

补肾活血方对血管性痴呆大鼠脑海马细胞凋亡及 ERK2, CREB 表达的影响

靳贺超¹, 于文涛^{1,2*}, 刘晓¹, 李强¹, 徐华洲¹, 张会珍¹, 马小顺¹

(1. 河北中医学院, 石家庄 050200;

2. 河北省心脑血管病中医药防治重点实验室, 石家庄 050091)

[摘要] **目的:**探讨补肾活血方治疗血管性痴呆(vascular dementia, VD)模型大鼠脑海马细胞凋亡的作用与机制。**方法:**75 只 SD 雄性大鼠经水迷宫筛选后,随机分为假手术组,模型组,尼莫地平组,补肾活血方高、低剂量(10.14, 5.07 g·kg⁻¹·d⁻¹)组,共 5 组,除假手术组外,其余各组采用两血管阻断法制备 VD 大鼠模型。补肾活血方高、低剂量组和尼莫地平组分别予补肾活血方药及尼莫地平片治疗 30 d,各组大鼠进行 Morris 水迷宫测试,并采用原位细胞凋亡检测法(TUNEL)测定脑海马细胞凋亡情况,免疫组化及蛋白免疫印迹(Western blot)法检测大鼠脑海马细胞外信号调节激酶 2(ERK2),环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)表达水平。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期延长($P < 0.05$),穿越平台次数及原平台停留时间均减少($P < 0.01$),脑海马细胞凋亡积分吸光度(IA)显著升高,平均灰度值显著下降($P < 0.01$),脑海马 ERK2, CREB(免疫组化)表达的 IA 明显下降,平均灰度值明显升高($P < 0.05$),蛋白表达量(Western blot)显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,补肾活血方高、低剂量组能提高大鼠水迷宫学习记忆能力,降低细胞凋亡 IA($P < 0.01$),升高平均灰度值($P < 0.01$),提高脑海马组织 ERK2, CREB 的 IA 和蛋白表达量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。 **结论:**补肾活血方药可能通过调控大鼠海马 ERK/CREB 信号通路,抑制海马细胞凋亡,从而改善 VD 大鼠学习记忆能力。

[关键词] 补肾活血方药; 血管性痴呆; 细胞凋亡; 细胞外信号调节激酶 2(ERK2); 环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)

[中图分类号] R22; R24; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0129-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181139

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180315.1609.044.html>

[网络出版时间] 2018-03-16 8:31

Effect of Bushen Huoxue Formula on Hippocampal Cells Apoptosis and ERK2, CREB Expression in Rats with Vascular Dementia

JIN He-chao¹, YU Wen-tao^{1,2*}, LIU Xiao¹, LI Qiang¹, XU Hua-zhou¹, ZHANG Hui-zhen¹, MA Xiao-shun¹

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

2. Hebei Key Laboratory of Chinese Medicine Research on Cardio-Cerebrovascular Disease, Shijiazhuang 050091, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Bushen Huoxue formula on hippocampal cells apoptosis in rats with vascular dementia (VD). **Method:** Totally 75 male SD rats were screened in Morris Water-maze screening, and then randomly divided into the sham-operated group, model group, Nimodipine group, Bushen Huoxue formula high and low dose (10.14, 5.07 g·kg⁻¹·d⁻¹) groups. Except the rats in the sham-operated group, all the other four groups received two-vessel occlusion (2-VO) method to establish VD models. The rats in the low-dose and high-dose Bushen Huoxue formula groups and the Nimodipine group received

[收稿日期] 20180129(005)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(H2015423057)

[第一作者] 靳贺超,在读硕士,从事脑血管病证治规律研究,E-mail:656832740@qq.com

[通信作者] *于文涛,博士,硕士生导师,教授,从事缺血性脑血管病证治规律研究,E-mail:ywtawen@163.com

drugs Bushen Huoxue formula tablets and Nimodipine tablets respectively for 30 days. After treatment, all rats were tested by Morris Water-maze; brain hippocampal cells apoptosis was detected by TUNEL method and the expression levels of rat hippocampal extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) and cAMP response element binding protein (CREB) were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Result:** As compared with sham-operated group, the time of escape latency was significantly increased ($P < 0.05$); the number of passing platform and the stayed time in the former platform quadrant were both decreased ($P < 0.01$); the integral absorbance (IA) of hippocampal cells apoptosis was significantly increased, and the average grey value was decreased significantly ($P < 0.01$); IA of hippocampal ERK2 and CREB (immunohistochemical) expression was significantly decreased, and the average grey value was significantly increased ($P < 0.01$); and the protein expression level (Western blot) was significantly decreased in model group ($P < 0.01$). As compared with the model group, Bushen Huoxue formula improved the learning and memory ability of rats, decreased the apoptosis IA ($P < 0.01$), increased the average grey value ($P < 0.01$), and increased the IA and protein expression of ERK2 and CREB in hippocampal tissues ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Bushen Huoxue formula may inhibit apoptosis of hippocampal cells and improve the learning and memory ability of VD rats through regulating ERK/CREB signaling pathways in hippocampal tissues of rat.

[**Key words**] Bushen Huoxue formula; vascular dementia; cell apoptosis; extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2); cAMP response element binding protein (CREB)

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是由于多种脑血管病变引起的认知功能障碍综合征, 是继 Alzheimer 病之后第 2 种常见的痴呆类型^[1]。据统计表明^[2], 1980 年至 2011 年我国 55 岁以上人群中 VD 占痴呆的构成比为 30.6%, 且患病率呈逐年上升的趋势。VD 确切的发病机制尚未完全清楚, 目前西医主要以改善脑循环, 促进细胞代谢、保护脑缺血损伤等药物为主^[3], 但远期疗效不甚理想。课题组前期研究表明, 肾虚证和血瘀证为 VD 最常见的证候, VD 患者记忆能力与肾精亏虚证候积分成显著相关性^[4]。补肾活血方是全国名老中医药专家杨牧祥教授治疗 VD 的经验方, 该方是根据《黄帝内经》中“肾藏精”、“肾精通于脑”及《医林改错》中“凡有瘀血也令人善忘”等理论, 在国医大师朱良春治疗痴呆名方健脑散基础上化裁而成, 具有补肾填精、活血开窍等功效, 经 20 余年临床验证, 疗效显著。前期临床试验表明^[5], 该方药可明显改善 VD 患者学习记忆能力, 降低事件相关电位 P300, 调节血脂代谢, 临床总有效率 83.72%。进一步实验研究表明, 该方可明显改善 VD 动物模型水迷宫学习记忆能力和脑海马病理组织损伤^[6], 该作用可能与诱导脑海马脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 及受体酪氨酸受体激酶 B (tropomyosin, TrkB) mRNA 表达有关^[7-8]。研究表明, BDNF 是脑缺血时重要的神经保护因子, 其与受体 TrkB 结合后, 可激活下游的细胞外信号调节激酶

环磷腺苷效应元件结合蛋白环磷腺苷效应元件结合蛋白 (ERK/CREB) 信号通路, 从而发挥神经元保护作用^[9]。脑缺血时, ERK/CREB 信号通路受到抑制, CREB 磷酸化受阻, 无法启动和调控下游转录因子, 使其不能产生新的神经突触联系, 最终导致学习记忆障碍^[10]。本研究在前期研究基础上, 从 BDNF 介导的 ERK/CREB 信号通路的角度探讨补肾活血方药改善学习记忆能力作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性清洁级 SD 大鼠, 7 周龄, 体重 250 ~ 300 g, 由河北医科大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(冀)2008-1003。动物实验符合河北中医学院动物伦理委员会标准 (编号 HUCM 2015-02)。

1.2 药物 补肾活血方药由人参、胡桃肉、制何首乌、益智仁、川芎、当归、丹参、郁金组成, 饮片由河北乐仁堂药店提供, 经河北中医学院中药教研室张一昕教授鉴定为正品, 符合 2015 年版《中国药典》规范; 尼莫地平片 (河北永丰药业, 批号 20140106, 20 mg/片)。

1.3 试剂 原位细胞凋亡检测法 (TUNEL) 试剂盒 (德国 Roche 公司, 货号 11684817910); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体, CREB 抗体, ERK2 抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 货号分别为 sc-25778, sc-186, sc-1647); VECTASTAIN ABC 免疫组化试剂盒 (美国 Vector 公司, 货号 PK-4001, 4002)。

1.4 仪器 HM-200型电子天平(日本AND公司);1-15K型高速冷冻离心机(美国Sigma公司);MDF-382E型超低温保存箱(日本三洋公司);DP73型数码显微镜(日本Olympus公司);FR-980型复日生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司);ZS-001型Moriss水迷宫(北京众实迪科技发展有限公司);HMIAS-2000型显微图像分析系统(武汉同济医科大学);DYY-III 40B型电泳槽,DYY-III 7B型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组与造模 大鼠75只,适应性喂养1周后,运用水迷宫实验剔除测试成绩极差的大鼠,剩余70只随机分为模型组,假手术组,补肾活血方高、低剂量组,尼莫地平组5组,每组14只。大鼠术前12h禁食,不禁水。配置10%水合氯醛溶液按 $400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量腹腔注射麻醉。麻醉后密切观察大鼠呼吸节律,待翻正反射消失后,仰卧位固定于手术台,采用改良后的两血管阻断法(bilateral common artery occlusion 2-VO)造模^[11],颈前手术区域备皮,酒精消毒,行颈前正中切口,钝性分离皮下结缔组织及颈前肌群,分离双侧颈总动脉并结扎,避免刺激或结扎迷走神经,观察大鼠生命体征,缝合皮下组织、皮肤,碘伏伤口消毒,术后连续3d肌注庆大霉素。假手术组仅分离双侧颈总动脉但不结扎。剔除标准:死亡、术后瘫痪。术后3d各组剩余数:假手术组12只,模型组11只,补肾活血高剂量组12只,补肾活血低剂量组11只,尼莫地平组11只。

2.2 药物制备 补肾活血方药,制何首乌15g,人参10g,胡桃肉15g,益智仁15g,川芎15g,丹参15g,当归15g,郁金10g。上述中药称质量,放入烧杯,加蒸馏水500mL,水煎30min取药汁,依据陈奇^[12]大鼠与人药物剂量折算方法分别浓缩至含生药 $1.014\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (高剂量)和含生药 $0.507\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (低剂量)2种水提液,至4℃冰箱保存备用。尼莫地平片用水配置为 $1.106\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混悬液,至4℃冰箱保存备用。

2.3 给药 造模成功后3d各药物治疗组按体质量进行给药干预,低剂量组每日按 $5.07\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量灌服药液;高剂量组每日按 $10.14\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量灌服药液;尼莫地平组每日按 $0.011\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 体质量灌服尼莫地平混悬液,持续30d。模型组、假手术组每日给予相同体积的生理盐水灌胃,持续30d。

2.4 样本采集与处理 给药结束后每组随机选取3只SD大鼠断头处死,取大脑,石蜡包埋,冠状切

片,制成 $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚切片,分别通过免疫组织化学法检测海马组织ERK2,CREB的表达及TUNEL染色法检测海马神经细胞凋亡水平。剩余大鼠进行Morris水迷宫测试,行为学检测结束后,将各组大鼠断头处死,取海马组织放入液氮1h后转入-80℃冰箱保存,应用蛋白免疫印迹法(Western blot)对各组大鼠脑海马组织ERK2,CREB的蛋白表达进行检测。

2.5 免疫组化检测 ERK2, CREB 的表达 取脑切片常规脱蜡至水,磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液浸泡5min,微波炉抗原修复10min,自然冷却至室温。0.3% H_2O_2 孵育35min, PBS清洗5min, 3次,滴加正常山羊封闭血清,室温孵育35min, 勿洗;滴加用PBS稀释的抗体ERK2(1:75), CREB(1:75), 4℃冰箱过夜;次日, 37℃温箱放置30min, PBS清洗5min, 3次, 拭干水分, 滴加生物素标记的2抗, 37℃孵育35min; PBS冲洗5min, 3次, 拭干水分后滴加SP复合物, 37℃孵育35min, PBS清洗5min, 3次, 显色剂显色, 脱水, 透明, 中性树胶封片。采用图像分析系统对免疫组化病理图片进行定量分析, 选取积分吸光度IA和平均灰度值反映染色阳性部位表达强度, 在光镜200倍视野下, 随机选取2个视野, 图像分析系统自动计算其IA和平均灰度值, 指标表达强度与IA成正比, 与平均灰度值成反比, 每组取12个数据纳入最后的数据分析。

2.6 原位细胞凋亡检测法(TUNEL)检测海马神经细胞凋亡水平 取脑切片脱蜡脱水, PBS缓冲液漂洗后加3% H_2O_2 , 放置37℃温箱40min后PBS缓冲液漂洗, 加蛋白酶K后孵育10min, PBS缓冲液漂洗。配置TUNEL反应混合物放于切片上, 放置37℃温箱1h, PBS缓冲液漂洗, 添加转化剂-POD, 放置温箱30min后清洗, DAB显色, 苏木素轻度复染。脱水、透明、封片。采用图像分析系统对TUNEL染色的病理图片进行定量分析, 方法同上。

2.7 行为学检测 设定水迷宫水深35cm, 水温22℃, 将水迷宫4个象限的中点作为大鼠入水点, 水迷宫分析系统自动记录2min内大鼠找到平台的位置以及在平台上停留超过2s的时间, 即逃避潜伏期(定位航行实验), 后将平台撤除, 将大鼠放入水中任选一入水点, 记录大鼠2min内跨越原平台的次数及停留时间(空间探索实验)。

2.8 Western blot 检测 ERK2, CREB 蛋白表达 取脑海马组织100mg, 冲洗后加入裂解液($100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 放冰上剪碎。超生破碎后, $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4℃离心20min, 取上清液, 测蛋

白浓度,将蛋白样品分装, - 80 ℃ 冰箱保存备用。配分离胶及浓缩胶,准备样品,每孔使用总蛋白量 50 μg,加入 Sample buffer 2.5 μL 再使用双氧水补充至 10 μL,离心,100 ℃ 水浴 5 min 后置于冰上,上样,每个孔上样 10 μL,溴酚蓝达底部时即停止电泳。提前配好转膜液 4 ℃ 欲冷,将凝胶切下在转膜液中平衡 15 min,制备三明治结构,在恒压下半干式蛋白质印迹转膜槽转膜 30 min,5% 牛血清白蛋白封闭液封闭 2 h,聚山梨酯(Tween)-PBS 溶液清洗 3 遍,封一抗(1:250)。Tween-PBS 溶液清洗 10 min,共 3 遍,二抗(1:6 500)孵育 1 h,Tween-PBS 清洗 3 遍,每次 10 min,采用 ECL 发光试剂显色,曝光,洗片。采用 Quantity One 分析软件进行灰度分析,以目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值表示蛋白相对表达量。

2.9 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料的比较采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组和多组间比较采用 *t* 检验和单因素方差分析检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠海马细胞凋亡的影响 与假手术组比较,VD 模型组大鼠海马细胞凋亡 IA 升高($P < 0.01$),平均灰度值下降($P < 0.01$);与模型组比较,补肾活血方高、低剂量组大鼠海马细胞凋亡 IA 降低($P < 0.01$),平均灰度值升高($P < 0.01$)。见表 1,图 1。

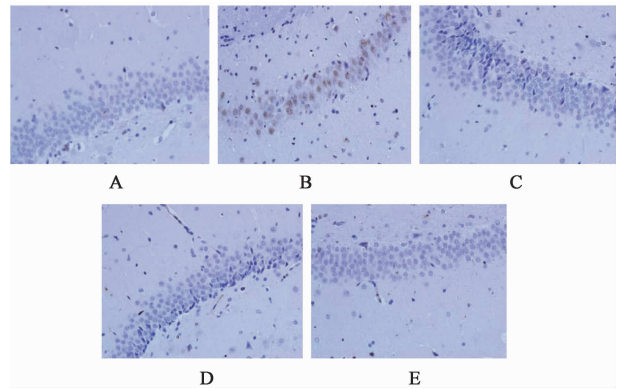
3.2 对大鼠空间学习记忆能力的影响 定位航行实验:与假手术组比较,VD 模型组大鼠逃避潜伏期延长($P < 0.05$);与 VD 模型组比较,补肾活血方明显改善 VD 大鼠学习记忆能力($P < 0.05$, $P < 0.01$);各治疗组之间差异无显著。空间探索实验:与假手术组比较,VD 模型组大鼠穿越原平台次数及在原平台停留时间均减少($P < 0.01$);与 VD

表 1 补肾活血方药对大鼠海马细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Bushen Huoxue formula on neuronal apoptosis in rats hippocampus ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	IA	平均灰度值
假手术	-	0.078 5 ± 0.006 7	2.128 6 ± 3.294 5
模型	-	0.188 3 ± 0.036 1 ²⁾	1.670 6 ± 1.279 4 ²⁾
补肾活血方药	10.04	0.095 3 ± 0.014 2 ⁴⁾	2.050 4 ± 6.512 2 ⁴⁾
	5.07	0.106 0 ± 0.039 5 ⁴⁾	2.008 4 ± 1.640 7 ⁴⁾
尼莫地平	0.011	0.110 9 ± 0.029 4 ⁴⁾	1.982 4 ± 1.276 4 ⁴⁾

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 2~4 同)。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 补肾活血高剂量组;D. 补肾活血低剂量组;E. 尼莫地平组(图 2~4 同)

图 1 补肾活血方药对大鼠海马细胞凋亡的影响(TUNEL, ×200)

Fig.1 Effect of Bushen Huoxue formula on neuronal apoptosis in rats hippocampus(TUNEL, ×200)

模型组比较,补肾活血方明显改善 VD 大鼠学习记忆能力($P < 0.05$, $P < 0.01$);各治疗组之间差异无显著。见表 2。

3.3 对大鼠脑海马 ERK2, CREB 表达(免疫组化)的影响 与假手术组比较,VD 模型组大鼠脑海马 ERK2, CREB 表达的 IA 下降($P < 0.05$),平

表 2 补肾活血方药对大鼠逃避潜伏期、穿越平台次数、原平台停留时间的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Bushen Huoxue formula on time of rat escape latency, number of through platform and activity time in platform ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ g·kg ⁻¹	n	定位巡航实验 逃避潜伏期/s	空间探索实验	
				穿越平台数/次	原平台停留时间/s
假手术	-	9	24.801 ± 15.516	9.44 ± 1.81	65.01 ± 20.99
模型	-	8	55.920 ± 25.266 ¹⁾	3.75 ± 1.28 ²⁾	22.69 ± 6.98 ²⁾
补肾活血方药	10.04	9	29.861 ± 12.996 ⁴⁾	8.11 ± 1.76 ⁴⁾	61.83 ± 12.80 ⁴⁾
	5.07	8	36.735 ± 11.489 ³⁾	5.88 ± 2.10 ³⁾	41.73 ± 9.62 ³⁾
尼莫地平	0.011	8	34.043 ± 19.008 ³⁾	6.00 ± 1.85 ³⁾	46.54 ± 14.02 ⁴⁾

均灰度值升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各治疗组 ERK2, CREB 表达的 IA 升高 ($P < 0.05, P <$

0.01), 平均灰度值下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3, 图 2, 3。

表 3 补肾活血方药对大鼠脑海马 ERK2, CREB 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Bushen Huoxue formula on levels of ERK2, CREB in rats hippocampus ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CREB		ERK2	
		IA	平均灰度值	IA	平均灰度值
假手术	-	0.121 \pm 0.014	193.35 \pm 6.273	0.123 \pm 0.013	192.55 \pm 5.60
模型	-	0.101 \pm 0.015 ¹⁾	202.43 \pm 6.724 ¹⁾	0.098 \pm 0.019 ¹⁾	204.00 \pm 8.85 ¹⁾
补肾活血方药	10.04	0.168 \pm 0.032 ⁴⁾	174.38 \pm 11.970 ⁴⁾	0.190 \pm 0.049 ⁴⁾	166.62 \pm 18.08 ⁴⁾
	5.07	0.153 \pm 0.014 ⁴⁾	179.93 \pm 5.811 ⁴⁾	0.124 \pm 0.015 ³⁾	192.20 \pm 6.53 ³⁾
尼莫地平	0.011	0.141 \pm 0.023 ⁴⁾	185.06 \pm 9.238 ⁴⁾	0.135 \pm 0.014 ⁴⁾	187.25 \pm 5.64 ⁴⁾

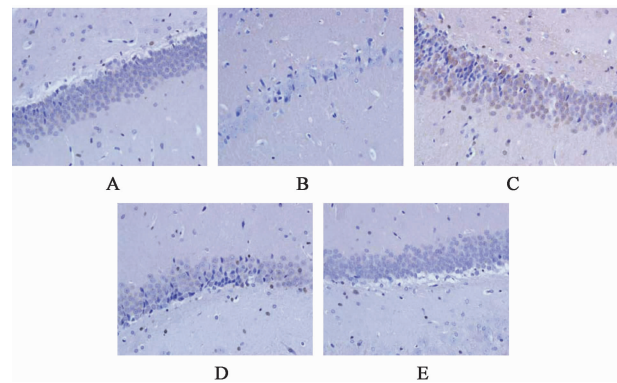


图 2 补肾活血方药对大鼠脑海马 CREB 表达的影响 (IHC, $\times 200$)
Fig. 2 Effect of Bushen Huoxue formula on levels of CREB in rats hippocampus (IHC, $\times 200$)

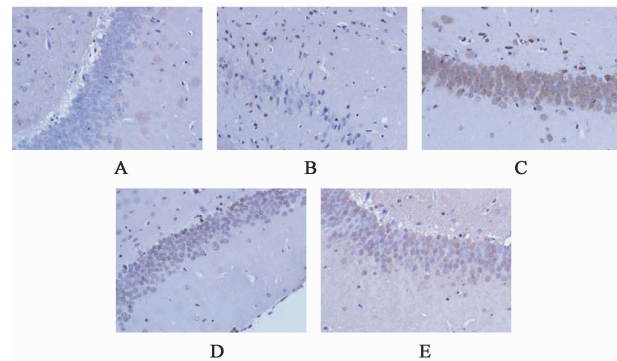


图 3 补肾活血方药对大鼠脑海马 ERK2 表达的影响 (IHC, $\times 200$)
Fig. 3 Effect of Bushen Huoxue formula on levels of ERK2 in rats hippocampus (IHC, $\times 200$)

3.4 对大鼠脑海马 CREB, ERK2 蛋白表达 (Western blot) 的影响 与假手术组比较, VD 模型组大鼠脑海马 CREB, ERK2 蛋白表达量明显下降 ($P < 0.01$); 与 VD 模型组比较, 各治疗组大鼠脑海马 CREB, ERK2 表达量均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4, 图 4。

表 4 补肾活血方药对大鼠脑海马 CREB, ERK2 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Bushen Huoxue formula on levels of CREB, ERK2 in rats hippocampus ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	CREB/GAPDH	ERK2/GAPDH
假手术	-	0.766 \pm 0.049	1.035 \pm 0.145
模型	-	0.466 \pm 0.144 ²⁾	0.844 \pm 0.138 ²⁾
补肾活血方药	10.04	1.160 \pm 0.175 ⁴⁾	1.300 \pm 0.195 ⁴⁾
	5.07	0.626 \pm 0.092 ³⁾	1.085 \pm 0.141 ³⁾
尼莫地平	0.011	0.699 \pm 0.231 ⁴⁾	1.154 \pm 0.074 ⁴⁾

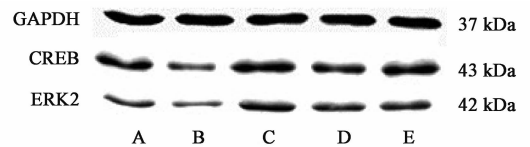


图 4 补肾活血方药对大鼠脑海马 CREB, ERK2 表达电泳
Fig. 4 Effect of Bushen Huoxue formula on levels of ERK2, CREB in rats hippocampus

4 讨论

VD 属于中医“健忘”、“呆病”、“癡病”等病证范畴, 中医认为, 肾藏精, 肾精通于脑, 而脑为髓之海, 肾精不足, 则髓海空虚; VD 多发生在中风之后, 瘀血闭阻络脉, 令人善忘。故本病的基本病机为肾精渐亏, 脑髓空虚, 瘀血阻络。课题组前期对 95 例 VD 患者进行统计分析, 结果表明, 肾精亏虚证、瘀血阻络证的证候出现率分别为 86.32% 和 54.74%, 两证组合中以肾精亏虚 + 瘀血阻络证出现最多^[13]。针对 VD 证候和病机特点, 采用补肾填精, 活血开窍治疗本病, 补肾活血方中重用人参大补元气, 补肾填精, 安神益智; 制何首乌补益精血; 益智仁温肾助阳,

固精缩尿;川芎、郁金行气活血;配合当归、丹参活血散瘀、养血安神。其中人参、胡桃肉、制何首乌、益智仁组成的补肾药组,补肾填精以治其本;当归、川芎、郁金、丹参组成的活血药组,活血行气以治其标。课题组前期研究表明^[14-16],该方药可通过调节VD小鼠自由基代谢,抑制炎症损伤,促进神经营养因子表达等机制改善VD小鼠学习记忆能力,且补肾药组与活血药组具有协同作用。

研究表明,慢性脑低灌注损伤是VD的主要病因之一,在慢性脑低灌注致VD的发病机制中,神经元的凋亡占据着至关重要的地位。大量实验表明海马椎体神经元细胞的凋亡可引起啮齿类、灵长类动物以及人类出现认知功能障碍^[17-18]。病理形态学实验结果也表明^[19],VD与脑海马神经元的凋亡数量呈正相关。ERK是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)亚家族成员,包括ERK1和ERK2,磷酸化ERK(phosphorylation-ERK, p-ERK)是其活化形式。ERK既往被发现在神经元细胞增殖、抑制细胞凋亡中发挥重要调节作用。目前ERK信号通路在神经系统中的作用有不同观点,Runden等^[20]研究发现,ERK磷酸化与神经元死亡有相关性,ERK的激活介导了脑损伤后神经细胞的死亡,而更多研究则认为ERK激活可抑制细胞凋亡的发生。本实验显示VD模型组大鼠脑海马组织中ERK2表达水平显著降低,与Morris水迷宫实验结果呈负相关关系,与大多数学者结果一致,表明ERK2对神经元有保护作用。CREB是一种重要的细胞核内转录因子,是影响记忆的关键蛋白,调节突触可塑性和长时程增强,而突触可塑性变化在VD发病中起到至关重要的作用。近年大量实验研究表明,CREB不仅参与脑缺血的损伤过程,也有神经保护作用^[21]。CREB是多种信号分子的目标蛋白,CREB的激活可能依赖于ERK通路^[22]。CREB被磷酸化进而激活下游效应可能是CREB活化后促进抗凋亡和保护蛋白分子(B细胞淋巴瘤/白血病-2,降钙素基因相关肽等)及BDNF等的表达^[23-24],调节缺血损伤后神经元的再生、修复和存活过程,进而实现对缺血性痴呆可塑性和学习记忆的保护。

本实验通过对各组大鼠行为学检测以及对各组大鼠海马神经细胞凋亡的比较发现,补肾活血方药能改善VD大鼠学习记忆能力,抑制海马神经细胞的凋亡;同时采用免疫组化和Western blot两种方法检测各组大鼠脑海马ERK2, CREB的表达,发现VD

模型组相对假手术组大鼠脑海马组织中ERK2, CREB表达水平显著降低,补肾活血高剂量组相对模型组大鼠脑海马组织中ERK2, CREB表达水平显著提高。由此本研究可以推断补肾活血方药可能通过激活ERK/CREB信号通路,抑制VD大鼠脑海马神经元凋亡,从而提高VD大鼠学习记忆能力。

[参考文献]

- [1] 田金洲. 血管性痴呆[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003:1-2.
- [2] 曲艳吉,卓琳,王华丽,等. 1980—2011年中国社区55岁及以上人群中血管性痴呆流行病学的Meta分析[J]. 中国卒中杂志, 2013, 8(7):533-543.
- [3] 吴江. 神经病学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2015:214-217.
- [4] 马小顺,于文涛,靳贺超,等. 血管性痴呆中医证候与神经心理学指标相关性分析[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(10):4696-4699.
- [5] 王志宏,刘素梅,于文涛. 补肾活血法治疗血管性痴呆的临床研究[J]. 中华实用中西医杂志, 2005, 4(24):3756-3757.
- [6] 于文涛,张一昕,王玮,等. 补肾活血系列方对血管性痴呆小鼠脑海马病理组织学的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(12):1485-1486.
- [7] 于文涛,苏博伦,苏凤哲,等. 补肾活血方对血管性痴呆小鼠脑组织bFGF mRNA和BDNF mRNA表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(5):514-515.
- [8] 于文涛,高维娟,方朝义,等. 补肾活血方对血管性痴呆大鼠海马BDNF mRNA及受体TrkB mRNA表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(8):985-990.
- [9] 刘永惠,李少为,郑清莲. 补肾健脑方对血管性痴呆大鼠乙酰胆碱和海马区ERK1和ERK2表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(4):504-509.
- [10] 张晓锋,陈浙玲,王欣东. 盐酸美金刚对血管性痴呆大鼠海马CA1区BDNF及ERK表达的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2010, 13(4):19-21.
- [11] Farkas E, Luiten P G, Bari R. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases[J]. Brain Res Rev, 2007, 54(1):162-180.
- [12] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993:33.
- [13] 王玮,于文涛,聂金涛,等. 血管性痴呆患者中医证候特点研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(4):514-517.
- [14] 于文涛,张一昕,吴中秋,等. 补肾活血方对血管性痴

- 呆小鼠行为学及脑海马自由基代谢的影响[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(12): 1478-1480.
- [15] 于文涛, 张一昕, 杨牧祥. 补肾活血系列方对血管性痴呆小鼠脑组织 IL-1 β 和 TNF- α 含量的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(6): 1558-1560.
- [16] 于文涛, 张一昕, 王玮, 等. 补肾活血系列方对血管性痴呆小鼠脑组织 bFGF mRNA 表达的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(5): 537-540.
- [17] Sugawara T, Lew'en A, Noshita N, et al. Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial, and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1 subregion in rats [J]. J Neurotrauma, 2002, 19(1): 85-98.
- [18] Burke M J C, Nelson L, Slade J Y, et al. Morphometry of the hippocampal microvasculature in post-stroke and age-related dementias [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2014, 40(3): 284-295.
- [19] 马春林, 张宣, 刘佳楠, 等. 归芪聪志汤对 VD 模型大鼠海马神经元 Claudin-1, TGF- β 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6): 102-107.
- [20] Runden E, Seglen P O, Haug F M, et al. Regional selective neuronal degeneration after protein phosphatase inhibition in hippocampal slice cultures: evidence for a MAP kinase-dependent mechanism [J]. J Neurosci, 1998, 18(18): 7296-7305.
- [21] Lonze B E, Ginty D D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system [J]. Neuron, 2002, 35(4): 605-623.
- [22] ZENG Z, LENG T D, FENG X C, et al. Silencing TRPM7 in mouse cortical astrocytes impairs cell proliferation and migration *via* ERK and JNK signaling pathways [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119912.
- [23] 李文联, 王玲, 张红爱. Ca²⁺ 对新生大鼠脑缺氧缺血后 CREB 磷酸化及神经元凋亡的影响[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(3): 217-219.
- [24] 任广立, 孙海宏, 汪洋, 等. 新生鼠缺氧缺血/再灌注后海马 p-CREB 的表达 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(17): 1578-1580.

[责任编辑 全燕]