



不同浓度 $A\beta_{25-35}$ 蛋白模拟阿尔茨海默病 模型学习记忆的差异

王 凯¹, 李 强², 孙伟明¹, 徐家淳¹, 郭 威¹, 曹 杨¹, 周 震^{2*}

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150)

【摘要】 目的 不同浓度的淀粉样蛋白 $A\beta_{25-35}$ 侧脑室注射后, 观察大鼠 Morris 水迷宫学习记忆能力的变化, 探讨制备 AD 模型大鼠时 $A\beta_{25-35}$ 注射的最佳浓度。方法 雄性 SD 大鼠随机分为假手术组和模型组, 模型组 $A\beta_{25-35}$ 注射浓度分别为 2、4 和 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。参照《大鼠脑立体定位图谱》, 选取右侧侧脑室注射聚集态的 $A\beta_{25-35}$, 制备 AD 大鼠模型。造模成功后 7 d 采用 Morris 水迷宫测试各组大鼠学习记忆能力的变化。结果 平均游泳速度比较, 各组大鼠间差异无显著性 ($P > 0.05$)。逃避潜伏期结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠逃避潜伏期时间明显增加, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 模型组中, 与注射 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的大鼠比较, 注射 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 与 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 后大鼠逃避潜伏期时间明显增加, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 与 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组间比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。目标象限的活动时间与路程显示, 与假手术组比较, 模型组注射不同剂量 $A\beta_{25-35}$ 的大鼠目标象限活动时间和路程均显著减少, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 但模型组不同浓度间比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。空间探索结果显示, 与假手术组比较, 模型组注射不同剂量 $A\beta_{25-35}$ 的大鼠穿越平台次数均显著减少, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 模型组中, 与注射 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的大鼠比较, 注射 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 后大鼠穿越平台次数明显减少, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 与 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组间比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。结论 单侧侧脑室注射 $A\beta_{25-35}$ 蛋白制备大鼠 AD 模型时, 注射 $A\beta_{25-35}$ 的推荐浓度为 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

【关键词】 $A\beta_{25-35}$; 阿尔茨海默病; Morris 水迷宫; 行为学; 学习记忆能力

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 03-0014-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.03.003

$A\beta_{25-35}$ protein in different concentrations to create a rat model resembling Alzheimer's disease and the differences in their learning and memory ability

WANG Kai¹, LI Qiang², SUN Wei-ming¹, XU Jia-chun¹, GUO Wei¹, CAO Yang¹, ZHOU Zhen^{2*}

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150)

【Abstract】 Objective To observe the learning and memory ability of rats after injection of $A\beta_{25-35}$ protein in different concentrations into the lateral ventricle assessed by Morris water maze test, and to explore the optimal concentration of $A\beta_{25-35}$ in the preparation of AD model rats. **Methods** Male SD rats were randomly divided into sham

【基金项目】 高等学校博士学科点专项科研基金(20131210110012); 国家自然科学基金(81273940)。

【作者简介】 王凯, 博士研究生, 研究方向: 中医脑病方向。E-mail: wangkai19881023@163.com

【通讯作者】 周震, 医学博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 从事中西医结合防治脑病工作。E-mail: zhouzhen7681@126.com

operated group and model group. The rats of model group received $A\beta_{25-35}$ injection in concentrations of 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respectively. According to the *Rat Brain Stereotaxic Atlas*, 5 μL of aggregation of $A\beta_{25-35}$ was injected into the right lateral ventricle to establish the AD rat model. 7 days after successful modeling, Morris water maze was used to test the changes of learning and memory ability of the rats. **Results** There was no significant difference in the average swimming speed between the two groups ($P > 0.05$). The escape latency time of rats in the model group was significantly increased compared with the sham group ($P < 0.05$). In the model group, the escape latency time of rats treated with 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ $A\beta_{25-35}$ was significantly increased compared with the rats injected with 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($P < 0.05$), while there was no significant difference between rats treated with 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ $A\beta_{25-35}$ ($P > 0.05$). The activity time and distance of target quadrant of the rats injected with different concentration of $A\beta_{25-35}$ in the model group were significantly reduced compared with the sham group ($P < 0.05$), but no significant difference among the rats treated with different $A\beta_{25-35}$ concentrations ($P > 0.05$). Compared with the sham-operated group, the number of platform-crossing of rats injected with different doses of $A\beta_{25-35}$ in the model group were significantly reduced ($P < 0.05$). In the model group, the rats treated with 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ was significantly reduced compared with the group with 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ injection ($P < 0.05$). There was no significant difference between the rats injected with 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ and 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($P > 0.05$). **Conclusions** The recommended dose and concentration of $A\beta_{25-35}$ to be injected into the unilateral ventricle to establish a rat model of Alzheimer's disease is 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in a volume of 5 μL .

【Key words】 $A\beta_{25-35}$ protein; Alzheimer's disease; Morris water maze test; Behavior; Learning and memory ability

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以学习记忆障碍为主的常见中枢神经系统退行性疾病。其主要病理特征包括 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, $A\beta$) 沉积形成的老年斑、Tau 蛋白异常磷酸化形成的神经纤维缠结以及神经元的丢失^[1]。研究发现 $A\beta$ 是 AD 病理改变的核心与启动因素^[2, 3]。故近 10 多年来,大量关于 AD 的基础研究都采用了脑内注射 $A\beta$ 建立动物模型^[4]。然而在众多报道中 $A\beta$ 的配置浓度多样,参考实验时存在较难取舍的问题。因此,本研究拟通过大鼠侧脑室注射不同浓度的 $A\beta_{25-35}$ 制备 AD 模型,采用 Morris 水迷宫观察其学习记忆能力的变化,通过行为学比较得到注射建模时 $A\beta_{25-35}$ 的最佳浓度。

1 材料和方法

1.1 动物

雄性 SD 大鼠 36 只,SPF 级,体重 200 g 左右,购自维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】。

1.2 药物及试剂

$A\beta_{25-35}$ (sigma 公司,规格 1mg,纯度 $> 97\%$,批号:053M4804V)溶于生理盐水配制成浓度为 2、4 和 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 无菌恒温箱内孵育 96 h,凝聚后 4 $^{\circ}\text{C}$ 存用^[5]。

1.3 仪器

脑立体定位仪(深圳瑞沃德生命科技有限公

司);Morris 水迷宫(北京硕林苑科技有限公司);Topscanlite 动物运动轨迹记录分析系统(北京吉安得尔科技有限公司);10 μL 微量进样器(上海高鸽工贸有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 分组及模型制备

将 36 只大鼠随机分为假手术组和模型组,假手术组 6 只,模型组注射 $A\beta_{25-35}$ 浓度分别为 2、4 和 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,每组各 10 只。

10% 的水合氯醛 3 mL/kg 腹腔注射麻醉,将大鼠头部固定在脑立体定位仪上,保持前后囟同一水平,备皮,碘伏消毒,头顶部正中切口,暴露前囟,按大鼠脑立体定位图谱进行定位,在前囟点后 1.5 mm,中线右侧旁开 1.0 mm,用三棱针钻一小孔,垂直插入微量注射器,深度为 4.0 mm(可达侧脑室)。缓慢注射 5 μL (1 $\mu\text{L}/\text{min}$) 聚集态的 $A\beta_{25-35}$ 溶液,注射持续约 5 min,留针 5 min,使 $A\beta$ 充分弥散,缓慢出针(耗时 5 min)。骨科蜡封堵钻孔,双氧水消毒皮缘,常规缝皮。假手术组经同样操作,仅向侧脑室注入 5 μL 生理盐水。术后各组大鼠再连续予腹腔注射青霉素,每只 4 万 U,连续 3d,预防感染,7 d 后进行行为学检测。

1.4.2 Morris 水迷宫检测

水迷宫装置由一黑色圆柱型水池和一可移动位置的站台组成。水池高 60 cm,直径 150 cm,站台直径 10 cm,水池上空通过一个数字摄像机与计算

机相连接。在水池中注入清水,水深 23 cm,加入食用黑色素使池水变为不透明的黑色,站台表面为黑色,水面高出站台表面 2 cm。水温控制在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

定向航行实验:检测持续 5 d,每天 4 次,每次分别随机从不同象限将大鼠腹侧朝向桶壁放入水,每次入水间隔 1 min。设定时间为 90 s,若动物在 90 s 内找到站台,让其在站台上停留 10 s,若动物未找到站台,将其引导至站台上,使其停留 10 s,摄像头追踪大鼠至其上隐藏跳台或耗时 90 s 终止记录。

空间探索实验:检测第 6 天撤除隐藏跳台,选择同一象限放入各组大鼠,记录越平台区域次数。

1.4.3 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行分析处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。水迷宫数据逃避潜伏期为重复测量数据,考虑数据样本量和数据正态情况,本次分析采用广义估计方程统计,协方差矩阵选择“基于模型的估计”,并根据 QIC 和 QICC 值选择工作相关性矩阵,本次分析采用 UN 协方差结构。平均游泳速度、目标象限活动时间及路程和穿越平台次数均采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 一般情况

实验注射过程中,模型组中 $8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组共有 3 只动物死亡,解剖后死因未明,考虑与注射浓度过高有关。实验结束醒转后,各组大鼠活动自如,至水迷宫检测前模型组 $4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组共有 2 只动物死亡,解剖后发现死于肺炎或肠梗阻,详见表 1。

表 1 各组动物死亡情况

Tab.1 Death of animals in each group

组别 Groups	剂量/ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Dose	<i>n</i>	死亡数 Death
假手术组 Sham operation	-	6	0
模型组 Model	2	10	0
	4	10	2
	8	10	3

2.2 平均游泳速度

水迷宫检测不同组间大鼠平均游泳速度比较,各组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。说明各组大鼠间体质无明显差异,详见表 2。

表 2 各组大鼠平均游泳速度比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of average swim speed of the rats in each group

组别 Groups	剂量/ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Dose	<i>n</i>	目标象限速度/ mm/s Target quadrant speed
假手术组 Sham operation	-	6	174.78 ± 19.17
模型组 Model	2	10	153.46 ± 19.06
	4	8	151.46 ± 24.97
	8	7	172.95 ± 19.13

2.3 定位航行试验

2.3.1 逃避潜伏期

随着训练时间的延长,各组大鼠逃避潜伏期在不断缩短。假手术组大鼠第 1 天时间稍少于其他组,从第 2 天开始,逃避潜伏期时间明显减少,第 4 ~ 5 天逃避潜伏期趋向于平稳。注射不同剂量 $\text{A}\beta$ 的大鼠第 1 天逃避潜伏期时间要高于假手术组,且随着注射剂量的增加,逃避潜伏期有明显的延长,从第 2 ~ 5 天,逃避潜伏期逐渐减少。

各组大鼠逃避潜伏期时间进行广义估计方程分析,组别之间存在差异 ($P = 0.015$),组别 \times 时间未见交互效应。从各组大鼠逃避潜伏期时间边界均值来看,其逃避潜伏期时间假手术组 $< 2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组 $< 4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组 $< 8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组,表明随着注射 $\text{A}\beta$ 剂量的增加,大鼠的空间学习记忆能力明显减低。与假手术组比较,其他组大鼠逃避潜伏期时间明显增加,差异有显著性 ($P < 0.05$);与 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组大鼠比较, $4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组与 $8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组逃避潜伏期时间明显增加,差异有显著性 ($P < 0.05$);与 $4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组比较, $8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组逃避潜伏期时间虽然有增加,但是差异无显著性 ($P > 0.05$),详见表 3、表 4、表 5。

2.3.2 目标象限活动时间

不同组别目标象限活动时间比较。与假手术组相比,注射 $2, 4, 8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组大鼠目标象限活动时间有明显的降低 ($P < 0.05$); $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组、 $4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组、 $8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组之间比较,组间差异无显著性 ($P > 0.05$),详表 6。

2.3.3 目标象限路程

不同组别目标象限路程比较。与假手术组相比, $2, 4, 8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组大鼠目标象限路程显著减少 ($P < 0.05$); $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组、 $4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组、 $8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组之间比较,组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),详表 7。

2.4 空间探索试验

不同组别 Morris 水迷宫穿越平台次数比较,与假手术组比较,2、4、8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组穿越平台次数均有显著减少 ($P < 0.05$);与 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组比较,4、8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

μL 组穿越平台次数显著减少 ($P < 0.05$);而 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组与 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组比较,差异无显著性 ($P > 0.05$),详见表 8。

表 3 各组大鼠逃避潜伏期时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of escape latency time among the rats in each group

组别 Groups	剂量/ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Dosage	逃避潜伏期/s Escape latency/s				
		第 1 天 1st day	第 2 天 2nd day	第 3 天 3rd day	第 4 天 4th day	第 5 天 5th day
假手术组 Sham operation	-	35.28 \pm 9.46	17.35 \pm 5.16	16.22 \pm 2.43	13.72 \pm 2.78	11.90 \pm 3.41
模型组 Model	2	41.41 \pm 10.73	28.48 \pm 10.28	20.37 \pm 5.09	16.48 \pm 3.68	14.20 \pm 3.87
	4	48.80 \pm 14.73	32.10 \pm 7.90	24.78 \pm 8.67	19.41 \pm 6.28	18.14 \pm 4.42
	8	51.49 \pm 13.96	42.94 \pm 18.73	25.48 \pm 11.51	21.84 \pm 6.72	14.85 \pm 4.93

表 4 广义估计方程模型效应检验

Tab.4 Effect test of the generalized estimation equation model

	Wald 卡方值 Wald chi-square value	自由度 Variance	显著性 Sig.
(截距) (Intercept)	534.551	1	0.000
组别 Groups	10.427	3	0.015
时间 Time	229.352	1	0.000
组别 \times 时间 Groups \times Times	2.034	3	0.565

表 5 各组逃避潜伏期时间边界均值

Tab.5 Boundary values of the mean escape latency time of each group

Groups	平均值 Mean	标准错误 Standard error	95% Wald 置信区间 Wald 95% confidence interval	
			下限 Lower limit	上限 Upper limit
1.00	18.456	2.487	13.580	23.332
2.00	24.702	2.652	19.503	29.899
3.00	29.030	2.469	24.189	33.870
4.00	32.751	2.456	27.935	37.565

表 6 各组大鼠目标象限活动时间比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.6 Comparison of the movement time of rats in the target quadrant

组别 Groups	剂量/ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Doses	n	目标象限时间/s Target quadrant time/s
假手术组 Sham operation	-	6	35.65 \pm 12.56
模型组 Model	2	10	23.06 \pm 8.17 *
	4	8	19.70 \pm 8.62 *
	8	7	20.63 \pm 7.64 *

注:vs 假手术组, * $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$, vs. the sham operation group.

表 7 各组大鼠目标象限路程比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 7 Comparison of target quadrant distance of the rats in each group

组别 Groups	剂量/ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Doses	n	目标象限路程/mm Target quadrant distance/mm
假手术组 Sham operation	-	6	4381.66 \pm 754.11
模型组 Model	2	10	3218.94 \pm 1003.80 *
	4	8	2636.22 \pm 1240.06 *
	8	7	2971.11 \pm 769.95 *

注:vs 假手术组, * $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$, vs. the sham operated group.

表 8 各组大鼠穿越平台次数比较($\bar{x} \pm s$)

Tab. 8 The number of crossing the platform the rats in each group

组别 Groups	剂量/ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Doses	n	穿越平台次数/次 No. Through the platform
假手术组 Sham operation	-	6	6.00 \pm 0.71
模型组 Model	2	10	4.10 \pm 0.74 *
	4	8	2.86 \pm 1.22 **
	8	7	2.43 \pm 0.54 **

注:vs 假手术组, * $P < 0.05$; vs 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组, # $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$, vs. the sham operated group. # $P < 0.05$, vs. the 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ group.

3 讨论

随着人口老龄化速度的加快,AD 的患病人数逐年上升,其发病进程与临床症状给社会和家庭均带来了极大的经济及救治负担。因此,防治 AD 已成为我国亟待解决的公共和卫生问题。为了更好的研究 AD 的发病机制和有效治疗药物的作用机制,良好的模型制备是必不可少的。虽然 AD 的发病机制目前尚不明确,但 A β 的聚集是 AD 发生和发展的关键因素^[6]。脑内发挥毒性作用的 A β 主要分为 A β_{1-40} 和 A β_{1-42} 两种。本研究中所用的 A β_{25-35} 为人工合成,但代表了体内蛋白酶分解 APP (amyloid precursor protein, APP) 产生 A β 蛋白过程中的最短 A β 片段,且几乎与 A β_{1-42} 具有同等的毒性作用^[7]。目前围绕 A β 的毒性作用,转基因动物模型是研究 AD 的热点,但同样也存在造模程序复杂,制备费用昂贵和传代缺乏稳定性^[8,9] 的不足。因而采用具有神经毒性的 A β 片段注射到大鼠侧脑室、基底核或海马等部位以模拟 AD 发病的动物模型同样得到广泛应用。本团队既往研究发现,采用侧脑室注射 A β_{25-35} 可造成大鼠学习记忆能力减退,海马神经元丢失和突触超微结构损伤^[10,11],其中配置合理浓度的注射用 A β 是实验成功的先决条件。

Morris 水迷宫是目前公认的评价大鼠行为学的

方法。该实验原理表明:大鼠可在短时间训练后出于本能在水箱中搜寻到藏匿于水下的逃避平台。利用水迷宫以外的结构线索找到平台所在位置的过程,需要海马体主要负责学习和记忆存储。整个过程涉及到空间定位相关的视觉信息的收集,处理加工再整理,记忆和取出等复杂环节。该检测方法主要用来考察大鼠的空间记忆、工作记忆和空间鉴别能力。针对水迷宫的统计方法一般多选用重复测量方差分析,但是重复测量方差分析要求数据格式比较严格,一般情况下,数据离散度较大,正态性比较差,本次实验研究应用 GEE (广义估计方程) 统计方法进行数据处理,GEE 为半参数估计方法,适用于存在缺失值且正态性差的数据,能够更好的评估数据的 error (标准误) 和灵活的选取协方差结构,因此本次数据分析选用 GEE 进行分析。

本次实验研究结果表明:手术后各组间大鼠平均游泳速度比较,组间无显著差异,说明注射对各组间大鼠的体质无显著影响。定位航行试验显示,随着训练时间的延长,各组大鼠逃避潜伏期不断缩短。注射不同剂量 A β_{25-35} 的大鼠逃避潜伏期时间明显高于假手术组,且随着注射剂量的增加,逃避潜伏期有明显的延长,其中 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组效果更为明显。目标象限活动时间和路程显示,与假手术组比较,注射不同剂量 A β_{25-35} 的大鼠目标象限活动时间

和路程均显著减少。空间探索试验发现,与假手术组比较,注射不同剂量 $A\beta_{25-35}$ 的大鼠穿越平台次数显著减少,且较 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组, $4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 $8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 组减少更为显著。提示单侧侧脑室注射 $A\beta_{25-35}$ 能够成功制备大鼠 AD 模型,综合上述实验结果并结合模型的稳定性和死亡率考虑,注射 $A\beta_{25-35}$ 的推荐浓度与体积为 $4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 $5 \mu\text{L}$ 。

参考文献:

[1] Ramirez-Bermudez J. Alzheimer's disease; critical notes on the history of a medical concept[J]. Arch Med Res, 2012, 43(8): 595-599.

[2] Hardy J, SelkoeDJ. The amyloid hypothesis Alzheimer's disease; progress and problems on the road to therapeutics[J]. Science, 2002, 297(5580): 353-356.

[3] Masters CL, SelkoeDJ. Biochemistry of amyloid β -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease [J]. Cold Spring HarbPerspect Med, 2012, 2(6): a006262.

[4] 苏芮,韩振蕴,范吉平. 脑内注射 β -淀粉样蛋白致痴呆动物模型的效度评价及中医内涵的探索[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(8): 2741-2743.

[5] Maurice T, Su TP, Privat A. Sigma 1 ($\sigma 1$) receptor agonists and neurosteroids attenuate β_{25-35} - amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism [J].

Neuroscience, 1998, 83(2): 413-428.

[6] 徐萌,杨延莲,王琛. Beta 淀粉样多肽的高分辨结构解析[J]. 东南大学学报: 医学版, 2011, 30(1): 228-240.

[7] Frozza RL, Horn AP, Hoppe JB, et al. A comparative study of beta-amyloid peptides Abeta1-42 and Abeta25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures [J]. Neurochem Res, 2009, 34(2): 295-303.

[8] Mao P, Reddy PH. Aging and amyloid beta-induced oxidative DNA damage and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: implications for early intervention and therapeutics[J]. BiochimBiophysActa (BBA) - Mol Basis Dis, 2011, 1812(11): 1359-1370.

[9] Xu SP, Yang YY, Xue D, et al. Cognitive-enhancing effects of polygalasaponinhydrolysate in $A\beta$ (25-35) induced amnesic mice [J]. Evidence-based ComplAltern Med, 2010, 2011: 839720-839720.

[10] 王凯,张琳琳,宋宛珊,等. 益肾化浊方对阿尔茨海默病模型大鼠海马区 BDNF 及其受体 TrkB 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5): 111-114.

[11] 宋宛珊,王红秀,张玉莲,等. 益肾化浊方对 AD 大鼠海马突触形态及 Ca^{2+} 相关激酶表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(15): 97-101.

[修回日期] 2016-08-19