

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.10.005

基于多靶点防治 AD 策略的候选新药脑智复的药理作用及其机制研究^{*}

艾佳晨^{1,2}, 廖应养³, 熊静悦², 肖英^{1,2}, 石依坤^{1,2}, 唐大轩², 张莉², 谭正怀^{2△}

(1. 成都中医药大学药学院 610072; 2. 四川省中医药科学院药理毒理研究所, 成都 610041;
3. 石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司, 石家庄 050035)

[摘要] **目的** 评价脑智复多靶点防治阿尔茨海默病(AD)的作用。**方法** 雌性小鼠去势后 30 d, 海马内注射 A β_{1-42} 和鹅膏蕈氨酸(BO)以复制 AD 模型, 次日将造模小鼠分为模型组、脑智复低剂量组、脑智复中剂量组、脑智复高剂量组及吡拉西坦组并相应给药, 每天灌胃 1 次, 连续 4 周, 另设假手术组(对照组)进行跳台、Morris 水迷宫及生化指标的检测。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠跳台试验中的潜伏期显著缩短($P<0.05$), 错误次数增加($P<0.05$), 在水迷宫中寻找逃逸平台的逃避潜伏期延长($P<0.05$), 进入逃逸平台的次数减少($P<0.05$), 在逃逸平台周围游泳的路程、在有效区域内的游泳时间及路程减少($P<0.05$); 脑组织的丙二醛水平明显升高, 乙酰胆碱水平及超氧化物歧化酶活力明显下降(均 $P<0.05$)。脑智复高、中剂量组中上述指标显著改善。**结论** 脑智复具有体内多靶点防治 AD 的作用。

[关键词] 阿尔茨海默病; 脑智复; A β_{1-42} ; 鹅膏蕈氨酸

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)10-1313-03

Study on pharmacological effects and mechanism of Naozhifu as a new drug candidate for prevention and treatment of Alzheimer's disease base on multiple targets strategy^{*}

Ai Jiachen^{1,2}, Liao Yingyang³, Xiong Jingyue², Xiao Ying^{1,2}, Shi Yikun^{1,2}, Tang Daxuan², Zhang Li², Tan Zhenghui^{2△}
(1. Colledge of Pharmacy Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610072, China;
2. Insitute of Phamacology Toricdogy, Sichuan Academy of Chinese Medicine Science, Chengdu, Sichuan 610041, China;
3. Zhongqi Pharmaceutical Technology (Shijiazhuang) Co., Ltd., CSPC Pharma Group, Shijiazhuang, Hebei 050035, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the effect of Naozhifu as a multifunctional agents for the prevention and treatment of Alzheimer's disease(AD). **Methods** On 30th after castration, female mice were received intrahippocampal injection of A β_{1-42} and ibotenic acid for replicating the AD model. On the next day, these modeled mice were randomly divided into model group, low dose of Naazhifu group, middle dose of Naozhifu group, high dose of Naozhifu group and piracetam group, sham operated mice were set as control group. Then the gavage was given once a day for 4 consecutive weeks. Furthermore the step-down passive avoidance test, morris water maze test and biochemical indicators detection were performed. **Results** In step-down passive avoidance test, the latent period in model group was significantly shortened($P<0.05$), the fault frequency was increased when compared with control group ($P<0.05$). During the Morris Water Maze test, the latent period for seeking escape from platform in AD mice were obviously extended($P<0.05$), the times of passing through the platform was shortened($P<0.05$), the swimming path length around the escape from platform, swimming time and distance in the effective area in AD mice were increased($P<0.05$), meanwhile the level of MDA in brain tissue was significantly increased, while the levels of Ach and SOD were significantly decreased($P<0.05$). These indicators in middle and high dose of Naofuzhi group obviously improved. **Conclusion** Naofuzhi has the multi-target prevention and treatment effect on AD.

[Key words] Alzheimer's disease; Naozhifu; A β_{1-42} ; ibotenic acid

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性记忆和认知功能损伤为特征的退行性神经系统疾病^[1]。临床主要表现为进行性认知障碍。病理学主要表现为老年斑大量出现、神经原纤维缠结及神经元缺失变性等^[2]。流行病学调查表明,我国有 AD 患者约 600 万,预计至 2020 年,我国的 AD 患者将达到 2 000 万人^[3],目前全球医药工作者都在积极寻找能有效防治 AD 的药物或方法。脑智复以具有良好抗氧化作用的灯盏乙素为母体,经过系列结构加工、修饰,使其同时具有良好的抗氧化作用、抑制胆碱酯酶活性、金属络合作用,抑制 A β 的聚集等^[4-6],但其在体内是否同样具有良好的抗 AD 作用,本文就此问题进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物均为 SPF 级昆明种小鼠[四川省中医药科学院提供,生产合格证号 SCXK(川)2013-19 号]。DW-2000 脑立体定位仪(成都泰盟科技有限公司);Morris 水迷宫(成都泰盟科技有限公司);全波长酶标仪(Thermo 公司);脑智复,由四川大学华西药学院邓勇教授课题组提供;A β_{1-42} (Sigma 公司);鹅膏蕈氨酸(BO, Sigma 公司);吡拉西坦片(华中药业股份有限公司,批号 20120513);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、乙酰胆碱(ACh)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

^{*} 基金项目:四川省科技厅资助项目(A-2014N-6)。 作者简介:艾佳晨(1991—),在读硕士,主要从事老年痴呆研究。 △ 通讯作者, E-mail: tanzhzh616@163.com。

1.2.1 模型制作及给药 SPF 级昆明种雌性小鼠 80 只,18~22 g,适应性喂养 2 d 后,用水合氯醛(400 mg/kg,腹腔注射)麻醉小鼠,按照 Hruska 等^[5]做法稍有改进,除假手术组(对照组)小鼠仅切除卵巢附近的脂肪外,其他各组小鼠均进行双侧卵巢摘除手术。卵巢摘除手术 4 周后,进行神经毒性造模: Aβ₁₋₄₂粉末 0.2 mg 溶于 200 μL 无菌的生理盐水中,浓度为 1 μg/μL,混匀,37 ℃恒温箱孵育 1 周,使其转为凝聚态,取 IBO 0.1 mg 溶于其中,配制成 Aβ₁₋₄₂和 IBO 的混合液。运用脑立体定位仪在小鼠大脑海马区(以前囟后 3 mm,中线右旁开 2 mm,深 2 mm 为坐标)注射 Aβ₁₋₄₂ 2 μL/只,次日将造模小鼠分为模型组、吡拉西坦组(阳性对照,800 mg/kg)、脑智复高剂量组(脑智复 18 mg/kg)、脑智理智中剂量组(脑智复 6 mg/kg)、脑智复低剂量组(脑智复 2 mg/kg),后 4 组灌胃给药,每日 1 次,连续 4 周,模型组及对照组则给与等体积 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)。给药 3 周后,进行跳台和 Morris 水迷宫实验。末次给药后 24 h,取脑组织测定 SOD、MDA、ACh 水平。

1.2.2 跳台实验 于给药 3 周后进行跳台试验,将动物放入反应箱内适应 3 min,然后立即通以 36 V 交流电。训练 5 min,并记录每次小鼠受到电击的次数(错误次数),并由此作为学习成绩。24 h 后进行测试,每只小鼠测定 5 min,记录小鼠第 1 次跳下平台的潜伏期及 5 min 内的错误次数。

1.2.3 Morris 水迷宫实验 跳台实验结束后,采用 Morris 水迷宫系统测定小鼠的学习记忆能力。水池直径 120 cm,高 60 cm,平台直径 12 cm。实验前将水池分为 1、2、3、4 4 个象限,然后将安全平台置于其中一个象限内,向水池内注入水,水温(23±2)℃,加入适量奶粉,使水池成为不透明的白色。(1)定位航行实验:隐藏平台,使水面没过平台 2 cm,将小鼠进行隐藏平台实验,并记录 90 s 内小鼠从入水到爬上平台所需的时间,即逃避潜伏期。允许动物 90 s 内找到平台,并在平台上保持 10 s,若动物在入水游泳 90 s 以内仍未能找到水池中的平台或未能爬上平台时,则将动物引导置于平台上站立保持 10 s,动物每天训练 3 次,连续 3 d。(2)空间探索实验:定位航行试验结束 24 h 后,撤除站台。然后任选一相同入水点将小鼠放入水中,记录小鼠在 90 s 内的游泳路径,记录有效区域运动时间、有效区域运动距离、有效区域进入逃避平台次数等。

1.2.4 生化指标 将脑组织用生理盐水制成 10%的组织匀浆,按照南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书测试

MDA、SOD、ACh 水平。用考马斯亮蓝法测定总蛋白浓度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 SNK 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 跳台实验结果 由表 1 可见,在跳台实验中,与对照组比较模型组小鼠的潜伏期明显缩短,错误次数显著增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,吡拉西坦组,脑智复高剂量、中剂量组小鼠潜伏期、错误次数显著延长,差异有统计学意义($P < 0.05$)。脑智复低剂量组亦可显著延长痴呆小鼠潜伏期,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),但其减少错误次数的作用较弱,与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 水迷宫实验结果 由表 2 可见,模型组小鼠无论在定向航行还是空间探索实验中找到逃逸平台的潜伏期均明显长于对照组($P < 0.05$),各药物组均可显著缩短痴呆小鼠找到逃逸平台的潜伏期,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。由表 3 可见,在空间探索实验中,模型组小鼠进入逃逸平台次数及在平台周围游泳的路程均明显少于对照组($P < 0.05$),各药物组均能显著增加痴呆小鼠进入逃逸平台次数及在逃逸平台周围游泳的路程,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。脑智复高、中剂量小鼠进入逃逸平台的次数与吡拉西坦组比较明显增多($P < 0.05$)。

表 1 脑智复对 AD 小鼠在跳台实验中各项指标的影响($\bar{x} \pm s$)				
组别	动物数 (n)	学习 成绩(分)	潜伏期 (s)	错误次数 (次)
对照组	10	3.3±1.3	170.5±109.0 ^b	2.2±1.4 ^b
模型组	9	4.8±1.5	42.6±29.1	4.4±1.3
吡拉西坦组	9	4.0±1.1	108.8±87.6 ^a	3.1±1.5
脑智复高剂量组	7	3.2±1.2	154.6±99.3 ^b	2.7±1.9 ^a
脑智复中剂量组	10	3.3±1.4	165.1±82.4 ^b	2.8±1.4 ^a
脑智复低剂量组	8	3.2±1.0	140.5±107.2 ^a	3.2±1.9

^a: $P < 0.01$,^b: $P < 0.05$,与模型组比较。

表 2 脑智复对 AD 小鼠在定向航行及空间探索实验找到逃逸平台逃逸潜伏期的影响($\bar{x} \pm s$)					
组别	动物数 (n)	潜伏期(s)			
		d1	d2	d3	d4
对照组	10	47.02±19.54 ^a	47.80±15.73 ^a	33.04±4.21 ^b	32.87±5.22 ^b
模型组	9	73.30±19.86	62.26±11.12	45.25±9.15	55.37±13.05
吡拉西坦组	9	59.34±16.26 ^a	36.52±11.92 ^b	36.29±5.85 ^a	30.27±10.02 ^b
脑智复高剂量组	7	42.79±15.63 ^b	42.91±11.65 ^b	35.95±7.03 ^a	32.26±10.03 ^b
脑智复中剂量组	10	32.58±10.56 ^b	42.57±5.89 ^b	34.33±6.68 ^a	25.43±7.38 ^b
脑智复低剂量组	8	31.60±9.32 ^b	41.12±16.49 ^b	31.15±5.52 ^b	28.71±6.60 ^b

d1、d2、d3、d4 分别为水迷宫试验第 1、2、3、4 天;^b: $P < 0.01$,^a: $P < 0.05$,与模型组比较。

由表 4 可见,在空间探索实验中,模型组小鼠在有效区域内的游泳时间及路程均明显少于对照组($P < 0.05$)。吡拉西坦组也可一定程度增加有效区域内的运动时间及路程,但与模

型组比较差异无统计学意义($P < 0.05$),而脑智复各剂量组均能明显增加 AD 小鼠在有效区域内的游泳时间及路程($P < 0.05$)。与吡拉西坦组相比,脑智复各剂量组在有效区域内的

游泳路程明显增加($P<0.05$)。

表 3 脑智复对 AD 小鼠进入逃逸平台的次数及在其周围游泳路程的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (<i>n</i>)	进入逃逸 平台次数	在逃逸平台周围 游泳的路程(mm)
对照组	10	3.67±1.57 ^a	637.10±310.70 ^a
模型组	9	1.93±1.21	246.58±124.12
吡拉西坦组	9	2.93±0.56 ^a	484.69±209.86 ^a
脑智复高剂量组	7	3.48±0.37 ^{ab}	563.84±199.73 ^a
脑智复中剂量组	10	3.53±0.55 ^{ab}	729.66±512.60 ^a
脑智复低剂量组	8	3.42±0.90 ^a	693.33±328.59 ^a

^a: $P<0.05$,与模型组比较;^b: $P<0.05$,与吡拉西坦组比较。

2.3 生化指标变化 如表 5 所示,与对照组比较,模型组脑组织 MDA 水平明显升高,SOD 活力明显下降($P<0.05$)。与

模型组比较,脑智复高剂量组 MDA 水平显著降低,脑智复中剂量组 ACh 水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 4 脑智复对 AD 小鼠在有效区域内游泳时间及路程的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (<i>n</i>)	游泳时间(s)	游泳的路程(mm)
对照组	10	6.29±1.67 ^a	2 678.53±909.38 ^a
模型组	9	3.55±1.31	1 179.75±770.10
吡拉西坦组	9	5.21±2.26	1 534.22±337.78
脑智复高剂量组	7	5.92±2.81 ^a	2 312.08±672.53 ^{ab}
脑智复中剂量组	10	5.12±1.81 ^a	2 246.48±595.06 ^{ab}
脑智复低剂量组	8	5.37±1.90 ^a	2 994.39±724.69 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与模型组比较;^b: $P<0.05$,与吡拉西坦组比较。

表 5 脑智复对 AD 小鼠脑组织中 SOD、MDA、ACh 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(<i>n</i>)	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)	ACh(μg/mgprot)
对照组	10	279.60±44.818 ^a	9.31±1.39 ^b	23.11±5.23 ^b
模型组	9	235.29±33.73	12.52±2.29	11.31±10.49
吡拉西坦组	9	263.37±48.38	10.65±4.83	17.36±5.96
脑智复高剂量组	7	257.17±20.55	10.15±0.83 ^a	17.21±5.71
脑智复中剂量组	10	256.88±48.68	11.20±3.69	23.57±11.53 ^a
脑智复低剂量组	8	221.49±58.04	11.17±1.92	16.30±2.59

^a: $P<0.05$,^b: $P<0.01$,与模型组比较。

3 讨 论

AD 发病机制复杂、涉及诸多假说,包括 Aβ 沉积学说、胆碱能神经异常假说、氧化应激与自由基损伤假说、tau 蛋白磷酸化学说及雌激素缺乏学说等^[6]。目前已经上市的 AD 治疗药物大部分属于单靶向药物,可以一定程度缓解轻度、中度的 AD 症状,但不能阻止或者逆转 AD 的进一步发展。近年来研究者尝试多靶点治疗 AD,以期找到更有效的药物^[7]。

本课题组采用去势小鼠单侧海马内注射 Aβ₁₋₄₂ 和 IBO 的混合液导致的复合模型,以模拟 Aβ 沉积、胆碱能神经损伤及雌激素缺乏等多种因素复合引起的 AD。结果表明,在去势小鼠海马注射 Aβ₁₋₄₂ 和 IBO 后,小鼠的学习、记忆能力均明显降低,小鼠脑组织 MDA 水平明显升高,SOD 活力及 ACh 水平明显下降,这表明侧脑室注射 Aβ₁₋₄₂ 和 IBO 及雌激素缺乏诱导氧化应激产生游离的自由基,破坏胆碱能系统,使学习记忆能力下降。基底前脑注射 IBO,会破坏脑内胆碱能系统,使胆碱能神经元丢失,破坏胆碱能神经元的功能,或使其功能丧失,降低 ACh^[8-9],Aβ₁₋₄₂ 或者 IBO 单独注射仅能使注射部位周边的神经元退化损伤,Aβ₁₋₄₂ 和 IBO 联合注射不仅使注射部位神经元剧烈丢失,还能使海马 CA1、CA4 区的神经元细胞丢失,这种损伤与 IBO 有剂量依赖。而且 Aβ 和 IBO 联合注射能强烈损伤微管结合蛋白-2 的免疫反应^[10]。氧自由基增加既是雌激素缺乏的结果^[11],也是 Aβ 的毒性效应之一,增加神经细胞中自由基的浓度,可诱发脂质过氧化,使 Ca²⁺ 内流,进而使线粒体功能损伤,诱导神经元凋亡。脑组织的氧化应激还可使 Aβ 斑块的沉积加速,沉积的 Aβ 斑块可作为活性氧供体从而加剧氧化

应激,因此,应用抗氧化剂可以阻断氧化应激和 Aβ 斑块之间的正反馈^[12-13],进而使得神经元细胞避免受 Aβ 的毒害。这可能也是本实验发现吡拉西坦对复合因素致 AD 小鼠具有一定预防作用的重要原因。吡拉西坦是 GABA(γ-氨基丁酸)的衍生物,与谷氨酸受体有最大亲和力,可直接激活谷氨酸受体;清除脑内氧自由基,减慢脂质过氧化;抗大脑皮质缺氧,增加氧血流量,促进能量转化,和脑蛋白质合成及促进脑半球间的信息传递,增加脑细胞的能量储存和脑细胞活性,从而改善学习记忆能力,是常用的神经保护剂^[14-15]。

本实验中,经过脑智复治疗后,脑组织中的 ACh 水平升高,SOD 活性升高,MDA 水平降低,AD 小鼠的学习记忆能力明显改善,其学习记忆能力强于吡拉西坦组,提示脑智复在体内同样具有良好的抗氧化作用及抑制胆碱酯酶活性的作用,展示了部分多靶点作用的特性,其他多靶点策略的体现还有待进一步深入研究和评价。

参考文献

[1] Palmer AM. Neuroprotective therapeutics for Alzheimer's disease: progress and prospects[J]. Trends Pharmacol Sci,2011,32(3):141-147.
[2] Huang YD, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies[J]. Cell,2012,148(6):1204-1222.
[3] 王晶. 我国阿尔茨海默病的流行现状及预防措施[J]. 亚太传统医药,2011,7(2):157-158.
[4] Sang Z, Qiang X, Li Y, et al. Design, synthesis(下转第 1319 页)

- review and meta-analysis of randomised controlled trials [J]. *Eur J Clin Invest*, 2014, 44(4): 429-440.
- [3] Zhao M, Bai H, Wang E, et al. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(3): 397-405.
- [4] Kssmeyer S, Plendl J, Custodis P, et al. New insights in vascular development; vasculogenesis and endothelial progenitor cells[J]. *Anat Histol Embryol*, 2009, 38(1): 1-11.
- [5] Hristov M, Zerneck A, Liehn EA, et al. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury[J]. *Thromb Haemost*, 2007, 98(2): 274-277.
- [6] Song B, Gu Y, Pu J, et al. Application of direct current electric fields to cells and tissues in vitro and modulation of wound electric field in vivo[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(6): 1479-1489.
- [7] 赵晓辉, 吴楠, 尹扬光, 等. 雌二醇调控小鼠内皮祖细胞凋亡及体外血管新生研究[J]. *第三军医大学学报*, 2010, 32(13): 1399-1402.
- [8] Li Li, Wei Gu, Juan Du, et al. Electric fields guide migration of epidermal stem cells and promote skin wound healing[J]. *Wound Rep Reg*, 2012, 20(6): 840-851.
- [9] McCaig CD, Rajniecek AM, Song B, et al. Has electrical growth cone guidance found its potential[J]. *Trends in Neurosciences*, 2002, 25(7): 354-359.
- [10] McCaig CD, Rajniecek AM, Song B, et al. Controlling cell behavior electrically; current views and future potential [J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(3): 943-978.
- [11] Mycielska ME, Djamgoz MBA. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects; galvanotaxis and metastatic disease[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(9): 1631-1639.
- [12] Nagasaka M, Kohzuki M, Fujii T, et al. Effect of low-voltage electrical stimulation on angiogenic growth factors in ischaemic rat skeletal muscle [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, 33(7): 623-627.
- [13] Liew A, Barry F, O'Brien T. Endothelial progenitor cells; diagnostic and therapeutic considerations [J]. *Bioessays*, 2006, 28(3): 261-270.
- [14] Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells in vascular repair and remodeling [J]. *Pharmacol Res*, 2008, 58(2): 148-151.
- [15] Gurtner GC, Chang E. "Priming" endothelial progenitor cells a new strategy to improve cell based therapeutics [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(6): 1034-1035.
- [16] Li L, Jiang J. Stem cell niches and endogenous electric fields in tissue repair [J]. *Front Med*, 2011, 5(1): 40-44.
- [17] Serena E, Figallo E, Tandon N, et al. Electrical stimulation of human embryonic stem cells; cardiac differentiation and the generation of reactive oxygen species [J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(20): 3611-3619.

(收稿日期: 2015-12-18 修回日期: 2016-01-25)

(上接第 1315 页)

- and evaluation of scutellarein-O-alkylamines as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 94: 348-366.
- [5] Hruska Z, Dohanich GP. The effects of chronic estradiol treatment on working memory deficits induced by combined infusion of beta-amyloid (1-42) and ibotenic acid [J]. *Horm Behav*, 2007, 52(3): 297-306.
- [6] Lewis J, Dickson DW, Lin WL, et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP[J]. *Science*, 2001, 293(5534): 1487-1491.
- [7] 杨云, 卞广兴, 吕秋军. 多靶向抗阿尔茨海默病的研究进展[J]. *中国新药志*, 2008, 17(1): 12-20.
- [8] 张兰, 叶翠飞, 褚燕琦, 等. 二苯乙烯苷对鹅膏蕈氨酸致痴呆大鼠模型脑内胆碱能系统的影响[J]. *中国药理学杂志*, 2005, 10(10): 749-752.
- [9] 陈民, 王晶, 陈欢雪. $A\beta_{1-42}$ 合并 IBO 诱导阿尔茨海默病大鼠模型的建立和评价[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2010, 8(4): 465-467.
- [10] Morimoto K, Yoshimi K, Tonohiro T, et al. Co-injection of beta-amyloid with ibotenic acid induces synergistic loss of rat hippocampal neurons [J]. *Neuroscience*, 1998, 84(2): 479-487.
- [11] Lean JM, Davies JT, Fuller K, et al. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(6): 915-923.
- [12] 卢继承, 林贞贤. 白藜芦醇对 $A\beta$ 致大鼠学习记忆损伤的修复作用[J]. *泰山学院学报*, 2013, 35(3): 120-123.
- [13] Fukui H, Moraes CT. The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection; reality or just an attractive hypothesis [J]. *Trends Neurosci*, 2008, 31: 251-256.
- [14] Cohen S, Müller WE. Effects of piracetam on N-methyl-D-aspartate receptor properties in the aged mouse brain [J]. *Pharmacology*, 1993, 47(4): 217-222.
- [15] Stoll L, Schubert T, Müller WE. Age-related deficits of central muscarinic cholinergic receptor function in the mouse; partial restoration by chronic piracetam treatment [J]. *Neurobiol Aging*, 1992, 13(1): 39-44.

(收稿日期: 2015-12-18 修回日期: 2016-01-16)