加味五子衍宗方含药脑脊液对β淀粉样蛋白诱导海马神经元损伤的保护作用

曾克武 王学美 富 宏 刘庚信

摘要 目的 研究加味五子衍宗方及其总多糖、总黄酮含药脑脊液对β淀粉样蛋白诱导的原代大鼠海马神经元损伤的保护作用。**方法** 体外原代培养大鼠胎鼠海马神经元，并将加味五子衍宗方的提取物(总方、总多糖、总黄酮)对大鼠进行灌胃给药，然后抽取含药脑脊液，将含药脑脊液与 20 μmol/L 的 $A\beta_{25-35}$ 共同作用海马神经元 24 h 后，分别检测正常对照组、$A\beta_{25-35}$ 损伤组、空白脑脊液保护组、加味五子衍宗方含药脑脊液(总方、总多糖、总黄酮)保护组的海马神经元活力、凋亡率以及凋亡相关蛋白(caspase-3, PARP, Bcl-2, Bcl-XL, JNK1/2, p38 MAPK)的变化情况。**结果** 加味五子衍宗方不同提取物(总方、总多糖、总黄酮)的含药脑脊液对 $A\beta_{25-35}$ 所诱导的海马神经元毒性均有保护作用，且总黄酮、总多糖含药脑脊液的保护作用明显高于总方含药脑脊液($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，但是加味五子衍宗方不同组分(总方、总多糖、总黄酮)的含药脑脊液对凋亡相关蛋白的调控机制并不一致。**结论** 加味五子衍宗方中的部分黄酮类和多糖类成分可以透过血脑屏障并进入脑脊液，同时这些成分对β淀粉样蛋白所致的神经损伤有一定的保护作用。

关键词 淀粉样蛋白；加味五子衍宗方；脑脊液；海马神经元

Protective Effect of Cerebrospinal Fluid Containing Jiawei Wuzi Yanzong Formula on β-amyloid Protein-Induced Injury of Hippocampal Neurons ZENG Ke-wu, WANG Xue-mei, FU Hong, et al *Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of First Hospital of Peking University, Beijing (100034)*

ABSTRACT Objective To investigate the protective effects of cerebrospinal fluid (CSF)-containing Jiawei Wuzi Yanzong formula (CSF-C) on β-amyloid protein-induced injury of hippocampal neurons. **Methods** Primary hippocampal neurons were isolated and cultured for 7 days *in vitro*. CSF-C was prepared by cerebrospinal fluid extracted from SD rats fed continuously with various components of Jiawei Wuzi Yanzong formula (total formula, total flavonoids or total polysaccharides) respectively. The viability, morphological change, apoptotic rate and apoptosis-related proteins (caspase-3, PARP, Bcl-2, Bcl-XL, JNK1/2 and p38 MAPK) of neurons were detected in different groups: the untreated normal group, the $A\beta_{25-35}$-treated group, and the CSF-C protected groups (co-acted by CSF-C and 20 μmol/L of $A\beta_{25-35}$), respectively. **Results** CSF-C showed significant neuro-protective effect, and the protection of CSF-C contained total flavonoids or total polysaccharides was significantly greater than that contained total formula ($P<0.05$ or $P<0.01$). Moreover, the effects of CSF-C contained various components on apoptosis-related proteins were different. **Conclusion** Some flavonoid and polysaccharide components in Jiawei Wuzi Yanzong formula can pass through the blood brain barrier and protect neurons from β-amyloid protein-induced neuron injury to some extents.

KEYWORDS β-amyloid protein; Jiawei Wuzi Yangzong formula; cerebrospinal fluid; hippocampal neurons

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种临床上表现为渐进性智力障碍和记忆力减退的神经退行性疾病[1,2]。目前认为，β淀粉样蛋白(β-amyloid protein, Aβ)在大脑内的沉积可导致神经元及其突触的丢失，进而诱发慢性记忆障碍，并最终导致痴呆[3]。因此，国内外大量研究中均采用β淀粉样蛋白诱导神经细胞损伤作为抗痴呆药物特别是抗阿尔茨海默病药物的筛选平台[4,5]。

加味五子衍宗方是根据传统中医学理论"肾主智，肾虚则智不足，补肾以益智"，在补肾填精的古方五子衍宗丸(枸杞子、菟丝子、五味子、车前子、覆盆子)的基础上加淫羊藿而成的中药复方。前期临床试验表明，该方可以提高老年痴呆患者的瞬时记忆，减

基金项目：国家自然科学基金资助项目(No. 30973813, No. 30672760)；教育部博士点基金资助项目(No. 20070001707)

作者单位：北京大学第一医院中西医结合研究室(北京 100034)

通讯作者：王学美，Tel:010-83573053，E-mail:wangxuemeibjmu@163.com

万方数据

少手颤，患者服药后海马指数和颞角宽度较治疗前均明显缩小[6-8]，因此对轻度认知障碍以及记忆力减退有较好的治疗效果，且无明显的不良反应。为了进一步研究加味五子衍宗方抗痴呆的作用机制，并同时考虑中药复方成分复杂的特点，本实验采用了脑脊液药理学方法[9]，研究了加味五子衍宗方及其总多糖和总黄酮的含药脑脊液对 $A\beta_{25-35}$ 蛋白所诱导的原代海马神经元损伤的保护作用，旨在阐明该方在神经保护方面的作用机制，同时也为今后深入探索该方的活性物质基础提供思路。

材料与方法

1　材料

1.1　动物　清洁级 SD 大鼠（雌雄各半），体重 400 ~ 500 g，北京大学医学部实验动物中心提供。

1.2　药物　枸杞子、菟丝子、覆盆子、五味子、车前子、淫羊藿均购自北京同仁堂药店。其中，HPLC 测得加味五子衍宗方的含药脑脊液成分峰主要含有淫羊藿次苷Ⅱ、淫羊藿素和槲皮素。

1.3　试剂及仪器　$A\beta_{25-35}$ 蛋白毒性片段、多聚赖氨酸、阿糖胞苷（Sigma 公司），Neurobasal 培养基、B-27 营养添加剂（GIBCO 公司），CCK-8 细胞活性分析试剂盒（Kumamoto 公司），抗体（Cell Signaling Technology 公司）。荧光显微镜（Leica 公司），酶标仪（BioTek 公司），Western blot 成像系统（Fuji 公司）。

2　方法

2.1　原代海马神经元的培养　原代海马神经元的培养方法参考文献〔10〕。在无菌条件下取孕 17 ~ 18 天 SD 大鼠胎鼠大脑海马组织，在冷的 D-Hank's 液中小心地去除血管膜，用眼科剪刀将海马组织剪碎至 1 mm^2 的碎块，用 0.2 % 胰酶 37 ℃消化 20 min，弃消化液，再用含有 10 % 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化，滴管轻轻吹打至细胞分散，静置 10 min，取上清细胞悬液，镜下计数并调整细胞密度，接种到预先铺被多聚赖氨酸的塑料培养皿中。细胞在 37 ℃、5 % CO_2 培养箱中培养 4 h 后，弃去培养液，换 Neurobasal 神经元专用培养基（含 2 % B-27 营养添加剂，1 % 青链双抗），以后每 3 天半量换液 1 次，并在第 4 天加入终浓度为 5 mmol/L 的阿糖胞苷，抑制胶质细胞的增殖。7 天后神经元发育成熟，并可用于实验。

2.2　加味五子衍宗方及其总黄酮、总多糖的提取分离　加味五子衍宗方及其总黄酮、总多糖的提取分离方法参考文献〔11〕。

2.3　动物给药与脑脊液的抽取　实验动物采用 SD 大鼠，饲养条件为：每日光照 12 h、黑暗 12 h 循环进行，饮食、饮水不受限制，采用随机数字表法将大鼠随机均分为对照组、模型组、加味五子衍宗总方组、加味五子衍宗总黄酮组、加味五子衍宗总多糖组，每组 8 只。将加味五子衍宗方的用药量设定为成人临床的 10 倍给药剂量，每日灌胃给药 2 次，每次给药约 1 000 mg/kg（约 2 mL），连续给药 5 天，其中总黄酮和总多糖用量与总方组相同，对照组仅给予生理盐水。然后按照文献〔12〕中描述的方法抽取脑脊液，并将得到的脑脊液在13 000 r/ min，4 ℃条件下离心 10 min，然后分离出上清液，并保存在 -80 ℃条件下，待用。

2.4　细胞的药物处理　将 $A\beta_{25-35}$ 蛋白毒性片段以 1 mmol/L 的浓度溶解在无菌蒸馏水中，作为储备液，4 ℃保存待用。实验前，将 $A\beta_{25-35}$ 蛋白毒性片段的储备液用 Neurobasal 神经元专用培养基（含 2% B-27 营养添加剂，1% 青链双抗）稀释到 20 μmol/L，然后单独或与脑脊液共同作用海马神经元 24 h，并进行相关指标的测定。

2.5　CCK-8 细胞活性分析　将海马神经元接种到 96 孔板中（3×10^4/孔）并培养 7 天，加药处理细胞到指定的时间后，吸出所有培养基，并将 90 μL 的新培养基与 10 μL 的 CCK-8 试剂（试剂盒提供）混合，得到 100 μL 的 CCK-8 工作液，补加到该孔中，培养箱中 37 ℃避光培养 1 h。在酶标仪上选择 450 nm 测定吸光度（A）值。

2.6　细胞形态观察　将海马神经元接种到 96 孔板中（3×10^4/孔）并培养 7 天，加药处理细胞到指定的时间后，在 100 倍的倒置相差显微镜下观察细胞并对典型的细胞形态进行拍照。

2.7　Hoechst 33258 染色凋亡分析　将海马神经元接种到 12 孔板内（1×10^5/孔，孔内预先放置玻璃爬片）并培养 7 天。加药处理细胞到指定的时间后，吸出培养基，PBS 洗 1 遍，加入 4 % 的多聚甲醛室温固定 20 min，适当洗涤去除固定剂。加入 0.2 % 的 Triton X 100（PBS 溶解）室温打孔 20 min，适当洗涤，然后加入终浓度为 5 μg/ mL 的 Hoechst 33258 染色液，室温放置 10 min。吸出 Hoechst 33258 染色液，用 PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。封片后直接在荧光显微镜下观察，最大激发波长为 346 nm，最大发射波长为 460 nm。每组数据分别来自 4 张代表性照片的平均细胞计数值（约 400 个细胞）。

2.8　Western blot 蛋白分析　将海马神经元接种到 6 孔板内（1×10^6/孔）并培养 7 天。加药处理细胞到指定的时间后，收集细胞并裂解获得总蛋白（裂解

万方数据

液为商业化的 RIPA 裂解液加蛋白酶抑制剂 cocktail)。然后，采用 10 % 浓度的 SDS-PAGE 分离总蛋白，并采用半干法将蛋白转至聚偏氟乙烯膜(PVDF 膜)上，5 % 的脱脂奶粉室温封闭 1 h，然后加入一抗(1∶500 封闭液稀释)，室温结合 2 h，充分洗涤，加入二抗(anti-rabbit IgG，1∶1 000 封闭液稀释)室温结合 1 h。充分洗涤后，用 ECL 显色剂 (Animal Genetics, Inc) 显色，并在 FUJIFILM LAS-4000 成像系统上拍照分析，用 Image Ready LAS-4000 软件进行条带的光密度积分分析。

2.9 统计学方法 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用方差分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

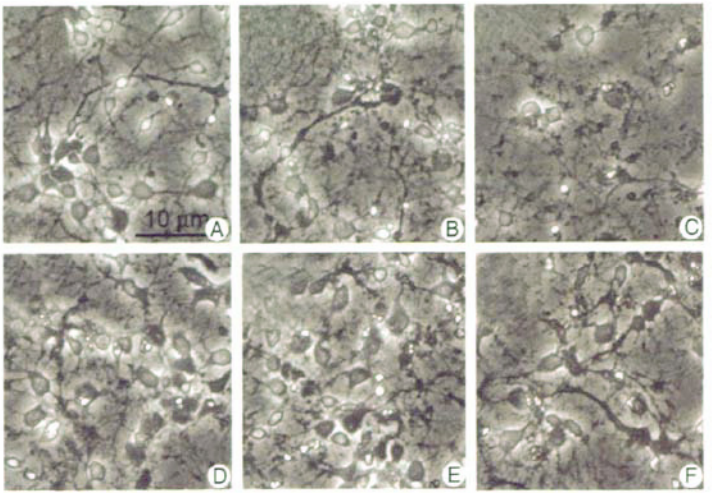
1 加味五子衍宗方含药脑脊液对海马神经元细胞活性的影响(表 1) 浓度为 2.5%、5.0% 和 10.0%(体积比:v/v)的加味五子衍宗方含药脑脊液(总方、总多糖、总黄酮)对 $A\beta_{25-35}$ 引起的海马神经元活性降低均有抑制作用，且呈剂量效应关系。值得指出的是，总多糖、总黄酮含药脑脊液对神经元的保护作用均强于总方含药脑脊液，这说明黄酮和多糖类成分可能是加味五子衍宗方神经保护作用的物质基础。

2 加味五子衍宗方含药脑脊液对海马神经元形态学的影响(图 1) 不同含药脑脊液(5.0 %，体积比:v/v)和 $A\beta_{25-35}$ 共同处理细胞 24 h 后，在倒置相差显微镜下观察神经元的形态学变化。对照组的海马神经元胞体呈圆形，且饱满，突触发育较长，分支多；在模型($A\beta_{25-35}$ 损伤)组，海马神经元胞体萎缩，变形，突触变短有的甚至消失，损伤严重的细胞发生分解，出现凋亡小体；受空白药脑脊液保护的神经元形态与模型组相比变化不大；在含药脑脊液(总方、总多糖、总黄酮)组的神经元仅见少量细胞出现轻度突触变短，

表 1 加味五子衍宗方含药脑脊液对 $A\beta_{25-35}$ 诱导海马神经元细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞活力(%)	保护率(%)
对照	6	100.0 ± 7.5	-
模型	6	68.3 ± 3.4°	-
2.5% 空白脑脊液	6	69.0 ± 3.6°	0.0
2.5% 总方含药脑脊液	6	75.4 ± 1.8*	20.6
2.5% 总多糖含药脑脊液	6	98.5 ± 1.2**	95.1
2.5% 总黄酮含药脑脊液	6	74.6 ± 3.7*	18.1
5.0% 空白脑脊液	6	73.3 ± 4.2	0.0
5.0% 总方含药脑脊液	6	85.1 ± 8.4△	44.1
5.0% 总多糖含药脑脊液	6	103.7 ± 5.2△△	113.8
5.0% 总黄酮含药脑脊液	6	89.0 ± 5.4△△	58.8
10.0% 空白脑脊液	6	82.2 ± 8.9	0.0
10.0% 总方含药脑脊液	6	90.6 ± 4.5	47.2
10.0% 总多糖含药脑脊液	6	109.5 ± 5.5▲	153.4
10.0% 总黄酮含药脑脊液	6	106.9 ± 10.3▲	138.8

注:保护率(%) = (1 - 含药脑脊液保护组细胞死亡率/空白脑脊液保护组细胞死亡率) × 100%；与 2.5 % 空白脑脊液组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与 5.0 % 空白脑脊液组比较，△$P<0.05$，△△$P<0.01$；与 10.0% 空白脑脊液组比较，▲$P<0.01$；与对照组比较，°$P<0.01$



注：A 为对照组；B 为模型组；C 为空白脑脊液组；D 为总方含药脑脊液组；E 为总多糖含药脑脊液组；F 为总黄酮含药脑脊液组

图 1 加味五子衍宗方含药脑脊液(5.0 %, v/v)对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的海马神经元形态学的影响

万方数据

与对照组比较，无明显改变。

3　加味五子衍宗方含药脑脊液对海马神经元凋亡率的影响（表 2）　实验中采用荧光染料 Hoechst 33258 对不同处理组的海马神经元进行荧光染色，通过观察细胞核染色质是否发生浓缩（严重时出现碎块）来判断细胞是否发生凋亡。加味五子衍宗方含药脑脊液（5.0 %，体积比：v/v）对 $A\beta_{25-35}$ 引起的细胞凋亡均有明显抑制作用（$P<0.01$），不同组分的含药脑脊液对细胞凋亡的抑制作用差别不明显。

表 2　加味五子衍宗方含药脑脊液（5.0 %，v/v）对 $A\beta_{25-35}$ 诱导细胞凋亡率的影响　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	凋亡率（%）
对照	3	7.8 ± 1.5
模型	3	36.4 ± 3.1 *
5.0% 空白脑脊液	3	28.2 ± 0.9
5.0% 总方含药脑脊液	3	11.1 ± 2.9 △
5.0% 总多糖含药脑脊液	3	9.2 ± 0.8 △
5.0% 总黄酮含药脑脊液	3	10.9 ± 1.1 △

注：与对照组比较，*$P<0.01$；与 5.0 % 空白脑脊液组比较，△$P<0.01$

4　加味五子衍宗方含药脑脊液对海马神经元凋亡相关蛋白的影响（图 2）　Caspase 家族蛋白在调节细胞凋亡的过程中具有非常重要的作用，其中 caspase-3 及其底物多聚（ADP-核糖）聚合酶（PARP）属于凋亡级联反应的下游关键分子，激活后可诱导细胞最终发生凋亡[13,14]。$A\beta_{25-35}$ 单独处理的海马神经元中 caspase-3 和 PARP 的剪切片段（活性形式）比例显著增高（$P<0.01$），而在给予加味五子衍宗方含药脑脊液（5.0 %，体积比：v/v）的海马神经元中，caspase-3 和 PARP 的剪切片段比例出现显著降低，即 caspase-3 和 PARP 的活性受到了抑制。另外还可以看出，空白脑脊液对 caspase-3 和 PARP 的活性变化影响不大。Bcl-2 和 Bcl-XL 均属细胞内重要的抗凋亡蛋白，其水平增高可抑制细胞发生凋亡[15,16]。从图 3 可以看出，$A\beta_{25-35}$ 处理后的细胞中出现了显著的 Bcl-2 和 Bcl-XL 水平降低，而同时给予加味五子衍宗方含药脑脊液（总方）时，其细胞中的 Bcl-2 和 Bcl-XL 水平出现了显著性的升高。但是，对于总多糖和总黄酮的含药脑脊液来说，仅总黄酮含药脑脊液给予组的 Bcl-XL 出现了升高，其他指标均未发生明显变化。

5　加味五子衍宗方含药脑脊液对海马神经元 JNK1/2 以及 p38 MAPK 蛋白激酶活性的影响（图 4）　JNK1/2 和 p38 是两条重要的 MAPK 信号通路，研究证实，在 AD 的发病过程中，JNK1/2 和 p38 的激活（磷酸化）与 tau 蛋白的高度磷酸化及多种系统的促凋亡作用有关。经 $A\beta_{25-35}$ 处理后的海马神经元出现了

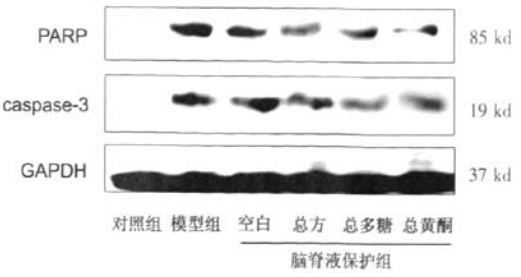


图 2　加味五子衍宗方含药脑脊液（5.0 %, v/v）对海马神经元细胞 caspase-3 以及 PARP 凋亡蛋白表达的影响

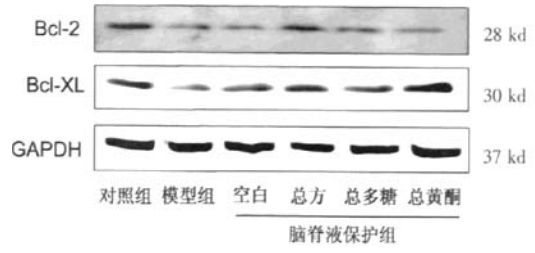


图 3　加味五子衍宗方含药脑脊液（5.0 %, v/v）对海马神经元细胞 Bcl-2 以及 Bcl-XL 蛋白表达的影响

JNK1/2 和 p38 磷酸化水平的显著升高，加入空白脑脊液后略有降低，但并不明显。而给予了总方的含药脑脊液（5.0 %，体积比：v/v）后，JNK1 和 p38 磷酸化水平出现了明显的降低，并且总多糖的含药脑脊液（5.0 %，体积比：v/v）与总方作用效果基本一致。另外，总黄酮的含药脑脊液（5.0 %，体积比：v/v）未能像总多糖表现出对 p38 磷酸化的抑制作用，由此可以认为，加味五子衍宗方总多糖和总黄酮含药脑脊液对 JNK1/2 和 p38 磷酸化的调节机制是不同的。

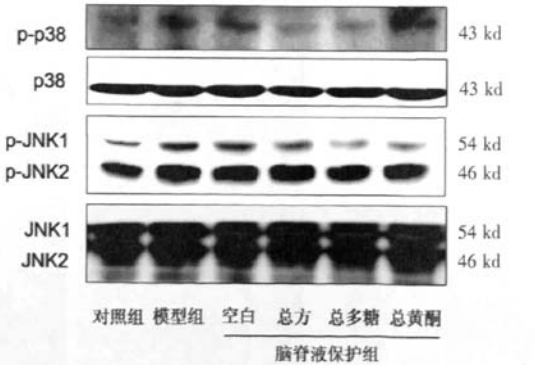


图 4　加味五子衍宗方含药脑脊液（5.0 %, v/v）对海马神经元细胞 JNK1/2 以及 p38 MAPK 蛋白激酶活性的影响

讨　论

AD 是目前严重威胁老年人生命健康的重要疾病，其发病机制复杂，主要病理特征为 β-淀粉样蛋白

万方数据

(Aβ)聚集形成的老年斑和 tau 蛋白异常形成的神经原纤维缠结[17,18]。近年来研究发现，Aβ 是由淀粉样蛋白前体物质(APP)经过一系列的水解反应而生成的，但是在 AD 患者脑内的 Aβ 前体蛋白裂解位点上发生了基因突变，并导致脑神经细胞中 Aβ 的生成异常增多、聚集，最后形成神经毒性的老年斑[19,20]。因此，Aβ 诱导的神经细胞损伤模型被很多体外药物筛选实验广泛采用。

加味五子衍宗方是在传统补肾中药复方五子衍宗方的基础上加味淫羊藿而成的，临床上对治疗轻度认知障碍(MCI)引起的痴呆有较好的疗效[21]。此外，该方还能够减少老年人白细胞线粒体 DNA 缺失率，提高线粒体呼吸链酶复合体活力、ATP 合成量，降低血清中 AchE 水平和脂质过氧化物丙二醛(MDA)的含量[22]。最近研究还表明，加味五子衍宗方能降低 MCI 患者血清中 Aβ 的水平[23]，提示该方可能参与了调节 Aβ 在体内的代谢过程。

由于中药特别是中药复方的成分复杂，作用机制难于阐明，因此在本实验中采用了脑脊液药理学的方法研究了加味五子衍宗方拮抗 Aβ 蛋白神经毒性的作用机制。采用该方法的优势在于，作用于中枢神经系统的药物若发挥作用则必须首先通过血脑屏障，而药物通过血脑屏障的“过滤”作用后，只有部分成分可以进入脑内，因此采用加味五子衍宗方的含药脑脊液进行研究可以大大缩小所要研究的药物成分的范围，避免其他非药效成分的干扰。实验结果表明，加味五子衍宗方含药脑脊液(总方、总多糖、总黄酮)有对抗 $A\beta_{25-35}$神经毒性的作用，且总多糖和总黄酮含药脑脊液的保护作用明显高于总方含药脑脊液。因此可以看出，加味五子衍宗方中确实有部分成分通过了血脑屏障进入到中枢神经系统内并发挥了抗 $A\beta_{25-35}$神经毒性的作用，且这些成分可能来自于黄酮或多糖类成分。Hoechst 33258 的染色结果还证明了加味五子衍宗方的含药脑脊液可以有效地保护 $A\beta_{25-35}$诱导的神经细胞凋亡的发生。另外，在 $A\beta_{25-35}$诱导神经细胞发生凋亡的过程中，还会伴随凋亡相关蛋白 caspase-3 和 PARP 的激活，以及 Bcl-2 和 Bcl-XL 的抑制。而实验结果表明，与 $A\beta_{25-35}$单独处理的海马神经元相比，$A\beta_{25-35}$和含药脑脊液共处理海马神经元细胞中的 caspase-3 和 PARP 的激活被显著性抑制，但不同组分的含药脑脊液对 Bcl-2 和 Bcl-XL 蛋白表达的调控却存在差别，特别是对 Bcl-XL 的调节上总黄酮含药脑脊液的效果优于总多糖含药脑脊液。以上结果说明，加味五子衍宗方含药脑脊液的神经保护作用可能是通过黄酮类和多糖类成分共同调节 caspase-3 和 PARP 的激活以及黄酮类成分单独调节 Bcl-XL 的表达而实现的。此外，加味五子衍宗方含药脑脊液对 $A\beta_{25-35}$诱导的 JNK1/2 和 p38 MAPK 的磷酸化也有较强的抑制作用，且总多糖和总黄酮的含药脑脊液对该通路的调节作用亦不相同，即黄酮和多糖类成分共同参与了对 JNK1/2 的调节，而仅有多糖类成分参与了对 p38 的调节。

综上可知，加味五子衍宗方的部分有效成分，特别是黄酮和多糖类成分可以通过血脑屏障进入中枢脑脊液，对 β 淀粉样蛋白诱导的神经毒性具有保护作用。这与本课题组的前期实验结果，即加味五子衍宗颗粒及其总黄酮、总多糖能改善由 β 淀粉样肽所致 AD 模型大鼠的空间学习记忆能力是相一致的[24]。此外机制研究还表明，加味五子衍宗方的神经保护作用可能是通过其黄酮和多糖类成分共同抑制 caspase-3 和 PARP 的激活，以及黄酮类成分促进 Bcl-XL 表达而实现的。同时也可能有部分黄酮和多糖类成分参与了对 JNK1/2 和 p38 MAPK 磷酸化的调节，但是在不同成分之间的调节机制并不相同。

参 考 文 献

[1] Moreira PI, Zhu X, Nunomura A, et al. Therapeutic options in Alzheimer's disease[J]. Expert Revi Neurotherap, 2006, 6(6): 897-910.

[2] Pluta R, Ulamek M. New proposals for treatment sporadic Alzheimer's disease[J]. Central Nerv System Age Med Chemi, 2008, 8(4): 286-296.

[3] Cerpa W, Dinamarca MC, Inestrosa NC. Structure-function implications in Alzheimer's disease: effect of Aboligomers at central synapses[J]. Curr Alzheimer Res, 2008, 5(3):233-243.

[4] Kim W, Kim Y, Min J, et al. A high-throughput screen for compounds that inhibit aggregation of the Alzheimer's peptide[J]. ACS Chemical Biol, 2006, 1(7): 461-469.

[5] Chakrabarti E, Smith J D. Drug library screen to identify compounds that decrease secreted Ab from a human cell line[J]. Curr Alzheimer Res, 2005, 2(2): 255-259.

[6] 富宏，王学美，刘庚信，等. 加味五子衍宗颗粒治疗轻度认知障碍的随访研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(2):67-70.
Fu H, Wang XM, Liu GX, et al. Follow-up study on treatment of mild cognitive impairment by modified Wuzi Yanzong Granule[J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2008, 14(2), 67-70.

万方数据

[7] 王学美，富宏，刘庚信，等. 加味五子衍宗颗粒治疗轻度认知障碍的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志，2004，24(5):392-395.
Wang XM, Fu H, Liu GX, et al. Clinical study on treatment of mild cognitive impairment by modified Wu-Zi-Yan-Zong Granule[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2004, 24(5): 392-395.

[8] 富宏，王学美，刘庚信. 加味五子衍宗颗粒对轻度认知障碍患者记忆功能及海马体积的磁共振研究[J]. 中国中西医结合杂志，2006，26(12):1066-1069.
Fu H, Wang XM, Lui GX, et al. Effects of modified Wu-Zi-Yan-Zong Granule on memory ability and volume of hippocampus measured by MRI in patients with mild cognitive impairment[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2006, 26(12):1066-1069.

[9] 闫晨，康立源. 中药脑脊液药理学方法研究进展[J]. 中国临床药理学杂志，2009，25(3):257-259.
Yan C, Kang LY. Advance in research for cerebrospinal fluid pharmacology in Chinese materia medica[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2009, 25(3): 257-259.

[10] Chihiro T, Mahoko I, Yanjing B, et al. Inhibitory effects of eleutherococcus senticosus extracts on amyloid β (25-35)-induced neuritic atrophy and synaptic loss[J]. J Pharmacol Sci, 2008, 107(3), 329-339.

[11] 王斌，王学美. 加味五子衍宗方及其有效部位对 H_2O_2 损伤 PC12 细胞的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志，2009，15(8):57-60.
Wang B, Wang XM. Effects of modified Wu-Zi-Yan-Zong formula and its crude total flavones, crude total polysaccharides on H_2O_2 induced damage in PC12 cells and possible mechanisms[J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2009, 15(8): 57-60.

[12] 富宏，陶迎红，王学美，等. 经皮穿刺延髓池抽取兔和大鼠脑脊液的方法[J]. 中国比较医学杂志，2006，16(11):684-687.
Fu H, Tao YH, Wang XM, et al. Method of drawing cerebrospinal fluid from cerebellomedullary cisterm of experimental animals via percutaneous puncture[J]. Chin J Comparat Med, 2006, 16(11): 684-687.

[13] Harada J, Sugimoto M. Activation of caspase-3 in β-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons[J]. Brain Res, 1999, 842(2): 311-323.

[14] Boland B, Campbell V. β-amyloid(1-40)-induced apoptosis of cultured cortical neurons involves calpain-mediated cleavage of poly-ADP-ribose polymerase[J]. Neurobiol Aging, 2003, 24(1):179-186.

[15] Ferreiro E, Eufrasio A, Pereira C, et al. Bcl-2 overexpression protects against amyloid-β and prion toxicity in GT1-7 neural cells[J]. J Alzheimer's Dis, 2007, 12(3): 223-228.

[16] Luetjens CM, Lankiewicz S, Bui NT, et al. Up-regulation of Bcl-XL in response to subtoxic β-amyloid: role in neuronal resistance against apoptotic and oxidative injury[J]. Neuroscience, 2001, 102(1): 139-150.

[17] Doraiswamy PM, Xiong GL. Pharmacological strategies for the prevention of Alzheimer's disease[J]. Expert Opinion Pharmacotherapy, 2006, 7(1): 1-10.

[18] Silvestrelli G, Lanari A, Parnetti L, et al. Treatment of Alzheimer's disease: from pharmacology to a better understanding of disease pathophysiology[J]. Mech Ageing Develop, 2006, 127(2): 148-157.

[19] Huber A, Stuchbury G, Burkle A, et al. Neuroprotective therapies for Alzheimer's disease[J]. Curr Pharmaceut Design, 2006, 12(6): 705-717.

[20] Kile SJ, Olichney JM. Amyloid clearing immunotherapy for Alzheimer's disease and the risk of cerebral amyloid angiopathy[J]. Alzheimer's Dis Res J, 2007, 1(1/2): 5-12.

[21] 王学美，富宏，宋萍，等. 从神经心理学和影像学探讨加味五子衍宗颗粒对轻度认知障碍患者的影响[J]. 中国老年学杂志，2004，24(4):299-301.
Wang XM, Fu H, Song P, et al. The effect of Jiawei Wuzi Yanzong Particle on the patients with mild cognitive impairment by neuropsychology and tomography[J]. Chin J Gerontol, 2004, 24(4): 299-301.

[22] 王学美，富宏. 五子衍宗丸对男性老年肾虚者外周血白细胞线粒体 DNA 缺失及线粒体呼吸链酶复合体活力的影响[J]. 中国中西医结合杂志，2002，22(2):101-103.
Wang XM, Fu H. Effect of Wuzi Yanzong Pill on mitochondrial DNA deletion and respiratory chain enzyme complex activity in peripheral leukocyte of aged male with kidney deficiency syndrome[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2002, 22(2): 101-103.

[23] 富宏，王学美，刘庚信. 加味五子衍宗颗粒对轻度认知障碍患者记忆功能及血清 β 淀粉样蛋白的影响[J]. 中国老年学杂志，2007，27(4):715-717.
Fu H, Wang XM, Liu GX. The effect of Jiawei Wuziyanzong Granule on memory ability and level of serum beta-amyloid of mild cognitive impairment patients[J]. Chin J Gerontol, 2007, 27(4):715-717.

[24] 富宏，王学美，刘庚信. 加味五子衍宗方有效部位对 β-淀粉样肽致大鼠行为学改变的影响[J]. 中国实验方剂学杂志，2009，15(6):44-47.
Fu H, Wang XM, Liu GX. Effect of modified Wuzi Yanzong Prescription and its components on spatial behavior in rats induced by β-amyloid peptide[J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2009, 15(6): 44-47.

(收稿:2009-12-16　修回:2010-05-16)

万方数据