

蓝布正提取物对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及 海马 NT-3, BDNF 蛋白表达的影响

刘明^{1,2*}, 刘杨¹, 邓颖¹, 江蓓³, 吕金田³, 蔡兵³

(1. 贵阳中医学院基础医学院, 贵阳 550025; 2. 国家苗药工程技术研究中心, 贵阳 550025; 3. 贵州盛世龙方制药股份有限公司, 贵阳 550001)

[摘要] **目的:**观察蓝布正提取物(GHE)对血管性痴呆(VD)大鼠学习记忆能力的影响并探讨其作用的机制。**方法:**采用双侧颈总动脉结扎法制作 VD 大鼠模型,将大鼠随机分成假手术组,模型组,GHE 高、中、低剂量组(7,3.5,1.75 g·kg⁻¹)和阳性药组(天保宁银杏叶片,0.007 g·kg⁻¹),各组灌胃相应药物,每日1次,连续35 d,在第30~35天进行 Morris 水迷宫实验检测大鼠的学习记忆能力,Morris 水迷宫实验结束后处死大鼠,收集大脑样本,免疫组化法检测海马 CA₁ 区 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax),Bcl-2,神经营养因子-3(NT-3),脑源性神经营养因子(BDNF)蛋白表达。**结果:**与模型组比较,GHE 高、中剂量组可明显缩短大鼠的逃避潜伏期,增加穿越平台数($P < 0.05$);GHE 高、中、低剂量组可显著降低海马 CA₁ 区 Bax 表达,升高 Bcl-2,NT-3,BDNF 表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**GHE 能改善 VD 大鼠的学习记忆能力,其机制可能与促进海马 CA₁ 区 NT-3, BDNF 的表达,抑制神经细胞凋亡有关。

[关键词] 蓝布正提取物; 血管性痴呆; 学习记忆; 神经营养因子-3; 脑源性神经营养因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)17-0154-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017170154

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170612.0938.002.html>

[网络出版时间] 2017-06-12 9:38

Effect of Gei Herba Extract on Learning and Memory Ability and Expression of NT-3 and BDNF Protein in Hippocampus of Vascular Dementia Rats

LIU Ming^{1,2*}, LIU Yang¹, DENG Ying¹, JIANG Bei³, LYU Jin-tian³, CAI Bing³

(1. Basic Medical School, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China;
2. National Engineering and Technological Research Center of Miao Medicine, Guiyang 550025, China;
3. Guizhou Shengshi Longfang Pharmaceutical Co. Ltd., Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effect and mechanism of Gei Herba extract (GHE) on memory and learning ability of rats model of vascular dementia (VD). **Method:** Rats with vascular dementia were prepared with bilateral carotid artery ligation. Then the rats were randomly divided into 6 groups, namely sham operation group, model group, GHE high, medium and low dose groups (7, 3.5, 1.75 g·kg⁻¹), and Taponing positive control group (0.007 g·kg⁻¹). The corresponding drug was given by oral administration for 35 d, once a day. The behavior tests were carried out by water maze task on day 30-35 to test the memory and learning abilities of the rats, then they were sacrificed at the end of water maze test. The protein expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) associated X protein (Bax), Bcl-2, nerve neurotrophic factor-3 (NT-3) and nerve

[收稿日期] 20170426(018)

[基金项目] 贵州省科技合作计划项目(黔科合 LH 字[2015]7274 号);贵州省科技计划项目(黔科合院士站[2014]4013 号);贵州省协同创新中心建设项目(黔教合协同创新字[2013]02 号);贵州省普通高等学校工程研究中心建设项目(黔教合 KY 字[2014]22 号)

[通讯作者] *刘明,博士,副教授,从事中药、民族药防治心脑血管疾病药理研究,E-mail:393617518@qq.com

neurotrophic factor-3 (BDNF) in hippocampal CA₁ region of brain samples collected after the last administration were detected by immunocytochemistry. **Result:** GHE high and middle dose groups can significantly shorten the escape latency and increase the number of cross platforms ($P < 0.05$); GHE high, middle and low dose groups can significantly decline the expression levels of Bax and rise the expression levels of Bcl-2, NT-3 and BDNF ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** GHE can improve learning and memory abilities of VD rats, and its mechanism may be related to the promotion of NT-3 and BDNF expression in hippocampal CA₁ region and the inhibition of neurons apoptosis.

[**Key words**] Gei Herba extract; vascular dementia; learning and memory; nerve neurotrophic factor 3; brain-derived neurotrophic factor

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是指由各种脑血管病, 包括梗死、出血和缺血等相关性改变所致的严重认知功能障碍综合征, 研究表明, VD 是仅次于阿尔茨海默病的第二位常见的痴呆, 虽具有一定的可防治性, 但目前还缺乏根本有效的防治措施^[1]。因此, 研发有效预防及治疗 VD 的药物具有重要的意义。

蓝布正为蔷薇科植物柔毛路边青 *Geun japonicum* var. *chinense* 的干燥全草, 贵州少数民族地区将柔毛路边青叫做蓝布正, 又名头晕药、香鸡归、路边黄、水杨梅等, 民间广泛用于治疗头晕目眩、头痛等^[2]。大量研究表明, 蓝布正具有显著脑保护作用^[3-5]。现已明确, 神经营养因子对脑缺血损伤具有保护作用。另外, 蓝布正对脑缺血损伤大鼠神经元凋亡具有抑制作用^[4], 但蓝布正是否可以影响 VD 后神经营养因子的表达而抑制神经元凋亡, 尚未见报道。本研究通过观察蓝布正提取物 (Gei Herba extract, GHE) 对 VD 大鼠学习记忆、海马神经细胞凋亡及神经营养因子-3 (nerve neurotrophic factor-3, NT-3), 脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 的影响, 探讨 GHE 改善 VD 学习记忆的作用及可能作用机制, 为民族医药防治 VD 提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠, 体重 (200 ± 20) g, 由中国人民解放军第三军医大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (军) 2014-0011, 经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准 (编号 1602003)。

1.2 药物及试剂 GHE (贵州盛世龙方制药股份有限公司, 批号 20150617)。取蓝布正干燥全草 1 kg, 经水提醇沉后, 浓缩干燥, 得干膏 0.026 kg。成人日用蓝布正生药量为 9 ~ 30 g, 本研究以 30 g 计。天保宁银杏叶片 (浙江康恩贝制药股份有限公司, 批号 150405)。SABC 免疫组化染色试剂盒 (博

士德生物, 批号 14C28C)。B 细胞淋巴瘤 (Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bax), Bcl-2, NT-3, BDNF 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号分别为 ab47528, ab47316, ab157492, ab153482)。

1.3 仪器 SLY-WMS 型 Morris 水迷宫 (北京硕林苑科技有限公司); ASP200S 型脱水机, EG1160 型包埋机, RM2135 型切片机 (德国 Leica 公司); DC300 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 动物造模、分组及给药 参照文献方法^[6-7]制备 VD 大鼠模型, 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 (3.5 mL · kg⁻¹) 全身麻醉, 分离一侧颈总动脉, 永久性结扎; 间隔 3 d 后, 再次麻醉大鼠, 分离另一侧颈总动脉, 永久性结扎。假手术组大鼠仅暴露颈总动脉同等时间操作。造模结束第 2 天, 将大鼠随机分为假手术组, 模型组, GHE 高、中、低剂量组和阳性药组, 每组 10 只。假手术组和模型组大鼠灌胃给予生理盐水; GHE 高、中、低剂量组 (7, 3.5, 1.75 g · kg⁻¹) 灌胃给予相应溶液; 阳性药组灌胃给予天保宁 0.007 g · kg⁻¹, 给药体积均为 10 mL · kg⁻¹, 每日 1 次, 连续 35 d。

2.2 Morris 水迷宫实验 在大鼠给药第 30 ~ 35 天进行 Morris 水迷宫实验。实验前, 迷宫中灌水, 水深没过平台 2 cm, 水温 (24 ± 1) °C。在训练的第 1 天大鼠被置于平台上 15 s, 使其了解此安全区域的存在, 然后将大鼠按顺序头朝水槽从正对平台的固定位置放入水中, 记录大鼠从入水开始到找到平台并爬上平台的时间 (即为逃避潜伏期), 时间设定为 90 s, 90 s 内未能找到平台, 则计为 90 s, 每天训练 1 次, 共训练 4 次。第 5 天正式检测大鼠逃避潜伏期, 第 6 天去掉平台, 记录 90 s 内大鼠穿过平台区的次数 (即为穿越平台数/次)。

2.3 样本采集 水迷宫实验结束 4 h 后, 每组随机选取 6 只大鼠, 腹腔注射水合氯醛麻醉, 通过心脏

灌注 4% 多聚甲醛固定脑组织,灌注完成后,取脑组织置于 10% 中性甲醛溶液中固定,用于免疫组化检测。

2.4 免疫组化检测 Bax, Bcl-2, NT-3, BDNF 蛋白的分布及表达 固定好的脑组织经常规脱水、透明、浸蜡、包埋。具体步骤按照 SABC 免疫组化试剂盒说明书操作。显微镜观察, Bax, Bcl-2, NT-3, BDNF 阳性结果均以细胞胞质出现褐色或棕黄色颗粒为阳性反应。每张切片用光学显微镜观察,于左右大脑海马 CA₁ 区各选 2 个视野,用数码医学图像分析系统进行数码照相及图片分析 Bax, Bcl-2, NT-3, BDNF 蛋白的分布及表达情况,以 4 个视野的积分吸光度 IA 的平均值反映其蛋白表达量。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,所有数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-way ANOVA 单因素方差分析,多组间比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 GHE 对 VD 大鼠学习记忆能力的影响 与假手术组比较,模型组大鼠的逃避潜伏期显著延长,穿越平台数明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组

比较,天保宁组及 GHE 高、中剂量组大鼠的逃避潜伏期明显缩短,穿越平台数显著增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 GHE 对 VD 大鼠学习记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of GHE on learning and memory ability of model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	逃避潜伏期/s	穿越平台数/次
假手术	-	17.9 ± 12.6	8.2 ± 2.6
模型	-	47.8 ± 25.2 ²⁾	5.6 ± 2.0 ¹⁾
天保宁	0.007	21.2 ± 14.8 ⁴⁾	7.6 ± 2.1 ³⁾
GHE	7	25.5 ± 15.2 ³⁾	7.4 ± 2.3 ³⁾
	3.5	28.5 ± 23.8 ³⁾	7.3 ± 2.2 ³⁾
	1.75	41.7 ± 33.2	6.5 ± 2.2

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 3 同)。

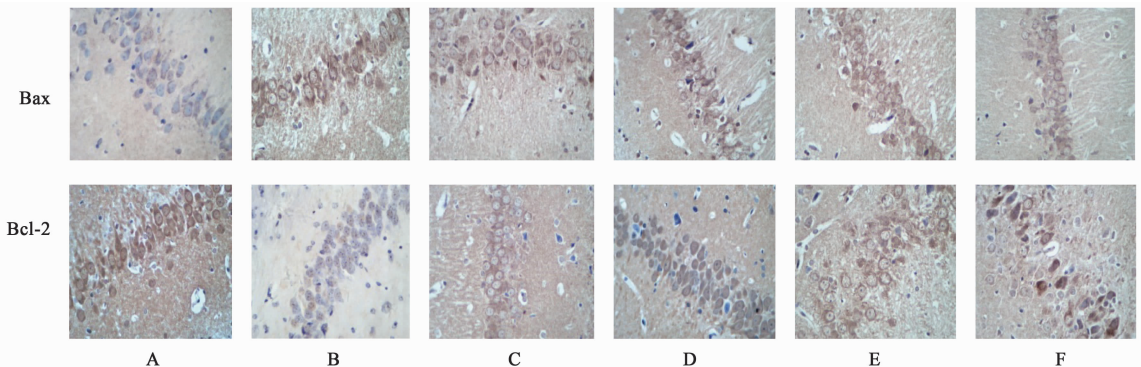
3.2 GHE 对 VD 大鼠海马 CA₁ 区神经细胞凋亡相关蛋白 Bax, Bcl-2 表达的影响 Bax, Bcl-2 阳性表达为棕黄色,主要在细胞质表达,模型组大鼠海马 CA₁ 区 Bax 表达较假手术组增多, Bcl-2 表达减少 ($P < 0.01$);天保宁组及 GHE 高、中、低剂量组可明显降低 Bax 表达,增加 Bcl-2 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2,图 1。

表 2 GHE 对 VD 大鼠海马 CA₁ 区 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of GHE on expression levels of Bax and Bcl-2 protein in hippocampal CA₁ region of model rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Bax/IA	Bcl-2/IA	Bax/Bcl-2
假手术	-	25.46 ± 2.78	105.43 ± 12.07	0.24 ± 0.05
模型	-	100.39 ± 4.43 ¹⁾	34.58 ± 11.59 ¹⁾	3.19 ± 1.05 ¹⁾
天保宁	0.007	69.71 ± 4.62 ³⁾	60.79 ± 3.89 ³⁾	1.15 ± 0.13 ³⁾
GHE	7	40.45 ± 2.25 ³⁾	98.87 ± 4.54 ³⁾	0.41 ± 0.02 ³⁾
	3.5	59.81 ± 1.86 ³⁾	80.09 ± 2.04 ³⁾	0.75 ± 0.04 ³⁾
	1.75	93.62 ± 5.83 ²⁾	47.72 ± 10.97 ²⁾	2.06 ± 0.51 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 天保宁组; D. GHE 7 g·kg⁻¹; E. GHE 3.5 g·kg⁻¹; F. GHE 1.75 g·kg⁻¹ (图 2 同)

图 1 GHE 对 VD 大鼠海马 CA₁ 区 Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 (免疫组化, × 200)

Fig. 1 Effect of GHE on levels of Bax, Bcl-2 protein expression in hippocampal CA₁ region of model rats (IHC, × 200)

3.3 GHE 对 VD 大鼠海马 CA₁ 区 NT-3, BDNF 蛋白表达的影响 NT-3, BDNF 阳性表达为褐色着色, 主要在胞质表达。与假手术组比较, 模型组大鼠海马 CA₁ 区 NT-3, BDNF 表达较少, IA 明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较, 天保宁组及 GHE 高、中、低剂量组大鼠海马 CA₁ 区 NT-3, BDNF 表达显著增加, IA 明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3, 图 2。

4 讨论

永久性结扎双侧颈总动脉建立 VD 模型是 VD 研究

表 3 GHE 对 VD 大鼠海马 CA₁ 区 NF-3, BDNF 蛋白积分吸光度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of GHE on levels of NT-3 and BDNF protein expression IA in hippocampal CA₁ region of model rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NT-3	BDNF
假手术	-	58.26 ± 13.81	47.29 ± 3.65
模型	-	40.64 ± 14.39 ¹⁾	35.56 ± 8.39 ²⁾
天保宁	0.007	57.32 ± 15.21 ³⁾	70.22 ± 3.19 ⁴⁾
GHE	7	65.67 ± 13.67 ⁴⁾	74.18 ± 17.71 ⁴⁾
	3.5	60.53 ± 15.51 ³⁾	66.83 ± 15.34 ⁴⁾
	1.75	58.98 ± 18.81 ³⁾	63.68 ± 12.47 ⁴⁾

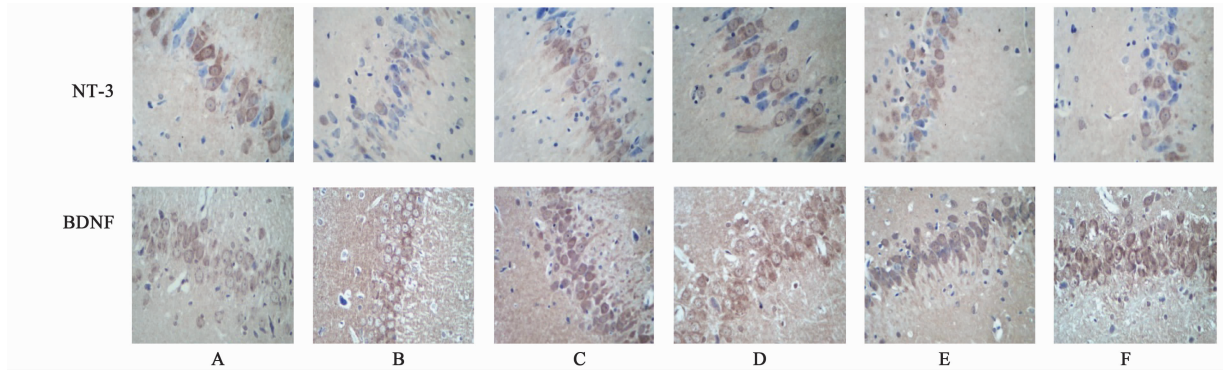


图 2 GHE 对 VD 大鼠海马 CA₁ 区 NT-3, BDNF 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of GHE on levels of NT-3, BDNF protein expression in hippocampal CA₁ region of model rats (IHC, ×200)

中常用的模型之一。有文献报道, 同时结扎双侧颈总动脉制备 VD 模型, 动物死亡率极高, 存活率仅为 12.5%^[8]。本实验组在预实验过程中也发现同时结扎双侧颈总动脉制备 VD 模型, 动物存活率极低, 给研究带来很多困难。而通过分时段永久性结扎双侧颈总动脉复制 VD 大鼠模型, 大鼠恢复苏醒快, 死亡率低, 动物存活率高达 90% 以上, 与文献报道一致^[9]。造模动物苏醒后对其进食和活动的较小, 经 Morris 水迷宫检测证实模型制备成功。本研究结果表明, VD 模型组大鼠逃避潜伏期明显延长, 表明其学习能力下降; 穿越平台数显著减少, 表明其记忆能力降低。

大脑海马区损伤会引起血管性痴呆, 从而导致认知功能障碍。大量实验结果表明海马 CA₁ 区神经细胞的凋亡会引起啮齿类、灵长类动物以及人类出现认知功能障碍^[10-11]。神经细胞凋亡过程受多种基因的调控, Bcl-2 基因家族编码的蛋白质在神经细胞凋亡的调节中起着极其重要的作用。Bcl-2 基因家族编码两类功能相反的蛋白质, 一类是抑凋亡基因, 如 Bcl-2, Bcl-XL; 一类是促凋亡基因, 如 Bax, Bak 等。其中 Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 基因家族中调节凋亡的最主要的 2 个蛋白。脑缺血损伤后, 脑组织

中的 Bax 可从细胞质转位到线粒体膜, 使线粒体膜的通透性增加, 从而引起细胞色素 C 的释放增多, 进而激活内在的凋亡途径。Bcl-2 可以稳定线粒体膜, 保护线粒体的完整性。因此, 一旦 Bax 蛋白大量表达时, 细胞便走向死亡^[12-13]。本研究结果表明, VD 模型大鼠海马 CA₁ 区 Bax 蛋白表达显著增加, Bcl-2 蛋白表达明显减少, Bax/Bcl-2 明显升高, 说明 VD 模型大鼠神经细胞凋亡途径被激活, 造成 VD 大鼠学习记忆功能障碍。GHE 可降低海马 CA₁ 区 Bax 蛋白表达, 增加 Bcl-2 蛋白表达, 降低 Bax/Bcl-2, 从而抑制神经细胞凋亡, 改善 VD 大鼠学习记忆能力。

NT-3 和 BDNF 是神经营养因子家族的主要成员, 在神经系统的发育、功能维持和神经元群的形成等方面起着重要作用。近年来多种研究发现无论短暂性或持续性脑缺血均可诱导内源性 NT-3, BDNF 表达增加, 提示这可能是一种内源性自我保护机制。但持续的脑缺血后, 神经营养因子的表达不足以抵抗损伤性因子的作用, 因此, 提高机体内源性 NT-3, BDNF 的表达可以促进神经功能的恢复^[14-15]。因此, 通过如药物的治疗可以促使机体释放足量的内源性 NT-3, BDNF 等神经营养因子, 使其发挥相应的

功能。本研究结果表明,在造模5周时,VD模型大鼠海马CA₁区NT-3, BDNF蛋白表达显著降低。GHE可促进大鼠海马CA₁区NT-3, BDNF蛋白表达,对神经细胞及功能均具有明显的保护作用。

综上所述,GHE可能通过促进海马CA₁区NT-3, BDNF蛋白表达,影响凋亡相关蛋白Bax, Bcl-2的平衡调节,抑制神经细胞凋亡,改善VD大鼠的学习记忆能力,这一研究有助于对GHE治疗血管性痴呆的作用及其机制有更好的认识。

[参考文献]

[1] LI L, YIN G S, Geraghty O C, et al. Oxford vascular study[J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(9):903-913.

[2] 邱德文,杜江. 中华本草·苗药卷[M]. 贵阳:贵州科技出版社, 2005:274.

[3] 赖泳,李辉,方春生,等. 蓝布正对小鼠脑缺血的保护作用[J]. *大理学院学报*, 2005, 4(5):44-45.

[4] 刘明,邓颖,刘杨,等. 蓝布正对大鼠梗死灶周围大脑皮质神经元凋亡和蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(17):117-121.

[5] 刘杨,邓颖,刘明,等. 蓝布正对大鼠供血供氧及止血耐眩晕作用的影响[J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(6):97-100.

[6] 黄新武,李华,秦大莲,等. 不同时点分别结扎左、右颈总动脉建立大鼠血管性痴呆模型[J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(14):2006-2007.

[7] 马婧怡,张万鑫,陈虹,等. 改良方法制备的血管性痴呆模型大鼠的学习记忆能力表现[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28(3):421-425.

[8] 张留宝,陈进贵,刘平,等. 不同动物的不同脑供血动

脉结扎后存活率比较[J]. *南京军医学院学报*, 2002, 24(2):73-74.

[9] 李国春,黄新武,张红,等. 不同时点分别结扎左、右颈总动脉建立的大鼠血管性痴呆模型血流变学及生化学研究[J]. *现代预防医学*, 2011, 38(4):718-720.

[10] Tachibana K, Hashimoto T, Kato R, et al. Long-lasting effects of neonatal pentobarbital administration on spatial learning and hippocampal synaptic plasticity[J]. *Brain Res*, 2011, 1388(1388):69-76.

[11] 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.

[12] Adams J M, Huang D C, Strasser A, et al. Subversion of the bcl-2 life/death switch in cancer development and therapy[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2005, 70(1):469-477.

[13] 黄新武,李国春,熊玉霞,等. 大鼠血管性痴呆模型动物海马神经元凋亡和蛋白表达的研究[J]. *神经解剖学杂志*, 2011, 27(3):331-334.

[14] Dmitrieva V G, Povarova O V, Skvortsova V I, et al. Semax and Pro-Gly-Pro activate the transcription of neurotrophins and their receptor genes after cerebral ischemia[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 30(1):71-79.

[15] 王建平,刘聪,杨直堂,等. 白藜芦醇对脑缺血小鼠BDNF及NT-3表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(4):531-535.

[责任编辑 邹晓翠]