

升降散激活 Wnt 信号通路促进慢性脑缺血 VD 模型大鼠海马组织损伤修复

史江峰^{1,2}, 马健^{1*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210023; 2. 徐州市中医院, 江苏徐州 221009)

[摘要] **目的:**升降散对血管性痴呆(VD)大鼠学习记忆能力的影响及神经保护分子机制。**方法:**SD大鼠70只,随机分为正常组、假手术组,模型组,阳性药物组(盐酸多奈哌齐,1 mg·kg⁻¹),升降散低、中、高剂量组(0.67, 1.33, 2.66 g·kg⁻¹),每组10只,除正常组和假手术组外,其余各组采用改良的2VO法制作慢性脑缺血VD模型,手术1周后开始给药,连续灌胃给药8周。采用2VO两血管阻断法观察升降散对VD各组大鼠学习和记忆的影响、定位航行和空间探索行为功能,分析其学习记忆和空间辨认的能力;采用苏木素-伊红(HE)染色考察海马区病理形态;利用蛋白质免疫印迹(Western blot)和免疫组织荧光化学染色法检测血管内皮生长因子(VEGF),巢蛋白(Nestin),Wnt信号通路关键蛋白,磷酸化低密度脂蛋白受体相关蛋白(p-LRP),磷酸化糖原合成酶激酶(p-GSK3 β)和 β -连环蛋白(β -catenin)的表达水平,初步探讨升降散对VD大鼠海马组织保护作用机制。**结果:**与模型组比较,升降散不同剂量组能不同程度延长VD大鼠的避暗实验的潜伏期、缩短VD大鼠水迷宫定位航行和空间探索实验的潜伏期,升降散呈剂量依赖性促进海马区的病理性损伤修复及VEGF和Nestin表达,升降散呈剂量依赖性上调海马组织Wnt信号通路关键蛋白p-LRP, p-GSK3 β 和 β -catenin蛋白水平,均具有一定的统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**升降散改善VD大鼠学习记忆和空间辨认的行为学能力可能与激活海马组织Wnt信号通路活性有关。

[关键词] 升降散; 血管性痴呆; 学习记忆; 神经损伤; Wnt通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)06-0161-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017060161

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161228.1130.028.html>

[网络出版时间] 2016-12-28 11:30

Effect of Shengjiansan on Promoting Repair of Hippocampal Tissue Damage in Chronic Ischemic VD Rats via Activating Wnt Pathway

SHI Jiang-feng^{1,2}, MA Jian^{1*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. Xuzhou City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xuzhou 221009, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protection effect and mechanism of Shengjiansan on learning and memory abilities of vascular dementia (VD) rats. **Method:** SD rats were randomly divided into normal group, sham-operation group, model group, positive drug group (donepezil hydrochloride, 1 mg·kg⁻¹), Shengjiansan low, middle and high dose groups (0.67, 1.33, 2.66 g·kg⁻¹). VD models were reproduced by improved two vessel occlusion method (2VO), and the intragastric administration of the drugs was started 1 week after surgery, for 8 consecutive 8 weeks. The effect of Shengjiansan on learning and memory abilities of VD rats, as well as the orientation navigation and space exploration behaviors were observed by using 2VO method. HE staining was used to investigate the pathomorphology in hippocampus; Western blot and immunofluorescence assays were used to

[收稿日期] 20160726(010)

[基金项目] 江苏省中医药管理局优秀中医临床人才研修专项课题(YX1229);徐州市科技计划一般项目(XM13B073)

[第一作者] 史江峰,博士,主任中医师,从事中医脑病临床研究工作,Tel:15952260819,E-mail:2206777257@qq.com

[通讯作者] *马健,博士,教授,从事中医临床基础工作,Tel:025-85811928,E-mail:majian67@hotmail.com

explore the expression levels of VEGF, Nestin, and key proteins (p-LRP, p-GSK3 β , LRP, GSK3 β and β -catenin) in hippocampus. **Result:** As compared with the model group, all doses of Shengjiangsan could prolong the latency of VD rats in passive avoidance test, shorten the latency of the orientation navigation and space exploration in Morris water maze test and promote the repair of pathological injury in some degree in a dose-dependent manner. In addition, Shengjiangsan up-regulated the protein expression levels of VEGF, Nestin, p-LRP, p-GSK3 β and β -catenin in hippocampus in a dose-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Shengjiangsan could improve the behaviors of VD rats in learning and memory as well as spatial recognition by activating Wnt signal pathway.

[**Key words**] Shengjiangsan; vascular dementia (VD); learning and memory; nerve injury; Wnt pathway

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是由一系列脑血管因素导致的脑组织损害引起的, 以认知功能障碍为特征的一种痴呆综合征, 这些因素包括: 脑缺血、脑出血、急慢性缺氧性脑血管病等^[1]。VD 是老年期痴呆中最常见的一种痴呆类型, 在老年人所患痴呆中, 其发病率仅次于阿茨海默病, 约占所有痴呆的 10% ~ 50%^[2]。随着人口老龄化、饮食结构的变化, 我国血管性痴呆已经成为老年期痴呆的最主要类型^[3]。VD 给患者带来长期身体和心理的痛苦, 严重影响着病人生活质量, 同时给患者的家庭和整个社会造成了沉重的经济负担和社会负担。

导致 VD 的主要病因为脑血管病, 包括大动脉病变、心源性脑栓塞、小血管病变等, 这些脑血管病变引起控制学习和记忆功能的神经元 (海马) 发生缺血, 进而导致这些神经元的损伤和凋亡, 最终发展为痴呆。因此, VD 治疗的难点和突破点均聚焦在血管和神经元的新生方面。

中医药以其独特的诊疗理论和方法在防治脑血管疾病方面显示出巨大的潜力, 现已成为 VD 综合治疗不可或缺的治疗手段^[4]。升降散由僵蚕、蝉衣、姜黄、大黄、米酒和蜂蜜 6 味药组成。课题组前期的临床研究发现, 升降散可明显改善 VD 患者认知功能和日常生活能力, 然而其作用途径和机制尚不清楚^[5]。本研究旨在前期临床观察的基础上, 首先通过避暗, Morris 水迷宫, 定位航行和空间探索等行为学实验考察升降散对 VD 大鼠学习和记忆能力的影响, 其次通过苏木素-伊红 (HE) 染色观察升降散对 VD 大鼠海马组织病理学变化的影响; 最后通过免疫组化、免疫荧光和免疫印记法观察升降散对 VD 大鼠海马组织血管内皮生长因子 (VEGF), 巢蛋白 (Nestin), 磷酸化低密度脂蛋白受体相关蛋白 (p-LRP), 磷酸化糖原合成酶激酶 (p-GSK3 β) 和 β -连环蛋白 (β -catenin) 的表达水平, 初步探讨升降散对 VD 大鼠海马组织保护作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠 70 只, 雄性, 体重 (200 \pm 10) g, 由南京军区总医院实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(军)2012-0014。本研究获得南京中医药大学实验动物伦理委员会批准 [编号 ACU-38 (20141226)]。

1.2 药物及试剂 盐酸多奈哌齐片 (重庆植恩药业有限公司, 批号 150123); 升降散: 先将白僵蚕、全蝉蜕、姜黄和川大黄微粉化, 再由白僵蚕-全蝉蜕-姜黄-川大黄 2:1:3:4 配成的粉剂, 实验用剂量 0.67, 1.33, 2.66 g \cdot kg⁻¹, 由徐州中医院提供, 实验时称取相应剂量用 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 配置成混悬液灌胃 (ig); VEGF, NEST, p-LRP, LPR, p-GSK3 β , β -catenin, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 一抗及荧光二抗及 DAPI (谷歌生物公司, 批号分别为 PAB9519, XB-1572, PA1988, WL01743, SRCL07974, 2251-1, 228-10515-1, 247-002, 190463)。

1.3 仪器 通用 Morris 水迷宫 (上海吉量软件科技有限公司), FA1004 型电子分析天平 (上海精科天平厂), ZH-600 型避暗箱 (淮北正华生物仪器设备有限公司提供), SM2010R 型病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司), KYC-1112 型烤箱 (上海福玛实验仪器有限公司), G70F20CN3L-C2B0 型微波炉 (格兰仕微波炉电器有限公司), TE2000-U 型倒置荧光显微镜 (日本尼康), JT-12k 型脱水机, JRS-14D 型包埋机及 KD-T 型冻台 (武汉俊杰电子有限公司)。

2 方法

2.1 药物的配置 阳性药: 取多奈哌齐 2 片研碎, 加入 0.5% CMC-Na 至 100 mL, 混匀, 配成含多奈哌齐 0.1 g \cdot L⁻¹ 的溶液, 按 10 mL \cdot kg⁻¹ ig 给药。升降散高剂量 (2.66 g \cdot kg⁻¹): 精密称取升降散 66.5 g, 加入 0.5% CMC-Na 至 250 mL, 混匀, 配成 0.266 g \cdot mL⁻¹ 的溶液, 按 10 mL \cdot kg⁻¹ ig 给药。升降散中剂

量($1.33 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$):精密量取升降散高剂量溶液,加入 0.5% CMC-Na 等比稀释,配成 $0.133 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,按 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药。升降散低剂量($0.67 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$):精密量取升降散中剂量溶液,加入 0.5% CMC-Na 等比稀释,配成 $0.067 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,按 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药。

2.2 动物分组及造模 适应性喂养 3 d,随机分为正常组,假手术组,模型组,阳性药物组(盐酸多奈哌齐, $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),升降散低、中、高剂量组($0.67, 1.33, 2.66 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组 10 只,除正常组和假手术组外,其余各组采用改良的 2VO 法制作慢性脑缺血 VD 模型^[6]。手术 1 周后开始给药,连续给药 8 周,进行后续实验。

2.3 避暗实验 利用动物喜好钻黑洞的习惯,设计明、暗相连的两箱,两箱间隔板底部留一孔洞。动物放入明箱之后,立即会通过孔洞钻入暗箱。暗箱底部铺设带电铜栅,动物一钻入暗箱即受到电击,而返回明箱,从而获得记忆。24 h 后再次依法测定,记忆好的动物放入明箱后钻洞的潜伏期延长,钻洞的次数减少。记忆差的动物则相反。此种方法检测药物对动物学习和记忆的影响,称避暗法。训练前 20 min,各组动物按实验分组给药,测定时将动物放入明箱,记录大鼠自放入明箱到钻洞进入暗箱的潜伏期,及 5 min 进入暗箱的错误数。5 min 内未钻洞者,潜伏期按 300 s 计算。

2.4 Morris 水迷宫实验 Morris 水迷宫是一个直径约 150 cm 的圆形水池,是广泛用于测定大鼠学习记忆能力的仪器。各组大鼠于给药后 8 周行 Morris 水迷宫实验。实验包括第 5 天的定位航行实验,第 6 天的空间探索实验^[6-9]。

2.4.1 定位航行实验 实验前 1 d 让动物在无安全平台的水中适应性游泳 120 s。开始实验时先将大鼠置于平台上 60 s,使其明确水池中有平台可供逃生;实验中有图像自动监视系统追踪大鼠的游泳轨迹,记录大鼠寻找固定平台的时间(潜伏期)^[11-12]。

2.4.2 空间探索实验 第 6 天时,撤去平台,在同一入水点将各组大鼠面向池壁放入水中,系统自动记录其在 120 s 内跨过原平台相应位置的次数^[13]。

2.5 海马组织病理形态学观察 各组大鼠于完成行为学测定后,断头取材、后固定,石蜡切片,应用 HE 染色、观测各组大鼠的海马区病理形态^[14]。

2.6 免疫组织荧光化学染色 各组大鼠于完成行为学测定后,断头取材、后固定,石蜡包埋、切片,进

行 VEGF 和 Nestin 荧光双标实验,最后荧光显微镜高倍视野下观察海马组织 VEGF 和 Nestin 的表达情况^[15]。

2.7 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测海马组织中 VEGF 和 Nestin 的表达水平及其上游 Wnt 信号通路活性 各组大鼠于完成行为学测定后,断头取材,把海马组织放在预冷的玻璃平皿上,用剪刀将脑组织剪碎,用 RIPA 液悬浮脑组织,每脑组织 250 mg 加 RIPA 1 mL,冰上匀浆脑组织,直至匀浆光滑(大致用 30 min,多匀浆几次,每次匀浆间隔 1 min 以上),将匀浆转移到预冷的离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $2\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min 留上清,弃沉淀,转移上清至另一离心管中, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $18\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 45 min,保存上清。BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白 $40 \mu\text{g}$ /孔在 10% SDS-PAGE 电泳分离,然后转至 PVDF 膜上,以 5% 脱脂奶粉溶液于室温下封闭反应 2 h,加入 $1:1\ 000$ 稀释的一抗抗体及 $1:5\ 000$ 稀释的 GAPDH(内参)抗体, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应过夜;洗膜缓冲液(TBST)洗膜后,加入 $1:1$ 万稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠或兔 IgG 二抗,室温反应 2 h;TBST 洗膜 3 次后,置于 Bio-Rad 凝胶成像仪中,加入化学发光剂进行化学显色,分析蛋白条带的位置及表达的情况。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,统计学处理数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 VD 大鼠避暗实验潜伏期的影响 采用 2VO 两血管阻断法所致 VD 大鼠连续给药 8 周后行大鼠避暗实验,模型组大鼠避暗实验潜伏期明显缩短,5 min 内错误数明显增加,与正常组比较具有显著性差异($P < 0.01$);假手术组、盐酸多奈哌齐组、升降散高、中、低剂量组大鼠避暗实验潜伏期明显延长,5 min 内错误数明显减少,与模型组比较具有显著性差异($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 1。

3.2 对 VD 大鼠水迷宫定位航行实验和空间探索实验潜伏期的影响 采用 2VO 两血管阻断法所致 VD 大鼠连续给药 8 周后,行 Morris 水迷宫实验定位航行实验。模型组大鼠定位航行实验的潜伏期比正常组明显延长($P < 0.01$),假手术组大鼠定位航行实验的潜伏期比模型组明显缩短,而经不同剂量的升降散干预后,VD 大鼠定位航行实验潜伏期比模型组有不同程度的缩短,升降散能显著改善 VD 大鼠的学习记忆的能力($P < 0.01, P < 0.05$)。见表 2。

表 1 升降散对 VD 大鼠避暗实验潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Shengjiangsan on latency of experimental dementia in vascular dementia ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	潜伏期/s	5 min 错误数/次
正常	-	262.40 ± 66.98	0.30 ± 0.48
模型	-	101.90 ± 39.20 ¹⁾	1.80 ± 0.79 ¹⁾
假手术	-	248.80 ± 76.61 ³⁾	0.38 ± 0.52 ³⁾
盐酸多奈哌齐	0.001	216.40 ± 108.67 ²⁾	0.60 ± 0.84 ³⁾
升降散	2.66	213.00 ± 84.35 ³⁾	0.80 ± 0.79 ²⁾
	1.33	227.70 ± 96.84 ³⁾	0.60 ± 0.97 ³⁾
	0.67	208.00 ± 97.39 ³⁾	0.70 ± 0.82 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2,3 及图 5,7 同)。

表 2 升降散对 VD 大鼠水迷宫定位航行实验潜伏期的影响 (day 4) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Shengjiangsan on VD rats water maze positioning navigation test latency of impact of (day 4) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	I 象限	II 象限	III 象限	IV 象限
正常	-	38.38 ± 28.62	34.18 ± 26.08	11.75 ± 5.63	10.98 ± 6.98
模型	-	76.31 ± 27.60 ¹⁾	72.95 ± 27.33 ¹⁾	62.38 ± 32.11 ¹⁾	63.47 ± 34.66 ¹⁾
假手术	-	37.89 ± 30.24 ²⁾	6.94 ± 5.52 ³⁾	15.12 ± 13.54 ³⁾	23.99 ± 28.25 ²⁾
盐酸多奈哌齐	0.001	25.76 ± 29.63 ³⁾	22.12 ± 16.40 ³⁾	25.41 ± 26.22 ²⁾	30.51 ± 37.55
升降散	2.66	24.94 ± 19.42 ³⁾	25.24 ± 26.27 ³⁾	25.30 ± 34.42 ²⁾	21.68 ± 22.08 ³⁾
	1.33	22.49 ± 26.77 ³⁾	35.38 ± 35.76 ²⁾	30.51 ± 32.53 ²⁾	15.59 ± 26.96 ³⁾
	0.67	38.72 ± 34.08 ²⁾	25.21 ± 22.57 ³⁾	7.38 ± 6.94 ³⁾	12.91 ± 10.90 ³⁾

3.3 对 VD 大鼠水迷宫空间探索实验潜伏期的影响 水迷宫空间探索实验,模型组大鼠穿越平台次数、第四象限停留时间、第四象限停留时间(总时间)明显减少,与正常组比较有显著性差异($P < 0.01$)。升降散高剂量组大鼠穿越平台次数、第四象限停留时间、第四象限停留时间(总时间)均有增加,其中第四象限停留时间、第四象限停留时间(总

时间)与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。升降散中剂量组大鼠穿越平台次数、第四象限停留时间、第四象限停留时间(总时间)有一定的增加,但与模型组大鼠比较,没有统计学差异。升降散低剂量组大鼠穿越平台次数、第四象限停留时间、第四象限停留时间(总时间)有明显增加,与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

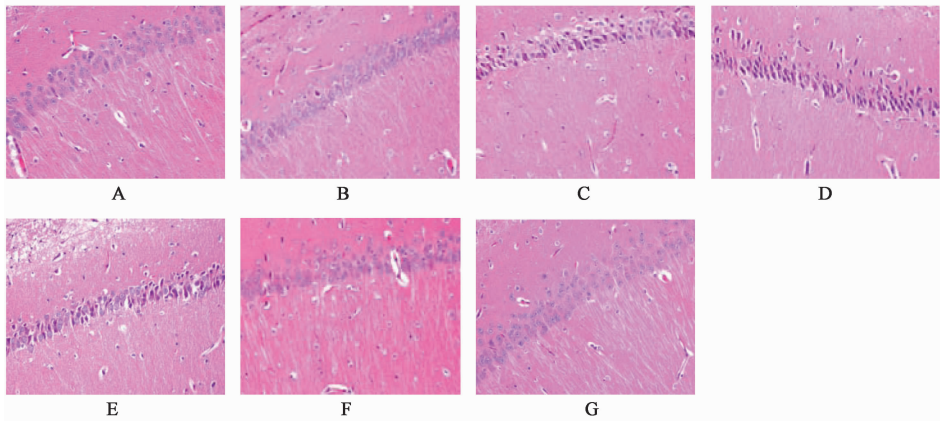
表 3 升降散对 VD 大鼠水迷宫空间探索实验潜伏期的影响 (day 6) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Shengjiang on VD rats water maze space exploration experiment latency effect (day 6) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	穿越平台数/次	IV 象限停留时间/s	IV 象限停留时间(总时间)/s
正常	-	3.70 ± 1.89	29.00 ± 6.46	32.22 ± 7.18
模型	-	1.60 ± 2.22 ¹⁾	21.27 ± 7.01 ¹⁾	23.63 ± 7.79 ¹⁾
假手术	-	3.00 ± 1.20	28.65 ± 7.37 ²⁾	31.83 ± 8.19 ²⁾
盐酸多奈哌齐	0.001	2.10 ± 1.66	30.31 ± 11.76	33.68 ± 13.07
升降散	2.66	3.50 ± 1.58	27.89 ± 5.93 ²⁾	30.98 ± 6.59 ²⁾
	1.33	2.40 ± 1.58	30.86 ± 12.87	31.29 ± 14.30
	0.67	4.50 ± 3.31 ²⁾	39.21 ± 10.21 ³⁾	43.57 ± 11.34 ³⁾

3.4 对 VD 大鼠海马区病理组织学的影响 VD 大鼠模型组主要表现为海马齿状回处颗粒细胞明显核固缩,CA1 及 CA3 区神经元数量减少,排列紊乱,细胞皱缩,胞浆嗜酸性染色增强,部分神经元

细胞核固缩,染色质聚集。与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和升降散低、中、高剂量组海马齿状回处和 CA1 及 CA3 区病变有明显的减轻。见图 1~3。



A. 正常组; B. 假手术组; C. 模型组; D. 升降散 $0.67 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; E. 升降散 $1.33 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; F. 升降散 $2.66 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; G. 盐酸多奈哌齐组(图 2~4 同)
图 1 升降散对 VD 大鼠海马 CA1 组织学病变的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Shengjiangsan on histopathological changes of hippocampal CA1 in AD rats(HE, $\times 200$)

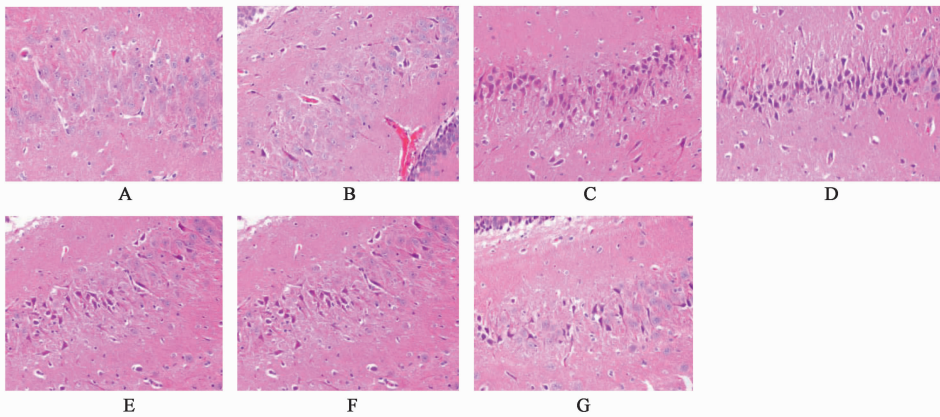


图 2 升降散对 VD 大鼠海马 CA3 组织学病变的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of Shengjiangsan on histopathological changes of hippocampal CA3 in AD rats(HE, $\times 200$)

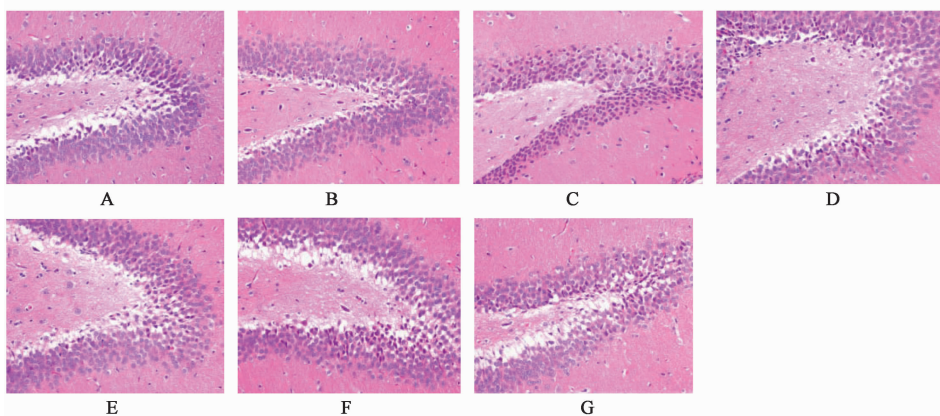
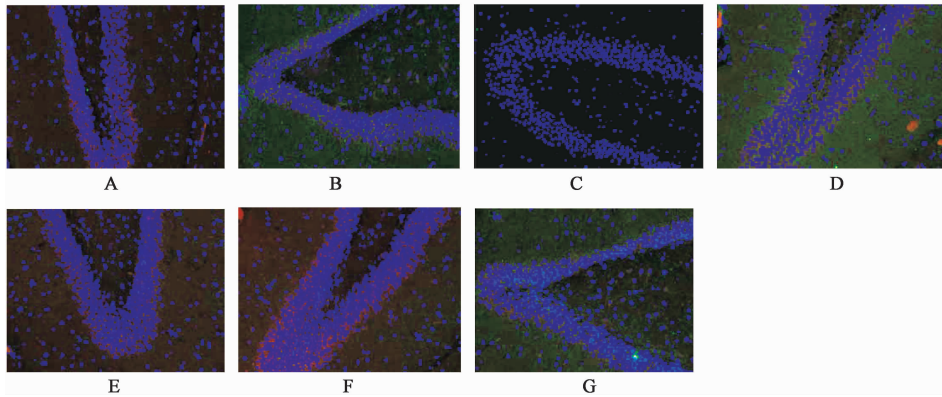


图 3 升降散对 VD 大鼠海马齿状回处组织学病变的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of Shengjiangsan on histological changes of dentate gyrus in hippocampus of AD rats(HE, $\times 200$)

3.5 对 VD 大鼠海马区 VEGF 和 Nestin 表达的影响 采用 2VO 两血管阻断法所致 VD 模型大鼠组海马区 VEGF 和 Nestin 的荧光强度明显减少($P < 0.01$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和升降散低中高剂量组海马区 VEGF 和 Nestin 的荧光强度显著增

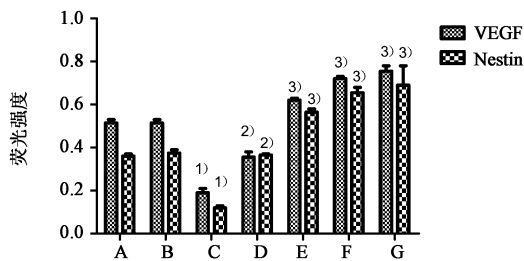
加($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 4,5。Western blot 结果同样也发现升降散能剂量依赖性上调 VD 大鼠海马组织 VEGF 和 Nestin 蛋白的表达($P < 0.05, P < 0.01$),见图 6,7。提示升降散对脑内神经的损伤作用很可能与促进血管新生和神经干细胞分化相关。



红色荧光强度表示 VEGF 表达水平;绿色荧光强度表示 Nestin 表达水平;蓝色是核染 DAPI

图 4 升降散对 VD 大鼠海马齿状回处 VEGF 和 Nestin 的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 4 Effect of Shengjiangsan on VEGF and Nestin in hippocampal dentate gyrus of AD rats (IF, ×200)



A. 正常组; B. 假手术组; C. 模型组; D. 升降散 $0.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 升降散 $1.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 升降散 $2.66 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; G. 盐酸多奈哌齐组(图 7,9 同)

图 5 升降散对 VD 大鼠海马齿状回处 VEGF 和 Nestin 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 5 Effect of Shengjiangsan on VEGF and Nestin in hippocampal dentate gyrus of AD rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

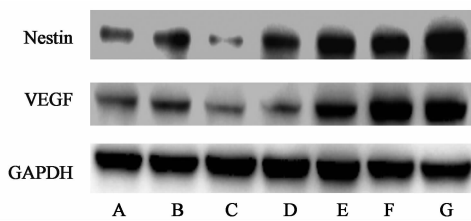


图 6 升降散对 VD 大鼠海马组织 VEGF 和 Nestin 蛋白的影响

Fig. 6 Effect of Shengjiangsan on VEGF and Nestin in hippocampus of AD rats

3.6 对调控海马组织 VEGF 和 Nestin 上游 Wnt 信号通路活性的影响

Wnt 信号被认为是海马神经干细胞发育和损伤修复最重要的信号通路之一,其激活后能同时上调血管的新生和神经干细胞的分化,本研究结果发现,升降散能剂量依赖性上调 VD 大鼠海马组织 Wnt 信号通路中 LRP, GSK3 β 的磷酸化水平及转录辅助因子 β -catenin 的水平,最终活化 Wnt 信号通路,这提示升降散上调 VD 大鼠海马组织中 VEGF 和 Nestin 表达的机制很可能与激活 Wnt

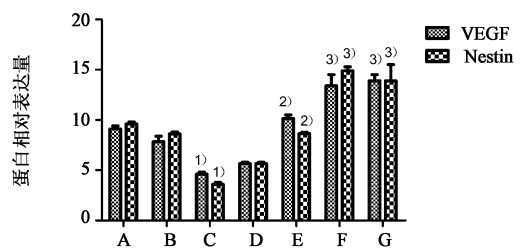


图 7 升降散对 VD 大鼠海马组织 VEGF 和 Nestin 蛋白相对 GAPDH 表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 7 Effect of Shengjiangsan on expression of VEGF and Nestin in hippocampus of AD rats compared with expression of GAPDH($\bar{x} \pm s, n = 10$)

信号通路有关。见图 8,9。

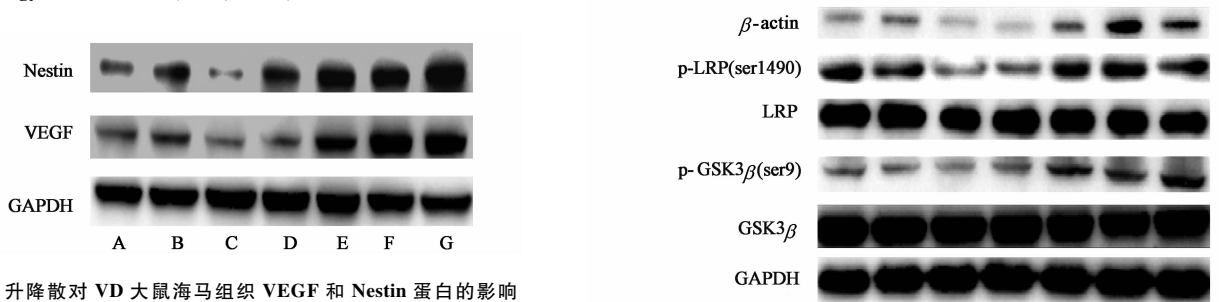


图 8 升降散对 VD 大鼠海马组织 Wnt 信号通路相关蛋白的影响

Fig. 8 Effect of Shengjiangsan on Wnt signaling pathway-related protein in hippocampus of AD rats

4 讨论

血管性痴呆是因脑血管因素导致脑实质损害所产生的智能及认知功能障碍的临床综合征,具有以下至少三项精神活动受损,语言、记忆、视空间技能、情感、人格和其他认知功能(如计算力、抽象判断力)^[16]。VD 是一种严重困扰老年人生活质量的常见病,其发病随年龄增长而增加,被认为是导致痴呆的第二位原因。目前尚无标准统一的治疗方法,主

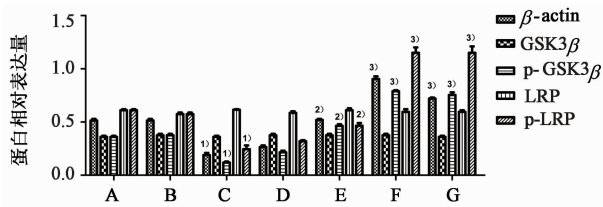


图 9 升降散对 VD 大鼠海马组织 Wnt 信号通路相关蛋白相对 GAPDH 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 9 Effect of Shengjiangsan on expression of Wnt signaling pathway-related protein in hippocampus of AD rats compared with GAPDH expression ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

要针对挽救缺血半暗带的神经细胞,防止梗死灶的面积进一步扩大,应用改善脑循环、脑代谢,提高脑细胞供氧等治疗方法,由于发病机制的多样化^[17-18],现有治疗手段或药物均不能很好改善 VD 的一系列症状,因此,如何多途径、多靶点治疗 VD 成为当今研究的热点^[19-22]。大量实验和临床研究表明,中医药在治疗神经退行性疾病方面显示出了一定的疗效,其多途径、多靶点的作用方式很可能是其发挥独特疗效的基础^[5]。

升降散由僵蚕、蝉衣、姜黄、大黄、米酒和蜂蜜 6 味药组成,6 药两两阴阳相配,升降相施,寒温并用^[23]。既无明显寒热偏胜之性,又无补泻偏胜之弊,重在调和,正所谓“以和为贵”^[24]。其组方说明其治疗辨证关键在于气机失调,其药物组成也较好的针对 VD 的病理因素“虚、痰、瘀、浊、毒”。升降散可明显改善 VD 患者认知功能和日常生活能力,然而其作用途径和机制不清楚^[5]。

避暗实验、水迷宫定位航行实验和水迷宫空间探索实验是评价药物对学习记忆能力最常用模型,避暗实验、水迷宫定位航行实验和水迷宫空间探索实验的结果均显示,升降散能呈剂量依赖性改善 VD 大鼠的学习和记忆能力。有趣的是,水迷宫空间探索实验和水迷宫定位航行实验结果均显示中剂量 ($1.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 升降散对 VD 大鼠学习和记忆能力的改善作用不如低剂量 ($0.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和高剂量 ($2.66 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),这种非线性量效关系背后的机制尚不清楚,有待于课题组进一步研究。另外,病理学的结果也从形态学上进一步确证升降散逆转 VD 的作用。

VEGF 在脑缺血损伤修复过程中非常关键,因此,上调 VD 患者海马组织 VEGF 的水平对逆转 VD 的病程的一个重要策略。Nestin 属于中间纤维蛋白的第 4 个亚族,目前认为,其是神经干细胞或祖细胞的标志物^[25-26],而且其在神经损伤修复过程中发挥

着不可替代的作用^[27],因此,上调 VD 患者海马组织中 Nestin 的水平是防治 VD 又一重要策略。依据本研究结果,升降散显著上调 VD 大鼠海马组织的 VEGF 和 Nestin 的水平,提示升降散改善 VD 患者认知和日常生活能力的途径很可能与促进海马组织血管新生及神经干细胞分化有关。有意思的是,免疫荧光的实验结果显示:低剂量 ($0.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 升降散上调 Nestin 的作用较 VEGF 明显,而中剂量 ($1.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 升降散和高剂量 ($2.66 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 升降散上调 VEGF 的作用较 Nestin 显著,其中的内在机制也值得课题组进一步研究,这对于阐释升降散的物质基础和作用机制具有重要意义。

大量研究已经证实经典 Wnt 信号通路与老年痴呆的发生发展密切相关,激活 Wnt 信号通路有助于促进脑血管的新生和神经干细胞的分化,具体表现为上调下游靶基因 VEGF 和 Nestin 等的表达^[28-32]。本研究结果显示,升降散能剂量依赖性上调 Wnt 信号通路的活性,主要上调关键蛋白磷酸化水平,而非上调总蛋白水平,这对揭示升降散上调 Wnt 信号的途径并非直接上调通路中某个关键蛋白的水平,而很可能是通过激活 Wnt 信号膜受体发挥作用的,这对揭示升降散治疗 VD 的作用机制和途径具有重要的提示意义。

[参考文献]

[1] Yoshimura M, Nishida K, Takekita Y, et al. Vascular dementia: an update [J]. Nihon Rinsho, 2016, 74(3): 489-494.

[2] Kalaria R N, Akinyemi R, Ihara M. Stroke injury, cognitive impairment and vascular dementia [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(5): 915-925.

[3] 曲艳吉, 卓琳, 王华丽. 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.

[4] 刘芳, 唐巍. 中医药防治血管性痴呆研究进展及思路探讨 [J]. 安徽中医药大学学报, 2014, 6(11): 1202-1204.

[5] 史江峰, 马健. 升降散治疗血管性痴呆 64 例疗效分析 [J]. 江苏医药, 2015, 41(21): 2569-2570.

[6] 闫盼盼, 闫国立, 詹向红, 等. Morris 水迷宫实验设计的统计学方法探析 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2): 264-266.

[7] 王俊亚, 张冬梅. Morris 水迷宫实验的测试方法介绍及注意事项 [J]. 现代医药卫生, 2012, 21(11): 3289-3290.

[8] 耿燕娜, 武毅君, 张文鑫. 贯叶金丝桃素对 AD 模型小鼠学习记忆能力及海马组织中 β_{1-42} , β APP 及

- BACE1 蛋白表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2877-2882.
- [9] 钱晓路, 孙蓉. 筛选训练对 Morris 水迷宫测试成绩的影响[J]. 中国药物警戒, 2013, 10(4): 193-195.
- [10] 谢宁, 关慧波, 宋琳, 等. 地黄饮子对 AD 模型大鼠定位航行学习记忆的影响[J]. 中医学报, 2005, 33(4): 28-29.
- [11] 田宛, 马新欣. 哌甲酯干预对自发性高血压大鼠定位航行实验搜索策略影响的研究[J]. 精神医学杂志, 2013, 26(1): 1-4.
- [12] 武海霞, 吴志刚, 刘红彬, 等. Morris 水迷宫实验在空间学习记忆研究中的应用[J]. 神经药理学报, 2014, 4(5): 30-35.
- [13] 郝玉兰, 李清钊, 郑国颖, 等. 纳米四氧化三铁染毒小鼠肝、肾、脑组织的病理形态学观察[J]. 环境与健康杂志, 2011, 28(9): 773-774.
- [14] 谢子平, 谭艳. 量子点荧光标记技术与免疫组织化学染色检测泌尿系统肿瘤组织特异性抗原表达的效果比较[J]. 广东医学, 2014, 35(15): 2372-2376.
- [15] 董鸿瑞, 王艳艳, 王国勤, 等. 免疫组织化学和免疫荧光染色在肾活检组织石蜡切片磷脂酶 A2 受体检测中的应用[J]. 中国医学科学院学报, 2015, 37(5): 562-566.
- [16] Brien J T, Thomas A vascular dementia [J]. Lancet 2015, 386(10004): 1698-1706.
- [17] Mori E. How treatable is vascular dementia? [J]. Brain Nerve, 2016, 68(4): 441-450.
- [18] Biessels G J. Diagnosis and treatment of vascular damage in dementia. [J] Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(5): 869-877.
- [19] LV Y L. Neuroprotective effects of tetrandrine against vascular dementia [J]. Neural Regen Res, 2016, 11(3): 454-459.
- [20] Bousser M G, Chabriat H. Vascular dementia[J]. Bull Acad Natl Med, 2012, 196(2): 409-428.
- [21] Igoumenou A, Ebmeier K P. Diagnosing and managing vascular dementia[J]. Practitioner, 2012, 256(1747): 13-16.
- [22] Benisty S. Current concepts in vascular dementia [J]. Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil, 2013, 11(2): 171-180.
- [23] Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia [J]. Neuron, 2013, 80(4): 844-866.
- [24] 翟双庆, 王洪图. 论中焦气机与神志关系[J]. 北京中医药大学学报, 1995, 18(5): 10-11.
- [25] 韩景献. 三焦气化失常-衰老[J]. 中医杂志, 2008, 49(3): 200-202.
- [26] 韩肖华, 黄晓琳. 电针督脉腧穴对脑缺血大鼠缺血灶周围巢蛋白表达的影响[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2010, 39(3): 383-386.
- [27] Gilyarov A V. Nestin in central nervous system cells [J]. Neurosci Behav Physiol, 2008, 38(2): 165-169.
- [28] Vaittinen S, Lukka R, Sahlgren C, et al. The expression of intermediate filament nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2001, 60(6): 588-597.
- [29] WU C, CHEN J, CHEN C, et al. Wnt/beta-catenin coupled with HIF-1alpha/VEGF signaling pathways involved in galangin neurovascular unit protection from focal cerebral ischemia [J]. Sci Rep, 2015, doi: 10.1038/srep16151.
- [30] ZHAO Z, LU P, ZHANG H, et al. Nestin positively regulates the Wnt/beta-catenin pathway and the proliferation, survival and invasiveness of breast cancer stem cells [J]. Breast Cancer Res, 2014, 16(4): 1-12.
- [31] 于俊生, 王强, 于惠青. 升降散对系膜增生性肾小球肾炎大鼠肾组织 NF- κ B 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 190-193.
- [32] 王玮, 赵岩松. 升降散中姜黄应用析疑[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 369-372.

[责任编辑 周冰冰]