

基于PI3K/Akt/Bad信号通路探讨益髓解毒方对 血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡的影响

高玲¹, 赵建军², 胡亚男^{1*}, 粟粟¹, 李萍¹, 王冰梅¹

(1. 长春中医药大学, 长春 130117; 2. 长春中医药大学附属医院, 长春 130021)

[摘要] **目的:**探讨益髓解毒方对血管性痴呆(VD)大鼠海马神经元损伤及调控细胞凋亡信号通路磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/淋巴瘤细胞-2(Bcl-2)关联死亡启动子重组蛋白(Bad)的作用机制。**方法:**40只SD大鼠分为假手术组、模型组、盐酸多奈哌齐组、益髓解毒方组,每组10只。双侧颈总动脉永久结扎(2-VO)法制备VD动物模型,假手术组和模型组灌胃生理盐水;盐酸多奈哌齐组灌胃盐酸多奈哌齐原药 $0.52\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;益髓解毒方组灌胃益髓解毒方颗粒($11.11\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$);1次/d。30 d后,以Morris水迷宫测试大鼠学习、记忆能力;苏木素-伊红(HE)染色观察海马CA1区组织形态结构;透射电镜(TEM)观察大鼠海马CA1区神经元超微结构;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测Akt, Bad mRNA表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织Akt,磷酸化(p)-Akt, Bad蛋白表达情况。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠学习、记忆能力下降明显($P<0.05$),海马组织病理结构及神经元超微结构病变明显,海马组织Akt mRNA和Akt, p-Akt蛋白表达水平明显下降($P<0.05$), Bad mRNA和Bad蛋白表达水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,益髓解毒方组可明显提高大鼠的学习记忆能力,改善海马CA1区神经元细胞及超微结构变化,上调海马组织Akt mRNA和Akt, p-Akt蛋白表达水平,降低Bad mRNA和Bad蛋白表达水平($P<0.05$)。**结论:**益髓解毒方可明显提高VD大鼠学习、记忆能力,改善海马组织及神经元超微结构病理变化,修复神经元受损细胞,这可能与促进Akt磷酸化,激活PI3K/Akt/Bad信号通路,发挥抗细胞凋亡保护神经元有关。

[关键词] 益髓解毒方; 血管性痴呆; 磷脂酰肌醇3-激酶; 蛋白激酶B; 促凋亡蛋白Bad; 细胞凋亡

[中图分类号] R2-0; R289; R285.5; R246.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)18-0058-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201838

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200713.1651.003.html>

[网络出版日期] 2020-7-13 17:11

Effect of Yisui Jiedu Prescription on Apoptosis of Hippocampal Neurons Based on PI3K/Akt/Bad Signal Pathway in Rats with Vascular Dementia

GAO Ling¹, ZHAO Jian-jun², HU Ya-nan^{1*}, SU Li¹, LI Ping¹, WANG Bing-mei¹

(1. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Affiliated Hospital of Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Yisui Jiedu prescription on hippocampal neuron damage in vascular dementia (VD) rats and to regulate phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/recombinant Bcl-2 associated death promoter (Bad) mechanisms of signaling pathways of neuronal apoptosis. **Method:** The 40 SD rats were divided into sham operation group, model group, donepezil hydrochloride group and Yisui Jiedu prescription group, with 10 rats in each group. VD animal model was prepared by bilateral carotid artery permanent ligation (2-VO) method. The sham operation group and the model group were intragastrically administered with normal saline, the donepezil hydrochloride group was

[收稿日期] 20200522(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473576, 81603557); 国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项(JDZX2015045)

[第一作者] 高玲, 博士, 讲师, 从事中医药防治脑病的研究, E-mail: 952343185@qq.com

[通信作者] * 胡亚男, 博士, 副教授, 从事中医内科脑病的研究, Tel: 0431-86172301, E-mail: 19150688@qq.com

intragastrically administered with donepezil hydrochloride $0.52 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The Yisui Jiedu prescription group was administered with Yisui Jiedu prescription ($11.11 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 1 time/d. After 30 days, Morris water maze was used to test the learning and memory ability of rats, hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the histomorphological structure of hippocampal CA1 region. Ultrasound of neuron in rat hippocampal CA1 region was observed by transmission electron microscopy (TEM). Real-time fluorescent quantitative (Real-time PCR) was used to detect the Akt, Bad mRNA expression. Western blot was used to detect the Akt, p-Akt and Bad protein expression in hippocampus. **Result:** Compared with sham operation group, the learning and memory ability of model group decreased significantly ($P < 0.05$). The pathological structure and neuronal ultrastructure of the hippocampus were changed obviously. Hippocampal tissue Akt mRNA and the Akt, p-Akt protein expression level decreased significantly ($P < 0.05$), and the levels of Bad mRNA and protein were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, Yisui Jiedu prescription group can significantly improve the learning and memory ability of rats, improve the neuronal cells and ultrastructural changes in hippocampal CA1 area, and increase the expression of Akt mRNA and Akt, p-Akt protein in hippocampus. Decreased Bad mRNA and Bad protein expression levels ($P < 0.05$). **Conclusion:** Yisui Jiedu prescription can significantly improve the learning and memory ability of VD rats, improve the ultrastructural pathological changes of hippocampus and neurons, and repair damaged neurons, which may promote Akt phosphorylation and activate PI3K/Akt/Bad. The signaling pathway plays a role in the defense of neurons against apoptosis.

[Key words] Yisui Jiedu prescription; vascular dementia; phosphatidylinositol 3-kinase; protein kinase B; pro-apoptotic protein Bad; cell apoptosis

血管性痴呆(VD)是一类认知损害的临床综合征^[1]。据流行病学调查研究发现,在欧美国家中,VD占总痴呆人数的15%~20%,仅次于阿尔兹海默病(AD)^[2]。在2016年所调查的国家和地区中,我国的痴呆患病人数接近全球痴呆总患病人数的1/4^[3],我国作为老龄化人口众多的国家,其65岁以上人群的痴呆发病率为0.039%,而VD则占68.5%^[4]。研究发现,磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路是一条经典的抗凋亡、促存活的通路,参与VD的发生及发展全过程^[5]。该通路的持续活化,对VD海马组织神经元凋亡至关重要。促凋亡蛋白Bad位于该通路下游,是B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)家族中重要的促凋亡因子之一,Akt活化可使Badser136位点磷酸化,与Bcl-2解离,从而实现Bcl-2的抗凋亡作用^[6]。PI3K/Akt/Bad信号通路通过一系列反应参与并调节细胞生长、增殖、分化与迁移,在细胞凋亡中发挥着重要作用。因此,调控PI3K/Akt/Bad信号通路,已成为研究VD海马组织神经元凋亡的重要途径之一。

益髓解毒方是吉林省中医院脑病科赵建军教授总结30余年的经验方,是在《圣济总录》治疗舌强不能言,足废不能用之暗痲的地黄饮子基础上进行加减而来,有研究指出,地黄饮子加减方可改善VD大鼠学习记忆能力及海马神经元损伤^[7]。益髓解毒

方的形成具有完备的理论基础。国医大师任继学教授提出“脑髓”理论为中风病的指导思想,基于中风病肾虚精亏而脑髓不足,易于被风、火、痰、瘀、虚五毒损害,赵建军教授提出了“髓虚毒损”的中风病病机关键^[8],并以益髓解毒法进行组方用药。本团队前期临床研究表明,益髓解毒方可明显改善患者的学习、记忆、认知等功能^[9]。动物实验亦证实,该方可明显下调VD大鼠海马神经元半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase)-3,Caspase-9蛋白和基因的表达^[10]。由于从动物实验层面尚未验证益髓解毒方对VD的凋亡细胞因子PI3K/Akt/Bad通路的调控作用,相关文献也未见报道。因此,本研究通过观察益髓解毒方对VD大鼠认知功能和海马组织、神经元超微结构的影响,以及对Akt,磷酸化(p)-Akt,Bad蛋白和Akt,Bad mRNA表达的调控,探讨益髓解毒方对血管性痴呆的PI3K/Akt/Bad抗凋亡细胞因子通路的干预及对神经的保护作用,以完善VD的病变机制研究,为该病的治疗提供新的思路和方法。

1 材料

1.1 动物 健康SPF级SD大鼠40只,雄性,体质量240~260 g,由辽宁长生生物技术股份有限公司提供,合格证号SCXK(辽)2018-0001。本实验获得长春中医药大学实验动物伦理委员会审查(编号2018-0025)。大鼠饲养于长春中医药大学创实大厦

实验动物中心。采取分笼饲养,每笼5只。饲养条件:空气流通,自然光照,温度18~23℃,湿度50%~70%。

1.2 药物及试剂 益髓解毒方由肉苁蓉15g,益智仁15g,山茱萸15g,丹参15g,红花15g,地龙15g,石菖蒲30g,豨莶草25g,黄连15g,由长春中医药大学附属医院农本方药房提供的配方颗粒。盐酸多奈哌齐片[卫材(中国)药业有限公司,批号1702011];戊巴比妥钠(湖北鸿运隆精细化工有限公司,批号57-33-0);Akt, p-Akt, Bad抗体(英国Abcam公司,批号分别为GR3192605-10, GR240003-H, GR106731-30);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号AH09048902);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗,BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型),特超敏ECL化学发光试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为040818180801, 62118181011, 82418180930);蛋白预染Marker(美国Thermo公司,批号26616);trizol试剂(美国Invitrogen公司,批号14105);逆转录试剂盒,实时荧光定量PCR(Real-time PCR)试剂盒(上海近岸科技有限公司,批号分别是0510791, 0511171);苏木精染色液,伊红染色液(南昌雨露实验器材有限公司,批号均为171007)。

1.3 仪器 MT-200型Morris水迷宫(成都泰盟科技有限公司);LEICA DM500型正置显微镜(德国Leica仪器有限公司);H-7650型透射电子显微镜(日本Hitachi公司);Nano Drop2000C型分光光度计,PIKOREAL96型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪,1510型全波长酶标仪,Legend Micro 21R型冷冻高速离心机(美国Thermo公司);TL2010S型高通量组织研磨仪(北京鼎昊源科技有限公司);TS-8型转移脱色摇床(上下运动),TS-2型定轨脱色摇床(圆周运动)(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);VILBER Fusion FX7 SPECTRA凝胶成像系统(法国Vilber Lourmat公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 40只大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组、盐酸多奈哌齐组、益髓解毒方组,每组10只。参照文献[11]方法,应用2-VO法制作VD大鼠模型。造模结束后第2天,于假手术组和手术组各随机取2只大鼠进行水迷宫测试,依据2组大鼠逃避潜伏期时间进行统计学分析,判断造模成功与否^[12]。术后第2天开始灌胃,给药

浓度及有效剂量参照临床人与大鼠体表面积进行换算^[13],益髓解毒方成人用量为1.778 g·kg⁻¹·d⁻¹,大鼠每1 kg用量为人类每1 kg用量的6.25倍,即大鼠灌胃剂量为11.11 g·kg⁻¹·d⁻¹,以100℃蒸馏水溶解至所需浓度。假手术组及模型组给予生理盐水,盐酸多奈哌齐组给予0.52 mg·kg⁻¹的盐酸多奈哌齐溶液,益髓解毒方组给予11.11 g·kg⁻¹的益髓解毒方颗粒溶液。各组采用等体积灌胃,按每天10 mL·kg⁻¹灌胃,1次/d,连续治疗30 d。

2.2 指标检测

2.2.1 水迷宫监测大鼠行为学 以定位航行实验和空间探索实验,监测大鼠的学习和记忆能力。定位航行实验,将Morris水迷宫分4个象限,第3象限内放置平台,水位高于平台约2 cm,食用黑色素撒入水中并搅拌均匀。设置Noldus软件程序,将大鼠寻找平台的时间设置为90 s,平台停留时间设置为3 s。4个象限随机入水,每只大鼠每个象限各训练1次,连续4 d,记录大鼠找到平台的时间,以此作为大鼠定位航行实验成绩。第5天撤去平台,进行空间探索实验,记录大鼠90 s内平台象限停留时间及穿越原平台次数,作为空间记忆的评价指标。

2.2.2 大鼠心脏灌流固定并取材 每组随机选择4只大鼠进行灌流,用于大鼠海马病理观察。以0.9%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,开胸暴露并游离心脏,于左心室插入灌流针,并剪开右心耳,灌注一定量4℃无菌的生理盐水后更换4℃灌流液体,其中2只灌流4%多聚甲醛溶液用于苏木素-伊红(HE)染色,2只灌流4%多聚甲醛溶液与4%戊二醛溶液等比例的混合液,用于电镜观察。灌流结束,冰盘中剥离大鼠海马,4%多聚甲醛固定,4℃冰箱固定24 h以上行石蜡包埋切片。其余每组6只大鼠取海马并置于液氮中保存,进行后续生化指标检测。

2.2.3 HE染色观察大鼠海马组织形态 海马常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋切片。HE染色(切片厚度4 μm),二甲苯脱蜡,梯度乙醇至水,苏木素染色,过染盐酸乙醇分化,伊红染色,梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

2.2.4 电镜扫描观察海马超微结构 将海马浸泡于2.5%戊二醛固定,1%锇酸固定,常规包埋、超薄切片,醋酸双氧铀、柠檬酸铅重金属染色,电镜观察海马神经元超微结构。

2.2.5 Real-time PCR检测大鼠海马组织Akt, Bad mRNA表达 取未灌流海马组织,采用trizol法进行总RNA提取,NANO-DROP仪器检测总RNA浓度

和纯度。按照逆转录试剂盒进行操作,反应条件:50 °C 25 min, 75 °C 5 min, 终止反应, 冰上冷却, 于-80 °C保存备用。PCR引物设计由上海生工设计完成, Akt上游5'-GGCAGGAGGAGGAGACGATGG-3', 下游5'-TTCATGGTCACACGGTGCTTGG-3', 长度109 bp, Bad上游5'-CGTACAGCGTTGAGTTCCTTCCG-3', 下游5'-CCAGGACTCGCAACTTAGCACAG-3', 长度172 bp, GAPDH上游5'-GTTACCAGGGTTTCCCGT-3', 下游5'-GATGGTGATGGGTTTCCCGT-3', 长度177 bp。按照PCR试剂盒进行操作, 2×NovoStart SYBR Real-time PCR SuperMix Plus 10 μL, PCR引物F和PCR引物R各1 μL, cDNA模板1 μL, RNase Free Water 7 μL。反应程序为95 °C预变性1 min, 于Real-time PCR仪进行三步法扩增, 条件为95 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C 30 s, 共进行40个循环, 反应完成后作熔解度曲线分析, 以便排除非特异性扩增。以GAPDH作为内参基因。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA相对表达量。

2.2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马组织Akt, p-Akt, Bad蛋白的表达 取海马组织100 mg, 经研磨、匀浆、裂解后, 4 °C, 12 000 r·min⁻¹, 离心10 min(离心半径8 cm), 取上清, BCA法测定蛋白浓度。采取等蛋白含量进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。每孔上样15 μL, 根据实际设定电泳条件, 后冰浴环境下转膜; 5%脱脂奶粉封闭1 h, 后分别加入内参GAPDH(1:1 000)及Akt(1:1 000), p-Akt(1:100), Bad(1:2 000)一抗, 4 °C摇床孵育过夜, 次日TBST清洗, 以相应二抗(1:1 000)室温摇床孵育1 h; 加ECL工作液, 在凝胶成像仪下曝光成像, 并借助Image J软件分析目的蛋白条带灰度值。

2.3 统计学分析 采用SPSS 21.0软件进行分析, 当数据符合正态性和方差齐性检验时, 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对VD大鼠行为学的影响 与假手术组比较, VD各组大鼠平均逃避潜伏期明显延长, 而穿越平台区次数、平台象限停留时间明显减少($P<0.05$); 与模型组比较, 盐酸多奈哌齐组和益髓解毒方组大鼠平均逃避潜伏期均明显缩短, 而穿越平台区次数、平台象限停留时间均明显增多($P<0.05$)。见表1。

3.2 对VD大鼠海马组织形态结构的影响 对海马组织进行HE染色, 光学显微镜下观察大鼠海马区细胞的形态结构, 可见假手术组海马组织结构清晰

表1 益髓解毒方对VD大鼠行为学的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Yisui Jiedu prescription on behavior of VD rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

| 组别 | 剂量/ g·kg ⁻¹ | 定位航行实验 逃避潜伏期/s | 空间探索实验 | |
|--------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | | | 穿越平台 数/次 | 平台象限停留 时间/s |
| 假手术 | - | 23.80±14.65 | 7.33±1.02 | 53.19±13.44 |
| 模型 | - | 48.33±21.97 ¹⁾ | 2.28±1.30 ¹⁾ | 24.06±12.35 ¹⁾ |
| 盐酸多奈哌齐 | 5.2×10 ⁻⁴ | 28.38±17.42 ^{1,3)} | 5.55±1.73 ^{1,3)} | 44.37±14.23 ^{1,3)} |
| 益髓解毒方 | 11.11 | 30.19±17.95 ^{1,3)} | 5.41±1.22 ^{1,3)} | 45.02±10.77 ^{1,3)} |

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2~4同)。

完整, 细胞排列规则, 轮廓清晰, 形态正常, 核仁清晰可见; 模型组可见细胞排列不规则, 松散紊乱, 细胞轮廓模糊不清, 水肿明显, 部分核仁不可见。盐酸多奈哌齐组海马区神经元结构相对完整, 形态较规则, 细胞间质水肿不及模型组明显; 与模型组比较, 益髓解毒方组海马组织病理改变得到明显改善。见图1。

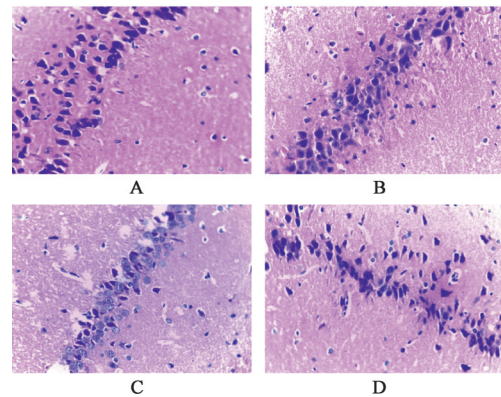


图1 益髓解毒方对VD大鼠海马区形态结构的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Yisui Jiedu prescription on morphology and structure of hippocampal region in VD rats(HE, ×400)

3.3 对VD大鼠海马神经元超微结构的影响 通过TEM观察VD大鼠海马神经元超微结构发现, 假手术组神经元形态正常, 结构完整, 细胞器丰富, 细胞核膜完整无溶解, 神经元外部轻微空化, 线粒体及内质网轻微扩张; 模型组神经元核形态异常, 异染色质增多, 细胞器减少且排列紊乱, 线粒体及内质网结构不完整, 有嵴和膜融合现象, 空化严重, 嵴出现断裂和缺失; 盐酸多奈哌齐组及益髓解毒方组神

经元结构较完整,胞膜溶解程度较轻,线粒体、内质网空化和扩张明显轻于模型组。见图2。

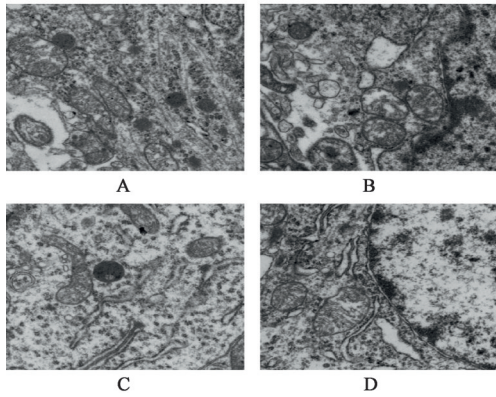


图2 益髓解毒方对VD大鼠海马神经元超微结构的影响(电镜,×5 000)

Fig. 2 Effect of Yisui Jiedu prescription on ultrastructure of hippocampal neurons in VD Rats(TEM, ×5 000)

3.4 对VD大鼠海马组织Akt, Bad mRNA表达的影响 与假手术组比较,模型组Akt mRNA表达明显下降,Bad mRNA表达明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组及益髓解毒方组Akt mRNA的表达明显升高,Bad mRNA的表达明显下降($P < 0.05$)。见表2。

3.5 对VD大鼠海马组织Akt, p-Akt, Bad蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马组织中

表3 益髓解毒法对VD大鼠海马Akt, p-Akt, Bad蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | Akt/GADPH | p-Akt/Akt | Bad/GADPH |
|--------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 假手术 | - | 0.813±0.021 | 0.523±0.007 | 0.197±0.013 |
| 模型 | - | 0.353±0.015 ¹⁾ | 0.214±0.008 ¹⁾ | 0.508±0.011 ¹⁾ |
| 盐酸多奈哌齐 | 5.2×10 ⁻⁴ | 0.891±0.011 ^{1,3)} | 0.473±0.005 ^{1,3)} | 0.331±0.009 ^{1,3)} |
| 益髓解毒方 | 11.11 | 0.679±0.022 ^{1,3)} | 0.388±0.007 ^{1,3)} | 0.290±0.009 ^{1,3)} |

4 讨论

传统中医将VD称之为中风病痴呆,《杂病源流犀烛中风源流》云:“人至五六十岁,气血就衰,乃有中风之病”,年老之人脏腑虚损,肾亏精少而髓不足,气虚无力运血,导致血行瘀滞,癖血内生;脾气亏虚,失于运化,痰湿内生。“髓虚毒损”为中风病的病机关键,中风病后,髓减脑消,脑络受损,风、火、痰、瘀、虚五毒互结,上窜瘀阻,败坏脑髓,肾之精气上输不能,则脑气与脏气不相顺接,脑络瘀阻伤髓,痰浊结于清窍,浊毒壅塞,玄府郁闭以至元神失养,灵机失用。髓虚贯穿中风及后期发展始终,毒损是发生及加重的主要因素,在治疗上,补脑髓之虚是

表2 益髓解毒方对VD大鼠海马组织Akt mRNA, Bad mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Yisui Jiedu prescription on expression of Akt and Bad mRNA in hippocampus of VD rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | Akt | Bad |
|--------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术 | - | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| 模型 | - | 0.69±0.21 ¹⁾ | 2.10±0.72 ¹⁾ |
| 盐酸多奈哌齐 | 5.2×10 ⁻⁴ | 1.15±0.29 ^{1,3)} | 1.69±0.81 ^{1,3)} |
| 益髓解毒方 | 11.11 | 1.14±0.36 ^{1,3)} | 1.81±0.97 ^{1,3)} |

Akt, p-Akt蛋白表达含量明显下降,Bad蛋白表达明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组及益髓解毒方组Akt, p-Akt蛋白表达明显升高,Bad蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。见图3,表3。

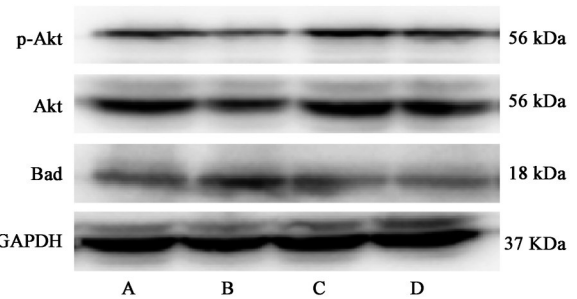


图3 VD大鼠海马组织Akt, p-Akt, Bad蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of PI3K, Akt and Bad protein expression in hippocampus of VD rats

根本,祛毒损之实是关键。因此,作为中风病的后续发展,赵建军教授认为“髓虚毒损”亦为VD的病机关键,并提出益髓解毒法为VD的治疗大法。本研究在益髓解毒法指导下进行组方为益髓解毒方,通过补益肾精濡养脑髓,祛除痰瘀浊邪毒损,以恢复灵窍神机之用。有学者亦认为,瘀血和痰浊作为重要病理因素,参与VD整个发展过程。近年来,研究发现有些中药、有效成分及复方可通过对PI3K/Akt信号通路的调控而发挥神经保护作用^[5]。本研究益髓解毒组方中肉苁蓉可补肾阳、益精血;益智仁暖脾胃,益肾火,山茱萸补益肝肾、涩精敛阴,三者功擅补肾填精而益髓,脑髓充盈则智力不消;丹

参、红花活血化瘀;地龙、菖蒲豁痰通络;豨莶草、黄连清热解毒,并可通络。纵观全方,标本兼顾,补肾填精益髓之药配以豁痰解毒通络之品,共奏益髓解毒之功效。

细胞凋亡是缺氧缺血过程中神经元损伤的一种重要形式,海马区是大脑结构中学习与记忆关系最为密切的功能区,直接参与信息的储存和处理,海马区神经元数量及其形态决定学习记忆功能的正常获取及储存,而空间学习能力则取决于海马结构和功能的完整性。神经元丢失将严重影响海马接收其他联络区域信息的功能,引起学习和记忆障碍。大脑对缺血缺氧十分敏感,大脑皮质、海马CA1区神经元最为敏感^[14]。大脑缺血缺氧后,海马及新皮层等部位产生大量可引起神经元凋亡的自由基、兴奋性氨基酸,NO聚集,导致细胞内Ca²⁺超载,诱导细胞凋亡的发生,可能是VD发生的病理基础^[15]。

PI3K是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,Akt能磷酸化细胞一系列蛋白成分,PI3K/Akt信号通路多见于肿瘤、癌症的研究中,参与细胞线粒体凋亡与自噬,Bad是Akt下游一重要靶向分子,其属于Bcl-2凋亡相关基因家族的促凋亡基因。由于Akt能直接磷酸化Bad,从而使Bcl-2或Bcl-x1形成单体,以此发挥抗凋亡作用;同时也可有效抑制Bad诱导的细胞凋亡^[16]。PI3K/Akt/Bad信号通路是一条经典的调控细胞凋亡信号通路,在局灶和全脑缺血神经元凋亡过程中发挥重要作用。本研究结果表明,经2-VO法制备VD大鼠,模型组海马神经元凋亡明显,益髓解毒方可明显改善缺血缺氧后VD大鼠的学习和记忆能力,HE染色显示海马区组织形态结构显著改善;TEM观察到模型组海马神经元胞膜不完整,线粒体与内质网存在严重程度的空化和扩张,而盐酸多奈哌齐组和益髓解毒方组海马神经元结构明显优于模型组。另外,通过Real-time PCR和Western blot发现,益髓解毒方组可明显上调Akt mRNA和Akt,p-Akt蛋白表达,下调Bad mRNA和Bad蛋白表达,这表明益髓解毒方对PI3K/Akt/Bad信号通路具有一定的调控作用。综上所述,益髓解毒方可通过改善VD大鼠的认知功能、修复神经受损细胞,改善神经元超微结构,调控细胞凋亡途径的相关因子表达,干预PI3K/Akt/Bad信号通路,从而抑制神经元凋亡,改善VD的发展进程。

[参考文献]

[1] MAXIMILIAN W, AMANDA J K, CLAASSEN J A .

Vascular aspects of cognitive impairment and dementia [J]. *J Cereb Blood F Met*, 2013, 33(11): 1696-1706.

[2] BRIEN, JOHN T O, THOMAS A. Vascular dementia [J]. *Lancet*, 2015, doi: 10.1016/S0140-6736 (15) 00463-8.

[3] GBD 2016 Dementia Collaborators. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(1): 88-106.

[4] 黄玮. 血管性痴呆的发病机制研究进展[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(5): 63-64.

[5] 朱金墙,宋宛珊,马妍,等. PI3K/Akt信号通路及血管性痴呆的关系及中药干预作用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(9): 223-229.

[6] DATTA S R, DUDEK H, TAO X, et al. Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery [J]. *Cell*, 1997, 91(2): 231-241.

[7] 张培丽. 马云枝教授运用地黄饮子治疗血管性痴呆经验[J]. *中医研究*, 2020, 33(6): 38-40.

[8] 王健,赵建军,任吉祥,等. 髓虚毒损脑病病机关键的提出及在出血性中风的应用[J]. *长春中医药大学学报*, 2013, 29(4): 715-78.

[9] 高玲,杨薇,姜秀雪,等. 从“髓虚毒损”论治血管性痴呆[J]. *环球中医药*, 2018, 11(9): 1389-1391.

[10] 高玲,赵建军,王冰梅,等. 益髓解毒法对血管性痴呆大鼠海马神经元Caspase-3、Caspase-9 mRNA及蛋白表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 12(34): 5656-5660.

[11] ZHANG Z H, SHI G X, LI Q Q, et al. Comparison of cognitive performance between two rat models of vascular dementia [J]. *Int J Neuro*, 2014, 124(11): 818-823.

[12] 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.

[13] 李凤奎,王纯耀. 实验动物与动物实验方法学[M]. 郑州:河南医科大学出版社,2007:321-323.

[14] 高风超,陈翔,田新英. 血管性痴呆危险因素及发病机制的研究进展[J]. *医学综述*, 2014, 20(6): 1068-1071.

[15] BLACK S E. Vascular cognitive impairment: epidemiology, subtypes, diagnosis and management [J]. *J R Coll Physicians Edinb*, 2011, 41(1): 49-56.

[16] LI S S, TANG Q L, WANG S H, et al. Simultaneously targeting Bcl-2 and Akt pathways sensitizes nasopharyngeal carcinoma to tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand [J]. *Cancer Biother Radio*, 2012, 1(27): 88-95.

[责任编辑 孙丛丛]