

的实验研究[J]. 成都中医药大学学报, 2010, 33(3): 40-44.

[9] 沈涛, 贾波, 郭力, 等. 黄连吴茱萸配伍对大鼠高脂血症模型肝脏组织 ABCA1 基因表达的影响[J]. 成都中医药大学学报, 2011, 34(1): 49-51.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 285.

[11] 吴江明, 栾连军, 程翼宇. 胶束毛细管电泳法同时测定黄连-吴茱萸药对中 5 种生物碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(3): 325-328.

[12] Zhang Q, Wang G J, A J Y, et al. Application of GC/MS-based metabonomic profiling in studying the lipid-regulating effects of *Ginkgo biloba* extract on diet-induced hyperlipidemia in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30 (12): 1674-1687.

[13] Wang H, Zhang Z S, Guo Y, et al. Hawthorn fruit increases the antioxidant capacity and reduces lipid peroxidation in senescence-accelerated mice [J]. *Eur Food Res Technol*, 2011, 232(5): 743-751.

[14] Espenshade P J, Hughes A L. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes[J]. *Annu Rev Genet*, 2007, 41: 401-427.

[15] Kourounakis A P, Katselou M G, Matralis A N, et al. Squalene synthase inhibitors: An update on the search for new anti-hyperlipidemic and antiatherosclerotic agents [J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(29): 4418-4439.

[16] Vanmierlo T, Rutten K, van Vark-van der Zee L C, et al. Cerebral accumulation of dietary derivable plant sterols does not interfere with memory and anxiety related behavior in Abcg5^{-/-} mice[J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2011, 66(2): 149-156.

[17] Miettinen T A, Nissinen M, Lepäntalo M, et al. Non-cholesterol sterols in serum and endarterectomized carotid arteries after a short-term plant stanol and sterol ester challenge [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2011, 21(3): 182-188.

[18] Altmann S W, Davis H R Jr, Zhu L J, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption [J]. *Science*, 2004, 303(5661): 1201-1204.

[19] Ge L, Wang J, Qi W, et al. The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1[J]. *Cell Metab*, 2008, 7(6): 508-519.

[20] Lee R G, Willingham M C, Davis M A, et al. Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates [J]. *J Lipid Res*, 2000, 41(12): 1991-2001.

[21] 王丹, 康健. 中药剂量与药效的相关性研究[J]. 河南中医, 2013, 33(7): 1158-1159.

益智聪明汤对 Aβ₂₅₋₃₅ 致阿尔茨海默病小鼠 tau 蛋白磷酸化的影响

齐越^{1,2}, 姜鸿³, 李纪彤³, 王光函¹, 王亚斌², 秦文艳¹, 李昭², 刘小虎¹, 向绍杰¹, 贾冬^{2*}

(1. 辽宁中医药大学附属第二医院, 辽宁 沈阳 110034; 2. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110847; 3. 辽宁中医药大学附属第三医院, 辽宁 沈阳 110032)

摘要: **目的** 观察益智聪明汤(人参、茯苓、制首乌, 等)对 β-淀粉样蛋白 Aβ₂₅₋₃₅ 致阿尔茨海默病模型小鼠磷酸化 tau 蛋白表达的影响及其作用机制。 **方法** 选用 SPF 级 ICR 小鼠 60 只, 随机分为 6 组, 每组 10 只, 假手术组左侧海马单次注射生理盐水 3 μL, 模型组、盐酸多奈哌齐组及益智聪明汤各组分别左侧海马注射 Aβ₂₅₋₃₅ 3 μL (3 nmol/L), 除假手术组及模型组外, 其余各组分别灌胃给予盐酸多奈哌齐和益智聪明汤。给药 15 d 后, 免疫组化测定 tau 蛋白磷酸化位点的表达; Western blot 检测海马区 PI3K/AKT/GSK3β (磷脂酰肌醇-3-羟激酶/蛋白激酶 B/糖原合成酶激酶 3β) 的蛋白表达。 **结果** 益智聪明汤可减少 tau (Thr231) 及 tau (Ser404) 磷酸化表达水平, 增加 PI3K、AKT 及 GSK3β 磷酸化表达。 **结论** 益智聪明汤可抑制 Aβ₂₅₋₃₅ 致阿尔茨海默病小鼠 tau 蛋白磷酸化位点的表达, 其机制可能是通过 PI3K/Akt/GSK3β 信号途径。

关键词: 益智聪明汤; 阿尔茨海默病; tau; PI3K; AKT; GSK3β

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)10-1999-05

收稿日期: 2017-04-18

基金项目: 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室开放基金 (zyzx1513)

作者简介: 齐越 (1977—), 女, 副研究员, 博士, 从事中药防治神经系统变性疾病研究。Tel: 13514214289, E-mail: lnzyxyqy2003@163.com

* **通信作者:** 贾冬 (1963—), 男, 研究员, 主任中药师, 博士生导师, 从事中药复方配伍、新药药效学和安全性评价研究。E-mail: jiadg2003@126.com

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.10.002

Yizhi Congming Decoction attenuates learning and memory deficits through reducing tau hyperphosphorylation in Aβ-induced AD mice

QI Yue^{1,2}, JIANG Hong³, LI Ji-tong³, WANG Guang-han¹, WANG Ya-bin², QIN Wen-yan¹,
LI Zhao², LIU Xiao-hu¹, XIANG Shao-jie¹, JIA dong^{2*}

(1. The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China; 2. Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China; 3. The Third Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the effects of Yizhi Congming Decoction (*Ginseng Radix et Rhizoma, Poria, Polygoni multiflori Radix praeparata, etc.*) on learning and memory deficits through reducing tau hyperphosphorylation in Aβ-induced AD mice and its mechanism of action. **METHODS** Sixty ICR mice were randomly and equally assigned into six groups. Sham group (injection of 3 μL normal saline into left hippocampus), model group, donepezil group and each group of Yizhi Congming Decoction (injection of 3 μL Aβ₂₅₋₃₅ into left hippocampus). Donepezil group and three treatment groups were gavaged with donepezil and Yizhi Congming Decoction. After 15 days of administration, immunohistochemistry was used to observe the expressions of Ser404 and Thr231. Western blot was performed to evaluate the levels of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), threonine/serine protein kinase B (AKT) and glycogen synthase kinase 3β (GSK3β). **RESULTS** Yizhi Congming Decoction attenuated the levels of phosphorylated tau at the Thr231 and Ser404 sites in the hippocampus and increased the phosphorylation levels of PI3K, AKT and GSK3β. **CONCLUSION** Yizhi Congming Decoction effectively provides protection against learning and memory deficits and inhibits hyperphosphorylated tau protein expression in the hippocampus. The possible mechanism may occur via the PI3K/Akt-dependent GSK3β signalling pathway. **KEY WORDS:** Yizhi Congming Decoction; Alzheimer’s disease; tau; PI3K; AKT; GSK3β

阿尔茨海默病 (Alzheimer’s disease, AD) 是以记忆损害为核心症状的获得性智能综合症。AD 的显著特征之一为细胞外的 Aβ 沉淀, 研究表明, Aβ 沉淀是诱发 AD 的始动因素^[1-2], 且 Aβ 还可诱发或加速细胞内的 tau 蛋白磷酸化^[3]。Tau 蛋白存在于神经元轴突中, 可调节微管的结构和功能^[4]。AD 发生时, tau 蛋白的过度磷酸化将影响细胞内神经营养物质的运输, 并对神经元的突触、树棘突产生毒性作用^[5-6], 进而影响记忆功能。因此, 抑制 tau 蛋白磷酸化将有可能改善 AD 的进行性记忆损害和认知、行为及功能的失调, 延缓 AD 进程。

研究证实, 有多种激酶参与了 tau 蛋白磷酸化位点的调解^[7], 例如, GSK-3β、CaMKII、PKA 等, 在这些激酶中, GSK-3β 作为 PI3K/AKT 的下游信号分子, 发挥了重要作用。体内及体外实验均证明 PI3K/Akt 的活化可阻止 Aβ 诱导的神经毒性^[8-9]。GSK3β 通过 PI3K/Akt 路径调解 tau 蛋白磷化及 Aβ 产生^[10-11]。因此, PI3K/Akt/GSK-3β 信号途径对于 AD 的诊断及治疗都是重要的靶点。

2000

益智聪明汤是在国家名老中医洪治平主任医师学术指导思想下创立的, 该方由人参、茯苓、制首乌、肉苁蓉、益智仁、知母、菖蒲、远志、川芎、赤芍、牛膝等多味中药组成, 具有健脾益肾填精、除痰、化瘀之功效。前期研究发现, 益智聪明汤可改善 Aβ 诱导的学习记忆缺失, 具体作用机制尚不明确。本研究以 Aβ₂₅₋₃₅ 侧脑室注射诱导 AD 模型小鼠为研究对象, 考察益智聪明汤是否通过对其 tau 蛋白磷酸化的影响进而改善其学习记忆障碍。

1 材料与方法

1.1 动物 选用雌雄各半 SPF 级 ICR 小鼠 60 只, 8 周龄, 体质量 (20 ± 2) g, 辽宁长生生物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK (辽) 2010-0001, 于辽宁中医药大学附属二院实验动物中心饲养, 许可证号 SYXK (辽) 2010-0003。饲养室温度 20 ~ 23 ℃, 饲养室湿度 50% ~ 60%。

1.2 药物 取益智聪明汤中的各药材共计 1 kg, 加入 8 L 水浸泡 1 h, 加热回流提取 1 h, 药液滤过后, 保留备用, 药渣内加 6 L 水, 加热回流提取

1 h, 药液滤过。2 次滤液合并、滤过后, 浓缩成浸膏(含生药量 1.08 g 生药/mL); 盐酸多奈哌齐片, 5 mg/片(卫材[中国]药业有限公司提供, 批号 131219A); A β_{25-35} (Sigma 公司)。

1.3 主要仪器 DW-200 脑立体定位仪(成都泰盟科技公司); TD1002B 电子台秤(四川中泯科技公司); Western blot 电泳仪(美国 BIO-RAD 公司); 奥林巴斯 BX51 显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。

2 方法

2.1 造模 A β_{25-35} 溶解于无菌的生理盐水中, 37 ℃ 孵育 5 d^[12]。3.5% 水合氯醛麻醉小鼠后, 头部固定于脑立体定位仪上, 沿颅骨中线切开头部皮肤约 2 cm, 定位, 以囟门为原点, 向后 0.5 mm, 旁开 1.0 mm, 深度为 3.0 mm, 2 min 内将已经老化的 A β_{25-35} (3 μ L) 注入侧脑中, 留针 5 min, 缓慢拔针。放入鼠笼饲养(注意保暖)。假手术组同样于 2 min 内注入同体积的无菌生理盐水。

2.2 分组及给药 小鼠按体质量随机分为假手术组, 模型组, 益智聪明汤 6.5、13、26 g 生药/kg 剂量组, 多奈哌齐 1.3 mg/kg 组, 每组 10 只, 共 6 组, 分笼饲养, 自由饮食。各组小鼠于造模后第 2 天按相应剂量灌胃给药, 给药容积为 10 mL/kg, 每日给药 1 次, 连续 15 d, 假手术组和模型组给予等体积的蒸馏水。15 d 后, 禁食, 常规处死, 进行检测。

2.3 免疫组化测定 tau 蛋白磷酸化位点的表达 给药 15 d 后, 每组随机选取小鼠 5 只, 麻醉的小鼠先用 0.9% 的生理盐水快速灌流, 再更换为 4 ℃ 的 4% 多聚甲醛。大脑取出后, 置于 4% 多聚甲醛(4 ℃) 过夜, 切片机机制做成 5 μ m 厚的石蜡切片, 脱蜡脱水, 微波修复后, 5% BSA 封闭, 滴加适宜浓度的一抗, 4 ℃ 过夜, PBS 洗涤后, 滴加相应的二抗, 室温 1 h, 依据染色过程进行 DAB 显色, 显微镜下进行观察。

2.4 Western blot 测定小鼠海马 PI3K/AKT/GSK3 β 蛋白表达的检测 第 15 天给药结束后, 每组取 5 只小鼠, 处死后, 进行 Western blot 分析。海马组织内加入 400 μ L 裂解液(含有磷酸酶和蛋白酶抑制剂)进行匀浆, BCA 法测定蛋白浓度。10% 的凝胶中, 每孔加入 40 μ g 蛋白, PVDF 膜进行转膜, 含有 5% 脱脂奶粉的 PBS 室温封闭 2 h, 加入一抗, 4 ℃ 过夜。PVDF 膜与二抗室温孵育 2 h, 加入 ECL 发光液, 凝胶成像系统观察蛋白条带并拍照, 相应

的灰度值用 Quantity One 4.6.2 图像分析软件进行分析。

2.5 统计学处理采用 用 SPSS 17.0 统计学软件对实验数据进行单因素方差分析, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析(one way ANOVA) 进行多组间比较, 方差不齐则采用 Dunnett's T3 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 益智聪明汤对 Thr231 及 Ser404 位点表达的影响 与假手术组相比, 模型组小鼠的磷酸化 tau (Ser404 及 Thr231) 蛋白表达增加显著; 与模型组比较, 益智聪明汤 13、26 g 生药/kg 剂量组小鼠脑组织中 tau (Ser404 及 Thr231) 蛋白表达显著减少(见图 1)。

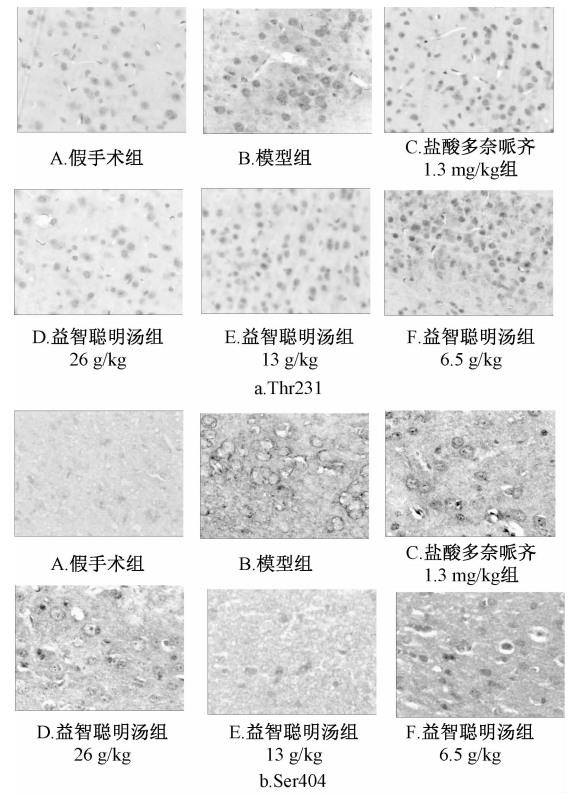


图 1 益智聪明汤对 Thr231 及 Ser404 的蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of Yizhi Congming Decoction on protein expressions of Thr231 and Ser404 in the mice with Alzheimer's disease

3.2 益智聪明汤对 PI3K、AKT 及 GSK3 β 蛋白表达水平的影响 与假手术组相比, 模型组的磷酸化 PI3K、AKT 及 GSK3 β 水平显著减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组相比, 益智聪明汤 13、26 g 生药/kg 剂量组的 PI3K、AKT 及 GSK3 β 磷酸化水

平显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见图 2、表 1。

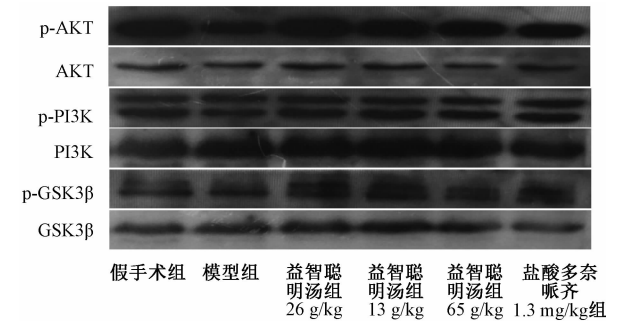


图 2 Western blot 检测不同组别 PI3K、AKT 及 GSK3β 蛋白条带

Fig. 2 Western blot analysis of PI3K, AKT and GSK3β protein bands in different groups

表 1 益智聪明汤对各组小鼠海马组织 PI3K、AKT 及 GSK3β 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of Yizhi Congming Decoction on protein expressions of PI3K, AKT and GSK3β in hippocampus in the mice with Alzheimer's disease ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量/ (g·kg ⁻¹)	p-PI3K/ PI3K	p-AKT/ AKT	p-GSK3β/ GSK3β
假手术组	5	—	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组	5	—	0.39 ± 0.02 **	0.45 ± 0.05 **	0.51 ± 0.08 *
盐酸多奈哌齐组	5	1.3 mg/kg	0.82 ± 0.02 ^{###}	0.82 ± 0.04 ^{##}	0.89 ± 0.06 [#]
益智聪明汤组	5	26	0.96 ± 0.05 ^{###}	0.85 ± 0.01 ^{##}	1.08 ± 0.12 [#]
益智聪明汤组	5	13	0.80 ± 0.02 ^{###}	0.82 ± 0.01 ^{##}	0.85 ± 0.03 [#]
益智聪明汤组	5	6.5	0.76 ± 0.04 [#]	0.69 ± 0.04 [#]	0.69 ± 0.03

注:与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$,
^{###} $P < 0.01$

4 讨论

据报道, 在 60 ~ 90 岁人群中, AD 的患病率随年龄的增长而呈指数增加, 每隔 5.1 岁增加 1 倍^[13], 可见衰老与本病的发生密切相关。《素问·上古天真论》中曰:“女子七岁, 肾气盛, 齿更发长, ……七八, 肝气衰, 筋不能动, 天癸竭, 精, 肾藏衰, 形体皆极”^[14]。充分体现了在机体生长发育过程中, 肾气盛衰的重要作用。肾与脑的关系又极为密切, 《黄帝内经》中就有“肾主骨, 生髓, 通于脑”, “脑为髓之海”^[14]。清代唐容川在《内经精义》中亦指出:“事物之所以不忘赖此记性, 记在何处, 则在肾精。盖肾生精化为髓而藏之于脑中”^[14]。故充足的肾精, 方可使髓海有余, 才能充分的发挥脑主智能的功能。反之, 肾精不足, 髓海不得以濡养, 其学习记忆功能失调, 智力下降。肾精充足、髓海有余作为本病的治疗原则已得到多数研究者的认可^[15-17], 以补肾填精益髓为法的临床治疗也取得了比较好的疗效, 这也反证了肾虚与 2002

AD 的相关性。

益智聪明汤是在国家名老中医洪治平主任医师学术指导思想下创立的, 为临床经验方。肾精作为脑髓的根本物质基础, 同时也是神智功能正常的基本的物质保障。五脏所化气血的不断滋养, 使得脑髓功能得以正常发挥; 脾为气血生化之源, 因劳倦、思虑损伤心脾, 心血亏虚则神失所养, 脾虚则气血生化无源, 清阳不升, 气血精华不能上荣于脑髓。久而久之脑髓枯萎, 神明损而失聪, 脑髓失用而发为痴呆^[18]。治疗上则应以健脾补肾, 充脑填精治其本, 豁痰化瘀开窍以治其标, 标本同治, 方可收工。在此学术思想指导下, 洪老学术继承人创立了“益智聪明汤”, 临床应用取得较好疗效。前期研究表明, 益智聪明汤对可改善 AD 模型小鼠学习记忆功能失调, 但其具体机制尚不明确。

AD 中存在 tau 蛋白异常磷酸化水平的改变。在众多的 tau 蛋白磷酸化位点中, 以丝氨酸 (占 53%) 和苏氨酸 (占 41%) 位点为大多数。据报道, Thr 231、Thr 181 和 Ser 404 位点与 AD 病人密切相关^[19]。本实验结果显示: Aβ₂₅₋₃₅ 注射可促使其 tau 蛋白位点发生磷酸化, 益智聪明汤可减少其表达, 提示其具有抗 tau 蛋白磷酸化作用。

GSK3β 在 AD 病理过程及调节 tau 磷酸化方面中起着重要的作用^[20], 磷酸化 Ser 9 (抑制性) 和 Tyr 216 (激活性) 位点受多种机制调控, 包括 PI3K/Akt 信号途径^[21]。活化的 PI3K/Akt/GSK3β 途径与突触功能的缺失及认知能力下降均相关, 且 AD 转基因模型小鼠及病人脑内的 PI3K/Akt 表达下降^[22]。本实验结果显示, 益智聪明汤增加 GSK3β (Ser 9)、PI3K (p85) 和 AKT (Ser 473) 磷酸化表达水平, 抑制其活化。以上研究结果均提示益智聪明汤可通过 PI3k/Akt/GSK3β 途径减少 Aβ 诱导的 tau 蛋白异常磷酸化。

本研究中, 首次证明了益智聪明汤可通过 PI3K/Akt/GSK3β 信号通路减少 tau 蛋白的异常磷酸化, 进而改善学习记忆障碍。提示益智聪明汤可具有潜在的治疗 AD 的作用。

参考文献:

[1] Qi Y, Zou L B, Wang L H, *et al.* Xanthoceraside inhibits pro-inflammatory cytokine expression in Aβ₂₅₋₃₅/IFN-γ-stimulated microglia through the TLR2 receptor, MyD88, nuclear factor-κB, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways [J]. *J Pharmacol Sci*, 2013, 122(4): 305-317.

[2] Krause D L, Müller N. Neuroinflammation, microglia and im-

- plications for anti-inflammatory treatment in Alzheimer's disease [J]. *Int J Alzheimer's Dis*, 2010; 732806.
- [3] Zumkehr J, Rodriguez-Ortiz C J, Cheng D, *et al*. Ceftriaxone ameliorates tau pathology and cognitive decline via restoration of glial glutamate transporter in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(7): 2260-2271.
- [4] Reddy P H. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease[J]. *Brain Res*, 2011, 1415: 136-148.
- [5] Dugger B N, Tu M, Murray M E, *et al*. Disease specificity and pathologic progression of tau pathology in brainstem nuclei of Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 491(2): 122-126.
- [6] Tang Z, Ioja E, Bereczki E, *et al*. mTor mediates tau localization and secretion: Implication for Alzheimer's disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(7): 1646-1657.
- [7] Wang J Z, Liu F. Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons[J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 85(2): 148-175.
- [8] Wei W, Wang X, Kusiak J W. Signaling events in amyloid beta-peptide-induced neuronal death and insulin-like growth factor I protection [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(20): 17649-17656.
- [9] Stein T D, Johnson J A. Lack of neurodegeneration in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein is associated with increased levels of transthyretin and the activation of cell survival pathways [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(17): 7380-7388.
- [10] Hoppe J B, Coradini K, Frozza R, *et al*. Free and nanoencapsulated curcumin suppresses β -amyloid-induced cognitive impairments in rats; Involvement of BDNF and Akt/GSK-3 β signaling pathway[J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2013, 106: 134-144.
- [11] Koh S H, Kim S H, Kwon H, *et al*. Epigallocatechin gallate protects nerve growth factor differentiated PC12 cells from oxidative-radical-stress-induced apoptosis through its effect on phosphoinositide 3-kinase/Akt and glycogen synthase kinase-3[J]. *Mol Brain Res*, 2003, 118(1-2): 72-81.
- [12] Jana M, Palencia C A, Pahan K. Fibrillar amyloid- β peptides activate microglia via TLR2: Implications for Alzheimer's disease[J]. *J Immunol*, 2008, 181(10): 7254-7262.
- [13] 李 栋, 高锦声. Alzheimer 病的研究现状[J]. 国外医学遗传学分册, 2001, 24(4): 224-227.
- [14] 张连城, 张玉莲, 张 权. 从肾藏精论治老年痴呆[J]. 中医杂志, 2011, 52(17): 1456-1458.
- [15] 曹会波, 李永祥, 韦正祥. 补肾活血化痰法拟方联合西药治疗血管性痴呆疗效观察[J]. 中医药临床杂志, 2011, 23(12): 1037-1038.
- [16] 韦华军. 加服自拟益肾健脑通络汤治疗血管性痴呆 24 例[J]. 广西中医药, 2011, 34(4): 14-15.
- [17] 唐学敏, 张运克, 周英武, 等. 补肾益气活血法治疗血管性痴呆病经验[J]. 中医杂志, 2013, 54(11): 968-969.
- [18] 魏翠柏, 田金洲, 贾建平. 老年痴呆中医因病机理论的认识与思考[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(8): 496-498.
- [19] Fujimura M, Usuki F, Sawada M, *et al*. Methylmercury induces neuropathological changes with tau hyperphosphorylation mainly through the activation of the c-jun-N-terminal kinase pathway in the cerebral cortex, but not in the hippocampus of the mouse brain[J]. *Neurotoxicology*, 2009, 30(6): 1000-1007.
- [20] Peng C X, Hu J, Liu D, *et al*. Disease-modified glycogen synthase kinase-3 β intervention by melatonin arrests the pathology and memory deficits in an Alzheimer's animal model [J]. *Neurobiol Aging*, 2013, 34(6): 1555-1563.
- [21] Liu P, Zou L B, Wang L H, *et al*. Xanthoceraside attenuates tau hyperphosphorylation and cognitive deficits in intracerebroventricular-streptozotocin injected rats [J]. *Psychopharmacology* 2014, 231(2): 345-356.
- [22] Heras-Sandoval D, Pérez-Rojas J M, Hernández-Damián J, *et al*. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration[J]. *Cell Signal*, 2014, 26(12): 2694-2701.