

龙生蛭胶囊对血管痴呆大鼠认知功能的影响及作用机制

孙晓丽^{1,2}, 张锴斌³, 郭淑贞², 刘燕², 王伟^{2,4*}

(1. 北京城市学院 生物医药学部, 北京 100094; 2. 北京中医药大学, 北京 100029;
3. 北京厚成医药科技开发有限公司, 北京 100044; 4. 广州中医药大学, 广州 510006)

[摘要] **目的:**研究龙生蛭胶囊对血管性痴呆(VD)大鼠的认知功能的影响及其可能的作用机制。**方法:**采用双侧颈总动脉永久结扎法造血管性痴呆模型,并将造模大鼠随机分为模型组(灌胃生理盐水)、喜得镇组(0.54 mg·kg⁻¹)、龙生蛭胶囊高、中、低剂量组(2.16、1.08、0.54 g·kg⁻¹),同时设置假手术组(灌胃生理盐水),每组大鼠15只,连续灌胃给药4周。Morris水迷宫实验测定大鼠的认知功能,苏木素-伊红(HE)染色考察大鼠脑组织海马区病理变化。检测大鼠血清中氧化应激指标超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的变化和炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-1 β 的水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脑组织中炎症蛋白、凋亡蛋白、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和黏附分子-1(ICAM-1)的蛋白表达。**结果:**Morris水迷宫结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期和明显延长,且穿越平台次数明显降低;与模型组比较,龙生蛭胶囊高、中剂量组大鼠逃避潜伏期所用时间明显缩短,大鼠穿越平台次数明显增多。与假手术组比较,模型组大鼠血清SOD和GSH-Px水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),MDA水平明显升高($P<0.05$),TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,龙生蛭胶囊高剂量组大鼠血清中SOD水平明显升高($P<0.05$),龙生蛭胶囊高、中、低剂量组大鼠血清中GSH-Px水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),MDA水平明显降低($P<0.05$),TNF- α 、IL-6和IL-1 β 水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。HE染色发现,龙生蛭胶囊能够改善VD大鼠海马区病理损伤。Western blot结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织Bax、NF- κ B、MMP-9及ICAM-1蛋白表达均显著升高($P<0.01$),Bcl-2、Akt和p-Akt蛋白表达均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),与模型组比较,龙生蛭胶囊高、中、低剂量组明显降低Bax、NF- κ B、MMP-9及ICAM-1蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$),明显提高Bcl-2蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$),龙生蛭胶囊高、中剂量组Akt蛋白表达明显升高($P<0.05$),龙生蛭胶囊高剂量组p-Akt蛋白表达显著升高($P<0.01$)。**结论:**龙生蛭胶囊可改善VD大鼠的认知功能,其机制可能与对氧化应激、炎症反应和细胞凋亡的抑制有关。

[关键词] 龙生蛭胶囊; 血管性痴呆; Morris水迷宫; 氧化应激; 炎症; 凋亡

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0072-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220936

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220306.2249.002.html>

[网络出版日期] 2022-03-08 12:34

Longshengzhi Capsules Improves Cognitive Function of Vascular Dementia Model Rats

SUN Xiao-li^{1,2}, ZHANG Kai-bin³, GUO Shu-zhen², LIU Yan², WANG Wei^{2,4*}

(1. School of Biological Medicine, Beijing City University, Beijing 100094, China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
3. Beijing Houcheng Medical Technology Co., Ltd., Beijing 100044, China;
4. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Longshengzhi capsules on the cognitive function of vascular dementia (VD) rats and reveal the underlying mechanism. **Method:** A VD rat model was established by permanent ligation of bilateral common carotid arteries. The model rats were randomly assigned into the

[收稿日期] 2021-10-20

[基金项目] 北京城市学院“城市新星计划”训练项目(202111418015)

[第一作者] 孙晓丽,博士,硕士生导师,从事心脑血管药理学及中药新药研究,E-mail:sdxhli@126.com

[通信作者] *王伟,博士,研究员,从事心脑血管药理学研究,E-mail:wangwei26960@126.com

model group (normal saline for gavage), Hydergine ($0.54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) group, and high-, medium-, and low-dose ($2.16, 1.08, \text{ and } 0.54 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively) Longshengzhi capsules groups, with 15 rats each group. Additionally, a sham group (normal saline for gavage) was designed in this study. Morris water maze test was conducted in the last week. Hematoxylin-eosin (HE) staining was employed for observation of the pathological changes in the hippocampal area of rat brain. Serum oxidative stress indicators including superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione peroxidase (GSH-Px) were examined. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin- 1β (IL- 1β) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of B cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), protein kinase B (Akt), p-Akt, nuclear factor- κ B (NF- κ B), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were determined by Western blot. **Result:** Morris water maze results showed that compared with sham operation group, the escape latency of rats in model group was significantly prolonged, and the number of crossing platform was significantly reduced. Compared with model group, the time of escape latency in Longshengzhi capsules high- and medium-dose groups was significantly shortened, and the number of crossing platform was significantly increased. Compared with sham operation group, SOD and GSH-Px levels in model group were significantly decreased ($P < 0.05, P < 0.01$), MDA levels were significantly increased ($P < 0.05$), TNF- α , IL-6 and IL- 1β levels were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, the level of SOD in serum of Longshengzhi capsules high-dose group was significantly increased ($P < 0.05$), the level of GSH-Px in serum of Longshengzhi capsules high-, medium- and low-dose groups was significantly increased ($P < 0.05, P < 0.01$), and the level of MDA was significantly decreased ($P < 0.05$). TNF- α , IL-6 and IL- 1β levels were significantly decreased ($P < 0.05, P < 0.01$). HE staining showed that Longshengzhi capsules could improve pathological damage in hippocampus of VD rats. Western blot results showed that compared with sham operation group, the protein expressions of Bax, NF- κ B, MMP-9 and ICAM-1 in model group were significantly increased ($P < 0.01$), and the protein expressions of Bcl-2, Akt and p-Akt were significantly decreased ($P < 0.05, P < 0.01$). The protein expression of Bax, NF- κ B, MMP-9 and ICAM-1 in Longshengzhi capsules high-, medium- and low-dose groups was significantly decreased ($P < 0.05, P < 0.01$), and the protein expression of Bcl-2 was significantly increased ($P < 0.05, P < 0.01$). The protein expression of Akt in Longshengzhi capsules high- and medium-dose groups was significantly increased ($P < 0.05$). The expression of p-Akt protein in Longshengzhi capsules high-dose group was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Longshengzhi capsules can improve the cognitive function of VD rats, and its mechanism may be related to the inhibition of oxidative stress, inflammatory response and apoptosis. **Conclusion:** Longshengzhi capsules can improve the cognitive function of VD rats by inhibiting oxidative stress, inflammatory reaction, and neuronal apoptosis.

[Keywords] Longshengzhi capsules; vascular dementia; Morris water maze experiment; oxidative stress; inflammation; apoptosis

痴呆是一种多见于老年群体的常见病,是以获得性认知功能减退为主要表现的综合征^[1],随着全球人口老龄化的增加,痴呆已成为严重影响人类健康的重大问题。我国痴呆的患病率占总人口的5%左右^[2],且痴呆的发病率呈逐年增加的趋势。血管性痴呆(VD)是老年期痴呆的常见类型之一,目前已成为仅次于阿尔兹海默病(AD)之后导致痴呆的第二大病因。通常由出血性脑血管病、缺血性脑血管病以及急、慢性缺氧性脑血管疾病等引起,可分为

多梗死性痴呆、皮质下动脉硬化性脑病、特殊部位梗死所致痴呆、分水岭梗死性痴呆、出血性痴呆,且容易造成认知功能障碍^[3-4]。

龙生蛭胶囊于2001年获批上市,是陕西步长制药的原研独家品种。该药是在补阳还五汤的基础上,经过处方加减而成,全方由黄芪、水蛭、当归、桃仁、红花、川芎、赤芍、桑寄生、刺五加、石菖蒲、地龙、木香12味中药组成。前期研究证明,龙生蛭胶囊治疗脑卒中具有很好的疗效^[5-6],临床也有报道龙

生蛭胶囊对于痴呆有一定的治疗作用^[7],但是针对龙生蛭胶囊对于痴呆认知功能的影响及其可能的作用机制,却没有相关的研究。本次实验采用双侧结扎大鼠颈动脉^[8],制备大鼠血管痴呆模型, Morris水迷宫实验考察龙生蛭胶囊干预给药后对痴呆大鼠学习认知功能的影响,并通过血清生化学检测,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测等方法,考察可能的作用机制,为龙生蛭胶囊的更进一步研究提供数据支持。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 90 只, 体重(220±20)g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号 SCXK(京)-2016-0006。动物实验均符合北京中医药大学动物伦理委员会标准(伦理号 BuCM-4-2018121802-4063)。

1.2 药材与试剂 龙生蛭胶囊(陕西步长制药股份有限公司, 批号 20171250); 喜得镇片(天津华津制药有限公司, 批号 7M801T); 丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(SOD)、微量还原型谷胱甘肽(GSH-Px)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20180412、20180418、20180908); 白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)检测试剂盒(拜尔迪生物科技, 批号分别为 L191105284、1331548705、13314128311); 兔抗大鼠 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)一抗(英国 Abcam 公司, 货号 ab59348); 蛋白激酶 B(Akt)、核转录因子- κ B(NF- κ B)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、 β -肌动蛋白(β -actin)一抗, 山羊抗兔二抗、RIPA 裂解液、显影定影试剂(武汉 Servicebio 公司, 货号分别为 GB11689、GB11997、GB11690、GB12001、GB23303、G2002、G2019); 磷酸化 Akt(p-Akt)一抗(美国 Affinity 公司, 货号 AF0908)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)一抗(瑞士 Bioss 公司, 货号分别为 bs-1854R、bs-4617R); 苏木素-伊红(HE)染液(武汉谷歌生物科技, 批号 G1005)。

1.3 仪器 水迷宫(北京众实迪科技发展有限责任公司); Neofuge 15R 型高速冷冻离心机(力康生物医疗科技控股有限公司); Chemray 240 型全自动生化仪(深圳雷杜生命科技有限公司); RM2016 型病理切片仪(上海来卡仪器有限公司); Epoch 型酶标仪(美国 BioTek 公司); DW-86L626 型超低温冰箱(青岛海尔集团); DYCZ-24DN 型双垂直电泳仪、DYCZ-40D 型转印电泳仪(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 造模及给药 采用双侧颈总动脉永久结扎方法^[9]制备大鼠 VD 模型。术前大鼠禁食不禁水 12 h, 以 10% 水合氯醛(3 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉, 碘伏清洁颈部皮肤后, 正中切口, 分离两侧颈总动脉, 采用 4 号手术线将大鼠右侧颈总动脉结扎后将皮肤缝合, 并在切口局部注射青霉素(0.2 万 U/只)防止感染。假手术组(12 只大鼠)只穿线不结扎。评定造模成功的标准参考文献[10-11]方法, 造模后第 3 天每组随机取 5 只大鼠进行 Morris 水迷宫行为学测评, 以假手术组逃避潜伏期为参考值, 计算各组逃避潜伏期与参考值之差, 若比值>20%, 则评定为有认知功能障碍的大鼠, 即造模成功。将造模成功大鼠随机分为 5 组: 模型组(生理盐水)、喜得镇组(0.54 mg·kg⁻¹)、龙生蛭胶囊高、中、低剂量(中药高、中、低剂量)组(2.16、1.08、0.54 g·kg⁻¹)^[12], 依据成人给药量换算的大鼠给药量设为中剂量组, 每组 15 只大鼠, 每天灌胃 1 次, 连续灌胃 28 d。

2.2 Morris 水迷宫实验^[13-14] 大鼠灌胃最后 1 周, 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, 包括定位航行和空间探索观察。

2.2.1 定位航行实验 设置水温保持(23±2) °C, 并将水池分为 A、B、C、D 四象限, 将各组大鼠按象限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 120 s。每只大鼠每天训练 4 次, 早晚各 2 次, 每次不同象限测定时间间隔为 30 min, 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。

2.2.2 空间探索实验 定位航行测试完成后次日, 移除实验平台, 从目标象限间隔距离最大的位置放入雄性大鼠, 测试雄性大鼠无月台作为目标的前提下, 凭借记忆搜索月台, 期间采用摄像录像仪器观察记录大鼠在 120 s 内的游泳活动路线, 应用 Image-pro Plus 系统分析实验动物进入目标象限的次数, 穿越平台的次数、大鼠移动轨迹的距离作为记忆能力的表现。

2.3 HE 染色观察大鼠海马组织病理形态学变化 实验结束后, 腹主动脉取血, 4% 多聚甲醛灌注后, 解剖取脑, 置于 4% 多聚甲醛中固定制备石蜡切片, 进行 HE 染色, 观察海马区病理变化。

2.4 血清中氧化应激指标检测 大鼠腹主动脉取血,室温下放置30 min,4 °C、4 000 r·min⁻¹离心(离心半径7.5 cm)处理2次,每次15 min,取上清,参照试剂盒说明书测试SOD、MDA、GSH-Px活性。

2.5 ELISA检测血清中炎症因子含量 取大鼠血清,采用ELISA试剂盒检测血清中TNF-α、IL-6和IL-1β的水平,操作严格按照试剂盒说明进行。

2.6 Western blot检测大鼠脑组织中蛋白表达 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1 h,分别加Bcl-2、Bax、Akt、p-Akt、NF-κB、ICAM-1、MMP-9和β-actin一抗4 °C孵育过夜,稀释倍数均为1:1 000。辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(1:3 000)室温孵育30 min。化学发光显影后采用Image J计算目的条带与内参条带灰度

值比值,即目的蛋白的相对表达量。

2.7 统计学分析 数据分析均使用SPSS 22.0统计分析软件进行处理,组间比较采取单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间两两比较用*t*检验,*P*<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对VD大鼠认知功能的影响 与假手术组比较,模型组大鼠从第2天开始,逃避潜伏期明显延长(*P*<0.05,*P*<0.01),与模型组比较,各给药组从第4天开始,逃避潜伏期明显缩短(*P*<0.05,*P*<0.01)。见表1。

与假手术组比较,模型组大鼠穿越平台次数明显减少,目标象限停留的时间显著缩短(*P*<0.01);与模型组比较,中药各剂量组大鼠穿越原平台次数明显增加,且在平台所在象限停留的时间也明显延长(*P*<0.05,*P*<0.01)。各组大鼠120 s内的平均运动速度差异无统计学意义。见表2。

表1 龙生蛭胶囊对VD大鼠逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
假手术组		106.5±38.2	75.6±44.9	60.1±28.2	35.8±31.0	19.2±12.7
模型组		115.4±10.2	111.0±22.3 ¹⁾	100.4±21.1 ²⁾	96.0±27.1 ²⁾	59.1±29.7 ²⁾
喜得镇组	5.4×10 ⁻⁴	94.5±41.8	88.7±44.9	74.0±30.0 ³⁾	65.8±29.1 ³⁾	24.7±23.1 ³⁾
中药高剂量组	2.16	109.3±20.3	106.8±33.4	86.8±46.7	63.7±26.9 ³⁾	27.1±7.9 ⁴⁾
中药中剂量组	1.08	110.7±19.6	89.2±42.6	83.7±42.1	63.8±29.4 ³⁾	31.8±25.3 ³⁾
中药低剂量组	0.54	111.5±18.0	104.6±31.5	84.4±34.8	62.8±22.8 ³⁾	37.2±10.4 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾*P*<0.05,²⁾*P*<0.01;与模型组比较³⁾*P*<0.05,⁴⁾*P*<0.01(表2-表6同)

表2 龙生蛭胶囊对VD大鼠空间探索的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of Longshengzhi capsules on spatial probe test in VD rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	穿越平台次数/次	目标象限停留时间/s	平均运动速度/cm·s ⁻¹
假手术组		5.9±1.4	37.3±8.1	18.7±1.7
模型组		2.3±0.9 ²⁾	25.9±4.7 ²⁾	19.1±2.0
喜得镇组	5.4×10 ⁻⁴	4.8±1.4 ⁴⁾	33.2±6.6	18.8±3.5
中药高剂量组	2.16	4.2±1.8 ⁴⁾	32.2±7.5 ⁴⁾	17.9±1.4
中药中剂量组	1.08	3.8±1.5 ³⁾	31.9±4.4 ³⁾	19.0±1.8
中药低剂量组	0.54	3.7±1.7 ³⁾	31.3±5.2 ³⁾	19.2±2.3

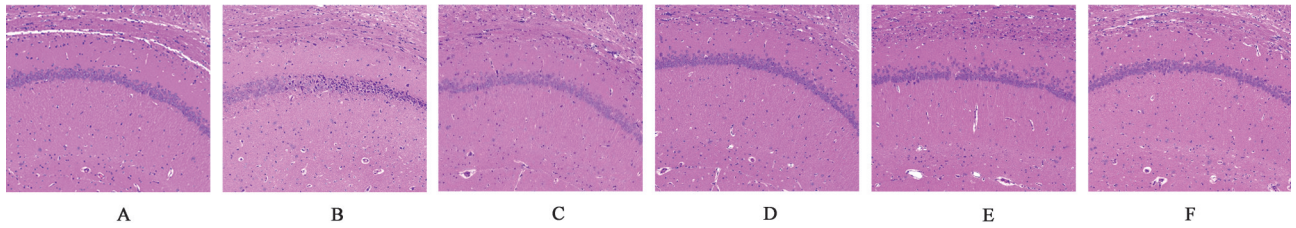
3.2 对VD大鼠脑组织病理形态学变化的影响 假手术组大鼠脑海马区结构正常,神经元细胞排列紧密,细胞结构清晰;模型组脑海马区结构异常,部分神经元细胞排列紊乱;各给药组脑海马区结构较完整,细胞排列较为整齐,排列紊乱细胞比例较模型

组减少。见图1。

3.3 对VD大鼠血清氧化应激指标的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清SOD和GSH-Px水平均明显降低(*P*<0.05,*P*<0.01),MDA水平明显升高(*P*<0.05);与模型组比较,喜得镇组和中药高剂量组大鼠血清中SOD含量明显升高(*P*<0.05,*P*<0.01),各给药组大鼠血清中GSH-Px水平均明显升高(*P*<0.05,*P*<0.01),MDA水平均明显降低(*P*<0.05)。见表3。

3.4 对VD大鼠血清炎症因子水平的影响 与假手术组比较,模型组血清中TNF-α、IL-6及IL-1β含量显著升高(*P*<0.01);与模型组比较,各给药组大鼠血清中TNF-α、IL-6及IL-1β含量均明显降低(*P*<0.05,*P*<0.01)。见表4。

3.5 对VD大鼠凋亡蛋白和炎症蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠凋亡蛋白Bax表达



注:A.假手术组;B.模型组;C.喜得镇组;D.龙生蛭胶囊高剂量组;E.龙生蛭胶囊中剂量组;F.龙生蛭胶囊低剂量组

图1 龙生蛭胶囊对VD大鼠海马组织病理形态学的影响(HE,×100)

Fig. 1 Effect of Longshengzhi capsules on pathological morphology of hippocampus in VD rats (HE,×100)

表3 龙生蛭胶囊对VD大鼠血清SOD、MDA和GSH-Px水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Longshengzhi capsules on level of SOD, MDA and GSH-Px in VD rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹	MDA /μmol·L ⁻¹	GSH-Px /U·mL ⁻¹
假手术组		645.39±70.14	5.14±0.74	906.86±180.24
模型组		571.47±38.72 ¹⁾	6.34±1.06 ¹⁾	644.57±189.73 ²⁾
喜得镇组	5.4×10 ⁻⁴	724.30±48.83 ⁴⁾	5.27±1.05 ³⁾	949.29±264.14 ³⁾
中药高剂量组	2.16	614.90±42.54 ³⁾	5.27±0.56 ³⁾	862.29±118.78 ⁴⁾
中药中剂量组	1.08	604.03±81.41	5.08±0.96 ³⁾	799.86±136.32 ³⁾
中药低剂量组	0.54	593.95±112.13	5.17±0.71 ³⁾	838.21±163.46 ³⁾

显著升高($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达显著减低($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠 Bax 蛋白表达

明显降低, Bcl-2 蛋白表达明显升高($P<0.05, P<0.01$);与假手术组比较,模型组 Akt, p-Akt 蛋白表达明显降低($P<0.05, P<0.01$), NF-κB 蛋白表达显著升高($P<0.01$),与模型组比较,各给药组 NF-κB 表达明显降低($P<0.05, P<0.01$),龙生蛭胶囊高、中剂量组 Akt 表达明显升高($P<0.05$),龙生蛭胶囊高剂量组 p-Akt 蛋白表达显著升高($P<0.01$)。见表5、图2。

3.6 对VD大鼠MMP-9及ICAM-1蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠ICAM-1和MMP-9蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组ICAM-1蛋白表达均明显降低($P<0.05, P<0.01$),中药高、中剂量组MMP-9蛋白表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表6、图3。

表4 生蛭胶囊对VD大鼠血清炎症因子IL-1β、IL-6、TNF-α水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Longshengzhi capsules on levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α in VD rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1β	IL-6	TNF-α
假手术组		317.30±41.71	248.81±97.36	308.47±57.31
模型组		798.40±49.06 ²⁾	678.75±113.17 ²⁾	833.70±122.80 ²⁾
喜得镇组	5.4×10 ⁻⁴	455.61±71.97 ⁴⁾	323.73±126.98 ⁴⁾	400.53±63.48 ⁴⁾
中药高剂量组	2.16	547.58±35.03 ⁴⁾	428.62±113.08 ⁴⁾	480.53±146.44 ⁴⁾
中药中剂量组	1.08	614.28±85.19 ⁴⁾	473.68±129.97 ⁴⁾	543.63±169.17 ⁴⁾
中药低剂量组	0.54	669.82±114.85 ⁴⁾	586.91±75.55 ³⁾	619.30±126.73 ⁴⁾

4 讨论

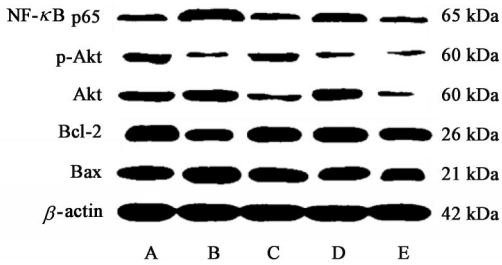
VD是由各种脑血管病变引起的脑组织损伤,临床以获得性智力损害和认知障碍为主要表现的综合征。传统中医将VD认为“痴呆”“呆病”范畴,《伤寒论》言:“其人喜忘者,必有蓄血……若气机紊乱、气血相失……,喜忘,发为痴呆。”认为瘀阻脑窍是引起痴呆原因。《太平圣惠方·补心益智及治健忘诸方》中提出:“气血俱虚,精神离散,恒多忧虑,耳目不聪,故令心智不利而健忘也。”认为气血不足同样可以引起痴呆。因此传统治疗中经常采用活血化瘀,补气活血的方药进行治疗^[15-16]。龙生蛭胶囊方中中以黄芪、水蛭为君药,《日华子本草》更言:“黄芪助气壮筋骨,长

肉补血。”《本经逢原》又称其“性虽温补,而能通调血脉,流行经络,可无碍于雍滞也。”《神农本草经》云:“水蛭主逐恶血、瘀血、月闭、破血瘕积聚,无子,利水道。”《本草经种录》又谓:“水蛭最喜食人之血,而性又迟缓善入,迟缓则生血不伤,善入则坚积易破,借其力以功久积之滞,自有力而无害也。”二者配伍,黄芪补气以治本,水蛭逐瘀以治标可收标本同治之功。方中以桃仁、红花、赤芍、川芎、当归为臣药,此五药皆为活血祛瘀之品,以助水蛭逐瘀通经之力,佐以刺五加、桑寄生。石菖蒲、地龙、木香,取其补肝肾、壮筋骨,芳香化浊开窍,通络理气之效。整方合用能够补气活血、逐瘀通络,起到治疗VD的作用。

表5 龙生蛭胶囊对VD大鼠凋亡蛋白及炎症蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Longshengzhi capsules on apoptosis and inflammatory protein expressions in VD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	Akt/ β -actin	p-Akt/ β -actin	NF- κ B/ β -actin
假手术组		0.47±0.04	0.86±0.05	0.36±0.04	0.34±0.03	0.32±0.01
模型组		0.77±0.05 ²⁾	0.44±0.03 ²⁾	0.25±0.02 ¹⁾	0.20±0.01 ²⁾	0.60±0.05 ²⁾
中药高剂量组	2.16	0.53±0.05 ⁴⁾	0.72±0.03 ⁴⁾	0.34±0.04 ³⁾	0.40±0.04 ⁴⁾	0.32±0.02 ⁴⁾
中药中剂量组	1.08	0.61±0.06 ⁴⁾	0.64±0.07 ³⁾	0.35±0.04 ³⁾	0.22±0.01	0.44±0.08 ³⁾
中药低剂量组	0.54	0.63±0.07 ³⁾	0.49±0.02 ³⁾	0.25±0.02	0.19±0.01	0.34±0.03 ⁴⁾



注:A.假手术组;B.模型组;C.中药高剂量组;D.中药中剂量组;E.中药低剂量组(图3同)

图2 大鼠凋亡及炎症相关蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of apoptosis protein and inflammatory protein expression levels in each group

表6 龙生蛭胶囊对VD大鼠MMP-9及ICAM-1蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Longshengzhi capsules on MMP-9 and ICAM-1 protein expressions in VD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ICAM-1/ β -actin	MMP-9/ β -actin
假手术组		0.57±0.03	0.34±0.02
模型组		0.89±0.02 ²⁾	0.52±0.02 ²⁾
中药高剂量组	2.16	0.57±0.04 ⁴⁾	0.33±0.01 ⁴⁾
中药中剂量组	1.08	0.67±0.02 ⁴⁾	0.45±0.03 ³⁾
中药低剂量组	0.54	0.81±0.02 ³⁾	0.53±0.02

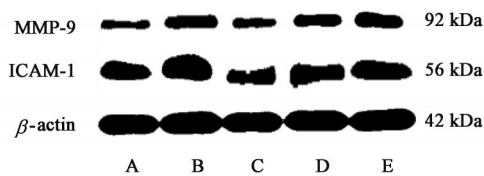


图3 各组大鼠ICAM-1和MMP-9蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of MMP-9 and ICAM-1 protein expression levels in each group

VD的发病机制尚不明确,但是许多研究表明VD的发生与氧化应激损伤^[17]、细胞凋亡^[18]和炎症反应^[19]有关。现代研究认为,VD发生时脑组织处于缺血缺氧的状态,此种状态下脑组织中星形胶质细胞会被活化,最终释放各种炎性物质,加重神经元的损伤。不仅如此,在缺血缺氧的状态下,氧化应激反应会产生大量的氧自由基,损伤神经细胞,

加重认知障碍^[20-21]。MDA是不饱和脂肪酸脂质过氧化产生的代谢物,是氧化应激的标志,SOD与GSH-Px是氧自由基的清除剂,反映机体抗脂质过氧化水平,并对抗自由基对缺血性脑组织的损害^[22-24]。氧化应激发生时同样伴随炎症反应的发生,氧化应激产生的活性氧可以激发炎症,诱导的凋亡及坏死机制,对脑组织造成损伤^[25-26]。NF- κ B信号通路是较为常见的参与氧化应激与炎症的信号通路,氧化应激的发生同时直接启动NF- κ B,脑组织中NF- κ B升高启动NF- κ B通路,并启动炎症细胞,加重神经炎症反应,导致细胞发生凋亡^[27]。凋亡途径主要包括Bcl-2蛋白家族、细胞色素C家族和Caspase家族。Bcl-2基因家族在脑缺血后神经元凋亡中起重要作用。Bcl-2和Bax是该家族的代表性蛋白,但在脑缺血后细胞凋亡的调控中具有相反的功能^[28-29]。Bcl-2家族成员活性受到Akt的调节,Akt是PI3K的下游靶点,是一类保守的信号转导酶家族,可以与Bcl-2家族中的一些因子反映抑制凋亡^[29-30]。MMP-9和ICAM-1是导致细胞凋亡及血管损伤的重要因子^[31-34]。MMP-9是基质金属蛋白酶家族成员,具有一定的底物特异性。尤其是在脑缺血发生时,能够增加炎性细胞浸润,促进炎症反应和神经细胞凋亡,从而加剧脑组织损伤,研究发现,在老年痴呆和脑梗死大鼠中MMP-9的含量显著升高^[35-36]。ICAM-1属于黏附分子中免疫球蛋白超家族成员之一,主要表达于神经元细胞、免疫细胞、血管内皮细胞、上皮细胞和神经胶质细胞,是重要的白细胞-内皮细胞间黏附分子之一,参与细胞间、细胞与基质间的信号交换,介导细胞黏附、识别、活化、增殖、分化、炎性反应,以及损伤修复等多种生理功能^[37-38]。脑缺血损伤后,炎性细胞因子IL-1 β 可启动胞内信号通路,使ICAM-1在血管内皮细胞表达增高。在黏附分子介导下白细胞与内皮细胞相互作用,白细胞变形移出血管并浸润到脑组织,导致继发性神经元死亡和梗死面积扩大^[39-40]。

本研究中模型组大鼠血清中炎性细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的水平与 MDA 的含量均显著高于假手术组,抗氧化酶 SOD 与 GSH-Px 的活性明显低于假手术组,表明炎性细胞因子的释放及氧化应激反应参与了 VD 的发生。Western blot 实验结果显示,模型组大鼠脑组织中 NF- κ B 蛋白, Bax 表达显著升高, Akt、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达显著减低说明 NF- κ B 信号通路和凋亡信号通路均参与了 VD 的发生,并且启动了 Akt 信号通路。龙生蛭干预给药可以显著的逆转 VD 大鼠上述氧化应激、炎症和凋亡的发生。Western blot 结果还显示,龙生蛭胶囊给药组显著降低了 VD 引起的 MMP-9 和 ICAM-1 表达的升高,说明龙生蛭胶囊还能够通过减轻 MMP-9 和 ICAM-1 的表达起到发挥对痴呆大鼠脑组织的保护作用。

综上所述,龙生蛭胶囊通过抑制 VD 大鼠体内氧化应激水平和炎症反应,减少脑组织细胞凋亡,从而起到改善 VD 大鼠的认知功能,不仅如此,龙生蛭胶囊还能够通过抑制 VD 大鼠脑组织中 MMP-9 和 ICAM-1 蛋白表达,这也为龙生蛭胶囊治疗脑痴的研究提供研究方向。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 陈晓春,张杰文,贾建平,等. 2018 中国痴呆与认知障碍诊治指南(一):痴呆及其分类诊断标准[J]. 中华医学杂志,2018,98(13):965-970.

[2] 胡以松. 我国痴呆流行病学调查现状[J]. 内科理论与实践,2015,10(2):80-86.

[3] 江冠亚,陈少云. 补肾益智汤治疗老年血管性痴呆的效果观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2016,14(2):215-216.

[4] 郭改艳,刘胜武. 血管性痴呆诊断、中医辨证及西医发病机制的研究进展[J]. 医学综述,2016,22(15):2978-2981.

[5] SUN X L, GUO S Z, WANG Y, et al. Neuroprotective effect of Longshengzhi capsule following permanent middle cerebral artery occlusion in rats[J]. J Trad Chin Med Sci, 2020, 7(1): 1-6.

[6] 孙晓丽,王勇,刘俊杰,等. 龙生蛭胶囊对脑卒中大鼠行为学的影响及脑组织的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(24):23-29.

[7] 郭宏伟,曾树林,杨金凤,等. 龙生蛭胶囊联合西药治疗气虚血瘀型血管性痴呆 48 例临床观察[J]. 中医杂志,2014,55(16):1393-1397.

[8] 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.

[9] 刘伟,胡鹏,冯波. 血管性痴呆大鼠模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报,2019,27(6):805-809.

[10] 高玲,赵建军,胡亚男,等. 基于 PI3K/Akt/Bad 信号通路探讨益髓解毒方对血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(18):58-63.

[11] 杨坤,宋小鸽,阮静茹,等. 艾灸改善血管性痴呆大鼠认知功能及对海马神经元凋亡相关蛋白的影响[J]. 中国针灸,2021,41(12):1371-1378.

[12] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2006:445.

[13] 罗俊,张科楠,肖帅,等. 镇心省睡益智方及其精油对 AD 模型小鼠学习记忆的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(9):74-81.

[14] 马莉,王佳惠,毛靖,等. 电针额区对血管性痴呆大鼠认知功能及 SIRT1/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 长春中医药大学学报,2022,38(1):43-47.

[15] 申海玉,查青,张慧楠,等. 血管性痴呆治疗的相关研究进展[J]. 西北药学杂志,2020,35(6):976-979.

[16] 朱云鹤,吴云虎,方向. 通窍活血汤治疗瘀血内阻型血管性认知障碍的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(2):139-143.

[17] 房娉平,阚敏宸,郭立静,等. 灯盏花素对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区病理改变及 Nrf2/HO-1 通路的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2021,19(16):2751-2756.

[18] 高玲,赵建军,胡亚男,等. 基于 PI3K/Akt/Bad 信号通路探讨益髓解毒方对血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(18):58-63.

[19] 李巧彤,程光宇,张晨,等. 电针对血管性痴呆大鼠学习记忆能力、炎症反应及自噬相关蛋白的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2021,30(34):3788-3793.

[20] 陈昭,吴林,蓝雪琳,等. 血管性痴呆发病机制中西医研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2022,24(1):40-44.

[21] 彭丽霖,孙景波,程骁. 血管性痴呆的研究进展[J]. 解剖学研究,2020,42(5):468-471.

[22] LI S, CHI Z, LI W, et al. *In vitro* toxicity of dimethyl phthalaet to human erythrocytes: From the aspects of antioxidant and immune functions[J]. Environ Pollut, 2019, 253(6): 239-245.

[23] DEVYATOV A A, FEDOROVA T N, STVOLINSKII S L, et al. Assessment of oxidative status of the brain and blood plasma in rats with modeled focal cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Bull Exp Biol Med, 2017, 163(2): 195-198.

- [24] 王小巍,张红艳,刘锐,等. 谷胱甘肽的研究进展[J]. 中国药理学杂志,2019,17(4):141-148.
- [25] 巫芳华,刘玉莲,高宇容,等. 补阳还五汤通过甲酰肽受体2减轻大鼠脑缺血再灌注后氧化应激损伤[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(18):9-15.
- [26] 王博,孙亚男,王继燕,等. 小檗碱通过启动SIRT1通路减轻脑缺血再灌注大鼠炎症及凋亡[J]. 中国动脉硬化杂志,2019,27(10):847-852.
- [27] 董永喜,王霞,董莉,等. 辛芍组方对缺血再灌注损伤后神经细胞氧化应激及NF- κ B信号通路的影响[J]. 山东医药,2016,56(42):5-8.
- [28] RADAK D, KATSIKI N, RESANOVIC I, et al. Apoptosis and acute brain ischemia in ischemic stroke [J]. *Cur Vasc Pharmacol*, 2017, 15(2):115-122.
- [29] GROSS A. Bcl-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(8):1243-1246.
- [30] 刘洁,王宝亮,钱仁义. 不同介入时间电针治疗对脑缺血后脑组织Bax、Bcl-2表达及PI3K/Akt信号通路的影响[J]. 陕西中医,2018,39(5):553-556,681.
- [31] 张晋霞,张志勇,张蕊,等. 白藜芦醇后处理对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障和ICAM-1、VCAM-1的影响[J]. 湖南师范大学学报:医学版,2021,18(6):39-41.
- [32] 张莹,徐冰,李庆祥,等. 黄芪多糖干预缺血-再灌注损伤大鼠心肌黏附分子ICAM-1、VCAM-1及p38通路的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(12):151-154.
- [33] 朱玲玲,张洋,窦勤玲,等. 槲皮素对U937细胞迁移和侵袭能力及MMP-2、MMP-9表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(16):146-151.
- [34] 马建鹏,常青,薛茜,等. 康脑液对脑缺血大鼠BDNF、MMP-9、ERK1/2表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(11):131-135.
- [35] 刘舒毓,王秋月,刘树民. 黄芪赤风汤对脑梗死大鼠模型的治疗作用及对脑组织ZO-1、Claudin-5、P-gp、MRP1蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(6):26-33.
- [36] 李俊娇,马景红,单铁英,等. 黄芪提取物对老年痴呆大鼠基质金属蛋白酶-9和紧密连接蛋白ZO-1表达的影响[J]. 职业与健康,2020,36(16):2191-2194.
- [37] NEPAL G, YADAV J K, KONG Y. Association between K469E polymorphism of ICAM-1 gene and susceptibility of ischemic stroke: An updated meta-analysis [J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2019, 7(7): e00784.
- [38] BUI T M, WIESOLEK H L, SAGIN R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis [J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 108(3):787-799.
- [39] 王文秀,邱连利,刘倩,等. “醒脑开窍”针法对大脑中动脉闭塞大鼠不同时相ICAM-1、MMPs-9表达的影响[J]. 针灸临床杂志,2020,36(9):61-65.
- [40] 袁丽君,涂星,李三字,等. 土家族麝针疗法对缺血性脑卒中大鼠下丘脑中DA、5-HT、ICAM-1和MCP-1含量的影响[J]. 中国老年学杂志,2021,41(4):840-844.

[责任编辑 孙丛丛]