

· 经典名方 ·

基于 Cx43/Glu/AMPA 通路探讨加减薯蓣丸对血管性痴呆大鼠海马髓鞘损伤的影响

王建婷¹, 谭子虎^{1,2*}, 周剑杰², 王静¹, 杨琼¹, 刘煜², 李贤炜²

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 湖北省中医院, 武汉 430065)

[摘要] 目的:探讨加减薯蓣丸对血管性痴呆(VD)模型大鼠海马髓鞘损伤的影响及其作用机制研究。方法:选取 SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只,随机分为假手术组,模型组,加减薯蓣丸高、中、低剂量组,每组 12 只。除假手术组外,其余 4 组均采用双侧颈动脉结扎改良法进行 VD 模型制备,造模结束后通过水迷宫筛选造模成功大鼠进行灌胃。加减薯蓣丸高、中、低剂量组灌胃剂量分别为 10、5、2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹,其余组给予等体积生理盐水。28 d 灌胃结束后,通过水迷宫检测大鼠空间学习记忆能力,苏木素-伊红(HE)染色法观察海马区神经元结构,生化检测海马肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、谷氨酸(Glu)含量变化,免疫荧光检测海马髓鞘碱性蛋白(MBP)、活化星形胶质细胞标记物胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、半通道蛋白 43(Cx43)的表达,电镜观察大鼠海马髓鞘结构,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(AMPA)、Cx43 蛋白表达。结果:与假手术组比较,VD 模型大鼠逃避潜伏期显著延长($P < 0.01$),穿越原平台次数和目标象限滞留时间百分比显著减少($P < 0.01$);海马 CA1 区神经元结构紊乱;髓鞘板层疏松,边缘模糊不清;海马 CA1 区神经元 TNF- α 、IL-6、Glu 含量明显增多,以 Glu 最为显著($P < 0.01$);AMPA 蛋白表达显著降低($P < 0.01$),磷酸化(p)-AMPA、Cx43 蛋白表达显著升高($P < 0.01$);髓鞘 MBP 蛋白表达显著降低,GFAP 与 Cx43 共标荧光显著增强。与模型组比较,给予加减薯蓣丸干预后,加减薯蓣丸中药组逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$),穿越原平台次数和目标象限滞留时间百分比明显延长($P < 0.05$);海马神经元排列较紧密;髓鞘板层更致密,边缘清晰;海马 TNF- α 、IL-6、Glu 含量明显降低,Glu 下降最为显著($P < 0.01$);AMPA 蛋白表达显著升高($P < 0.01$),p-AMPA、Cx43 蛋白表达显著降低,以高剂量组最为显著($P < 0.01$);髓鞘 MBP 蛋白表达显著增加,GFAP 与 Cx43 共标荧光显著降低,高剂量组改善最为明显。结论:加减薯蓣丸能改善 VD 大鼠学习记忆能力,其机制可能与抑制 Cx43 表达,减少 Glu 外排,抑制 AMPA 介导的炎症反应并减少星形胶质细胞标记物 GFAP 产生,促进髓鞘 MBP 蛋白表达,缓解髓鞘损伤有关。

[关键词] 半通道蛋白 43(Cx43); 髓鞘损伤; 血管性痴呆; 加减薯蓣丸

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R22;R74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)07-0038-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230240

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230202.1708.005.html>

[网络出版日期] 2023-02-03 09:41:49

Effect of Modified Shuyuwan on Hippocampal Myelin Sheath Injury in Vascular Dementia Rats Through Cx43/Glu/AMPA Pathway

WANG Jianting¹, TAN Zihu^{1,2*}, ZHOU Jianjie², WANG Jing¹, YANG Qiong¹, LIU Yu², LI Xianwei²

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of modified Shuyuwan (SYW) on hippocampal myelin sheath injury in vascular dementia (VD) model rats. **Method:** Sixty male SD rats of SPF

[收稿日期] 2022-10-09

[基金项目] 湖北省自然科学基金重点项目(2015CFA089);湖北省中医院老年呆病“五专”项目

[第一作者] 王建婷,在读博士,从事中医药防治心脑血管疾病的研究,E-mail:Jetty_cmx_ki@gmail.com

[通信作者] * 谭子虎,博士,主任医师,博士生导师,从事中医药防治心脑血管疾病的研究,E-mail:tanzihu2008@163.com

grade were randomly divided into sham operation group, model group, and high-, medium- and low-dose modified SYW groups, with 12 rats in each group. The VD model was induced by bilateral carotid artery ligation in rats of the groups except for those of the sham operation group. After modeling, rats were screened by the water maze test, followed by drug treatment by gavage. Specifically, rats in the modified SYW groups were treated with modified SYW at 10, 5, 2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹, accordingly, and those in other groups were administered with the same amount of normal saline. After intragastric administration for 28 days, the spatial learning and memory abilities of rats were detected by the water maze test. The hippocampal neuron structure was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The content of hippocampal tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin-6 (IL-6), and glutamate (Glu) was observed by biochemical detection. The hippocampal expression of myelin basic protein (MBP), astrocyte activation marker glial fibrillary acidic protein (GFAP), and connexin 43 (Cx43) was detected by immunofluorescence detection. The myelin sheath structure in the hippocampus was observed by the electron microscope. The α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor (AMPA) and Cx43 protein expression was detected by Western blot. **Result:** Compared with the sham operation group, the model group showed prolonged escape latency ($P<0.01$), decreased times of crossing the original platform and percentage of target quadrant detention time ($P<0.01$), disordered neuron structure in the hippocampal CA1 region, loose myelin sheath lamella with blurry edge, up-regulated expression levels of TNF- α , IL-6, and Glu in the hippocampal CA1 region, especially Glu ($P<0.01$), reduced expression of AMPAR ($P<0.01$), increased protein expression of p-AMPA and Cx43 ($P<0.01$), significantly dwindled protein expression of MBP in the myelin sheath, and enhanced fluorescence co-labeled by GFAP and Cx43. Compared with the model group, the modified SYW groups showed shortened escape latency ($P<0.05$), increased times of crossing the original platform and percentage of target quadrant detention time ($P<0.05$), closely arranged hippocampal neuron structure, denser myelin sheath lamella with clear edge, down-regulated expression levels of TNF- α , IL-6, and Glu in the hippocampal CA1 region, especially Glu ($P<0.01$), up-regulated AMPAR ($P<0.01$), reduced protein expression of p-AMPA and Cx43, especially in the high-dose group ($P<0.01$), significantly elevated protein expression of MBP in the myelin sheath, and weakened fluorescence co-labeled by GFAP and Cx43, especially in the high-dose group. **Conclusion:** Modified SYW can improve the learning and memory abilities of VD rats, and the mechanism may be related to the inhibition of Cx43 expression, reduction of the release of Glu, inhibition of AMPAR-mediated inflammatory response to reduce the production of astrocyte marker GFAP, and promotion of the expression of MBP protein to alleviate myelin injury.

[Keywords] connexin 43 (Cx43); myelin sheath injury; vascular dementia (VD); modified Shuyuwan

血管性痴呆(VD)是由各种急、慢性脑血管病变所导致的局部脑区缺血缺氧继而引发神经与认知功能损害的临床第二大痴呆类型,仅次于阿尔茨海默病^[1-2]。其发病率随年龄增长而急剧增加^[3],除智能、记忆、认知等障碍以外,VD患者常伴抑郁、冷漠、易激惹等精神行为异常,也因此进一步加重医疗和社会负担^[4-5]。目前VD病理机制尚不明晰,研究VD的发病机制对该病的防治具有重要意义。

髓鞘由少突胶质细胞轴突延伸并层层包绕神经元轴突形成,其结构与功能的完整性与学习记忆能力的形成密切相关^[6-7]。在生理状态下,星形胶质细胞调控少突谱系细胞的增殖分化、促进少突胶质细胞与髓鞘的形成,同时连接少突胶质细胞并为髓

鞘提供营养与结构支持^[8]。慢性脑缺血状态下,过度激活的星形胶质细胞通过其膜表面的半通道蛋白43(Cx43)介导损伤信号分子的释放,如谷氨酸(Glu)、白细胞介素-6(IL-6)等^[9-11],胞外过度积累的Glu通过少突胶质细胞膜表面的 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸受体(AMPA)介导炎性反应的发生^[12-13],导致少突胶质细胞损伤与髓鞘结构破坏^[14],进而损害学习记忆能力。VD伴随着广泛的髓鞘结构受损,被认为是该病学习记忆能力受损的主要原因之一^[15],而抑制Cx43可促进少突谱系细胞向髓鞘形成细胞的分化^[16],从而促进髓鞘的形成,因此研究Cx43介导的髓鞘损伤将为寻找VD有效疗法提供理论依据。

目前并无针对VD的有效治疗药物,临床多以扩张血管和调节神经递质为主,而疗效不甚肯定,且此类药物具有导致流涎、精神不振、嗜睡、心脑血管疾病风险增加等不良反应,进一步加重患者的疾病负担,因此亟需深入探索VD发病机制,为寻找新的VD疗法提供思路。薯蓣丸出自仲景《金匮要略·血痹虚劳病脉证并治第六》,主治“虚劳诸不足,风气百疾”,为补虚之代表方,而后经湖北省中医院名老中医吕继端教授结合验方“益智灵”化裁得到加减薯蓣丸,加重补虚之力,并结合化痰祛瘀之法,更好地针对痴呆的疾病特点,迄今用于各种痴呆症的治疗已有20余年^[17-18]。同时,该方可显著改善慢性脑低灌注大鼠的学习记忆能力^[19-20],减轻脑部炎症反应并促进少突胶质细胞的增生^[21],但具体机制仍不明晰。目前在中药保护VD髓鞘受损方面的研究不多,加减薯蓣丸对学习记忆的改善是否与髓鞘相关也需要探索。因此本研究基于Cx43/Glu/AMPA通路探讨加减薯蓣丸改善VD学习记忆能力及海马髓鞘损伤的作用机制,同时为中医药治疗VD提供一定的理论依据。

1 材料

1.1 动物 健康SPF级雄性3月龄SD雄性大鼠60只,体质量(280±20)g,由湖北省中医院动物房提供,动物合格证号SCXK(鄂)2020-0018,本研究得到湖北省中医院伦理委员会批准(伦理批件编号HBZY2020-C47-01)。

1.2 药物 加减薯蓣丸由山药30g、何首乌24g、熟地黄24g、党参20g、当归20g、白芍20g、白术18g、茯苓18g、枸杞子18g、石菖蒲14g、杜仲12g、川芎10g、五味子10g、远志12g组成,所有饮片经湖北省中医院药剂科周从辉主管药师鉴定,符合相关用药标准。将各饮片浸泡0.5h后水煎3次,过滤合并,经物理方法将合并后的水煎剂浓缩至含生药质量浓度为1g·mL⁻¹。为湖北省中医院院内制剂(批准文号鄂药制字Z20180013),由湖北省中医院中药房提供^[22]。

1.3 试剂 苏木精(德国Merck公司,批号H9627);伊红(北京国药集团化学试剂公司,批号71014544);大鼠IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒(武汉酶免生物科技公司,批号分别为MM-0190R2、MM-0180R2);Glu含量检测试剂盒(北京Solarbio公司,批号BC1585);髓鞘碱性蛋白(MBP,北京Bioss公司,批号bs-0380R);兔多抗Cx43(美国Affinity公司,批号AF0137);RIPA裂解液(大连

Meilunbio公司,批号MA0151);活化星形胶质细胞标记物胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、兔多抗p-AMPA GluR1 S831、兔单抗AMPA GluR1(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为#3670、#8084、#13185);荧光(CY3)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G、荧光(CY3)标记羊抗小鼠IgG、荧光(FITC)标记羊抗兔IgG、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程公司,批号分别为BA1032、BA1031、BA1105、BA1054);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,杭州贤至生物公司,批号AB-P-R001)。

1.4 仪器 RM2016型轮转式病理切片机(德国Leica公司);BX53型生物显微镜(日本Olympus公司);FlexStation 3型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);H1-16KR型台式高速冷冻离心机(湖南可成仪器设备公司);DYCZ-24DN型垂直电泳槽(北京六一生物科技公司);SH-523化学发光成像系统(杭州申花科技公司);Tecnai G20 TWIN型透射电镜(美国FEI公司)。

2 方法

2.1 VD模型制备 采用双侧颈动脉结扎改良法制备^[23-24]。大鼠适应性喂养7d后开始造模,禁食后麻醉,固定四肢,颈前部剃毛,消毒,沿气管左侧剪开皮肤,钝性分离肌层、神经,结扎单侧颈总动脉的近心端与远心端,中间离断,对皮缝合,碘伏消毒,置于电热毯上等待复苏,术后禁食12h。术后第5天以同样方法进行右侧颈总动脉结扎并离断。假手术组剪开皮肤后进行缝合,不结扎、离断血管。术后第5天进行水迷宫定位巡航训练,记录每只大鼠的逃避潜伏期,以假手术组大鼠逃避潜伏期的均值为参考值,计算造模大鼠的平均逃避潜伏期与参考值之差占该鼠的平均逃避潜伏期时间比值,比值>20%则认为造模成功^[25]。

2.2 分组给药 将造模成功的大鼠随机分为模型组,加减薯蓣丸高、中、低剂量组,其余为假手术组,每组12只。根据前期给药剂量相关研究^[26],按成人临床推荐剂量及人与大鼠换算公式,即大鼠给药剂量=人给药剂量×换算系数=1.6g·kg⁻¹·d⁻¹×6.3≈10g·kg⁻¹·d⁻¹,以此作为大鼠加减薯蓣丸灌胃高剂量(10g·kg⁻¹·d⁻¹),并设定中药中、低剂量组的灌胃剂量(5、2.5g·kg⁻¹)。期间模型组与假手术组灌胃予以等体积生理盐水,连续灌胃28d。

2.3 指标检测

2.3.1 行为学检测 灌胃4周后进行定位巡航实验

(步骤同前,记录2 min内逃避潜伏期)与空间探索实验(在定位巡航结束后撤去平台,将大鼠面朝池壁从同一象限放入水中,记录其2 min内跨原平台位置的次数和该象限滞留时间)。

2.3.2 苏木素-伊红(HE)染色观察海马结构变化

大鼠海马组织经4%多聚甲醛固定后,用乙醇梯度脱水,经二甲苯透明,60℃石蜡浸蜡,包埋、切片、烤片后,经二甲苯、乙醇脱蜡,蒸馏水浸洗,以苏木素染色、伊红染色,经乙醇、二甲苯脱水,中性树脂胶封片,于光镜下观察海马CA1区组织形态。

2.3.3 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测海马TNF- α 与IL-6表达、紫外分光光度法观察Glu表达

ELISA:大鼠海马组织匀浆后2 000 r·min⁻¹离心20 min(离心半径8.5 cm,下同)取上清,严格按照试剂盒说明进行。按浓度梯度对标准品进行稀释,加样,室温温育,弃液,洗涤,加入酶标室温温育,弃液,洗涤,避光显色,加终止液,测定吸光度A。紫外分光光度法:组织样品预处理,配置标准溶液,测定样本A,绘制标准曲线计算Glu含量。

2.3.4 电镜观察髓鞘结构变化

新鲜海马CA1区组织样本经2.5%戊二醛、1%锇酸缓冲液固定,乙醇梯度脱水,依次用丙酮-812包埋剂(1:1)、纯812包埋剂37℃恒温渗透,环氧树脂包埋,厚度70 nm超薄切片,铀铅双染色,超微透射电镜观察拍照。

2.3.5 免疫荧光检测海马MBP、GFAP与Cx43表达

取海马组织用乙醇梯度脱水,经二甲苯透明,石蜡浸蜡,包埋切片,脱蜡,抗原修复,羊血清室温

封闭,加一抗(稀释倍数均为1:100)后4℃湿盒孵育过夜,PBST冲洗后加荧光二抗,室温湿盒孵育,经PBST冲洗后滴加DAPI避光孵育,冲洗后封片,荧光显微镜观察采集图像。

2.3.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马Cx43、AMPA、p-AMPA GluR1蛋白表达

取适量大鼠海马组织加入RIPA裂解液,超声破碎,4℃、12 000 r·min⁻¹离心5 min后取上清,BCA法测定蛋白浓度。上样、电泳后转膜,加5%脱脂奶粉封闭,分别加入Cx43、AMPA、p-AMPA GluR1和GAPDH一抗,稀释倍数均为1:1 000,4℃过夜,洗涤后加入相应HRP标记二抗(1:10 000)37℃恒温孵育,洗涤后ECL显影,Image J分析目标条带。

2.4 统计学分析

采用SPSS Statistics 25软件进行统计分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),方差齐的用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐则用Dunnnett's T检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对VD大鼠学习记忆能力的影响

与假手术组比较,模型组大鼠第5天逃避潜伏期显著延长($P < 0.01$),穿越原平台次数和目标象限滞留时间百分比显著减少,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,加减薯蓣丸各剂量组第5天逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$),穿越原平台次数和目标象限滞留时间百分比明显延长,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表1。

表1 加减薯蓣丸对VD大鼠逃避潜伏期、穿越平台次数和目标象限滞留时间的影响($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 1 Effect of modified Shuyuwan on escape latency, times of crossing platform and retention time in target quadrant of VD rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | 逃避潜伏期/s | | | 穿越平台次数 /次 | 目标象限滞留时间 比/% |
|------------|---------------------------|-------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| | | 第1天 | 第3天 | 第5天 | | |
| 假手术组 | | 83.47±63.28 | 52.80±13.84 | 34.10±3.05 | 7.67±0.58 | 44.40±1.68 |
| 模型组 | | 94.87±43.53 | 92.87±25.54 ¹⁾ | 52.70±5.20 ²⁾ | 2.67±0.58 ²⁾ | 32.33±3.56 ²⁾ |
| 加减薯蓣丸组高剂量组 | 10 | 84.27±61.89 | 66.63±8.50 ³⁾ | 37.60±3.64 ³⁾ | 6.67±1.15 ⁴⁾ | 41.43±3.61 ³⁾ |
| 加减薯蓣丸组中剂量组 | 5 | 85.47±59.81 | 67.43±3.06 ³⁾ | 40.60±2.46 ³⁾ | 6.33±0.58 ⁴⁾ | 39.93±3.51 ³⁾ |
| 加减薯蓣丸组低剂量组 | 2.5 | 89.57±52.71 | 75.93±2.75 ³⁾ | 41.00±3.73 ³⁾ | 5.00±1.00 ³⁾ | 39.57±0.76 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和表3同)

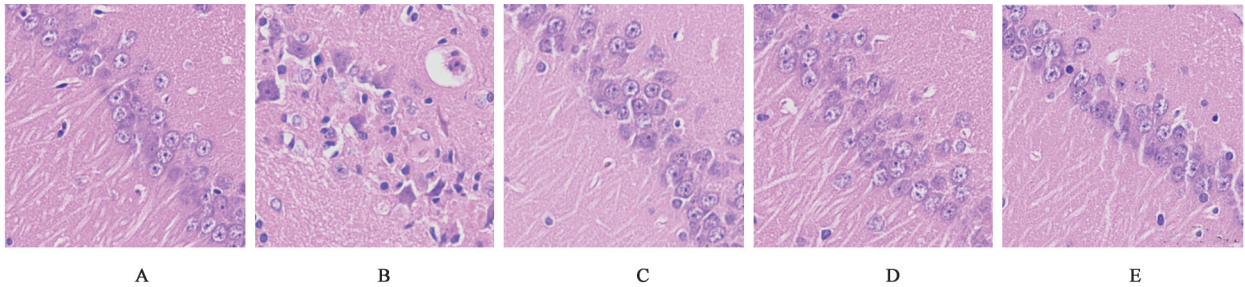
3.2 对VD大鼠海马CA1区神经元结构的影响

假手术组海马CA1区结构完整,细胞排列整齐,胞质饱满,胞体轮廓清晰,细胞核多呈圆形且较大,分布于胞质中心,染色较浅。模型组海马组织松散,结构紊乱,细胞间隙明显,大量神经元坏死或变性,胞质皱缩,染色加深。给予加减薯蓣丸干预后,

海马组织损伤程度较模型组明显减轻,胞体排列规则,胞质染色减淡,细胞核肿胀减轻。见图1。

3.3 对VD大鼠海马CA1区TNF- α 、IL-6、Glu含量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠海马CA1区TNF- α 、IL-6、Glu水平明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,加减薯蓣丸高



注:A.假手术组;B.模型组;C.加减薯蓣丸高剂量组;D.加减薯蓣丸中剂量组;E.加减薯蓣丸低剂量组(图2-图5同)

图1 加减薯蓣丸对VD大鼠海马CA1区神经元结构的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of modified Shuyuwan on neuron structure in hippocampal CA1 of VD rats (HE, ×200)

剂量组 TNF- α 、IL-6 水平明显降低($P<0.05$), Glu 显著降低($P<0.01$), 加减薯蓣丸中剂量组 TNF- α 水平明显降低($P<0.05$), Glu 显著降低($P<0.01$), IL-6 水平降低但差异无统计学意义; 加减薯蓣丸低剂量组 Glu 水平明显降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 加减薯蓣丸对VD大鼠海马CA1区TNF- α 、IL-6、Glu表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of modified Shuyuwan on TNF- α , IL-6, Glu in hippocampal CA1 of VD rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | TNF- α /ng·g ⁻¹ | IL-6/pg·g ⁻¹ | Glu/ μ mol·g ⁻¹ |
|-----------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| 假手术组 | | 265.23±57.54 | 559.57±61.74 | 2.20±0.36 |
| 模型组 | | 845.76±175.51 ¹⁾ | 958.10±128.46 ¹⁾ | 5.76±0.29 ²⁾ |
| 加减薯蓣丸高剂量组 | 10 | 368.93±98.90 ³⁾ | 634.06±174.05 ³⁾ | 2.97±0.50 ⁴⁾ |
| 加减薯蓣丸中剂量组 | 5 | 479.45±135.43 ³⁾ | 702.21±215.55 | 3.82±0.31 ⁴⁾ |
| 加减薯蓣丸低剂量组 | 2.5 | 754.55±208.78 | 871.01±170.99 | 5.04±0.40 ³⁾ |

3.4 对VD大鼠海马CA1区髓鞘结构的影响 电镜观察示,假手术组大鼠海马CA1区髓鞘结构完整,板层紧凑规则,边缘光滑,空泡较少;模型组大鼠髓鞘结构松散,边缘模糊不清,致密层分离,出现

较多空泡样改变;给予加减薯蓣丸干预后,大鼠海马CA1区髓鞘结构较模型组有序,板层结构更为致密,边缘清晰,空泡样改变减少,其中加减薯蓣丸高剂量组髓鞘结构的改善最为明显。见图2。

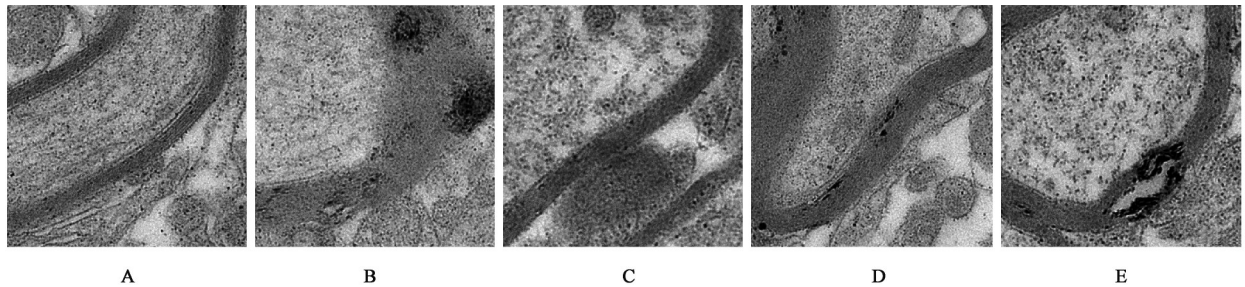


图2 加减薯蓣丸对VD大鼠海马CA1区髓鞘结构的影响(电镜,×11 000)

Fig. 2 Effect of modified Shuyuwan on myelin structure in hippocampal CA1 of VD rats (TEM, ×11 000)

3.5 对VD大鼠海马MBP、GFAP与Cx43的影响

与假手术组比较,模型组大鼠海马区细胞结构紊乱,组织松散,胞核体积缩小,髓鞘碱性蛋白MBP荧光强度明显降低,星形胶质细胞标记物GFAP与半通道蛋白Cx43荧光强度显著增强。经加减薯蓣丸干预后,大鼠海马区细胞排列较为改善,胞核较模型组饱满,各组MBP荧光强度均不同程度增强,同时GFAP与Cx43荧光强度明显降低,以高剂量组改

善最为明显。见图3和图4。

3.6 对VD大鼠海马CA1区AMPA、p-AMPA、Cx43蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马AMPA蛋白表达显著降低($P<0.01$), p-AMPA、Cx43蛋白表达显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,加减薯蓣丸各剂量组大鼠AMPA蛋白表达均显著增高($P<0.01$),加减薯蓣丸高、中剂量组p-AMPA、Cx43蛋白表达显著减少($P<0.01$)。见表3、图5。

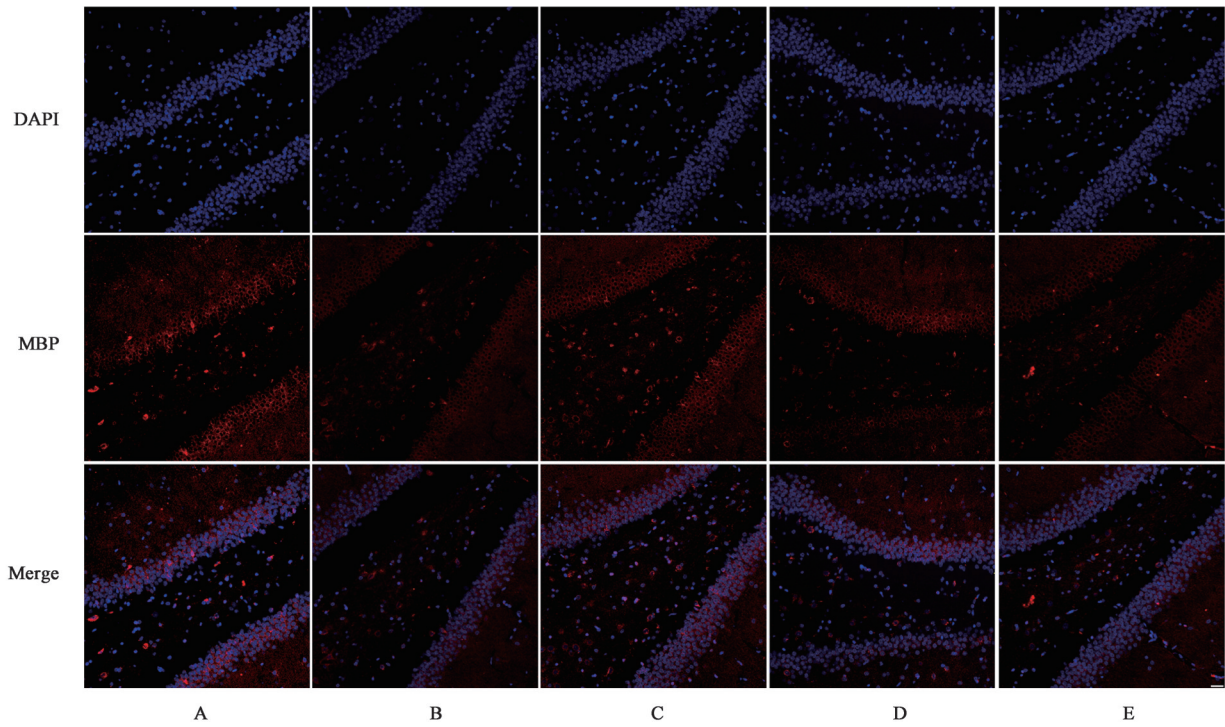


图3 加减薯蓣丸对VD大鼠海马CA1区MBP荧光表达的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 3 Effect of modified Shuyuwan on MBP immunofluorescence staining in hippocampal of VD rats (IF, ×200)

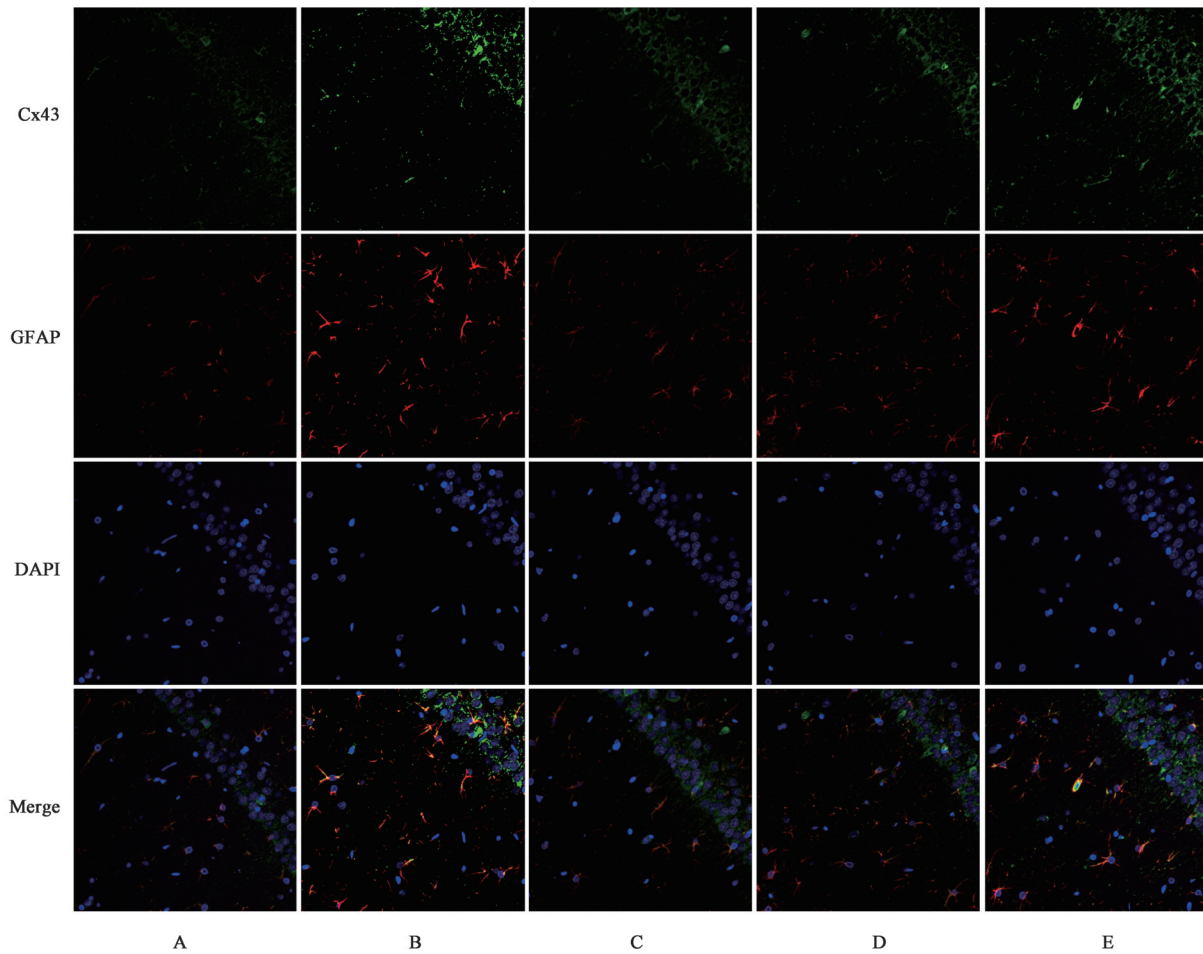


图4 加减薯蓣丸对VD大鼠海马GFAP、Cx43荧光表达的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 4 Effect of modified Shuyuwan on GFAP, Cx43 immunofluorescence staining in hippocampal of VD rats (IF, ×200)

表3 加减薯蓣丸对VD大鼠海马CA1区AMPA、p-AMPA、Cx43蛋白相对表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of modified Shuyuwán on AMPAR, p-AMPA, Cx43 protein expression level in hippocampal CA1 of VD rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | AMPA/GAPDH | p-AMPA/GAPDH | Cx43/GAPDH |
|------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 假手术组 | | 1.00±0.04 | 1.00±0.02 | 1.00±0.04 |
| 模型组 | | 0.29±0.01 ²⁾ | 3.20±0.06 ²⁾ | 2.54±0.11 ²⁾ |
| 加减薯蓣丸组高剂量组 | 10 | 0.83±0.02 ⁴⁾ | 1.49±0.04 ⁴⁾ | 1.27±0.06 ⁴⁾ |
| 加减薯蓣丸组中剂量组 | 5 | 0.64±0.01 ⁴⁾ | 2.05±0.03 ⁴⁾ | 1.61±0.06 ⁴⁾ |
| 加减薯蓣丸组低剂量组 | 2.5 | 0.44±0.03 ⁴⁾ | 2.87±0.03 | 2.24±0.07 |

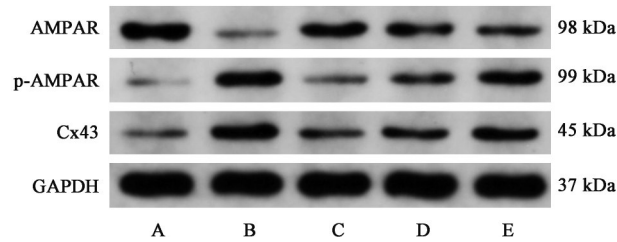


图5 大鼠海马CA1区AMPA、p-AMPA、Cx43蛋白电泳
Fig. 5 Electrophoresis of AMPAR, p-AMPA, Cx43 in hippocampal CA1 of rats

4 讨论

VD是由各种脑血管病变引起的脑组织损伤,以获得性智力损害和认知障碍为主要临床表现的综合征,其病理改变与腔隙性梗死、弥漫性白质损伤、髓鞘丢失、轴突异常等因素相关联,VD的发病机制尚不明确,但与炎症、凋亡密切相关^[15]。中医将VD归属“痴呆”“呆病”范畴,认为肾虚髓失养为VD发病之本^[27],痰浊蒙窍、瘀阻脑络为其基本病机,病位在脑,与脾肾密切相关^[28-29]。加减薯蓣丸以熟地黄、何首乌益肾填精,以杜仲、五味子、枸杞子、山药肝脾肾三脏同补,以白术、茯苓、党参健脾化痰,以川芎、当归、白芍活血养血,以远志、石菖蒲开窍醒神,全方共奏补肾健脾、化痰祛瘀之功。在《金匱要略》薯蓣丸基础上,加减薯蓣丸去其甘草、人参、大枣、阿胶以防滋腻伤脾而助痰湿,同时加远志、石菖蒲更增化痰之力。此外,薯蓣丸以大豆黄卷、桔梗、白敛、干姜、神曲等药偏重肺胃,药性缓和,加减薯蓣丸则以熟地黄、何首乌、杜仲、五味子、枸杞子滋肾养肝,效专力宏。肾为先天之本,主水藏精,肾精化气,一可推动并维持脏腑机能正常运行,一可推动津液输布,将痰浊瘀血等浊液排出体外。从微观角度,生理状态下Glu代谢维持海马依赖性学习记忆,如同脏腑机能的正常运行;慢性脑低灌注状态下,Glu过度积累引发炎症级联反应,同时正常的代谢途径受损,最终导致髓鞘形成与重塑受损,损害学习认知能力,如同机体所形成的痰浊瘀血,作为病理产物又可进一步加重机体损伤。药

理研究表明,补肾类中药能减轻炎症反应^[30],如熟地黄单体成分5-羟甲基糠醛^[31]与地黄寡糖^[32]、石菖蒲有效成分β-细辛醚^[33]、川芎提取物川芎嗪^[34]等,对脑缺血再灌注小鼠、VD大鼠、APP/PS1小鼠的学习记忆能力有改善作用,且能显著改善病理状态下的神经元损伤,因此选用加减薯蓣丸治疗VD模型大鼠具有一定的药理研究基础。

研究表明,Glu由星形胶质细胞分泌^[35],是中枢神经系统中重要的兴奋性神经递质^[36],生理状态下的Glu-谷氨酰胺循环是海马依赖的学习记忆所必需的^[37],同时,胞外Glu稳态由星形胶质细胞中的Glu转运蛋白维持,防止Glu过度积累导致的兴奋性毒性^[38]。此外,神经纤维由成束的髓鞘所包绕,髓鞘由少突胶质细胞所构成^[39]。髓鞘的脱失不仅会造成信息传递速度的降低^[40],还会致使神经元轴突暴露于氧自由基、炎症因子等环境中受到损害,而髓鞘碱性蛋白MBP作为髓鞘的特异性标志物,可反映髓鞘的损伤程度。在脑慢性低灌注状态下,神经系统受损,炎症环境下星形胶质细胞活化增加,Cx43表达上调且通透性增加,Glu及炎症因子过度分泌^[41],诱导NF-κB信号传导并触发炎症级联反应^[42],胞外积累的Glu积聚一方面过度激活少突胶质细胞膜表面的AMPA受体,介导Ca²⁺内流,诱导少突胶质细胞死亡与髓鞘损伤^[43];另一方面不断激活星形胶质细胞导致Cx43过度开放^[44-45],炎症因子与Glu大量外排,加重炎症反应,进一步损伤髓鞘^[46-47]。与此一致的是,研究结果显示,造模后VD大鼠海马区炎症因子TNF-α、IL-6分泌显著升高,伴随神经元凋亡、组织结构紊乱。炎症介导的星形胶质细胞活化增多,Cx43表达增加,表现为GFAP-Cx43共标免疫荧光增强;测得Glu分泌增加,过度激活少突胶质细胞表面AMPA,使磷酸化AMPA增加,MBP荧光强度明显降低,提示髓鞘结构受损。而给予加减薯蓣丸后,海马区炎症因子分泌得到抑制,GFAP-Cx43荧光强度降低,提示星形胶质细胞

活化程度降低,且Glu分泌明显降低,AMPA磷酸化表达下降,提示AMPA通路激活抑制,同时组织病理明显改善,电镜结果也发现,加减薯蓣丸能明显改善大鼠髓鞘结构松散、边缘模糊不清、致密层分离、空泡样改变等病理现象,表明少突胶质细胞损伤得到改善,提示加减薯蓣丸可有效抑制VD状态下的脑部炎症反应,减少星形胶质细胞活化与Cx43表达,降低Glu分泌与AMPA的激活,改善髓鞘损伤,从而改善VD大鼠的空间学习记忆能力。此外,研究所用的VD动物模型制备方法为双侧颈总动脉结扎改良法^[48],较传统方法显著降低死亡率,更加符合动物伦理的原则和要求,也较好的模拟了VD状态下的海马组织病理学改变。

综上所述,加减薯蓣丸能有效改善VD大鼠学习记忆能力的损害,其机制可能通过其补肾、化痰、活血之法,抑制VD大鼠脑部炎症反应与星形胶质细胞活化,降低海马区Cx43蛋白的表达与胞外Glu水平,减轻神经毒性,推动Glu代谢恢复正常水平,同时改善少突胶质细胞受损,促进髓鞘形成与修复。同时,加减薯蓣丸在改善VD学习记忆能力方面仍存在其他干预机制,值得未来进一步探究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 余文骁,王延江. 亚洲血管性认知损害的流行病学现状和发展趋势[J]. 中国医学前沿杂志:电子版, 2020, 12(10):1-8.

[2] SMITH E E. Clinical presentations and epidemiology of vascular dementia[J]. Clin Sci, 2017, 131(11): 1059-1068.

[3] WOLTERS F J, IKRAM M A. Epidemiology of vascular dementia[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(8):1542-1549.

[4] BESSEY L J, WALASZEK A. Management of behavioral and psychological symptoms of dementia [J]. Curr Psychiatry Rep, 2019, 21(8):66.

[5] MAGIERSKI R, SOBOW T, SCHWERTNER E, et al. Pharmacotherapy of behavioral and psychological symptoms of dementia: State of the art and future progress[J]. Front Pharmacol, 2020, 31(11):1168.

[6] BEHRENDT G, BAER K, BUFFO A, et al. Dynamic changes in myelin aberrations and oligodendrocyte generation in chronic amyloidosis in mice and men[J]. Glia, 2013, 61(2):273-286.

[7] ARAI K. Can oligodendrocyte precursor cells be a therapeutic target for mitigating cognitive decline in cerebrovascular disease? [J]. J Cereb Blood Flow

Metab, 2020, 40(8):1735-1736.

[8] YALÇIN B, MONJE M. Microenvironmental interactions of oligodendroglial cells [J]. Dev Cell, 2021, 56(13):1821-1832.

[9] YU H, CAO X, LI W, et al. Targeting connexin 43 provides anti-inflammatory effects after intracerebral hemorrhage injury by regulating YAP signaling [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1):322.

[10] YE Z C, WYETH M S, BALTAN-TEKKOK S, et al. Functional hemichannels in astrocytes: A novel mechanism of glutamate release [J]. J Neurosci, 2003, 23(9):3588-3596.

[11] STOUT C E, COSTANTIN J L, NAUS C C, et al. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels [J]. J Biol Chem, 2002, 277(12):10482-10488.

[12] OKADA M, FUKUYAMA K, SHIROYAMA T, et al. Brivaracetam prevents astroglial l-glutamate release associated with hemichannel through modulation of synaptic vesicle protein [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 138:111462.

[13] MEUNIER C, WANG N, YI C, et al. Contribution of astroglial Cx43 hemichannels to the modulation of glutamatergic currents by D-serine in the mouse prefrontal cortex [J]. J Neurosci, 2017, 37(37):9064-9075.

[14] BAYÓN-CORDERO L, OCHOA-BUENO B I, RUIZ A, et al. GABA receptor agonists protect from excitotoxic damage induced by AMPA in oligodendrocytes [J]. Front Pharmacol, 2022, 26(13): 897056.

[15] KALARIA R N. The pathology and pathophysiology of vascular dementia [J]. Neuropharmacology, 2018, 134(Pt B):226-239.

[16] WANG Q, WANG Z, TIAN Y, et al. Inhibition of astrocyte connexin 43 channels facilitates the differentiation of oligodendrocyte precursor cells under hypoxic conditions *in vitro* [J]. J Mol Neurosci, 2018, 64(4):591-600.

[17] 周剑杰,谭子虎,杨哲,等. 加减薯蓣丸介导线粒体自噬改善APP/PS1小鼠氧化应激损伤及学习记忆能力 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(6):43-53.

[18] 刘金欢,陈军,谭子虎,等. 加减薯蓣丸对非痴呆型血管性认知障碍患者认知功能的~1H-MRS初步分析 [J]. 中华医学杂志, 2014, 94(39):3075-3078.

[19] 刘茜,谭子虎. 加减薯蓣丸对血管性痴呆大鼠海马区p-tau蛋白表达的影响 [J]. 湖北中医药大学学报, 2018, 20(4):18-21.

[20] 李红兵,谭子虎. 加减薯蓣丸对血管性痴呆大鼠海马突触再生和可塑性影响的研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2018, 42(6):473-478.

- [21] 李红兵,赵茂军,张流忠,等. CCH条件下海马神经胶质重构及MDP干预的研究[J]. 贵州医药,2018,42(11):1292-1295.
- [22] 周剑杰. 基于线粒体质量调控探讨加减薯蓣丸减轻APP/PS1小鼠神经元氧化应激损伤的作用及机制[D]. 武汉:湖北中医药大学,2022.
- [23] 李杰,尹发明,王渊,等. 血管性痴呆大鼠模型研究进展[J]. 现代中医药,2022,42(5):1-5.
- [24] 孙旭,王蕾,赵婧,等. 血管性痴呆动物模型研究概述[J]. 广州中医药大学学报,2022,39(10):2465-2470.
- [25] 孙晓丽,张锴铤,郭淑贞,等. 龙生蛭胶囊对血管痴呆大鼠认知功能的影响及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(9):72-79.
- [26] 彭星铭. 加减薯蓣丸对轻度认知障碍的早期临床干预及相关量效关系实验的研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2015.
- [27] 曾子修,张允岭,金香兰. 从“肾虚络损髓伤”浅谈血管性痴呆发生发展的核心病机[J]. 北京中医药大学学报,2022,45(7):649-653.
- [28] 曹冰倩,谭峰. 基于“脾肾痰瘀”探讨中医药治疗血管性痴呆的理论及研究进展[J]. 中华中医药学刊,2022,40(5):62-67.
- [29] 谢宁,史瑞,吴颂,等. 血管性痴呆病因病机的研究概述[J]. 中华中医药学刊,2011,29(8):1712-1714.
- [30] 孙琳林,梁绍栋,任公平,等. 四种经典补肾抗衰方对衰老大鼠免疫炎症损伤影响的比较研究[J]. 中华中医药学刊,2018,36(4):830-833.
- [31] 张丽娜,金国琴. 熟地及有效成分对老年学习记忆减退的信号转导分子变化的影响[J]. 中国老年学杂志,2014,34(3):836-838.
- [32] 蒋青,沈明勤,石磊,等. 地黄寡糖对血管性痴呆大鼠海马区神经细胞凋亡及相关蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(3):192-196.
- [33] 邓敏贞,钟晓琴,宁百乐,等. 定志小丸有效成分中人参皂苷Rb₁联合 β -细辛醚对血管性痴呆模型小鼠作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2021,23(5):31-34.
- [34] ZHAO T, FU Y, SUN H, et al. Ligustrazine suppresses neuron apoptosis via the Bax/Bcl-2 and Caspase-3 pathway in PC12 cells and in rats with vascular dementia [J]. IUBMB Life, 2018, 70(1):60-70.
- [35] NARANJO V, CONTRERAS A, MERINO B, et al. Specific deletion of the astrocyte leptin receptor induces changes in hippocampus glutamate metabolism, synaptic transmission and plasticity [J]. Neuroscience, 2020, 447:182-190.
- [36] LIU Y, DING X F, WANG X X, et al. Xiaoyaosan exerts antidepressant-like effects by regulating the functions of astrocytes and EAATs in the prefrontal cortex of mice [J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1):215.
- [37] EBERSOLE J, ROSE G, EID T, et al. Altered hippocampal astroglial metabolism is associated with aging and preserved spatial learning and memory [J]. Neurobiol Aging, 2021, 102:188-199.
- [38] HASE Y, HORSBURGH K, IHARA M, et al. White matter degeneration in vascular and other ageing-related dementias [J]. J Neurochem, 2018, 144(5):617-633.
- [39] 邢华医,杜怡峰. 进行性多灶性白质脑病[J]. 临床神经病学杂志,2012,25(2):147-148.
- MICHEVA K D, WOLMAN D, MENSCH B D, et al. A large fraction of neocortical myelin ensheathes axons of local inhibitory neurons [J]. Elife, 2016, doi: 10.7554/eLife.15784.
- [40] ILLES P, BURNSTOCK G, TANG Y. Astroglia-derived ATP modulates CNS neuronal circuits [J]. Trends Neurosci, 2019, 42(12):885-898.
- [41] SAGGU R, SCHUMACHER T, GERICH F, et al. Astroglial NF- κ B contributes to white matter damage and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia [J]. Acta Neuropathol Commun, 2016, 4(1):76.
- [42] MATUTE C, ALBERDI E, DOMERCQ M, et al. The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases [J]. Trends Neurosci, 2001, 24(4):224-30.
- [43] SKOWROŃSKA K, OBARA-MICHELLEWSKA M, ZIELIŃSKA M, et al. NMDA receptors in astrocytes: In search for roles in neurotransmission and astrocytic homeostasis [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(2):309.
- [44] MATUTE C, DOMERCQ M, SÁNCHEZ-GÓMEZ M V. Glutamate-mediated glial injury: Mechanisms and clinical importance [J]. Glia, 2006, 53(2):212-224.
- [45] BALTAN S, BESANCON E F, MBOW B, et al. White matter vulnerability to ischemic injury increases with age because of enhanced excitotoxicity [J]. J Neurosci, 2008, 28(6):1479-1489.
- [46] WANG M, QIN C, LUO X, et al. Astrocytic connexin 43 potentiates myelin injury in ischemic white matter disease [J]. Theranostics, 2019, 9(15):4474-4493.
- [47] 高兴,向涛. 双侧颈总动脉结扎建立大鼠慢性脑缺血模型方法的改良[J]. 武汉大学学报:医学版,2020,41(5):836-838.

[责任编辑 孙丛丛]