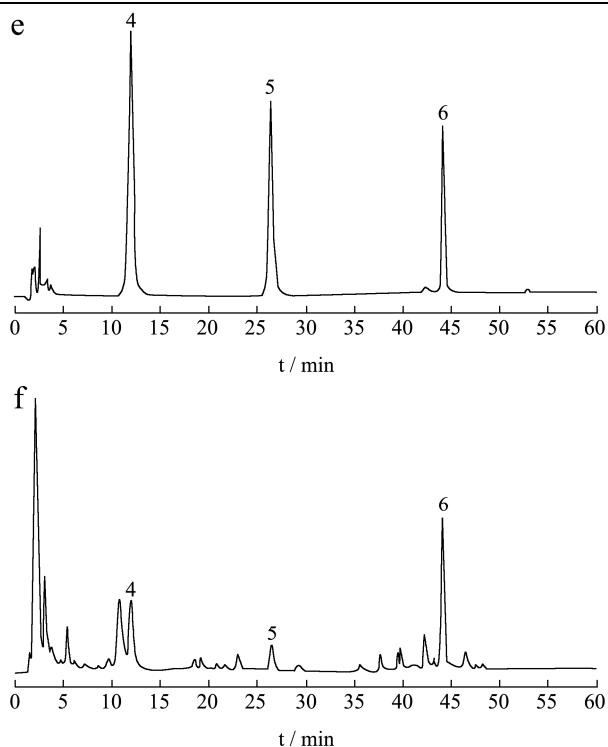


图1 党参-茯苓-甘草水提取物HPLC色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of water extract

注: a: 党参炔苷标准品; c: 猪苓酸 C、去氢土莫酸对照品; e: 甘草苷、甘草素、甘草酸铵对照品; b、d、f: 党参-茯苓-甘草水提取物样品。1: 党参炔苷; 2: 猪苓酸 C; 3: 去氢土莫酸; 4: 甘草苷; 5: 甘草素; 6: 甘草酸铵。

甘草成分甘草苷、甘草素、甘草酸铵色谱图见图1e、f。精密称取干燥至恒重的甘草苷、甘草素、甘草酸铵对照品适量, 加甲醇定容, 制成含甘草苷 0.2988 mg/mL、甘草素 0.0084 mg/mL、甘草酸铵 0.6043 mg/mL 的对照品溶液。流动相为乙腈 (A) -0.85%磷酸 (B), 梯度洗脱 (0~11 min, 18% A; 11~13 min,

18%→22% A; 13~21 min, 22%→28% A; 21~31 min, 28% A; 31~40 min, 28%→42% A; 40~60 min, 42% A), 检测波长: 237 nm。

## 2.2 水提取物对学习记忆障碍小鼠行为学影响

长期以来, 海马在学习和记忆中起着关键作用, 广泛的行为学研究已证实了海马在储存和恢复记忆以及空间导航方面的重要性<sup>[20-22]</sup>。东莨菪碱作为乙酰胆碱拮抗剂, 以胆碱能学说为基础, 模拟乙酰胆碱分泌不足造成的学习记忆障碍动物模型<sup>[23]</sup>。盐酸多奈哌齐通过抑制胆碱酯酶活性, 是临床普遍用于治疗轻度、中度老年痴呆的药物, 本实验将其作为阳性对照药物。

Morris 水迷宫能够评价动物空间学习记忆能力, 是一种被应用于痴呆研究的行为学评价指标<sup>[24]</sup>。本研究经过 5 d 对小鼠的训练, 选取最后一天的测试结果, 即穿过平台次数、第Ⅲ象限时间及路程百分比作为评价指标, 见表 1。与正常组比较, 模型组小鼠穿过平台次数、在第Ⅲ象限的时间及路程百分比均显著降低 ( $p<0.05$ ), 学习记忆能力明显下降。与模型组比较, 高剂量党参-茯苓-甘草组 (40 g/kg) 小鼠穿越原平台的次数明显增加 ( $p<0.05$ ); 低、中、高剂量党参-茯苓-甘草组 (10、20、40 g/kg) 小鼠在原平台所在第Ⅲ象限停留时间百分比均明显提高 ( $p<0.05$ ), 在剂量范围内呈量效关系; 中剂量和高剂量党参-茯苓-甘草组 (20、40 g/kg) 小鼠在第Ⅲ象限运动路程百分比明显提高 ( $p<0.05$ )。结果表明, 腹腔注射氢溴酸东莨菪碱能够造成小鼠学习记忆损伤, 表明学习记忆障碍模型建立成功; 党参-茯苓-甘草水提取物能够改善学习记忆障碍小鼠的学习记忆障碍行为学表现, 其中 40 g/kg 剂量最佳。

表 1 党参-茯苓-甘草对学习记忆障碍小鼠记忆能力的影响

Table 1 Effect of water extract on memory ability of learning and memory impairment mice (mean±SD, n=10)

组别	穿过平台次数/次	第Ⅲ象限时间百分比/%	第Ⅲ象限路程百分比/%
正常组	7.71±3.68	39.30±9.51	35.18±13.38
模型组	2.38±1.19 <sup>a</sup>	17.47±5.63 <sup>a</sup>	21.38±6.51 <sup>a</sup>
党参-茯苓-甘草组 (g/kg)	10	4.43±0.53 <sup>a</sup>	28.57±10.03 <sup>b</sup>
	20	4.50±1.52 <sup>a</sup>	33.23±5.90 <sup>b</sup>
	40	7.86±2.61 <sup>b</sup>	34.88±7.44 <sup>b</sup>
阳性药组	8.33±3.20 <sup>b</sup>	36.15±5.84 <sup>b</sup>	37.92±8.50 <sup>b</sup>

注: \*表示正常组与模型组组间存在显著 ( $p<0.05$ ) 差异; 不同字母表示各给药组存在显著 ( $p<0.05$ ) 差异, 表 2 同。

## 2.3 水提取物对胆碱能神经递质 ACh 及酶 AChE

的影响

### 2.3.1 ACh 与 AChE 标准曲线建立

将浓度分别为 0、50、100、200、400、800、1600 pmol/L 的小鼠 ACh 标准品设为横坐标, 酶标仪检测的 OD 值为纵坐标, 绘得标准曲线的直线方程式:  $y=1125.4x+62.541$  ( $R^2=0.9912$ ); 将浓度分别为 0、3.125、6.25、12.5、25、50 U/mg 的小鼠 AChE 标准

品设为横坐标, 酶标仪检测的 OD 值为纵坐标, 绘得标准曲线的直线回归方程式:  $y=39.544x-2.9032$  ( $R^2=0.9943$ )。将样本 OD 值带分别入以上标准直线方程式中, 计算样品浓度。

### 2.3.2 胆碱能神经递质 ACh 浓度及 AChE 酶活力

乙酰胆碱是中枢胆碱能系统中重要的神经递质之一, 与学习、记忆密切相关, 海马中 ACh 水平的降低能够引起学习记忆障碍<sup>[12,25]</sup>。乙酰胆碱酯酶 (AChE), 可使 ACh 水解为胆碱和乙酸, 是胆碱能突触通路中神经信号传导的关键酶。正常生理状态下, AChE 能够维持 ACh 含量的稳定, 避免其对于突触后膜受体的过度刺激; 病理条件下, AChE 活性的异常升高, 使 ACh 降解速度加快, 从而造成含量显著降低, 生物信号不能得到正常传导<sup>[26]</sup>。

表2 党参-茯苓-甘草水提物对学习记忆障碍小鼠海马 ACh 水平及 AChE 活性的影响

Table 2 Effect of water extract on ACh content and AChE activity of hippocampus in learning and memory impairment mice (mean±SD, n=10)

组别	ACh/(pmol/L)	AChE/(U/mg)
正常组	480.94±56.94	205.99±15.41
模型组	322.48±45.67 <sup>a</sup>	256.57±14.36 <sup>a</sup>
党参-茯苓-甘草组 (g/kg)	10	358.36±59.71 <sup>b</sup>
	20	417.31±37.79 <sup>b</sup>
	40	406.34±87.05 <sup>b</sup>
阳性药组	486.31±54.15 <sup>c</sup>	212.27±12.80 <sup>b</sup>

胆碱能神经递质 ACh 及酶 AChE 检测结果见表 2。与正常组相比, 模型组小鼠海马中胆碱能神经递质 ACh 水平显著下降 ( $p<0.05$ ); 与模型组相比, 中剂量和高剂量党参-茯苓-甘草组 (20、40 g/kg) 小鼠海马中 ACh 水平显著升高, 且 20 g/kg 剂量作用效果好于 40 g/kg。与正常组相比, 模型组小鼠海马中乙酰胆碱降解酶 AChE 活性显著降低 ( $p<0.05$ ); 与模型组相比, 中剂量党参-茯苓-甘草组 (20 g/kg) 小鼠海马中 AChE 活性显著升高 ( $p<0.05$ )。研究发现, 党参多糖能够改善东莨菪碱、亚硝酸钠、乙醇等诱导的学习记忆障碍模型小鼠学习记忆能力<sup>[27-29]</sup>。张立等<sup>[30]</sup>通过党参多糖对铅中毒诱导的小鼠记忆障碍的评价中, 发现党参多糖处理的小鼠在 Morris 水迷宫及跳台实验中表现良好, 但 AChE 作为检测指标, 发现党参多糖组与模型组在该指标上并无显著差异, 党参多糖是否能够对胆碱能系统产生影响仍与进一步研究。徐煜彬等<sup>[31]</sup>、高冰冰等<sup>[32]</sup>均认为茯苓改善东莨菪碱所致学习记忆障碍与降低 AChE 活性有关。药理研究分析发现, 茯苓

酸类与茯苓多糖是茯苓发挥改善学习记忆障碍药理活性的主要物质, 去氢茯苓酸能够降低  $A\beta$  沉积造成的神经细胞毒性, 茯苓多糖能够提高抗氧化能力起到抗衰老作用<sup>[33-36]</sup>。蜜炙甘草药性温和, 补脾和胃。张耀峰等<sup>[37]</sup>发现甘草水提物能够有效缓解阿尔茨海默病发病进程, 认为其可能机制与降低 AChE 活性与氧化应激有关。甘草活性成分甘草酸可通过抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡、抗胆碱酯酶等药理作用起到脑保护效果<sup>[38]</sup>。在体内外实验中发现甘草素能够减轻 AD 模型细胞及小鼠炎症和凋亡的产生, 此外还能够通过抑制  $A\beta$  和老年斑的生成, 改善 AD 小鼠学习记忆能力<sup>[39]</sup>。本研究结果显示, 腹腔注射氢溴酸东莨菪碱能够降低小鼠海马中 ACh 水平造成记忆障碍; ACh 水平的降低可能是由于 AChE 活力升高造成 AChE 降解速度加快而引起的。所以党参-茯苓-甘草水提物能够通过降低 AChE 活力, 使学习记忆障碍小鼠海马中 ACh 含量恢复正常水平。

### 2.4 水提物对胆碱能突触信号通路相关蛋白的影响

#### 2.4.1 乙酰胆碱受体 $\alpha 7$ -nAChR 蛋白表达量

烟碱型乙酰胆碱受体 (Nicotinic acetylcholine receptors, AChRs) 广泛分布于大脑海马中, 作为乙酰胆碱的主要代谢型受体蛋白, ACh 经过突触前膜胞吐作用于突触后膜, 激活  $\alpha 7$ -nAChR 可诱导多种与神经保护和突触可塑性相关的途径, 促进海马神经元的增殖与分化, 增强神经元突触可塑性<sup>[40]</sup>。研究认为在 AD 发病早期出现  $A\beta$  沉积, 认知障碍临床表现变得明显之前, 烟碱型乙酰胆碱受体, 尤其是  $\alpha 7$  亚型, 在与认知和记忆功能相关的脑区表达异常<sup>[41]</sup>。有强有力的证据表明, 通过激活  $\alpha 7$  胆碱能受体能够使患者的学习记忆功能得到一定改善, 它与 AD 早期学习和记忆能力的降低密切相关<sup>[42]</sup>。

实验 2.2 发现党参-茯苓-甘草水提物能够调节学习记忆障碍小鼠海马中 ACh 水平, 则位于突触后膜上的 ACh 受体表达量也会随之降低。通过检测各组小鼠海马中  $\alpha 7$ -nAChR 的蛋白表达量, 发现模型组小鼠与正常组相比,  $\alpha 7$ -nAChR 蛋白表达量显著降低 (0.73 vs. 1.00,  $p<0.01$ ); 高剂量党参-茯苓-甘草组 (40 g/kg) 小鼠与模型组相比, 蛋白表达量有升高趋势 (1.01 vs. 0.73,  $p<0.01$ ), 但低剂量和中剂量党参-茯苓-甘草组 (10 g/kg、20 g/kg) 无显著差异 (1.01 vs. 0.73,  $p>0.05$ ; 0.66 vs. 0.73,  $p>0.05$ )。课题组通过对党参、茯苓、甘草三味中药治疗阿尔茨海默病的药物-疾病靶点网

络药理学分析, 预测到靶点  $\alpha 7$ -nAChR (Gene name: CHRNA7) 是具有相关性的目的蛋白之一<sup>[43]</sup>。此外, 未小明等<sup>[44,45]</sup>认为中药活性成分或水提物若促进 AD 模型  $\alpha 7$ -nAChR 蛋白的表达, 则能证实其具有一定改善学习记忆的效果。所以, 可判断党参-茯苓-甘草水提物能够激活学习记忆障碍小鼠海马中  $\alpha 7$ -nAChR, 起到改善学习记忆障碍的作用。

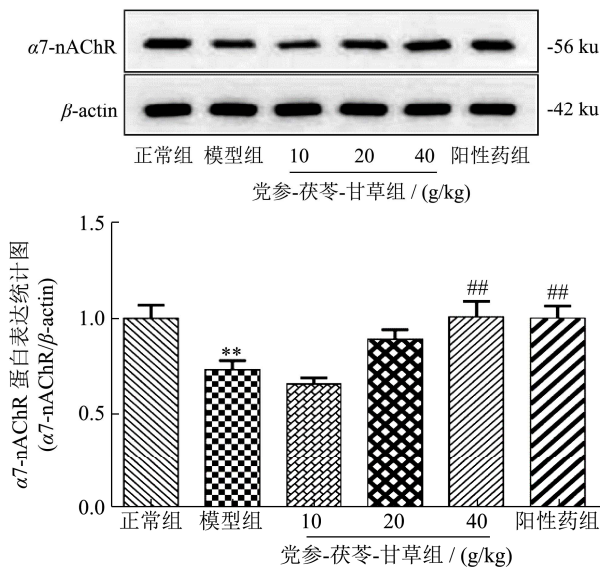


图2 党参-茯苓-甘草水提物对小鼠海马乙酰胆碱受体  $\alpha 7$ -nAChR 蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of water extract on expression of  $\alpha 7$ -nAChR protein in mouse hippocampus (mean  $\pm$  SD, n=3)

### 2.4.2 钙离子相关蛋白 CaMK II

$\alpha 7$  胆碱能受体 ( $\alpha 7$ -nAChR) 作为离子型通道, 对  $Ca^{2+}$  有很好的通透性, 能协助第 2 信使  $Ca^{2+}$ , 参与调节学习记忆<sup>[46]</sup>。研究表明, 突触神经元  $Ca^{2+}$  浓度的变化均影响长时程增强 (Long-term potentiation, LTP) 的诱导与维持, 其中研究最为深入, 且具有关键作用的相关蛋白激酶中, 不得不提的是钙调素依赖性蛋白激酶 II (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II)<sup>[47,48]</sup>。 $Ca^{2+}$  内流能够激活 CaMK II, 促使其发生自身磷酸化, 据此早在 1994 年, Lisman<sup>[49]</sup> 推测 CaMK II 可能是记忆的分子基础。在敲除 CaMK II  $\alpha$  亚基后发现小鼠的空间学习记忆能力显著降低, 但非空间记忆能力无显著变化, 海马作为空间学习与记忆的生物基础, 所以本研究对小鼠海马中 CaMK II 的蛋白磷酸化表达量测定<sup>[50]</sup>。

ACh 含量的降低, 使其受体  $\alpha 7$ -nAChR 蛋白活性下降,  $Ca^{2+}$  浓度也随之降低, 所以与正常组相比, 模型组小鼠海马组织中 CaMK II 的蛋白磷酸化表达量显著降低 (0.66 vs. 1.00,  $p < 0.01$ ); 与模型组相比, 中剂量和高剂量党参-茯苓-甘草组 (20 g/kg、40 g/kg)

小鼠海马中 CaMK II 的蛋白磷酸化表达量显著升高 (0.91 vs. 0.66,  $p < 0.05$ ; 1.01 vs. 0.66,  $p < 0.01$ ), 低剂量党参-茯苓-甘草组 (10 g/kg) 无显著差异 (0.65 vs. 0.66,  $p > 0.05$ )。不过, 在本课题组前期的研究中, 学习记忆障碍小鼠海马中 CaMK II 出现过表达现象, 与本研究结果相反<sup>[51]</sup>。不过, 前期研究是基于乙醇诱导兴奋性毒性, 受体活性增强引起了钙超载现象; 而本研究是基于东莨菪碱诱导 ACh 含量下降, 其受体活性减弱引起的钙离子浓度降低现象。所以, CaMK II 的表达异常, 即过表达或低表达, 均能够对学习记忆能力产生损伤。Kanno 等<sup>[52]</sup>研究认为通过上调 CaMK II 的磷酸化表达量, 能够起到显著的改善记忆障碍的作用, 本研究得到相似的结果。

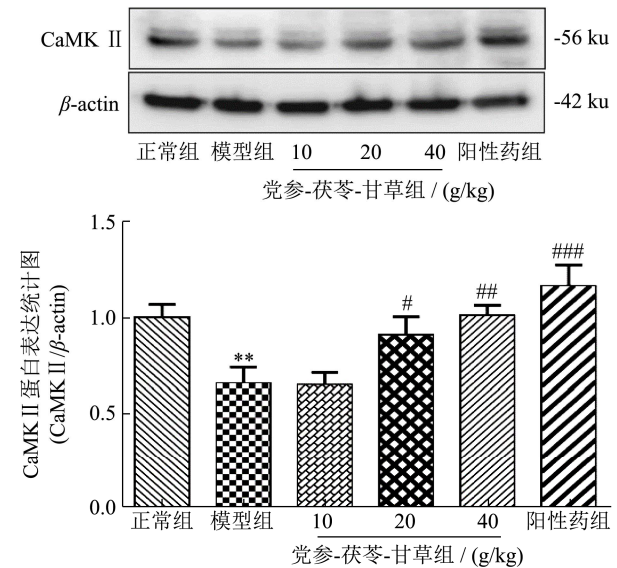


图3 党参-茯苓-甘草水提物对小鼠海马 CaMK II 蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of water extract on expression of CaMK II protein in mouse hippocampus (mean  $\pm$  SD, n=3)

### 2.4.3 突触可塑性相关蛋白 ERK 和 CREB

胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 和环磷腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 是与学习记忆相关的蛋白, 对调节突触可塑性起到重要作用, 并参与胆碱能突触通路<sup>[53]</sup>。ERK 级联的激活需要 CaMK II 等突触蛋白的激活, ERK 包括 ERK1 和 ERK2, 其磷酸化 (phosphorylation-ERK, p-ERK) 在神经元细胞增殖、抑制细胞凋亡中发挥重要调节作用<sup>[54,55]</sup>。CREB 是海马突触可塑性和海马依赖记忆的关键核转录因子, 其磷酸化 (phosphorylation-CREB, p-CREB) 是海马空间记忆形成的分子标记<sup>[56]</sup>。多数研究发现, CaMK II 磷酸化转录因子 CREB, 并将其转化为活性形式 p-CREB, 随后启动神经元可塑性所

需的蛋白质的转录和翻译<sup>[57-59]</sup>。研究表明 AD 动物海马组织中 p-ERK 与 p-CREB 蛋白表达均普遍降低,通过激活 ERK 与 CREB 磷酸化能够增强小鼠学习记忆能力<sup>[60]</sup>。

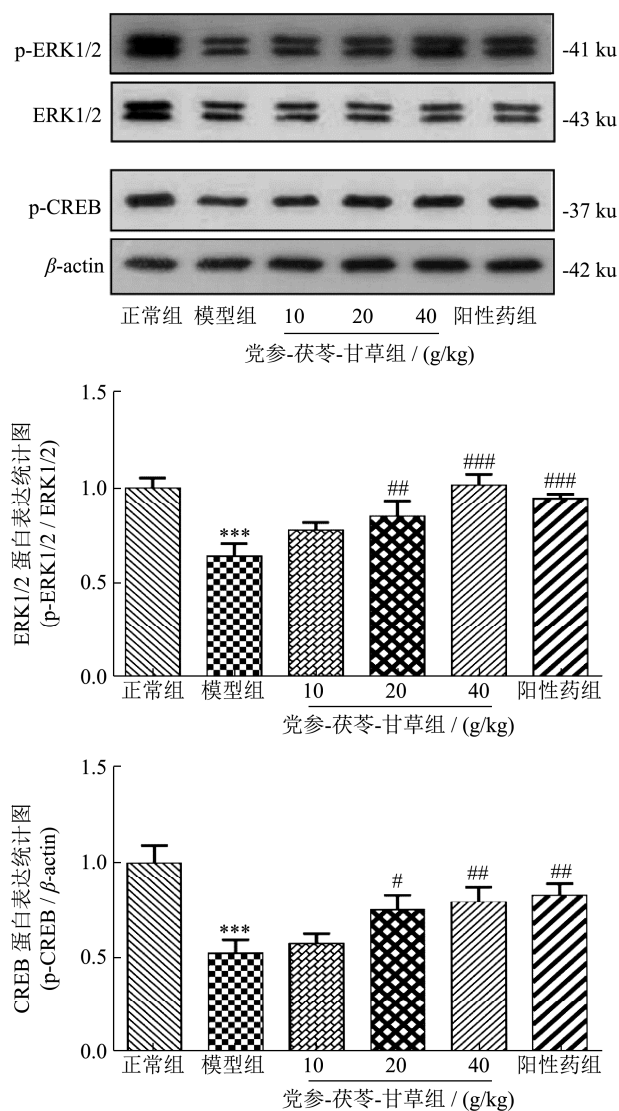


图4 党参-茯苓-甘草水提取物对小鼠海马突触可塑性蛋白 ERK 和 CREB 表达的影响

Fig.4 Effect of water extract on expression of ERK and CREB proteins in mouse hippocampus (mean±SD, n=3)

本研究对 ERK1/2 以及 CREB 的磷酸化水平进行测定后发现,与正常组相比,模型组小鼠海马组织中 ERK1/2 及 CREB 的磷酸化蛋白表达量显著降低(0.64 vs. 1.00,  $p<0.01$ ; 0.52 vs. 1.00,  $p<0.01$ );与模型组相比,中剂量和高剂量党参-茯苓-甘草组(20、40 g/kg)小鼠海马中 p-ERK1/2 蛋白磷酸化表达量显著升高(0.85 vs. 0.64,  $p<0.01$ ; 1.01 vs. 0.64,  $p<0.01$ ), p-CREB 蛋白磷酸化表达量也显著升高(0.75 vs. 0.52,  $p<0.05$ ; 0.79 vs. 0.52,  $p<0.01$ );低剂量党参-茯苓-甘草组(10 g/kg)有升高趋势,但效果不显著(0.77 vs. 0.64,

$p>0.05$ ; 0.52 vs. 0.52,  $p>0.05$ )。上述结果表明,模型组小鼠海马中 ACh 水平的降低,使突触后膜乙酰胆碱受体  $\alpha 7$ -nAChR 活性降低,从而引起该信号通路相关蛋白 p-ERK1/2 及 p-CREB 处于低表达状态<sup>[61]</sup>;党参-茯苓-甘草能够升高模型鼠海马中 ACh 水平,恢复  $\alpha 7$ -nAChR 蛋白活性,激活胆碱能突触信号通路,对该通路中相关蛋白 p-ERK1/2 及 p-CREB 表达起到上调作用,得到与屈夏夏等<sup>[60]</sup>和高静等<sup>[62]</sup>相同的研究结论。

### 3 结论

本研究通过 Morris 水迷宫测试,分析小鼠穿越原平台的次数、在第 III 象限停留时间及第 III 象限运动路程,发现不同剂量党参-茯苓-甘草对学习记忆障碍小鼠的学习记忆能力均有不同程度的改善,以 40 g/kg 剂量表现最佳。党参-茯苓-甘草水提取物 20、40 g/kg 剂量能够降低氢溴酸东莨菪碱导致的学习记忆障碍小鼠海马 AChE 酶活,从而升高 ACh 的水平,以及上调  $\alpha 7$ -nAChR 与 CaMK II 蛋白表达量。此外,党参-茯苓-甘草水提取物 20、40 g/kg 剂量均能够上调 p-ERK1/2 和 p-CREB 蛋白表达。说明党参-茯苓-甘草水提取物能够降低海马组织 AChE 活性,升高 ACh 水平,恢复乙酰胆碱受体  $\alpha 7$ -nAChR 活性,上调相关蛋白 CaMK II、p-ERK1/2、p-CREB 的表达。党参-茯苓-甘草水提取物能够改善小鼠的学习记忆障碍,其机制可能与降低海马组织 AChE 活性,升高 ACh 水平,恢复 ACh 受体  $\alpha 7$ -nAChR 蛋白活性,激活胆碱能突触通路并上调相关蛋白的表达有关。结合杨鹏飞等<sup>[14]</sup>对水提取物的抗氧化及增强免疫力研究,本研究为今后游党参、茯苓、甘草多靶点预防疾病提供了实验基础,更为“药食两用”中药资源保健功能的开发提供研究方向。

### 参考文献

- [1] 只德广,庞纪平,金兆祥,等.海马补肾丸对小鼠学习记忆障碍的改善作用[J].现代药物与临床,2019,34(5):1290-1293  
ZHI De-guang, PANG Ji-ping, JIN Zhao-xiang, et al. Improvement of Haima Bushen Pills on learning and memory impairment in mice [J]. Drugs & Clinic, 2019, 34(5): 1290-1293
- [2] Revi M. Alzheimer's Disease Therapeutic Approaches [J]. Adv Exp Med Biol. 2020, 1195: 105-116
- [3] Hampel H, Mesulam M M, Cuello A C, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease [J]. Brain, 2018, 141(7): 1917-1933
- [4] Selkoe D J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy



- [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81: 741-766
- [5] 张中启,罗质璞.学习记忆的胆碱能机制与去甲肾上腺素能和 5-羟色胺能介质系统的关系[J].*中国药理学通报*,1994, 10(2):81-83  
ZHANG Qi-zhong, LUO Zhi-pu. Relationship between cholinergic mechanism of learning and memory and norepinephrine and serotonin mediators system [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 1994, 10(2): 81-83
- [6] Roberts R O, Knopman D S, Mielke M M, et al. Higher risk of progression to dementia in mild cognitive impairment cases who revert to normal [J]. *Neurology*, 2014, 82(4): 317-325
- [7] Lawrence H, Alireza A, Stephen S. Alzheimer's disease in primary care: the significance of early detection, diagnosis, and intervention [J]. *Am J Med*, 2017, 130(6): 756
- [8] 张萌,巴哈尔·哈德尔.阿尔茨海默病中医研究进展[J].*新疆中医药*,2018,36(6):66-68  
ZHANG Meng, BAHAR Haider. Advances in TCM research on Alzheimer's disease [J]. *Xinjiang Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2018, 36(6): 66-68
- [9] 董东梅,常诚.健忘中医论治探讨[J].*辽宁中医杂志*,2017,44(5):945-946  
DONG Dong-mei, CHANG Cheng. TCM treatment for forgetfulness [J]. *Liaoning Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2017, 44(5): 945-946
- [10] 卢阳佳,陈俊琦,黄泳,等.从脾胃论治阿尔茨海默病概述[J].*时珍国医国药*,2010,21(5):1217-1219  
LU Jia-yang, CHEN Jun-qi, HANG Yong, et al. An overview of the treatment of Alzheimer's disease by spleen and stomach [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Reserch*, 2010, 21(5): 1217-1219
- [11] 张沁园,曹存梅.脑与脾肾的关系探讨[J].*中华中医药学刊*, 2008,1:180-183  
ZHAGN Qin-yuan, CAO Cun-mei. Discuss relation of brain spleen kidney [J]. *Chinese Archives of Triditional Chinese Medicine*, 2008, 1: 180-183
- [12] 杨丽霞,赵婧,王善,等.党参远志散微乳对阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆障碍的改善作用[J].*中草药*,2020,51(5): 1257-1263  
YANG Li-xia, ZHAO Jing, WANG Shan, et al. Dangshen Yuanzhi Powder microemulsion attenuates learning and memory impairment in Alzheimer's disease model mice [J]. *Chinese Troditional and Herbal Drugs*, 2020, 51(5): 1257-1263
- [13] 陈黔,李雨泓.中药有效成分治疗阿尔茨海默病研究概况[J].*医学综述*,2020,26(8):1588-1592,1597  
CHEN Qian, LI Yu-hong. Research status of treatment of Alzheimer's disease with effective components of traditional Chinese medicine [J]. *Medical Recapitulate*, 2020, 26(8): 1588-1592, 1597
- [14] 杨鹏飞,楚世峰,陈乃宏.党参的药理学研究进展及其抗脑缺血再灌注损伤的机制[J].*湖南中医药大学学报*,2015,35(12):5-10  
YANG Peng-fei, CHU Shi-feng, CHEN Nai-hong. Advances in pharmacological researches of dangshen and the protective mechanisms of dangshen on brain ischemia-reperfusion injury [J]. *Journal of Hunan Univ. of CM*, 2015, 35(12): 5-10
- [15] 刘禹.中药治疗阿尔茨海默病的文献研究[D].*通辽:内蒙古民族大学*,2020  
LIU Yu. Literature research on the treatment of Alzheimer's disease with traditional Chinese medicine [D]. *Tongliao: Inner Mongolia University for Nationalities*, 2020
- [16] 张振东,吴兰芳,景永帅,等.党参多糖对小鼠学习记忆作用研究[J].*山地农业生物学报*,2010,29(3):242-245  
ZHANG Zhen-dong, WU Lan-fang, JING Yong-shuai, et al. Effect of polysaccharides from *Radix Codonopsis* (DSP) on the ability of learning and memory of mice [J]. *Journal of Mountain Agricultural and Biology*, 2010, 29(3): 242-245
- [17] 张敏.远志皂苷和茯苓多糖对学习记忆的改善作用及其机制研究[J].*北华大学学报(自然科学版)*,2018,19(1):39-44  
ZHANG Min. PSP improves learning and memory and its mechanism [J]. *Journal of Beihua University (Natural Science)*, 2018, 19(1): 39-44
- [18] 丁莉,江南,雷红伟.甘草酸二铵对动物中枢胆碱酯酶和学习记忆力的影响[J].*内科*,2010,5(3):237-239  
DING Li, JIANG Nan, LEI Hong-wei. Effects of diammonium glycyrrhizinate on the activity of acetylcholinesterase in cerebrospinal of rabbits and the learning and memory ability of mice [J]. *Animals Internal Medicine*, 2010, 5(3): 237-239
- [19] 徐飞飞,王梓林,王洁,等.党参-茯苓-甘草水提物对学习记忆障碍小鼠的抗氧化及免疫调节功效评价[J].*现代食品科技*,2021,37(1):7-16  
XU Fei-fei, WANG Zi-lin, WANG Jie, et al. Evaluation of antioxidant and immunomodulatory effects of *Radix codonopsis-Poria cocos-Radix glycyrrhizae* water extract in mice with learning and memory impairment [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 37(1): 7-16
- [20] Mu Y, Gage F H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease [J]. *Molecular Neurodegeneration*,

- 2011, 6(1): 85
- [21] Lazarov O, Hollands C. Hippocampal neurogenesis: learning to remember [J]. *Progress in Neurobiology*, 2016, 138-140: 1-18
- [22] Eichenbaum H. The role of the hippocampus in navigation is memory [J]. *Journal of Neurophysiology*, 2017, 117(4): 1785-1796
- [23] 白杨,辛随成.阿尔兹海默病动物模型的研究进展[J].*实验动物科学*,2013,30(6):61-65,53  
BAI Yang, XIN Sui-cheng. Advances in animal models of Alzheimer's disease [J]. *Laboratory Animal Science*, 2013, 30(6): 61-65, 53
- [24] Barnhart C D, Yang D, Lein P J. Using the Morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice [J]. *Plos One*, 2015, 10(4): e0124521
- [25] Haam J, Yakel J L. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2017, 142: 111-121
- [26] Kume T, Takada-Takatori Y. Nicotinic acetylcholine receptor signaling: roles in neuroprotection [J]. *Nicotinic Acetylcholine Receptor Signaling in Neuroprotection*, 2018, 4: 59-71
- [27] 黄涛,唐瑛,邹瑞,等.党参水煎提取物对化学药品诱导小鼠学习记忆障碍的影响[J].*华南国防医学杂志*,2007,21(2):10-12  
HUANG Tao, TANG Ying, ZOU Rui, et al. Effect of decoction extracted from *Codonopsis pilosula* on learning and memory disturbance induced by chemicals in mice [J]. *South China Journal of Preventive Medicine*, 2007, 21(2): 10-12
- [28] 陈亚丹.党参多糖对铅中毒小鼠记忆障碍及免疫功能低下的影响[D].吉林:吉林大学,2009  
CHEN Ya-dan. The effects of polysaccharides from *Radix Codonopsis* on memory disorder and low immune function of lead poisoning mice [D]. Jilin: Jilin University, 2009
- [29] 蔡淑清.党参提取物对东莨菪碱所致小鼠学习记忆障碍的影响[J].*中国社区医师*,2006,13(8):25  
CAI Shu-qing. Effects of *Codonopsis pilosula* extract on learning and memory impairment in mice induced by scopolamine [J]. *Chinese Community Physicians*, 2006, 13(8): 25
- [30] 张立,李丹,刘积平,等.党参多糖对铅中毒小鼠记忆障碍的影响及其作用机制[J].*武警医学*,2013,24(5):410-413  
ZHANG Li, LI Dan, LIU Ji-ping, et al. Effects of polysaccharides from *Radix codonopsis* on memory disorder of lead poisoning mice [J]. *Med J Chin PAPF*, 2013, 24(5): 410-413
- [31] 徐煜彬,徐志立,李明玉,等.茯苓及其化学拆分组分学习记忆及镇静催眠的性味药理学研究[J].*中草药*,2014,45(11): 1577-1584  
XU Yu-bin, XU Zhi-li, LI Ming-yu, et al. Nature and flavor pharmacology of Fuling and its components for learning and memory improvement as well as sedative and hypnotic effects [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, 45(11): 1577-1584
- [32] 高冰冰,徐淑萍,刘新民,等.开心散与去茯苓开心散改善拟AD 动物学习记忆作用比较[J].*中国比较医学杂志*,2010,20(7):57-62  
GAO Bing-bing, XU Shu-ping, LIU Xin-min, et al. Comparison of nootropic effects of Kaixinsan prescription and Kaixinsan without *Poria cocos* (Schw. ) Wolf to Alzheimer's mice model [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2010, 20(7): 57-62
- [33] Yu M Y, Xu X Y, Jiang N, et al. Dehydropachymic acid decreases bafilomycin A1 induced  $\beta$ -amyloid accumulation in PC12 cells [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 198: 167-173
- [34] 聂磊.茯苓、茯神和茯苓皮成分比较研究[D].武汉:湖北中医药大学,2014  
NIE Lei. A comparative study of *Poria*, *Poria* with host wood and porie cutis [D]. Wuhan: Hubei University of Traditional Chinese Medicine, 2014
- [35] 侯安继,陈腾云,彭施萍,等.茯苓多糖抗衰老作用研究[J].*中药药理与临床*,2004,20(3):10-11  
HOU An-ji, CHEN Teng-yun, PENG Shi-ping, et al. Effect of *Poria cocos* polysaccharide on anti-aging [J]. *Study Pharmacology and Clinic of Traditional Chinese Medicine*, 2004, 20(3): 10-11
- [36] 梁亦龙,曾垂省,王允,等.茯苓多糖的抗氧化作用[J].*江苏农业科学*,2012,40(7):288-289  
LIANG Yi-long, ZENG Chui-sheng, WANG Yun, et al. Antioxidant effects of *Poria cocos* polysaccharides [J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2012, 40(7): 288-289
- [37] 张耀峰.甘草及其活性成分的药理活性研究进展[J].*中医临床研究*,2019,11(9):141-142  
ZHANG Yao-feng. Research progress on pharmacological activities of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch and its active components [J]. *Clinical Journal of Chinese Medicine*, 2019, 11(9): 141-142
- [38] 张明发,金玉洁,沈雅琴.甘草酸保护脑损伤及改善记忆力功

- 能的药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2013, 36(1): 59-63  
ZHANG Ming-fa, JIN Yu-jie, SHEN Ya-qin. Advances in pharmacologic study on encephalic injury protection and memory improvement of glycyrrhizic acid [J]. Drug Evaluation Research, 2013, 36(1): 59-63
- [39] 杜焯湘. 甘草素通过抑制炎症反应对阿尔兹海默病的保护作用及其机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019  
DU Ye-xiang. A study on the protective effect of glycyrrhizin on Alzheimer's disease by inhibiting inflammatory reaction and its mechanism [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2019
- [40] Dineley K T, Pandya A A, Yakel J L. Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders [J]. Trends in Pharmacological Sciences, 2015, 36(2): 96-108
- [41] Fonar G, Polis B, Sams D S, et al. Modified snake  $\alpha$ -neurotoxin averts  $\beta$ -amyloid binding to  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor and reverses cognitive deficits in Alzheimer's disease mice [J]. Mol Neurobiol, 2021, 58: 2322-2341
- [42] 周玉弟, 张杰, 田伟千, 等. 电针对术后认知功能障碍大鼠认知功能及海马  $\alpha 7$ nAChR 受体表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(20): 3815-3821  
ZHOU Yu-di, ZHANG Jie, TIAN Wei-qian, et al. Effect of electroacupuncture on the cognitive function and expression of  $\alpha 7$ nAChR receptor in the hippocampus of rats with postoperative cognitive dysfunction [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2020, 20(20): 3815-3821
- [43] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform. 2014, 16(6): 13
- [44] 未小明, 王爱梅, 罗朝辉, 等. 黄精对 AD 模型大鼠空间学习记忆及  $\alpha 7$ nAChR 表达的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(3): 391-396  
WEI Xiao-ming, WANG Ai-mei, LUO Chao-hui, et al. Effect of *Polygonatum sibiricum* on spatial learning and memory and the expression of  $\alpha 7$  nAChR in AD model rats [J]. Chin J Neuroanat, 2016, 32(3): 391-396
- [45] 赵大鹏, 李晓峰, 陈树沙, 等. 远志总皂苷对 AD 模型大鼠学习记忆及海马  $\alpha 7$ nAChR 亚基的影响[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2012, 19(5): 349-353  
ZHAO Da-peng, LI Xiao-feng, CHEN Shu-sha, et al. Effect of tenuigenin on learning, memory and expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha-7 in hippocampus in Alzheimer's disease rats [J]. Chin J Neuroimmunol Neurol, 2012, 19(5): 349-353
- [46] Ridley D L, Rogers A, Wonnacott S. Differential effects of chronic drug treatment on alpha3 and alpha7 nicotinic receptor binding sites, in hippocampal neurones and SH-SY5Y cells [J]. Br J Pharmacol, 2001, 133(8): 1286-1295
- [47] Mayford M, Bach M E, Huang Y Y, et al. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene [J]. Science, 1996, 274(5293): 1678-1683
- [48] Vigil F A, Giese K P. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and memory destabilization: a new role in memory maintenance [J]. J Neurochem, 2018, 147(1): 12-23
- [49] Lisman J. The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory [J]. Trends Neurosci, 1994, 17: 406-412
- [50] Silva A J, Paylor R, Wehner J M, et al. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice [J]. Science, 1992, 257: 206-211
- [51] Li Q, Xu F, Zhang Q, et al. Effect of  $\alpha$ -asarone on ethanol-induced learning and memory impairment in mice and its underlying mechanism [J]. Life Sci, 2019, 238: 116898
- [52] Kanno T, Yaguchi T, Nagata T, et al. Indomethacin enhances learning and memory potential by interacting with CaMKII [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(3): 919-926
- [53] Sweatt J D, Weeber E J. Genetics of childhood disorders: LII. Learning and memory, part 5: human cognitive disorders and the ras/ERK/CREB pathway [J]. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry, 2003, 42(7): 873-876
- [54] Schmitt J M, Wayman G A, Nozaki N, et al. Calcium activation of ERK mediated by calmodulin kinase I [J]. J Biol Chem, 2004, 279(23): 24064-24072
- [55] Peng S, Zhang Y, Zhang J, et al. ERK in learning and memory: a review of recent research [J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(1): 222-232
- [56] Zhang Y, He F, Hua T, et al. Green tea polyphenols ameliorate ethanol-induced spatial learning and memory impairments by enhancing hippocampus NMDAR1 expression and CREB activity in rats [J]. Neuroreport, 2018, 29(18): 1564-1570
- [57] Silva A J, Kogan J H, Frankland P W, et al. CREB and memory [J]. Annu Rev Neurosci, 1998, 21: 127-148

(下转第 290 页)