

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

马春林¹, 张宣², 刘佳楠¹, 朱凯敏¹, 崔淑梅¹, 李海龙^{1,3}, 吴红彦^{1,3,4*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省中医院, 兰州 730070;
3. 甘肃省方药挖掘和创新转化实验室, 兰州 730000;
4. 甘肃省中药新产品创制工程实验室, 兰州 730000)

[摘要] **目的:**研究归芪聪志汤对血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 模型大鼠学习记忆和海马神经元紧密连接蛋白 1 (Claudin-1) 和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 表达的影响。**方法:**Wistar 雄性大鼠 120 只,按随机数字表选 10 只大鼠作为假手术组,其余大鼠制备 VD 模型,选成功模型大鼠随机分为 5 组,分别为模型组、阳性组和归芪聪志汤低、中、高剂量组。归芪聪志汤低、中、高剂量组给药量分别为 9.9, 19.8, 39.6 g·kg⁻¹·d⁻¹。阳性组给予脑复康吡拉西坦胶囊 0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹。假手术组、模型组给予等量水。每日 1 次。连续灌胃治疗 28 d 后, Morris 水迷宫予以行为学检测, 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR), 免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 与蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测各组海马组织 Claudin-1, TGF- β 基因和蛋白表达。**结果:**灌胃治疗 28 d 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 ($P < 0.01$), 大鼠海马的 Claudin-1 mRNA 及蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 大鼠海马的 TGF- β mRNA 及蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各治疗组大鼠逃避潜伏期均缩短, 跨原平台次数均增多 ($P < 0.01$), 大鼠海马的 Claudin-1 mRNA 及蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 大鼠海马的 TGF- β mRNA 及蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 归芪聪志汤中剂量组与脑复康吡拉西坦胶囊组优于其他组 ($P < 0.05$)。**结论:**归芪聪志汤能够显著改善 VD 大鼠的学习记忆能力, 可能与调节脑组织细胞间黏附作用、抑制炎症因子表达等有关。

[关键词] 血管性痴呆; 归芪聪志汤; 紧密连接蛋白 1 (Claudin-1); 转化生长因子- β (TGF- β)

[中图分类号] R285.5; R277.7; R289.5; R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)06-0102-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180697

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171125.1518.028.html>

[网络出版时间] 2017-11-25 15:18

Effect of Guiqi Congzhi Decoction on Expressions of Claudin-1, TGF- β in Hippocampus Area of Vascular Dementia Rats

MA Chun-lin¹, ZHANG Xuan², LIU Ja-nan¹, ZHU Kai-min¹, CUI Shu-mei¹, LI Hai-long^{1,3}, WU Hong-yan^{1,3,4*}

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

2. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Lanzhou 730070, China;

3. Gansu Provincial Laboratory of TCM Excavation and Innovative Transformation, Lanzhou 730000, China;

4. Gansu Provincial Laboratory for TCM New Product Development Engineering, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Guiqi Congzhi decoction on expressions of Claudin-1, transforming growth factor- β (TGF- β) in the hippocampus area of vascular dementia (VD) rats. **Method:** Ten rats were selected from 120 male wistar rats as sham-operation group according to random number table. The

[收稿日期] 20171002(002)

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金项目(81660760); 甘肃省中药药理与毒理重点实验室开放课题项目(ZDSYS-KJ-2015-010)

[第一作者] 马春林, 在读博士, 从事痴呆的中医药防治研究, Tel: 15730973352, 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, Tel: 0931-8765367, E-mail: wu.hy@163.com

remaining rats were selected to prepare the VD model; then, the successfully modeled rats were randomly divided into model group, positive control group, and high, medium and low-dose Guiqi Congzhi decoction groups (9.9, 19.8, 39 g·kg⁻¹·d⁻¹). The positive group was given Piracetam capsules (0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹). The sham operation group and the model group were given the equal amount of water, respectively. The medicines were administered once a day. All of the groups were intervened with the corresponding medicines through gastric perfusion once a day after modeling, which lasted for 28 days. Then, rats' behaviors were detected by Morris water maze, the protein expressions of Claudin-1 and TGF-β in hippocampus of rats were detected by IHC and Western blot, the mRNA expressions of Claudin-1 and TGF-β in hippocampus were detected by Real-time PCR. **Result:** Compared with sham-operation group, the average escaping latency period was significantly prolonged, and the number of cross-platform was decreased distinctly in VD rats ($P < 0.01$), the mRNA and protein expressions of Claudin-1 were apparently increased in hippocampus of VD rats ($P < 0.05$), the mRNA and protein expressions of TGF-β was apparently declined in hippocampus of VD rats ($P < 0.05$); compared with VD model group, the average escaping latency period was shorted obviously, and the number of cross-platform was increased distinctly in middle-dose Guiqi Congzhi decoction group and positive control group ($P < 0.01$), the mRNA and protein expressions of Claudin-1 were apparently increased in hippocampus of middle-dose Guiqi Congzhi decoction group ($P < 0.05$), the mRNA and protein expressions of TGF-β was apparently increased in hippocampus of middle-dose Guiqi Congzhi decoction group and positive control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Guiqi Congzhi decoction could improve the learning and memory abilities of VD rats. The mechanism may be correlated with the regulation of the adhesive effect between brain tissues and cells and the inhibition of the expressions of inflammatory factors.

[**Key words**] vascular dementia; Guiqi Congzhi decoction; Claudin-1; transforming growth factor-β (TGF-β)

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。随着当今人口老龄化问题逐渐严峻和疾病谱的改变,以及目前疾病诊断技术和方法的趋于完善,VD 的检出率和发病率呈不断增高的趋势。有研究显示,中国 65 岁以上老人中痴呆的患病率为 3.9% ~ 5%^[1],VD 可能逐渐取代阿尔茨海默病成为我国老年期痴呆最大发病因素^[2]。VD 临床确诊时已到疾病晚期,至今尚无对症的特效药物,而中药具有疗效满意、副作用少等优势,合理开发防治痴呆的中医药逐渐受到医学研究者的重视^[3-5]。归芪聪志汤方是导师吴红彦教授经验方,全方由黄芪 (*Astragalus membranaceus*), 当归 (*Angelica sinensis*), 川芎 (*Ligusticum chuanxiong*), 苦参 (*Snpthora flavescens*), 石菖蒲 (*Acorus tatarinowii*), 地龙 (*Pheretimaas pergilum*) 等,用量按 6:3:2:2:1:1.5 比例组成。诸药合用,标本兼顾,清利脑窍,共凑补气、养血、活血、化痰、解毒之功效。前期研究表明归芪聪志汤对于改善 VD 模型大鼠症状有明显疗效^[6-8],但是关于其治疗 VD 的机制尚不明确,因此为了进一步探讨其作用机制,本实验通过双侧颈动脉结扎法建立血管

性痴呆大鼠模型,观察归芪聪志汤对大鼠海马组织紧密连接蛋白 1 (Claudin-1) 和转化生长因子-β (TGF-β) 表达的影响,为临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 120 只,体质量 (200 ± 20) g,由甘肃中医药大学科研实验动物中心提供,许可证号 SYXK(甘)2015-0001。经甘肃中医药大学实验动物伦理委员会批准,批号 2015-18。SPF 级饲料(北京科澳协力饲料有限公司)喂养,自由饮水,适应性饲养 3 d 后进行实验。

1.2 药物 归芪聪志汤方药材购自甘肃中医药大学附属医院。经甘肃中医药大学附属医院杨锡仓主任医师鉴定均为正品,符合《中国药典》2015 年版要求。采用传统水煎法,药物以总体积的 8 倍量水冷浸 3 h,煮沸 1 h,煎煮 2 次后合并滤液制成质量浓度分别为含生药 0.99, 1.98, 3.96 g·mL⁻¹ 的水提液,无菌条件装瓶;脑复康吡拉西坦胶囊(西安利君方圆制药有限公司,批号 H61022576),用水配成 30 g·L⁻¹ 的混悬液,4 °C 储存备用。

1.3 试剂 反转录试剂盒(美国 Roche 公司,批号 11316120);扩增试剂盒(韩国 Bioneer 公司,批号 1422K);RIPA 裂解液(贝博公司,批号 AA2305-1);

Claudin-1 Polyclonal Antibody, TGF- β Polyclonal Antibody (美国 Immunoway 公司, 批号分别为 YT0942, YT4633); 蛋白免疫印迹 (Western blot) 凝胶试剂盒 (西安赫特生物科技有限公司, 批号 WB005); Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒 (美国 Thermo 公司, 批号 JX0368); Buffe 上样缓冲液 (贝博公司, 批号 20150120); PVDF 膜 (鼎国生物技术有限公司, 批号 DG201502); 增强型 ECL 化学发光试剂盒 (南京 Vazyme 公司, 批号 PJ207479)。

1.4 仪器 WMT-100S 型 Morris 水迷宫视频跟踪分析系统 (成都泰盟科技有限公司); TGL16M 型高速冷冻离心机 (美国 Heraeus 公司); ABI7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); Mini Protean 3 Cell 型电泳仪, PowerPac 3000 型转印仪, 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 采用改良后的大鼠双侧颈总动脉永久性结扎法制备 VD 大鼠模型^[9-11]。采用 Morris 水迷宫行为学检测法, 取假手术组大鼠逃避潜伏期的均值为参考值, 同时计算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, 该值 >20% 定为痴呆鼠。

2.2 动物分组、给药及取材 预选假手术组大鼠 10 只; 利用 Morris 水迷宫筛选出成功模型大鼠 35 只, 称重, 再按区组随机法将其分为模型组 8 只, 阳性组 7 只, 归芪聪志汤低、中、高剂量组分别为 7、6、7 只。大鼠归芪聪志汤低、中、高剂量组给药量分别为 9.9, 19.8, 39.6 g·kg⁻¹·d⁻¹, 相当于临床人用药剂量的 0, 2, 4 倍。阳性组给予脑复康吡拉西坦胶囊 0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹。假手术组、模型组给予等量水, 每日 1 次, 连续灌胃 28 d。大鼠麻醉后经心脏灌注内固定取脑, 取大鼠脑最宽部位 (海马冠状位) 约 4 mm。

2.3 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 Claudin-1, TGF- β mRNA 表达 按 Trizol 法分别提取不同组别海马组织的总 RNA, 检测浓度纯度后, 用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒反转录合成 cDNA, -20 °C 保存备用。引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成, 并通过 UCSC In-Silico PCR 和 NCBI BLAST 验证, Claudin-1 (NCBI, Gene ID: 65129), 引物序列 (5'-3') 上游 TGGAAGTGGTGTACGTG, 下游 CATCAAGGCTCTGTTGCCT, 176 bp; TGF- β (NCBI, Gene ID: 59086) 上游 GCAGAGTTCAGGGTCTTTCG, 上游

GCTGGGTTGGAGATGTTAGG, 106 bp。按照 AccuPower[®] 2 × Greenstar qPCR Master Mix 试剂盒说明操作, 在 CFX96 Real-time 荧光 PCR 仪上进行扩增反应, 反应条件为 95 °C 5 min, 95 °C 变性 20 s, 60 °C 退火与延伸 45 s, 45 个循环之后结束。分析溶解曲线, 确认扩增产物的特异性, 以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算相对表达量。

2.4 免疫组化 (IHC) 测定 Claudin-1, TGF- β 蛋白表达 每组随机抽取 3 只大鼠的海马组织常规制作病理切片。应用 SP 法进行免疫组织化学染色, 严格按照试剂盒说明进行操作。其中兔抗 Claudin-1, TGF- β 的一抗浓度为 1:200。光镜下观察结果, 细胞质、胞核染成棕黄色或棕褐色为阳性细胞。每张图片在 400 倍下随机选 5 个视野, 计数每个视野下的阳性细胞数目, 取平均值, 各组免疫组化结果应用 Leica Qwin 病理图像分析系统处理。

2.5 Western blot 检测 Claudin-1, TGF- β 蛋白表达 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 °C 孵育过夜, 1 × 洗膜液洗膜 3 次, 每次 10 min; 用辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 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带灰度值。

2.6 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行参数检验的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 T3, 数据处理用 SPSS 20.0 软件完成, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 归芪聪志汤对大鼠学习记忆能力的影响 与假手术组比较, 模型组逃避潜伏期明显延长, 跨原平台次数明显减少 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各治疗组大鼠逃避潜伏期均缩短, 跨原平台次数均增多 ($P < 0.01$), 其中归芪聪志汤中剂量组、脑复康吡拉西坦胶囊组大鼠学习记忆能力改善情况优于归芪聪志汤高、低剂量组 ($P < 0.05$); 与脑复康吡拉西坦胶囊组比较, 归芪聪志汤中剂量组逃避潜伏期和跨原平台均无明显差异。见表 1。

3.2 对大鼠 Claudin-1, TGF- β mRNA 相对表达量的影响 与假手术组相比, 模型组 Claudin-1 mRNA 相对表达量升高, TGF- β mRNA 相对表达量降低 ($P <$

表 1 归芪聪志汤对大鼠逃避潜伏期、跨原平台次数的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effect of Guiqi Congzhi decoction on escape latency and number of cross platform times in rats of each group($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | n | 逃避潜伏期 /s | 跨原平台 /次 |
|-----------|---------------------------|----|----------------------------|---------------------------|
| 假手术 | - | 10 | 16.3 ± 5.4 | 9.1 ± 1.5 |
| 模型 | - | 8 | 53.4 ± 14.1 ¹⁾ | 2.8 ± 1.4 ¹⁾ |
| 归芪聪志汤 | 39.6 | 7 | 28.9 ± 4.3 ^{2,3)} | 3.4 ± 1.8 ^{2,3)} |
| | 19.8 | 6 | 16.7 ± 3.7 ²⁾ | 6.8 ± 2.3 ²⁾ |
| | 9.9 | 7 | 26.6 ± 5.7 ^{2,3)} | 3.0 ± 1.2 ^{2,3)} |
| 脑复康吡拉西坦胶囊 | 0.3 | 7 | 17.1 ± 4.5 ²⁾ | 5.3 ± 1.7 ²⁾ |

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与归芪聪志汤中剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

0.05);与模型组相比,各治疗组较模型组 Claudin-1 mRNA 相对表达量均降低,TGF- β mRNA 相对表达量均升高,其中归芪聪志汤中剂量组和脑复康吡拉西坦胶囊 Claudin-1 mRNA 相对表达量降低明显,TGF- β mRNA 相对表达量升高明显($P < 0.01$);归芪聪志汤中剂量组较脑复康吡拉西坦胶囊组差异无统计学意义。见表 2。

表 2 归芪聪志汤对大鼠 Claudin-1,TGF- β mRNA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Guiqi Congzhi decoction on Claudin-1,TGF- β mRNA relative expression in rats of each group($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | Claudin-1 | TGF- β |
|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术 | - | 0.75 ± 0.15 | 1.79 ± 0.57 |
| 模型 | - | 1.00 ± 0.00 ¹⁾ | 1.00 ± 0.00 ¹⁾ |
| 归芪聪志汤 | 39.6 | 0.83 ± 0.12 | 1.19 ± 0.12 |
| | 19.8 | 0.66 ± 0.17 ²⁾ | 2.11 ± 0.45 ²⁾ |
| | 9.9 | 0.86 ± 0.06 | 1.54 ± 0.28 |
| 脑复康吡拉西坦胶囊 | 0.3 | 0.72 ± 0.04 ²⁾ | 1.98 ± 0.63 ²⁾ |

3.3 对大鼠 Claudin-1,TGF- β 蛋白表达强度的影响

Claudin-1 和 TGF- β 的阳性表达均为神经元细胞膜出现黄色或棕黄色颗粒,神经胶质细胞有少量或无表达。与假手术组比较,Claudin-1 呈强阳性表达,模型组 TGF- β 呈弱阳性表达($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组 Claudin-1 阳性表达减弱,TGF- β 的阳性表达增强($P < 0.01$),其中归芪聪志汤中剂量组、脑复康吡拉西坦胶囊组优于归芪聪志汤高、低剂量组($P < 0.05$);与脑复康吡拉西坦胶囊组比较,归芪聪志汤中剂量组差异无统计学意义。见表 3,图 1,2。

表 3 归芪聪志汤对大鼠 Claudin-1,TGF- β 蛋白表达强度的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of Guiqi Congzhi decoction on Claudin-1 and TGF- β proteins expression intensity in hippocampus of rats($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | Claudin-1 | TGF- β |
|-----------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 假手术 | - | 45.45 ± 3.71 | 50.55 ± 2.9 |
| 模型 | - | 63.15 ± 3.65 ¹⁾ | 34.50 ± 2.37 ¹⁾ |
| 归芪聪志汤 | 39.6 | 49.81 ± 3.55 ^{2,3)} | 43.31 ± 2.86 ^{2,3)} |
| | 19.8 | 43.66 ± 5.09 ²⁾ | 49.55 ± 2.44 ²⁾ |
| | 9.9 | 46.37 ± 3.67 ²⁾ | 44.87 ± 2.83 ²⁾ |
| 脑复康吡拉西坦胶囊 | 0.3 | 43.08 ± 2.96 ²⁾ | 50.19 ± 3.36 ²⁾ |

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与归芪聪志汤中剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 4 同)。

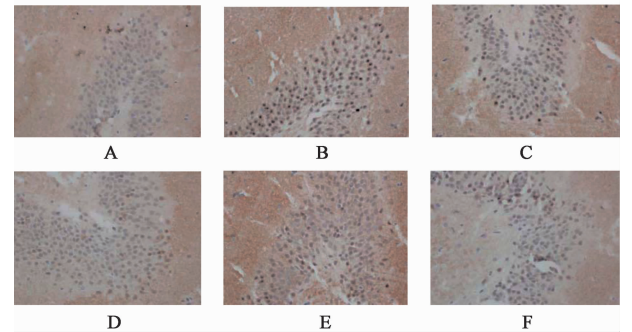


图 1 对大鼠海马组织 Claudin-1 蛋白的表达的影响(IHC, ×200)
Fig. 1 Effect of Claudin-1 protein expression intensity in hippocampus of rats(IHC, ×200)

图 2 对大鼠海马组织 TGF- β 蛋白表达强度的影响(IHC, ×400)
Fig. 2 Effect of TGF- β protein expression intensity in hippocampus of rats(IHC, ×400)

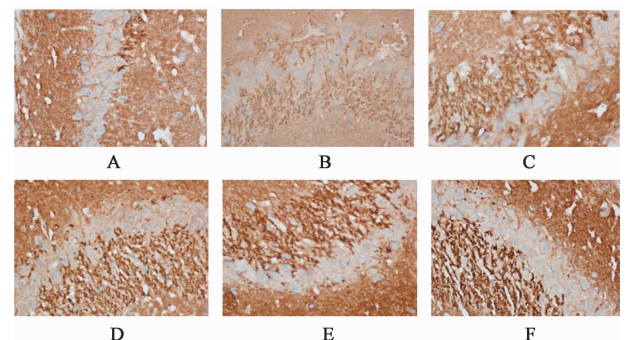


图 2 对大鼠海马组织 TGF- β 蛋白表达强度的影响(IHC, ×400)
Fig. 2 Effect of TGF- β protein expression intensity in hippocampus of rats(IHC, ×400)

3.4 对大鼠 Claudin-1,TGF- β 蛋白相对表达量的影响

与假手术组相比,模型组大鼠海马区 Claudin-1 蛋白相对表达量显著增加,TGF- β 蛋白相对表达量显著下降($P < 0.01$);与模型组相比,各治疗组 Claudin-1 蛋白相对表达量均下调,TGF- β 蛋白相对

表达量均增加 ($P < 0.01$) ; 与脑复康吡拉西坦胶囊组相比, 中药中剂量组 Claudin-1, TGF- β 蛋白相对表达下降, 但无统计学意义。见表 4, 图 3。

表 4 对大鼠 Claudin-1, TGF- β 蛋白的相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Relative expression of Claudin-1, TGF- β proteins in hippocampus of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | Claudin-1 / β -actin | TGF- β / β -actin |
|-----------|---------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 假手术 | - | 1.000 \pm 0.000 | 1.000 \pm 0.000 |
| 模型 | - | 1.440 \pm 0.054 ¹⁾ | 0.677 \pm 0.009 ¹⁾ |
| 归芪聪志汤 | 39.6 | 1.275 \pm 0.043 ²⁾ | 1.102 \pm 0.016 ²⁾ |
| | 19.8 | 1.017 \pm 0.007 | 1.058 \pm 0.013 |
| | 9.9 | 1.192 \pm 0.060 ²⁾ | 1.376 \pm 0.015 ²⁾ |
| 脑复康吡拉西坦胶囊 | 0.3 | 1.055 \pm 0.052 ²⁾ | 1.480 \pm 0.010 ²⁾ |



图 3 大鼠海马区 Claudin-1, TGF- β 蛋白表达凝胶电泳
Fig. 3 Gel image of Claudin-1, TGF- β proteins expression in hippocampus of rats

4 讨论

中医学认为 VD 多由于中老年人精气衰减, 内环境紊乱, 气机失调, 风火痰瘀上扰, 损伤脑髓, 元神被乱, 神机失统, 或髓虚脑空, 气血精津难以上输, 元神失养, 导致灵机记忆丧失。其病位在脑, 涉及心肝脾肾, 基本病因病机为本虚标实。VD 的发病过程呈现出慢性、反复波动的特点, 而在发病急性期或波动期, 病情多以实证为主, 急则治标, 故要采取活血化瘀、扶正解毒为基本治法。以此为理论依据, 创制归芪聪智汤开展防治 VD 的研究, 方中重用黄芪、当归为君, 益气养血, 活血通络; 以川芎理气活血通瘀, 苦参清解湿热毒火为臣; 以地龙活血通脑络, 石菖蒲化浊开窍醒神为佐药。现代药理研究证实黄芪多糖与黄芪皂苷均具有抗病毒、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^[12]。当归的主要有效成分阿魏酸, 是天然的自由基清除剂和抗氧化剂, 对 AD 转基因小鼠大脑神经元具有保护作用^[13]。苦参碱具有抗炎和免疫调节的重要作用^[14]。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, 具有抗炎、抗氧化、保护脑组织和益智的疗效^[15]。

研究表明 VD 的发生与脑皮质和海马区细胞凋亡、氧自由基损伤造成组织细胞的退行性变化、炎症因子引起的神经元损伤等因素有着密切联系^[16]。中医认为 VD 多为久病入络, 虚、痰、瘀相互影响转化, 酿生浊毒, 败坏脑髓形体, 致神明失用而成, 而 VD 发病过程中所产生的代谢产物如黏附分子、炎症因子、自由基等, 类似于中医的“毒”, 因此脑组织缺血缺氧后炎症因子引起的神经元损伤是 VD 主要发病机制之一。Claudins 属于细胞间紧密连接蛋白, Claudins 的缺乏可导致不同环境间通透性增高, 从而促进炎症反应的发生。

遗传和生化研究表明 Claudins 家族是高等真核生物中紧密连接多样性及其生物特性的主要介质^[17], 有表达分布于神经系统的多种细胞, 具有调节神经细胞间黏附作用、血脑屏障的通透性、接受并传导细胞间信号等生物功能。此外, 已有研究发现有些 Claudins 的缺乏能够引起小鼠的神经髓鞘的脱失, 出现神经系统的病变, 且敲除 Claudin-5 基因的小鼠血脑屏障细胞间的通透性升高^[18]。

TGF- β 是一种参与调节细胞生长、分化、凋亡与炎症反应等生物学功能的多肽类生长因子, 脑细胞是 TGF 产生的主要部位之一, 已有研究表明^[19-20], 脑缺血后, 通过促进大脑 TGF- β 的表达可促进脑缺血大鼠脑内血运重建, 另外, 还可以通过抑制黏附分子等炎症介质的释放发挥抗炎作用、调节其他细胞因子的表达, 最终发挥对脑组织的保护作用。

中药化学成分是中药产生药理效应的物质基础, 受多种因素影响其在煎制过程中会发生一系列变化, 药物的效应是各种化学成分综合作用的结果。在实验中笔者发现高剂量组的治疗效果并不优于中剂量组。可能原因为高剂量组中药各种成分之间产生的拮抗作用较强; 或者高剂量组中药里的某种化学成分具有较强的肝药酶诱导剂的作用, 增强了药酶活性, 加快其他成分的代谢; 或者高剂量组中与药物结合的受体出现饱和现象等。以上因素均可使其药理活性降低。这仅是依据文献做的推测^[21], 具体机制有待科学验证。

本实验研究发现 Claudin-1 的表达模型组较假手术组高, 治疗组低于模型组, 归芪聪智汤可能是通过抑制 Claudin-1 的表达而参与神经细胞的增殖和迁移形成神经髓鞘的过程, 或参与维持血脑屏障的通透性而改善 VD 大鼠的认知障碍。其作用机制可能与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有关。而 TGF- β 的表达模型组较假

手术组低,治疗组高于模型组,这与国外文献报道的TGF表达趋势一致^[22]。双侧颈动脉结扎后,大鼠脑供血严重不足,脑组织开始大面积梗死,脑细胞死亡,导致TGF- β 的表达下降,而治疗后认知能力的改善,可能与归芪聪志汤促进TGF- β 的表达上调,修复损伤的脑细胞有关。归芪聪志汤可以通过抑制Claudin-1,促进TGF- β 的表达改善VD大鼠的认知能力,其具体作用机制有待于进一步验证。

[参考文献]

[1] 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.

[2] XU W, QIU C, Gatz M, et al. Mid-and late-life diabetes in relation to the risk of dementia: a population-based twin study[J]. Diabetes, 2009, 58(1): 71-77.

[3] 胡跃强,赖菁菁,汪庭龙,等. 温肺降浊方对血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017,32(4):1804-1807.

[4] 史江峰,马健. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(6):161-168.

[5] 崔远武,江丰,马妍,等. 张伯礼分期论治老年期血管性痴呆述要[J]. 中医杂志, 2015,56(15):1276-1279.

[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] 张宣,吴红彦,李海龙,等. microRNA表达对血管性痴呆的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016,22(14): 227-230.

[8] 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.

[9] 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.

[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] 赵宪林,房宝玉,方秀斌,等. 血管性痴呆大鼠海马神

经元凋亡的研究[J]. 中国医科大学学报, 2000,29(4):264-266.

[12] 刘洋,杜婧,沈颜红. 10种药用黄芪属植物化学成分及药理作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(18):222-234.

[13] 王玥,王旭,于嵩,等. 阿魏酸对阿尔茨海默病转基因小鼠脑内氧化应激和凋亡相关蛋白的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2017,29(5):762-766.

[14] 吕路,梅蕊,王昉,等. 苦参碱通过PKA/CREB信号通路对阿尔茨海默病大鼠认知障碍及神经炎症的调节作用[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(16): 3931-3934.

[15] 卢成淑,冯宁,南国,等. 石菖蒲及其活性成分防治阿尔茨海默病的研究进展[J]. 中草药, 2016,47(7): 1236-1242.

[16] Ana-Maria E, Stefan N, Laurentiu M, et al. Neurobiology of vascular dementia[J]. J Aging Res, 2011, 8(10): 416-420.

[17] Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, et al. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. [J]. Oncogene, 2008, 27(55): 6930-6938.

[18] 张布衣,姚根有. 紧密连接蛋白 claudins 的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(1): 14-17.

[19] HUANG H, LIU N, WANG J H, et al. The effects of adipose-derived stem cells transplantation on the expression of TGF- β_1 in rat brain after cerebral is chemia [J]. Cell Mol Immunol, 2011, 27(8): 872-875.

[20] 林静,易兴阳,池丽芬,等. 血清TGF- β_1 和VEGF与脑梗死患者颈动脉粥样斑块易损性的相关性[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2010, 17(4): 269-272.

[21] 张仲一,高岚,路军. 中药量效关系动物实验观察[J]. 天津中医学院学报, 1994,14(3):31-33.

[22] Tarkowski E, Issa R, Sjögren M, et al. Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF- β in Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. Neurobiol Aging, 2002, 23(2):237-243.

[责任编辑 邹晓翠]