

健脾填精方对血管性痴呆小鼠脑组织蛋白的影响

龚娟芬 刘吉丹 房梦园 苏蒙 李伟光 何迎春

【摘要】 **目的** 探讨健脾填精方对血管性痴呆(VD)小鼠脑组织关键蛋白的影响及作用机制。**方法** 40只小鼠采用随机数字表法分为中药组15只,模型组15只,假手术组10只。模型组和中药组采用短暂双侧颈总动脉阻断法建立VD小鼠模型。中药组给予2.016 g/ml的健脾填精方溶液10 ml/(kg·d)灌胃,模型组和假手术组给予等量0.9%氯化钠溶液灌胃,3组均持续28 d。给药结束后对小鼠进行Morris水迷宫试验,利用定量蛋白质组学技术对小鼠脑组织蛋白进行质谱分析,筛选差异表达蛋白并进行生物信息学分析。**结果** 水迷宫实验结果显示,试验第5天中药组逃避潜伏期时间[(38.12±2.15) s]显著短于模型组[(47.97±2.89) s],显著长于假手术组[(34.42±3.56) s],差异均有统计学意义($P<0.01$);中药组跨越平台次数[(3.60±0.52)次]显著多于模型组[(2.40±0.52)次],显著少于假手术组[(4.70±0.82)次],差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);中药组停留在第Ⅲ象限时间[(16.71±1.19) s]显著长于模型组[(11.42±1.96) s],显著短于假手术组[(20.05±1.77) s],差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。蛋白质组学共筛选出152个差异蛋白,模型组与中药组之间有65个差异蛋白;中药组小鼠脑组织中代谢性谷氨酸受体2(Grm2)、细胞色素c氧化酶亚基7C(Cox7c)、鸟苷酸环化酶可溶性亚基 α -3(Gucy1a3)、蛋白偶联锌反转运蛋白Slc30a1(Slc30a1)等蛋白表达上调。**结论** 健脾填精方可能通过影响小鼠脑组织中关键蛋白的表达来减轻兴奋性毒性、抗氧化应激、减轻线粒体功能障碍、抗动脉粥样硬化、调节细胞离子稳态等途径,从而改善VD。

【关键词】 健脾填精方;血管性痴呆;差异表达蛋白;蛋白质组学;中医药

Effect of Jianpi Tianjing formula on brain tissue proteins in mice with vascular dementia

GONG Juanfen, LIU Jidan, FANG Mengyuan, SU Meng, LI Weiguang, HE Yingchun

Authors' address: Department of Geriatrics, Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310007, China

Corresponding author: HE Yingchun, E-mail: heyingchun2008@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect and mechanism of Chinese medicine Jianpi Tianjing (JPTJ) formula on brain proteins in mice with vascular dementia (VD). **Methods** Forty ICR male mice were randomly divided into JPTJ group ($n=15$), model group ($n=15$) and sham group ($n=10$). The VD mouse model were induced by brief bilateral common carotid artery blockage in model group and the JPTJ group; while sham operation was performed in sham group. The mice in JPTJ group were gavaged with 10 ml JPTJ formula solution (2.016 g/ml), while the model group and sham group were given equal amount of saline. After the 28 d administration treatment, the mice were subjected to the Morris water maze test, then the brain tissues were harvested and the differentially expressed proteins were screened with mass spectrometry for quantitative proteomics and bioinformatics analysis. **Results** The water maze test showed that the latency time of escape was significantly shorter in the JPTJ group (38.12 s $\pm$ 2.15 s) than that in the model group (47.97 s $\pm$ 2.89 s), but longer than that in the sham-operated group (34.42 s $\pm$ 3.56 s) at D5 ($P<0.01$). The number of platform crossings in the JPTJ group (3.60 $\pm$ 0.52) was significantly more than that in the model group (2.40 $\pm$ 0.52), but less than that in the sham group (4.70 $\pm$ 0.82) ($P<0.01$). The time to stay in quadrant III in the JPTJ group (16.71 s $\pm$ 1.19 s) was significantly higher than that in the model group (11.42 s $\pm$ 1.96 s), but

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2023.45.9.2023-109

基金项目:杭州市科技发展计划项目(20201203B194);浙江中医药科技计划项目(2022ZA104)

作者单位:310007 浙江中医药大学附属杭州市中医院老年病科

通信作者:何迎春, E-mail: heyingchun2008@163.com

significantly shorter than that in the sham group ($20.05 \pm 1.77 \text{ s}$) ($P < 0.01$). A total 152 differential proteins were screened out by proteomics, and there were 65 differential proteins between the model group and the JPTJ group. The expression of metabotropic glutamate receptor 2, cytochrome c oxidase subunit 7C, guanylate cyclase soluble subunit alpha-3, and proton-coupled zinc antiporter Slc30a1 were upregulated in the brain tissue of mice in JPTJ group. **Conclusion** Chinese medicine Jianpi Tianjing formula may improve VD in mice by affecting the expression of key proteins in brain tissue, which are associated with excitotoxicity, anti-oxidative stress, reducing mitochondrial dysfunction, anti-atherosclerosis, and regulating cellular ion homeostasis.

【Key words】 Jianpi Tianjing formula; Vascular dementia; Differentially expressed protein; Proteomics; Traditional Chinese medicine

血管性痴呆(vascular dementia, VD)指因各种脑血管损伤导致学习、记忆、计算能力、定向力等认知功能严重下降的临床综合征^[1]。现用于改善 VD 症状的药物主要是多奈哌齐、加兰他敏和美金刚等^[2],这些药物治疗有限,还可能引起严重的不良反应,如呕吐、腹泻、头痛和高血压等^[3]。相比于单靶点化学药物,中药具有多组分、多靶点、不良反应少等特点,在 VD 的治疗中发挥了积极的作用^[4-5]。健脾填精方由人参、天麻、白术、巴戟天、石菖蒲、黄连、菟丝子等中草药组成,能改善轻度认知功能障碍患者的学习记忆功能,提高患者生活质量^[6]。动物研究发现,健脾填精方治疗 VD 的机制可能与减少大鼠脑组织氧化应激损伤,维持海马的线粒体膜电位和 ATP 水平,改善线粒体功能障碍等相关^[7]。中药复方成分复杂,定量蛋白质组学技术是寻找疾病生物标志物和药物治疗靶点的新型手段^[8],能从分子层面分析中药复方的作用机制。本研究通过蛋白质组学技术筛选健脾填精方干预 VD 小鼠脑组织差异表达蛋白,并进一步对差异蛋白进行生物信息学分析,以期对健脾填精方的临床应用及药物药理研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物 ICR 雄性小鼠 40 只(无特定病原体,6~8 周龄,体质量 18~22 g),由上海市计划生育研究所动物经营部提供,动物合格证编号 SCXK(沪)2018-0006,在浙江中医药大学动物实验研究中心饲养,实验动物使用许可证号 SYXK(浙)2021-0012。所有小鼠提前适应性喂养 1 周,实验房室温为 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$,湿度为 $(63 \pm 2)\%$,光照为明/暗=12 h/12 h,噪音 $< 55 \text{ dB}$,自由进食和饮水。所有程序均按照浙江中医药大学动物实验中心指南进行,并由浙江中医药大学动物伦理委员会批准,批准编号 IACUC-20210906-12。

1.2 实验药物 自拟健脾填精方:人参 9 g,天麻 9 g,

白术 10 g,巴戟天 6 g,石菖蒲 6 g,黄连 3 g,菟丝子 12 g,由浙江中医药大学中药教研室鉴定。前期研究发现健脾填精方最佳剂量为 $14.4 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,按照人与动物间体表面积折算的等效剂量比值换算成小鼠的治疗剂量为 $20.160 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,口服剂量为 $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ^[9]。本研究中健脾填精方颗粒剂(含有草药 55 g)用约 27.3 ml 0.9%氯化钠溶液溶解,得到终浓度为 $2.016 \text{ g}/\text{ml}$ 的健脾填精方溶液。

1.3 主要试剂 二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白质定量试剂盒(批号:P0012)和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(批号:P0015F)购自上海碧云天生物技术有限公司;碘乙酰胺购自美国 Sigma 公司,批号:I1149-5G;甲酸(批号:A117)购自德国 Thermo Fisher Scientific 公司;乙腈(批号:1000304008)购自上海麦克林生化科技股份有限公司;C18 分析柱(批号:WAT023590)购自美国 Waters 公司。

1.4 方法

1.4.1 动物分组、造模及给药 40 只小鼠用随机数字表法分为中药组 15 只,模型组 15 只,假手术组 10 只。所有小鼠均用 0.3%戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉,中药组和模型组小鼠采用短暂双侧颈总动脉阻断法建立 VD 模型^[10],经颈正中切口显露双侧颈总动脉,用丝线结扎双侧颈动脉 10 min,然后松开 10 min,重复 3 次,最后取下丝线缝合伤口。假手术组小鼠仅切开皮肤,不结扎双侧颈总动脉。术后连续 3 d 予肌肉注射青霉素 5 000 U/d 预防感染,用碘伏消毒伤口直至愈合。术后第 7 天开始给药,中药组给予 $10 \text{ ml}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 健脾填精方溶液灌胃,模型组和假手术组给予等体积 0.9%氯化钠溶液灌胃。3 组小鼠均给药 28 d。

1.4.2 Morris 水迷宫试验 圆形逃生平台位于第 III 象限。3 组小鼠均训练 4 d,将小鼠放置在不同象限内自

由游泳 90 s, 如果 90 s 内没有到达安全平台, 则引导至平台停留 10 s。将小鼠从第Ⅲ象限以外象限的水池壁放入水中, 记录到达逃生平台的时间, 即逃避潜伏期, 共持续测试 5 d。撤去圆形逃生平台, 将小鼠从第Ⅰ象限的水池壁放入水中, 记录 1 min 内跨越第Ⅲ象限平台次数和在第Ⅲ象限停留的时间。

1.4.3 3 组小鼠脑组织蛋白提取及肽段制备 Morris 水迷宫试验结束后, 将各组小鼠迅速断颈处死, 快速取脑。每组随机选择 3 个脑组织样本加入适量裂解液, 超声破碎, 沸水浴 10 min, 14 000 r/min 离心 15 min, 留取上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度^[11]。取 200 μ g 蛋白质溶液根据过滤辅助样品制备程序进行酶解, 酶解后的肽段采用 C18 柱脱盐, 肽段冻干后加入 40 μ l 0.1% 甲酸溶液, 进行肽段定量。

1.4.4 蛋白质质谱分析 采用 NanoElute 系统进行色谱分离。缓冲液 A 液为 0.1% 甲酸水溶液, B 液为 0.1% 甲酸乙腈水溶液。色谱柱以 100% 的 A 液平衡, 样品由自动进样器上样到分析柱 (IonOpticks, 澳大利亚, 25 cm $\times$ 75 μ m, C18 填料 1.6 μ m) 分离, 流速 300 nl/min, 持续 90 min。进行液相梯度分离: 0~75 min, B 液线性梯度为 2%~22%; 75~80 min, B 液线性梯度为 22%~37%; 80~85 min, B 液线性梯度为 37%~80%; 85~90 min, B 液为 80%。经色谱分离后的样品用 TimsTOF Pro 质谱仪的平行累积连续碎裂技术模式进行质谱分析。

1.4.5 蛋白质鉴定和质谱数据分析 收集 TimsTof pro 高分辨率质谱仪质谱数据, 肽段离子得分 > 60 分表示结果可信。7~20 个氨基酸长度的肽段被认为符合胰蛋白酶解和高能碎裂的规律。大部分蛋白对应两个以上肽段, 表示蛋白质定量结果可信。将原始质谱数据导入 Maxquant 软件 (版本号 1.6.17.0), 采用非标记定量 (label free quantitation, LFQ) 算法^[12]对蛋白质组学数据进行计算, 以差异倍数 > 1.200 或 < 0.833、 $P < 0.05$ 的标准筛选差异蛋白。

1.4.6 蛋白质生物信息学分析 通过 <http://www.bioinformatics.com.cn/> 在线软件对差异表达蛋白进行聚类分

析。运用 <http://geneontology.org/> 进行基因本体论 (gene ontology, GO) 分析。通过 <http://www.kegg.jp/> 进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。运用 STRING 数据库 ([https:// string-db.org/](https://string-db.org/)) 构建蛋白互作网络 (protein-protein interaction, PPI)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 25.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Levene 法进行方差齐性检验, 方差齐时组间比较采用单因素方差分析, 方差不齐采用 Mann-Whitney U 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况及 Morris 水迷宫试验结果 手术时, 中药组和模型组各有 3 只小鼠死亡; 给药期间中药组和模型组各有 2 只小鼠死亡。手术结束后, 除假手术组, 其他两组小鼠均出现精神倦怠、纳食减少和行动缓慢等现象。随试验进行, 各组小鼠逃避潜伏期逐渐缩短; 第 2~5 天, 与假手术组比较, 模型组逃避潜伏期显著延长 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组逃避潜伏期显著缩短 ($P < 0.01$)。试验第 6 天, 与假手术组相比, 模型组和中药组跨越平台次数和停留在第Ⅲ象限的时间均显著减少 (均 $P < 0.01$); 与模型组相比, 中药组 1 min 内跨越第Ⅲ象限平台次数和在第Ⅲ象限停留的时间均显著增加 (均 $P < 0.01$), 见表 1。

2.2 差异蛋白的鉴定结果 质谱分析共得到蛋白质二级谱图数 841 588 个, 有效谱图数 393 081 个; 鉴定到的肽段总数 52 206 条, 特异性肽段数 50 097 条, 鉴定到的蛋白质总数 5 236 个。蛋白质肽段长度多为 8~19 kD, 处于合理范围内, 约 70% 的肽段得分 > 60 分, 大部分蛋白对应 1 个以上的特异性肽段, 说明结果精确可信。

2.3 差异蛋白的表达情况 3 组共筛选出 152 个差异蛋白, 其中模型组与中药组间 65 个, 包括表达上调蛋白 39 个, 表达下调蛋白 26 个; 模型组与假手术组间 53 个, 包括表达上调蛋白 32 个, 表达下调蛋白 21 个。聚类分析结果显示, 在模型组中上调或下调的蛋白, 在

表 1 3 组小鼠 Morris 水迷宫试验结果比较

组别	n	逃避潜伏期 (s)					1 min 内穿越第Ⅲ象限平台次数 (次)	在第Ⅲ象限停留的时间 (s)
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天		
假手术组	10	52.39 $\pm$ 2.35	45.84 $\pm$ 2.02 ^a	40.37 $\pm$ 2.87 ^a	35.24 $\pm$ 2.99 ^a	34.42 $\pm$ 3.56 ^a	4.70 $\pm$ 0.82 ^a	20.05 $\pm$ 1.77 ^a
模型组	10	51.21 $\pm$ 2.03	50.54 $\pm$ 2.03 ^b	48.16 $\pm$ 3.01 ^b	49.18 $\pm$ 1.94 ^b	47.97 $\pm$ 2.89 ^b	2.40 $\pm$ 0.52 ^b	11.42 $\pm$ 1.96 ^b
中药组	10	51.60 $\pm$ 2.15	47.29 $\pm$ 2.04 ^a	42.46 $\pm$ 3.45 ^a	39.50 $\pm$ 3.37 ^a	38.12 $\pm$ 2.15 ^a	3.60 $\pm$ 0.52 ^a	16.71 $\pm$ 1.19 ^a

注: 与模型组比较, ^a $P < 0.01$; 与中药组比较, ^b $P < 0.01$

假手术组、中药组中表达相反,可见差异表达的蛋白可以有效地区分各组,见图1(插页)。

2.4 GO富集分析 模型组和中药组间的差异蛋白主要涉及血浆脂蛋白的清除、细胞钙离子稳态、突触膜粘附、神经递质的分泌、氮化合物代谢等生物过程;差异蛋白主要位于胞内体、质膜外侧、突触前膜等位置,与胆固醇结合、蛋白结合、离子结合、酶活性等分子功能相关,见图2(插页)。

2.5 KEGG富集分析和PPI分析 KEGG富集分析结果显示,模型组和中药组间的差异蛋白涉及维生素消化和吸收、丙酮酸代谢、谷氨酸突触、代谢通路、神经退行性变通路等信号通路,见图3。将模型组与中药组之间的差异蛋白导入STRING数据库构建PPI网络,结果显示该网络中共有55个节点,128条边。主要差异蛋白质有参与谷氨酸突触信号通路的代谢性谷氨酸受体2(metabotropic glutamate receptor 2, Grm2),与氧化磷酸化相关的细胞色素c氧化酶亚基7C(cytochrome c oxidase subunit 7C, Cox7C),调节细胞离子稳态的蛋白偶联锌反转运蛋白Slc30a1(proton-coupled zinc antiporter Slc30a1, Slc30a1)也在其中,见图4。使用Cytoscape 3.9.1软件的cytoHubba插件可筛选出关键蛋白,关键蛋白为差异表达基因集合中具有最强调控作用的基因,见图5。

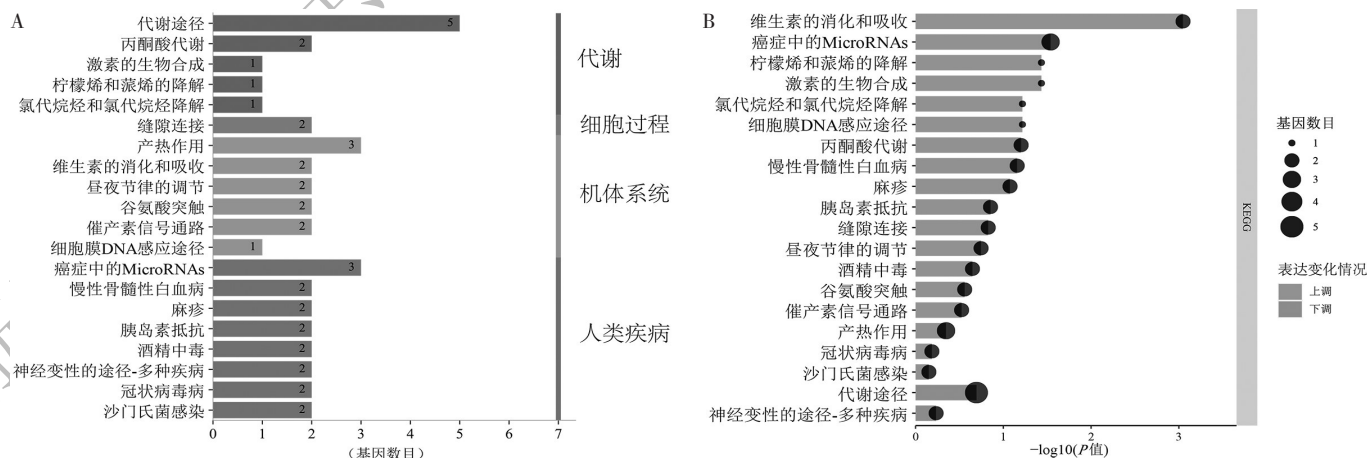
3 讨论

VD是一种复杂的脑部疾病,脑血管损伤导致脑灌注减少可能是VD的潜在机制。研究认为,脑灌注减少时,氧气和能量供应减少,直接导致线粒体功能障碍和离子失衡,之后神经兴奋性毒性、氧化应激等分子机制被激活^[13]。Olloquequi等^[14]认为,兴奋性谷氨

酸受体过度激活引起神经元功能障碍或死亡,导致中枢神经系统处于兴奋性毒性状态,这可能与VD的发病相关。差异蛋白Grm2可降低由氧化应激介导的兴奋性毒性,减少神经元死亡,改善认知功能^[15]。健脾填精方减轻兴奋性毒性的作用机制可能与活性成分人参皂苷、白术内酯Ⅲ有关。研究发现,人参皂苷通过抑制星形胶质细胞兴奋性毒性而发挥保护神经和增强认知的作用^[16]。白术内酯Ⅲ可通过抑制半胱天冬酶信号通路,减轻谷氨酸诱导的神经元凋亡,从而发挥神经保护作用^[17]。

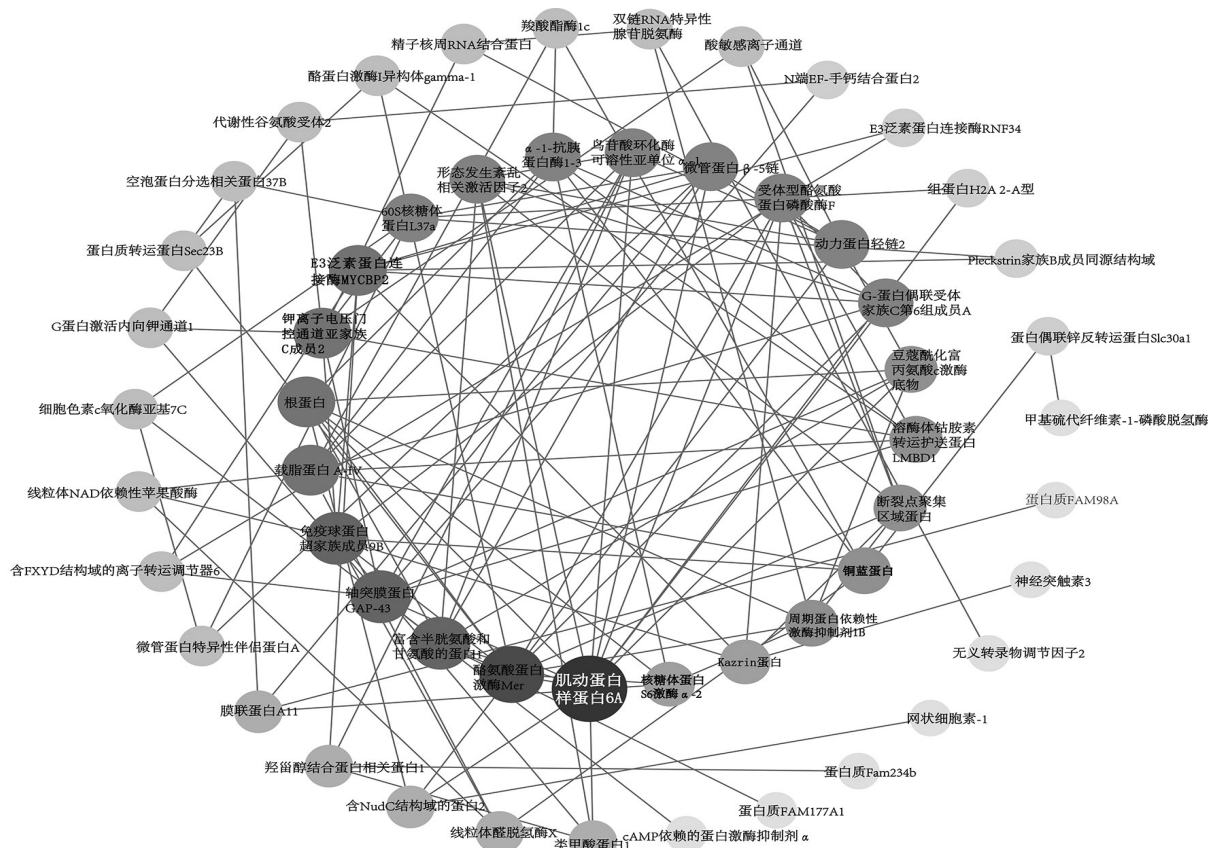
缺氧条件下,线粒体功能障碍可引发能量代谢异常,活性氧与抗氧化剂之间的平衡被打破,自由基增多,引起氧化应激反应,导致神经元细胞死亡,这可能是VD发病的原因之一^[18]。差异蛋白Cox7C能够促进ATP合成,减少线粒体功能障碍的发生,减轻氧化应激反应^[19]。健脾填精方减轻氧化应激的作用机制可能与活性成分白术内酯、巴戟天低聚糖有关。白术内酯可减少活性氧形成,减轻氧化损伤,增加记忆相关蛋白,如突触素I和蛋白激酶C的表达,从而改善记忆能力^[20]。Chen等^[21]研究发现巴戟天低聚糖可抑制痴呆模型大鼠海马CA1脑区、皮质和前脑基底核神经元细胞减少,增强抗氧化能力并防止自由基损伤,提高大鼠学习记忆能力。本研究发现,中药组小鼠脑组织中Grm2、Cox7C表达上调,说明健脾填精方可能通过减轻神经系统兴奋性毒性、抗氧化应激和减轻线粒体功能障碍从而发挥改善VD的作用。

动脉粥样硬化可能是VD发生的原因之一,鸟苷酸环化酶可溶性亚基 α -3(guanylate cyclase soluble subunit alpha-3, Gucy1a3)能防止动脉粥样硬化的发



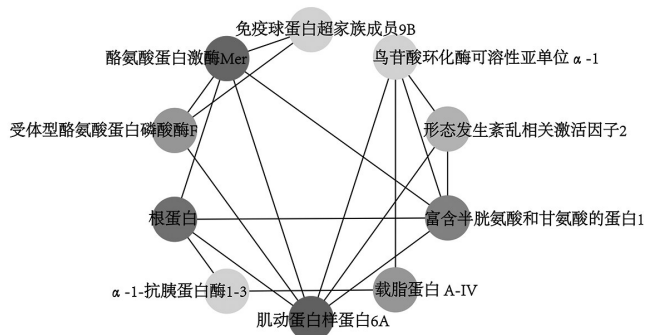
注:KEGG为京都基因与基因组百科全书;B图中黑点大小表示通路中基因的数目,点越大,说明基因数目越多

图3 KEGG通路富集结果(A:通路分类图;B:KEGG富集点线图)



注: PPI 为蛋白互作网络, 节点为差异表达蛋白, 节点之间的连线为蛋白质之间的联系, 节点大小表示差异蛋白与其他蛋白质的联系程度, 与其他蛋白质联系越多, 节点越大, 节点颜色越深。

图4 差异蛋白的PPI分析



注:节点颜色表示差异蛋白与其他蛋白质的关联程度,关联程度越多,节点颜色越深

图5 关键蛋白网络图

生^[22-23]。Gucyl1a3 编码可溶性鸟苷酸环化酶的 $\alpha 1$ 亚基,可溶性鸟苷酸环化酶复合体是一氧化氮受体,可催化环状鸟苷 3',5'-单磷酸酯(Guanosine-3',5'-cyclic monophosphate,cGMP)的形成,cGMP 可调节神经传递、松弛血管平滑肌细胞和抑制血小板聚集等生理过

程^[24]。健脾填精方中的黄连素是从中药黄连中分离的一种季铵生物碱,可改善动脉粥样硬化血管内皮损伤^[25]。经健脾填精方干预的小鼠脑组织中Gucy1a3表达上调,而模型组小鼠脑组织中Gucy1a3的表达无明显变化,说明健脾填精方可能通过上调Gucy1a3的表达,发挥防治VD的作用。

脑缺血时,突触活动增强引起锌离子(Zn^{2+})释放增加,细胞内高水平的 Zn^{2+} 可对神经元、神经胶质细胞产生毒性,最终导致神经元或神经胶质细胞快速死亡^[26]。差异蛋白Slc30a1参与了调节细胞离子稳态的过程。Slc30a1是 Zn^{2+} 吸收和转运的关键调控因子,其表达增多可降低神经元、神经胶质细胞内 Zn^{2+} 水平,使其免受 Zn^{2+} 中毒的影响,维持 Zn^{2+} 稳态,减少神经细胞死亡^[27]。天麻的主要生物活性成分天麻素可以抑制 Zn^{2+} 诱导的细胞死亡,保护星形胶质细胞免受 Zn^{2+} 的毒性影响和氧化应激损伤^[28]。经健脾填精方治疗的VD小鼠脑组织Slc30a1水平明显增加,证实了健脾填精方可通过调节细胞离子稳态,保护神经元。

除人参皂苷、白术内酯、巴戟天低聚糖类、黄连素、天麻素等活性成分外,健脾填精方中还可能还存在其他活性成分,但是否对改善 VD 有利还需进一步证实。总之,健脾填精方对小鼠脑组织蛋白的影响可能涉及 Grm2、Cox7C、Gucy1a3、Slc30a1 等关键蛋白,通过减轻兴奋性毒性、抗氧化应激、减轻线粒体功能障碍、抗动脉粥样硬化、调节细胞离子稳态等途径,起到改善 VD 的作用。

4 参考文献

- [1] Kuang H, Zhou ZF, Zhu YG, et al. Pharmacological treatment of vascular dementia: a molecular mechanism perspective[J]. *Aging Dis*, 2021, 12(1):308–326. DOI:10.14336/AD.2020.0427.
- [2] Iadecola C, Duering M, Hachinski V, et al. Vascular cognitive impairment and dementia: JACC scientific expert panel[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(25):3326–3344. DOI:10.1016/j.jacc.2019.04.034.
- [3] Battle CE, Abdul-Rahim AH, Shenkin SD, et al. Cholinesterase inhibitors for vascular dementia and other vascular cognitive impairments: a network Meta-analysis[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2021, 2(2):Cd013306. DOI:10.1002/14651858.CD013306.
- [4] Bai X, Zhang M. Traditional Chinese medicine intervenes in vascular dementia: traditional medicine brings new expectations[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:689625. DOI:10.3389/fphar.2021.689625.
- [5] Chan ES, Bautista DT, Zhu Y, et al. Traditional Chinese herb-medicine for vascular dementia[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2018, 12(12):Cd010284. DOI:10.1002/14651858.CD010284.pub2.
- [6] 何迎春, 李瑾, 刘晓丹, 等. 从 β 类淀粉样蛋白等氧化损伤角度探讨健脾填精方对轻度认知障碍的作用机制[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(6):1317–1319. DOI:10.13193/j.archtcm.2013.06.103.heyh.079.
- [7] 王志伟, 何迎春, 朱青. 健脾填精方对血管性痴呆大鼠认知功能障碍的影响及机制研究[J]. *中药材*, 2022, 45(5):1–5. DOI:10.13863/j.issn1001-4454.2022.05.037.
- [8] Sandin M, Chawade A, Levander F. Is label-free LC-MS/MS ready for biomarker discovery?[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2015, 9(3/4):289–294. DOI:10.1002/prca.201400202.
- [9] Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human[J]. *J Basic Clin Pharm*, 2016, 7(2):27–31. DOI:10.4103/0976-0105.177703.
- [10] Wang Q, Yang W, Zhang J, et al. TREM2 overexpression attenuates cognitive deficits in experimental models of vascular dementia[J]. *Neural Plast*, 2020, 2020:8834275. DOI:10.1155/2020/8834275.
- [11] Lin C, Li L, Feng J, et al. A novel Apt-SERS platform for the determination of cardiac troponin I based on coral-like silver-modified magnetic substrate and BCA method[J]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1225:340253. DOI:10.1016/j.aca.2022.340253.
- [12] Cox J, Hein MY, Luber CA, et al. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(9):2513–2526. DOI:10.1074/mcp.M113.031591.
- [13] Belkhef M, Beder N, Mouhoub D, et al. The involvement of neuroinflammation and necroptosis in the hippocampus during vascular dementia[J]. *J Neuroimmunol*, 2018, 320:48–57. DOI:10.1016/j.jneuroim.2018.04.004.
- [14] Olloquequi J, Cornejo-Córdova E, Verdaguer E, et al. Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: therapeutic implications[J]. *J Psychopharmacol*, 2018, 32(3):265–275. DOI:10.1177/0269881118754680.
- [15] Sonnenschein SF, Grace AA. The mGluR2/3 agonist parglumetad methionil normalizes aberrant dopamine neuron activity via action in the ventral hippocampus[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2020, 45(12):2106–2113. DOI:10.1038/s41386-020-0764-2.
- [16] 赵慧. 人参皂苷 CK 抗谷氨酸兴奋毒细胞网络模型中星形胶质细胞兴奋毒性异常作用机制研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2017.
- [17] Liu C, Zhao H, Ji ZH, et al. Neuroprotection of atractylenolide III from *Atractylodes macrocephalae* against glutamate-induced neuronal apoptosis via inhibiting caspase signaling pathway[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(9):1753–1758. DOI:10.1007/s11064-014-1370-7.
- [18] Li L, Tan J, Miao Y, et al. ROS and autophagy: interactions and molecular regulatory mechanisms[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(5):615–621. DOI:10.1007/s10571-015-0166-x.
- [19] Mai L, He G, Chen J, et al. Proteomic analysis of hypoxia-induced senescence of human bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells Int*, 2021, 2021:5555590. DOI:10.1155/2021/5555590.
- [20] Ji ZH, Liu C, Zhao H, et al. Neuroprotective effect of biatractylenolide against memory impairment in D-galactose-induced aging mice[J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 55(3):678–683. DOI:10.1007/s12031-014-0407-3.
- [21] Chen DL, Zhang P, Lin L, et al. Protective effects of baijiasu in a rat model of $A\beta_{25-35}$ -induced neurotoxicity[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(1):206–217. DOI:10.1016/j.jep.2014.04.004.
- [22] Price BR, Norris CM, Sompol P, et al. An emerging role of astrocytes in vascular contributions to cognitive impairment and dementia[J]. *J Neurochem*, 2018, 144(5):644–650. DOI:10.1111/jnc.14273.
- [23] Li JL, Liu LY, Jiang DD, et al. Associations between GUCY1A3 genetic polymorphisms and large artery atherosclerotic stroke risk in Chinese Han population: a case-control study[J]. *Lipids Health Dis*, 2019, 18(1):233. DOI:10.1186/s12944-019-1177-2.
- [24] Wobst J, Kessler T, Dang TA, et al. Role of sGC-dependent

- NO signalling and myocardial infarction risk[J]. *J Mol Med*, 2015, 93(4):383–394. DOI:10.1007/s00109-015-1265-3.
- [25] Fan X, Wang J, Hou J, et al. Berberine alleviates ox-LDL induced inflammatory factors by up-regulation of autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway[J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 92. DOI:10.1186/s12967-015-0450-z.
- [26] Zhao Y, Yan F, Yin J, et al. Synergistic interaction between zinc and reactive oxygen species amplifies ischemic brain injury in rats[J]. *Stroke*, 2018, 49(9):2200–2210. DOI:10.1161/STROKEAHA.118.021179.
- [27] Sankavaram K, Freake HC. The effects of transformation and ZnT-1 silencing on zinc homeostasis in cultured cells[J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(6):629–634. DOI:10.1016/j.jnutbio.2011.03.006.
- [28] Luo L, Kim SW, Lee HK, et al. Gastrodin exerts robust neuro-protection in the postischemic brain via its protective effect against Zn(2+)-toxicity and its anti-oxidative effects in astrocytes[J]. *Anim Cells Syst*, 2018, 22(6):429–437. DOI:10.1080/19768354.2018.1549099.

(收稿日期:2023-01-06)

(本文编辑:沈亚芳)

(上接第 961 页)

生病变时,神经元中NSE释放到血液及脑脊液中,其水平与脑损伤程度相关。本研究发现,治疗后观察组患者血清Hcy、GFAP和NSE水平低于对照组,BDNF水平高于对照组,提示养血清脑丸联合草酸艾司西酞普兰可降低血清Hcy、GFAP和NSE水平,提高BDNF水平。

综上所述,养血清脑丸联合草酸艾司西酞普兰治疗AD伴抑郁疗效显著,可降低患者血清Hcy、GFAP和NSE水平,提高BDNF水平,具有重要临床研究价值。但本研究还存在一些局限,样本量小,观察疗程短,还需后续加大样本量深入研究,以期临床提供更多可靠依据。

4 参考文献

- [1] Jakaria M, Belaidi AA, Bush AI, et al. Ferroptosis as a mechanism of neurodegeneration in Alzheimer's disease[J]. *J Neurochem*, 2021, 159(5):804–825. DOI:10.1111/jnc.15519.
- [2] 张锦红,邱劲松,吴妍,等.刺五加注射液联合氟西汀治疗老年性痴呆伴发抑郁的临床疗效[J].*云南中医学院学报*, 2017, 40(6):62–65. DOI:10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.06.018.
- [3] 潘名志,徐晓文,任秀乾,等.阿尔茨海默病伴抑郁患者外周炎症因子、25羟维生素D水平的研究[J].*临床输血与检验*, 2021, 23(1):100–103. DOI:10.3969/j.issn.1671-2587.2021.01.025.
- [4] 何慧萍,何尧苇,沈宗霖,等.阿尔茨海默病与轻度认知功能障碍患者精神行为症状比较分析[J].*昆明医科大学学报*, 2022, 43(9):19–23. DOI:10.12259/j.issn.2095-610X.S20220913.
- [5] 李丹,赵微.盐酸度洛西汀与草酸艾司西酞普兰对老年期抑郁患者的疗效和安全性比较[J].*国际精神病学杂志*, 2021, 48(4):643–646. DOI:10.13479/j.cnki.jip.2021.04.019.
- [6] 陈妍,梁玉婵,陈东梅,等.养血清脑丸联合度洛西汀治疗卒中后抑郁的临床效果及对神经介质水平的影响研究[J].*辽宁中医杂志*, 2022, 49(8):107–109. DOI:10.13192/j.issn.1000-1719.2022.08.030.
- [7] 中华医学会精神病学分会.中国精神疾病防治指南[M].北京:北京
- 大学医学出版社, 2010:26–30.
- [8] 鄢玲,李伟.舒肝解郁胶囊治疗阿尔茨海默病伴抑郁患者的临床疗效及其对氧化应激的影响[J].*世界中西医结合杂志*, 2020, 15(12):2261–2264. DOI:10.13935/j.cnki.sjzx.201222.
- [9] Sharma VK, Singh TG, Singh S, et al. Apoptotic pathways and Alzheimer's disease: probing therapeutic potential[J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(12):3103–3122. DOI:10.1007/s11064-021-03418.
- [10] 任宏.内皮细胞特异性分子-1水平与阿尔茨海默病患者抑郁的相关性[J].*中国现代医学杂志*, 2019, 29(13):80–83. DOI:10.3969/j.issn.1005-8982.2019.13.015.
- [11] 洪伟涛,陈曦,朱少毅.卡巴拉汀联合奥氮平对阿尔茨海默病伴精神障碍患者的疗效及安全性研究[J].*临床精神医学杂志*, 2021, 31(5):350. DOI:10.3969/j.issn.1005-3220.2021.05.004.
- [12] 成日华.草酸艾司西酞普兰联合小剂量曲唑酮治疗难治性抑郁症的疗效分析[J].*湖南师范大学学报(医学版)*, 2021, 18(5):147–149. DOI:10.3969/j.issn.1673-016X.2021.05.043.
- [13] 李旭红,陈丽艳,施旭爱.耳穴压豆联合草酸艾司西酞普兰片治疗抑郁症临床研究[J].*新中医*, 2022, 54(8):192–195. DOI:10.13457/j.cnki.jncm.2022.08.045.
- [14] 袁荣荣,赵佳源,王小芳,等.养血清脑颗粒辅助治疗卒中后抑郁疗效和安全性的系统评价[J].*中药药理与临床*, 2021, 37(5):164–170.
- [15] 郭珍,陈娟,王辉.养血清脑丸对慢性脑供血不足患者的疗效及对认知功能的影响[J].*贵州医药*, 2021, 45(8):1281–1282. DOI:10.3969/j.issn.1000-744X.2021.08.056.
- [16] 阎萧萧,窦晓娜,宋明慧.老年卒中后抑郁症患者神经功能恢复与脂蛋白相关磷脂酶A2、同型半胱氨酸表达的关系[J].*临床和实验医学杂志*, 2022, 21(17):1884–1886. DOI:10.3969/j.issn.1671-4695.2022.17.025.
- [17] 徐倩倩,钱旭东,孙凡,等.老年脑卒中后抑郁水平与5-HT、炎症因子和BDNF水平的关系[J].*分子诊断与治疗杂志*, 2022, 14(6):1004–1007. DOI:10.3969/j.issn.1674-6929.2022.06.026.

(收稿日期:2022-12-02)

(本文编辑:沈亚芳)