

还脑益聪方提取物对 APP 转基因小鼠脑组织 A β 生成相关因子和学习记忆行为的影响

李 浩¹ 刘明芳¹ 刘剑刚¹ 刘龙涛¹ 官 杰² 蔡琳琳¹ 胡 佳³ 魏 芸³

摘要 目的 研究还脑益聪方提取物对 β 淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)转基因小鼠学习记忆能力以及脑组织海马 CA1 区(hippocampal-CA1 area, CA1)APP、淀粉样前体蛋白 β 位分解酶 1(β -site APP-cleaving enzyme, BACE1)、早老素蛋白 1(presenilin-1, PS-1)和 β 淀粉样蛋白(beta amyloid protein, A β)的影响,初步探讨还脑益聪方提取物治疗阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)的作用机制。**方法** 选用 3 月龄 APP695V717I 转基因小鼠模型,按数字表法随机分为模型组、盐酸多奈哌齐组、还脑益聪方提取物大剂量组和小剂量组,另设立正常对照组(C57BL/6J 小鼠),每组 15 只。连续灌胃 4 个月后进行相关指标检测:采用 Morris 水迷宫观测 APP 转基因小鼠空间学习记忆行为,采用免疫组织化学法检测 APP 转基因小鼠海马 CA1 区 APP、BACE1、PS-1 和 A β 蛋白的表达水平。**结果** 与正常对照组小鼠比较,7 月龄 APP 转基因模型小鼠在 Morris 水迷宫实验中穿越原平台位置次数、原平台所在第四象限游泳时间和游泳路程均显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,7 月龄盐酸多奈哌齐组、还脑益聪方提取物大、小剂量组小鼠在 Morris 水迷宫实验中穿越原平台位置次数、第四象限游泳时间和路程均显著增多($P < 0.05$)。与正常对照组小鼠比较,7 月龄模型组小鼠海马 CA1 区神经元 APP、BACE1、PS-1 和 A β 阳性表达显著增强($P < 0.01$)。与模型组比较,7 月龄各药物干预组小鼠 APP、BACE1、PS-1 和 A β 阳性表达显著减弱($P < 0.01$)。**结论** 还脑益聪方提取物早期应用可明显改善 APP 转基因小鼠已下降的学习记忆能力,降低海马 CA1 区神经元 APP、BACE1、PS-1 和 A β 的表达,减少 A β 生成,延缓 APP 转基因小鼠大脑病理进程。

关键词 阿尔茨海默病;APP 转基因小鼠;学习记忆; β 淀粉样蛋白; β 位点剪切酶;早老素蛋白-1;还脑益聪方提取物

Effects of Huannao Yicong Recipe Extract on the Learning and Memory and Related Factors of A β Generation in the Brain of APP Transgenic Mice LI Hao¹, LIU Ming-fang¹, LIU Jian-gang¹, LIU Long-tao¹, Guan Jie², CAI Ling-ling¹, HU Jia³, and WEI Yun³ 1 Department of Geratology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091), China; 2 Department of Endocrinology, Qingdao Haici Hospital, Qingdao (266033), China; 3 National Key Lab for Effective Application of Chemical Resources, Beijing Industrial University, Beijing (100029), China

ABSTRACT Objective To study the effects of Huannao Yicong Recipe (HNYCR) extract on the learning and memory ability, and the expressions of amyloid precursor protein (APP), β -site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1), presenilin-1 (PS-1), and beta amyloid protein (A β) in hippocampus CA1 area of APP transgenic mice, and to explore its mechanisms for treating Alzheimer's disease (AD). **Methods** Totally 3-month-old APP695V717I transgenic mice were used to establish the AD model in this research. They were randomly divided into the model group, the Donepezil group, the large dose HNYCR extract group, the small dose HNYCR extract group, and the normal control group (C57BL/6J mice), 15 in each group. These animals were gavaged for 4 continuous months. Relevant indicators were detected: Morris water maze test was used to measure the spatial learning and memory ability. The immunohistochemical assay was used to detect the expressions of APP, BACE1, PS-1, and A β . **Results** The times of crossing

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30873338, No. 81173383);国家科技部重大新药创制项目(No. 2009ZX09103-391)

作者单位:1.中国中医科学院西苑医院老年病科(北京 100091);2.山东省青岛市海慈医院集团内分泌科(青岛 266033);3.北京化工大学化工资源有效利用国家重点实验室(北京 100029)

通讯作者:李 浩, Tel:010-62887973, E-mail:xyhplihao1965@126.com

the original platform and the swimming time and distance in the fourth quadrant of the 7-month-old APP transgenic mice were significantly reduced in Morris water maze test, when compared with the normal control group ($P < 0.01$). The times of crossing original platform and the swimming time and distance in the fourth quadrant of all treatment groups significantly increased in Morris water maze test, when compared with the model group ($P < 0.05$). The expressions of APP, BACE1, PS-1, and A β in hippocampus CA1 area of 7-month-old model mice increased significantly ($P < 0.01$), when compared with the normal control group. The expressions of APP, BACE1, PS-1, and A β in each 7-month-old intervention groups were significantly reduced, when compared with the model group ($P < 0.01$). Conclusion Early application of HNYCR extract can obviously improve the learning and memory ability of APP transgenic mice that has declined, reduce the expressions of APP, BACE1, PS-1, and A β in the hippocampal CA1 area, reduce the production of A β , and slow down the pathological process of brains in APP transgenic mice.

KEYWORDS Alzheimer's disease; APP transgenic mice; learning and memory; beta amyloid protein; β -site APP cleaving enzyme 1; presenilin-1; Huannao Yicong Recipe extract

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种发生于老年期或老年前期的慢性进行性神经变性疾病, 以进行性记忆认知障碍、人格改变为主要特征, AD 脑内的主要病理改变为老年斑 (senile plaque, SP) 及神经元纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NFT)。SP 本身并没有神经毒性, 但 SP 的出现和大量存在提示 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid peptide, A β) 的过量生成和持续增高。基础和临床研究证实, A β 的神经毒性在 AD 发生发展中起了核心作用^[1], 其产生和清除平衡的破坏是 AD 发病机制的关键环节。 β 淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 转基因小鼠是利用 APP 基因突变导致 A β 沉积, 使该模型脑中过量表达 APP, A β 产生增加, 导致神经毒害作用, 损伤小鼠学习记忆能力, 并聚集和沉积形成 SP。还脑益聪方是临床治疗早期 AD 和认知障碍的有效方药, 有明显改善患者氧化应激状态, 减轻炎症反应以及提高脑供血等作用^[2], 本研究通过观察还脑益聪方对 APP 转基因小鼠的学习和记忆能力, 以及影响脑组织内生成 A β 相关的关键因子: APP、淀粉样前体蛋白 β 位分解酶 1 (β -site APP cleaving enzyme1, BACE1)、早老素蛋白 1 (presenilin-1, PS-1) 和 A β 的作用, 探讨还脑益聪方提取物防治 AD 的作用机制。

材料与方法

1 实验动物 APP695V717I 转基因小鼠 60 只, 相同遗传背景 C57BL/6J 小鼠 15 只, 均为 3 月龄, 雌雄各半, 体重 (20 ± 3) g, 均购自中国医学科学院实验动物研究所, 动物许可证号: SCXK (京) 2005-0013。饲养环境为 SPF 动物房, 定时给予全价营养饲料喂食, 室温控制 $22 \sim 25$ °C, 湿度 50% ~ 70%。

2 实验药物与试剂 还脑益聪方由何首乌、人参、川芎、石菖蒲和黄连 5 味药 (4:2:3:1.8:2) 组成, 方中所用中药材由河北省安国市神农中药饮片有限公司提供, 经中国中医科学院中药研究所郝近大研究员鉴定为正品药材, 由北京化工大学按提取工艺^[3] 提取该方组分作为实验用药。盐酸多奈哌齐片 [商品名称: 安理申, 卫材 (中国) 药业有限公司, 批号: 081121A, 5 mg/片] 作为阳性对照药。抗体: 兔抗 A β_{1-42} 抗体, 批号 091210; 兔抗 APP 抗体, 批号 091120; 兔抗 β 位点剪切酶 (β -site APP cleaving enzyme, BACE) 抗体, 批号 091125; 兔抗 PS-1 抗体, 批号 20100212; 均购自北京博奥森生物技术有限公司。

3 主要仪器 BH-2 型生物显微镜, 日本 Olympus 生产; DpxView Pro 型计算机彩色图像处理系统, 丹麦 Delta Pix 公司生产。

4 实验动物分组与给药 APP695V717I 转基因小鼠随机分为转基因模型组, 还脑益聪方提取物大剂量组 [2.8 g 生药/(kg · d)], 还脑益聪方提取物小剂量组 [1.4 g 生药/(kg · d)] 以及阳性药物对照组 [盐酸多奈哌齐 0.65 mg/(kg · d)], 药物用剂量根据患者临床用量的等效剂量和动物体表面积折算而来, 每组 15 只; C57BL/6 J 小鼠 15 只, 作为正常对照组。所给药物稀释相同体积灌胃, 正常组和模型组给予等体积蒸馏水灌胃, 均每日 1 次。连续灌胃 4 个月后, 进行相关指标测试。

5 行为学测试 采用 Morris 水迷宫进行空间探索实验^[3], 记录小鼠 3 min 内进出原平台位置次数、原平台所在第四象限游泳时间及游泳路程, 作为评价小鼠学习记忆成绩的指标。数据采集和处理均由图像自动监视和处理系统完成。

6 脑组织样品的制备 小鼠于末次行为学测试后,禁食 12 h,不禁水,进行脑组织取材。麻醉后于低温下快速断头取全脑,每组随机选取 4 只小鼠脑组织,置液氮中速冻后保存于 -70 ℃ 冰箱,待作冰冻切片;另选取 4 只小鼠脑组织放入 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 以上(4 ℃),换固定液,待脑组织沉底,进行常规石蜡包埋切片。

7 免疫组织化学法测定小鼠海马 CA1 区 APP、BACE1、PS-1 和 Aβ 的表达 APP、BACE1 和 Aβ 为冰冻切片,PS-1 为石蜡切片,根据试剂盒说明书的操作步骤,分别进行免疫组化染色。抗体稀释比例:APP 为 1:200,BACE1 为 1:100,Aβ 为 1:200,PS-1 为 1:400。染色后对切片进行拍照及图像分析:光镜 10×20 倍视野下,每组选取 4 只小鼠脑的 4 张切片,每张切片在海马 CA1 区选取 3 个连续的不同视野,每组共计 12 个视野,记数 CA1 区内 APP、BACE1、PS-1、Aβ 染色阳性细胞数目,结果表示为视野阳性细胞数的平均值。

8 统计学方法 采用统计软件 SPSS 13.0 进行统计分析,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据经正态分布和方差齐性检验,方差齐性比较采用单因素方差分析,q 检验,方差不齐数据采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠 Morris 水迷宫实验空间学习记忆能力比较(表 1) 与正常对照组比较,模型组小鼠在 Morris 水迷宫实验中穿越原平台位置次数、原平台所在第四象限游泳时间和游泳路程均显著减少($P < 0.01$)。与模型组比较,盐酸多奈哌齐组、还脑益聪方提取物大剂量和小剂量组小鼠在 Morris 水迷宫中穿越原平台位置次数、第四象限游泳时间和游泳路程均增多($P < 0.05$)。

2 各组小鼠海马 CA1 区 APP、BACE1、PS-1 和 Aβ 表达比较(图 1-4,表 2) 应用免疫组织化学染色方法观察各组小鼠海马 CA1 区,在光镜下可见阳性

表 1 各组小鼠 Morris 水迷宫实验空间学习记忆能力比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	穿越次数(次)	游泳时间(s)	游泳路程(cm)
正常对照	15	5.67 ± 2.55	56.20 ± 16.12	433.97 ± 166.91
模型	15	3.13 ± 2.17 *	34.70 ± 16.00 *	278.17 ± 157.95 *
盐酸多奈哌齐	15	5.00 ± 1.85 Δ	46.16 ± 13.18 Δ	381.97 ± 99.19 Δ
还脑益聪方提取物大剂量	15	5.07 ± 2.59 Δ	46.68 ± 14.23 Δ	381.46 ± 125.91 Δ
还脑益聪方提取物小剂量	15	4.80 ± 2.18 Δ	45.13 ± 10.30 Δ	379.98 ± 115.32 Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,Δ $P < 0.05$,ΔΔ $P < 0.01$;下表同

标记物为棕褐色或棕黄色颗粒,主要分布于海马神经元胞浆。图像分析系统结果显示,与正常对照组比较,模型组小鼠海马 CA1 区神经元 APP、BACE1、PS-1 和 Aβ 阳性细胞数目均显著增多($P < 0.01$),着色明显加深。与模型组比较,盐酸多奈哌齐组、还脑益聪方提取物大剂量组和小剂量组 APP、BACE1、PS-1 和 Aβ 阳性细胞数目均显著减少($P < 0.01$),着色较浅。

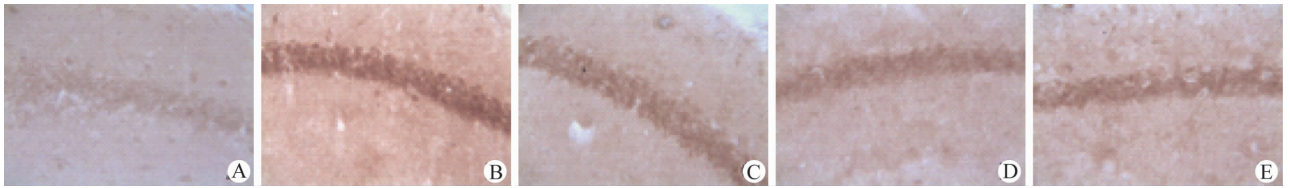
讨 论

Aβ 是 SP 的主要成分,由 APP 水解而成。研究表明,APP 的异常代谢及 Aβ 的过度生成是 AD 重要病理机制^[4]。APP 有两条降解途径,γ-分泌酶是天冬氨酸水解酶,是两条途径都需要的重要水解酶,最终产生 Aβ₄₀ 和 Aβ₄₂ 或 P₃^[5-8]。PS-1 在此过程中起到重要的催化作用。研究表明,PS-1 的突变是造成大部分遗传早发性 AD,同时也是引起 Aβ₄₂ 的过度合成以及促进 γ-分泌酶活性的主要原因之一^[9],而在 PS 基因剔除的小鼠神经组织中,Aβ₄₀ 和 Aβ₄₂ 的含量明显减少;还有研究发现,在 PS-1/PS-2 双重基因剔除的小鼠模型中确无 γ-分泌酶的存在,这提示 γ-分泌酶需要 PS 的存在^[10],而 PS-1 也成为 AD 治疗的重要靶点之一。

此外,γ-分泌酶还决定了 Aβ₄₀ 和 Aβ₄₂ 的生成比例。正常情况下脑组织主要生成 Aβ₄₀,在分泌的 Aβ 中大约占了 90%,而在 AD 时 Aβ₄₂ 升高,成为淀粉样斑块中的主要 Aβ 形式^[11,12]。由于 Aβ₄₂ 比 Aβ₄₀ 多 2 个疏水性氨基酸,即异亮氨酸(I)和丙氨酸(A),具有更强的疏水性并更容易发生聚集,导致淀粉样物质的生

表 2 各组小鼠海马 CA1 区 APP、BACE1、PS-1 和 Aβ 表达比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	APP	BACE1	PS-1	Aβ
正常对照	4	51.50 ± 5.41	19.83 ± 4.85	39.08 ± 6.83	40.79 ± 7.66
模型	4	88.21 ± 6.44 *	29.79 ± 3.41 *	75.50 ± 10.14 *	79.30 ± 11.22 *
盐酸多奈哌齐	4	73.79 ± 8.61 ΔΔ	22.92 ± 2.49 ΔΔ	50.33 ± 7.40 ΔΔ	64.33 ± 4.64 ΔΔ
还脑益聪方提取物大剂量	4	76.29 ± 6.85 ΔΔ	24.79 ± 3.12 ΔΔ	55.00 ± 10.09 ΔΔ	69.50 ± 8.89 ΔΔ
还脑益聪方提取物小剂量	4	73.25 ± 6.50 ΔΔ	25.33 ± 3.13 ΔΔ	61.00 ± 5.44 ΔΔ	68.75 ± 8.51 ΔΔ



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C 为盐酸多奈哌齐组;D 为还脑益聪方大剂量组;E 为还脑益聪方小剂量组;下图同

图 1 各组小鼠海马 CA1 区 APP 表达比较(免疫组织化学法, ×200)

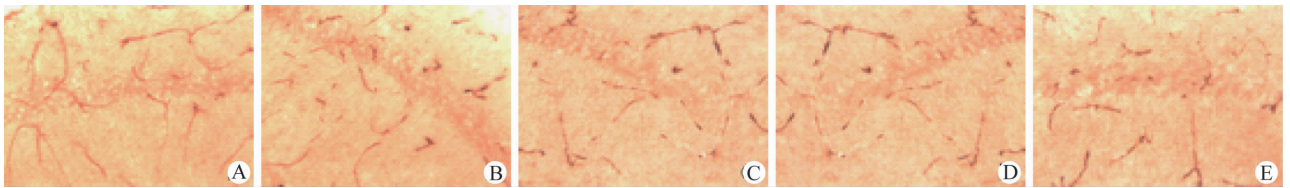


图 2 各组小鼠海马 CA1 区 BACE1 表达比较(免疫组织化学法, ×200)

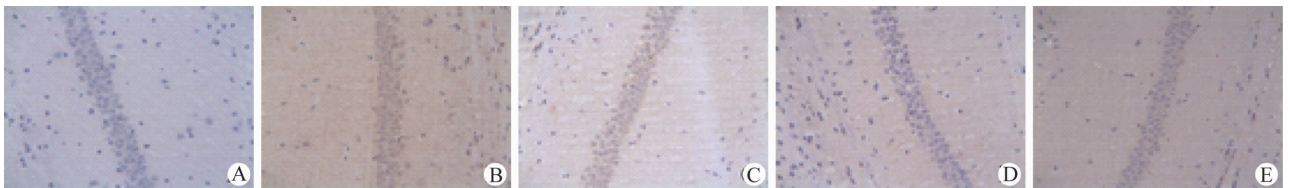


图 3 各组小鼠海马 CA1 区 PS-1 表达比较(免疫组织化学法, ×200)

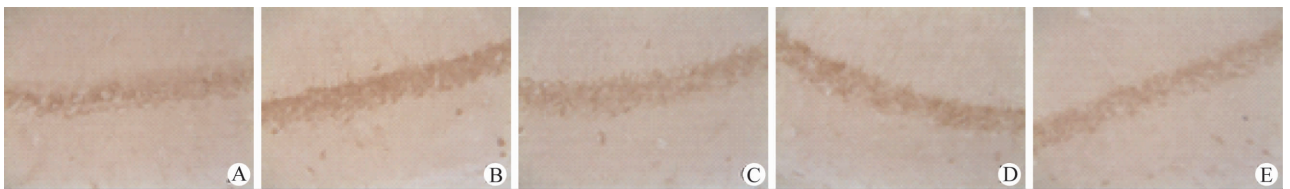


图 4 各组小鼠海马 CA1 区 Aβ 表达比较(免疫组织化学法, ×200)

成,因此,Aβ₄₂可能更具致病力并对 AD 的发病起着更为关键作用^[13]。研究发现,AD 脑组织中的 Aβ₄₂主要以 Aβ₄₂寡聚体形式存在,其神经毒性远大于可溶性 Aβ₄₂的神经毒性,是产生神经毒性作用的原因。所以减少脑细胞外间隙的 Aβ(主要是 Aβ₄₂)堆积,能有效减少脑内淀粉样斑块数量,可作为药物治疗的靶点。目前已被克隆的 β-分泌酶有 2 种类型^[14],即 BACE1 和 BACE2,二者有 64%的氨基酸序列相似,仅前者在脑组织中有表达。现已证实 BACE1 是形成 Aβ 的蛋白切割酶,并具有年龄依赖性^[15],其不仅起始了 APP 的淀粉样酶切途径,而且是 Aβ 生成的限速酶,抑制 BACE1 的表达,AD 就会得到控制^[16],因此,BACE1 成为 AD 治疗的另一个重要靶点。

本研究采用的 APP695V717I 转基因小鼠模型建立在 APP 基因突变导致 Aβ 沉积的病理学说上,过多地表达 APP 基因或其突变基因产物,即可较早地引起 Aβ 的沉积和相关的病理损害或症状,是研究 AD 发病机制及筛选治疗药物的理想模型。本研究结果显示,与正常对照组比较,7 月龄 APP 转基因小鼠模型组 3 min

内穿越原平台位置的次数、在原平台所在第四象限停留时间及游泳路程显著减少,学习记忆能力明显降低,与秦川等^[17]的报道相符。研究还发现,7 月龄 APP 转基因模型组小鼠海马 CA1 区神经元 APP、BACE1、PS-1 和 Aβ 表达显著上调,表现为阳性细胞数目显著增多,着色显著加深,这与邢颖^[18,19]等报道的小鼠脑组织病理表现一致。提示 APP 表达上调可能是 APP 转基因小鼠脑内病理改变的起始事件;BACE1 表达上调的趋势与 APP 一致,可能是 APP 表达增加的继发事件,即更多的 APP 经由 BACE1 介导的淀粉源途径水解,使 BACE1 表达代偿性增高。我们对 3 月龄 APP 转基因小鼠连续灌胃给药 4 个月后,发现 7 月龄还脑益聪方提取物大剂量组和小剂量组 APP、BACE1、PS-1 和 Aβ 表达均显著下调,表现为阳性细胞数目显著减少,着色较浅。说明还脑益聪方可以通过降低脑内 APP 的表达,在一定程度上抑制 Aβ 聚集和 SP 形成,从而延缓 APP 转基因小鼠大脑病理进程,而 PS-1 及 BACE1 是其可能的作用靶点。因动物是长期灌胃给药,所用药物剂量都是在临床等效剂量下换算出的剂量,并只相差

1 倍,所以无论学习记忆行为还是免疫组化结果都没有明显的量效差异。还脑益聪方由何首乌、人参、石菖蒲、川芎和黄连组成。方中何首乌补肝肾,填精髓,为君药。人参的作用在《神农本草经》中论述为“主补五脏,安精神,定魂魄……开心、益智。久服,轻身延年”,为臣药,协助君药增强补益之功。黄连入心经以解神明之毒,共为佐药。川芎活血祛瘀,并载药上行于脑为使药。该方是课题组通过系统的文献研究并结合多年的临床经验,在补益虚损的基础上,根据中医对 AD 的认识提出“虚-瘀-浊-毒”为 AD 的病机基础上^[20]总结而成的中药复方。全方贯穿补肾益气、活血通络、化痰祛浊、清热解毒的中医治法,标本兼治。研究证明还脑益聪方提取物作为防治 AD 的有效中药成分,具有良好的应用开发前景。

参 考 文 献

- [1] Vanhanen M, Koivisto K, Moilanen L, et al. Association of metabolic syndrome with Alzheimer's disease: a population-based study [J]. *Neurology*, 2006, 67(5): 843-847.
- [2] 李浩,姚明江,赵文明,等.还脑益聪胶囊治疗老年轻度认知损害的双盲随机对照研究[J].*中西医结合学报*, 2008, 6(1): 25-28.
- [3] 官杰,李浩,刘剑刚,等.还脑益聪方组分对 APP 转基因小鼠脑组织炎症因子和氧化应激的影响[J].*中国病理生理杂志*, 2011, 27(4): 732-738.
- [4] Zhang YW, Xu H. Molecular and cellular mechanisms for Alzheimer's disease: understanding APP metabolism[J]. *Curr Mol Med*, 2007, 7(7): 687-696.
- [5] Selkoe DJ, Schenk D. Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003, 43(6): 545-584.
- [6] Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, et al. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review[J]. *Brain Res Bull*, 2003, 61(1): 21-24.
- [7] Ling Y, Morgan K, Kalsheker N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35(11): 1505-1535.
- [8] Wolfe MS, Kopan R. Intramembrane proteolysis: theme and variations [J]. *Science*, 2004, 305(5): 1119-1123.
- [9] Bart De Strooper. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer's disease [J]. *EMBO Reports*, 2007, 8(2): 141-146.
- [10] Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by alpha-, beta-, and gamma-secretases [J]. *FEBS Lett*, 2000, 483(1): 6-10.
- [11] Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, et al. Visualization of Abeta 42(43) and Abeta 40 in senile plaques with end-specific Abeta monoclonals: evidence that an initially deposited species is Abeta 42(43) [J]. *Neuron*, 1994, 13(1): 45-53.
- [12] Gravina SA, Ho L, Eckman CB, et al. Amyloid beta protein (Abeta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at Abeta 40 or Abeta 42(43) [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(13): 7013-7016.
- [13] McGowan E, Pickford F, Kim J, et al. Aβ42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice [J]. *Neuron*, 2005, 47(2): 191-199.
- [14] Suh YH, Checler F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-Synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease [J]. *Pharmacol Rev*, 2002, 54(3): 469-525.
- [15] Wu J, Basha MR, Brock B, et al. Alzheimer's disease (AD)-like pathology in aged monkeys after infantile exposure to environmental metal lead (Pb): evidence for a developmental origin and environmental link for AD [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(1): 3-9.
- [16] Rossner S, Sastre M, Bourne K, et al. Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression-implications for Alzheimer's disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2006, 79(2): 95-111.
- [17] 秦川,朱华,常洋,等.阿尔茨海默症转基因小鼠的初步行为学评价[J].*上海实验动物科学*, 2000, 20(4): 210-211.
- [18] 邢颖,张兰,李林.参乌胶囊抑制阿尔茨海默病模型小鼠脑内 β-淀粉样肽生成的机制研究[J].*中国老年学杂志*, 2006, 26(7): 924-926.
- [19] 徐艳玲,赵娟,马瑞珏,等.H102 对 APP 转基因小鼠脑内淀粉样蛋白和淀粉样蛋白前体蛋白表达的影响[J].*中国应用生理学杂志*, 2010, 26(3): 302-306.
- [20] 李浩,姚明江.浅谈中医“虚”、“瘀”、“浊”、“毒”与轻度认知障碍发病的关系[J].*中国中医药信息杂志*, 2006, 13(11): 4-5.

(收稿:2012-07-10 修回:2012-10-15)