

丹萎片对 $A\beta_{1-40}$ 致脑微血管内皮细胞损伤保护作用的机制研究

高爱社¹, 杨洒¹, 张振强², 宋军营^{1,2}, 张鹏飞¹, 史占江¹ (1. 河南中医药大学基础医学院, 河南 郑州 450018; 2. 河南中医药大学中医药科学院, 河南 郑州 450018)

摘要: **目的** 研究丹萎片对 β 淀粉样蛋白 1-40 ($A\beta_{1-40}$) 诱导脑微血管内皮细胞 (BMEC) 损伤的保护作用。**方法** (1) 将大耳白兔 BMEC 培养在含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的完全培养基中, 用 $A\beta_{1-40}$ 建立 BMEC 损伤模型。实验分正常组 (C)、模型组 (M) 和晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 中和抗体组 (RAGE-Ab), 24 h 后使用 Western Blot 法检测各组血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1)、巨噬细胞炎症蛋白-1 β (MIP-1 β)、趋化因子受体-5 (CCR5) 的表达。(2) 用丹萎片制备含药血清, 实验分为正常组 (10% 空白血清培养)、模型组、低浓度用药组 (10% 丹萎片低浓度含药血清 + $A\beta_{1-40}$)、高浓度用药组 (10% 丹萎片高浓度含药血清 + $A\beta_{1-40}$), 24 h 后用 Western Blot 法测定各组细胞上述因子的表达水平。**结果** (1) 与正常组相比, 模型组 RAGE、VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 表达显著增加 ($P < 0.01$), RAGE-Ab 组各因子表达水平显著降低 ($P < 0.01$); (2) 与空白血清组相比, 模型组 RAGE、VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 表达增加 ($P < 0.001$), 与模型组相比, 丹萎片含药血清组各因子的表达显著降低 ($P < 0.01$)。**结论** 丹萎片含药血清具有保护 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 BMEC 损伤的作用, 其机制可能与抑制 $A\beta$ 和 RAGE 诱发的 BMEC 趋化反应有关。

关键词: 丹萎片; 脑微血管内皮细胞; β 淀粉样蛋白 1-40; 阿尔茨海默病; 兔

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)02-0234-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.02.012

Protective Mechanism of *Dan Lou* Tablets on $A\beta_{1-40}$ -induced Brain Microvascular Endothelial Cell Damage

GAO Aishe¹, YANG Sa¹, ZHANG Zhenqiang², SONG Junying^{1,2}, ZHANG Pengfei¹, SHI Zhanjiang¹ (1. School of Basic Medical Sciences of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450018 Henan, China; 2. Academy of Chinese Medicine Sciences of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450018 Henan, China)

Abstract: **Objective** To explore the protective effect of *Dan Lou* tablets on $A\beta_{1-40}$ -induced brain microvascular endothelial cells (BMEC) injury. **Methods** Rabbit BMEC were cultured in a complete medium containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin, and divided into normal control group (C), model group (M $A\beta_{1-40}$ model) and advanced glycosyl End product receptor (RAGE) neutralizing antibody group (RAGE-Ab), 24 hours later, Western Blot was used to detect vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β), and the expression of chemokine receptor-5 (CCR5). BMEC was cultured with *Dan Lou* tablets medicated serum and divided into normal group (10% blank serum culture), model group ($A\beta_{1-40}$ to establish BMEC injury model), and low concentration drug group (10% *Dan Lou* tablets low concentration medicated serum + $A\beta_{1-40}$), high-concentration drug group (10% *Dan Lou* tablets high-concentration medicated serum + $A\beta_{1-40}$), 24 hours later, the expression levels of the above factors in the cells of each group were determined by Western Blot. **Results** Compared with the normal group, the expression of RAGE, VCAM-1, MIP-1 β and CCR5 in the model group increased significantly ($P < 0.01$), and the expression levels of various factors in the RAGE-Ab group decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with the blank serum group, the expression of RAGE, VCAM-1,

收稿日期: 2020-07-02

作者简介: 高爱社, 女, 博士, 教授, 研究方向: 中医药防治心脑血管疾病研究。Email: gaoaishe@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金联合项目 (U1504829); 中原科技领军人才项目 (204200510022); 河南省高等学校重点科研项目 (20A310009); 河南中医药大学博士基金项目 (BSJJ2018-01); 河南省科技攻关项目 (202102310508)。

MIP-1 β and CCR5 in the model group increased significantly ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of RAGE, VCAM-1, MIP-1 β and CCR5 increased ($P < 0.001$). Compared with the model group, the expression of each factor in the serum group containing *Dan Lou* tablets was significantly reduced ($P < 0.01$).

Conclusion The serum containing *Dan Lou* tablets can protect BMEC from damage induced by A β_{1-40} . The mechanism may be related to the inhibition of A β /RAGE-induced BMEC chemotaxis.

Keywords: *Dan Lou* tablets; brain microvascular endothelial cells; A β_{1-40} ; Alzheimer's disease; rabbits

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease AD)是一种以认知功能障碍和行为损害为主要临床表现的神经退行性疾病^[1]。AD 的中枢神经病理特征为 β 淀粉样蛋白(β -amyloid protein A β)沉积、神经元纤维缠结、神经炎症等^[2-3]。脑微血管内皮细胞(BMEC)作为脑部微循环系统的组成单位,又是血脑屏障的基本骨架和关键结构,在维持脑部微环境稳定方面发挥重要作用。在 AD 中沉积的 A β 促进 BMEC 释放趋化因子和黏附分子,这些因子损伤 BMEC,破坏血脑屏障(BBB),导致纤维蛋白原、免疫球蛋白和白细胞等进入脑实质,引起神经元凋亡^[4]。同时激活小胶质细胞,引发持续性神经炎症反应。以往对于 AD 的抗炎研究^[5-6]发现,晚期糖基化终末产物受体(RAGE)可与 A β 结合,通过激活 NF- κ B、P38MAPK、mTOR 等多种途径诱发神经炎症,损伤神经元。但以上研究多以小胶质细胞为对象,对 BMEC 的研究较少。越来越多的证据表明 BMEC 趋化反应发生在 AD 早期且会引发小胶质细胞的激活。抑制 A β 诱导的 BMEC 趋化反应、保护 BMEC 功能可能对于降低 AD 早期的神经炎症反应具有重要意义^[7-8]。

中医认为 AD 的发生以肾虚为本,以痰瘀为主要致病因素^[9-10]。病机在于痰瘀实邪侵犯脑窍,导致神明逆乱,根据其病机应治以化痰、活血之法。丹萎片是由国医大师雷忠义根据“胸痹痰瘀互结理论”研发出的国家级中药新药,源于《金匱要略》之瓜蒌薤白白酒汤,有活血化瘀,化痰散结之功效。药理研究^[11]显示,丹萎片醇提物能抑制动脉粥样硬化内皮细胞炎症反应。其单体成分包括没食子酸、丹参酚酸 B、丹参酮 II A、芍药苷、大豆苷、丹参素、隐丹参酮等,其中芍药苷、丹参酮 II A 能改善 AD 小鼠认知能力,降低神经炎症反应和氧化应激^[12-15]。丹参酚酸 B 可通过抑制自噬和神经炎症反应改善由脂多糖引起的行为缺陷^[16]。本课题组前期研究^[17]表明,丹萎片含药血清具有提高 A β_{1-40} 致 BMEC 损伤后细胞活性,减少细胞乳酸脱氢酶的释放量。本实验以

BMEC 为研究对象,探讨丹萎片是否可以通过抑制 A β_{1-40} 诱导的 BMEC 趋化反应发挥保护内皮细胞功能的作用。

1 材料与方法

1.1 药物及仪器 丹萎片,吉林康乃尔药业股份有限公司,批号:20190107; A β_{1-40} ,上海源叶生物科技有限公司,批号:S41976; RAGE 抗体、 β -actin 抗体,美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,批号:sc-80652、sc-47778; VCAM-1 抗体、MIP-1 β 抗体、CCR5 抗体,美国 Abcam 公司,批号为:ab181315、ab45690、ab65850; DM3000 荧光显微镜和显微照相系统,德国 Leica 公司。

1.2 动物及细胞 日本大耳白兔 10 只,体质量约 2.5 kg,山东鲁抗医药股份有限公司,许可证号:SCSK(鲁)20130001。BMEC,北纳生物有限公司,批号:BNCC339490。

1.3 A β_{1-40} 的配制 将 A β_{1-40} 1 mg 溶于 1 mL 的无菌超纯水中,置于 5% CO₂ 培养箱中,37 °C 条件下孵育 7 d,待其变为凝胶状态后取出并分装放置于 EP 管内,置于 -20 °C 冰箱保存。

1.4 丹萎片含药血清的制备 丹萎片剂量根据 60 kg 成人 1 日用药量换算,成人丹萎片用量为 0.075 g·kg⁻¹·d⁻¹,经体表面积折算后(与人相比,兔的折算系数为 5)兔的等效剂量为 0.375 g·kg⁻¹·d⁻¹,此为低浓度组。高浓度组剂量为低浓度组 3 倍,即 1.125 g·kg⁻¹·d⁻¹;空白对照组以等体积的生理盐水灌胃,均灌胃 7 d,每日 1 次。最后 1 次灌胃 1 h 后用 10% 水合氯醛腹腔麻醉,腹主动脉采血,血清析出后离心、灭活、过滤,得到不同浓度的含药血清,分装后于 -80 °C 低温保存。

1.5 细胞培养 将 BMEC 进行传代培养,当细胞生长至融合状态时,调整密度后接种于 96 孔板和 6 孔板内,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,待孔板内细胞出现汇合时,无血清培养基同步化 12 h 后将细胞

分组用于实验。

1.6 MTT 法测定不同浓度 $A\beta_{1-40}$ 对 BMEC 活性的影响

将培养好的 BMEC 接种于 96 孔板内, 置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养。待孔板内细胞出现融合时, 无血清培养基同步化 12 h 后将细胞分组: 正常组、 $A\beta_{1-40}$ 组 (5 、 10 、 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 加药 24 h 后向各孔内加入 $20\ \mu\text{L}$ 浓度为 $5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液, 置于 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中培养 4 h; 然后取出 96 孔板, 弃上清, 每孔加入 $150\ \mu\text{L}$ DMSO 溶液, 放置于摇床上摇 15~20 min, 使用全波长酶标仪在 $570\ \text{nm}$ 处测量各组细胞 OD 值。

1.7 Western Blot 法检测各组 BMEC 中 RAGE、VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 的表达

1.7.1 RAGE-Ab 对 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 BMEC 损伤的作用 将培养好的 BMEC 分组, 各组细胞均使用含 10% 胎牛血清的培养基培养, 分为正常组、模型组 (用 $A\beta_{1-40}$ $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 制作模型)、RAGE 抗体组 (RAGE-Ab $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 提前作用 BMEC, 2 h 后使用 $A\beta_{1-40}$ $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 造模)。24 h 后通过 Western Blot 法测定各组内皮细胞 RAGE、VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 的表达水平。用 RIPA 裂解液将各组内皮细胞裂解后, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 各组取 $20\ \mu\text{g}$ 进行 12%SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳后将蛋白转移至 $0.45\ \mu\text{m}$ PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1 h, 用 PBST 稀释一抗工作液: RAGE ($1:1\ 000$); β -Actin ($1:1\ 000$); VCAM-1 ($1:1\ 000$); MIP-1 β ($1:1\ 000$); CCR5 ($1:1\ 000$)。一抗孵育 4°C 过夜, 用 PBST 稀释二抗 ($1:1\ 000$); 二抗为 HRP 标记山羊抗兔 IgG 和山羊抗鼠 IgG, 内参为 β -actin, 使用 ECL 发光液显影, 以 Las-4000 化学发光检测仪进行成像并分析数据。

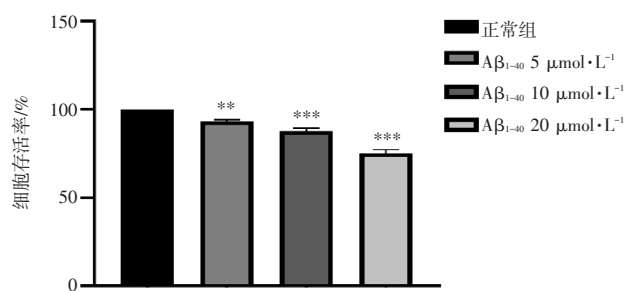
1.7.2 丹莪片对 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 BMEC 损伤的影响 将 BMEC 分为正常组 (含 10% 空白血清的 DMEM 培养基)、模型组 (10% 空白血清的 DMEM 培养基 + $A\beta_{1-40}$ $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、丹莪片低浓度含药血清组 (10% 丹莪片低浓度含药血清 + $A\beta_{1-40}$ $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、丹莪片高浓度含药血清组 (10% 丹莪片高浓度含药血清 + $A\beta_{1-40}$ $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。按“1.7.1”项下方法, 以 Western Blot 法检测各组 BMEC 中 RAGE、VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 的表达。

1.8 统计学处理方法 所有计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行分析。多组间比较符合正态分布且方差齐时用单因

素方差分析, 然后进行 Student Newman-Keuls (SNK) 多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 $A\beta_{1-40}$ 对 BMEC 细胞活性的影响 通过 $A\beta_{1-40}$ 制造 BMEC 损伤模型探究丹莪片对 BMEC 的保护作用, 使用 MTT 法测定不同浓度 $A\beta_{1-40}$ 对 BMEC 活性的影响。与正常组比较, $A\beta_{1-40}$ 5 、 10 、 $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用于 BMEC 后细胞存活率有不同程度的下降 (见图 1), $A\beta_{1-40}$ $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 BMEC 的损伤作用较弱, $A\beta_{1-40}$ $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用于 BMEC 后细胞的存活率为 75.2% , 损伤作用较强, 故后续实验选择 $A\beta_{1-40}$ 的造模浓度为 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。



注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

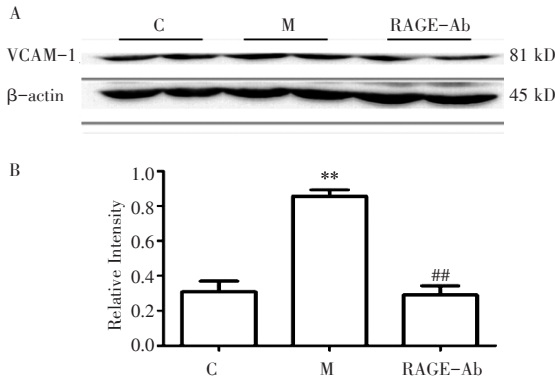
图 1 不同浓度 $A\beta_{1-40}$ 对 BMEC 细胞活性的影响 ($n=3$)

Figure 1 The effect of different concentrations of $A\beta_{1-40}$ on the activity of BMEC cells ($n=3$)

2.2 RAGE-Ab 处理后各组内皮细胞 VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 的表达 与正常组相比, 模型组 VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 表达明显升高 ($P < 0.01$), 表明 $A\beta_{1-40}$ 可诱导 BMEC 损伤。模型组与 AD 的病理变化相似, 表明 BMEC 损伤模型诱导成功。与模型组相比, RAGE-Ab 组 VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 表达均显著降低 ($P < 0.01$), 表明 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 BMEC 损伤可被 RAGE-Ab 阻断, 说明 BMEC 损伤与 RAGE 有关。结果见图 2~图 4。

2.3 丹莪片含药血清对 $A\beta_{1-40}$ 诱导的 BMEC 模型 RAGE、VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 表达的影响

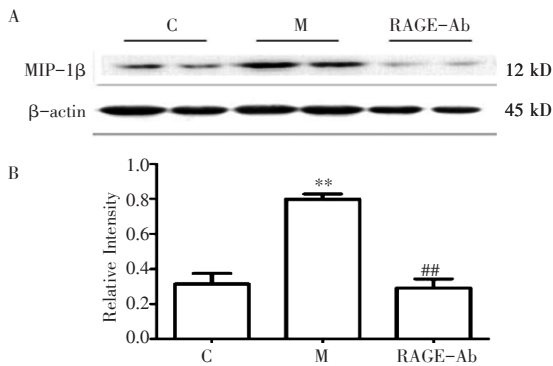
以 Western Blot 法检测各组 BMEC 中 RAGE、VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 的表达, 结果显示, 模型组 RAGE、VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 的表达均高于正常组 ($P < 0.001$), 表明造模成功。与模型组比较, 丹莪片低浓度组和丹莪片高浓度组 RAGE、VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 的表达量均降低 ($P < 0.01$), 表明丹莪片含药血清可通过抑制 RAGE 表达缓解由 $A\beta_{1-40}$ 诱导 BMEC 引起的趋化因子和黏附分子释放。结果见图 5、图 6。



注：与正常组(C)比较，** $P < 0.01$ ；与模型组(M)比较，## $P < 0.01$

图 2 各组内皮细胞 VCAM-1 的表达($n=4$)

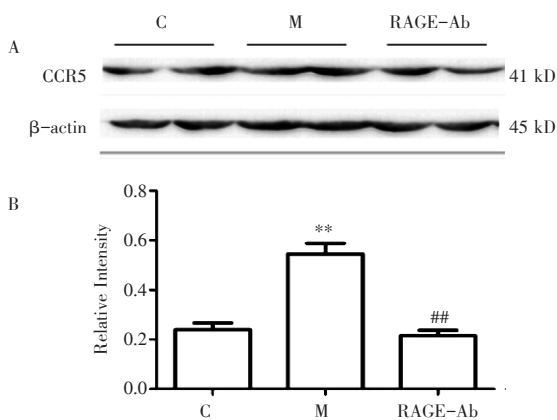
Figure 2 The expression of VCAM-1 in each group of cells($n=4$)



注：与正常组(C)比较，** $P < 0.01$ ；与模型组(M)比较，## $P < 0.01$

图 3 各组内皮细胞 MIP-1β 的表达($n=4$)

Figure 3 MIP-1β expression of cells in each group($n=4$)



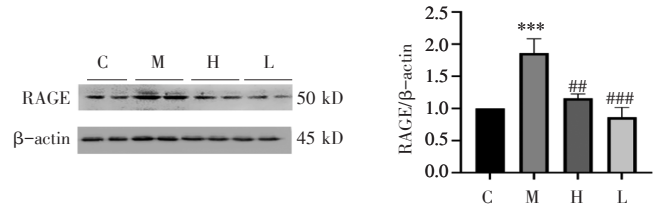
注：与正常组(C)比较，** $P < 0.01$ ；与模型组(M)比较，## $P < 0.01$

图 4 各组内皮细胞 CCR5 的表达($n=4$)

Figure 4 CCR5 expression of cells in each group($n=4$)

3 讨论

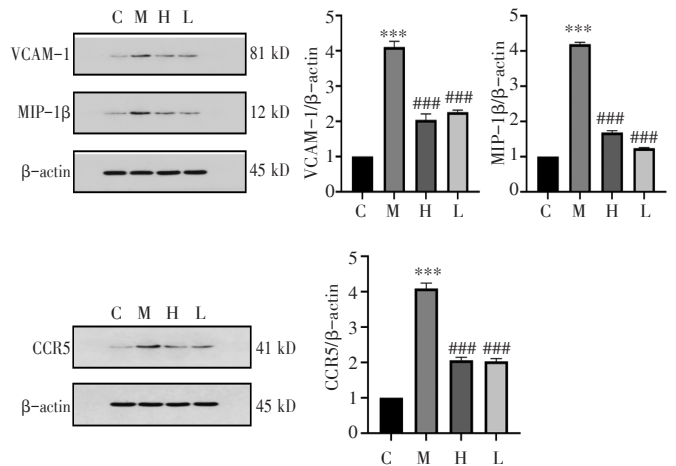
慢性持续性神经炎症反应被认为是阿尔茨海默病(AD)的病理特征之一，AD 患者大脑中存在活化的小胶质细胞和星形胶质细胞数量增加，促炎因子和免疫细胞由外周向中枢神经系统黏附迁移^[20-21]。Aβ 诱导的 BMEC 损伤会破坏 BBB 的屏障功能，同时



注：与正常组(C)比较，*** $P < 0.001$ ；与模型组(M)比较，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ 。H、L 分别为丹莪片高、低浓度组

图 5 丹莪片对内皮细胞 RAGE 蛋白表达水平的影响($n=4$)

Figure 5 RAGE protein expression levels of endothelial cells in each group($n=4$)



注：与正常组(C)比较，*** $P < 0.001$ ；与模型组(M)比较，### $P < 0.001$ 。H、L 分别为丹莪片高、低浓度组

图 6 丹莪片对内皮细胞 VCAM-1、MIP-1β 和 CCR5 表达的影响($n=3$)

Figure 6 Expression of VCAM-1, MIP-1β and CCR5 in endothelial cells of each group($n=3$)

BMEC 释放一些趋化因子和黏附分子，促进免疫细胞的黏附迁移^[22]。BMEC 表达的黏附分子与小胶质细胞活化及外周免疫细胞(包括单核细胞和 T 细胞)穿过血脑屏障等均有关^[23-25]。BMEC 功能障碍引起的小胶质细胞活化和星形胶质细胞增殖可导致炎症因子增多，损伤神经元^[26]。

晚期糖基化终末产物受体(RAGE)广泛存在于脑内神经元、小胶质细胞、内皮细胞等处，在 AD 早期病理过程中具有重要作用。AD 患者脑内的 RAGE 表达显著升高^[27]。位于 BMEC 上的 RAGE 可将外周的 Aβ 转运至脑内，其表达升高会加重脑内 Aβ 的沉积。Aβ 是淀粉样前体蛋白被 β 和 γ 分泌酶裂解后形成^[28]，RAGE 能增强 β 分泌酶的活性，促进淀粉样前体蛋白产生更多的 Aβ^[29]。除了增强脑实质中 Aβ 的积累外，沉积的 Aβ 与 RAGE 结合后会介导几种细胞

信号通路, 包括 NF- κ B, MAPK, mTOR, 这些信号涉及炎症、凋亡和自噬, 会改变 AD 的病理进程^[30-32]。血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) 是一种细胞表面黏附分子, 在 AD 的内皮细胞中表达上调, 其表达水平上升有利于白细胞与内皮细胞的黏附、游走和迁移^[33]。研究显示, 与正常老年人相比, 60 例 AD 患者和 80 例血管性痴呆患者的血浆 VCAM-1 水平在出现小血管或大血管疾病时均有升高^[34]。在老年小鼠中, VCAM-1 通过 BMEC 向脑实质传递信号, 激活小胶质细胞, 抑制神经元前体细胞活性, 损害认知功能, 使用 VCAM-1 抗体可导致神经元前体细胞活性增加, 使小胶质细胞反应性降低以及海马依赖性的学习记忆改善^[35]。趋化因子 MIP-1 β 及其受体 CCR5 是参与 AD 免疫调节的重要细胞因子, 通过协助白细胞穿过脑内皮细胞屏障及其活化、黏附和转运而调节免疫细胞的运输, 它们还可激活小胶质细胞和星形胶质细胞, 诱导炎症级联反应, 诱导细胞迁移, 加重 AD 的进展^[36]。以上因子表达升高会引发 BMEC 损伤及神经胶质细胞活化, 导致神经元受损、凋亡, 加剧 AD 的病理进程。

本研究表明, 使用 RAGE-Ab 中和 BMEC 表面受体 RAGE 后, 可抑制由 $A\beta_{1-40}$ 诱导产生的 VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 表达, 说明由 $A\beta_{1-40}$ 诱导 BMEC 产生的 VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 与 RAGE 有关。使用不同浓度丹莪片含药血清培养 BMEC 后, 与正常组相比, 模型组的 RAGE 蛋白水平明显升高, 而丹莪片含药血清低、高剂量组在不同程度上降低了 RAGE 表达水平。与正常组相比, 模型组 VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 表达明显增加; 与模型组相比, 丹莪片含药血清低、高剂量组不同程度地降低了 VCAM-1、MIP-1 β 、CCR5 的蛋白表达。结果表明, 丹莪片含药血清可改善 $A\beta_{1-40}$ 诱导 BMEC 产生的趋化反应, 其机制可能与抑制 $A\beta$ 和 RAGE 诱发的 BMEC 趋化反应有关。

参考文献:

- [1] LANE C A, HARDY J, SCHOTT J M. Alzheimer's disease[J]. *European Journal of Neurology*, 2018, 25(1): 59-70.
- [2] MORLEY J E, FARR S A, NGUYEN A D. Alzheimer disease[J]. *Clinics in Geriatric Medicine*, 2018, 34(4): 591-601.
- [3] HENKA M T, CARSON M J, EL KHOURY J, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. *The Lancet Neurology*, 2015, 14(4): 388-405.
- [4] STOCK A J, KASUS-JACOBI A, PEREIRA H A. The role of neutrophil granule proteins in neuroinflammation and Alzheimer's disease[J]. *Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 240-255.
- [5] CHAN Y, CHEN W, WAN W, et al. Abeta1-42 oligomer induces alteration of tight junction scaffold proteins via RAGE-mediated autophagy in bEnd.3 cells[J]. *Experimental Cell Research*, 2018, 369(2): 266-274.
- [6] CHEN F, GHOSH A, HU M, et al. RAGE-NF-kappaB-PPARgamma signaling is involved in AGEs-induced upregulation of amyloid-beta influx transport in an in vitro BBB model[J]. *Neurotoxicity Research*, 2018, 33(2): 284-299.
- [7] ROSSI B, ANGIARI S, ZENARO E, et al. Vascular inflammation in central nervous system diseases: adhesion receptors controlling leukocyte-endothelial interactions[J]. *J Leukoc Biol*, 2011, 89(4): 539-556.
- [8] CRISCUOLO C, FONTEBASSO V, MIDDEI S, et al. Entorhinal cortex dysfunction can be rescued by inhibition of microglial RAGE in an Alzheimer's disease mouse model[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42370.
- [9] 史晓玲, 袁德培. 从“毒”探讨老年性痴呆的病因病机[J]. *湖北民族学院学报(医学版)*, 2011, 28(3): 64-66.
- [10] 谢宁, 谢芳, 姚辛敏, 等. 老年性痴呆从五脏论治的临床研究进展[J]. *湖北中医杂志*, 2017, 39(10): 59-62.
- [11] 刘玉梅, 杨振, 洪铁, 等. 丹莪片对动脉内皮损伤大鼠 ET、Ang II、NOS 的影响[J]. *世界中西医结合杂志*, 2010, 5(5): 403-405.
- [12] AI L, YANG F, SONG J, et al. Inhibition of Abeta proteotoxicity by paeoniflorin in caenorhabditis elegans through regulation of oxidative and heat shock stress responses[J]. *Rejuvenation Research*, 2018, 21(4): 304-312.
- [13] MA X H, DUAN W J, MO Y S, et al. Neuroprotective effect of paeoniflorin on okadaic acid-induced tau hyperphosphorylation via calpain/Akt/GSK-3beta pathway in SH-SY5Y cells[J]. *Brain Research*, 2018, 1690: 1-11.
- [14] MAINOE F, PICCOLO M, DE VITA S, et al. Down regulation of pro-inflammatory pathways by tanshinone IIA and cryptotanshinone in a non-genetic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Pharmacological Research*, 2018, 129: 482-490.
- [15] JIANG P, GUO Y, DANG R, et al. Salvianolic acid B protects against lipopolysaccharide-induced behavioral deficits and neuroinflammatory response: involvement of autophagy and NLRP3 inflammasome[J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 239.
- [16] WANG D, LIU L, LI S, et al. Effects of paeoniflorin on neurobehavior, oxidative stress, brain insulin signaling, and synaptic alterations in intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment in mice[J]. *Physiol Behav*, 2018, 191: 12-20.
- [17] 高爱社, 杨洒, 刘亚美, 等. 丹莪片对 $A\beta_{1-40}$ 致脑微血管内皮细胞损伤模型活性的影响[J]. *中医学报*, 2019, 34(9): 1936-1938.
- [18] SHIN S, KIM J H, CHO J H, et al. Mild cognitive impairment due to alzheimer disease is less likely under the age of 65[J]. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2015, 29(1): 26-31.
- [19] TANGEN G G, ENGEDAL K, BERGLAND A, et al. Relationships between balance and cognition in patients with

- subjective cognitive impairment, mild cognitive impairment, and Alzheimer disease[J]. *Phys Ther*, 2014, 94(8): 1123-1134.
- [20] WANG Q, LIU Y, ZHOU J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target[J]. *Translational Neurodegeneration*, 2015, 4: 1-19.
- [21] CARTER S F, HERHOLZ K, ROSA-NETO P, et al. Astrocyte biomarkers in Alzheimer's disease[J]. *Trends Mol Med*, 2019, 25(2): 77-95.
- [22] LI X H, DENG Y Y, LI F, et al. Neuroprotective effects of sodium hydrosulfide against beta-amyloid-induced neurotoxicity[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(4): 1152-1160.
- [23] TIAN Y, CHEN K Y, LIU L D, et al. Sevoflurane exacerbates cognitive impairment induced by Abeta 1-40 in rats through initiating neurotoxicity, neuroinflammation, and neuronal apoptosis in rat hippocampus[J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 3802324.
- [24] YAMAZAKI Y, KANEKIYO T. Blood-brain barrier dysfunction and the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1-19.
- [25] CHEIGNON C, TOMAS M, BONNEFONT-ROUSSELOT D, et al. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 450-464.
- [26] WANG B, HAN S. Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates deficits in synaptic plasticity and brain functions following traumatic brain injury[J]. *Cerebellum*, 2018, 17(4): 477-484.
- [27] THINAKARAN G, KOO E H. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(44): 29615-29619.
- [28] CAI Z, LIU N, WANG C, et al. Role of RAGE in Alzheimer's disease[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 36(4): 483-495.
- [29] FANG F, YU Q, ARANCIO O, et al. RAGE mediates Abeta accumulation in a mouse model of Alzheimer's disease via modulation of beta- and gamma-secretase activity[J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(6): 1002-1014.
- [30] LIU Y, LIANG C, LIU X, et al. AGEs increased migration and inflammatory responses of adventitial fibroblasts via RAGE, MAPK and NF-kappa B pathways[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 208(1): 34-42.
- [31] WANG J, ZHANG T, LIU X, et al. Aqueous extracts of *Se-enriched Auricularia auricular* attenuates D-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress and neuroinflammation via suppressing RAGE/MAPK/NF-kappa B pathway[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 704: 106-111.
- [32] JANELIDZE S, MATTSSON N, STOMRUD E, et al. CSF biomarkers of neuroinflammation and cerebrovascular dysfunction in early Alzheimer disease[J]. *Neurology*, 2018, 91(9): e867-e877.
- [33] ZULIANI G, CAVALIERI M, GALVANI M, et al. Markers of endothelial dysfunction in older subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia[J]. *J Neurol Sci*, 2008, 272: 164-170.
- [34] YOUSEF H, CZUPALLA C J, LEE D, et al. Aged blood impairs hippocampal neural precursor activity and activates microglia via brain endothelial cell VCAM1[J]. 2019, 25(6): 988-1000.
- [35] LEE Y K, KWAK D H, OH K W, et al. CCR5 deficiency induces astrocyte activation, Abeta deposit and impaired memory function [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2009, 92(3): 356-363.
- [36] WU F J, ZHAO Y, JIAO T, et al. CXCR2 is essential for cerebral endothelial activation and leukocyte recruitment during neuroinflammation[J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 98: 1-12.

(编辑: 梁进权)