

• 基础研究 •

陈皮提取物对 APP/PS-1 双转基因阿尔茨海默病小鼠学习记忆功能的影响

颜仁梁 李 威

【摘要】 目的 探讨陈皮提取物对 APP/PS-1 双转基因阿尔茨海默病 (AD) 小鼠学习记忆功能的影响。**方法** 选用 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠 16 只, 随机分为模型对照组和供试品组, 8 只/组, 另取 8 只 C57 小鼠为正常对照组, 正常对照组和模型对照组分别灌胃等量的生理盐水, 供试品组灌胃陈皮提取物的生理盐水溶解液, 灌胃体积为 10 mL/kg, 1 次/d, 连续 18 d。第 11 天到第 16 天, 进行 Morris 水迷宫的定位航行实验及空间探索实验。第 17 天到第 18 天, 进行 5 min 避暗实验。**结果** 在 Morris 水迷宫实验中, 与正常对照组比较, 模型对照组定位航行第 2 天、第 3 天、第 5 天的潜伏期增加 ($P < 0.05$); 与模型对照组比较, 供试品组第 5 天的潜伏期降低 ($P < 0.05$)。空间探索阶段, 各组的目标象限路程百分比、时间百分比及站台穿越次数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在避暗实验中各组的错误潜伏期、错误次数及错误率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 陈皮提取物对 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠的空间学习、记忆能力有一定的改善作用。

【关键词】 陈皮提取物; APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠; Morris 水迷宫实验; 避暗实验

【中图分类号】 R9 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2024)03-0107-04

Effect of Citri Reticulatae Pericarpium extracts on the learning and memory function of APP/PS-1 double transgenic Alzheimer's disease mice

YAN Renliang, LI Wei

Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou, Guangdong 510000, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of Citri Reticulatae Pericarpium extracts on the learning and memory ability of APP/PS-1 double transgenic Alzheimer's disease (AD) mice. **Methods** A total of 16 APP/PS-1 double transgenic AD mice were selected. They were randomly divided into model control group and test group (Citri Reticulatae Pericarpium extracts, 986 mg/kg), eight animals per group, another eight C57 mice were selected as the normal control group. Normal control group and model control group were respectively given the same amount of normal saline, the test group was given normal saline solution of Citri Reticulatae Pericarpium extracts. The volume of intragastric administration was 10 mL/kg once a day for 18 consecutive days. From day 11 to day 16, the positioning navigation experiment and space exploration experiment of Morris water maze were carried out. From the 17th to the 18th day, 5 min dark avoidance test was carried on. **Results** In the Morris water maze experiment, compared with the normal control group, the incubation period of the model control group was increased on the 2nd, 3rd and 5th day of positioning navigation ($P < 0.05$). Compared with the model control group, the incubation period of the test group on day 5 was decreased ($P < 0.05$). During the space exploration phase, there was no statistically significant difference ($P > 0.05$) in the target quadrant distance percentage, time percentage, and platform crossing frequency among the groups. There were no significant differences in error latency, error times and error rate among all groups in the dark avoidance experiment ($P > 0.05$). **Conclusion** Citri Reticulatae Pericarpium extracts can improve the spatial learning and memory ability of APP/PS-1 double transgenic AD mice.

【Key words】 Citri Reticulatae Pericarpium extracts; APP/PS-1 double transgenic AD mice; Morris water maze experiment; dark avoidance experiment

老年痴呆, 又称为阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD), 是以记忆、认知功能障碍为主要特

征的中枢神经系统退行性疾病^[1]。有文献报道, 陈皮中的川陈皮素和橘皮素在一些神经退行性疾病和

基金项目: 广东省医学科研基金项目 (A2023416); 广东食品药品职业学院自然科学项目 (2022ZR04)

作者单位: 广东食品药品职业学院, 广州 510000

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.03.033

神经系统疾病中有良好的神经保护作用，可以减轻胆碱能缺陷，减少 β 淀粉样蛋白 ($A\beta$) 的异常积累，逆转 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体功能减退，抑制 tau 蛋白的过度磷酸化，增强脑啡肽酶水平，调节信号级联反应，改善认知缺陷等^[2-5]，提示陈皮在治疗老年痴呆症方面具有很好的潜力。本实验研究陈皮提取物对 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠行为学的影响，为进一步探讨其治疗老年痴呆的作用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

陈皮提取物为广东食品药品职业学院提供的黑色干膏固体（采用 5 年的新会陈皮 10 倍水提取两次，合并滤液浓缩干燥成干膏。提取率为 40%），批号：CP202212；0.9% 氯化钠注射液由安徽丰原药业股份有限公司淮海药厂生产，批号：220802135。陈皮提取物使用前用生理盐水配成 98.6 mg/mL 溶液。主要仪器：JEA3001 型电子天平（上海浦春计量仪器有限公司）；JLBehv-MWMG 水迷宫视频分析系统（上海吉量软件科技有限公司）；JLBehv-PAM 避暗视频分析系统（上海吉量软件科技有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及给药 7 月龄 SPF 级雌性 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠 16 只，同龄 SPF 级雌性 C57 小鼠 8 只，购自广东省医学实验动物中心，动物生产许可证号为 SCXK（粤）2022-0002，动物合格证号 44007200112292、44007200112293，伦理审查编号：B202212-10。动物饲养在 SPF 级动物房，实验动物使用许可证号：SYXK（粤）2022-0002，动物实验证明号：00334573。检疫 3 d，适应性饲养 7 d，APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠 16 只，随机分为模型对照组、供试品组（986 mg/kg），另取 7 月龄 SPF 级 C57 小鼠 8 只为正常对照组。正常对照组和模型对照组分别灌胃等量的生理盐水（0.9% 氯化钠注射液）；供试品组灌胃陈皮提取物的生理盐水溶解液（98.6 mg/mL），灌胃体积为 10 mL/kg，1 次/d，连续给药 18 d。

1.2.2 常规项目观察与检测 实验期间，观察动物的存活、体形、被毛、皮肤、粪便、肌肉张力、步态、精神、呼吸等状况；每周称重 1 次，实验结束前称重。

1.2.3 Morris 水迷宫实验 在实验的第 9 天和第 10 天，将动物放入水迷宫中进行适应性训练。第

11 到第 15 天，动物进行 5 d 的定位航行实验，此阶段平台放置于一个固定位置，手抓小鼠背部，将其面向池壁在 4 个象限的固定入水点放入水中，记录动物的游泳轨迹、从入水到站上平台的时间（逃避潜伏期）及游泳路程。如果实验动物在 90 s 内未能登陆平台，则记录其逃避潜伏期值为 90 s，然后由实验人员将实验动物牵引至平台，停留 20 s；如动物能在 90 s 内登陆平台，则让动物在平台继续停留 5 s 后放回鼠笼。如此逆时针重复完成 4 个象限。第 16 天，进行空间探索实验。此阶段需撤去平台，手抓动物背部皮肤，使其面向池壁在离平台最远的象限入水点入水，记录 90 s 内动物在平台象限数据占总路程、总时间的百分比及穿越平台次数。

1.2.4 避暗实验 在第 17 天早上进行训练，将动物在避暗仪中适应 3 min 后背向避暗仪洞口放入明室，同时启动计时器，暗室电压调为 40 V。动物穿过洞口进入暗室受到电击时，计时器自动停止，此时间即为潜伏期，训练 5 min，记录 5 min 内电击次数。第 18 天早上进行重复实验，记录潜伏期、5 min 内的电击次数（错误次数）、进入暗室的动物数（错误率）。

1.2.5 统计学分析 计量资料以均数 \pm 标准差表示，应用 SPSS 21.0 软件进行分析，体重、Morris 水迷宫潜伏期采用重复测量资料方差分析；其余指标若方差齐、满足正态性，则采用方差分析；若数据方差不齐或不满足正态性，采用非参数检验分析。检验水平 $\alpha=0.05$ （双侧）。

2 结果

2.1 常规项目观察结果

实验期间，各组动物无明显异常，无动物死亡。各组动物各时间点体重差异无统计学意义（ $P>0.05$ ），见表 1。

表 1 实验期间各组动物体重 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	体重/g		
	第 1 周	第 2 周	实验结束
正常对照组	29.1 \pm 0.9	29.5 \pm 1.7	29.2 \pm 0.7
模型对照组	30.9 \pm 3.5	31.1 \pm 2.8	30.9 \pm 2.5
供试品组	30.5 \pm 4.9	30.4 \pm 4.6	30.3 \pm 4.2

注：采用重复测量数据方差分析。

2.2 Morris 水迷宫实验结果

在 1~5 d 的定位航行实验中，与正常对照组比较，模型对照组定位航行第 2 天、第 3 天、第 5 天的潜伏期增加（ $P<0.05$ ）；与模型对照组比较，

供试品组第 5 天的潜伏期降低 ($P<0.05$)。空间探索阶段, 各组的目标象限路程百分比、时间百分比

及站台穿越次数差异无统计学意义 ($P>0.05$), 结果见表 2, 3。

表 2 Morris 水迷宫定位航行潜伏期结果 ($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	潜伏期/s				
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常对照组	79.6 \pm 15.4	75.6 \pm 14.0	65.1 \pm 22.5	64.3 \pm 16.1	48.6 \pm 27.2
模型对照组	85.8 \pm 8.0	88.2 \pm 5.0 ^①	88.3 \pm 4.1 ^①	81.8 \pm 19.1	81.0 \pm 16.6 ^①
供试品组	89.6 \pm 1.1	85.5 \pm 12.7	77.0 \pm 25.1	70.4 \pm 26.9	52.4 \pm 33.1 ^②

注: 采用重复测量数据方差分析。与正常对照组比较, ① $P<0.05$; 与模型对照组比较, ② $P<0.05$ 。

表 3 Morris 水迷宫空间探索结果 ($n=8, \bar{x}\pm s$)

组别	目标象限路程百分比/%	目标象限时间百分比/%	站台穿越次数
正常对照组	29.4 \pm 9.0	28.8 \pm 8.7	2.1 \pm 1.7
模型对照组	23.7 \pm 10.3	24.3 \pm 10.7	0.9 \pm 0.8
供试品组	28.9 \pm 4.4	28.3 \pm 3.6	0.9 \pm 0.8

注: 目标象限路程百分比、目标象限时间百分比采用方差分析, 组间比较采用 LSD 法; 站台穿越次数采用非参数检验分析。

2.3 避暗实验结果

各组的错误潜伏期、错误次数及错误率差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 结果见表 4、表 5。

表 4 避暗实验第 1 天结果 ($n=8$)

组别	潜伏期 (s, $\bar{x}\pm s$)	错误次数 (次, $\bar{x}\pm s$)	错误率/%
正常对照组	14.0 \pm 12.0	2.4 \pm 0.9	100
模型对照组	23.3 \pm 20.5	3.3 \pm 1.0	100
供试品组	15.9 \pm 10.7	3.1 \pm 0.8	100

注: 采用非参数检验分析。

表 5 避暗实验第 2 天结果 ($n=8$)

组别	潜伏期 (s, $\bar{x}\pm s$)	错误次数 (次, $\bar{x}\pm s$)	错误率/%
正常对照组	204.6 \pm 114.9	0.5 \pm 0.5	50
模型对照组	246.1 \pm 109.5	0.3 \pm 0.5	25
供试品组	297.7 \pm 6.6	0.1 \pm 0.4	12.5

注: 采用非参数检验分析。

3 讨论

阿尔茨海默病 (AD) 是一种与年龄相关的神经退行性疾病, 其特征是记忆力逐渐丧失和高级认知功能恶化, 由于 AD 患者认知能力下降, 其需求的表达、预期行为的实施以及抑制自身行为的能力均较常人低, 常出现不合时宜的语言与举动^[6]。中药的多组分、多靶点及协同调节等特点, 在防治老年痴呆症方面具有天然的优势^[7-8]。多数医家认为 AD

是肾虚髓亏为本, 痰瘀阻滞为标, 五脏失调, 脑髓失用^[9]。有研究分析了近 25 年 (1990 年至 2015 年) 治疗老年痴呆的传统中医方剂配伍规律, 发现治疗痰浊蒙窍型和痰瘀互结型老年痴呆常用药中均出现了陈皮^[10]。

本研究采用 Morris 水迷宫实验和避暗实验研究陈皮提取物对 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠的空间学习、记忆等认知水平的影响, 实验结果提示陈皮提取物对 APP/PS-1 双转基因 AD 小鼠的空间学习、记忆能力有一定的改善作用。在空间探索实验中, 各组的目标象限路程百分比、时间百分比及站台穿越次数差异无统计学意义, 很可能与给药时间偏短有关, 适当延长给药时间可能有利于小鼠的空间探索实验。

在药物筛选中, 避暗实验因其方法简单、指标便于观察、实验周期短被广泛地应用于动物学习和记忆能力的测试, 经典的避暗实验是在 1 次训练后进行正式测试。本研究采用经典的避暗实验进行了单次测试研究, 但实验结果显示 3 组小鼠的错误潜伏期、错误次数及错误率差异均无统计学意义, 很可能与避暗反应实验测试次数有关, 单次避暗实验测试敏感度还不能满足统计学的要求, 原因可能是存在着一些无法消除的环境因素的干扰, 例如反应箱中残留的动物气味, 测试时实验动物发出的声音等影响动物行为表现的因素, 具体原因有待下一步深入研究。

参考文献

- [1] SRIPANIDKULCHAI B. Benefits of aged garlic extract on Alzheimer's disease: Possible mechanisms of action [J]. Exp Ther Med, 2020, 19 (2): 1560-1564.
- [2] 王秀琪, 丁晓波, 曾明. 川陈皮素对阿尔茨海默病的神经保护作用 [J]. 重庆医学, 2014, 43 (22): 2948-2951.
- [3] 张红蕊, 王耕银, 崔昌萌, 等. 川陈皮素对糖尿病大鼠认知功能障碍的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38 (18):

4516-4519.

- [4] KIMURA J, SHIMIZU K, KAJIMA K, et al. Nobiletin reduces intracellular and extracellular β -amyloid in iPS cell-derived alzheimer's disease model neurons [J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41 (4): 451-457.
- [5] ONOZUKA H, NAKAJIMA A, MATSUZAKI K, et al. Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and A β pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 326 (3): 739-744.
- [6] 彭海峰, 潘友让, 凌迎春. 老年阿尔茨海默病患者挑战行为与

认知障碍的关系及影响因素研究 [J]. 现代实用医学, 2024, 36 (2): 196-198.

- [7] 刘改枝, 朱奕林, 许杜娟, 等. 山药活性成分抗老年痴呆症的网络药理学作用机制探讨 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32 (3): 374-382.
- [8] 李林, 张兰. 中药治疗阿尔茨海默病的作用特点 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39 (8): 816-828.
- [9] 朱晓奕, 洪庆, 徐卫东, 等. 经典方玉屏风散防治老年痴呆症探讨 [J]. 亚太传统医药, 2018, 14 (1): 74-76.
- [10] 欧娟. 近 25 年治疗老年痴呆方剂的配伍规律研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.

(上接第 89 页)

究可通过扩大样本量、延长观察时间等方法, 更全面地评估理气通便贴在气滞型便秘患者中的应用效果。

参考文献

- [1] 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组. 中国慢性便秘诊治指南 (2013, 武汉) [J]. 胃肠病, 2013, 33 (10): 605-612.
- [2] CHAN A O, LAM K F, HUI W M, et al. Validated questionnaire on diagnosis and symptom severity for functional constipation in the Chinese population [J]. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2005, 22 (5): 483-488.
- [3] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 功能性便秘中西医结合诊疗共识意见 (2017 年) [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26 (1): 9.
- [4] 刘亚梅. 功能性便秘病证关系的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2009.
- [5] 刘丽丽. 莫沙必利与乳果糖联合用药治疗功能性便秘的效果观察 [J]. 中国冶金工业医学杂志, 2020, 37 (5): 571.
- [6] 丁照亮. 对排便推进力不足型便秘的认识及针刺治疗 [J]. 吉林中医药, 2011, 31 (5): 418-420.
- [7] 中华中医药学会脾胃病分会. 便秘中医诊疗专家共识意见 (2017) [J]. 中医杂志, 2017, 58 (15): 1345-1350.
- [8] 沈雪勇. 经络腧穴学 [M]. 北京: 中国中医药出版, 2016.
- [9] 王福民, 孙思涵, 银子涵, 等. 穴位贴敷治疗功能性便秘的选穴用药规律挖掘 [J]. 中国针灸, 2021, 41 (10): 1166-1170.
- [10] 李玉锋, 姜巍, 刘阳, 等. 理气通便方治疗功能性便秘 (肠道气滞证) 的随机双盲安慰剂对照临床研究 [J]. 世界中西医结合杂志, 2021, 16 (10): 1900-1904.
- [11] 汤水华, 李思汉, 林翔英, 等. 理气通便方对功能性便秘气滞证大鼠脑肠肽的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44 (7): 615-624.
- [12] 康年松, 钱蓉, 张娟娟, 等. 小儿推拿联合穴位贴敷治疗儿童功能性便秘 75 例临床观察 [J]. 中医儿科杂志, 2021, 17 (2): 79-82.
- [13] 刘起华, 文谨, 王菲, 等. 中药穴位给药应用研究概述 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17 (2): 104-106.
- [14] JING C. Curative effect of Ziwu Liuzhu theory-based acupoint application of Runchang Gao on constipation in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2017, 25 (24): 2230.
- [15] 张微, 李瑛, 刘丽莎, 等. 电针大肠俞募穴对功能性便秘小鼠结肠组织 GDNF 表达的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2015, 31 (5): 475-479.
- [16] 袁维运, 杨伟宁, 朱芳红. 针灸配合神阙穴中药贴敷促进胃癌患者术后胃肠功能恢复临床研究 [J]. 陕西中医药大学学报, 2021, 44 (6): 93-96.
- [17] 尉耘翠, 都赛飞, 张俐, 等. 微生态制剂治疗儿童功能性便秘的临床用药现状调查 [J]. 中南药学, 2020, 18 (8): 1387-1392.
- [18] 朱晓龙. 穴位贴敷疗法的历史沿革及现代研究 [J]. 贵阳中医学院学报, 2010, 32 (2): 1-3.
- [19] 万佳丽. 穴位贴敷治疗儿童便秘研究的文献计量学分析 [J]. 中外医学研究, 2020, 18 (4): 164-166.
- [20] 易华云, 周荔, 廖莉, 等. 中药敷贴治疗便秘观察与护理 [J]. 实用中医药杂志, 2016 (12): 1220-1221.
- [21] 王钧冬, 林智, 谢红艳, 等. 中药穴位贴敷疗法治疗慢性功能性便秘的应用价值 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19 (68): 236, 240.
- [22] 陈慧, 李春平, 何炎琴, 等. 穴位按摩联合生物反馈对气虚排便推进力不足型便秘患者的影响 [J]. 护理学报, 2020, 27 (21): 73-76.
- [23] 留美婷. 电针治疗功能性便秘的临床疗效观察 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2014.