

补阳还五汤对脑缺血再灌注大鼠恢复期突触可塑性的影响

杨开令, 周颖, 闫福曼, 周乐全, 刘玉莲, 刘微*

(广州中医药大学基础医学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:** 探讨补阳还五汤在脑缺血再灌注大鼠恢复期提高突触可塑性的机制研究。**方法:** 建立大脑中动脉栓塞(MCAO)大鼠模型, 随机分为假手术组、模型组、补阳还五汤组、补阳还五汤联合缝隙连接蛋白 43(Cx43)抑制剂(Gap26)组, 补阳还五汤每天灌胃 2 次($16 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Gap26 于术后第 3 天腹腔注射, 每天 1 次($25 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$); 7 d 后取材, 采用透射电镜观察缺血侧海马突触和缝隙连接超微结构的改变, 运用蛋白免疫印迹法(Western blot)和免疫荧光检测缺血侧海马突触素(SYN), 生长相关蛋白-43(GAP-43)的表达。**结果:** 电镜下观察到假手术组突触结构完整、清晰, 突触数量多, 缝隙连接结构清晰; 模型组缺血侧海马突触结构溶解, 突触数量减少, 缝隙连接消失, 存在较大间隙, 与假手术组比较, SYN, GAP-43 的表达明显增高($P < 0.05, P < 0.01$); 补阳还五汤组缺血侧海马突触结构较清晰, 突触数量增多, 缝隙连接结构较完整, 与模型组比较, SYN, GAP-43 的表达明显增强($P < 0.05, P < 0.01$); 而联合使用 Gap26 后缺血侧海马突触数量较补阳还五汤组减少, 仅可见少量结构完整的缝隙连接, 补阳还五汤增强 SYN, GAP-43 的作用被明显抑制($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:** 补阳还五汤可提高脑缺血再灌注恢复期缺血侧海马突触可塑性, 其机制可能与增加 Cx43 的表达促进对 SYN, GAP-43 的干预有关。

[关键词] 补阳还五汤; 脑缺血再灌注; 缝隙连接蛋白 43(Cx43); 突触结构可塑性; 海马突触素(SYN); 生长相关蛋白-43(GAP-43)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)01-0043-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192201

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190807.1341.003.html>

[网络出版时间] 2019-08-07 15:23

Effect of Buyang Huanwu Tang on Synaptic Structural Plasticity After Cerebral Ischemia-reperfusion in Rats

YANG Kai-ling, ZHOU Ying, YAN Fu-man, ZHOU Le-quan, LIU Yu-lian, LIU Wei*

(School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of Buyang Huanwu Tang (BYHWT) in improving synaptic structural plasticity after cerebral ischemia-reperfusion in rats. **Method:** Middle cerebral artery occlusion and reperfusion model was established. SD rats were randomly divided into sham-operated group, model group, BYHWT group, BYHWT + Gap26 (connexin43 inhibitor) groups. BYHWT was given twice a day ($16 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), Gap26 was intraperitoneally injected once a day since the third day after surgery ($25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Brain was taken out at the 7th day. The changes of neuronal synaptic and gap junction ultrastructure were observed by transmission electron microscopy. Synaptophysin (SYN) and growth-associated protein-43 (GAP-43) protein expression were detected by Western blot and immunofluorescence. **Result:** The structure of synapses was integrated, and the gap junctions were clear in sham-operated group. In the hippocampus of model group, the structure was destroyed, and the gap junctions disappeared. Compared with the sham-operated group, model group up-regulated the expressions of SYN and GAP-43 ($P < 0.05, P < 0.01$). In the hippocampus of BYHWT group, the structure was close to the

[收稿日期] 20190415(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673772); 广州中医药大学“青年英才培养工程”项目(QNYC20170102)

[第一作者] 杨开令, 在读硕士, 从事中医药防治心脑血管疾病的研究, E-mail: 2685453254@qq.com

[通信作者] * 刘微, 博士, 教授, 从事中医药防治心脑血管疾病的研究, E-mail: weiliu1980@yahoo.com

normal. Furthermore, BYHWT up-regulated the expressions of SYN and GAP-43 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). However, after the combined administration with Cx43 inhibitor (Gap26), the damage of synaptic structural decreased, only a small number of gap junctions with the structural integrity can be seen, and the effect of BYHWT on SYN and GAP-43 was inhibited ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** BYHWT could improve the hippocampal synaptic structural plasticity obviously after the CIRI. The mechanism may be related to the increase of the expression of Cx43 and the promotion of the intervention of SYN and GAP-43.

[Key words] Buyang Huanwu Tang; cerebral ischemia; connexin43 (Cx43); synaptic structural plasticity; synaptophysin (SYN); growth associated protein-43 (GAP-43)

脑卒中是我国第一大死亡病因,其中缺血性脑卒中最常见的类型,具有高发病率、高复发率、高致残率等特点。中医认为脑缺血是因气血逆乱,产生风、火、痰、瘀,致使脑络痹阻,气虚血瘀为其主要病机,故治疗原则应以益气活血为主。补阳还五汤是治疗脑缺血的代表方,具有补气活血化瘀通络之功,为清代名医王清任所创,出自《医林改错》,全方由黄芪、当归、川芎、赤芍、桃仁、红花和地龙组成^[1-3]。现代药理学研究已证明,补阳还五汤对脑缺血损伤后的修复作用与改善脑微循环,促进损伤后神经元修复等有关^[4-5]。

星形胶质细胞上广泛存在的缝隙连接蛋白 43 (Cx43)能传递细胞间的物质和信息,促进脑损伤后的修复。然而关于 Cx43 如何参与补阳还五汤治疗脑缺血的研究仍处于初级阶段,本课题之前的研究发现补阳还五汤可以在脑缺血恢复期增加 Cx43 的表达改善神经元形态促进神经功能恢复^[6-7]。神经功能的恢复还依赖于缺血侧海马突触可塑性发生变化,海马作为研究学习记忆功能的经典脑区,依据细胞形态等被划分为 4 个不同区域:CA1, CA2, CA3 和齿状回(DG)区。不同区域的功能不尽相同,尤其是 CA1, CA3, DG 区与突触有着密切联系。Cx43 的表达是否影响补阳还五汤提高缺血侧海马突触可塑性?本研究通过在脑缺血后第 3 天(恢复期)联合使用 Cx43 抑制剂 Gap26 干预 Cx43 的表达,通过透射电镜观察缺血侧海马突触和缝隙连接的超微结构,运用蛋白免疫印迹法(Western blot)分析影响海马突触可塑性蛋白的表达情况以及免疫荧光反映海马不同亚区间突触可塑性相关蛋白表达的差别。探讨 Cx43 介导补阳还五汤在脑缺血大鼠恢复期提高缺血侧海马突触可塑性的机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康成年 SD 雄性大鼠 100 只,体质量 250 ~ 300 g,由广州中医药大学实验动物中

心提供,合格证号 SCXK(粤)2013-0034。大鼠放置于安静环境下饲养,自由摄食和饮水。实验过程中动物的处置方法符合广州中医药大学动物伦理委员会规范。

1.2 药物与试剂 补阳还五汤煎药组成(1剂):黄芪 120 g,当归 6 g,赤芍 4.5 g,桃仁 3 g,红花 3 g,川芎 3 g,地龙 3 g(康美药业股份有限公司,批号分别为 161102571, 161110821, 161102821, 161109121, 161101211, 160908761, 160710671),以上中药饮片均由广州中医药大学药学院杜先华副教授鉴定符合 2015 年版《中国药典》规范。蒸馏水浸泡 2 h,煎煮 2 次,煎液浓缩成生药含量为 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$; Gap26(英国 Tocris 公司,货号 1950); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(英国 Abcam 公司,货号 ab8226);突触素(SYN),缝隙连接蛋白 43(GAP-43)抗体(美国 Millipore 公司,货号分别为 MABS29-C, MAB347);山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G 二抗,山羊抗兔 IgG 二抗(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab150113, ab150077);多聚甲醛(广州化学试剂厂,批号 20150101-1);抗体稀释液,进口羊血清工作液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 WK180317-1, WK180930);抗荧光衰减封片液(北京索莱宝科技有限公司,货号 S2100);Pierce BCA Protein Assay Kit(美国 Thermo 公司,货号 23225);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0012A)。

1.3 仪器 HT7700 型透射电镜(日本日立公司);BS210S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司);JX-2016 型匀浆仪(上海净信实业发展有限公司);Neofuge23R 型低温高速离心机(力康生物医疗科技控股有限公司);iMark 型多功能酶标仪,1645050 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Tanno5200 型全自动化学发光仪(上海天能科技有限公司);CM1860 型冰冻切片机(德国 Leica 公司);ZEISS.0 型激光共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备 本实验参照 Longa 方法^[8], 采用大脑中动脉栓塞(MCAO)法制备模型, 大鼠禁食 12 h 后用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 固定于手术台, 消毒后沿大鼠颈部正中线将皮肤切开, 顿性分离皮下组织和肌肉, 避开神经, 分离出左侧颈总(CCA), 颈外(ECA)和颈内动脉(ICA); 在 ECA 的游离残端剪小口, 将鱼线插进 ICA (20 ± 0.5) mm; 2 h 后将鱼线拔出至 ECA, ICA 分叉处, 使大脑重新供血, 形成再灌注后缝合伤口。大鼠清醒后参照 Longa 法对其进行神经行为评分: 0 分, 无神经病学征象; 1 分, 提尾时不能完全伸展病变对侧前肢; 2 分, 行走时向病变对侧旋转; 3 分, 向病变对侧跌倒; 4 分, 无自发活动及意识丧失。神经行为评分 1 ~ 3 分为成功模型。

2.2 分组与用药

2.2.1 分组 造模成功后的大鼠随机分为模型组、补阳还五汤组、补阳还五汤 + Gap26 组, 再另设假手术组, 每组 11 只大鼠。

2.2.2 给药 补阳还五汤组于术后清醒开始灌胃给药, 每日早晚各给药 1 次, 连续给药 7 d, 参照文献剂量 $16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[7]; Gap26 于术后第 3 天开始腹腔注射, 连续给药 5 d, 参照文献剂量 $25 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ^[9]; 假手术组与模型组用等量生理盐水作对照。

2.3 指标检测

2.3.1 电镜检测 术后第 7 天取材, 麻醉大鼠后用 4 °C 生理盐水和 4% 多聚甲醛心脏灌注固定, 取缺血侧海马组织 1 mm^3 大小的标本用 2.5% 戊二醛溶液固定, 磷酸盐缓冲液冲洗 3 次, 15 min/次, 将标本置入 1% 四氧化锇中固定 1 h。磷酸盐缓冲液冲洗 3 次, 15 min/次, 后再分别用浓度为 50%, 70%, 80%, 90% 的丙酮脱水 20 min, 包埋后在光镜下定位取材, 切片机将包埋块切成 70 nm 超薄切片, 用 2% 乙酸铀饱和水溶液和枸橼酸铅进行双重染色。透射电子显微镜下观察并摄片。

2.3.2 Western blot 检测缺血侧海马 SYN, GAP-43 蛋白表达 麻醉大鼠, 用 4 °C 生理盐水进行心脏灌注, 待从右心耳流出的液体颜色变清亮后迅速断头取脑, 在冰上分离出缺血侧海马, 加蛋白裂解液, 进行机械匀浆, 匀浆后 4 °C 条件下 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 离心后取上清液 BCA 蛋白定量。取适量蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 后转膜, 5% BSA 封闭 1 h; TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 加入一抗

(SYN 1 : 5 000, GAP-43 1 : 500, β -actin 1 : 5 000) 4 °C 孵育过夜, 吸弃一抗洗涤后加相应二抗 (1 : 5 000) 常温孵育 1 h, 吸弃二抗洗涤, ECL 显影, 化学发光仪收集图像。采用 Image J 软件分析条带灰度值, 以目标蛋白条带灰度值与 β -actin 的比值作为蛋白表达量。

2.3.3 免疫荧光检测缺血侧海马 CA1, CA3, DG 区 SYN, GAP-43 的表达 麻醉大鼠后用 4 °C 生理盐水和 4% 多聚甲醛心脏灌注固定, 取出大脑依次放入 15%, 30% 蔗糖溶液梯度脱水, 冰冻切片 (片厚 $10 \mu\text{m}$)。切片加 Tris 缓冲生理盐水 (TBS), 室温浸泡 30 min; TBS/triton 漂洗 2 次, 10 min/次; 山羊血清封闭 1 h 后, 加稀释后的混合一抗 (SYN 1 : 200, GAP-43 1 : 250) 4 °C 孵育过夜, TBS 浸泡 10 min, TBS/triton 漂洗 2 次, 10 min/次, 滴加相应荧光二抗 (1 : 200), 室温避光孵育 2 h; TBS 漂洗 3 次, 10 min/次, 抗荧光淬灭封片液封片。在激光共聚焦显微镜下选择缺血侧海马 CA1, CA3 和 DG 区进行观察拍照, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析图像, 计算出每个视野平均荧光强度。

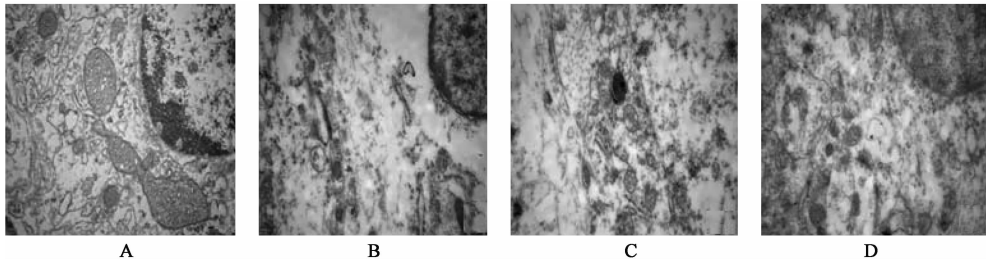
2.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 MCAO 大鼠缺血侧海马超微结构的影响 假手术组突触结构完整、清晰, 可见多个突触结构, 缝隙连接结构清晰; 模型组突触结构溶解, 突触数量减少, 缝隙连接消失, 存在较大间隙; 补阳还五汤组突触结构较清晰, 突触数量增多, 缝隙连接结构接近完整; 而补阳还五汤 + Gap26 组与补阳还五汤组比较突触数量减少, 可见少量结构完整的缝隙连接。见图 1。

3.2 对 MCAO 大鼠缺血侧海马 SYN 蛋白表达的影响 与假手术组比较, 模型组 SYN 的表达明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 补阳还五汤组 SYN 的表达显著增加 ($P < 0.01$); 与补阳还五汤组比较, 补阳还五汤 + Gap26 组 SYN 的表达显著降低 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 1。

3.3 对 MCAO 大鼠缺血侧海马 SYN 平均积分吸光度的影响 与假手术组比较, 模型组缺血侧海马 CA1, CA3 和 DG 区 SYN 的平均荧光强度明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 补阳还五汤组 SYN 的平均荧光强度显著增加 ($P < 0.01$); 与补阳



A. 假手术组; B. 模型组; C. 补阳还五汤组; D. 补阳还五汤 + Gap26 组 (图 2 ~ 5 同)
图 1 补阳还五汤对 MCAO 大鼠缺血侧海马超微结构的影响 (电镜扫描, $\times 4$ 万)

Fig. 1 Effect of BYHWT on ischemia side ultrastructure of hippocampus in MCAO rats (SEM, $\times 4$ 万)

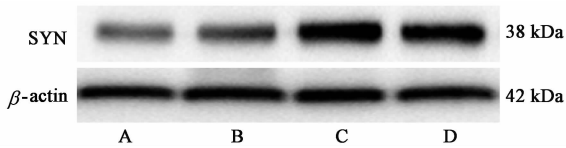


图 2 大鼠缺血侧海马 SYN 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of SYN protein expression in hippocampus after cerebral ischemia

表 1 补阳还五汤对 MCAO 大鼠缺血侧海马 SYN 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of Buyang Huanwu Tang (BYHWT) on SYN protein expression in hippocampus after cerebral ischemia in MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	SYN/ β -actin
假手术	-	0.35 \pm 0.04
模型	-	0.65 \pm 0.13 ¹⁾
补阳还五汤	16	1.47 \pm 0.03 ⁴⁾
补阳还五汤 + Gap26	16 + 2.5 $\times 10^{-5}$	0.78 \pm 0.11 ⁶⁾

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⁾ $P < 0.01$;与补阳还五汤组比较⁵⁾ $P < 0.05$, ⁶⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 4 同)。

还五汤组比较,补阳还五汤 + Gap26 组 SYN 的平均荧光强度明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);不同区 SYN 的平均荧光强度对比没有显著统计学差异。见图 3,表 2。

3.4 对 MCAO 大鼠缺血侧海马 GAP-43 蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组 GAP-43 的表达明显增加 ($P < 0.05$);与模型组比较,补阳还五汤组 GAP-43 的表达显著增加 ($P < 0.01$);与补阳还五汤组比较,补阳还五汤 + Gap26 组 GAP-43 的表达明显降低 ($P < 0.01$)。见图 4,表 3。

3.5 对 MCAO 大鼠缺血侧海马 GAP-43 平均积分吸光度的影响 与假手术组比较,模型组缺血侧海马 CA1, CA3 和 DG 区 GAP-43 的平均荧光强度明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,补阳还五

汤组 GAP-43 的平均荧光强度明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$);与补阳还五汤组比较,补阳还五汤 + Gap26 组 GAP-43 的平均积分吸光度明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);不同区 GAP-43 的平均积分吸光度对比没有显著统计学差异。见图 5,表 4。

4 讨论

星形胶质细胞作为中枢神经系统含量最丰富的细胞,在脑缺血的修复中扮演着重要的角色,其具有非常广泛的缝隙连接,可以通过缝隙连接实现细胞间的信息传递和物质运输^[10]。缝隙连接是细胞间的特殊跨膜通道,由相邻细胞膜上的两个半通道相互锚定组成,缝隙连接蛋白 Cx 是这两种通道的结构蛋白,Cx43 是 Cx 家族中数量最为丰富的成员,参与了中枢微环境维持,正常状态下 Cx43 半通道处于关闭状态,当机体产生应激反应,Cx43 半通道大量开放。在脑损伤恢复期,缺血周围区的营养物质可通过 Cx43 顺浓度差流向损伤的细胞内促进脑修复^[11-12]。脑缺血再灌注后大鼠的神经行为评分显著升高,给予补阳还五汤干预后能明显降低大鼠神经行为评分,促进神经功能恢复^[13]。前期研究也发现补阳还五汤可以改善大鼠的运动整合能力和空间记忆能力,其机制与增加 Cx43 的表达有关,而 Cx43 的表达增加可以形成更多的缝隙连接^[14],与本研究的电镜结果一致,脑缺血再灌注后脑内仅残留少量缝隙连接;补阳还五汤治疗减轻了缝隙连接结构的破坏,提示补阳还五汤可能是通过增加 Cx43 的表达促进缝隙连接的修复发挥神经保护作用。

脑缺血再灌注后提高缺血侧海马的突触可塑性对促进学习记忆能力的恢复、改善预后具有重要意义。突触可塑性主要体现在突触的数量和结构等方面^[15]。过去人们对突触可塑性的认识主要集中在神经元上,最近的研究发现星形胶质细胞可以通过释放化学递质调节突触可塑性,且突触结构参数的变化与星形胶质细胞上的 Cx43 变化密切相关^[16]。

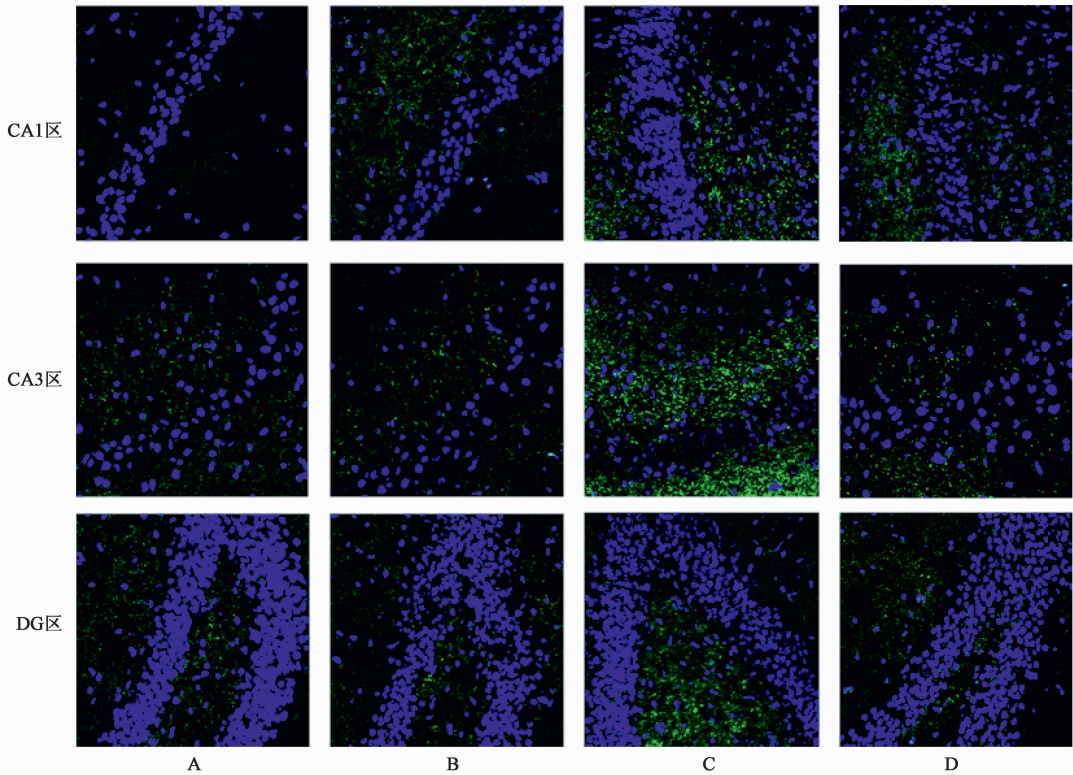


图 3 补阳还五汤对 MCAO 大鼠缺血侧海马 CA1, CA3, DG 区 SYN 表达的影响 (免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of BYHWT on SYN protein expression in ischemic hippocampal CA1, CA3, DG of MCAO rats (IF, $\times 200$)

表 2 补阳还五汤对大鼠缺血侧海马 CA1, CA3, DG 区 SYN 平均荧光强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of BYHWT on fluorescence intensity of SYN in ischemic hippocampal CA1, CA3, DG of MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CA1	CA3	DG
假手术	-	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01
模型	-	$0.06 \pm 0.03^{1)}$	$0.07 \pm 0.01^{1)}$	$0.06 \pm 0.01^{2)}$
补阳还五汤	16	$0.12 \pm 0.01^{4)}$	$0.13 \pm 0.02^{4)}$	$0.12 \pm 0.02^{4)}$
补阳还五汤 + Gap26	$16 + 2.5 \times 10^{-5}$	$0.09 \pm 0.02^{5)}$	$0.09 \pm 0.01^{6)}$	$0.07 \pm 0.01^{6)}$

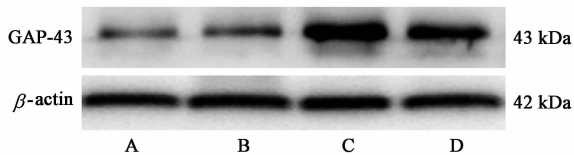


图 4 大鼠缺血侧海马 GAP-43 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of GAP-43 protein expression in hippocampus

表 3 补阳还五汤对 MCAO 大鼠缺血侧海马 GAP-43 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of BYHWT on GAP-43 protein expression in hippocampus after cerebral ischemia in MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	GAP-43/ β -actin
假手术	-	0.88 ± 0.10
模型	-	$1.20 \pm 0.10^{1)}$
补阳还五汤	16	$1.74 \pm 0.16^{4)}$
补阳还五汤 + Gap26	$16 + 2.5 \times 10^{-5}$	$0.70 \pm 0.03^{6)}$

本研究在给予补阳还五汤治疗的第 3 天 (恢复期) 开始联合使用 Gap26 干预, 目的是在脑损伤恢复期阻断 Cx43, 明确 Cx43 在补阳还五汤修复脑损伤中的作用, 电镜下观察到缺血侧海马突触结构受损, 补阳还五汤能改善突触结构受损情况, 而补阳还五汤 + Gap26 组修复突触结构效果不及补阳还五汤

组, 提示补阳还五汤可能通过 Cx43 提高海马突触可塑性。

影响突触可塑性的蛋白有多种, 其中 SYN 和 GAP-43 是与突触可塑性密切相关的两种蛋白, SYN

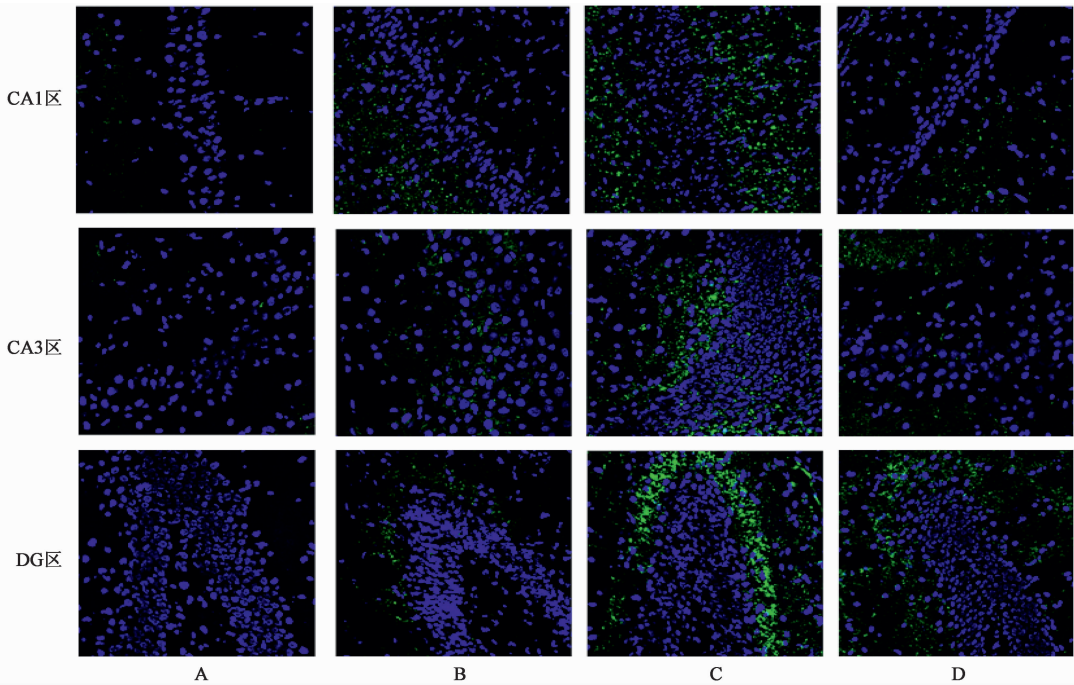


图 5 补阳还五汤对 MCAO 大鼠缺血侧海马 CA1, CA3, DG 区 GAP-43 表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 5 Effect of BYHWT on GAP-43 protein expression in ischemic hippocampal CA1, CA3, DG of MCAO rats (IF, ×200)

表 4 补阳还五汤对 MCAO 大鼠缺血侧海马 CA1, CA3, DG 区 GAP-43 平均荧光强度的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of BYHWT on fluorescence intensity of GAP-43 in ischemic hippocampal CA1, CA3, DG of MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CA1	CA3	DG
假手术	-	0.05 ± 0.05	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.03
模型	-	0.12 ± 0.06 ¹⁾	0.08 ± 0.03 ²⁾	0.07 ± 0.04 ¹⁾
补阳还五汤	16	0.20 ± 0.05 ³⁾	0.15 ± 0.04 ⁴⁾	0.21 ± 0.09 ⁴⁾
补阳还五汤 + Gap26	16 + 2.5 × 10 ⁻⁵	0.12 ± 0.04 ⁶⁾	0.08 ± 0.05 ⁵⁾	0.10 ± 0.05 ⁵⁾

是位于突触前囊泡膜上的钙结合糖酸性蛋白,参与了突触可塑性的调节和神经递质的释放, SYN 的定量与定位可反映突触的数量和分布,被作为突触重建的分子标记物^[17-18]。GAP-43 是位于神经元轴突末端的特异性磷蛋白,其表达与轴突的延伸生长和突触的形成密切同步,在突起发生阶段呈高度表达,是国际公认的神经元轴突再生分子标志物^[19-20],被作为研究神经可塑性的首选探针。脑缺血时缺血侧海马 SYN 和 GAP-43 的表达显著减少,恢复期伴随着轴突的出芽,形成新的突触,缺血侧海马 SYN 和 GAP-43 的表达逐渐增加,提示这 2 种蛋白参与了脑损伤后的突触重塑^[21]。本研究运用 Western blot 发现给予补阳还五汤治疗后在缺血侧海马可见这 2 种蛋白大量表达,而联合使用 Gap26 干预后表达明显下降,提示补阳还五汤可能通过介导 Cx43 干预 SYN 和 GAP-43 的表达。

海马中的基本神经联系是以 EC(内嗅皮层)-DG-CA3-CA1 的三突触联系回路为结构,但以往的研究很少同时涉及到海马 CA1, CA3, DG 区,本研究运用免疫荧光发现给予补阳还五汤治疗后在缺血侧海马 3 个区均可见 SYN 和 GAP-43 的平均荧光强度显著增加,虽然比较不同区 SYN 和 GAP-43 的平均荧光强度无明显统计学差异,但有研究指出海马各区对缺血的敏感性有很大差异,表现为海马 CA1 区对缺血性损伤十分敏感,CA3 区和 DG 区则对缺血性刺激相对耐受,可能是缺血性损伤在海马各亚区激活了不同的分子信号转导机制^[22]。海马各区对脑损伤后的修复调控机理比较复杂,本课题已展开研究。

综上所述,本研究证实补阳还五汤可以减轻脑缺血再灌注对海马突触结构的损伤,加快突触发生,提高突触可塑性。其机制可能与补阳还五汤增加

Cx43 的表达促进对 SYN, GAP-43 的干预有关。

[参考文献]

- [1] CHEN H J, SHEN Y C, SHIAO Y J, et al. Multiplex brain proteomic analysis revealed the molecular therapeutic effects of buyang huanwu decoction on cerebral ischemic stroke mice [J]. PLoS One, 2015, 10 (10): e0140823.
- [2] ZHANG W W, XU F, WANG D, et al. Buyang Huanwu Decoction ameliorates ischemic stroke by modulating multiple targets with multiple components: *in vitro* evidences [J]. Chin J Nat Med, 2018, 16 (3): 194-202.
- [3] 吴玉芙, 刘晓红, 郭伟成, 等. 补阳还五汤对气虚血瘀型脑梗死患者脑血管储备功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (12): 162-167.
- [4] YU P, GUAN L, ZHOU L, et al. Upregulation of glutamate metabolism by BYHWT in cultured astrocytes following oxygen-glucose deprivation/reoxygenation in part depends on the activation of p38 MAPK [J]. Exp Ther Med, 2017, 13 (6): 3089-3096.
- [5] LIU B, CAI G, YI J. Buyang Huanwu Decoction regulates neural stem cell behavior in ischemic brain [J]. Neural Regen Res, 2013, 8 (25): 2336-2342.
- [6] 丘敏, 曾维勇, 刘微, 等. 补阳还五汤对脑缺血再灌注后星形胶质细胞 connexin43 影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17 (5): 36-38.
- [7] 刘微, 郭建超, 苏宁, 等. 补阳还五汤通过缝隙连接蛋白 43 抗脑缺血损伤 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36 (9): 2068-2070.
- [8] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20 (1): 84-91.
- [9] 李晓静. 抑制缝隙连接蛋白 43 促进新生大鼠脑缺血损伤后神经功能的恢复 [D]. 苏州: 苏州大学, 2015.
- [10] Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, et al. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission [J]. Science, 2008, 322 (5907): 1551-1555.
- [11] Krysko D V, Leybaert L, Vandenabeele P. Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals [J]. Apoptosis, 2005, 10 (3): 459-469.
- [12] 朱丽萍. Cx43 及 Cx43-hemichannel 在大鼠全脑缺血再灌注损伤中的作用 [D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [13] 朱原, 蔡俊, 徐愉林, 等. 补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤大鼠 PTEN mRNA 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21 (23): 135-138.
- [14] 朱长良. 大鼠蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛后缝隙连接形态学检测 [D]. 南昌: 南昌大学, 2013.
- [15] Hoang S, Liauw J, Choi M, et al. Netrin-4 enhances angiogenesis and neurologic outcome after cerebral ischemia [J]. Cereb Blood Flow Metab, 2008, 29 (2): 385-397.
- [16] 罗燕. 针刺对脑缺血模型大鼠突触重建促进作用的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2009.
- [17] 杨丽, 徐利满, 朱晓丹, 等. 金芪降糖片对糖尿病引发的认知功能障碍的影响及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (1): 146-152.
- [18] 白鑫宇, 刘萍, 杨帆, 等. 补阴益智汤配方颗粒对东莨菪碱所致小鼠学习记忆损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (12): 138-144.
- [19] 郭敏, 李刚. 突触可塑性相关蛋白的研究进展 [J]. 神经药理学报, 2013, 3 (6): 57-64.
- [20] Smith S E, Figley S A, Schreyer D J. Protein-energy malnutrition developing after global brain ischemia induces an atypical acute-phase response and hinders expression of GAP-43 [J]. PLoS One, 2014, 9 (9): e107570.
- [21] WANG T, YU D R, HUANG J, et al. Multimodal rehabilitation program promotes motor function recovery of rats after ischemic stroke by upregulating expressions of GAP-43, SYN, HSP70, and C-MYC [J]. Stroke Cerebrovasc Dis, 2018, 27: 2829-2839.
- [22] 孙晓彩, 李力, 张敏, 等. Wistar 大鼠海马 CA1 区、CA3 区和齿状回区的解剖分割 [J]. 中国应用生理学杂志, 2012, 28 (2): 189-192.

[责任编辑 周冰冰]