

$A\beta$ 损伤人脑微血管内皮细胞培养液对正常神经元凋亡的影响及通心络胶囊的干预作用

张志慧¹, 贾振华^{1*}, 康健生², 安俊岐¹, 孙永辉¹

(1. 河北以岭医院, 石家庄 050091; 2. 河北商贸学校, 石家庄 050057)

[摘要] 目的:通过 β 淀粉样蛋白(amyloid β -protien, $A\beta$)损伤人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cells, HBMEC)培养液对正常神经元凋亡的影响及通心络胶囊的干预作用研究,探讨通心络对HBMEC及脑神经元的保护作用及其可能作用机制。方法:实验分为空白组,正常组,模型组, $A\beta$ 损伤组,通心络组,石杉碱甲组,空白组为正常神经元组,正常组为正常HBMEC培养液培养神经元组,其余4组采用 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $A\beta$ 诱导HBMEC损伤,其中通心络组提前干预($400 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 通心络预处理6 h),石杉碱甲组提前干预($100 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 石杉碱甲预处理6 h),取其损伤后的细胞培养液加到正常脑神经元中进行培养,实验结束检测神经元的凋亡情况及凋亡蛋白、基因表达。结果: $A\beta$ 损伤HBMEC后的培养液可加速脑神经元的凋亡,且较 $A\beta$ 直接导致脑神经元凋亡严重,提前通过通心络干预的HBMEC培养液诱导脑神经元凋亡细胞减少,凋亡蛋白、基因表达均有降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),且优于西药石杉碱甲组($P < 0.05$)。结论:老年性痴呆(AD)中HBMEC损伤可以进一步加速神经元的凋亡,而通心络保护HBMEC同时可起到保护脑神经元的作用,通心络胶囊对AD脑神经元及HBMEC具有双重保护作用。

[关键词] 通心络胶囊; β 淀粉样蛋白; 人脑微血管内皮细胞; 神经元凋亡; 干预作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)17-0166-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017170166

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170526.1041.054.html>

[网络出版时间] 2017-05-26 10:41

Effect of $A\beta$ Injury-based Human Brain Microvascular Endothelial Cell Culture Solution on Apoptosis of Normal Neurons and Intervention Effect of Tongxinluo Capsule

ZHANG Zhi-hui¹, JIA Zhen-hua^{1*}, KANG Jian-sheng², AN Jun-qi¹, SUN Yong-hui¹

(1. Hebei Yiling Hospital, Shijiazhuang 050091, China;

2. Hebei Business and Trade School, Shijiazhuang 050057, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of amyloid beta ($A\beta$) injury-based human brain microvascular endothelial cell culture solution on normal neuronal apoptosis and the intervention effect of Tongxinluo capsule, in order to investigate the protective effect of Tongxinluo on brain microvascular and brain neurons and its possible mechanism. **Method:** The experiment was divided into blank group, normal group, model group, $A\beta$ injury group, Tongxinluo group, Huperzine A group. The blank group was normal neuron group, The normal group was normal human brain microvascular endothelial cells-cultured neuron group. In the other 4 groups, $20 \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $A\beta$ was used to induce damage in brain microvascular endothelial cells. Among them, the early intervention was made for the Tongxinluo group (pretreatment with $400 \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Tongxinluo for 6 h) and the huperzine A group

[收稿日期] 20170220(002)

[基金项目] 河北省中医药管理局科研计划项目(2011095)

[第一作者] 张志慧, 博士, 主任医师, 从事脑血管病中西医结合治疗与研究, Tel:18503210676, E-mail:zhzh728@163.com

[通讯作者] *贾振华, 博士, 主任医师, 从事心脑血管病中西医结合治疗与研究, Tel:18503210608, E-mail:jiatcm@163.com

(pretreatment with $100 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ huperzine A for 6 h). The damaged cell culture fluid was cultured in normal brain neurons. At the end of experiment, neuron apoptosis and apoptosis protein and gene expressions were detected. **Result:** The culture fluid of brain microvascular endothelial cells after $A\beta$ damage could increase apoptosis rate of neurons in the brain, and directly cause severer cerebral neuron apoptosis than $A\beta$. After the early intervention with Tongxinluo, human brain microvascular endothelial cells-induced cerebral neuron apoptosis rate decreased, and apoptosis gene and protein expressions reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$), with a better effect than western medicine huperzine A ($P < 0.05$). **Conclusion:** The apoptosis of neurons could be further accelerated in Alzheimer's disease (AD), and Tongxinluo protects brain microvascular endothelial cells and brain neurons. This suggests that Tongxinluo capsule has a double protective effect on AD neurons in the brain and brain microvascular endothelial cells.

[**Key words**] Tongxinluo capsule; amyloid β -protein ($A\beta$); human brain microvascular endothelial cells (HBMEC); endothelial cells apoptosis; intervention effect

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 又称老年性痴呆, 是一种发生于患者老年期以记忆力减退和认知功能障碍为主要表现的神经系统慢性进行性疾病^[1]。成为继心脑血管病、癌症和脑卒中之后的第 4 位死亡原因^[2]。本病尽管临床治疗方法较多、可选择应用药物不少, 但目前尚无特效治疗^[3]。其病理特征为大脑皮质萎缩, 神经原纤维缠结, β -淀粉样蛋白沉积, 记忆性神经元数量大量减少及老年斑形成等^[4]。 β -淀粉样蛋白沉积 ($A\beta$) 是一种具有神经元毒性的多肽, 是大脑皮质老年斑的主要成分, 目前已公认其是导致 AD 等神经退行性疾病的主要原因之一, 在 AD 发生发展过程中起关键作用^[5]。因此有实验发现 AD 死亡患者脑微血管内皮细胞 (HBMEC) 与正常大鼠大脑皮层神经元联合培养, 或者用其 HBMEC 条件培养液培养正常大鼠大脑皮层神经元, 都会导致神经元的死亡^[6]。

通心络胶囊是治疗心脑血管疾病的复方制剂, 以往实验发现其对 $A\beta_{1-42}$ 损伤 HBMEC 的保护作用^[7], 同时可保护脑神经元^[8], 但其保护 HBMEC 同时是否实现保护脑神经元尚未可知, 为此本研究采用 $A\beta$ 诱导 HBMEC (提前干预) 损伤, 取其损伤后的上清液加到正常培养脑神经元中, 检测神经元的凋亡情况, 探讨通心络对 HBMEC 及脑神经元的保护及其可能作用途径。

1 材料

1.1 药物 通心络超微粉 (石家庄以岭药业股份有限公司, 批号 2014063), 石杉碱甲原粉 (中国食品药品检定研究院, 批号 2014055)。

1.2 试剂 SYBR Premix Ex Taq, 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司, 批号分别为 RR420Q, 6233); B 淋巴细胞瘤-2

(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax), 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase)-3 抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 批号分别为 sc-23960, sc-20067, sc398715); 引物序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, Bcl-2 (200 bp): 上游 5'-GGATGACTTCTCTCGTCGCTAC-3', 下游 5'-TGACATCTCCCTGTTGACGCT-3'; Bax (190 bp): 上游 5'-GGTTGCCCTCTTCTACTTTGC-3', 下游 5'-TCTTCCAGATGGTGAGCGAG-3'; GAPDH (144 bp): 上游 5'-ACTTTGGTATCGTGGAAGGACT-3', 下游 5'-GTAGAGGCAGGGATGATGTTTC-3'。

1.3 仪器 MCO-175 型 CO_2 培养箱 (日本 Sanyo 公司); DHP-9602 型培养/干燥箱 (上海一恒科技有限公司); CK2 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); LD4-8 型水平低速离心机 (北京医用离心机厂); SW-CJ-1F 型洁净工作台 (中国苏净集团安泰公司); Epics-XL II 型流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); ABI PRISM7000 型实时定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 170-3930 型蛋白免疫印迹 (Western blot) 电泳仪, 170-3935 型转膜槽 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 药物选择 $A\beta_{1-42}$ ($A\beta$) 老化处理, 观察药物通心络超微粉, 对照药物配制, HBMEC 细胞复苏与培养同文献^[7]。400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 通心络孵育 HBMEC 细胞 6 h 活性最佳^[7], 通心络超微粉用前 0.2 μm 过滤器过滤除菌。

2.2 HBMEC 损伤上清液制备 HBMEC 培养后, 取对数生长期的 HBMEC 细胞, 以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板, 正常组用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 6 h 后, 换培养液, 继续培养 24 h 后进行检测;

模型组细胞培养 6 h 后,换培养液,然后加入终浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{A}\beta$ 作用 24 h 诱导细胞损伤;通心络组加入终质量浓度为 $400 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 通心络预处理 6 h,换培养液,并加入终浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{A}\beta$,作用 24 h 诱导细胞损伤。石杉碱甲组加入终质量浓度为 $100 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的石杉碱甲预处理 6 h,换培养液,并加入终浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{A}\beta$,作用 24 h 诱导细胞损伤。

2.3 分组及药物处理 原代神经元培养后^[8],实验分为 6 组,分别为正常神经元组(空白组),正常 HBMEC 上清液 + 神经元组(正常组), $\text{A}\beta$ 损伤 HBMEC 上清液 + 神经元组(模型组), $\text{A}\beta$ 损伤神经元组($\text{A}\beta$ 损伤组),通心络干预 HBMEC 上清液(通心络终质量浓度为 $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{A}\beta$ 终浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,处理 24 h) + $\text{A}\beta$ + 神经元组(通心络组),石杉碱甲干预 HBMEC 上清液(石杉碱甲终质量浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{A}\beta$ 终浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,处理 24 h) + $\text{A}\beta$ + 神经元组(石杉碱甲组)。空白组加入 100% 无血清 DMEM 培养液,其余 5 组加入 50% 无血清 DMEM 培养液,将处理好的细胞置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养 12 h。

2.4 流式细胞法检测各组神经元凋亡 培养结束后收集细胞沉淀吹打成单细胞悬液,加入乙醇固定, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存过夜,加入碘化丙啶(PI)染液 1 mL,放置 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光染色 30 min,流式细胞仪检测凋亡率。

2.5 Western blot 检测各组神经元凋亡相关蛋白 Caspase-3, Bax, Bcl-2 表达 细胞加药培养后取细胞,裂解,离心,分离上清,测定蛋白浓度;蛋白变性,每组取蛋白电泳,洗膜封闭,洗膜后加入 Bax, Bcl-2 (1:200),Caspase-3 特异性兔抗小鼠多克隆抗体(1:200),鼠源 β -actin (1:1 000) 一抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;TBS-T 洗膜后分别加入荧光鼠源二抗(1:1 万),孵育,洗膜后 ECL 显像曝光,采用 quantity one 软件分析检测各条带灰度值, β -actin 作为内参。

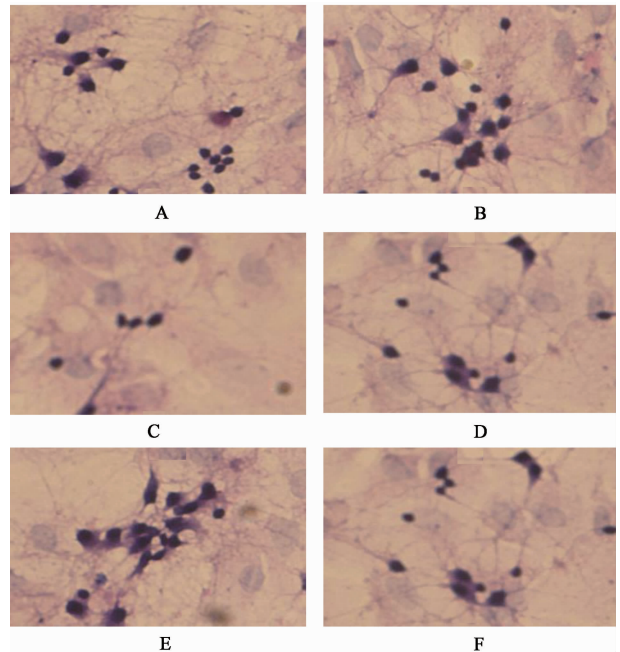
2.6 Real-time PCR 法检测各组神经元凋亡相关基因 Bax, Bcl-2 mRNA 表达 细胞加药培养后取细胞,裂解,静置 5 min,加入三氯甲烷,摇匀离心,取水样层,加入异丙醇,混匀沉淀离心,弃上清,加乙醇离心,弃上清,干燥,取 RNA 加入 Lodding buffer $1 \mu\text{L}$,电泳,检测 RNA 浓度,按试剂盒说明配制 $10 \mu\text{L}$ 体系反应液,于 PCR 仪中将 mRNA 反转录成 cDNA。PCR 反应体系为 SYBR Premix Ex Taq 酶 $10 \mu\text{L}$, ROX Reference Dye $0.4 \mu\text{L}$, cDNA 溶液 $5 \mu\text{L}$,上、下游引物各 $0.4 \mu\text{L}$,蒸馏水 $3.8 \mu\text{L}$,总计 $20 \mu\text{L}$ 反应

体系。PCR 反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 10 s; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火/延伸 31 s,扩增 40 个循环。反应结束后确认扩增曲线与融解曲线,以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示基因相对表达量。

2.7 统计学分析 采用 PEMS 3.1 统计软件分析数据,多个样本均数比较用单因素方差分析,均数以 $\bar{x} \pm s$ 表示;多个样本均数比较用秩和检验,多个样本均数间的两两比较用 Nemeyi 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 通心络对 HBMEC 培养液培养神经元死亡的影响 空白组和正常组神经元细胞胞体大而透亮,呈梭形或三角形,细胞核和核仁清晰可见,聚堆生长,神经元突起长、多,末端分支形成典型的神经网络; $\text{A}\beta$ 损伤组和模型组神经元细胞数量减少,胞体模糊,神经元突起明显稀疏,变短变少,甚至消失,以模型组损伤最为严重。通心络组和石杉碱甲组与模型组相比明显好转,且通心络组改善更明显。见图 1。



A. 空白组;B. 正常组;C. 模型组;D. $\text{A}\beta$ 损伤组;E. 通心络组;F 石杉碱甲组(图 2~4 同)

图 1 通心络对 $\text{A}\beta$ 损伤 HBMEC 培养液培养神经元形态的影响(HE, $\times 400$)

Fig.1 Effect of Tongxinluo on morphological changes of human brain microvascular endothelial cells cultured *in vitro* by $\text{A}\beta$ (HE, $\times 400$)

3.2 通心络对 HBMEC 培养液培养神经元坏死和凋亡的影响 Hoechst33342 染色下,空白组及正常组皮质神经元呈低蓝染色,细胞胞核和细胞膜相对

较完整,凋亡细胞较少, $A\beta$ 模型组细胞损伤较严重,细胞呈亮蓝染色,可见细胞呈典型的凋亡形态,细胞周边有凋亡小体形成。通心络组和石杉碱甲组均有改善。见图 2。

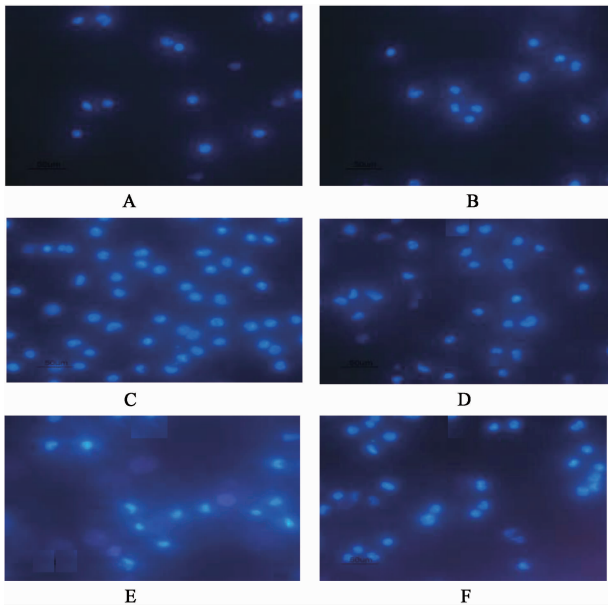


图 2 通心络对 $A\beta$ 损伤 HBMEC 培养液培养神经元坏死和凋亡的影响 (Hoechst33342, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of Tongxinluo on changes of neuronal necrosis and apoptosis in human microvascular endothelial cells cultured *in vitro* by $A\beta$ (Hoechst33342, $\times 200$)

3.3 通心络对 $A\beta$ 损伤 HBMEC 培养液培养神经元凋亡率影响 与空白组、正常组比较, $A\beta$ 损伤组及模型组神经元细胞出现明显凋亡 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),凋亡率显著上升,且模型组最为显著 ($P < 0.01$),与模型组比较,通心络与石杉碱甲组的凋亡率均下降,减少神经元细胞凋亡 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 通心络对 $A\beta$ 损伤 HBMEC 培养液培养神经元凋亡率影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of Tongxinluo on apoptosis of human brain microvascular endothelial cells cultured with $A\beta$ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 浓度 | 凋亡率/% |
|-------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| 空白 | - | 7.29 \pm 0.77 |
| 正常 | - | 9.55 \pm 1.97 |
| 模型 | - | 22.07 \pm 4.82 ²⁾ |
| $A\beta$ 损伤 | 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 15.22 \pm 0.25 ²⁾ |
| 通心络 | 400 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 15.70 \pm 0.85 ^{3,5)} |
| 石杉碱甲 | 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 19.05 \pm 3.50 ³⁾ |

注:与正常组、空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;和石杉碱甲组比较⁵⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.4 通心络对 $A\beta$ 损伤 HBMEC 培养液培养神经元凋亡相关蛋白酶 Caspase-3 的影响 空白组与正常组比较无统计学差异。与空白组、正常组比较, $A\beta$ 损伤组、模型组凋亡相关蛋白酶 Caspase-3 表达上升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),以模型组最为显著 ($P < 0.01$)。与模型组比较,通心络组及石杉碱甲组 Caspase-3 表达显著下降 ($P < 0.01$),通心络组下降较石杉碱甲组明显 ($P < 0.05$)。见图 3,表 2。



图 3 $A\beta$ 损伤 HBMEC 培养液培养神经元 Caspase-3 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of Caspase-3 expression in human microvascular endothelial cells cultured with $A\beta$

表 2 通心络对 $A\beta$ 损伤 HBMEC 培养液培养神经元 Caspase-3 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Tongxinluo on apoptosis-related protease Caspase-3 in human microvascular endothelial cells cultured with $A\beta$ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 浓度 | Caspase-3/ β -actin |
|-------------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 空白 | - | 0.83 \pm 0.17 |
| 正常 | - | 0.89 \pm 0.21 |
| 模型 | - | 1.32 \pm 1.22 ²⁾ |
| $A\beta$ 损伤 | 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | 1.11 \pm 0.17 ^{1,3)} |
| 通心络 | 400 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0.78 \pm 0.85 ^{4,5)} |
| 石杉碱甲 | 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ | 0.93 \pm 3.50 ⁴⁾ |

3.5 通心络对 $A\beta$ 损伤 HBMEC 培养液培养神经元 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 空白组与正常组比较无统计学差异。与空白组、正常组比较, $A\beta$ 损伤组及模型组神经元细胞凋亡蛋白 Bax 表达增强, Bcl-2 表达减弱 ($P < 0.05$),且模型组最为明显,通心络组 Bax, Bcl-2 表达较模型组改善 ($P < 0.05$),通心络组优于石杉碱甲组。见图 4,表 3。

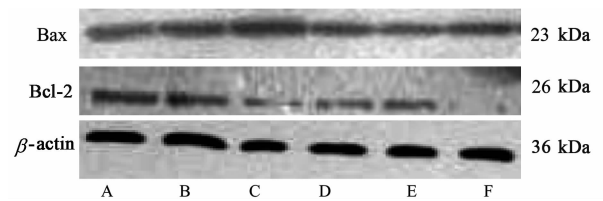


图 4 $A\beta$ 损伤 HBMEC 培养液培养神经元 Bax, Bcl-2 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of protein expressions of relevant apoptosis Bax and Bcl-2 in HBMEC cultured with $A\beta$

3.6 通心络对 $A\beta$ 损伤 HBMEC 培养液培养神经元 Bcl-2, Bax mRNA 表达的影响 与空白组、正常组比较, $A\beta$ 损伤组、模型组凋亡基因 Bax mRNA 表达

表 3 通心络对 Aβ 损伤 HBMEC 培养液培养神经元 Bax, Bcl-2 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Tongxinluo on protein expressions of relevant apoptosis Bax and Bcl-2 in HBMEC cultured with Aβ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 浓度 | Bcl-2/β-actin | Bax/β-actin |
|-------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 空白 | - | 0.78 ± 0.11 | 0.82 ± 0.01 |
| 正常 | - | 0.70 ± 0.03 | 0.83 ± 0.12 |
| 模型 | - | 0.45 ± 0.12 ¹⁾ | 1.21 ± 0.11 ¹⁾ |
| Aβ 损伤 | 20 μmol·L ⁻¹ | 0.49 ± 0.19 ¹⁾ | 1.01 ± 0.15 ¹⁾ |
| 通心络 | 400 g·L ⁻¹ | 0.72 ± 0.12 ³⁾ | 0.84 ± 0.09 ³⁾ |
| 石杉碱甲 | 100 mg·L ⁻¹ | 0.45 ± 0.21 ¹⁾ | 1.05 ± 0.15 ¹⁾ |

注:与正常组、空白组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01;与模型组比较³⁾ P < 0.05。

上升, Bcl-2 mRNA 表达下降, 且以模型组最为显著 (P < 0.01), 通心络组 Bax, Bcl-2 mRNA 表达较模型组均有不同程度改善 (P < 0.05, P < 0.01)。见表 4。

表 4 通心络对 Aβ 损伤 HBMEC 培养液培养神经元 Bax, Bcl-2 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of Tongxinluo on apoptosis of Bax and Bcl-2 mRNA in human brain microvascular endothelial cells cultured with Aβ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 浓度 | Bcl-2 mRNA | Bax mRNA |
|-------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 空白 | - | 1.00 ± 0.01 | 1.00 ± 0.03 |
| 正常 | - | 0.97 ± 0.06 | 1.02 ± 0.12 ¹⁾ |
| 模型 | - | 0.93 ± 0.06 ¹⁾ | 1.19 ± 0.19 ¹⁾ |
| Aβ 损伤 | 20 μmol·L ⁻¹ | 1.16 ± 0.09 | 0.80 ± 0.16 |
| 通心络 | 400 g·L ⁻¹ | 1.14 ± 0.16 ²⁾ | 0.84 ± 0.09 ^{3,4)} |
| 石杉碱甲 | 100 mg·L ⁻¹ | 0.98 ± 0.11 | 1.03 ± 0.15 |

注:与空白组、正常组比较¹⁾ P < 0.01;与模型组比较²⁾ P < 0.05, ³⁾ P < 0.01, 与石杉碱甲组比较⁴⁾ P < 0.05。

4 讨论

随着我国人口老龄化的来临, AD 的发病率呈现逐年升高的趋势^[9], 迄今为止, AD 的发病机制不明确, 无疗效显著的西药与之对应, 本课题组在以往中医学研究基础上, 结合现代医学对其研究现状, 对其机制有一个新的认识, 根据中医络病理论研究, 本课题组认为本病年老患病, 病在脑络, 肾元亏虚, 痰瘀阻络, 乃久病入络, 实属“络病”范畴。年老患病, 凝痰败瘀混处络中, 非草木药物之力可以逐出, 虫类通络药则可奏效。因虫类药善于走窜, 具搜剔疏拔之功, 有“追拔沉混气血之邪”的独特疗效。故本病应选用虫类化痰通络药或搜风通络药如水蛭、土鳖虫、全蝎、蜈蚣等, 以搜剔疏拔, 迅速开通闭塞之脉

络, 达到络气畅通。此外, 叶天士所谓:“络以辛为泄”, “攻坚垒, 佐以辛香, 是络病大旨”。络气虚滞、络脉瘀阻, 日久伴有气机运行失常, 治疗可配伍流气畅络辛味药, 有补而不滞之效。

本研究中通心络胶囊主要由人参、全蝎、水蛭、蝉蜕、蜈蚣、土鳖虫、酸枣仁、降香、冰片等药物组成, 方中用人参补益元气, 补益脾肺之气, 元气充足, 《本草经疏》:“人参能……益真气, 则五脏皆补也”, 络气畅通, 气旺血行, 络脉自通, 并有益智之功效, 《神农本草经》曰:“明目, 开心益智”。《名医别录》谓:“调中, …令人不忘。”虫类药活血、化痰、通络, 搜剔疏拔以开通闭塞之络脉, 酸枣仁养血安神益智, 《本草再新》谓:“益志定呵, 聪耳明目。”降香、冰片引药入络, 诸药合用, 达到气旺血行, 脑络通畅, 诸症自愈。纵观通心络胶囊组方, 既有大补元气, 补一身之气的药物, 又有疏通络脉, 使脑络通畅的诸药配合, 体现了“络以通为用”的治疗原则。气旺血行, 络脉畅通, 供血供气、津血互换、营养代谢功能则正常, 气络信息传导及调节控制功能恢复, 则呆傻诸证减轻或消除。

以往实验取大脑微血管内皮细胞, 诱导缺血损伤模型, 采用其细胞条件培养液对大鼠脑皮层神经元神经元培养, 发现对神经元活力具有损伤作用^[10]。本次实验采用 Aβ 损伤大脑微血管内皮细胞。诱导痴呆模型, 取其条件培养液培养神经元, 同样发现其对神经元具有损伤作用。结合之前实验中发现通心络可以剔除络瘀, 减轻 Aβ 损伤人脑微血管内皮细胞所致炎症反应, 本实验发现提前用通心络干预过的脑微血管内皮细胞对脑神经元的毒性反应减轻, 神经元的凋亡减少, 究其原因可能与其有效增加脑微血管内皮损伤后 VEGF 表达^[11], 促进脑微血管新生, 为脑组织更好的供血供氧, 又可有效减少炎症因子分泌, 避免炎症因子对脑微血管内皮细胞的继发损伤, 同时又可避免炎症因子引起的神经炎症性损伤^[7], 由此推测通心络不仅可保护 Aβ 所致脑神经元损伤^[8], 而且保护脑微血管的平衡调节功效, 同时也实现了保护脑神经元的作用。此实验结果在一定意义上为中药制剂对 AD 和神经元双重保护作用提供了佐证。

[参考文献]

- [1] 吴江. 神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 297-299.
- [2] 李丽琴, 彭阿香, 张弦, 等. 巴柴合剂治疗老年性痴呆肾虚髓减证 36 例[J]. 福建中医药, 2016, 47(2):

- 14-15.
- [3] 孙岩,马晨铭,刘锐,等. 中西医治疗老年性痴呆研究述评[J]. 中医学报,2016,5(216):733.
- [4] 何小波,王晓燕. 天麻素联合多奈哌齐治疗血管性痴呆疗效分析[J]. 实用老年医学,2014,29(7):580-582.
- [5] 李秀玲,刘亚芬,孙莉. 交泰丸对老年性痴呆心肾不交证患者认知能力及血清 $A\beta$ 水平的影响[J]. 中国中医药现代远程教育,2015,13(24):12-14.
- [6] Grammas P, Ovasse R. Inflammatory factors are elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging,2001,22(6):837-842.
- [7] 张志慧,吴以岭. 通心络对 $A\beta 1-42$ 损伤人脑微血管内皮细胞分泌炎症因子的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2009,15(7):504-505.
- [8] 张志慧,周龙岗,王玲玲,等. $A\beta 1-42$ 诱导皮层神经元细胞凋亡的机制及通心络的干预作用[J]. 中国老年学杂志,2009,12(29):3199-3201.
- [9] 郝梦薇,任庆国. 抗抑郁药对老年性痴呆治疗作用的研究进展[J]. 卒中与神经疾病,2013,20(4):253-255.
- [10] 盖聪,李澎涛,孙红梅,等. 通心络干预的脑微血管内皮细胞条件液对大鼠脑皮层神经元的影响[J]. 中医学报,2014,29(6):769-771.
- [11] 张志慧,吴以岭. 通心络对 $A\beta 1-42$ 损伤人脑微血管内皮细胞 HIF-1 α 、VEGF 表达的干预作用[J]. 中国药理学通报,2010,26(1):124-127.

[责任编辑 张丰丰]

欢迎订阅 2018 年《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中华中医药学会、中国中医科学院中药研究所主办的学术刊物。本刊创建于1995年10月,主要设置栏目包括复方配伍专论、方剂学研究、药剂与炮制、资源与鉴定、化学分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘、中医传承及相关综述等。目前为CSCD来源期刊、中文核心期刊、中国科技核心期刊、RCCSE中国学术期刊排行榜核心期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为中国中医药优秀期刊及中国学术期刊优秀期刊。

本刊为半月刊,16开本,234页,标准刊号ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价48元,全年1152元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号2-417;国外由中国国际图书贸易集团有限公司办理发行,代号SM4655,欢迎订阅。读者还可通过本刊编辑部办理邮购,Tel:(010)84076882,E-mail:syfjx_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。