

丹参多酚酸对 PAP 小鼠大脑海马组织内质网应激通路的影响

王英¹ 李筠² 田秀丽² 宋瑾² 关建兵¹ 郑瑞利²

¹ 宝鸡市人民医院神经内科, 陕西宝鸡 721000; ² 宝鸡市第二人民医院神经内科, 陕西宝鸡 721000

通信作者: 王英, Email: bjwy1968@163.com

【摘要】 目的 探讨丹参多酚酸对 PAP 小鼠脑海马组织内质网应激(ERS)通路的影响。**方法** 选择 PAP 双转基因雄性小鼠 20 只,按随机数字表法分为 PAP 小鼠模型组和丹参多酚酸给药组,每组 10 只;另选择 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 10 只作为正常对照组。丹参多酚酸给药组经尾静脉注射丹参多酚酸 0.9% 生理盐水溶液(400 g/L),剂量 $21 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;PAP 小鼠模型组和正常对照组给予等量生理盐水,3 组均持续给药 4 周。在第 4 周末进行 Morris 水迷宫实验,观察各组小鼠逃避潜伏期、第三象限停留时间(RTQ)、入水朝向角度和跨越平台次数的变化;并检测各组小鼠脑海马组织淀粉样前体蛋白(APP)阳性细胞、双链 RNA 样内质网激酶(PERK)-真核起始因子 2 α -增强子结合同源蛋白(PERK-eIF2 α -CHOP)通路相关蛋白的表达水平。**结果** PAP 小鼠模型组第 1~5 天逃避潜伏期均较正常对照组明显延长,第 5 天时有所下降趋势,但仍明显高于正常对照组($s: 58.41 \pm 2.36$ 比 28.6 ± 10.15);丹参多酚酸给药组各时间点逃避潜伏期均较 PAP 小鼠模型组明显缩短,第 5 天时达到最低水平($s: 31.97 \pm 8.36$ 比 58.41 ± 2.36)。PAP 小鼠模型组 RTQ、跨越平台次数均较正常对照组明显降低[RTQ(s): 8.27 ± 2.95 比 15.97 ± 7.33 ,跨越平台次数(次/90 s): 0.70 ± 0.47 比 2.70 ± 0.48],而入水朝向角度较正常对照组明显增大[(47.94 ± 4.68)° 比 (32.66 ± 2.55)°, $P < 0.05$]。丹参多酚酸给药组 RTQ、跨越平台次数均较 PAP 小鼠模型组明显增加[RTQ(s): 13.57 ± 1.86 比 8.27 ± 2.95 ,跨越平台次数(次/90 s): 1.60 ± 0.97 比 0.70 ± 0.47],而入水朝向角度较 PAP 小鼠模型组明显减小[(35.46 ± 6.79)° 比 (47.94 ± 4.68)°, $P < 0.05$]。PAP 小鼠模型组 APP 阳性表达率和 CHOP、p-eIF2 α 蛋白表达均较正常对照组明显增多[APP 阳性表达率: (60.44 ± 6.19)% 比 (21.05 ± 5.87)%, CHOP 蛋白表达(灰度值): 3.09 ± 0.07 比 1.46 ± 0.09 , p-eIF2 α 蛋白表达(灰度值): 0.98 ± 0.09 比 0.47 ± 0.06 ,均 $P < 0.01$],PERK、p-PERK 蛋白表达均较正常对照组减少[PERK 蛋白表达(灰度值): 0.42 ± 0.06 比 0.82 ± 0.11 , p-PERK 蛋白表达(灰度值): 0.98 ± 0.09 比 0.64 ± 0.10 ,均 $P < 0.01$];丹参多酚酸给药组 APP 阳性表达率和 CHOP、p-eIF2 α 蛋白表达水平均较 PAP 小鼠模型组明显显著减少[APP 阳性表达率: (33.09 ± 10.33)% 比 (60.44 ± 6.19)%, CHOP 蛋白表达(灰度值): 1.57 ± 0.12 比 3.09 ± 0.07 , p-eIF2 α 蛋白表达(灰度值): 0.80 ± 0.07 比 0.98 ± 0.09 ,均 $P < 0.01$],PERK、p-PERK 蛋白表达较 PAP 小鼠模型组明显增加[PERK 蛋白表达(灰度值): 0.89 ± 0.12 比 0.42 ± 0.06 , p-PERK 蛋白表达(灰度值): 0.78 ± 0.08 比 0.98 ± 0.09 ,均 $P < 0.01$]。**结论** 丹参多酚酸可能通过 PERK-eIF2 α -CHOP 通路减少 PAP 双转基因小鼠海马组织 APP 的蓄积,从而改善 PAP 双转基因小鼠的学习能力,延缓脑损伤的进程。

【关键词】 丹参多酚酸; PAP 小鼠; 海马; 内质网应激; 双链 RNA 样内质网激酶-真核起始因子 2 α -增强子结合同源蛋白通路

基金项目:“重大新药创制”科技重大专项(2012zx09101202)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.04.001

Effects of Salvianolic acid on endoplasmic reticulum stress pathway in brain hippocampus of PAP mice

Wang Ying¹, Li Jun², Tian Xiuli², Song Jin², Guan Jianbing¹, Zheng Ruili²

¹Department of Neurology, Baoji People's Hospital, Baoji 721000, Shannxi, China; ²Department of Neurology, Baoji No.2 People's Hospital, Baoji 721000, Shannxi, China

Corresponding author: Wang Ying, Email: bjwy1968@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Salvianolic acid on endoplasmic reticulum stress (ERS) pathway in brain hippocampus of PAP mice. **Methods** Twenty PAP dual transgenic male mice were selected, they were randomly divided into a PAP mice model group and a Salvianolic acid group, 10 mice in each group; another 10 SPF grade C57BL/6J male mice were selected as a normal control group. In the Salvianolic acid group, 0.9% normal saline solution of Salvianolic lyophilized injection (400 g/L) of dosage $21 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ was injected intravenously through a tail vein of mice; the PAP mice model and normal control groups were given the same amount of 0.9% normal saline, and the therapeutic course was consecutive 4 weeks in the three groups. At the end of the 4th week, the Morris water maze test was carried out to observe the changes of escape latency, the third quadrant residence time (RTQ), entry angle into water and cross-platform times of mice in each group; amyloid precursor protein (APP) positive cell expression in cerebral hippocampus of mice were detected by immunohistochemistry; Western Blot was used to detect the expression level of PER like endoplasmic reticulum kinase-eukaryon initiation factor 2 α -C/EBP homogenous protein (PERK-eIF2 α -CHOP) pathway related proteins in hippocampus of mice. **Results** The escape latency of the PAP mice model group on the 1st to 5th day were significantly longer than those of the normal control group, although a downward trend was observed on the 5th day, it was still significantly longer than that of the model group (seconds: 58.41 ± 2.36 vs. 28.60 ± 10.15); compared with the PAP mice model group, the escape latency of Salvianolic acid group was shorter at each time point, and reached the shortest level on the 5th day (seconds: 31.97 ± 8.36 vs. 58.41 ± 2.36). In the PAP mice model group, the RTQ and the number of crossing platforms were significantly lower than those in the normal control

group [RTQ (seconds): 8.27 ± 2.95 vs. 15.97 ± 7.33 , numbers of crossing platforms (frequency/90 s): 0.70 ± 0.95 vs. 2.70 ± 0.48]; the entry angle was obviously greater than that of the normal control group [$(47.94 \pm 4.68)^\circ$ vs. $(32.66 \pm 2.55)^\circ$, $P < 0.05$]. Compared with PAP mice model group, in Salvianolic acid group, the RTQ and number of crossing platform were significantly higher [RTQ (seconds): 13.57 ± 1.86 vs. 8.27 ± 2.95 , number of crossing platforms (frequency/90 s): 1.60 ± 0.97 vs. 0.70 ± 0.47], the entry angle was markedly smaller [$(35.46 \pm 6.79)^\circ$ vs. $(47.94 \pm 4.68)^\circ$, $P < 0.05$]. The positive expression rate of APP and the protein expressions of CHOP, p-eIF2 α in PAP mice model group were significantly higher than those in the normal control group [the positive rate of APP: $(60.44 \pm 6.19)\%$ vs. $(21.05 \pm 5.87)\%$, CHOP protein expression (gray value): 3.09 ± 0.07 vs. 1.46 ± 0.09 , p-eIF2 α protein expression (gray value): 0.98 ± 0.09 vs. 0.47 ± 0.06 , all $P < 0.01$], the expression of PERK and p-PERK were lower than those in normal control group [PERK (gray value): 0.42 ± 0.06 vs. 0.82 ± 0.11 , p-PERK protein expression (gray value): 0.98 ± 0.09 vs. 0.64 ± 0.10 , both $P < 0.01$]; the positive expression rate of APP and protein expressions of CHOP, p-eIF2 α in Salvianolic acid group were significantly lower than those in PAP mice model group [positive expression rate of APP: $(33.09 \pm 10.33)\%$ vs. $(60.44 \pm 6.19)\%$, CHOP protein expression (gray value): 1.57 ± 0.12 vs. 3.09 ± 0.07 , p-eIF2 α protein expression (gray value): 0.80 ± 0.07 vs. 0.98 ± 0.09 , all $P < 0.01$], while PERK and p-PERK expression were significantly higher than those in the model group [PERK (gray value): 0.89 ± 0.12 vs. 0.42 ± 0.06 , p-PERK (gray value): 0.78 ± 0.08 vs. 0.98 ± 0.09 , both $P < 0.01$]. **Conclusion** Salvianolic acid might work through the PERK-eIF2 α -CHOP pathway to reduce the retention of APP in the hippocampus tissue of PAP dual-transgenic mice, thereby the learning ability of the mice is improved, and the progression of brain injury delayed.

【Key words】 Salvianolic acid; PAP mice; Hippocampus; Endoplasmic reticulum stress; PERK-eIF2 α CHOP pathways

Fund program: "Major new drug development" Science and Technology Major Special Project (2012zx091010202)
DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.04.001

阿尔兹海默病(AD)是一种中枢神经系统退行性疾病^[1]。AD的临床表现为进行性认知功能障碍及记忆力损害,常起病隐匿,预后较差且尚无特异性治疗方法。AD的进展与内质网应激(ERS)有关^[2]。有研究表明,内质网(ER)功能障碍可导致多种蛋白发生功能改变,淀粉样前体蛋白(APP)蓄积引起神经细胞毒性介导的神经细胞凋亡,ERS在其中起到了重要的作用^[3]。双链RNA样内质网激酶(PERK)-真核翻译起始因子2 α (eIF2 α)通路作为ERS的重要通路之一,其过度激活不仅能引起神经退化,而且在AD的发病机制和记忆障碍发生中起到了关键作用^[4]。丹参多酚酸有抗炎、抗氧化应激、改善能量代谢等作用^[5],可改善认知、记忆能力,延缓AD进程^[6-7],但其机制尚未明确。本研究探讨丹参多酚酸对PAP双转基因小鼠海马组织PERK-eIF2 α -增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)通路的影响,明确丹参多酚酸治疗AD的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及给药方法:选择20只PAP双转基因小鼠,按随机数字表法分为PAP小鼠模型组和丹参多酚酸给药组,每组10只;以10只C57BL/6J小鼠为正常对照组。丹参多酚酸给药组经尾静脉注射丹参多酚酸0.9%生理盐水注射液(400 g/L),剂量为 $21 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;PAP小鼠模型组和正常对照组给予等量0.9%生理盐水,持续4周。

1.2 伦理学:本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准(审批号:2019-07-15)。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 Morris 水迷宫测试^[8]:给药第4周末进行

Morris 水迷宫测试。Morris 水迷宫测试为定位航行和空间探索实验。测试第1天,将小鼠放入水迷宫中自由游泳60 s;第2天起,将平台置于第三象限中央,每天4次,每次间隔20 s,共训练5 d,若在90 s内未找到平台,则将其引致平台休息20 s,此为定位航行实验;在定位航行实验24 h后,撤去平台,将小鼠面向池壁放入水中,记录小鼠平台所在第三象限停留时间(RTQ)、入水朝向角度和跨越平台次数。

1.3.2 用免疫组化法测定脑组织 APP 蛋白阳性表达:取小鼠大脑海马组织石蜡包埋后,切片,梯度脱蜡及水化,在3%过氧化氢(H_2O_2)室温下孵育10 min、洗涤;用10 mmol/L柠檬酸缓冲液(pH值=6)抗原修复,煮沸10 min,37℃孵育一抗APP 1 h,洗涤;37℃下孵育二抗标记生物素兔抗鼠免疫球蛋白20 min、洗涤,用链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)在室温下孵育3 min,最后用3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色。在显微镜成像系统下观察并拍摄,用IPP6.0软件分析图片灰度值。

1.3.3 用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测脑组织 PERK、CHOP、磷酸化 PERK (p-PERK)、p-eIF2 α 的蛋白表达:将NP40裂解液加入冻存的脑组织中,冰上匀浆,裂解15 min,4℃离心5 min,取上清液煮沸5 min,用二喹啉甲酸法(BCA)测定蛋白浓度,上样取等量总蛋白100 μg ,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,电转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,50 g/L脱脂奶粉封闭2 h、洗涤,4℃孵育一抗p-eIF2 α 、PERK2、CHOP、p-PERK、 β -肌动蛋白(β -actin)过夜,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,每次10 min,室温下孵育辣根

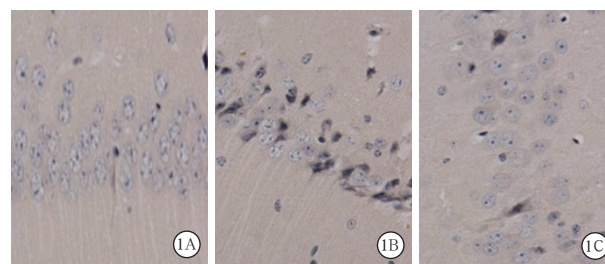
过氧化酶(HRP)相应二抗 1 h, PBS 洗涤 3 次,每次 10 min,室温下孵育化学发光(ECL)1 min,用凝胶成像系统进行扫描并分析,将所得条带灰度值与 β -actin 进行均一化处理,再以各组比值与正常对照组灰度值的比值作为目的蛋白表达量。

1.4 统计学方法:使用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行分析,符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析;计数资料以只表示,采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠空间探索能力和逃避潜伏期的比较(表 1):PAP 小鼠模型组 RTQ、跨越平台次数均较正常对照组明显减少,入水朝向角度较正常对照组明显增大;给予丹参多酚酸处理后,RTQ 和跨越平台次数均较 PAP 小鼠模型组明显增加,入水朝向角度较 PAP 小鼠模型组明显减小($P < 0.05$);丹参多酚酸给药组 RTQ 和跨越平台次数仍明显低于正常对照组($P < 0.05$);而入水朝向角度接近正常对照组水平($P > 0.05$)。PAP 小鼠模型组小鼠第 1~5 天逃避潜伏期均较正常对照组明显延长($P < 0.05$);测试第 2 天起丹参多酚酸给药组逃避潜伏期均较 PAP 小鼠模型组明显缩短,持续到测试第 5 天($P < 0.05$);测试第 4 天开始丹参多酚酸给药组逃避潜伏期已接近正常对照组水平。

2.2 各组小鼠海马组织 APP 阳性细胞表达水平比较(图 1;表 2):各组小鼠海马组织均有 APP 阳性表达;PAP 小鼠模型组 APP 阳性细胞表达显著高于正常对照组;丹参多酚酸给药组 APP 阳性细胞表达较 PAP 小鼠模型组显著降低($P < 0.05$);但丹参多酚酸给药组 APP 阳性细胞表达仍明显高于正常对照组($P < 0.05$)。



注:A 为正常对照组;B 为 PAP 小鼠模型组;
C 为丹参多酚酸给药组

图 1 各组小鼠海马组织 APP 蛋白表达情况
(免疫组化 高倍放大)

2.3 各组小鼠脑组织 PERK-eIF2 α -CHOP 通路相关蛋白表达情况比较(表 2;图 2):PAP 小鼠模型组 CHOP、p-eIF2 α 蛋白表达水平均较正常对照组明显增多,PERK、p-PERK 蛋白表达水平均较正常对照组明显减少,而丹参多酚酸给药组 CHOP、p-eIF2 α 蛋白表达水平均较 PAP 小鼠模型组明显减少,PERK、p-PERK 蛋白表达水平均较 PAP 小鼠模型组明显增多(均 $P < 0.05$)。

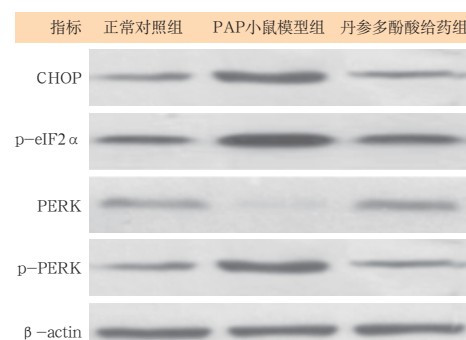


图 2 各组小鼠海马组织 CHOP、p-eIF2 α 、
PERK、p-PERK 蛋白表达水平比较

3 讨论

相关统计指出,2001 年至 2040 年欧洲、北美洲和西太平洋地区 AD 患者数将增加 1.8~2.9 倍,而

表 1 各组小鼠空间探索能力指标及不同时间点逃避潜伏期的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	RTQ (s)	入水朝向 角度($^{\circ}$)	跨越平台 次数(次/90s)	逃避潜伏期(s)				
					测试第 1 天	测试第 2 天	测试第 3 天	测试第 4 天	测试第 5 天
正常对照组	10	15.97 $\pm$ 7.33	32.66 $\pm$ 2.55	2.70 $\pm$ 0.48	58.37 $\pm$ 11.13	60.46 $\pm$ 8.89	51.75 $\pm$ 5.62	35.01 $\pm$ 8.41	28.6 $\pm$ 10.15
PAP 小鼠模型组	10	8.27 $\pm$ 2.95 ^a	47.94 $\pm$ 4.68 ^a	0.70 $\pm$ 0.47 ^a	89.14 $\pm$ 3.19 ^a	76.94 $\pm$ 4.65 ^a	86.32 $\pm$ 5.16 ^a	72.52 $\pm$ 12.21 ^a	58.41 $\pm$ 2.36 ^a
丹参多酚酸给药组	10	13.57 $\pm$ 1.86 ^{ab}	35.46 $\pm$ 6.79 ^b	1.60 $\pm$ 0.97 ^{ab}	86.56 $\pm$ 3.88 ^a	69.64 $\pm$ 5.78 ^{ab}	60.48 $\pm$ 9.11 ^{ab}	39.64 $\pm$ 7.72 ^b	31.97 $\pm$ 8.36 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与 PAP 小鼠模型组比较,^b $P < 0.05$

表 2 各组小鼠脑组织 APP 阳性细胞表达及相关蛋白表达情况比较

组别	动物数(只)	APP 阳性率(%)	CHOP(灰度值)	p-eIF2 α (灰度值)	PERK(灰度值)	p-PERK(灰度值)
正常对照组	10	21.05 $\pm$ 5.87	1.46 $\pm$ 0.09	0.47 $\pm$ 0.06	0.82 $\pm$ 0.11	0.64 $\pm$ 0.10
PAP 小鼠模型组	10	60.44 $\pm$ 6.19 ^a	3.09 $\pm$ 0.07 ^a	0.98 $\pm$ 0.09 ^a	0.42 $\pm$ 0.06 ^a	0.98 $\pm$ 0.09 ^a
丹参多酚酸给药组	10	33.09 $\pm$ 10.33 ^{ab}	1.57 $\pm$ 0.12 ^b	0.80 $\pm$ 0.07 ^{ab}	0.89 $\pm$ 0.12 ^b	0.78 $\pm$ 0.08 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与 PAP 小鼠模型组比较,^b $P < 0.05$

拉丁美洲、印度、中国等 AD 患者增加幅度将超过 300%^[9]。因此深入研究 AD 的发病机制、延缓 AD 的进程及改善患者临床症状成为目前神经领域的重要课题。近年来,随着基因技术的飞速发展,PAP 双转基因模型鼠被广泛应用于 AD 的研究中,该模型鼠可过度表达人类的 APP 和 PS1 基因,在幼年即可出现 A β 沉淀和淀粉样斑块^[10]。而 C57BL/6L 小鼠在遗传学和特定基因功能技术的研究中被广泛使用。目前对 AD 的治疗并无特效药物,中药、针灸的开发及利用在 AD 的治疗上逐渐成为研究热点。丹参具有活血化瘀、通经止痛、凉血消痈的作用,丹参提取物已被广泛应用于临床并取得了良好疗效。王富江等^[5]研究发现,丹参多酚酸对大鼠脑缺血/再灌注(I/R)损伤有明显保护作用。目前已有研究证实,丹参多酚酸可通过抑制 β 淀粉样前体蛋白裂解酶释放从而抑制 APP 在脑内沉积,改善 AD 症状,丹参多酚酸还能通过抑制活性氧簇(ROS)和促炎作用保护神经胶质细胞,改善小鼠学习能力,延缓 AD 的进展^[5, 11-12]。在 AD 神经元内质网中错误折叠的蛋白质增多,内质网功能失调,稳态失衡,便会引起 ERS,此时细胞产生应激状态,做出细胞适应性应答反应(UPR),重建 ER 稳态。蛋白激酶(PRK)样 ER 调节激酶 PERK 为参与 UPR 的 3 种受体之一。葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 是内质网的分子伴侣葡萄糖调节蛋白,当存在 ERS 时,GRP78 与 PERK 解离然后与未折叠或错误折叠蛋白结合,而 PERK 发生二聚体化和自身磷酸化,p-PERK 能使 eIF2 的 α 亚基第 51 位丝氨酸发生磷酸化,抑制基因转录,减少蛋白质合成。p-eIF2 α 能激活活化转录因子 4(ATF4),进而增加 CHOP 的表达,抑制 Bcl-2 的转录,促进细胞凋亡^[13]。有文献报道,丹参多酚酸 B 能抑制多索霉素诱导的 ERS 和心肌细胞凋亡来减轻心肌细胞功能障碍^[14]。本研究显示,与正常对照组比较,PAP 小鼠模型组逃避潜伏期明显延长,空间探索能力明显下降,APP 阳性表达水平明显增多,PERK 蛋白表达水平减少,而 p-eIF2 α 增多,CHOP 蛋白表达水平升高,说明 PAP 小鼠模型组小鼠学习能力下降,APP 蛋白蓄积可能与 PERK-eIF2 α 通路激活导致的 ERS 有关,与 Xu 等^[15]研究结果一致。本研究显示,丹参多酚酸可缩短 PAP 双转基因小鼠逃避潜伏期,降低空间探索能力和 p-PERK、p-eIF2 α 、CHOP 的蛋白表达,说明丹参多酚酸可通过抑制 PERK-eIF2 α 通路激活改善神经细胞 ERS 水平,减少 APP 生成,改善 AD 症状,延缓疾病进程。

综上所述,丹参多酚酸可能通过作用于 PERK-eIF2 α 通路抑制神经细胞 ERS,减少 PAP 双转基因小鼠海马内 APP 的蓄积,从而改善 PAP 双转基因小鼠的学习能力,延缓 AD 进程,为丹参多酚酸改善 AD 症状作用机制的研究提供新思路。然而本实验剂量暂时没有证据证明与临床等效,还将在后续实验中进一步验证和完善。

参考文献

- [1] Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years [J]. EMBO Mol Med, 2016, 8 (6): 595-608. DOI: 10.15252/emmm.201606210.
- [2] Hashimoto S, Saido TC. Critical review: involvement of endoplasmic reticulum stress in the aetiology of Alzheimer's disease [J]. Open Biol, 2018, 8 (4): pii: 180024. DOI: 10.1098/rsob.180024.
- [3] Zaouali MA, Panisello A, Lopez A, et al. GSK3 β and VDAC involvement in ER stress and apoptosis modulation during orthotopic liver transplantation [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18 (3): pii: E591. DOI: 10.3390/ijms18030591.
- [4] Ohno M. PERK as a hub of multiple pathogenic pathways leading to memory deficits and neurodegeneration in Alzheimer's disease [J]. Brain Res Bull, 2018, 141: 72-78. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2017.08.007.
- [5] 王富江, 李芮琳, 贾壮壮, 等. 注射用丹参多酚酸和血栓通注射液联合应用对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织星形胶质细胞和小胶质细胞的影响及作用机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48 (19): 4029-4036. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.020.
- [6] Habtemariam S. Molecular pharmacology of rosmarinic and salvianolic acids: potential seeds for Alzheimer's and vascular dementia drugs [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (2): pii: 1458. DOI: 10.3390/ijms19020458.
- [7] Bonaccini L, Karioti A, Bergonzi MC, et al. Effects of Salvia miltiorrhiza on CNS neuronal injury and degeneration: a plausible complementary role of tanshinones and depsides [J]. Planta Med, 2015, 81 (12-13): 1003-1016. DOI: 10.1055/s-0035-1546196.
- [8] 罗小泉, 骆利平, 陈海芳, 等. Morris 水迷宫检测大鼠记忆力方法的探讨 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21 (10): 2667-2669. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2010.10.114.
- [9] Luo XQ, Luo LP, Chen HF, et al. Study on the method for testing memory capacity in rats by morris water maze [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2010, 21 (10): 2667-2669. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2010.10.114.
- [10] Hampel H, Prvulovic D, Teipel S, et al. The future of Alzheimer's disease: the next 10 years [J]. Prog Neurobiol, 2011, 95 (4): 718-728. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2011.11.008.
- [11] Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, et al. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models [J]. Front Genet, 2014, 5: 88. DOI: 10.3389/fgene.2014.00088.
- [12] Zhang J, Xie X, Tang M, et al. Salvianolic acid B promotes microglial M2-polarization and rescues neurogenesis in stress-exposed mice [J]. Brain Behav Immun, 2017, 66: 111-124. DOI: 10.1016/j.bbi.2017.07.012.
- [13] Guo Y, Zhao Y, Nan Y, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate ameliorates memory impairment and rescues the abnormal synaptic protein levels in the frontal cortex and hippocampus in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. Neuroreport, 2017, 28 (10): 590-597. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000803.
- [14] Yu T, Paudel P, Seong SH, et al. Computational insights into β -site amyloid precursor protein enzyme 1 (BACE1) inhibition by tanshinones and salvianolic acids from Salvia miltiorrhiza via molecular docking simulations [J]. Comput Biol Chem, 2018, 74: 273-285. DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2018.04.008.
- [15] Chen RC, Sun GB, Ye JX, et al. Salvianolic acid B attenuates doxorubicin-induced ER stress by inhibiting TRPC3 and TRPC6 mediated Ca²⁺ overload in rat cardiomyocytes [J]. Toxicol Lett, 2017, 276: 21-30. DOI: 10.1016/j.toxlet.2017.04.010.
- [16] Xu TT, Zhang Y, He JY, et al. Bajijiasu Ameliorates β -amyloid-triggered endoplasmic reticulum stress and related pathologies in an Alzheimer's disease model [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46 (1): 107-117. DOI: 10.1159/000488414.

(收稿日期: 2018-10-18)