

# 基于 Nrf2 信号通路探讨黄连解毒汤对阿尔茨海默病小鼠学习记忆的改善作用

孙亦轩<sup>1</sup>, 王俊力<sup>2</sup>, 刘欣<sup>2</sup>, 王睿<sup>1</sup>, 徐鑫梓<sup>1</sup>, 邵卫<sup>2</sup>, 陈国华<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖北中医药大学, 湖北 武汉 430065; 2. 武汉市第一医院, 湖北 武汉 430022)

**摘要:** **目的** 探究黄连解毒汤对阿尔茨海默病 (AD) 小鼠学习记忆损伤的改善作用及其机制。**方法** 将 12 只 9 月龄雄性 C57BL/6J 小鼠作为对照组, 60 只 3xTg-AD 小鼠随机分成模型组、多奈哌齐组 (0.65 mg/kg) 和黄连解毒汤低、中、高剂量组 (1.95、3.9、7.8 g/kg), 每组 12 只, 对照组和模型组灌胃予以生理盐水, 其余各组灌胃予以相应剂量多奈哌齐或黄连解毒汤。给药 1 个月后, 水迷宫实验检测小鼠学习记忆能力, ELISA 法检测小鼠海马组织氧化应激指标 (MDA、GSH 水平和 SOD 活性), Western blot 法检测小鼠海马组织细胞核内 Nrf2 蛋白表达和下游蛋白 HO-1、NQO1 表达。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠逃避潜伏期延长 ( $P<0.05$ ), 穿越平台次数、目标象限时间与路程减少 ( $P<0.05$ ), 海马组织 MDA 水平升高 ( $P<0.05$ ), SOD 活性和 GSH 水平降低 ( $P<0.05$ ), HO-1、NQO1、核内 Nrf2 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 黄连解毒汤各剂量组及多奈哌齐组小鼠逃避潜伏期缩短 ( $P<0.05$ ), 穿越平台次数、目标象限时间与路程增加 ( $P<0.05$ ), 海马组织 MDA 水平降低 ( $P<0.05$ ), SOD 活性和 GSH 水平升高 ( $P<0.05$ ), HO-1、NQO1、核内 Nrf2 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ); 与多奈哌齐组比较, 黄连解毒汤中、高剂量组小鼠海马组织 MDA 水平降低 ( $P<0.05$ ), SOD 活性和 GSH 水平升高 ( $P<0.05$ ), HO-1、NQO1、核内 Nrf2 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ )。**结论** 黄连解毒汤能改善 AD 小鼠的学习记忆能力, 其可能是通过激活 Nrf2 信号通路实现的, 且高剂量下抗氧化作用最佳。

**关键词:** 黄连解毒汤; 阿尔茨海默病; 氧化应激; Nrf2 信号通路

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2024)07-2371-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.07.042

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种受基因、环境等多重因素影响的慢性进展性退行性脑部疾病, 全世界大约有 5 000 万患者, 我国患者约占 25%, 作为老年人中主要致残原因之一其发病率逐年升高, 成为了危害社会和谐的重要因素<sup>[1]</sup>。据报道, AD 患者的大脑氧化负荷增加<sup>[2-3]</sup>, 血液中氧化应激生物标志物水平的升高反映了大脑中的这种应激<sup>[4-5]</sup>, 而核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路是机体抗氧化应激的最主要的防御机制之一。黄连解毒汤是根据“毒损脑络”理论提出的治疗 AD 的方剂<sup>[6]</sup>, 而大脑中富含脂质, 最易受氧化应激的损害<sup>[7]</sup>。课题组前期研究发现, 黄连解毒汤干预 APP/PS1 双转基因鼠可改善其学习记忆降低, 提高红细胞超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性, 降低丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平,

从而改善氧化应激<sup>[8]</sup>, 但两者相互作用的受体后信息传导系统仍缺乏完整的研究。本实验以 Nrf2 信号通路为切入点, 以清热解毒法的代表方剂黄连解毒汤为对象, 探讨该方法在 Nrf2 信号通路介导下改善 3xTg-AD 三转基因小鼠学习记忆的效应机制, 以期补充其治疗 AD 的作用靶点及阐释清热解毒法的科学内涵提供实验依据。

## 1 材料

1.1 动物 7 周龄 SPF 级 3xTg-AD 小鼠 60 只, 雄性, 购自常州卡文斯实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (苏) 2016-0010, 动物质量合格证号 320730210100008424]; 7 月龄 C57BL/6J 小鼠 12 只 (3xTg-AD 转基因小鼠的背景鼠), 购自武汉有度生物科技有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (鄂) 2021-0025], 均饲养于湖北中医药大学 SPF 级实验动物房, 室温 (25±3)℃,

**收稿日期:** 2023-02-28

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81673914); 湖北省武汉市卫生健康委青年项目 (WZ21Q08); 湖北省武汉市应用基础前沿项目 (2020020601012302)

**作者简介:** 孙亦轩 (1992—), 男, 博士生, 从事中西医结合治疗脑血管病和痴呆病研究。Tel: 13108657890, E-mail: 435151352@qq.com

**\* 通信作者:** 陈国华 (1965—), 男, 教授, 主任医师, 从事中西医结合治疗脑血管病和痴呆病研究。Tel: 13971318512, E-mail: cghys2008@126.com

**网络出版日期:** 2023-06-27

**网络出版地址:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20230626.1800.002.html>.

相对湿度 40%~55%，12 h/12 h 光照/黑暗交替，给予标准饲料喂养，自由进食饮水，喂养至 9 月龄。研究经湖北中医药大学动物伦理委员会批准（伦理号 HUCMS202107009）。

1.2 试剂与药物 黄连、黄芩、黄柏、栀子散装饮片（批号 20210408）均由武汉市第一医院中药房提供，经武汉市第一医院药剂科胡松主任鉴定为正品。方中黄连、黄芩、黄柏、栀子按 2020 年版《中国药典》中的配比（9：6：6：9）制成水煎液，浓缩至质量浓度为 1 g/mL，临用时以 0.9% 生理盐水配制。盐酸多奈哌齐片〔卫材（中国）药业有限公司，批号 2105056〕，临用时研磨成粉末，以 0.9% 生理盐水配制。MDA、SOD、GSH 检测试剂盒（批号 20210407、20210407、20210506，南京建成生物工程研究所）；兔多抗 Lamin B、兔多抗 Nrf2、兔多抗 HO-1（批号 20220309、20220121、20220102，美国 Affinity 公司）；胞浆核蛋白提取试剂盒（批号 20211009，大连美仑生物技术有限公司）；兔多抗 NQO1（批号 20210502，英国 Abcam 公司）；兔多抗 GAPDH（批号 20210603，杭州贤至生物科技有限公司）。

1.3 仪器 Morris 水迷宫动物行为学分析系统（安徽正华生物仪器设备有限公司）；酶标仪〔赛默飞世尔科技（中国）有限公司〕；电转仪、垂直电泳槽（北京六一仪器有限公司）；FlexStation 3 多功能酶标仪〔美谷分子仪器（上海）有限公司〕。

2 方法

2.1 分组及给药 将 12 只 9 月龄雄性 C57BL/6J 小鼠作为对照组，60 只 3xTg-AD 小鼠随机分成模型组、多奈哌齐组和黄连解毒汤低、中、高剂量组，每组 12 只。对照组和模型组灌胃予以生理盐水；按照小鼠与人的体表面积比例换算给药剂量<sup>[9]</sup>，多奈哌齐组灌胃予以 0.65 mg/kg 多奈哌齐溶液，黄连解毒汤低、中、高剂量组分别灌胃予以 1.95、3.9、7.8 g/kg 黄连解毒汤溶液，各组小鼠每天上午固定时间给药 1 次，连续 1 个月。

2.2 标本采集 小鼠随机挑选 6 只进行 Morris 水迷宫实验；另外 6 只腹腔注射 10% 水合氯醛（0.35 mL/100 g）麻醉，冰上取脑，剥离海马，生理盐水冲洗后放入 EP 管中保存，用于后续实验。

2.3 指标检测

2.3.1 Morris 水迷宫实验 Morris 水迷宫实验是评价学习记忆能力的一种经典的行为学实验方法<sup>[10]</sup>。给药结束后，进行为期 5 d 的定位航行实验，将小鼠面向池壁提示物方向分别从一、二、三、四象限轻轻放入水中，记录 1 min 内游泳轨迹，没有在规定时间内找到平台的小鼠则需要引导至平台上，每天每 1 个象限训练 1 次，记录每只小鼠找到平台所需要的时间，即逃避潜伏期，若入水后 60 s 内未能找到平台则记录为 60 s。实验第 6 天撤掉平台，于平台对角象限放入小鼠，方法同前，摄像系统自动记录 1 min 内穿越平台的次数、目标象限的时间与路程。

2.3.2 ELISA 法检测海马组织 MDA、GSH 水平和 SOD 活性 取小鼠海马组织适量，严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测 MDA、GSH 水平和 SOD 活性。

2.3.3 Western blot 法检测海马组织 HO-1、NQO1、胞核内 Nrf2 蛋白表达 取小鼠海马组织适量，按照细胞核蛋白提取试剂盒进行质核分离，BCA 法测定蛋白浓度，煮沸 8 min 进行变性，经 5%、8% SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜，置于 5% 脱脂奶中常温封闭 1 h，加入一抗 4 ℃ 孵育过夜，洗膜后加入相应二抗，常温摇床孵育 2 h，洗膜后采用 ECL 试剂曝光、显色，通过 Image-pro Plus 软件分析蛋白灰度值，计算相对表达量。

2.4 统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件进行处理，数据以（ $\bar{x}\pm s$ ）表示，拟合正态分布和拟合卡方者多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD 检验，拟合正态分布但不拟合卡方者 2 组间比较采用 Welch 近似 F 检验。 $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 Morris 水迷宫实验

3.1.1 定位航行实验 如表 1、图 1 所示，各组小鼠逃避潜伏期均逐渐缩短，提示其寻找隐藏水中平台的学习能力均逐渐得到提高。实验结束（即第 5 天）时，与对照组比较，模型组小鼠逃避潜伏期延长（ $P<0.05$ ）；与模型组比较，各给药组小鼠逃避潜期缩短（ $P<0.05$ ）；与多奈哌齐组比较，黄连解毒汤低剂量组小鼠逃避潜伏期延长（ $P<0.05$ ），黄连解毒汤中、高剂量组小鼠无明显变化（ $P>0.05$ ）。

表 1 各组小鼠逃避潜伏期比较（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=6$ ）

组别	逃避潜伏期/s				
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
对照组	40.15±3.14	33.46±3.52	25.36±4.23	20.48±2.79	16.74±2.45
模型组	58.75±2.05 <sup>*</sup>	56.23±1.06 <sup>*</sup>	53.24±1.79 <sup>*</sup>	50.46±2.30 <sup>*</sup>	45.74±1.34 <sup>*</sup>
黄连解毒汤低剂量组	44.25±1.94 <sup>#</sup>	42.11±1.93 <sup>#△</sup>	37.56±2.12 <sup>#△</sup>	36.12±1.89 <sup>#△</sup>	34.23±2.34 <sup>#△</sup>
黄连解毒汤中剂量组	43.78±2.14 <sup>#</sup>	38.72±2.81 <sup>#</sup>	35.61±2.45 <sup>#</sup>	31.57±1.61 <sup>#</sup>	26.75±1.89 <sup>#</sup>
黄连解毒汤高剂量组	43.56±3.01 <sup>#</sup>	38.42±1.78 <sup>#</sup>	33.12±1.99 <sup>#</sup>	30.23±1.82 <sup>#</sup>	25.22±2.12 <sup>#</sup>
多奈哌齐组	45.12±2.81 <sup>#</sup>	38.74±1.98 <sup>#</sup>	33.45±2.45 <sup>#</sup>	29.34±1.23 <sup>#</sup>	24.56±2.34 <sup>#</sup>

注：与对照组比较，<sup>\*</sup> $P<0.05$ ；与模型组比较，<sup>#</sup> $P<0.05$ ；与多奈哌齐组比较，<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

3.1.2 空间探索实验 如表 2、图 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠穿越平台次数、目标象限时间和路程减少（ $P<$

0.05）；与模型组比较，各给药组小鼠穿越平台次数、目标象限时间和路程增加（ $P<0.05$ ）；与多奈哌齐组比较，黄

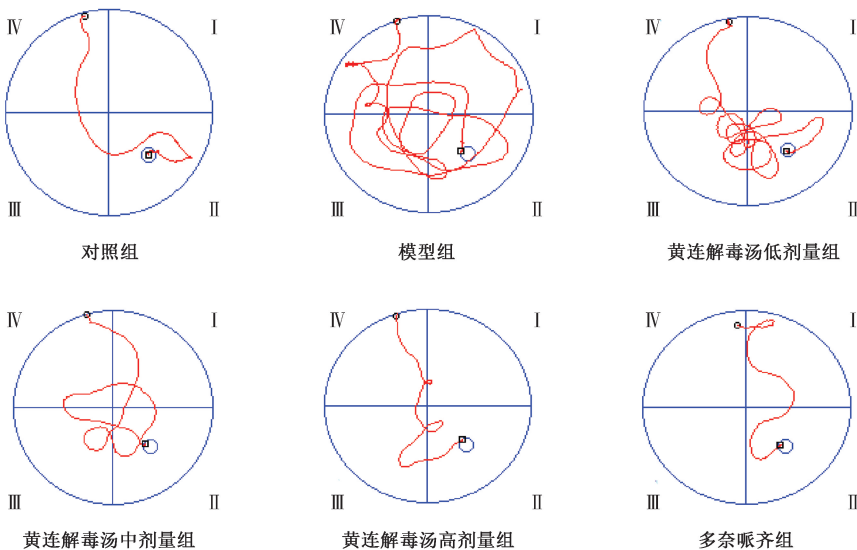


图 1 各组小鼠第 5 天定位航行实验路线图

表 2 各组小鼠穿越平台次数、目标象限时间和路程比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

组别	穿越平台次数/次	目标象限时间/s	目标象限路程/cm
对照组	3.95±1.23	36.87±5.12	180.24±12.46
模型组	0.43±0.78 <sup>*</sup>	17.36±5.92 <sup>*</sup>	107.25±10.73 <sup>*</sup>
黄连解毒汤低剂量组	1.56±0.88 <sup>#△</sup>	23.49±6.83 <sup>#△</sup>	121.53±9.46 <sup>#△</sup>
黄连解毒汤中剂量组	2.34±1.29 <sup>#</sup>	28.53±7.40 <sup>#</sup>	159.98±14.45 <sup>#</sup>
黄连解毒汤高剂量组	3.23±0.54 <sup>#</sup>	31.56±5.29 <sup>#</sup>	164.23±11.82 <sup>#</sup>
多奈哌齐组	3.45±0.52 <sup>#</sup>	33.45±3.46 <sup>#</sup>	170.24±7.45 <sup>#</sup>

注：与对照组比较，<sup>\*</sup> $P<0.05$ ；与模型组比较，<sup>#</sup> $P<0.05$ ；与多奈哌齐组比较，<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

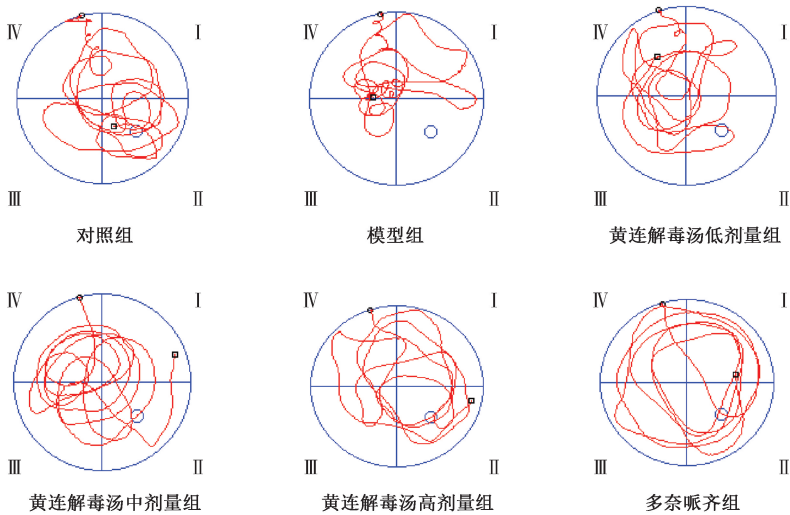


图 2 各组小鼠空间探索实验路线图

连解毒汤低剂量组小鼠穿越平台次数、目标象限时间和路程减少 ( $P<0.05$ )，黄连解毒汤中、高剂量组小鼠三者无明显变化 ( $P>0.05$ )。

3.2 黄连解毒汤对 AD 小鼠海马组织 MDA、GSH 水平和 SOD 活性的影响 如表 3 所示，与对照组比较，模型组小鼠海马组织 MDA 水平升高 ( $P<0.05$ )，SOD 活性和 GSH 水平降低 ( $P<0.05$ )；与模型组比较，各给药组小鼠海马组织 MDA 水平降低 ( $P<0.05$ )，SOD 活性和 GSH 水平升高

( $P<0.05$ )；与多奈哌齐组比较，黄连解毒汤中、高剂量组小鼠海马组织 MDA 水平降低 ( $P<0.05$ )，SOD 活性和 GSH 水平升高 ( $P<0.05$ )，黄连解毒汤低剂量组小鼠海马组织三者无明显变化 ( $P>0.05$ )。

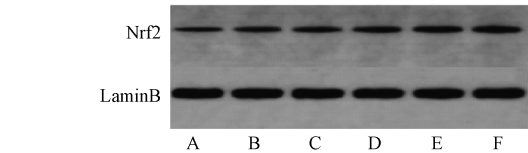
3.3 黄连解毒汤对 AD 小鼠海马组织细胞核内 Nrf2 蛋白表达的影响 如图 3、表 4 所示，与对照组比较，模型组小鼠海马组织细胞核内 Nrf2 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ )；与模型组比较，各给药组小鼠海马组织细胞核内 Nrf2 蛋白表达升

高 ( $P<0.05$ )；与多奈哌齐组比较，黄连解毒汤中、高剂量组小鼠海马组织细胞核内 Nrf2 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ )，(  $P>0.05$ )。

表 3 各组小鼠海马组织 MDA、GSH 水平和 SOD 活性比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

组别	MDA/( $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	SOD/( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	GSH/( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ )
对照组	0.41±0.02	113.80±7.75	3.45±0.07
模型组	1.17±0.10 <sup>*</sup>	49.72±5.47 <sup>*</sup>	1.87±0.03 <sup>*</sup>
黄连解毒汤低剂量组	0.73±0.04 <sup>#</sup>	67.45±1.13 <sup>#</sup>	2.64±0.08 <sup>#</sup>
黄连解毒汤中剂量组	0.63±0.01 <sup>#△</sup>	81.56±1.09 <sup>#△</sup>	2.88±0.04 <sup>#△</sup>
黄连解毒汤高剂量组	0.52±0.03 <sup>#△</sup>	91.38±2.22 <sup>#△</sup>	3.11±0.13 <sup>#△</sup>
多奈哌齐组	0.69±0.05 <sup>#</sup>	68.56±1.10 <sup>#</sup>	2.68±0.04 <sup>#</sup>

注：与对照组比较，<sup>\*</sup> $P<0.05$ ；与模型组比较，<sup>#</sup> $P<0.05$ ；与多奈哌齐组比较，<sup>△</sup> $P<0.05$ 。



注：A 为对照组，B 为模型组，C 为多奈哌齐组，D~F 分别为黄连解毒汤低、中、高剂量组。

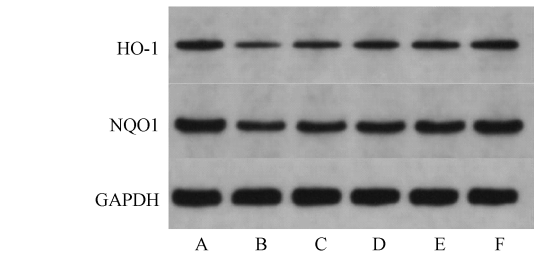
图 3 各组小鼠海马组织细胞核内 Nrf2 蛋白电泳条带

表 4 各组小鼠海马组织细胞核内 Nrf2 蛋白表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

组别	Nrf2/Lamin B
对照组	0.17±0.02
模型组	0.21±0.01 <sup>*</sup>
黄连解毒汤低剂量组	0.25±0.04 <sup>#</sup>
黄连解毒汤中剂量组	0.41±0.02 <sup>#△</sup>
黄连解毒汤高剂量组	0.49±0.03 <sup>#△</sup>
多奈哌齐组	0.27±0.04 <sup>#</sup>

注：与对照组比较，<sup>\*</sup> $P<0.05$ ；与模型组比较，<sup>#</sup> $P<0.05$ ；与多奈哌齐组比较，<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

3.4 黄连解毒汤对 AD 小鼠海马组织 HO-1、NQO1 蛋白表达的影响 如图 4、表 5 所示，与对照组比较，模型组小鼠海马组织 HO-1、NQO1 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ )；与模型组比较，各给药组海马组织 HO-1、NQO1 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ )；与多奈哌齐组比较，黄连解毒汤中、高剂量组小鼠海马组织 HO-1、NQO1 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ )，黄连解毒汤低剂量组两者无明显变化 ( $P>0.05$ )。



注：A 为对照组，B 为模型组，C 为多奈哌齐组，D~F 分别为黄连解毒汤低、中、高剂量组。

图 4 各组小鼠海马组织 HO-1、NQO1 蛋白电泳条带

#### 4 讨论

β-淀粉样蛋白 (β-amyloid, Aβ) 沉积引发活性氧自由基的产生，后者又反过来导致前者增加，发生线粒体功能

表 5 各组小鼠海马组织 HO-1、NQO1 蛋白表达比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

组别	HO-1/GAPDH	NQO1/GAPDH
对照组	0.50±0.07	0.67±0.03
模型组	0.17±0.07 <sup>*</sup>	0.30±0.08 <sup>*</sup>
黄连解毒汤低剂量组	0.25±0.09 <sup>#</sup>	0.39±0.08 <sup>#</sup>
黄连解毒汤中剂量组	0.35±0.09 <sup>#△</sup>	0.54±0.02 <sup>#△</sup>
黄连解毒汤高剂量组	0.45±0.05 <sup>#△</sup>	0.61±0.02 <sup>#△</sup>
多奈哌齐组	0.27±0.11 <sup>#</sup>	0.40±0.09 <sup>#</sup>

注：与对照组比较，<sup>\*</sup> $P<0.05$ ；与模型组比较，<sup>#</sup> $P<0.05$ ；与多奈哌齐组比较，<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

障碍、神经元细胞膜受损，最后促进 AD 的发生发展<sup>[11-12]</sup>，氧化应激不仅参与了 Aβ 的生成，还参与了 Tau 蛋白的磷酸化，神经炎症、线粒体功能、金属离子等与 AD 有着紧密联系<sup>[13]</sup>。本研究发现，黄连解毒汤能有效缩短小鼠的逃避潜伏期，增加第 6 天空间探索实验的指标，降低 MDA 水平，升高 SOD 活性及 GSH 水平；相较于野生型小鼠，APP/PS1 小鼠 MDA 水平升高，SOD 活性和 GSH 水平降低，说明黄连解毒汤可改善氧化应激状态。

核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 是一种转录因子，在机体内起着重要的调控氧化应激作用。Rojo 等<sup>[14]</sup>发现，Nrf2 缺乏与衰老之间有 7 个共同特征，与 AD 之间有 10 个共同特征，模型小鼠不溶性 p-tau、Aβ 水平增加。Nrf2 可能作为大脑衰老和 AD 之间的分子联系的假设<sup>[15-16]</sup>，一些 Nrf2 激活剂，如叔丁基对苯二酚和莱菔硫烷在体内 (急性 AD 小鼠模型中) 可以减少毒素诱导的 Aβ1-42 分泌，同时增加细胞活力和改善认知功能<sup>[17-18]</sup>。Milanesi 等<sup>[19]</sup>发现，许多炎症和氧化还原基因在 AD 患者的血液中差异表达，其中 Nrf2 和 NF-κB (氧化还原和炎症稳态的主要调节因子) 受到干扰，表明与 Nrf2 和 NF-κB 相关的氧化还原和炎症基因可能是监测轻度 AD 患者诊断和预后的生物标志物。大量证据表明，Nrf2 功能障碍在认知障碍和 AD 的发病机制中起作用；本实验发现，黄连解毒汤具有活化 Nrf2 的作用，促使 Nrf2 入核，增加细胞核内 Nrf2 的表达，是启动抗氧化应激反应的标志。

Nrf2 入核后会激活下游靶基因或重要解毒酶基因的转录，如 HO-1、NQO1。HO-1 是一种抗氧化酶，经其处理后的细胞能诱导 TNFα 和 IL-6 的产生，从而促进 Aβ 的吞噬作用和清除<sup>[20]</sup>。NQO1 是一种内源性抗氧化剂，NQO1 \* 2 多



态性失活是 AD 患者的主要危险因素<sup>[21]</sup>，黄益智方可上调 NQO1，从而抑制 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病小鼠海马神经元凋亡<sup>[22]</sup>。本实验发现，黄连解毒汤可增加 HO-1、NQO-1 等抗氧化蛋白的表达。

综上所述，黄连解毒汤可能是通过激活 Nrf2 信号通路改善 AD 小鼠的学习记忆能力，且高剂量组效果最好。

参考文献：

[ 1 ] Alzheimer’ s Disease International. World Alzheimer Report 2020[R]. 2020.

[ 2 ] Behl C, Moosmann B. Antioxidant neuroprotection in Alzheimer’ s disease as preventive and therapeutic approach[J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33(2): 182-191.

[ 3 ] Moosmann B, Behl C. Antioxidants as treatment for neurodegenerative disorders [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2002, 11(10): 1407-1435.

[ 4 ] Torres L L, Quaglio N B, de Souza G T, *et al*. Peripheral oxidative stress biomarkers in mild cognitive impairment and Alzheimer’ s disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2011, 26(1): 59-68.

[ 5 ] Beal M F. Oxidative damage as an early marker of Alzheimer’ s disease and mild cognitive impairment [J]. *Neurobiol Aging*, 2005, 26(5): 585-586.

[ 6 ] 王俊力, 刘 欣, 孙亦轩, 等. 基于“毒损脑络”病机探讨清热解毒法治疗阿尔茨海默病的临床研究[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(10): 2443-2447.

[ 7 ] 苏 芮, 韩振蕴, 范吉平, 等. “毒损脑络”理论在阿尔茨海默病中医研究领域中的意义[J]. *中医杂志*, 2011, 52(16): 1370-1371.

[ 8 ] 邱 昕, 陈国华, 汪 戩, 等. 黄连解毒汤对 APP/PS1 双转基因阿尔茨海默病小鼠自由基代谢及海马区病理形态学影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2011, 31(10): 1379-1382.

[ 9 ] 魏 伟, 吴希美, 李元建, 等. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 69.

[ 10 ] Morris R G M. Spatial localization does not require the presence of local cues[J]. *Learn Motiv*, 1981, 12(2): 239-260.

[ 11 ] Butterfield D A, Boyd-Kimball D. Oxidative stress, amyloid- $\beta$  peptide, and altered key molecular pathways in the pathogenesis and progression of Alzheimer’ s disease[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 62(3): 1345-1367.

[ 12 ] Jurcău M C, Andronie-Cioara F L, Jurcău A, *et al*. The link between oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in the pathophysiology of Alzheimer’ s disease: Therapeutic implications and future perspectives[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(11): 2167.

[ 13 ] 邓 磊, 张俊丽, 韩发彬. 转录因子 NRF2 在阿尔茨海默病中的作用及治疗研究 [J]. *生命科学*, 2022, 34(9): 1090-1100.

[ 14 ] Rojo A I, Pajares M, Rada P, *et al*. NRF2 deficiency replicates transcriptomic changes in Alzheimer’ s patients and worsens APP and TAU pathology[J]. *Redox Biol*, 2017, 13: 444-451.

[ 15 ] Wang C, Chen S, Guo H, *et al*. Forsythoside A mitigates Alzheimer’ s-like pathology by inhibiting ferroptosis-mediated neuroinflammation *via* Nrf2/GPX4 axis activation[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(5): 2075-2090.

[ 16 ] Bian Y, Chen Y, Wang X, *et al*. Oxyphylla A ameliorates cognitive deficits and alleviates neuropathology *via* the Akt-GSK3 $\beta$  and Nrf2-Keap1-HO-1 pathways *in vitro* and *in vivo* murine models of Alzheimer’ s disease [J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 1-12.

[ 17 ] Eftekharzadeh B, Maghsoudi N, Khodagholi F. Stabilization of transcription factor Nrf2 by tBHQ prevents oxidative stress-induced amyloid beta formation in NT2N neurons [J]. *Biochimie*, 2010, 92(3): 245-253.

[ 18 ] Kim H V, Kim H Y, Ehrlich H Y, *et al*. Amelioration of Alzheimer’ s disease by neuroprotective effect of sulforaphane in animal model[J]. *Amyloid*, 2013, 20(1): 7-12.

[ 19 ] Milanesi E, Dobre M, Cucos C A, *et al*. Whole blood expression pattern of inflammation and redox genes in mild Alzheimer’ s disease[J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 6085-6102.

[ 20 ] Zhang R L, Lei B X, Wu G Y, *et al*. Protective effects of berberine against  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity in HT22 cells *via* the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Bioorg Chem*, 2023, 133: 106210.

[ 21 ] Bian J T, Zhao H L, Zhang Z X, *et al*. Association of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 polymorphism and Alzheimer’ s disease in Chinese[J]. *Mol Neurosci*, 2008, 34(3): 235-240.

[ 22 ] 甄蓉蓉, 曲彦洁, 顾 超, 等. 地黄益智方对 APP/PS1 双转基因小鼠海马神经元凋亡和 Nrf2 通路蛋白的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2022, 49(1): 177-180; 221.