

## 参麻益智方对慢性脑缺血致血管性认知障碍大鼠 学习记忆功能的干预作用

孙成成<sup>1,2</sup>, 刘剑刚<sup>1,3</sup>, 刘美霞<sup>1,3</sup>, 罗增刚<sup>3,4\*</sup>, 李浩<sup>1,3\*</sup>

(1. 中国中医科学院西苑医院, 北京 100091; 2. 中国中医科学院研究生院, 北京 100700;  
3. 中国中医科学院老年病研究所, 北京 100091; 4. 北京市中医药管理局, 北京 100053)

**[摘要]** **目的:**观察参麻益智方对双侧颈总动脉结扎造成慢性脑缺血致血管性认知障碍模型大鼠的学习记忆能力和血清炎症因子及氧化应激相关指标的影响。**方法:**SPF级SD大鼠,采用双侧颈总动脉结扎法制备慢性脑缺血模型,手术成功后筛选认知障碍的大鼠按随机数字表法分成5组,模型组、盐酸多奈哌齐组(0.45 mg·kg<sup>-1</sup>),参麻益智方低、中、高剂量组(2.97, 5.94, 11.88 g·kg<sup>-1</sup>),另设假手术组,每组10只。给药方式为灌胃,其中模型组和假手术组给予等体积纯净水灌胃,连续灌胃8周后进行相关指标检测。采用Morris水迷宫实验进行大鼠学习记忆功能检测;苏木素-伊红(HE)染色观察海马CA1区病理形态学改变;比色法检测血清中乙酰胆碱(Ach),乙酰胆碱酯酶(AChE)含量;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠血清炎症因子白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )含量;比色法检测谷胱甘肽(GSH),超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)含量;非酶促免疫法检测谷胱甘肽过氧化物还原酶(GSH-Px)含量。**结果:**与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期均明显增加,寻台次数、穿越原平台次数、原平台象限游泳时间占总游泳时间百分比均明显减少( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), Ach, GSH, GSH-Px含量均明显减少, AChE, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MDA含量均明显增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );与模型组比较,参麻益智方低、中、高剂量组大鼠逃避潜伏期均显著减少,大鼠寻台次数、穿越原平台次数、原平台象限游泳时间占总游泳时间百分比均明显增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),参麻益智方中、高剂量组AChE含量显著减少( $P<0.01$ ),参麻益智方高剂量组大鼠血清Ach含量明显增加( $P<0.05$ ),大鼠血清IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MDA含量均明显减少( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), GSH, SOD, GSH-Px含量明显增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。**结论:**参麻益智方可改善双侧颈总动脉结扎引起慢性脑缺血致血管性认知障碍大鼠的学习记忆能力,并具有改善其海马的病理形态,保护神经元,增强胆碱能系统功能,抑制炎症反应,提高机体抗氧化能力。

**[关键词]** 参麻益智方; 双侧颈总动脉结扎; 血管性认知障碍; 炎症因子; 氧化应激

**[中图分类号]** R2-0;R289;R743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)19-0153-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201940

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200729.1527.002.html>

**[网络出版日期]** 2020-7-29 16:07

### Intervention of Shenma Yizhi Prescription on Learning and Memory in Rats with Vascular Cognitive Impairment Induced by Chronic Cerebral Ischemia

SUN Cheng-cheng<sup>1,2</sup>, LIU Jian-gang<sup>1,3</sup>, LIU Mei-xia<sup>1,3</sup>, LUO Zeng-gang<sup>3,4\*</sup>, LI Hao<sup>1,3\*</sup>

(1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;  
2. Graduate School of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;  
3. Institute of Geriatrics, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China;  
4. Beijing Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of Shenma Yizhi prescription (SMYZ) on learning and

**[收稿日期]** 20200215(019)

**[基金项目]** 北京市G20工程创新研究科技计划项目“十病十药”研发课题(Z171100001717016)

**[第一作者]** 孙成成,在读博士,从事中西医结合老年病的临床研究和基础研究,E-mail:925019777@qq.com

**[通信作者]** \*罗增刚,博士,研究员,博士生导师,从事中医老年病的临床和基础研究,E-mail:luozenggang@sina.com;

\*李浩,博士,教授,主任医师,从事中西医结合老年病的临床和基础研究,E-mail:xyhplihao1965@126.com

memory, inflammatory factors and oxidative stress related indexes of rats with chronic cerebral ischemia inducing vascular dementia caused by bilateral common carotid artery ligation. **Method:** The chronic cerebral ischemia model of SPF grade SD rats was prepared by bilateral common carotid artery ligation. After successful surgery, the rats with cognitive impairment were randomly divided into 5 groups, model, donepezil ( $0.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), SMYZ-low, medium and high dose ( $2.97, 5.94, 11.88 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), with 10 rats in each group, and 10 rats in sham operation group were established. Intra-gastric administration were given for 8 weeks respectively then followed Morris water maze test. The pathomorphological changes of hippocampus CA1 were observed. The serum levels of acetylcholine (ACh) and acetylcholinesterase (AChE) were detected, and the levels of inflammatory cytokines interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the serum of rats were detected. The contents of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase reductase (GSH-Px) were observed. **Result:** Compared with sham operation group, the escape latency increased significantly in the model group, and the frequency of platform search, the frequency of crossing the original platform and the percentage of swimming time in the original platform quadrant decreased significantly ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The contents of ACh and the contents of GSH and GSH-Px were significantly decreased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The contents of AChE, IL- $1\beta$  and TNF- $\alpha$  and the contents of MDA were significantly increased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). Compared with model group, the escape latency of rats in the low, medium and high dose groups of SMYZ prescription was significantly reduced ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The frequency of looking for a platform, the frequency of crossing the original platform and the percentage of swimming time in the original platform quadrant of the rats in the low, medium and high dose groups of SMYZ prescription increased significantly ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The content of AChE in high dose group were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), and the content of ACh in high dose group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), the rat serum IL- $1\beta$ , TNF- $\alpha$  levels and MDA content were significantly reduced ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). The GSH, SOD and GSH-Px levels were significantly increased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion:** SMYZ can improve the learning and memory ability of rats with vascular cognitive disorder caused by chronic cerebral ischemia caused by ligation of bilateral common carotid artery, bilateral common carotid artery ligation, improve the pathological morphology of hippocampal tissue, inhibit inflammatory response, improve cholinergic level and oxidative stress state.

**[Key words]** Shenma Yizhi prescription; bilateral common carotid artery ligation; vascular cognitive impairment; inflammatory factors; oxidative stress

血管性痴呆 (VaD) 是由血管系统因素导致的脑组织累积性损伤所致, 是一种获得性、慢性、进行性智力损害综合征, 其特征是记忆力和认知能力的逐渐受损<sup>[1]</sup>。VaD 被广泛认为是第二种最常见的痴呆类型, 仅次于阿尔茨海默病 (AD)<sup>[2]</sup>, 随着我国老龄化加剧, VaD 对社会和患者造成了极大负担。目前, VaD 的发病机制主要有慢性脑低灌注<sup>[3]</sup>、突触障碍<sup>[4]</sup>、髓磷脂丢失和轴突异常<sup>[5]</sup>、白质血管变化<sup>[6]</sup>、海马神经元丢失等<sup>[7]</sup>。血管性认知障碍 (VCI) 包含了血管源性认知损害由轻到重的整个发病过程, 其中血管病理学显著影响认知状况, 导致痴呆和认知障碍, 血流灌注不足/血管危险因素会增强记忆损害因素, 并加速记忆障碍的进展, 并对治疗结果产生负面影响<sup>[4]</sup>。由于血管性痴呆的治疗方法有限, 因此

临床上在血管性痴呆症治疗过程中主要是积极控制危险因素并预防中风复发<sup>[8]</sup>。中医用于治疗血管性认知障碍的复方主要有益精健脑汤、状元复土丹等, 但其组方成分复杂, 因此, 寻找一种组方成分简单、疗效确切且安全的中药组方治疗血管性痴呆疾病十分必要。

参麻益智方是中国中医科学院西苑医院治疗 VaD 的协定处方, 该方由人参片、天麻、鬼箭羽、川芎组成, 具有益气增智、活血化瘀、平肝潜阳的功效。课题组前期临床研究表明其有较好的临床疗效<sup>[9-10]</sup>, 能改善 VaD 病人的认知功能障碍, 课题组前期实验表明, 参麻益智方能有效改善 VaD 大鼠学习记忆能力<sup>[11]</sup>。本实验在前期基础上对参麻益智方的制剂方法进行了改良, 优化了制剂工艺, 为了进

一步验证药物的药理作用,采用双侧颈总动脉结扎(2VO)引起的慢性缺血致血管性认知障碍模型,观察大鼠学习记忆能力,海马CA1区病理形态,并对炎症因子、胆碱能水平及氧化应激因子指标进行多种药理效应观察,探讨其治疗血管性认知障碍的作用机制,为开发其临床应用提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 10周龄,SPF级,SD大鼠70只,雌雄各半,体质量200~220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0006。在屏障环境实验动物房适应性饲养,温度22~26℃,湿度40%~70%,自由摄食饮水,适应性喂养1周后进行实验研究。动物造模过程和实验过程遵循国家科技部《关于善待实验动物的指导性意见》和《北京市实验动物管理条例》相关伦理要求,并通过本院医学伦理委员会审批(批号2018XLC004-2)。

**1.2 药物** 参麻益智方由人参片、天麻、鬼箭羽、川芎(3:3:3:2)组成,由中国中医科学院西苑医院制剂室制备,北京市医院制剂(京药制备NO.字Z20200005000)。制备方法:人参片单煎,加水煎煮2次,分别为加12倍量水2 h,加10倍量水2 h,合并滤过备用。天麻、鬼箭羽、川芎饮片加水煎煮3次,分别为加2次10倍量水煎煮2 h,8倍量水煎煮1 h,合并滤过,滤液与人参片滤液合并,滤液浓缩至每1 g浸膏含生药2.44 g。盐酸多奈哌齐,每片5 mg,购自卫材药业有限公司,批号1702012。

**1.3 试剂** 乙酰胆碱酯酶(AChE),乙酰胆碱(Ach),谷胱甘肽过氧化物还原酶(GSH-Px),谷胱甘肽(GSH),丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20181022,20181025,20181010,20181110,20181110,20181111);肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(北京欣博盛生物科技有限公司,批号分别为20181112,20181110);苏木素-伊红(HE)染色液(上海化学试剂有限公司,批号46160)。

**1.4 仪器** ZS-001型Morris水迷宫(北京众实迪创公司);H-7500型透射电子显微镜(日本Hitachi公司);BH-2型生物显微镜(日本Olympus公司);Sorvall ST8R型高速冷冻离心机(德国Thermo Fisher公司);ASP200S型脱水机,EG1150型包埋机,RM2245型石蜡切片机(德国Leica公司);DR-200BS型自动酶标仪(无锡华卫德朗仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 造模** 根据文献方法进行改进<sup>[12]</sup>,10周龄SD大鼠,术前禁食12 h,以4%水合氯醛(9 mL·kg<sup>-1</sup>体质量)腹腔麻醉,仰卧固定并刮除颈部皮毛,碘伏消毒后纵行剪开颈部皮肤1.5~2 cm,钝性分离皮下组织及肌肉,暴露双侧颈总动脉,结扎、缝合伤口、保温饲养。假手术组仅钝性分离双侧颈总动脉,穿线不结扎。术后予青霉素4万U/只/天(肌注),抗感染,持续3 d,密切观察伤口愈合情况。造模2周后,进行Morris水迷宫实验,通过与假手术组比较,筛选认知障碍的大鼠。

**2.2 分组与给药** 水迷宫方法筛选认知障碍的50只大鼠,按体质量随机分为5组,分别为模型组,盐酸多奈哌齐组(0.45 mg·kg<sup>-1</sup>),参麻益智方低、中、高剂量组(2.97,5.94,11.88 g·kg<sup>-1</sup>),每组10只,动物给药剂量根据人的临床等效剂量,依据人和动物体表面积换算而来<sup>[13]</sup>,各组予等体积药物灌胃,1次/d。另设假手术组10只,给予等体积纯净水灌胃。连续灌胃8周,进行相关测试和指标检测。

**2.3 Morris水迷宫实验** 采用Morris水迷宫实验检测大鼠行为学,观察大鼠的空间学习能力和记忆能力。将水池等分为4个象限,平台放置在第四象限中心。注入清水,水温(21±2)℃为宜,以水位没过平台1 cm为度,加入适量墨汁,以平台隐藏为宜。定位航行实验:每天在固定时间段训练大鼠2次,任意选择2个不同入水点入水(遵循随机原则),将大鼠头朝下面向池壁从入水点轻放入水中,并同时记录大鼠从入水开始到寻找并爬上平台的时间(此时间为逃避潜伏期)及游泳距离,连续训练4 d。空间探索实验:于定位航行实验结束24 h后进行,撤走平台,记录大鼠的第四象限活动时间及穿越原平台次数,以原平台象限游泳时间占总游泳时间百分比、穿越原平台次数作为评价大鼠学习记忆能力的指标。以第5天逃避潜伏期、寻台次数作为测定大鼠学习记忆能力的指标。

**2.4 脑组织样品处理** Morris水迷宫实验结束后,在大鼠禁食12 h后,于次日麻醉后(4%水合氯醛溶液,0.9 mL·kg<sup>-1</sup>体质量)进行腹主动脉采血并分离血清,以4℃,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,用于相关指标检测。快速并完整取出脑组织并随机分组。每组取6只大鼠的半脑组织置于4%中性多聚甲醛溶液中,另外6只大鼠的半脑组织置于锡纸保存于液氮中备用。

**2.5 HE染色观察大鼠脑组织病理形态学改变** 脑

组织固定后,依次经过脱水、透明、浸埋、切片、脱蜡、水化等处理程序,然后进行HE染色并封片,以用于显微镜下观察。

**2.6 比色法检测 AChE 和 Ach 水平** 取置于液氮冻存的大鼠脑组织,恢复常温,称取 100 mg 放置 2 mL 生理盐水中,碎冰上进行组织匀浆,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min 取上清,采用比色法进行检测,严格按照试剂盒说明书进行操作。

**2.7 ELISA 检测血清 TNF-α 和 IL-1β 含量** 分别设空白孔、待测样品孔,其中空白孔不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同。先在待测样品孔中加入样品稀释液 40 μL,然后再加入待测样品 10 μL,轻轻晃动混匀。37 °C 温育 30 min,配液、洗涤,除空白孔外各孔加酶标试剂 50 μL,温育、洗涤、显色、终止,450 nm 波长处测定各孔的吸光度 A。

**2.8 比色法测定 GSH, MDA, SOD 水平, 非酶促免疫法测定 GSH-Px 水平** 将 GSH 抗体包被微孔板制成固相抗体,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,换算成 GSH 的含量;过氧化脂质降解产物中的 MDA 与硫代巴比妥酸(TBA)缩合形成红色降解产物,在 532 nm 处为最大吸收峰换算成 MDA 浓度;邻苯三酚可发生自氧化反应,生成超氧阴离子自由基,换

算成 SOD 的含量值;纯化的 GSH-Px 抗原包被微孔板,制成固相抗原,洗涤后利用底物 TMB 显色,经过 HRP 酶的催化作用转化成蓝色,在酶标仪 450 nm 波长下测定吸光度 A。

**2.9 统计学处理** 采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,进行正态性检验和方差齐性检验,方差齐时采用单因素方差分析,方差不齐采用 Dunnett's T3 分析,组间多重比较采用 LSD 检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠行为学的影响** 定位航行实验中,与假手术组比较,模型组逃避潜伏期明显增加( $P < 0.05$ ),寻台次数显著减少( $P < 0.01$ );与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和参麻益智方低、中、高剂量组逃避潜伏期均明显减少( $P < 0.05$ ),盐酸多奈哌齐组和参麻益智方各剂量组寻台次数均明显增加( $P < 0.05, P < 0.01$ )。空间探索实验中,与假手术组比较,模型组原平台象限游泳时间占总游泳时间百分比、穿越原平台次数均显著减少( $P < 0.01$ );与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和参麻益智方低、中、高剂量组原平台象限游泳时间占总游泳时间百分比、穿越原平台次数均明显增加( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 参麻益智方对 VCI 模型大鼠定位航行及空间探索的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 1 Effect of Shenma Yizhi prescription on localization navigation and spatial exploration in VCI model rats( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	逃避潜伏期/s	寻台次数/次	穿越原平台次数/次	原平台象限游泳时间占总游泳时间百分比/%
假手术	-	30.87±15.82	3.60±1.27	7.30±3.20	29.31±4.87
模型	-	48.42±20.19 <sup>1)</sup>	1.95±0.94 <sup>2)</sup>	2.70±2.36 <sup>2)</sup>	23.48±4.26 <sup>2)</sup>
多奈哌齐	4.5×10 <sup>-4</sup>	31.69±21.00 <sup>3)</sup>	3.35±1.14 <sup>4)</sup>	4.90±3.14 <sup>4)</sup>	32.43±4.82 <sup>4)</sup>
参麻益智方	2.97	31.98±16.50 <sup>3)</sup>	2.75±1.25 <sup>3)</sup>	4.40±3.27 <sup>4)</sup>	32.30±5.44 <sup>4)</sup>
	5.94	31.44±18.09 <sup>3)</sup>	2.75±0.85 <sup>3)</sup>	7.10±4.12 <sup>4)</sup>	31.96±3.05 <sup>4)</sup>
	11.88	31.14±14.68 <sup>3)</sup>	2.90±0.97 <sup>4)</sup>	7.00±2.26 <sup>4)</sup>	32.81±6.03 <sup>4)</sup>

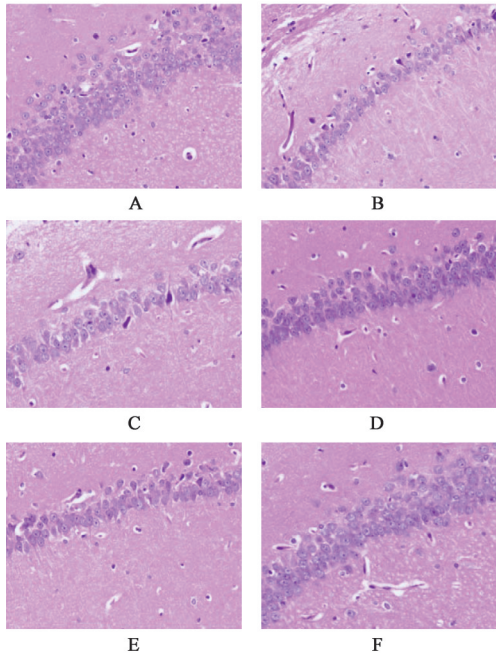
注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

**3.2 对大鼠病理形态学的影响** 光镜下显示,假手术组大鼠海马 CA1 区锥体细胞、颗粒细胞、神经元排列整齐、连接紧密,细胞膜显示清晰,细胞内结构较为完整,胞质丰富,核膜及核仁较为明显,未见神经元变性现象或坏死改变;模型组大鼠海马 CA1 区锥体细胞、颗粒细胞、神经元排列稀疏且散乱,细胞数量明显减少,细胞层次明显减低,且部分细胞可见空泡变性,有核固缩甚至坏死现象;盐酸多奈哌齐组,参麻益智方低、中、高组大鼠海马 CA1 区的以上细胞排列较模型组有一定好转,细胞数量有显著增加,且细胞结构较为完整,胞膜清晰,偶见细胞空

泡变性 & 坏死现象。见图 1。

**3.3 对大鼠脑组织神经递质 AChE, Ach 含量的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织神经递质 AChE 含量显著增多, Ach 含量显著减少( $P < 0.01$ );与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和参麻益智方中、高剂量组 AChE 含量明显减少( $P < 0.05, P < 0.01$ ), Ach 含量均明显增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2。

**3.4 对大鼠血清炎症因子 IL-1β, TNF-α 含量的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠血清 IL-1β, TNF-α 含量明显增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05, P <$



A.假手术组;B.模型组;C.多奈哌齐组;D.参麻益智方低剂量组;E.参麻益智方中剂量组;F.参麻益智方高剂量组

图1 参麻益智方对大鼠海马CA1区病理形态的影响(HE,×100)  
Fig. 1 Effect of Shenma Yizhi prescription on pathological morphology in CA1 hippocampus of rats (HE,×100)

0.01);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和参麻益智方各剂量组IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 含量均明显减少,差异具有统计学意义( $P<0.05,P<0.01$ )。见表3。

**3.5 对大鼠血清GSH,MDA,SOD,GSH-Px水平的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠血清GSH,GSH-Px水平明显减少,MDA水平明显增加( $P<0.05$ ,

表4 参麻益智方对大鼠血清GSH,MDA,SOD,GSH-Px水平的影响( $\bar{x}\pm s,n=10$ )

Table 4 Effect of Shenma Yizhi prescription on serum GSH,MDA,SOD,GSH-Px expression in rats( $\bar{x}\pm s,n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	GSH/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	GSH-Px/U·mL <sup>-1</sup>
假手术	-	6.62±2.00	3.86±0.86	63.33±16.52	733.23±114.78
模型	-	5.09±0.75 <sup>1)</sup>	5.86±0.42 <sup>2)</sup>	51.35±12.99	644.26±76.49 <sup>2)</sup>
多奈哌齐	4.5×10 <sup>-4</sup>	6.58±1.60 <sup>3)</sup>	5.09±0.96	65.14±16.13	683.65±31.62
参麻益智方	2.97	6.35±1.03	4.98±1.19 <sup>3)</sup>	64.11±15.64	687.82±32.41
	5.94	7.63±1.84 <sup>4)</sup>	4.67±1.17 <sup>4)</sup>	68.30±19.42 <sup>3)</sup>	699.59±36.70
	11.88	8.01±1.49 <sup>4)</sup>	4.52±0.61 <sup>4)</sup>	72.11±15.64 <sup>4)</sup>	714.64±36.97 <sup>3)</sup>

#### 4 讨论

慢性脑灌注不足诱发认知障碍,是VaD的主要危险因素<sup>[14]</sup>。双侧颈总动脉永久性结扎模型是慢性脑缺血较为经典的模型,因其能较好地模拟人慢性脑血流灌注不足造成的脑组织处于低灌注和低氧状态,特别是与认知功能有关的大脑脆弱结构如海马、皮层等容易发生氧化应激损伤,神经元损伤和中

表2 参麻益智方对大鼠脑组织神经递质AChE,Ach含量的影响( $\bar{x}\pm s,n=10$ )

Table 2 Effect of Shenma Yizhi prescription on AChE, Ach expression in neurotransmitters in brain tissue of rats( $\bar{x}\pm s,n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Ach/mg·L <sup>-1</sup>	AChE/U·L <sup>-1</sup>
假手术	-	331.96±98.61	47.58±12.14
模型	-	199.52±79.2 <sup>2)</sup>	58.56±6.58 <sup>2)</sup>
多奈哌齐	4.5×10 <sup>-4</sup>	285.77±81.04 <sup>3)</sup>	49.22±8.03 <sup>3)</sup>
参麻益智方	2.97	277.14±102.6	49.54±12.26 <sup>3)</sup>
	5.94	283.81±115.78	48.33±9.89 <sup>4)</sup>
	11.88	285.76±93.46 <sup>3)</sup>	48.33±9.31 <sup>4)</sup>

表3 参麻益智方对大鼠血清炎症因子IL-1 $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 含量的影响( $\bar{x}\pm s,n=10$ )

Table 3 Effect of Shenma Yizhi prescription on serum IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  expression in rats( $\bar{x}\pm s,n=10$ ) ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
假手术	-	27.20±9.17	54.49±13.78
模型	-	40.01±10.32 <sup>2)</sup>	74.49±14.76 <sup>2)</sup>
多奈哌齐	4.5×10 <sup>-4</sup>	26.98±4.02 <sup>4)</sup>	61.66±11.75 <sup>3)</sup>
参麻益智方	2.97	25.21±5.18 <sup>4)</sup>	58.16±12.00 <sup>4)</sup>
	5.94	24.10±4.47 <sup>4)</sup>	58.38±12.57 <sup>4)</sup>
	11.88	28.00±5.35 <sup>4)</sup>	59.21±10.70 <sup>4)</sup>

$P<0.01$ );与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和参麻益智方中、高剂量组GSH,GSH-Px水平明显增加,MDA水平明显减少( $P<0.05,P<0.01$ ),参麻益智方中、高剂量组SOD水平明显增加( $P<0.05,P<0.01$ )。见表4。

枢胆碱能障碍最终导致学习记忆和行为能力的损害,与慢性脑缺血的发生机制较为一致<sup>[15]</sup>。

Morris水迷宫试验是用于评估啮齿动物空间学习和记忆能力最常用的试验方法之一<sup>[16]</sup>,在定位航行实验中逃避潜伏期和寻台次数,在空间探索试验中穿越原平台次数、原平台象限游泳时间占总游泳时间百分比是较常用的指标。与模型组比较,盐酸

多奈哌齐组和参麻益智方各剂量组逃避潜伏期均显著减少、寻台次数均显著增加,盐酸多奈哌齐组和参麻益智方各剂量组原平台象限游泳时间占总游泳时间百分比、穿越原平台次数均显著增加,说明参麻益智方可以增强双侧颈总动脉结扎致血管性认知障碍大鼠的空间记忆能力和学习能力。

海马是神经科学中最重要的大脑结构,与记忆和空间认知密切相关<sup>[17]</sup>。海马CA1区是对缺血、缺氧最敏感的区域之一,其神经元过度活化可减少椎体神经元的活动,继而诱发记忆缺陷<sup>[18]</sup>。本实验结果表明,模型组大鼠的海马CA1区神经元排列层次减少,数量稀疏,部分细胞见空泡样变性,呈核固缩现象。参麻益智方对海马CA1区神经元排列有一定的改善作用,细胞层次及数量有明显增加,胞膜清晰,结构完整,偶见细胞变性,少有细胞坏死。

中枢神经系统的神经递质种类多样,其中胆碱类神经递质的合成和释放在维持大脑正常的学习和记忆方面有重要作用。ACh不仅在神经系统中充当神经递质,而且还充当神经调节剂,可影响突触传递,诱导突触可塑性,并协调神经元的放电<sup>[19]</sup>,在记忆功能中起重要作用<sup>[20]</sup>。本研究对大鼠血清中ACh的含量进行了检测,研究结果显示,参麻益智方可以提高大鼠血清中ACh的含量,提示参麻益智方对VCI大鼠学习记忆能力的改善可能是通过提高胆碱类神经递质ACh含量实现的。促炎细胞因子IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ,在机体免疫调节、炎症反应中发挥重要的作用。IL-1 $\beta$ 过量产生,可能会加剧神经炎症,增加神经元细胞死亡,并导致认知障碍的发病<sup>[21]</sup>。TNF- $\alpha$ 水平与认知能力下降,神经元毒性和脑细胞凋亡密切相关<sup>[22]</sup>。本实验结果表明,参麻益智方高、中、低剂量组IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 含量显著减少,说明参麻益智方可以有效抑制大鼠炎症反应,改善脑血管损伤,从而降低VaD发生风险。抗氧化及防御能力下降,可降低神经元的突触活性,影响神经传递功能,最终导致认知功能障碍<sup>[23]</sup>。GSH水平与氧化还原状态的稳态密切相关,氧化还原状态通过调节细胞凋亡直接影响疾病的发生。监测细胞内GSH水平的变化,有助于进行疾病早期诊断和评估治疗效果<sup>[24]</sup>。SOD是可将超氧化物自由基催化转化为过氧化氢,被称为抗氧化损伤的第一道防线<sup>[17]</sup>。GSH-Px在机体中直接或间接充当抗氧化剂<sup>[25]</sup>,同时作为机体的一种氧化应激指标,其含量的高低代表了机体抗氧化能力的强弱。MDA是脂质过氧化的产物,是公认的氧化应激的指标,能够与核酸和

蛋白质形成复合物<sup>[26]</sup>。其含量的高低代表了机体受自由基攻击后,组织损伤的严重程度。

因VaD具有可防治性,故其也称作“可逆性痴呆”,现代医学尚缺乏安全有效的治疗方法。中医药具有多方面的药效作用,具有一定的优势。参麻益智方中,人参片为君,功可大补元气、益智安神;以天麻为臣,既平肝阳,又息肝风,无论虚实,为治肝阳上亢之要药;瘀血内阻是血管性认知障碍的重要病机,鬼箭羽破血通络,合人参片祛瘀推陈生新;“血中之气药”川芎可通达气血,又能“上行头目”入脑窍,载引诸药直入本病病位之所在。诸药合用,共奏益智补虚、平肝潜阳、活血通络之效。本实验结果表明,模型组GSH, GSH-Px水平均显著减少,MDA水平显著增加。与模型组比较,参麻益智方中、高剂量组GSH, GSH-Px水平均显著增加,MDA水平显著减少, SOD含量均显著增加,表明参麻益智方能清除过多的氧自由基,减轻氧化应激损伤细胞,增强机体抗氧化能力。

综上所述,参麻益智方可改善双侧颈总动脉结扎致血管性认知障碍大鼠的学习记忆能力,作用机制可能与改善其海马的病理形态,保护神经元,增强胆碱能系统功能,抑制炎症反应,提高机体抗氧化能力有关。

#### [参考文献]

- [1] LIU D D, YUAN X, CHU S F, et al. CZ-7, a new derivative of Claulansine F, ameliorates 2VO-induced vascular dementia in rats through a Nrf2-mediated antioxidant responses [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 40:425-440.
- [2] DICHGANS M, LEYS D. Vascular cognitive impairment [J]. Circ Res, 2017, 3:573-591.
- [3] DAMODARAN T, MULLER C P, HASSAN Z. Chronic cerebral hypoperfusion-induced memory impairment and hippocampal long-term potentiation deficits are improved by cholinergic stimulation in rats [J]. Pharmacol Rep, 2019, 71(3):443-448.
- [4] SUN M K. Potential therapeutics for vascular cognitive impairment and dementia [J]. Curr Neuropharmacol, 2018, 7:1036-1044.
- [5] KALARIA R N. The pathology and pathophysiology of vascular dementia [J]. Neuropharmacology, 2018, 134:226-239.
- [6] HASE Y, DING R, HARRISON G, et al. White matter capillaries in vascular and neurodegenerative dementias [J]. Acta Neuropathol Commun, 2019,

- 7(1):16.
- [ 7 ] JIANG P, CHEN L, SUN J, et al. Chotosan ameliorates cognitive impairment and hippocampus neuronal loss in experimental vascular dementia via activating the Nrf2-mediated antioxidant pathway[J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 2:105-111.
- [ 8 ] OKAMOTO K, TANAKA M T, KONDO S. Treatment of vascular dementia [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 977:507-512.
- [ 9 ] 吴琼, 刘方, 刘剑刚, 等. 参麻益智方对轻中度血管性痴呆病人认知功能和血液流变性的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2017, 15(19):2381-2385.
- [ 10 ] 罗增刚, 周文泉, 高普, 等. 参麻益智胶囊治疗老年血管性痴呆的临床研究[J]. *中医杂志*, 2001, 42(8):470-473.
- [ 11 ] 曹宇, 刁雪梅, 李泽惠, 等. 参麻益智方对双侧颈动脉结扎大鼠海马认知功能的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(8):1151-1154.
- [ 12 ] ZHANG Y, LIU J, YANG B, et al. Ginkgo biloba extract inhibits astrocytic lipocalin-2 expression and alleviates neuroinflammatory injury via the JAK2/STAT3 pathway after ischemic brain stroke[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:518.
- [ 13 ] 谢秀琼, 主编. 中药新制剂开发与应用[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社, 2008:421-422.
- [ 14 ] CAO Y, LIANG L, XU J, et al. The effect of *Scutellaria baicalensis* stem-leaf flavonoids on spatial learning and memory in chronic cerebral ischemia-induced vascular dementia of rats [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2016, 48(5):437-446.
- [ 15 ] 孙成成, 刘剑刚, 刘美霞, 等. 慢性脑低灌注致血管性痴呆的病理机制和模型建立[J]. *神经药理学报*, 2019, 9(1):13-17.
- [ 16 ] GE J F, QI C C, QIAO J P, et al. Sex differences in ICR mice in the Morris water maze task [J]. *Physiol Res*, 2013, 62(1):107-117.
- [ 17 ] MAGUIRE E A, INTRAUB H, MULLALLY S L. Scenes, spaces, and memory traces: what does the hippocampus do? [J]. *Neuroscientist*, 2016, 22(5):432-439.
- [ 18 ] YU J Y, FANG P, WANG C, et al. Dorsal CA1 interneurons contribute to acute stress-induced spatial memory deficits [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 135:474-486.
- [ 19 ] PICCIOTTO M R, HIGLEY M J, MINEUR Y S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior [J]. *Neuron*, 2012, 76(1):116-129.
- [ 20 ] HAAM J, YAKEL J L. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function [J]. *J Neurochem*, 2017, 2:111-121.
- [ 21 ] DING H G, DENG Y Y, YANG R Q, et al. Hypercapnia induces IL-1beta overproduction via activation of NLRP3 inflammasome: implication in cognitive impairment in hypoxemic adult rats [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1):4.
- [ 22 ] PARK J C, HAN S H, MOOK-JUNG I. Peripheral inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease: a brief review[J]. *BMB Rep*, 2020, 53(1):10-19.
- [ 23 ] TONNIES E, TRUSSHINA E. Oxidative stress, synaptic dysfunction, and Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57(4):1105-1121.
- [ 24 ] QIN Y, FAN J, YANG W, et al. An endogenous Cys-assisted GSH@AgNCs-rGO nanoprobe for real-time monitoring of dynamic change in GSH levels regulated by natural drug [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(2):1988-1996.
- [ 25 ] LAN R, LI S, CHANG Q, et al. Chitosan oligosaccharides protect sprague dawley rats from cyclic heat stress by attenuation of oxidative and inflammation stress [J]. *Animals (Basel)*, 2019, 9(12):1074.
- [ 26 ] CUI X, GONG J, HAN H, et al. Relationship between free and total malondialdehyde, a well-established marker of oxidative stress, in various types of human biospecimens [J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10(5):3088-3097.

[责任编辑 孙丛丛]