

# 大蒜素对血管性痴呆大鼠学习记忆能力的影响及作用机制

周伟<sup>1</sup>, 刘志刚<sup>2</sup>, 宋卫中<sup>1</sup>, 王建军<sup>2\*</sup>

(1. 河南大学, 河南 开封 475000; 2. 河南大学第一附属医院, 河南 开封 475000)

**[摘要]** 目的:探讨大蒜素(ALL)对血管性痴呆(VD)大鼠学习记忆能力的影响及其可能的作用机制。方法:采用改良双侧颈总动脉阻断法制备VD大鼠模型,造模成功后随机分为VD组,ALL低剂量组(ALL-L组)和ALL高剂量组(ALL-H组),对假手术组(S组)大鼠进行假手术,每组15只;ALL-L组和ALL-H组造模后分别股静脉注射ALL 5, 20 mg·kg<sup>-1</sup>, S组和VD组注射同体积生理盐水,每天1次,连续2周。治疗完成后用Morris水迷宫实验检测大鼠的学习记忆能力;苏木素-伊红(HE)染色观察海马区脑组织病理特点;检测大鼠脑组织中炎症因子肿瘤坏死因子-α(TNF-α),白细胞介素-6(IL-6), IL-1β的水平和氧化应激反应指标丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的含量;末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导dUTP缺口末端标记(TUNEL)法检测海马区细胞的凋亡率;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脑组织中凋亡及自噬相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), Bcl-2相关X蛋白(Bax),微管相关蛋白1轻链3(LC3) II, LC3 I及自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin-1)的表达。结果:与VD组比较,ALL-H组及ALL-L组大鼠的学习记忆能力明显优于VD组( $P<0.05$ ),海马组织中TNF-α, IL-6, IL-1β水平及MDA含量明显低于VD组( $P<0.05$ ), SOD及GSH-Px的活力明显高于VD组( $P<0.05$ ),细胞凋亡率明显低于VD组( $P<0.05$ ),且ALL-H组较ALL-L组更明显( $P<0.05$ )。ALL-L及ALL-H组海马组织中Caspase-3, Bax, LC3 II/LC3 I及Beclin-1表达水平明显低于VD组( $P<0.05$ ), Bcl-2表达水平明显高于VD组( $P<0.05$ ),且ALL-H组较ALL-L组更明显( $P<0.05$ )。结论:ALL可一定程度上改善VD大鼠的学习记忆能力,其机制可能与对炎症反应、氧化应激、细胞凋亡和自噬的抑制有关。

**[关键词]** 血管性痴呆(VD); 大蒜素; 炎症; 氧化应激; 凋亡

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R286 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)12-0082-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211295

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210420.1603.004.html>

**[网络出版日期]** 2021-4-21 9:08

## Effect of Allicin on Learning and Memory Ability of Vascular Dementia Rats and Its Mechanism

ZHOU Wei<sup>1</sup>, LIU Zhi-gang<sup>2</sup>, SONG Wei-zhong<sup>1</sup>, WANG Jian-jun<sup>2\*</sup>

(1. Henan University, Kaifeng 475000, China;

2. The First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of allicin (ALL) on learning and memory ability of rats with vascular dementia (VD) and the possible mechanism. **Method:** The VD rats induced by modified bilateral common carotid artery occlusion (BCCAO) were randomly divided into the VD group, low- and high-dose ALL (ALL-L and ALL-H) groups, and the sham operation (S) group, with 15 rats in each group. In the ALL-L and ALL-H groups, ALL was injected into the femoral vein at 5 mg·kg<sup>-1</sup> and 20 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively, while the same volume of normal saline was injected in the S and VD groups, once a day, for two successive weeks. Morris water maze (MWM) was used to test the learning and memory ability of rats. Hematoxylin and eosin

**[收稿日期]** 20210206(004)

**[基金项目]** 河南省教育厅科学技术研究重点项目(14B320008)

**[第一作者]** 周伟, 硕士, 讲师, 从事临床医学教学工作, Tel: 0371-23883139; E-mail: Zhouwei197709@qq.com

**[通信作者]** \* 王建军, 硕士, 主任医师, 从事血管性痴呆及阿尔茨海默症研究, Tel: 0371-22736826; E-mail: 2385342271@qq.com

(HE) staining was conducted to observe the pathological changes in hippocampal tissue, followed by the detection of inflammatory factors tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), and IL-1 $\beta$  as well as oxidative stress indexes malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in rat hippocampus. The apoptosis of hippocampal cells was detected by TdT-mediated dUTP Nick end Labeling (TUNEL) assay. The expression levels of apoptosis and autophagy-related proteins cysteinyl aspartate-specific protease-3 (Caspase-3), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), microtubule-associated protein light chain 3 II (LC3 II), LC3 I, and the mammalian homolog of yeast ATG6 (Beclin 1) in hippocampus were determined by Western blot. **Result:** The comparison with the VD group revealed that the learning and memory abilities of rats in the ALL-H and ALL-L groups were significantly improved ( $P<0.05$ ). The TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and MDA levels in hippocampus were lowered ( $P<0.05$ ), whereas the SOD and GSH-Px activities were enhanced ( $P<0.05$ ). The apoptosis rates were declined ( $P<0.05$ ), with an even lower rate noticed in the ALL-H group ( $P<0.05$ ). The expression levels of Caspase-3, Bax, LC3 II/LC3 I ratio, and Beclin-1 in the ALL-H and ALL-L groups were significantly down-regulated in contrast to those in the VD group ( $P<0.05$ ), while that of Bcl-2 was up-regulated ( $P<0.05$ ). The ALL-H group exhibited better performances than the ALL-L group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** ALL could improve the learning and memory ability of VD rats to some extent, which may be attributed to its inhibition against inflammatory reaction, oxidative stress, and neuronal apoptosis and autophagy.

[**Key words**] vascular dementia(VD); allicin; inflammation; oxidative stress; apoptosis

血管性痴呆(VD)是由脑血管疾病或反复脑缺血损伤导致的神经功能异常及痴呆综合征,主要临床表现为认知功能缺损、记忆力减退、注意力下降等,严重影响患者的生活质量<sup>[1]</sup>。目前VD的具体病理机制尚不明确,临床上仍然缺乏有效治疗VD的药物方案。现有研究表明VD发病机制与氧自由基损伤、炎症反应、兴奋性氨基酸毒性等因素有关<sup>[2-3]</sup>,这一系列反应可导致神经元出现过度自噬和凋亡,进而引起神经功能缺损。因此,有效地抑制炎症反应和氧化应激损伤,降低神经细胞的凋亡和自噬是预防和改善VD的重要途径之一<sup>[4-5]</sup>。大蒜素(ALL)已被国内外大量研究证实具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤及提高机体免疫功能等多种生理作用<sup>[6]</sup>,且有研究表明,ALL可以抑制脑缺血再灌注损伤中的小胶质细胞活化<sup>[7]</sup>,且对损伤的大脑神经元具有一定保护作用<sup>[8-9]</sup>。但目前关于ALL对脑损伤后VD的影响及其机制的研究尚不多见。本研究拟通过重复脑缺血损伤建立大鼠VD模型,并采用不同剂量的ALL进行干预,通过观察干预后大鼠认知及记忆能力的变化、对海马区脑组织炎症水平、氧化应激水平及神经元凋亡和自噬的变化,探讨ALL在VD发生中的保护作用及可能机制,以期为临床VD药物的研发提供一定的研究基础。

## 1 材料

1.1 动物 以Morris水迷宫实验筛选学习记忆正

常的健康雄性3月龄SPF级Wistar大鼠75只,体重220~280g,由河南大学医学院提供,检疫许可证号SYXK(豫)2016-0006。所有动物实验均通过河南大学第一附属医院伦理委员会批准通过(批号20140604)。

1.2 试剂 ALL注射液(江苏正大天晴药业股份有限公司,批号H32025639),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素(IL)-6,IL-1 $\beta$ 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒,超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒,丙二醛(MDA)含量检测试剂盒,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒及末端脱氧核苷酸转移酶介导dUTP缺口末端标记(TUNEL)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为SEKR-0009,SEKR-0005,SEKR-0002,BC0170-50T/24S,BC0020-50T/24S,BC1195-100T/48S,T2190-50T);DMEM培养基(美国Thermo Fisher公司,批号12634010),兔抗大鼠半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3),Bcl-2相关X蛋白(Bax),B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),微管相关蛋白1轻链3(LC3 I),LC3 II,自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin-1), $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)一抗,羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗(武汉三鹰生物科技有限公司,批号分别为19677-1,50599-2,12789-1,18725-1,18725-2,11306-1,66009-1,B900210),RIPA裂解液,苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,

批号分别为R0020,G1120-3)。

**1.3 仪器** DigBehv-MG型Morris水迷宫实验分析系统(上海吉量软件科技有限公司),CX23型光学显微镜(日本Olympus公司);BZ-X型荧光显微镜(日本基恩士公司);Invitrogen型电泳仪、凝胶成像分析系统(美国Thermo Fisher公司),BIO-RAD型转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 VD模型建立** 随机选择15只大鼠为假手术组(S组),其余60只大鼠用于VD模型大鼠的制备。采用改良双侧颈总动脉阻断法制备VD大鼠模型<sup>[10]</sup>,给予10%水合氯醛( $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )腹腔注射麻醉,去毛消毒后行颈正中切口,分离出双侧颈总动脉后用0号丝线结扎,阻断血流20 min,同时在大鼠距尾尖1 cm处断尾,放血约0.3 mL,然后松开丝线恢复血流10 min,并再次阻断血流20 min,重复3次,造成VD模型。S组大鼠只分离双侧颈总动脉,不结扎阻断,不做缺血处理,其余过程与模型组相同。造模判定标准<sup>[11]</sup>:术后7 d进行1次Morris水迷宫检测,以S组大鼠从不同入水点爬上站台消耗时间(即逃避潜伏期)的均值为参考值,逃避潜伏期超出参考值20%的大鼠视为VD造模成功。

**2.2 分组与给药** 造模结束后挑选出45只造模成功的大鼠进行后续实验,随机分为VD组,ALL低、高剂量组(ALL-L组和ALL-H组),每组15只。ALL-L组和ALL-H组股静脉注射ALL 5,  $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,S组,VD组注射相同体积生理盐水,每天1次,共14 d<sup>[12]</sup>。

**2.3 Morris水迷宫实验<sup>[13]</sup>** 给药结束后进行Morris水迷宫实验检测各组大鼠学习记忆能力的变化情况。①定位航行实验,将各组大鼠按第1,2,3,4象限的顺序依次面向池壁放入水中,记录120 s内成功爬上平台所需要的时间(大鼠找到平台并滞留其上5 s为成功),即逃避潜伏期。当大鼠超过120 s仍未找到平台时,则引导其至平台位置,并使其在平台上停留10 s后放回笼中,该类大鼠逃避潜伏期记为120 s;每只大鼠每天训练4次,早晚各2次,连续4 d。第5天进行测试,取4个象限逃避潜伏期时间的均值作为学习成绩的检测指标。②空间探索实验,在水迷宫实验第6天进行,撤除平台,将大鼠依次从4个象限放入水中放入水中,记录大鼠在120 s内穿越原平台位置的次数。取4个象限跨越平台次数的均数作为记忆成绩的最终结果。

**2.4 HE染色进行海马组织病理学观察** 行为学实

验结束后,每组随机取6只大鼠,10%水合氯醛麻醉后,断头取出脑组织并分离海马组织,10%中性甲醛固定后进行石蜡包埋,而后连续切片( $5\text{ }\mu\text{m}$ )。染色前,石蜡切片行二甲苯脱蜡,由高到低梯度乙醇水合,而后放置于苏木素染液中染色5 min,自来水冲洗30 min,1%盐酸分化10 s,而后放置于伊红溶液染色1 min,乙醇脱水后二甲苯透明。光镜下观察海马区脑组织形态。

**2.5 炎症因子检测** 每组取其余9只大鼠,10%水合氯醛麻醉后,断头取出脑组织,迅速冰上分离大鼠海马组织。将各组大鼠部分海马组织制成匀浆,采用ELISA试剂盒检测组织中TNF- $\alpha$ ,IL-6和IL-1 $\beta$ 的水平,操作严格按照试剂盒说明进行。

**2.6 氧化应激指标检测** 取大鼠海马组织匀浆,采用黄嘌呤氧化酶法测定SOD的活性,采用硫代巴比妥酸法测定MDA的含量,同时采用二硫代二硝基甲苯胺法测定GSH-Px活性,所有实验操作严格按照试剂盒操作进行。

**2.7 海马区细胞凋亡率检测** 取大鼠脑组织石蜡切片,采用TUNEL染色法检测凋亡细胞,具体操作参照TUNEL试剂盒说明书进行。在荧光显微镜下观察细胞凋亡情况,凋亡细胞为棕褐色;每张切片分别随机选取5个视野,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

**2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定蛋白表达** 采用细胞浆蛋白抽提试剂盒提取海马组织胞浆蛋白后采用BCA法测定蛋白浓度。取蛋白样品40  $\mu\text{g}$ 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳,转聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,采用脱脂奶粉室温封闭2 h,分别加Caspase-3,Bcl-2,Bax,LC3,Beclin-1和 $\beta$ -actin抗体(1:1 000)一抗4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。羊抗兔IgG二抗(1:2 000)室温孵育1 h。化学发光显影后采用Image J计算目的条带与内参条带灰度值的比值,即目的蛋白的相对表达量。

**2.9 统计学方法** 所有数据均采用SPSS 19.0进行分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- $t$ 检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对VD大鼠学习记忆力的影响** 与S组比较,VD大鼠第3天及第4天逃避潜伏期明显升高,穿越原平台次数明显降低( $P<0.05$ );与VD组比较,

ALL-L组, ALL-H组第3天及第4天逃避潜伏期明显降低, 穿越平台次数明显升高( $P<0.05$ ); 与ALL-L组比较, ALL-H组第3天及第4天逃避潜伏期明显降低, 穿越平台次数明显升高( $P<0.05$ )。随着训练

的进行, VD组寻找平台的时间逐渐高于S组, 而ALL-L及ALL-H组逐渐低于VD组, ALL可以改善大鼠记忆能力, 且ALL-H组较ALL-L组更明显, 见表1。

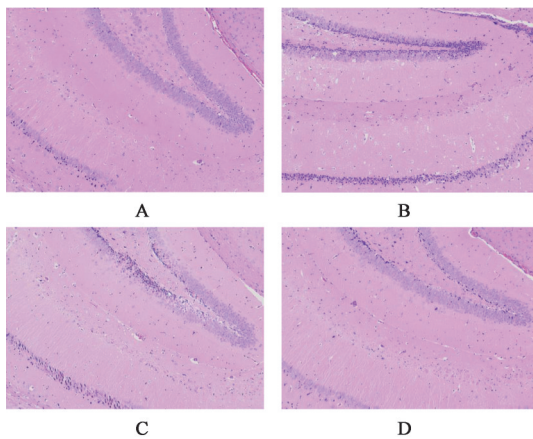
表1 各组大鼠各时间点逃避潜伏期及穿越平台次数( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Change of escape incubation period during training and times of crossing platform of rats in each group ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	逃避潜伏期/s				穿越平台次数
	第1天	第2天	第3天	第4天	
S	98.76±5.52	78.03±7.56	41.20±4.02	20.32±1.89	3.62±1.01
VD	100.12±5.69	82.33±6.59	73.04±4.07 <sup>1)</sup>	59.10±4.00 <sup>1)</sup>	1.06±0.77 <sup>1)</sup>
ALL-L	98.12±6.48	80.14±4.65	64.30±3.42 <sup>2)</sup>	45.54±3.21 <sup>2)</sup>	1.86±0.93 <sup>2)</sup>
ALL-H	97.54±6.59	78.90±5.78	52.22±3.71 <sup>3)</sup>	33.91±2.94 <sup>3)</sup>	2.46±0.66 <sup>3)</sup>

注: 与S组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ; 与VD组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ; 与ALL-L组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ (表2~5同)。

3.2 对VD大鼠海马组织形态的影响 HE染色结果显示, S组海马区细胞形态规则, 排列紧密, 与S组比较, VD组脑组织海马区域组织纹理紊乱, 部分细胞呈凋亡样改变, 细胞核变大变形, 着色较深; 与VD组比较, ALL-L组异常细胞比例降低, 组织形态上有一定改善, ALL-H组改善更为明显。见图1。



A.S组; B.VD; C.ALL-L组; D.ALL-H组(图2~4同)

图1 各组大鼠海马区域脑组织(HE, ×100)

Fig. 1 Brain tissue of hippocampal region of rats in each group (HE, ×100)

3.3 对VD大鼠脑组织炎症因子水平影响 与S组比较, VD组TNF- $\alpha$ , IL-6及IL-1 $\beta$ 的水平明显升高( $P<0.05$ ); 与VD组比较, ALL-L和ALL-H组TNF- $\alpha$ , IL-6及IL-1 $\beta$ 的水平明显降低, 且ALL-H组低于ALL-L组( $P<0.05$ )。见表2。

3.4 对VD大鼠脑组织氧化应激指标的影响 与S组比较, VD组MDA的含量明显增加, 抗氧化酶SOD及GSH-Px的活性明显下降( $P<0.05$ ); 与VD组

表2 各组大鼠脑组织炎症细胞因子水平( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Levels of inflammatory cytokines in brain tissue of rats in each group ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	ng·L <sup>-1</sup>		
	IL-6	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
S	25.02±3.78	22.73±3.04	52.02±3.08
VD	65.19±6.02 <sup>1)</sup>	57.33±5.06 <sup>1)</sup>	97.93±7.03 <sup>1)</sup>
ALL-L	51.09±5.54 <sup>2)</sup>	45.15±3.57 <sup>2)</sup>	75.37±4.44 <sup>2)</sup>
ALL-H	33.97±4.10 <sup>2,3)</sup>	36.28±3.87 <sup>2,3)</sup>	61.75±9.68 <sup>2,3)</sup>

比较, ALL-L组及ALL-H组MDA的含量明显降低, SOD及GSH-Px的活性明显升高( $P<0.05$ ), 且ALL-H组高于ALL-L组( $P<0.05$ )。见表3。

表3 各组大鼠脑组织MDA含量及SOD, GSH-Px活性比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Comparison of MDA content and activities of SOD and GSH-Px in brain tissue of rats in each group ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	GSH-Px/U·mL <sup>-1</sup>
S	6.75±1.50	119.60±9.52	371.15±20.98
VD	19.87±2.70 <sup>1)</sup>	57.90±5.11 <sup>1)</sup>	231.48±15.45 <sup>1)</sup>
ALL-L	12.64±1.52 <sup>2)</sup>	68.09±6.24 <sup>2)</sup>	288.62±18.19 <sup>2)</sup>
ALL-H	8.70±1.33 <sup>2,3)</sup>	91.71±7.59 <sup>2,3)</sup>	341.09±21.78 <sup>2,3)</sup>

3.5 对神经细胞凋亡的影响 结果显示S组偶见TUNEL阳性细胞, 与S组比较, VD组阳性细胞比例明显升高( $P<0.05$ ); 与VD组比较, ALL-L及ALL-H组阳性细胞明显减少, 凋亡率明显降低, 且ALL-H组较ALL-L组更明显( $P<0.05$ )。见图2, 表4。

与S组比较, VD组大鼠脑组织中促凋亡蛋白Caspase-3和Bax蛋白的表达水平明显升高, Bcl-2蛋白的表达水平明显降低( $P<0.05$ ); 与VD组比较, ALL-L和ALL-H组大鼠Caspase-3和Bax蛋白的表达水平明显降低, Bcl-2蛋白表达水平明显升高, 且

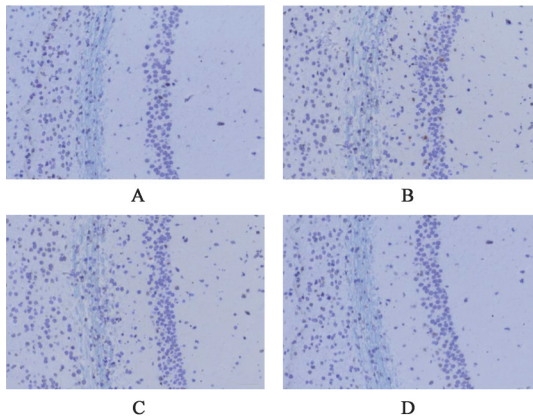


图2 各组大鼠海马区细胞凋亡情况 (TUNEL, ×200)

Fig. 2 Apoptotic of cells in hippocampal brain tissue of rats in each group (TUNEL, ×200)

表4 各组大鼠凋亡率及 Caspase-3, Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison of apoptosis rates and protein expression levels of Caspase-3, Bax and Bcl-2 in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	凋亡率/%	Caspase-3/ $\beta$ -actin	Bax/ $\beta$ -actin	Bcl-2/ $\beta$ -actin
S	3.23±1.04	0.16±0.02	0.26±0.03	0.82±0.09
VD	11.03±2.06 <sup>1)</sup>	0.68±0.06 <sup>1)</sup>	0.74±0.06 <sup>1)</sup>	0.29±0.04 <sup>1)</sup>
All-L	8.28±1.87 <sup>2)</sup>	0.52±0.05 <sup>2)</sup>	0.50±0.04 <sup>2)</sup>	0.43±0.03 <sup>2)</sup>
All-H	6.15±1.57 <sup>2,3)</sup>	0.31±0.03 <sup>2,3)</sup>	0.39±0.04 <sup>2,3)</sup>	0.67±0.08 <sup>2,3)</sup>

ALL-H 组较 ALL-L 组更明显 ( $P < 0.05$ )。见图3,表4。

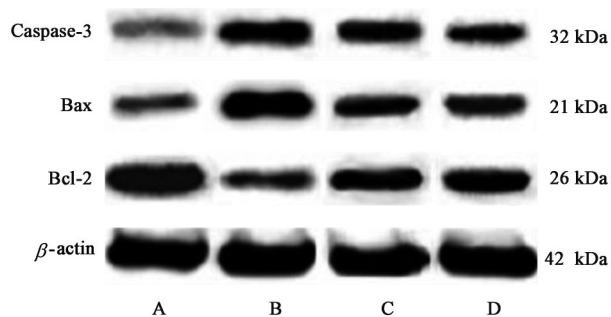


图3 各组大鼠 Caspase-3, Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Caspase-3, Bax and Bcl-2 in each group

3.6 对自噬蛋白 LC3 及 Beclin-1 表达的影响 自噬相关蛋白检测结果显示,与 S 组比较,VD 组大鼠海马组织中 LC3 II/LC3 I 及 Beclin-1 蛋白的表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ );与 VD 组比较,ALL-L 及 ALL-H 组大鼠海马组织中 LC3 II/LC3 I 及 Beclin-1 蛋白表达水平明显降低,且 ALL-H 组变化更明显 ( $P < 0.05$ )。见图4,表5。

#### 4 讨论

VD 是由脑血管疾病等引起的脑组织损伤进而

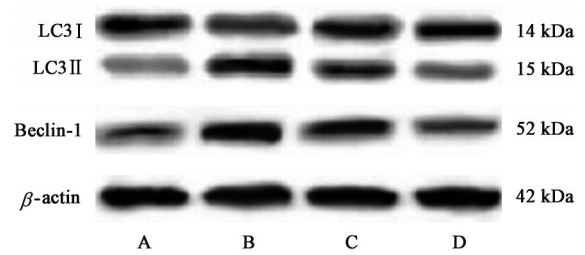


图4 各组大鼠 LC3 及 Beclin-1 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of LC3 and Beclin-1 protein expression levels in each group

表5 各组大鼠 LC3 及 Beclin-1 蛋白的表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Comparison of LC3 and Beclin-1 protein expression levels in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	LC3 II/LC3 I	Beclin-1/ $\beta$ -actin
S	0.36±0.04	0.39±0.05
VD	1.22±0.08 <sup>1)</sup>	0.65±0.04 <sup>1)</sup>
All-L	0.88±0.08 <sup>2)</sup>	0.52±0.03 <sup>2)</sup>
All-H	0.48±0.04 <sup>2,3)</sup>	0.44±0.04 <sup>2,3)</sup>

导致的一种进行性神经功能障碍,而学习记忆功能障碍是 VD 患者最典型也最严重的表现<sup>[14]</sup>。VD 的发病机制目前尚不明确,现有研究多认为 VD 的发生与氧化应激损伤、细胞异常凋亡、自噬及炎症反应有关。炎症因子是机体炎症及免疫应答的重要调节因子,可通过多种途径参与脑损伤过程,进而影响脑损伤的发展和预后,常见炎症因子有 IL-1 $\beta$ , IL-6 及 TNF- $\alpha$  等<sup>[15]</sup>。LI 等<sup>[16]</sup>研究发现, TNF- $\alpha$  水平对 VD 患者病情的严重程度具有一定的诊断意义; DUKIC 等<sup>[17]</sup>研究表明 IL-6 水平与 VD 的发生发展密切相关。此外,脑缺血发生时机体产生的大量氧自由基进而导致的氧化应激损伤是 VD 发生的另一重要机制。已有研究证实脑缺血损伤时活性氧自由基含量会显著升高,进而与脂质反应产生大量 MDA;同时 SOD 和 GSH-Px 等抗氧化酶的含量显著降低,导致组织氧化和抗氧化系统失衡,最终引起脑组织细胞损伤、凋亡和坏死<sup>[18-19]</sup>。本研究结果发现,VD 组大鼠海马组织中炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  的水平与 MDA 的含量均显著高于 S 组,抗氧化酶 SOD 与 GSH-Px 的活性明显低于 S 组,表明炎症细胞因子的释放及氧化应激反应参与了 VD 的发生,与既往的研究结果一致。自噬是将细胞内损伤、衰老或变性的蛋白质以及细胞器运输到溶酶体内进行消化清除以维持体内稳态平衡的重要途径<sup>[20]</sup>。目前研究发现,自噬对神经系统中内环境稳态的维持和神经元中蛋白正常功能的发挥具有重

要作用,自噬不足或过度都能导致神经元的异常及死亡。大量证据显示自噬参与了VD的发病过程<sup>[21]</sup>。LC3 II定位于前自噬体和自噬体,是自噬体膜的特异性标志物,通过检测LC3 II/LC3 I的变化,可以判断细胞自噬活动的强弱<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,与S组比较,VD组LC3 II/LC3 I和Beclin-1的蛋白表达水平明显上调,提示VD大鼠海马组织中自噬水平增加,与既往的研究结果一致<sup>[23]</sup>。

ALL又名二烯丙基二硫醚,是大蒜的主要生物活性物质,具有抗病毒、抗菌、抗肿瘤以及提高机体免疫功能等多种作用<sup>[24]</sup>。目前不少研究证实了ALL对神经功能的保护作用。胡爽等<sup>[25]</sup>研究发现,ALL可通过线粒体路径抑制幼年铅中毒大鼠海马组织细胞的凋亡率,从而保护大鼠的学习及记忆功能;于洋等<sup>[26]</sup>研究发现,ALL可通过增强脑组织总抗氧化力抑制衰老大鼠脑海马区的细胞凋亡,从而保护神经能力的下降。本研究结果显示,ALL干预能够降低VD大鼠的逃避潜伏期,增加穿越次数,表明ALL在一定程度上可以改善VD大鼠的学习记忆能力。研究表明,ALL的抗氧化作用具体表现在其能清除氧自由基和羟基自由基,显著提高SOD和GSH-Px的活性,降低体内MDA的含量,减轻由自由基引起的脂质过氧化反应,调节自噬反应并抑制凋亡发生<sup>[27-29]</sup>。已有大量研究证实了ALL与抗氧化反应及炎症反应中的作用,且从而发挥凋亡抑制和组织损伤保护作用。王建中等<sup>[30]</sup>研究显示,ALL可以通过抗氧化应激机制抑制氧糖剥夺再灌注的PC12细胞的损伤,降低其凋亡率;SAMRA等<sup>[31]</sup>研究显示ALL可以通过降低氧化应激、抑制炎性小体通路从而抑制对乙酰氨基酚诱导的肝损伤细胞的凋亡。结合现有研究发现,ALL与细胞自噬的间的作用根据作用内环境的不同而有差异。吴淑芬等<sup>[24]</sup>研究发现,在胃癌中ALL可以抑制内质网自噬并促使细胞发生应激性凋亡;刘重斌等<sup>[32]</sup>研究显示,ALL可以抑制慢性铁中毒大鼠的肝脏氧化应激并抑制细胞自噬和凋亡。本研究结果发现,与VD组比较,ALL低剂量及高剂量组大鼠海马组织中炎性细胞因子TNF- $\alpha$ ,IL-6,IL-1 $\beta$ ,MDA含量及神经细胞凋亡率明显降低,抗氧化酶SOD及GSH-Px的活性明显升高,说明ALL对VD大鼠的炎症反应和氧化应激水平有一定抑制作用;Western blot检测发现凋亡相关蛋白Caspase-3,Bax蛋白表达水平明显降低,Bcl-2蛋白表达水平明显升高;同时ALL组海马组织中LC3 II/LC3 I和Beclin-1的蛋白表达水

平明显低于VD组,提示ALL可能通过抑制氧化应激水平和炎症反应,抑制自噬蛋白的转化及合成,从而抑制海马区神经细胞自噬的发生和进一步凋亡的升高,减轻神经组织和功能的损伤。此外,在病理表现、炎症水平及氧化应激水平变化上ALL-H组均较ALL-L组更明显,提示ALL对VD的影响作用可能存在剂量依赖性。

综上所述,ALL可以通过抑制VD大鼠脑组织氧化应激水平和炎症反应,减少神经细胞的自噬和凋亡,从而改善VD大鼠学习记忆能力的降低,有望成为VD新药物开发的候选目标,也为临床治疗药物的进一步研究提供了一定实验基础及理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 单永琳,刘国华. 血管性痴呆的研究现状[J]. 医学综述,2017,23(8):1589-1594.
- [2] ZHAO X,LIU J,YANG S,et al. Ling-Yang-Gou-Teng-Decoction prevents vascular dementia through inhibiting oxidative stress induced neurovascular coupling dysfunction [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 222:229-238.
- [3] 鄢海良,赵阳,方兴,等. 基于网络药理学研究通窍活血汤治疗脑梗死后血管性痴呆的作用机制[J]. 中成药,2021,43(1):255-263.
- [4] 王丹,赵瑞珍,李小黎,等. 益肾调气法对血管性痴呆模型大鼠脑单胺神经递质的干预作用[J]. 世界中医药,2020,15(10):1395-1399.
- [5] LIU S, HE Y, SHI J, et al. Allicin attenuates myocardial ischemia reperfusion injury in rats by inhibition of inflammation and oxidative stress [J]. Transplant Proc, 2019, 51(6):2060-2065.
- [6] 杨兵,文进,陈月娥,等. 大蒜素对阿尔茨海默病高脂血症大鼠血脂代谢及炎性细胞因子的影响[J]. 实用医药杂志,2018,35(3):248-250.
- [7] 姜云传. 大蒜素抑制小胶质细胞活化在脑缺血再灌注模型中发挥抗炎效应的研究[J]. 免疫学杂志, 2017,33(10):850-855.
- [8] 任佳,高莉,谭雪,等. 类叶升麻苷对血管性痴呆大鼠学习记忆功能及氧化应激的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2018,27(9):777-782.
- [9] 赵军苍. 大蒜素对脑出血大鼠脑组织保护作用的研究[J]. 现代中西医结合杂志,2021,30(4):353-359.
- [10] 谭子虎,陈延,刘茜,等. 加减薯蓣丸对血管性痴呆大鼠海马CA1区细胞凋亡及PTEN信号通路的影响[J]. 中华中医药学刊,2017,35(10):2471-2474.
- [11] 王绪平,芮登俊,陈宇,等. Morris水迷宫实验评价血

- 管性痴呆大鼠模型的学习记忆能力[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(1): 99-100.
- [12] 王景周, 高东, 高唱, 等. 血管性痴呆大鼠海马IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 含量变化及大蒜素干预的研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(17): 1515-1517.
- [13] KALARIA R N. The pathology and pathophysiology of vascular dementia [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134(Pt B): 226-239.
- [14] ROMAY M C, TORO C, IRUELA-ARISPE M L. Emerging molecular mechanisms of vascular dementia [J]. *Curr Opin Hematol*, 2019, 26(3): 199-206.
- [15] 李佳蕊. 神经炎症反应在动物创伤性脑损伤中的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2019, 46(2): 214-217.
- [16] LI Y, ZHANG Z, ZHAO J, et al. Influences of Bushen Xingnao Decoction on expression of vascular endothelial growth factor, IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  in vascular dementia rats [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2015, 28(6 Suppl): 2317-2320.
- [17] DUKIC L, SIMUNDIC A M, MARTINIC-POPOVIC I, et al. The role of human kallikrein 6, clusterin and adiponectin as potential blood biomarkers of dementia [J]. *Clin Biochem*, 2016, 49(3): 213-218.
- [18] 谷晓林, 刘琳, 亓晓丽. 补肾益智汤联合丁基苯酞对老年血管性痴呆血液流变学及自由基损伤的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(12): 3217-3220.
- [19] DU S Q, WANG X R, ZHU W, et al. Acupuncture inhibits TXNIP-associated oxidative stress and inflammation to attenuate cognitive impairment in vascular dementia rats [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018, 24(1): 39-46.
- [20] WANG P, GUAN Y F, DU H, et al. Induction of autophagy contributes to the neuroprotection of nicotinamide phosphoribosyltransferase in cerebral ischemia [J]. *Autophagy*, 2012, 8(1): 77-87.
- [21] 吴玉芬, 周哲屹, 顿玲露, 等. 通窍活血汤对血管性痴呆大鼠海马CA1区自噬相关蛋白LC3及Beclin-1的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(7): 1547-1550.
- [22] JIANG P, MIZUSHIMA N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells [J]. *Methods*, 2015, 75: 13-18.
- [23] 高健, 王德秀, 王凤斌, 等. 血管性痴呆大鼠海马神经元LC3和Beclin-1的表达[J]. 神经解剖学杂志, 2018, 34(4): 467-472.
- [24] 娄净, 魏庆庆, 王大维, 等. 大蒜素对KG-1细胞增殖和凋亡的影响及分子机制[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(12): 2612-2617.
- [25] 胡爽, 郜振彦, 应晓兰, 等. 大蒜素对幼年铅中毒大鼠海马细胞凋亡损伤的抑制作用[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2018, 33(21): 1652-1656.
- [26] 于洋, 徐冶, 刘师兵, 等. 大蒜素对D-半乳糖致衰老模型大鼠学习记忆能力及脑组织氧化应激相关蛋白的影响[J]. 解放军医学杂志, 2015, 40(11): 880-884.
- [27] WU X, LI X, SONG Y, et al. Allicin protects auditory hair cells and spiral ganglion neurons from cisplatin-induced apoptosis [J]. *Neuropharmacology*, 2017, 116: 429-440.
- [28] WANG L, JIAO H, ZHAO J, et al. Allicin alleviates reticuloendotheliosis virus-induced immunosuppression via ERK/Mitogen-activated protein kinase pathway in specific pathogen-free chickens [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1856.
- [29] BA L, GAO J, CHEN Y, et al. Allicin attenuates pathological cardiac hypertrophy by inhibiting autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK/mTOR signaling pathways [J]. *Phytomedicine*, 2018, 58: 152765.
- [30] 王建中, 史杰, 邓同兴. 大蒜素对氧糖剥夺再灌注致PC12细胞损伤的保护作用及抗氧化应激机制[J]. 解剖学报, 2016, 47(4): 482-486.
- [31] SAMRA Y A, HAMED M F, EL-SHEAKH A R. Hepatoprotective effect of allicin against acetaminophen-induced liver injury: role of inflammasome pathway, apoptosis, and liver regeneration [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2020, 34(5): e22470.
- [32] 刘重斌, 王瑞, 董缪武, 等. 大蒜素对慢性铁中毒大鼠氧化应激与肝细胞自噬的抑制作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 26(4): 515-521.

[责任编辑 王鑫]