

地黄饮子加减方对血管性痴呆模型大鼠学习记忆能力及海马 CA1 区神经元损伤的影响

周雨慧^{1,3}, 苗明三², 芦锰^{1,2}, 郭金栋^{1,3}, 武博文^{1,3},
李晓宁¹, 高维娟^{1,3}, 武密山^{1,3*}

(1. 河北中医学院 基础医学院 方剂学教研室, 石家庄 050200;

2. 河南中医药大学, 郑州 450046;

3. 河北省心脑血管病中医药防治研究重点实验室, 石家庄 050091)

[摘要] 目的: 观察地黄饮子加减方对血管性痴呆模型大鼠学习记忆能力及海马 CA1 区神经元的影响。方法: 将 84 只 SD 雄性大鼠, 按随机原则选出 12 只大鼠作为假手术组, 其余 72 只大鼠采用两血管阻断法制备血管性痴呆模型, 筛选 60 只模型大鼠, 每组 12 只, 随机分为模型组, 尼莫地平组 ($0.011 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 地黄饮子加减方高、中、低 ($4.54, 2.27, 1.14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 剂量组。连续灌胃 30 d 后, Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆能力, 苏木素-伊红 (HE) 观察海马 CA1 区神经元形态结构改变, 透射电镜观察海马 CA1 区神经元超微结构变化, 原位细胞凋亡检测法 (TUNEL) 检测海马 CA1 区细胞凋亡水平, 免疫组化 (IHC) 检测海马 CA1 区组织磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K), 蛋白激酶 B (Akt), 半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 表达水平。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠逃避潜伏期显著延长, 穿越原平台次数显著减少 ($P < 0.01$), 海马 CA1 区神经元形态均有不同程度地损伤, 凋亡率显著增加 ($P < 0.01$), PI3K, Akt 的积分吸光度和平均积分吸光度明显降低 ($P < 0.01$), Caspase-3 的积分吸光度和平均积分吸光度显著增高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠逃避潜伏期缩短 ($P < 0.05, P < 0.01$), 穿越原平台次数增加 ($P < 0.05, P < 0.01$), PI3K, Akt 的积分吸光度和平均积分吸光度值显著增高 ($P < 0.01$), Caspase-3 的积分光密度和平均积分吸光度不同程度降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: 地黄饮子加减方可改善血管性痴呆模型大鼠学习记忆能力和海马 CA1 区神经元损伤, 潜在机制可能与 PI3K/Akt 信号转导途径的激活, 抑制大鼠海马 CA1 区神经细胞的凋亡有关。

[关键词] 地黄饮子; 血管性痴呆; 神经元; 凋亡; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B

[中图分类号] R2-0; R289; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)08-0053-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200836

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200104.1351.002.html>

[网络出版时间] 2020-01-04 14:44

Effect of Modified Dihuang Yinzi on Learning and Memory Ability and Neuron Damage in Hippocampal CA1 Area in Rats with Vascular Dementia

ZHOU Yu-hui^{1,3}, MIAO Ming-san², LU Meng^{1,2}, GUO Jin-dong^{1,3}, WU Bo-wen^{1,3},
LI Xiao-ning¹, GAO Wei-juan^{1,3}, WU Mi-shan^{1,3*}

(1. Department of Formulaology, Basic Medicine College, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China;

2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

3. Hebei Key Laboratory of Chinese Medicine Research on Cardio-Cerebrovascular Disease, Shijiazhuang 050091, China)

[收稿日期] 20191017(020)

[基金项目] 河北省高等学校科学技术研究重点项目 (ZD2019129); 河北中医学院 2019 年校内科技能力提升重点项目 (KTZ2019017); 河北省心脑血管病中医药防治研究重点实验室开放课题项目

[第一作者] 周雨慧, 在读硕士, 从事中医药防治心脑血管病研究, E-mail: 826757706@qq.com

[通信作者] * 武密山, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治心脑血管病研究, E-mail: wumishan@163.com

[Abstract] Objective: To observe the effect of modified Dihuang Yinzi on the learning and memory ability and on the neurons in CA1 area of hippocampus of rats suffering from vascular dementia. **Method:** The 84 male SD rats were randomly selected to form the sham operation group of 12 rats, and the other 72 rats were chosen for the vascular dementia model by means of Bivascular occlusion, and among which 60 were chosen randomly into 6 groups of 12 rats, namely, the model group, the nimodipine group ($0.011 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and the high, medium and low dose modified Dihuang Yinzi ($4.54, 2.27, 1.14 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) respectively. After 30 days of continuous gavage, Morris water maze was used to detect the learning and memory ability of rats, hematoxylin eosin (HE) was used to observe the morphological changes of hippocampal CA1 neurons, transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructural changes of hippocampal CA1 neurons, TUNEL was used to detect the apoptosis level of hippocampal CA1 neurons, immunohistochemical (IHC) was used to detect the expression level of phosphatidylinositol-3 (PI3K), protein kinase B (Akt), Caspase-3 in hippocampal CA1 tissues. **Result:** Compared with sham operation group, the escape latency of the model group was significantly prolonged, the number of times of crossing the original platform was significantly reduced ($P < 0.01$), the neuronal morphology of hippocampal CA1 area was damaged to varying degrees, the apoptosis rate was significantly increased ($P < 0.01$), the integral optical density and average optical density of PI3K, Akt were significantly reduced ($P < 0.01$), and the integral optical density and average optical density of Caspase-3 were significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with model group, the escape latency was shortened ($P < 0.05, P < 0.01$), the number of crossing the original platform was increased ($P < 0.05, P < 0.01$), the integrated optical density and average optical density of PI3K and Akt were significantly increased ($P < 0.01$), and the integrated optical density and average optical density of Caspase-3 were decreased in different degrees ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Modified Dihuang Yinzi can improve the learning and memory ability of vascular dementia model rats and the damaged neurons in the hippocampal CA1 area. The potential mechanism may be related to the activation of PI3K/Akt signal transduction pathway and the inhibition of apoptosis of neurons in hippocampal CA1 area of rats.

[Key words] modified Dihuang Yinzi; vascular dementia; neurons; apoptosis; phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B

血管性痴呆(VD)是指涵盖一系列脑血管疾病引起认知障碍的临床和神经病理学表现的一组异质性病症^[1]。2018 年全世界受痴呆影响的人数约 5 000 万人,预计到 2050 年将增加 2 倍,费用也逐年增加,引起了各国的重视^[2]。目前认为 VD 的发病与神经元凋亡、炎症反应、胆碱系统紊乱、兴奋性氨基酸毒性等因素相互作用诱发神经元损伤有关^[3]。其中大量研究证实,细胞凋亡是诱发神经元损伤引起 VD 发病的分子机制之一,海马 CA1 区对缺血性损伤极为敏感,其在学习和记忆过程中也扮演着重要的角色^[4],因此抑制海马 CA1 区神经元凋亡成为防治 VD 研究的重要内容之一。西医目前对本病尚无理想的疗法和药物,而近年来中药复方通过多途径、多靶点、多层次、多系统的干预方式对 VD 的发病机制进行探讨,取得了显著的疗效,彰显了强大的优势^[5]。中医学认为肾虚血瘀痰阻是 VD 发生的病理基础,结合现代调查研究发现 VD 单一证候以肾虚证、痰浊证、瘀血证最为常见,夹杂证候以肾虚痰

瘀阻窍证最为常见,提示了中医药应重视补肾活血祛痰之法防治 VD^[6]。地黄饮子在治疗 VD 方面具有一定疗效,具有补肾开窍的功效^[7-9],但血管性痴呆多以肾精不足为本,痰瘀痹阻脑络为标,且现代人体质多以痰、瘀为主,故以地黄饮子为基础方,佐以化痰祛痰之品,既为治又为防。鉴于中药治疗是一种潜在的治疗方法具有多组分、多靶点的治疗特点,需要进一步研究以证实这种效率,因此,本研究采用双侧颈总动脉永久性结扎(2VO)制备 VD 大鼠模型,探讨地黄饮子加减方对其认知功能、神经损伤的作用及机制。

1 材料

1.1 动物 84 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 (190 ± 10) g,由山东省实验动物中心提供,许可证号 SYXK(豫)2015-0005。饲养环境温度 $23 \sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度 $40\% \sim 70\%$,12 h 明暗交替,自由饮水和进食。实验通过河南中医药大学动物伦理委员会标准审查。

1.2 药物 酸枣仁(批号 19040047),远志(批号 19020071),砂仁(批号 18080047),山药(批号 16090101),茯苓(批号 19030057),白术(批号 19020023)各 15 g,杜仲炭(批号 18040140),川牛膝(批号 18050078),当归(批号 19030124),肉豆蔻(批号 18030045),骨碎补(批号 18070163),生地黄(批号 19010215),白芍(批号 18080109)各 12 g,人参(批号 19020109),淫羊藿(批号 19020073),肉苁蓉(批号 18090076),肉桂(批号 18070136),石菖蒲(批号 19040071)各 10 g,金银花(批号 18110177) 9 g,升麻(批号 18080149),五味子(批号 19010151)各 8 g,牛蒡子(批号 18050062),炙甘草(批号 19020129)各 6 g,葛根(批号 18120101) 5 g,金樱子(批号 18070130) 4 g,由四川新绿色药业科技发展有限公司所生产中药配方颗粒组成,三七粉(批号 19026424) 5 g,由江阴天江药业有限公司生产,以上药物共同配伍组成地黄饮子加减方;尼莫地平片(郑州瑞康制药有限公司,国药准字 H41022175)。

1.3 试剂 磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)抗体(美国 Bioworld 公司,批号 CJ36131);蛋白激酶 B(Akt),半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为 00072788,00071929);原位细胞凋亡检测法(TUNEL)细胞凋亡检测程序(瑞士 Roche 公司,批号 30967400);兔二步法试剂盒, DAB 显色试剂盒,苏木素染色液,伊红染色液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 K182311G, K196721D, 19061002, 19061302);钼酸(美国 Ted Pella 公司,批号 4008-171812-060818)。

1.4 仪器 WMT-100Morris 型水迷宫(成都泰盟软件有限公司);Multifuge X3R 型高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技公司);JXFSTPRP-48 型全自动样品快速研磨仪(上海净信实验发展有限公司);SW. TFG-15 型生物安全柜(广州瑞智净化设备有限公司);CX31 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);KD-T 型摊烤片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);JEM-1400 型透射电镜(日本电子株式会社);RM2016 型切片机, EMUC7 型超薄切片机(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药 将 84 只雄性 SD 大鼠,按随机原则选出 12 只作为假手术组,仅分离双侧颈总动脉但不结扎,其余 72 只大鼠采用两血管阻断法^[10]制备血管性痴呆大鼠模型,剔除死亡及无明显症状老鼠,共筛选 60 只模型大鼠,随机分为模型组,

尼莫地平组,地黄饮子加减方高、中、低剂量组,每组 12 只。实验用量根据临床用量参照人与大鼠体表面积折算系数计算^[11],地黄饮子加减方高、中、低剂量组 4.54, 2.27, 1.14 g·kg⁻¹,尼莫地平组 0.011 g·kg⁻¹,假手术组和模型组给予生理盐水灌胃,每天 1 次,连续灌服 30 d。

2.2 样本处理及 Morris 水迷宫行为学检测 给药结束后每组随机选取 3 只 SD 大鼠断头处理,取大脑双侧海马 CA1 区组织^[12],置于 2.5% 戊二醛中固定,用于电镜检测。剩余大鼠进行 Morris 水迷宫检测,1~5 d 进行定位航行试验,训练时将大鼠从入水点(将 4 个象限的中点标记为入水点)面向池壁放入水中,迫使大鼠学习寻找设于水面以下的平台,每天训练 4 次(每个象限各 1 次),记录每次 90 s 内寻找平台所需时间,即逃避潜伏期,入水 90 s 内未找到平台位置的逃避潜伏期记录为 90 s。第 6 天进行空间探索实验,撤走平台,让大鼠按相同的方法在水池中寻找平台,记录 90 s 内大鼠穿梭原平台的次数。行为学检测结束后,将各组大鼠断头处死,取海马 CA1 区组织置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h,常规包埋,用于苏木素-伊红(HE)染色, TUNEL 及免疫组化检测。

2.3 HE 染色观察海马 CA1 区神经元形态结构改变 切片脱蜡、水化、染色、分化、蓝化、染色、脱水、透明、封片,显微镜下观察大鼠海马 CA1 区神经元形态结构改变。同时按照半定量标准对实验动物海马 CA1 区的病理改变进行测定,按以下标准:“-”神经元基本正常,层次排列整齐;“+”少数神经元形态改变,层次排列稍疏松;“++”部分神经元胞核固缩或溶解,层次排列疏松,间隙略增大;“+++”大部分神经元胞核固缩或溶解,层次排列紊乱,间隙增大。

2.4 透射电镜观察海马 CA1 区神经元超微结构变化 沿海马 CA1 区纵轴方向取 1 mm×1 mm×1 mm 脑组织,4℃ 4% 戊二醛中预固定 1 h,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,钼酸固定,PBS 重复清洗,行乙醇梯度脱水,置环氧丙烷和树脂 3:1,1:1,1:3 的混合液 30 min,1 h,2 h 后,后置于环氧树脂(包埋液)中过夜,用新的包埋液放于包埋板中移至梯度烤箱 35℃ 12 h,45℃ 12 h,60℃ 24 h。切片、染色、观察、拍照记录。

2.5 TUNEL 法检测海马 CA1 区细胞凋亡水平 切片常规脱蜡至水,32℃ 用蛋白酶 K 处理组织 20 min,PBS 冲洗,添加 TUNEL 反应混合液于标本上,加盖玻片在暗湿盒中 37℃ 反应 1 h,PBS 冲洗,

滴加转化剂于标本上,加盖玻片在暗湿盒中 37 ℃ 反应 30 min, PBS 漂洗,加 DAB 显色液,反应 1 min,显微镜观察至有阳性显色,立即终止显色, PBS 冲洗,苏木素复染,数秒后立即用自来水冲洗,常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,显微镜观察凋亡细胞、拍照,每组选取 5 个视野(×400)观察,阳性细胞(棕褐色)所占百分比即为细胞凋亡率。

2.6 免疫组化(IHC)检测海马 CA1 区 PI3K, Akt, Caspase-3 的表达 切片常规脱蜡至水,将切片放入柠檬酸修复液高压修复,待顶开气阀后修复 5 min,将高压锅放入自来水冷却至室温,蒸馏水洗,加入 3% 甲醇双氧水后,蒸馏水洗, PBS 浸泡,滴加一抗工作液(PI3K 1:75, Akt 1:100, Caspase-3 1:85)4 ℃ 过夜, PBS 漂洗,滴加二抗,37 ℃ 孵育, PBS 洗, DAB 显色,自来水漂洗,苏木素复染、分化、返蓝,脱水、透明、封片。依据阳性免疫反应的图象灰度选择合适的灰度分割阈值,实现双阈值分割,得到样品的半灰度目标图象,以人机交互方式测定阳性免疫染色强度及

面积。每组取 3 例,每例测 5 个海马 CA1 区的 400 倍视野,计算所测阳性反应物相对含量的灰度值及面积,由积分吸光度 IA 和平均积分吸光度 AA 表示。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析,计量资料使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布且方差齐,采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD 检验;方差不齐采用非参数检验统计,等级资料用 Riddit 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠行为学的影响 水迷定位航行实验:各组逃避潜伏期随着训练天数的增加均有不同程度地缩短,与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期显著延长($P < 0.01$),与模型组比较,各给药组大鼠逃避潜伏期明显改善($P < 0.05, P < 0.01$)。水迷宫空间探索中,与假手术组比较,模型组大鼠穿越有效区次数显著减少($P < 0.01$),与模型组比较,各给药组大鼠穿越有效区次数明显增多($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 地黄饮子加减方对血管性痴呆模型大鼠逃避潜伏期、穿越有效区次数的影响($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Table 1 Effect of modified Dihuang Yinzi on evading incubation period and crossing effective area in vascular dementia model rats($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	逃避潜伏期/s					穿越有效 区次数/次
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	
假手术	-	47.81 ± 9.47	27.34 ± 5.32	19.40 ± 3.29	18.18 ± 3.30	14.68 ± 2.19	6.92 ± 1.24
模型	-	69.89 ± 13.92 ²⁾	52.72 ± 8.73 ²⁾	44.19 ± 7.92 ²⁾	36.68 ± 6.81 ²⁾	29.45 ± 2.07 ²⁾	3.17 ± 0.28 ²⁾
尼莫地平	0.011	55.23 ± 7.74 ⁴⁾	36.45 ± 7.20 ⁴⁾	26.54 ± 3.96 ⁴⁾	22.56 ± 3.76 ⁴⁾	17.49 ± 4.33 ⁴⁾	4.97 ± 0.73 ⁴⁾
地黄饮子加减方	4.54	55.04 ± 10.99 ⁴⁾	35.05 ± 6.86 ⁴⁾	26.07 ± 5.13 ⁴⁾	29.91 ± 3.99 ⁴⁾	17.03 ± 3.33 ⁴⁾	4.50 ± 0.73 ⁴⁾
	2.27	57.33 ± 9.61 ⁴⁾	37.40 ± 7.38 ⁴⁾	29.68 ± 5.52 ⁴⁾	22.17 ± 4.13 ⁴⁾	20.66 ± 3.95 ⁴⁾	4.94 ± 0.90 ⁴⁾
	1.14	59.59 ± 11.34 ³⁾	42.09 ± 7.92 ⁴⁾	30.33 ± 6.01 ⁴⁾	23.25 ± 3.56 ⁴⁾	21.61 ± 4.17 ⁴⁾	4.00 ± 0.70 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 3,4 同)。

3.2 对大鼠海马 CA1 区神经元结构的影响 假手术组大鼠的海马 CA1 区结构正常,神经元排列整齐,形态完整,胞核与胞质界限清晰可见,无明显坏死。与假手术组比较,模型组海马 CA1 区神经元排列极其紊乱,间隙增大,形态不完整,胞质稀少,胞核深染、固缩,呈三角形或不规则形,核仁不明显。与模型组比较,各给药组海马 CA1 区整体组织损伤情况均有明显改善,神经元排列较为整齐,细胞形态结构较完整,胞质较均匀,胞核与胞质界限较清晰,少数细胞核深染、固缩,呈三角形或不规则形,核仁不明显。见图 1。按照半定量标准对实验各组海马 CA1 区组织进行测定,经 Riddit 检验,与假手术组比较,模型组大鼠海马 CA1 区组织出现显著的病理变

化,与模型组比较,各给药组显著改善脑组织的损伤。见表 2。

表 2 地黄饮子加减方对血管性痴呆模型大鼠海马 CA1 区组织形态的影响($n = 9$)

Table 2 Effect of modified Dihuang Yinzi on morphology of hippocampal CA1 area in vascular dementia rats($n = 9$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	-	+	++	+++
假手术	-	9	0	0	0
模型	-	0	1	3	5
尼莫地平	0.011	5	1	3	0
地黄饮子加减方	4.54	5	2	2	0
	2.27	4	2	3	0
	1.14	3	4	2	0

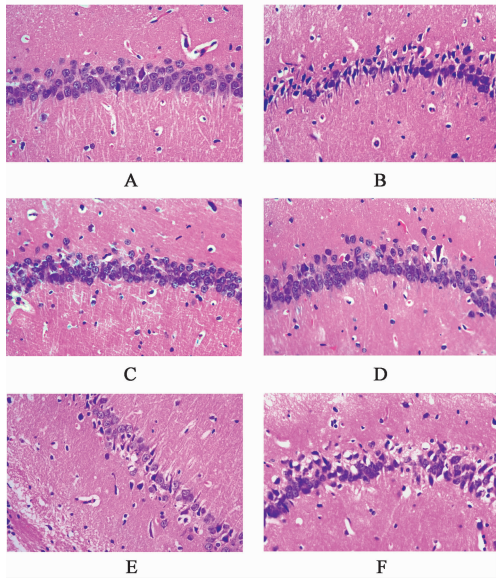


图 1 地黄饮子加减方对血管性痴呆模型大鼠海马 CA1 区神经元结构的影响(HE, $\times 400$)

A. 假手术组; B. 模型组; C. 尼莫地平组; D. 地黄饮子加减方高剂量组; E. 地黄饮子加减方中剂量组; F. 地黄饮子加减方低剂量组(图 2~6 同)

Fig. 1 Effect of modified Dihuang Yinzi on neuronal structure of hippocampal CA1 area in vascular dementia rats(HE, $\times 400$)

3.3 对大鼠海马 CA1 区神经元超微结构的影响

假手术组大鼠神经元形态正常, 细胞器形态结构正常完整, 数量丰富, 可见高尔基体, 粗面内质网整齐, 核糖体和糖原颗粒丰富, 线粒体清晰; 模型组神经元超微结构严重损害, 部分染色质溶解或凝集, 细胞器崩解、减少、甚至消失, 可见高尔基体扩张呈泡状, 粗面内质网扩张溶解, 表面核糖体解聚脱落, 线粒体畸形、肿胀, 甚至部分线粒体崎断裂、溶解透明成空泡; 各给药组神经元超微结构明显改善, 形态结构大致正常, 细胞膜及核膜光滑完整, 核仁形态结构较正常, 染色质分布较均匀, 细胞器较丰富, 偶见线粒体肿胀、空泡样变化尚未恢复正常, 少量粗面内质网肿胀, 神经元的损伤虽未完全恢复如假手术组, 但较模型组明显减轻且未见不可逆性损害; 地黄饮子加减方低剂量组相对其他给药组较差, 但较模型组有所改善。见图 2。

3.4 对大鼠海马 CA1 区神经元凋亡的影响 与假手术组比较, 模型组 CA1 区神经元凋亡率显著增多($P < 0.01$), 与模型组比较, 各给药组 CA1 区神经元凋亡率均显著减少($P < 0.01$)。见图 3, 表 3。

3.5 对大鼠海马 CA1 区 PI3K, Akt, Caspase-3 表达

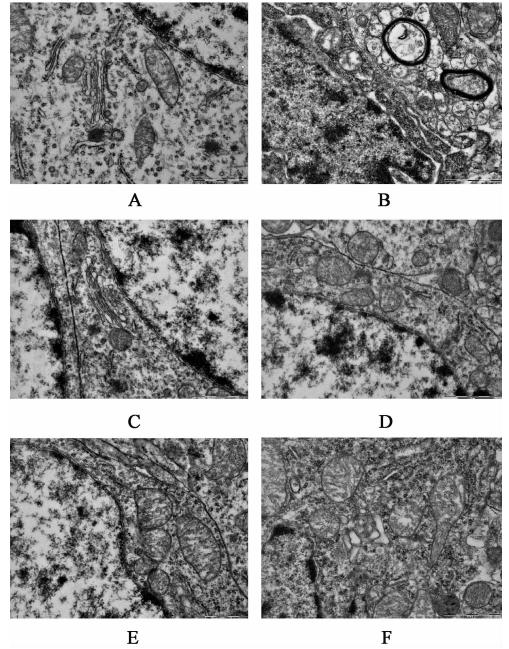


图 2 地黄饮子加减方对血管性痴呆模型大鼠海马 CA1 区神经元超微结构的影响(电镜扫描, $\times 3$ 万)

Fig. 2 Effect of modified Dihuang Yinzi on ultrastructure of hippocampal CA1 neurons in rats with vascular dementia (TEM, $\times 3$ 万)

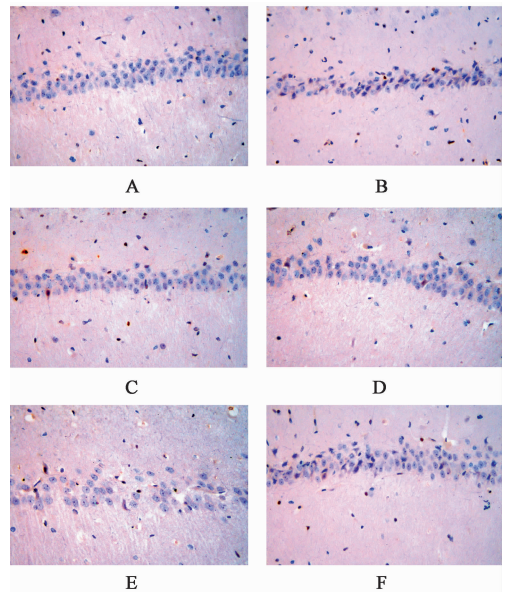


图 3 地黄饮子加减方对血管性痴呆模型大鼠海马 CA1 区神经元凋亡的影响(TUNEL, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of modified Dihuang Yinzi on neuron apoptosis in hippocampal CA1 area of vascular dementia model rats (TUNEL, $\times 400$)

的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠脑海马 PI3K, Akt 蛋白表达显著减少($P < 0.01$), Caspase-3 蛋白表达显著增高($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给

表 3 地黄饮子加减方对血管性痴呆模型大鼠海马 CA1 区神经元凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of modified Dihuang Yinzi on neuron apoptosis in hippocampal CA1 area of vascular dementia model rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	凋亡率/%
假手术	-	2.96 ± 0.88
模型	-	29.80 ± 1.01 ²⁾
尼莫地平	0.011	17.04 ± 1.00 ⁴⁾
地黄饮子加减方	4.54	7.10 ± 1.07 ⁴⁾
	2.27	21.57 ± 0.56 ⁴⁾
	1.14	26.77 ± 0.96 ⁴⁾

药组 PI3K, Akt 蛋白表达显著增高 ($P < 0.01$), Caspase-3 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 4~6, 表 4。

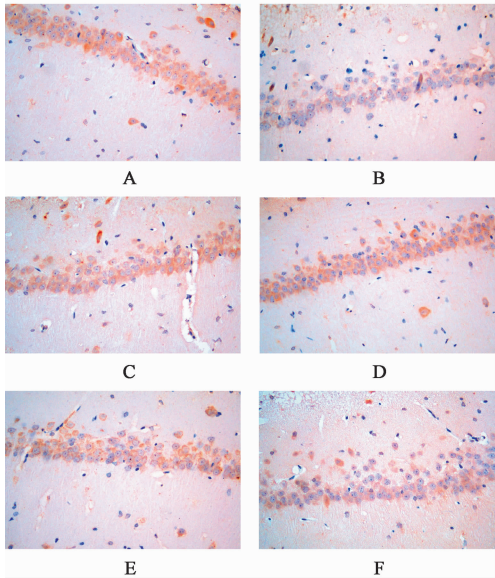


图 4 地黄饮子加减方对血管性痴呆模型大鼠海马 PI3K 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of modified Dihuang Yinzi on expression of PI3K protein in hippocampus of vascular dementia rats (IHC, ×400)

4 讨论

VD 属中医“呆病”“健忘”等范畴, 中医认为脑为髓海, 赖肾所藏之先天之精及五脏六腑之精的濡养, 肾为先天之本, 藏精、生髓, 其精气盛衰, 在生长壮老过程中起主导作用, 肾精渐亏, 复因饮食、情志等调摄失宜, 至内伤积损, 脏腑功能失调, 气血、津液运行受阻, 脏腑百骸渐失濡养, 痰瘀互结阻于脑络, 脑失所养, 则神明渐失所用, 灵机记忆性及渐丧失, 故本病的基本病机为肾精亏虚, 痰瘀阻络^[13]。调查也显示肾精亏虚证、痰浊阻窍证、瘀血阻络证在临床中

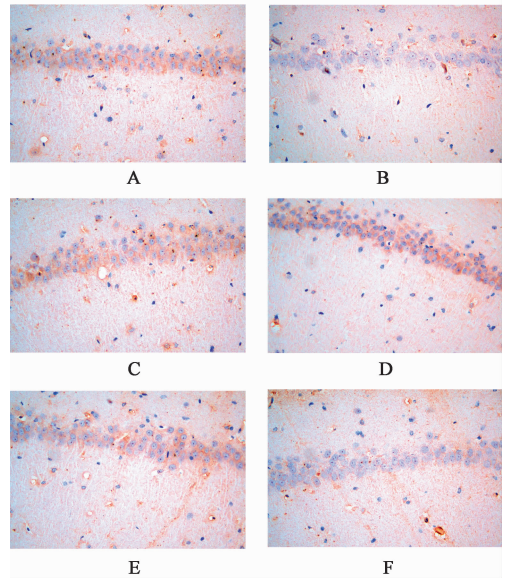


图 5 地黄饮子加减方对血管性痴呆模型大鼠海马 Akt 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 5 Effect of modified Dihuang Yinzi on Akt protein expression in hippocampus of vascular dementia rats (IHC, ×400)

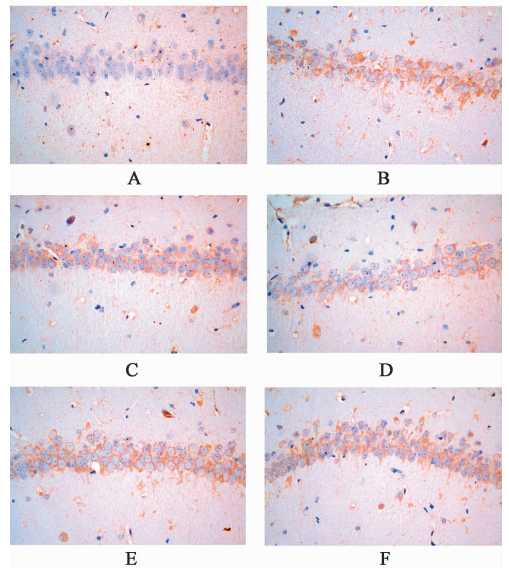


图 6 地黄饮子加减方对血管性痴呆模型大鼠海马 Caspase-3 蛋白表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 6 Effect of modified Dihuang Yinzi on Caspase-3 protein expression in hippocampus of vascular dementia rats (IHC, ×400)

最为常见^[14-15]。地黄饮子具有补肾开窍化痰的功效, 临床治疗 VD 多获良效, 其具有补肾益智、化痰祛瘀、改善记忆力的功效。故本实验采用两血管阻断法制备 VD 大鼠模型, 观察地黄饮子加减方对慢性低灌注大鼠行为学及海马 CA1 区神经元凋亡的影响, 探讨 PI3K/Akt 信号转导途径是否参与了神经保护作用。

表 4 地黄饮子加减方对血管性痴呆模型大鼠海马 PI3K, Akt, Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of modified Dihuang Yinzi on expression of PI3K, Akt, Caspase-3 protein in hippocampus of vascular dementia rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	PI3K		Akt		Caspase-3	
		IA	AA	IA	AA	IA	AA
假手术 模型	-	334.07 ± 2.48	0.049 7 ± 0.003 3	303.94 ± 2.89	0.051 9 ± 0.004 0	183.89 ± 2.53	0.029 0 ± 0.003 3
尼莫地平	0.011	159.60 ± 1.03 ²⁾	0.025 6 ± 0.005 5 ²⁾	49.62 ± 3.10 ²⁾	0.023 7 ± 0.004 5 ²⁾	335.77 ± 2.34 ²⁾	0.051 9 ± 0.002 0 ²⁾
地黄饮子加减方	4.54	311.29 ± 2.36 ⁴⁾	0.048 9 ± 0.003 1 ⁴⁾	272.21 ± 2.93 ⁴⁾	0.044 5 ± 0.004 8 ⁴⁾	252.98 ± 1.78 ⁴⁾	0.049 0 ± 0.003 1 ⁴⁾
	2.27	323.35 ± 2.22 ⁴⁾	0.049 1 ± 0.004 3 ⁴⁾	282.24 ± 2.70 ⁴⁾	0.051 1 ± 0.004 6 ⁴⁾	223.41 ± 2.96 ⁴⁾	0.048 3 ± 0.003 3 ⁴⁾
	1.14	276.14 ± 2.12 ⁴⁾	0.047 7 ± 0.004 3 ⁴⁾	181.85 ± 2.38 ⁴⁾	0.042 0 ± 0.005 0 ⁴⁾	297.68 ± 2.98 ⁴⁾	0.049 7 ± 0.003 2 ³⁾
		264.53 ± 1.64 ⁴⁾	0.047 2 ± 0.003 0 ⁴⁾	93.46 ± 3.08 ⁴⁾	0.024 6 ± 0.002 7 ⁴⁾	313.84 ± 1.53 ⁴⁾	0.049 8 ± 0.002 7 ³⁾

海马是大脑记忆形成、组织和存储过程中的关键部位,其中海马 CA1 区对缺血缺氧最为敏感,特别是 CA1 区神经元,极易受到缺血性损伤^[16-18]。在慢性脑低灌注的情况下,脑组织血流降低和代谢异常,会导致脑海马区缺血、缺氧,诱发细胞凋亡引起神经元损伤,且呈阶梯趋势加重,其中海马 CA1 区神经元损伤与认知功能障碍密切相关^[19-22]。2-VO 法是较理想的制备 VD 模型方法,可有效复制永久性慢性灌注不足诱发的 VD 大鼠模型,引起与记忆相关的大鼠脑海马组织损害,适用于 VD 的发病机制和药物疗效评价研究^[10,23]。因此,本研究采用 2VO 法制备 VD 模型, Morris 水迷宫实验检测 VD 大鼠学习记忆能力并观察海马 CA1 区损伤情况来评价其认知功能。

慢性脑低灌注被认为是 VD 等神经退行性疾病的诱因之一,但其基本的神经生物学机制知之尚少。目前有研究认为慢性脑低灌注可通过凋亡、自噬、神经递质紊乱、神经炎症反应等机制,使神经元发生迟发性坏死,从而导致神经退行性改变及认知功能障碍^[24-27]。其中细胞凋亡是缺血缺氧过程中神经元损伤的一种重要形式,在 VD 发生、发展中起重要作用,VD 大鼠海马 CA1 区神经元的大量凋亡丢失可能是 VD 发生发展的病理基础,若神经细胞凋亡受到明显抑制,则 VD 的发生可被延迟或逆转^[28-31]。相关研究也证实^[32],通过调节 VD 大鼠神经元的凋亡,可有效缓解 VD 引起的神经元损伤,提高其认知能力。细胞凋亡的发生与神经元内多种与凋亡有关的基因或蛋白酶激活的有关, Caspase-3 是级联瀑布反应下游中执行神经元凋亡的核心蛋白酶,多种凋亡因子都通过 Caspase-3 发挥作用而引起细胞不可逆的凋亡^[33-34]。研究表明,活化的 Caspase-3 切割蛋白质,加快聚(ADP-核糖)聚合酶-1 的裂解,加速

神经细胞 DNA 损伤修复的能量消耗,进而促进神经元凋亡,加重认知障碍^[35]。

PI3K/Akt 信号转导途径是一个经典抗凋亡、促存活的信号转导途径,参与脑海马神经元损伤过程,故也是调节大脑认知功能的关键信号通路之一^[36-37]。PI3K 是一种重要的抗凋亡细胞因子,PI3K 激活后可引发下游脂质底物磷酸化,激活 Akt,激活后的 Akt 可以磷酸化下游蛋白,如灭活 Bad,糖原合成酶激酶 3 (GSK3) 等底物或活化核转录因子- κ B (NF- κ B) 等抗凋亡蛋白而发挥抑制细胞凋亡的作用,并调控脑缺血缺氧后线粒体凋亡机制,也可以促进新生神经细胞的迁移和存活^[39-42]。大量研究也表明,PI3K/Akt 信号通路的激活能够改善慢性低灌注 VD 模型神经功能,减少促凋亡因子的表达,抑制神经细胞凋亡,改善神经元损伤,从而治疗认知功能下降^[42-43]。

综上所述,本研究表明地黄饮子加减方可以改善 VD 大鼠学习与记忆能力,减轻海马 CA1 区神经元损伤,其作用机制是通过上调海马组织中 PI3K, Akt 的表达,减少 Caspase-3 的表达,抑制细胞凋亡,从而发挥保护 VD 大鼠海马神经元的作用。

[参考文献]

[1] GANNON O J, ROBISON L S, CUSTOZZO A J, et al. Sex differences in risk factors for vascular contributions to cognitive impairment & dementia[J]. Neurochem Int, 2019, 127: 38-55.
[2] IADECOLA C, DUERING M, HACHINSKI V, et al. Vascular cognitive impairment and dementia[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 73(25): 3326-3344.
[3] CALABRESE V, GLORDANO J, SLGNORILE A, et al. Major pathogenic mechanisms in vascular dementia: roles of cellular stress response and hormesis in

- neuroprotection [J]. *J Neurosci Res*, 2016, 94 (12): 1588-1603.
- [4] ZHU J D, WANG J J, ZANG X H, et al. Panax ginseng extract attenuates neuronal injury and cognitive deficits in rats with vascular dementia induced by chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13 (4): 664-672.
- [5] GHORANI-AZAM A, SEPAHI S, KHODAVERDI E, et al. Herbal medicine as a promising therapeutic approach for the management of vascular dementia: a systematic literature review [J]. *Phytother Res*, 2018, 2 (9): 1720-1728.
- [6] 王玮, 于文涛, 聂金涛, 等. 血管性痴呆患者中医证候特点研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23 (4): 514-517, 548.
- [7] 覃辉, 周城恩, 陆晖, 等. 地黄饮子方结合胞磷胆碱治疗血管性痴呆肾精亏虚兼痰瘀阻络证疗效及对血清 β -AP、E₂、Livin 水平的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28 (6): 589-592, 596.
- [8] 季晓东. 地黄饮子方治疗血管性痴呆 40 例临床观察 [J]. *浙江中医杂志*, 2016, 51 (3): 186.
- [9] 谢宁, 史瑞, 吴颂, 等. 地黄饮子对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及大脑皮层 NO、NOS 含量的影响 [J]. *中医学报*, 2011, 26 (7): 821-823.
- [10] FARKA E, LUITEN P G, BARI F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases [J]. *Brain Res Rev*, 2007, 54 (1): 162-180.
- [11] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1861-1863.
- [12] 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.
- [13] 谢颖楨, 邹忆怀, 张云岭, 等. 血管性痴呆病因病机探讨 [J]. *北京中医药大学学报*, 2000, 23 (6): 1-3.
- [14] 马小顺, 于文涛, 靳贺超, 等. 血管性痴呆中医证候与神经心理学指标相关性分析 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32 (10): 4696-4699.
- [15] 周雨慧, 芦锰, 苗明三. 基于关联规则的中药治疗血管性痴呆用药规律分析 [J]. *药物流行病学杂志*, 2019, 28 (9): 567-572.
- [16] 闵冬雨, 张哲, 朱妹, 等. 化痰祛瘀方对血管性痴呆的保护作用机制探讨 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25 (16): 31-36.
- [17] ANAND K S, DHIKAV V. Hippocampus in health and disease: an overview [J]. *Ann Indian Acad Neurol*, 2012, 15 (4): 239-246.
- [18] ATLASI M A, NADERIAN H, NOUREDDINI M, et al. Morphology of rat hippocampal CA1 neurons following modified two and four-vessels global ischemia models [J]. *Arch Trauma Res*, 2013, 2 (3): 124-128.
- [19] 马春林, 陈杰, 崔淑梅, 等. 归芪聪志汤及其拆方对 VD 模型大鼠海马神经元 HIF-1 α 、VEGF 和 HO-1 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 (15): 143-148.
- [20] JIANG X M, HU J H, WANG L L, et al. Ulinastatin alleviates neurological deficiencies evoked by transient cerebral ischemia via improving autophagy, Nrf-2-ARE and apoptosis signals in hippocampus [J]. *Physiol Res*, 2018, 67 (4): 637-646.
- [21] 张君, 程笑, 杨欢, 等. 山奈酚对慢性脑缺血大鼠学习记忆能力的影响及机制探讨 [J]. *中国药理学通报*, 2017, 33 (1): 39-44.
- [22] 李红兵, 张流忠, 吴闵. 中长期慢性脑低灌注海马 CA1 区神经元凋亡及加减薯蓣丸干预作用的实验研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17 (9): 1324-1328.
- [23] 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.
- [24] 公维军. 慢性脑低灌注与认知功能障碍的关系 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2017, 19 (12): 1333-1335.
- [25] LI W, YUAN H, YU Y, et al. Etidronate rescues cognitive deficits through improving synaptic transmission and suppressing apoptosis in 2-vessel occlusion model rats [J]. *J Neurochem*, 2017, 140 (3): 476-484.
- [26] 李艳, 宋亚刚, 苗明三, 等. 月季花总黄酮对局灶性脑缺血再灌注模型大鼠的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25 (12): 64-70.
- [27] 白明, 刘慧娟, 李孟艳, 等. 葛花总黄酮对脑缺血再灌注模型小鼠死亡率及生化指标的影响 [J]. *中医学报*, 2019, 34 (8): 1715-1718.
- [28] 罗永坚, 蔺心敬, 李吕力, 等. 血管性痴呆模型大鼠海马神经元凋亡和病理改变的实验研究 [J]. *中国老年学杂志*, 2008 (18): 1788-1790.
- [29] QI Y Y, FENG X F, QIU L, et al. 3-n-butylphthalide inhibits the apoptosis of nerve cells in rats with cerebral small vessel disease via the PI3K/Akt pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23: 4474-4480.
- [30] 靳贺超, 于文涛, 刘晓, 等. 补肾活血方对血管性痴呆大鼠海马细胞凋亡及 ERK2、CREB 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24 (12): 129-135.
- [31] 刘明, 刘杨, 邓颖, 等. 蓝布正提取物对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马 NT-3、BDNF 蛋白表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (17): 154-158.

- [32] KERR J F, WYLLIE A H, CURRIE A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(4):239-257.
- [33] SÎRBULESCU R F, ZUPANC G K. Inhibition of Caspase-3-mediated apoptosis improves spinal cord repair in a regeneration-competent vertebrate system [J]. Neuroscience, 2010, 171(2):599-612.
- [34] 魏珍珍, 方晓艳, 王灿, 等. 败酱总黄酮对局灶性脑缺血再灌注大鼠的神经保护作用及炎症因子的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(4):396-402.
- [35] SAIRANEN T, SZEPEESI R, KARJALAINEN-LINDSBERG M L, et al. Neuronal caspase-3 and PARP-1 correlate differentially with apoptosis and necrosis in ischemic human stroke[J]. Acta Neuropathol, 2009, 118(4):541-552.
- [36] TOKUHIRA N, KITAGISHI Y, SUZUKI M, et al. PI3K/Akt/PTEN pathway as a target for Crohn's disease therapy (Review) [J]. Int J Mol Med, 2015, 35(1):10-16.
- [37] 朱金墙, 宋宛珊, 马妍, 等. PI3K/Akt 信号通路与管理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.
- [38] 林跃辉, 王敏. PI3K-Akt 信号转导途径与凋亡的关系 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2005, 25(4):307-310.
- [39] KAMADA H, NITO C, ENDO H, et al. Bad as a converging signaling molecule between survival PI3K/Akt and death JNK in neurons after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(3):521-533.
- [40] ZHAO H, SAPOLSKY R M, STEINBERG G K. Phosphoinositide-3-kinase/Akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke[J]. Mol Neurobiol, 2006, 34(3):249-269.
- [41] NORIFUMI S, FENG H, KOHJI F. Chapter 26 role of Akt and Erk signaling in the neurogenesis following brain ischemia[J]. Int Rev Neurobiol, 2009, 85:375-387.
- [42] HUANG K, SHEN L, NIU T, et al. Naomaitai ameliorated brain damage in rats with vascular dementia by PI3K/PDK1/Akt signaling pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, doi: 10.1155/2019/2702068.
- [43] 黄汉陵, 李阳. 大蒜素调控 VEGF/PI3K/Akt 促进 SKOV3 细胞的凋亡 [J]. 解剖学研究, 2019, 41(2):115-118.

[责任编辑 孙丛丛]