

归芪聪志汤及其拆方对 VD 模型大鼠海马神经元 HIF-1 α , VEGF 和 HO-1 表达的影响

马春林¹, 陈杰¹, 崔淑梅¹, 朱凯敏¹, 李海龙¹, 吴红彦^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 深圳市罗湖区中医院, 广东深圳 518001)

[摘要] 目的:研究归芪聪志汤及其拆方对血管性痴呆(vascular dementia, VD)大鼠海马组织缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α),血管内皮生长因子(VEGF),及血红素加氧酶-1(HO-1)表达的影响,并探讨相关的作用机制。方法:Wistar大鼠称体质量后,按随机原则选出10只作为假手术组,将其余90只大鼠采用改良后的双侧颈动脉永久性结扎法制备VD大鼠模型,造模后,筛选成功模型大鼠54只随机分为6组,分别为模型组,阳性药组(吡拉西坦,3.6 g·kg⁻¹),归芪聪志汤组(9.9 g·kg⁻¹),活血通络组(拆方1组,9.9 g·kg⁻¹),化痰解毒组(拆方2组,9.9 g·kg⁻¹),补气养血组(拆方2组,9.9 g·kg⁻¹),每组9只。连续灌胃28 d后, Morris水迷宫予以行为学检测,苏木素-伊红(HE)染色观察海马神经元的形态改变,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法和蛋白免疫印迹法(Western blot)分别检测大鼠海马HIF-1 α , VEGF及HO-1 mRNA和蛋白的表达。结果:治疗4周后,与假手术组比较,VD模型组大鼠的平均逃避潜伏期明显延长、跨原平台次数明显减少($P < 0.05$),大鼠海马的HIF-1 α , VEGF, HO-1 mRNA及蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$), HE染色显示VD模型大鼠海马神经细胞损伤严重;与模型组比较,归芪聪志汤组与吡拉西坦组大鼠的逃避潜伏期均显著缩短、跨原平台次数均显著增加($P < 0.05$),大鼠海马的HIF-1 α , VEGF, HO-1 mRNA和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$), HE染色显示归芪聪志汤与吡拉西坦组大鼠海马神经细胞损伤减轻。结论:归芪聪志汤组改善VD模型大鼠的学习记忆能力优于各拆方组,其作用机制可能与上调HIF-1 α , VEGF及HO-1因子的表达,减轻氧化应激损伤,激发脑内的损伤修复有关。

[关键词] 血管性痴呆; 归芪聪志汤; 缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α); 血管内皮生长因子(VEGF); 血红素加氧酶-1(HO-1)

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)15-0143-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20181532

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180516.0924.012.html>

[网络出版时间] 2018-05-16 14:11

Effect of Guiqi Congzhi Decoction and Its Disassembled Prescriptions on Expressions of HIF-1 α , VEGF and HO-1 in Hippocampus Area of Vascular Dementia Rats

MA Chun-lin¹, CHEN Jie¹, CUI Shu-mei¹, ZHU Kai-min¹, LI Hai-long¹, WU Hong-yan^{1,2*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Shenzhen Luohu District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Guiqi Congzhi decoction and its disassembled prescription on expressions of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), vascular endothelial growth factor (VEGF) and haem oxygenase-1 (HO-1) in the hippocampus area of vascular dementia rats. **Method:** A vascular dementia rat model was established through permanent ligation of bilateral carotid arteries. After being weighed, 10 rats were selected

[收稿日期] 20180201(001)

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金项目(81660760);兰州市2015年人才创新创业扶持项目(2015-RC-24)

[第一作者] 马春林,在读博士,从事痴呆的中医药防治研究, E-mail:757695095@qq.com

[通信作者] *吴红彦,教授,博士生导师,从事方证相关理论与敦煌医学研究与创新研究, E-mail:wu.hy@163.com

as the sham operated group according to the random principle. The remaining 90 rats were used for modeling, 54 eligible rats were randomly divided into 6 groups after successfully modeling: model group, positive drug control group, Guiqi Congzhi decoction group, Huoxue Tongluo group (the disassembled prescription group 1), Huatan Jiedu group (the disassembled prescription group 2), invigorating Qi and nourishing blood group (the disassembled prescription group 3), with 9 rats in each group. Drugs were administered to the rats through gastric perfusion once a day for 4 weeks. Then the behaviors of all of the rats were detected by Morris water maze, the morphological changes in hippocampal neurons were detected by hematoxylineosin (HE) staining, the expressions of HIF-1 α , VEGF and HO-1 mRNA and protein in hippocampus were detected by Real-time fluorescence quantitative PCR (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** After 4 weeks of treatment, compared with sham-operation group, the average escape latency period prolonged significantly and the number of cross-platforms were distinctly decreased in model group rats ($P < 0.05$), and the expressions of HIF-1 α , VEGF, HO-1 mRNA and protein in hippocampus of model rats were significantly increased ($P < 0.05$), suggesting that the damage of hippocampal nerve cells was serious in model group rats according to HE staining; compared with the model group, the escape latencies of the Guiqi Congzhi decoction group and the control group were significantly shortened, and the number of cross-platforms was significantly increased ($P < 0.05$), the expressions of HIF-1 α , VEGF, HO-1 mRNA and protein in the hippocampus of Guiqi Congzhi decoction group and positive control group rats were significantly increased ($P < 0.05$), suggesting that the damage of hippocampal nerve cells was alleviated in Guiqi Congzhi decoction group and control group. **Conclusion:** The Guiqi Congzhi decoction group show better learning and memory abilities than those of the disassembled prescription groups, and its mechanism of action may be related to up-regulation of HIF-1 α , VEGF, and HO-1 factors, alleviation of oxidative stress, and initiation of damage repair in the brain.

[**Key words**] vascular dementia; Guiqi Congzhi decoction; hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α); vascular endothelial growth factor (VEGF); haem oxygenase-1 (HO-1)

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是指由一系列脑血管病理因素破坏正常脑组织而引起的以认知功能减退为特征的一组临床综合征^[1]。研究表明 2013 年中国 55 岁以上人群 VD 患者约有 222 万人。世界痴呆人数每 20 年就可增加 1 倍, 预计到 2050 年则可能超过 4 000 万人^[2]。目前尚无治愈 VD 的确切方法, 但采取综合措施, 联合药物进行早期干预, 能有效提升康复效果和改善认知功能障碍, 提高 VD 患者的生活质量^[3]。近年来中医对血管性痴呆的治疗已显示出独特的优势^[4]。

中医学认为 VD 发病的基本病机是气血亏虚、脑髓失养, 多由于气滞血瘀、痰浊毒阻等因素而致病, 证属本虚标实, 特别是结合现代实验研究发现气血亏虚、痰瘀浊毒等因素是影响记忆智能的关键^[5], 因此采用中医药防治 VD 应采用补气活血、化痰解毒之法。导师吴红彦教授根据文献研究, 在传承古方 (补阳还五汤) 的基础上, 结合临床实际, 化裁出验方归芪聪志汤, 并开展了防治 VD 的研究^[6-9]。前期研究表明该方可通过保护神经元线粒体、抑制炎症因子、调节热休克蛋白表达、改善脑组织缺氧后炎症细胞的黏附作用与血脑屏障的通透性

等发挥防治 VD 的作用。鉴于中药复方具有多组分、多靶点的治疗特点, 本实验拟从氧化应激和血管生成角度探讨归芪聪志汤及其拆方对 VD 模型大鼠海马神经元缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α), 血管内皮生长因子 (VEGF), 及血红素加氧酶-1 (HO-1) 表达的影响, 为防治 VD 的新药研发, 提供一定的实验数据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 100 只 (雌雄各半), 体质量 (200 \pm 20) g, 购于甘肃中医药大学科研实验中心, 经甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批号 2015-018), 实验动物质量许可证号 SYXK (甘) 2015-0001。SPF 级饲料 (北京科澳协力饲料有限公司) 喂养, 食水自由, 适应性饲养 5 d。

1.2 药物及试剂 归芪聪志汤全方及拆方各组 (拆方 1 组: 川芎、地龙; 拆方 2 组: 苦参、菖蒲; 拆方 3 组: 黄芪、当归) 按比例购自兰州复兴厚药材有限公司, 由甘肃中医药大学附属医院药剂科杨锡仓主任医师鉴定, 符合 2015 年版《中国药典》规范。全方组及各拆方组药物分别加 8 倍量水浸泡 3 h, 煎煮 60 min 后过滤出药物煎液, 剩下药渣再加 6 倍量水

煎煮 40 min, 滤出后合并 2 次煎液, 水浴浓缩煎液, 全方组含生药为 $1.98 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 拆方 1, 2, 3 组含生药分别为 $0.43, 0.51, 1.03 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 浓缩后放至室温, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 储存备用; 吡拉西坦胶囊(陕西白鹿制药股份有限公司, 国药准字 H61022576), 用水配制成质量浓度为 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混悬液后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 储存备用。逆转录试剂盒(美国 Roche 公司, 批号 11316120); 扩增试剂盒(韩国 Bioneer 公司, 批号 1422K); 凝胶试剂盒(西安赫特生物科技有限公司, 批号 WB006); RIPA 裂解液, Buffe 上样缓冲液(贝博公司, 批号分别为 BB140081, BB140082); Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒(美国 Thermo 公司, 批号 JX0368); HO-1, VEGF, HIF-1 α , β -肌动蛋白(β -actin) 抗体(Affinity 公司, 批号分别为 Catalog#AF5393, Catalog#AF5131, Catalog#YT2133, Catalog#AF7018)。

1.3 仪器 MT-200 型 Morris 水迷宫视频跟踪系统, BI-2000 型医学图像分析系统(成都泰盟科技有限公司); CX21 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); ABI7500 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪(美国 ABI 公司); Mini Protean 3 Cell 型电泳仪, 转膜仪, Chemi DOC XRS + 型凝胶成像分析系统(美国伯乐公司)。

2 方法

2.1 模型制备 采用改良型的大鼠双侧颈总动脉永久性结扎法制备 VD 大鼠模型^[10]。术后对各组大鼠进行 Morris 水迷宫行为学检测, 将假手术组大鼠的逃避潜伏期的均值作为参考值, 如果模型组大鼠平均逃避潜伏期与参考值之差占该鼠的平均逃避潜伏期的比值 $>20\%$, 则可作为痴呆鼠纳入实验。

2.2 动物分组及给药 大鼠称体质量后随机选出假手术组 10 只(雌雄各半)。其余 90 只大鼠造 VD 模型, 造模组后大鼠死亡 33 只(雄鼠 20 只, 雌鼠 13 只), 术后 7 d 进行水迷宫测试选取合格大鼠称体质量, 将 VD 模型大鼠随机分为模型组、阳性药组、归芪聪志汤组(全方组)、活血通络组(拆方 1 组)、化痰解毒组(拆方 2 组)、补气养血组(拆方 3 组)6 组, 每组 9 只(雌鼠 5 只、雄鼠 4 只)。各组药物灌胃剂量按人与动物体表面积换算, 成人(70 kg)每日用量归芪聪志汤生药 115 g , 吡拉西坦胶囊 3 g 。阳性药组灌服吡拉西坦 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 全方组和拆方 3 组灌服对应汤药溶液 $9.9 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 假手术组和模型组灌服水 $9.9 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 连续灌服 28 d。

2.3 Morris 水迷宫行为学检测 在适应性实验之

后开始进行 Morris 水迷宫测试, 将大鼠面向池壁放入水中, 设置实验过程时长为 120 s, 若在规定时长后未找到安全平台, 将大鼠引导至平台后停留片刻, 记录其逃避潜伏期为 120 s。该定位航行实验连做 5 d 并详细记录大鼠找到平台时间。第 6 天进行空间搜索实验, 将水池中的安全平台撤去, 大鼠面向池壁放入水中在无平台的情况下自由游泳, 设置时长为 120 s, 记录在其时长内大鼠游经原平台区域相应位置的次数。

2.4 海马组织苏木素-伊红(HE)染色病理切片观察 各组大鼠采用颈椎脱臼法处死, 处死前 12 h 禁食, 开颅过程在冰块上操作, 将大鼠头部放置于冰块上, 开颅后取出完整脑组织, 用生理盐水冲洗 3 ~ 5 次后置于滤纸上, 剥离大脑皮层及海马, 置于多聚甲醛溶液中保存。组织经梯度脱水、透明、浸蜡、包埋, 切片($4 \text{ }\mu\text{m}$)、贴片, 染色、封片等处理后, 光学显微镜下观察摄影。

2.5 Real-time PCR 检测 HIF-1 α , VEGF 和 HO-1 mRNA 的表达 用 trizol 提取液按说明书步骤提取各组大鼠海马组织的总 RNA, 检测浓度纯度后, 严格按照试剂盒说明书进行逆转录, 反应产物 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成, 其序列见表 1。扩增反应按照 PCR 试剂盒说明操作, 在 CFX96 Real-time PCR 仪上进行。反应条件 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 10 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 20 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火与延伸 30 s, 45 个循环。分析溶解曲线, 确认扩增产物的特异性, 采取 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	引物序列(5'-3')	片段长度/bp
ACTIN	上游 GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	150
	下游 GACTCATCGTACTCTCTGCTTGCTG	
HIF-1 α	上游 CCAGATTCAAGATCAGCCAGCA	100
	下游 GCTGTCCACATCAAAGCACTACTCA	
HO	上游 AGGTGCACATCCGTGCAGAG	120
	下游 CTTCCAGGGCCGTATAGATATGCTA	
VEGF	上游 TCCTGCAGCATAGCAGATGTGA	125
	下游 CCAGGATTTAAACCGGGATTTC	

2.6 蛋白免疫印迹技术(Western blot)检测大鼠海马 HIF-1 α , VEGF 及 HO-1 蛋白的表达 按说明书用蛋白提取试剂盒提取各组大鼠海马组织的蛋白, BCA 法检测和调整蛋白浓度到一致。每孔上样

10 μ L,用 15% 聚丙烯酰胺凝胶 100 V 恒压电泳分离约 2 h;经 80 V,120 min 冰浴转至 PVDF 膜;用封闭液封闭 2 h 后,分别加入配制好的一抗(1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,1 \times 洗膜液洗膜 3 次,每次 10 min;用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)室温孵育 2 h,孵育后洗膜用于图像采集;加 ECL 工作液,在凝胶成像仪下曝光成像。运用 ImageJ2X 专业图像软件分析目的蛋白条灰度值。

2.7 统计学分析 用 SPSS 20.0 软件进行数据处理,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 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,方差齐用 LSD,方差不齐用 Dunnett's *T*₃,以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

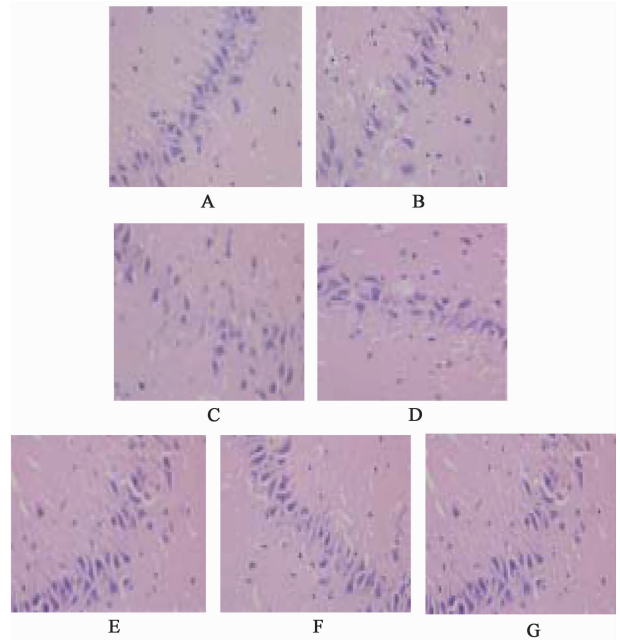
3.1 对 VD 模型大鼠行为学的影响 与假手术组比较,VD 模型大鼠平均逃逸潜伏期明显增长,而穿越平台区次数明显减少(*P* < 0.05);与模型组比较,各治疗组大鼠平均逃避潜伏期均明显缩短,而穿越平台区次数均明显增多(*P* < 0.05);与吡拉西坦组比较,归芪聪志汤组大鼠平均逃避潜伏期明显缩短,而穿越平台区次数明显增多(*P* < 0.05);与各拆方组比较,归芪聪志汤组平均逃避潜伏期明显缩短,而穿越平台区次数明显增多(*P* < 0.05)。见表 2。

表 2 归芪聪志汤及其拆方对 VD 模型大鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effect of Guiqi Congzhi decoction and its disassembled prescriptions on behavior of VD model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	<i>n</i>	逃避潜伏期 /s	空间搜索次数 /次
假手术	-	10	12.4 \pm 4.46	8.90 \pm 1.69
模型	-	9	76.1 \pm 7.01 ¹⁾	2.67 \pm 1.01 ¹⁾
拆方 1	9.90	9	28.4 \pm 1.53 ²⁾	4.33 \pm 1.32 ²⁾
拆方 2	9.90	9	25.7 \pm 1.80 ²⁾	4.78 \pm 0.83 ²⁾
拆方 3	9.90	9	24.9 \pm 2.20 ²⁾	3.89 \pm 1.17 ²⁾
归芪聪志汤	9.90	9	18.9 \pm 1.78 ^{2,3,4)}	6.89 \pm 1.69 ^{2,3,4)}
吡拉西坦	3.60	9	23.5 \pm 2.99 ²⁾	5.22 \pm 1.20 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ *P* < 0.05;与模型组比较²⁾ *P* < 0.05;与吡拉西坦比较³⁾ *P* < 0.05;与各拆方组比较⁴⁾ *P* < 0.05。

3.2 对 VD 模型大鼠海马组织的影响 与假手术组比较,模型组海马组织的神经细胞受损较为严重;与模型组比较,各治疗组海马组织的神经细胞受损较轻;与吡拉西坦比较,归芪聪志汤组海马组织的神经细胞受损较轻;与各拆方组比较,归芪聪志汤组与吡拉西坦的海马组织神经细胞损伤程度较轻;各拆方组间海马神经细胞损伤程度相近,见图 1。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 拆方 1 组;D. 拆方 2 组;E. 拆方 3 组;F. 归芪聪志汤组;G. 吡拉西坦组(图 2 同)

图 1 归芪聪志汤及其拆方对 VD 模型大鼠海马组织的影响(HE, \times 400)

Fig. 1 Effect of Guiqi Congzhi decoction and its decomposed prescriptions on hippocampal tissue in VD model rats(HE, \times 400)

3.3 对 VD 模型大鼠海马组织 HIF-1 α , VEGF, HO-1 mRNA 表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马区 HIF-1 α , VEGF, HO-1 mRNA 表达量明显增加(*P* < 0.05);与模型组比较,吡拉西坦、归芪聪志汤组、拆方 3 组大鼠海马区 HIF-1 α , VEGF, HO-1 mRNA 表达量均明显上调(*P* < 0.05);与各拆方组比较,吡拉西坦、归芪聪志汤组大鼠海马区 HIF-1 α , VEGF mRNA 表达量明显上调(*P* < 0.05)。见表 3。

3.4 对 VD 模型大鼠海马组织 HIF-1 α , VEGF, HO-1 蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马区 HIF-1 α , VEGF, HO-1 蛋白相对表达量明显增加(*P* < 0.05);与模型组比较,吡拉西坦、归芪聪志汤组、拆方 1,2,3 组大鼠海马区 HIF-1 α , VEGF, HO-1 蛋白相对表达量均明显上调(*P* < 0.05);与各拆方组比较,吡拉西坦、归芪聪志汤组大鼠海马区 HIF-1 α , VEGF, HO-1 蛋白相对表达量均明显上调(*P* < 0.05)。见表 4,图 2。

4 讨论

现代医学认为 VD 的病理机制主要是由于脑血管梗塞、小血管疾病、神经元损伤等导致脑组织特别是海马区低灌注和低氧代谢而形成。且会呈阶梯趋

表 3 归芪聪志汤及其拆方对 VD 模型大鼠海马组织 HIF-1 α , VEGF, HO-1 mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Guiqi Congzhi decoction and its disassembled prescriptions on expression of HIF-1 α , VEGF and HO-1 mRNA in hippocampal tissue of VD model rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	HIF-1 α	VEGF	HO-1
假手术	-	1.85 ± 0.11	5.76 ± 1.02	7.54 ± 2.12
模型	-	3.83 ± 0.39 ¹⁾	8.19 ± 0.84 ¹⁾	9.89 ± 0.85 ¹⁾
拆方 1	9.90	4.40 ± 1.84	8.59 ± 0.83	10.38 ± 0.96
拆方 2	9.90	4.80 ± 1.91	8.79 ± 1.03	10.76 ± 1.04
拆方 3	9.90	5.61 ± 1.16 ²⁾	9.39 ± 0.69 ²⁾	11.48 ± 1.43 ²⁾
归芪聪志汤	9.90	7.97 ± 1.01 ^{2,3)}	11.07 ± 0.78 ^{2,3)}	12.95 ± 1.91 ²⁾
吡拉西坦	3.60	7.72 ± 1.28 ^{2,3)}	10.71 ± 1.13 ^{2,3)}	12.92 ± 2.93 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与各拆方组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 4 同)。

表 4 归芪聪志汤及其拆方对 VD 模型大鼠海马组织 HIF-1 α , VEGF, HO-1 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Guiqi Congzhi decoction and its disassembled prescriptions on relative expression of HIF-1 α , VEGF and HO-1 protein in hippocampus tissue of VD model rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	HIF-1 α	VEGF	HO-1
假手术	-	0.56 ± 0.04	0.45 ± 0.02	0.27 ± 0.02
模型	-	0.76 ± 0.06 ¹⁾	0.96 ± 0.66 ¹⁾	0.42 ± 0.14 ¹⁾
拆方 1	9.90	1.01 ± 0.11 ²⁾	1.66 ± 0.12 ²⁾	0.71 ± 0.07 ²⁾
拆方 2	9.90	1.12 ± 0.49 ²⁾	1.83 ± 0.16 ²⁾	0.79 ± 0.25 ²⁾
拆方 3	9.90	1.27 ± 0.23 ²⁾	1.93 ± 0.13 ²⁾	0.86 ± 0.22 ²⁾
归芪聪志汤	9.90	1.99 ± 0.19 ^{2,3)}	2.47 ± 0.29 ^{2,3)}	1.12 ± 0.16 ^{2,3)}
吡拉西坦	3.60	2.13 ± 0.38 ^{2,3)}	2.33 ± 0.18 ^{2,3)}	1.16 ± 0.14 ^{2,3)}

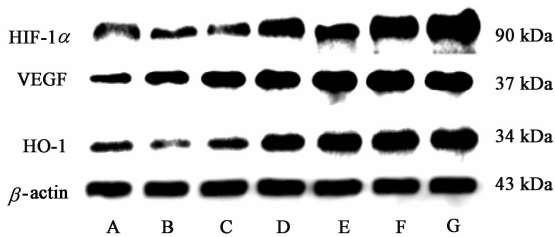


图 2 归芪聪志汤及其拆方干预后 VD 模型大鼠海马组织 HIF-1 α , VEGF, HO-1 蛋白表达电泳

Fig. 2 Ge limage of HIF-1 α , VEGF, and HO-1 proteins expression in hippocampus of VD model rats after intervention of Guiqi Congzhi decoction and its disassembled prescriptions

势加重。因此对脑海马组织的供血及供氧量的研究是探讨药物防治 VD 的重要机制。

HIF-1 α 属于异源二聚体^[11], 是血管生成、细胞

能量代谢、尤其是在缺氧缺血性疾病的发生发展中最重要维持机体氧平衡的调节因子^[12]。机体组织在缺血缺氧后,大量被激活的 HIF-1 α 可以上调血管系统相关因子的表达从而促进血管的生成,并可积极增加血流灌注量并降低组织缺血损伤^[13]。敲除 HIF-1 α 基因后,血管生成相关因子不能被激活,从而导致缺血后再灌注能力的下降,使病情加重^[14]。VEGF 属于同源二聚体,不论在生理还是病理情况下都对血管和淋巴管的新生和发育起着极为重要的调节作用^[15]。VEGF 直接参与新生血管网络的形成以及重构,在神经系统中,还对受损神经元起到保护甚至修复的作用^[16]。它不仅介导了细胞的存活、迁移以及增殖,还参与到脉管新生过程中的如调节血管渗透压等特殊机制,在缺血缺氧性疾病等的发生发展中发挥着重要的作用^[17]。HO 是一种限速酶,有 HO-1, HO-2, HO-3 3 个亚型^[18],其中 HO-1 广泛分布于全身组织中,起到抗炎及拮抗氧化应激的作用^[19]。HO-1 通过调节组织细胞的存活、凋亡等机制在免疫系统中发挥着双重调控作用,在缺血再灌注损伤等病理条件下,不仅可以抑制促炎细胞的释放,还能促进抗炎因子的产生来保护维持机体组织的功能^[20]。当 HO-1 发生缺陷,相关动物模型大部分会死于胚胎期,幸存下来的则后期死于发育停止、贫血、组织铁沉积等,佐证了 HO-1 在氧化应激中的重要作用^[21]。

现代药理研究表明,黄芪的主要成分黄芪多糖与黄芪总苷,都具有抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、促智、延缓衰老及增强机体免疫力等诸多功效^[22-23]。当归中的主要有效成分阿魏酸钠和当归多糖,是天然的自由基清除剂和抗氧化剂,对脑缺血-再灌注后的脑组织损伤具有很好的保护作用^[24-25]。苦参的有效成分苦参碱具有抗炎和免疫调节的重要作用^[26]。石菖蒲中含有大量挥发油成分如 β -细辛醚, α -细辛醚等可作用于中枢神经系统发挥双向调节作用,即有兴奋大脑、抗抑郁、抗缺氧的作用,又有镇静、催眠、抗惊厥的作用,还有保护脑组织和益智的疗效^[27]。因此,归芪聪志汤配伍既有详实的药理依据,也符合中医学证法方药原则。诸药合用,标本兼顾,共奏益气养血、活血解毒、化痰开窍之功,用于治疗 VD 具有客观的理论依据。

本实验从氧化应激和血管生成 2 个角度研究归芪聪志汤对 VD 的作用及机制,Real-time PCR 结果显示各治疗组 VD 大鼠海马区 HIF-1 α , VEGF, HO-1 的基因表达较模型组均有不同程度的上调,同时

Western blot 检测结果也验证了这一结论,且归芪聪志汤全方组优于各拆方组。与各拆方组比,归芪聪志汤组和吡拉西坦的 HO-1 核酸和蛋白表达不一致,其原因可能是特定基因的 mRNA 丰度不一定与其翻译产物(即蛋白质)的表达量成线性关系,因为基因表达的调控层次很多,转录水平的调控只是一个环节,还有转录后调控和翻译及翻译后调控都对于最后蛋白的表达量起作用。研究表明归芪聪志汤的可能是通过其主要药效成份如黄芪多糖、黄芪总苷、阿魏酸钠、当归多糖和苦参碱等,发挥调节血管生成与供氧提升及相关因子 VEGF,HO-1 与 HIF-1 α 的表达的作用,从而起到促进血管的生成,增加血流灌注量,降低组织缺血后的应激损害,抑制促炎细胞的释放,促进抗炎因子的产生,保护受损神经元,从而改善血管性认知功能障碍的效应,但其具体的作用机制仍需深入研究。

[参考文献]

[1] 田金洲. 血管性痴呆[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003:86-90.

[2] WU Y T, Lee H Y, Norton S, et al. Prevalence studies of dementia in mainland china, hong kong and taiwan: a systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One, 2013, 8(6):e66252.

[3] 张立, 邢艳丽, 熊伟南. 血管性痴呆治疗的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(8):1414-1417.

[4] 蔡颖颖, 蒋卫民. 中医药干预血管性认知障碍的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10):1837-1841.

[5] 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, 548.

[6] 谢守嫔, 吴红彦, 张宣, 等. 归芪聪志汤对血管性痴呆模型大鼠大脑皮层线粒体功能的影响[J]. 甘肃中医药大学学报, 2017, 34(2):11-16.

[7] 吴红彦, 李海龙, 杨长生, 等. 归芪聪志汤对 VD 大鼠模型脑组织热休克蛋白表达的影响[J]. 中药材, 2015, 38(12):2578-2582.

[8] 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.

[9] 李海龙, 张宣, 顾静, 等. 归芪聪志汤对血管性痴呆模型大鼠行为学和海马组织基因表达谱的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(6):746-752.

[10] 谭洁, 韩国栋, 张泓, 等. 改良大鼠双侧颈总动脉结扎方式建立血管性痴呆模型的评价研究[J]. 中国康复医学杂志, 2017, 32(3):264-268.

[11] 王莘莘, 孔繁平, 陈学群, 等. 低氧细胞应激的 HIF-1 α 信号通路[J]. 浙江大学学报:医学版, 2011, 40(5):

556-559.

[12] Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Lofstedt T, et al. Recruitment of HIF-1 alpha and HIF-2 alpha to common target genes is differently regulated in neuroblastoma: HIF-2 alpha promotes an aggressive phenotype [J]. Cancer Cell, 2006, 10(2):413-423.

[13] 于晨, 段嗣瑾, 王天, 等. 华佗再造丸对局灶性脑缺血大鼠 HIF-1 α 和 VEGF 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4):818-820.

[14] Bosch-Marce M, Okuyama H, Wesley J B, et al. Effects of aging and hypoxia inducible factor-1 activity on angiogenic cell mobilization and recovery of perfusion after limb ischemia [J]. Circ Res, 2007, 101(12):1310-1318.

[15] Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3 [J]. Circulation, 1996, 93(8):1493-1495.

[16] 赖晓霏, 骆文龙. 神经营养因子在周围神经损伤后的作用[J]. 现代医药卫生, 2008, 24(12):1838-1839.

[17] 倪效, 燕敏. VEGF 受体功能研究进展[J]. 生命科学, 2008, 20(1):120-125.

[18] Morse D, LIN L, Choi A M K, et al. Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease [J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(1):1-12.

[19] 任彩玲, 张钧. 血红素氧合酶-1 在心血管及运动中的作用[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(1):76-78.

[20] 余颜, 王宇红, 邵乐, 等. 补阳还五汤精简方对大鼠脑缺血后血管新生及 Nrf2/HO1 信号途径的影响[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(1):123-128.

[21] 朱子夫, 马莉. HO-1 抗氧化损伤的研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(15):2266-2270.

[22] 柏冬志, 东方, 唐文婷, 等. 黄芪多糖药理作用的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2014, 27(1):103-106.

[23] 黄可儿, 赵敏, 王建华. 黄芪总苷的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(6):461-463.

[24] 陈爱春, 舒化青, 周志鸿, 等. 阿魏酸钠对慢性脑缺血大鼠的神经保护作用机制研究[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2017, 24(6):411-415.

[25] 闫安, 谢云亮. 当归多糖对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织氧化应激水平及炎症因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(2):123-127.

[26] 赵艳武, 才春华, 姜松, 等. 苦参碱预处理对大鼠脑缺血再灌注神经细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响[J]. 河北医学, 2018, 24(1):152-155.

[27] 陈若冰, 张丽艳, 梁茂新. 基于数据挖掘和分析石菖蒲的潜在功能分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(17):217-221.

[责任编辑 周冰冰]