

化痰祛痰方对血管性痴呆的保护作用机制探讨

闵冬雨¹, 张哲¹, 朱姝², 关乐¹, 鞠业涛¹, 王东妮¹, 曹媛³, 杨关林^{3*}

(1. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032; 2. 中国医科大学附属口腔医院, 沈阳 110031;
3. 辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 沈阳 110847)

[摘要] 目的: 研究化痰祛痰方对血管性痴呆(VD)沙鼠的保护作用,并初步探讨其作用机制是否与钙离子-钙调素依赖性蛋白激酶Ⅱ(CaMKⅡ)/环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)/脑源性神经营养因子(BDNF)信号通路相关。**方法:**将健康沙鼠 40 只,随机分为假手术组,模型组,化痰祛痰方低、中、高(5.35,10.7,21.4 g·kg⁻¹)剂量组,每组 8 只,模型组及化痰祛痰三组参考 Levine 法对全部沙鼠进行侧颈总动脉结扎再灌注法造 VD 模型;假手术组则不封闭颈部动脉,其他操作同手术组。术后沙鼠给予相应药物灌胃 2 次/日,21 d 后进行水迷宫实验考察沙鼠的空间学习记忆能力。蛋白免疫印迹法(Western blot)及免疫组化分别测定沙鼠脑组织海马体的磷酸化(p)-CaMKⅡ/CaMKⅡ,p-CREB/CREB,BDNF 蛋白的表达。**结果:**与假手术组比较,模型组沙鼠的上台潜伏期和平台穿梭次数明显降低,p-CaMKⅡ/CaMKⅡ,p-CREB/CREB,BDNF 蛋白表达均明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,化痰祛痰方组沙鼠的上台潜伏期和平台穿梭次数明显升高,其中化痰祛痰方中以高剂量组效果最为明显($P < 0.01$),化痰祛痰方可以有效的保护 CA1 区锥体细胞,明显上调 p-CaMKⅡ/CaMKⅡ,p-CREB/CREB,BDNF 蛋白的表达($P < 0.01$)。**结论:**化痰祛痰方改善了血管性痴呆沙鼠的学习和记忆能力,作用机制可能与 CaMKⅡ/CREB/BDNF 信号通路的激活相关。

[关键词] 化痰祛痰方; 血管性痴呆; 钙离子-钙调素依赖性蛋白激酶Ⅱ; 环磷腺苷效应元件结合蛋白; 脑源性神经营养因子; 四君子汤

[中图分类号] R2-0;R285;R289;R74;R318.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)16-0031-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191539

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190418.1129.010.html>

[网络出版时间] 2019-04-19 10:02

Study on Protective Effect of Huayu Qutan Decoction on Vascular Dementia

MIN Dong-yu¹, ZHANG Zhe¹, ZHU Shu², GUAN Le¹, JU Ye-tao¹,
WANG Dong-ni¹, CAO Yuan³, YANG Guan-lin^{3*}

(1. *The First Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese*

Medicine (TCM), Shenyang 110032, China;

2. *Affiliated Stomatological Hospital of China Medical University, Shenyang 110031, China;*

3. *Key Laboratory of TCM Viscera Theory and Application, Ministry of Education, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China)*

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of Huayu Qutan decoction on vascular dementia (VD) gerbils and to explore whether its mechanism is related to Calcium ion-calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) /cyclic adenosine effect element binding protein (CREB) /brain-derived neurotrophic factor (BDNF) signaling pathway. **Method:** Forty healthy gerbils were randomly divided into sham operation group, model group, low, medium and high dose groups (5.35, 10.7, 21.4 g·kg⁻¹) of removing blood stasis and expelling phlegm. Eight gerbils in each group were divided into model group and removing blood stasis and

[收稿日期] 20181106(019)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2013CB531704);中国博士后科学基金项目(2014M551121);辽宁中医药大学中医脏象理论及应用国家重点实验室项目(zyzx1705);辽宁省科技厅项目(20180551110)

[第一作者] 闵冬雨,博士,副主任药师,从事中西医结合心脑血管疾病防治研究,E-mail:mindongyu@163.com

[通信作者] *杨关林,主任医师,博士生导师,从事中西医结合临床研究,E-mail:guanli19621010@163.com

expelling phlegm group. Gerbils were given corresponding drugs twice a day after operation. Water maze experiment was conducted 21 days later to investigate the spatial learning and memory ability of gerbils. The expression of p-CaMK II /CaMK II, p-CREB/CREB and BDNF in the hippocampus of gerbils were detected by Western blot and immunohistochemistry. **Result:** Compared with sham operation group, the incubation period and the number of platform trips of gerbil in the model group were significantly reduced, p-CaMK II /CaMK II, p-CREB/CREB, and BDNF protein expression were significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with model group, the incubation period and the number of platform shuttling of gerbil in Huayu Qutan decoction group were significantly increased, among which the high-dose phlegm dispelling prescription had the most significant effect ($P < 0.01$). The phlegm dispelling prescription could effectively protect pyramidal cells in CA1 region, significantly up-regulating the expression of p-CaMK II /CaMK II, p-CREB/CREB and BDNF protein ($P < 0.01$).

Conclusion: Huayu Qutan decoction improves the learning and memory abilities of gerbils with vascular dementia, and its mechanism may be related to the activation of CaMK II /CREB/BDNF signaling pathway.

[**Key words**] Huayu Qutan decoction; vascular dementia; calcium ion-calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II); cyclic adenosine effect element binding protein (CREB); brain-derived neurotrophic factor (BDNF); Si Junzitang

缺血性脑卒中,属于中医“中风”范畴,由脑组织区域血液供应障碍导致,是目前严重危害人类健康的主要疾病之一^[1]。缺血性脑卒中会因神经细胞的缺血缺氧引起不可逆变性坏死,产生临床上对应的神经功能缺失的表现,其中 VD 是最常见、最严重的临床表现,在我国 60~80 岁人群中 VD 的发病率约为 57/1 万人每年^[2],而这也逐渐成为我国老年痴呆发病的最大临床风险之一^[3]。目前针对 VD 的机制研究显示,钙调素依赖性蛋白激酶 II (CaMK II)/环磷腺苷效应元件结合蛋白 (CREB)/脑源性神经营养因子 (BDNF) 信号通路在突触可塑和学习记忆功能中具有重要作用。CaMK II 的磷酸化能够保持神经突触功能的持久活化^[4]。大脑缺血可以降低海马 p-CaMK II 表达并降低 CaMK II 在 CA1 区的活性^[5]。CREB 对于神经突触的形成和生长是十分重要的^[6]。CREB 的活化形式是 CREB 的磷酸化,磷酸化的 CREB 能够调控多种神经保护蛋白的转录^[7],而 BDNF 是其中重要的神经营养因子,进而对受损的神经细胞起到保护作用。化痰祛痰方由黄芪片、党参片、清半夏、茯苓等组成,由经典名方四君子汤加减而来。具有健脾益气、化痰祛痰之功效,临床上主要用于痰瘀互结型冠心病的治疗,已有 10 余年的历史。本课题组的前期实验结果表明该方可调控血脂及胆固醇代谢,抑制血小板活化和局部炎症反应,改善血管内皮功能失调^[8-9],增加缺血心肌的血氧供应。血管性痴呆的发病原因主要由于血管动脉硬化,导致脑组织供血不足,该化痰祛痰方是否对血管性痴呆有效未见报道。基于此,本研究拟采用沙鼠血

管性痴呆模型,对化痰祛痰方进行研究,应用 Morris 水迷宫,形态学,蛋白免疫印迹法 (Western blot) 等检测方法,阐明化痰祛痰方改善脑缺血性痴呆的作用及 CaMKII/CREB/BDNF 信号通路是否参与了该作用。

1 材料

1.1 动物 40 只 SPF 级雄性成年蒙古沙土鼠,体质量 60~80 g。由大连医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK (辽) 2013-0003。饲养环境: 20~25 ℃,相对湿度 40%~70%,12 h 照明,12 h 黑暗。于辽宁中医药大学动物房进行饲养及后续的实验研究,批准号 2015CS (DW)-002-01。

1.2 药物 化痰祛痰方由黄芪片、党参片、清半夏、茯苓等组成,方中药材全部由辽宁中医药大学附属医院提供,经辽宁中医药大学附属医院实验中心刘桂芳教授鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》的相关项下要求。由辽宁中医药大学附属医院实验中心进行后续制备,按处方比例称取药材,加 10 倍量水浸泡 0.5 h,煎煮 3 次,每次 40 min,过滤,合并 3 次滤液,37 ℃ 水浴加热浓缩,根据临床的实际用药情况,对药液进行浓缩处理,并以中质量浓度匹配临床的实际用药浓度。低质量浓度浓缩至 0.265 g·mL⁻¹ (以生药量计,下同),中质量浓度浓缩至 0.535 g·mL⁻¹,高质量浓度浓缩至 1.07 g·mL⁻¹,置 4 ℃ 冰箱贮存备用。

1.3 试剂 Nissl 染液 (上海如吉生物科技发展有限公司,批号 GL019); 水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司,批号 30037517); 阿托品 (上海全宇生物科技发展有限公司,批号 180926); 兔抗鼠神经元核抗

原(NeuN)抗体,兔抗鼠 anti-p-CaMK II 抗体,小鼠抗鼠 anti-CaMK II 抗体,兔抗鼠 anti-p-CREB 抗体,兔抗鼠 CREB 抗体(美国 Abcam 公司;批号分别为 ab177487, ab32678, ab22609, ab32096, ab219741);兔抗鼠 anti-BDNF 抗体,小鼠抗鼠 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Boster 公司,批号分别为 BM4113, BM0627);羊抗兔二抗(美国 Proteintech 公司,批号 SA00001-2)。

1.4 仪器 Leica CM1950 型冷冻切片机, HI1220 型烘片机(德国 Leica 公司);Echo 型全波长酶标仪, 5804R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Pico21 型常温离心机(美国 Thermo Scientific 公司);DW-HL388 型超低温冰箱(中科美菱), Vortex 5 型涡旋振荡器和 TS-2 型摇床(其林贝尔仪器制造有限公司);MG8000 型化学发光成像系统(北京 Thmorgan 生物科技有限公司);1658001 型 Western blot 设备(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组与处理 将 40 只沙鼠分为假手术组、模型组和化痰祛痰高、中、低剂量组,每组 8 只。模型组的造模方法采用沙鼠的双侧颈总动脉结扎再灌注方法,具体方法参考 Levine 法,并进行相应改良后制备^[10],沙鼠当日空腹给药后 1 h,常规水合氯醛麻醉,同时补充 10 μ g 阿托品。颈部正中开口,直接分离甲状腺及气管前肌肉,显微镜视角下玻璃出双侧颈总动脉,再用微型动脉夹将两侧颈总动脉同时夹闭,阻碍颈动脉处的血液流动 5 min。之后,撤去动脉夹,恢复供血,直接造成缺血再灌注模型,术后将沙鼠放在加热板上,保持沙鼠的体温在 36 ~ 37 $^{\circ}$ C,减少沙鼠的术中死亡率。而假手术组则不封闭颈部动脉,其他操作同手术组。模型制备成功评价标准^[10],夹闭过程中沙鼠出现意识丧失,瞳孔扩大等生理现象,同时,角膜及翻正反射消失等表明造模成功,废弃缺血期昏睡及死亡的沙鼠。化痰祛痰组在造模后给予化痰祛痰方灌胃,给药剂量依据人和动物体表面积折算系数换算^[8],分别为 5.35, 10.7, 21.4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药 21 d, 2 次/d。

2.2 Morris 水迷宫实验检测空间学习记忆能力 在直径 120 cm,高 40 cm 的水槽内加入温水(21 ~ 22 $^{\circ}$ C),用白色素混匀呈非透明状,水槽的上方的摄像头可以记录沙鼠的游泳轨迹,第三象限的中心位置放置安全平台,在训练的第 1 天,将安全平台置于水面上 1.0 cm,沙鼠每次都是从第一象限放入,每次训练 1 min,在 2 ~ 5 d 进行隐蔽平台实验,方法与

以前相同,每天 2 次,1 min 内未找到平台的以 1 min 记录。第 6 天进行空间探索实验,将平台移走,然后让沙鼠按相同的方法在水池中寻找平台,记录 1 min 内沙鼠穿梭平台所在位置的次数。

2.3 Nissl 染色检测沙鼠海马区细胞形态 将沙鼠用 7% 水合氯醛(0.35 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉后,开胸暴露心脏,左心插入注射针头,用生理盐水将体内血液冲洗干净,再用 4% 多聚甲醛灌注,待全身僵硬后取出大脑放入 4% 多聚甲醛中进行后固定 1 d,再用 30% 的蔗糖沉糖 4 d,脑组织冰冻切片,厚 6 μm ,切片用 Nissl 染液进行染色,方法参照试剂盒里面的说明书。

2.4 Western blot 检测沙鼠海马体相关蛋白的表达 沙鼠腹腔麻醉后快速取出鼠海马提取总蛋白。BCA 法测蛋白浓度,上样后进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,一抗(p-CREB, 1:1 000; CREB, 1:500; BDNF, 1:200; p-CaMK II, 1:400; CaMK II, 1:400; β -actin, 1:5 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗(1:1 000)1 h, ECL 显影。Image J 分析软件进行分析。

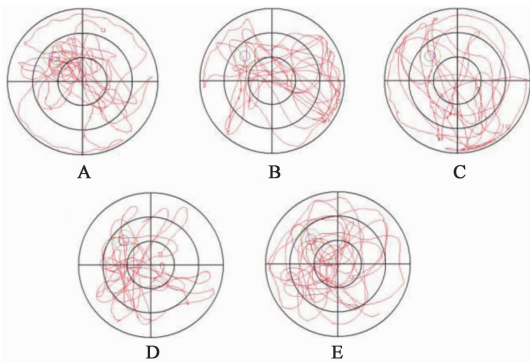
2.5 免疫组化检测沙鼠海马体相关蛋白的表达 冰冻切片用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 3 次,每次 5 min,0.3% H_2O_2 抑制内源性过氧化物酶活性 15 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,封闭 30 min,用 NeuN(1:50)孵育切片,4 $^{\circ}$ C 下湿盒内孵育过夜, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,羊抗兔二抗(1:200)室温孵育切片 30 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,滴加 SP 试剂,室温下孵育 20 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min, DAB 显色 10 min 后, PBS 冲洗切片终止显色反应,切片脱水,透明,中性树脂胶封片。每只沙鼠取 6 张脑片,其断面水平各鼠均相似,所有脑片均在同一放大倍数、同一光强度下分析。用 MetaMorph/DPI0/BX41 图像分析系统测定各组海马 CA1 区各指标的平均光密度值。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用单因素方差分析,并采用最小显著性差异法 LSD 进行组间多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 VD 模型沙鼠空间探索能力的影响 同假手术组比较,模型组沙鼠的 3,4 d 的上台潜伏期及穿梭次数显著减少($P < 0.01$);与模型组比较,化痰祛痰方中、高剂量组沙鼠 3,4 d 的上台潜伏期及穿梭次数均显著减少($P < 0.01$)。见图 1,表 1。

3.2 对 VD 模型沙鼠海马 CA1 区锥体细胞形态学的影响 假手术组沙鼠的海马 CA1 区锥体细胞



A. 假手术组; B. 模型组; C. 化痰祛痰方低剂量组; D. 化痰祛痰方中剂量组; E. 化痰祛痰方高剂量组

图 1 化痰祛痰方对沙鼠空间探索能力的影响

Fig. 1 Effect of Huayu Qutan decoction on space exploration ability of gerbils

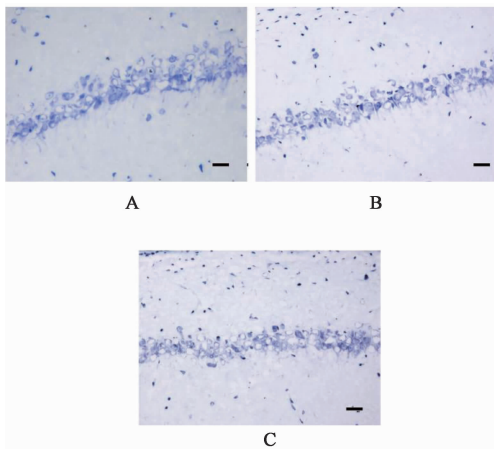
排列紧密, 细胞结构清晰, 细胞膜完整, 细胞核正常, 染色质分布均匀, 细胞数量较多, 胞浆内尼氏小体

表 1 化痰祛痰方对沙鼠空间探索能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of Huayu Qutan decoction on space exploration ability of gerbils ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	潜伏期/s				穿梭数/次
		1 d	2 d	3 d	4 d	
假手术	-	49.62 ± 1.88	39.66 ± 5.03	29.91 ± 6.72	14.95 ± 3.78	6.0 ± 1.2
模型	-	49.35 ± 2.81	44.03 ± 5.98	46.14 ± 7.11 ²⁾	36.74 ± 4.13 ²⁾	1.9 ± 1.1 ²⁾
化痰祛痰方	5.35	49.21 ± 3.70	45.96 ± 4.34	41.71 ± 7.87	34.87 ± 5.14	2.7 ± 0.7
	10.7	50.87 ± 4.98	46.91 ± 5.26	36.30 ± 3.58 ⁴⁾	27.79 ± 6.40 ⁴⁾	4.1 ± 1.4 ⁴⁾
	21.4	50.12 ± 5.67	43.17 ± 6.48	31.54 ± 3.27 ⁴⁾	21.07 ± 5.98 ⁴⁾	5.8 ± 1.4 ⁴⁾

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 ~ 3 同)。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 化痰祛痰方组 (图 3 ~ 4 同)

图 2 化痰祛痰方对沙鼠海马 CA1 区 NeuN 阳性细胞数的影响 (Nissl, ×400)

Fig. 2 Effect of Huayu Qutan decoction on positive cells of NeuN in hippocampus CA1 area (Nissl, ×400)

丰富。模型组沙鼠的海马 CA1 区可见部分神经元丢失, 数量减少, 排列不整齐, 细胞轮廓模糊, 部分神经元胞体皱缩, 核固缩, 胞浆深染。与模型组比较, 化痰祛痰方组神经元显著增多, 且排列较为整齐, 细胞轮廓清晰, 细胞结构完整。模型组 CA1 区高倍视野完整结构细胞数显著低于假手术组 ($P < 0.01$), 而化痰祛痰高剂量组与模型组比较显著增加 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 2。

3.3 对沙鼠海马 CA1 区 NeuN 的影响 假手术组 NeuN 阳性细胞数目较多, 染色较深, 细胞结构清晰, 排列整齐, 模型组沙鼠 NeuN 阳性细胞较少, 细胞固缩; 与模型组比较, 化痰祛痰组神经细胞的 NeuN 阳性细胞明显增多, 细胞结构清晰, 见图 3。免疫组化的结果显示, 模型组 CA1 区 NeuN 平均光密度值显著低于假手术组 ($P < 0.01$), 而化痰祛痰高剂量组显著高于模型组 ($P < 0.01$)。见图 3, 表 2。

表 2 化痰祛痰方对沙鼠海马 CA1 区神经细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 2 Effect of Huayu Qutan decoction on number of NeuN in hippocampus CA1 area ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Nissl 染色	免疫组化
假手术	-	71.6 ± 9.8	71.8 ± 9.3
模型	-	26.0 ± 6.7 ²⁾	25.6 ± 6.2 ²⁾
化痰祛痰方	21.4	42.5 ± 8.5 ⁴⁾	43.3 ± 8.9 ⁴⁾

3.4 对沙鼠海马区 p-CaMK II, p-CREB, BDNF 表达的影响 与正常组比较, 模型组沙鼠海马组织 p-CaMK II, p-CREB 和 BDNF 表达显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 化痰祛痰方组沙鼠海马组织 p-CaMK II, p-CREB 和 BDNF 表达显著上升 ($P < 0.01$)。见图 4, 表 3。

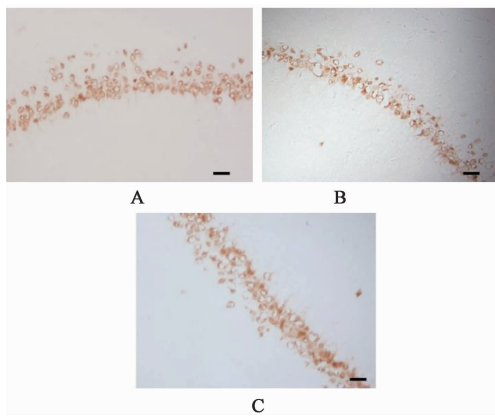


图 3 化痰祛痰方对沙鼠海马 CA1 区 NeuN 的影响(免疫组化, × 400)
Fig. 3 Effect of Huayu Qutan decoction on NeuN immunohistochemistry in hippocampal CA1 area (IHC, × 400)

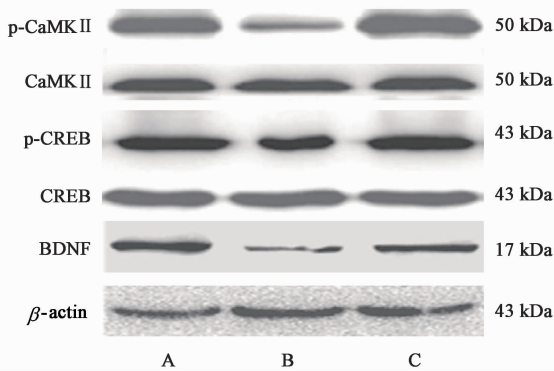


图 4 沙鼠海马区 p-CaMK II, CaMK II, p-CREB, CREB, BDNF 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of p-CaMK II, CaMK II, p-CREB, CREB, BDNF proteins in hippocampus of gerbil

表 3 化痰祛痰方对沙鼠海马组织 p-CaMK II/CaMK II, p-CREB/CREB, BDNF/ β -actin 蛋白相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 3 Relative expression of p-CaMK II/CaMK II, p-CREB/CREB, BDNF/ β -actin proteins in hippocampus of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	BDNF / β -actin	p-CaMK II /CaMK II	p-CREB /CREB
假手术	-	1.000	1.000	1.000
模型	-	0.443 ± 0.051 ²⁾	0.443 ± 0.072 ²⁾	0.567 ± 0.061 ²⁾
化痰祛痰方	21.4	0.824 ± 0.067 ⁴⁾	0.800 ± 0.093 ⁴⁾	0.843 ± 0.082 ⁴⁾

4 讨论

缺血性脑卒中, 归属于中医的“中风”范畴, 其临床病机多以内伤立论, 由五脏虚损、肝阳化风以致气血逆乱, 挟痰挟瘀横窜经络、上蒙清窍所致^[11]。针对上述病机, 杨关林教授创立了化痰祛痰方对该

病进行救治, 从临床角度出发, 取得了良好的效果。本文则从其作用于海马体相关基因表达的角度出发, 对其治疗的缺血性脑卒中的潜在机制进行了研究。

应用经典的沙鼠缺血再灌注模型, 本研究的结果显示, 化痰祛痰方对沙鼠的缺血再灌注损伤具有保护作用。其具体表现为通过水迷宫实验可知, 化痰祛痰方能显著提升缺血再灌注沙鼠的学习记忆能力, 通过对沙鼠海马体的神经细胞形态及相应基因表达可看出, 化痰祛痰方可以有效的改善沙鼠海马神经细胞的活性。该结果提示, 化痰祛痰方可以通过上调模型沙鼠海马体内 p-CaMK II, CaMK II, p-CREB, CREB, BDNF 等蛋白的表达, 起到保护神经细胞的作用, 从而进一步改善沙鼠脑功能恢复的作用。同时, 与化痰祛痰方中剂量组及低剂量组比较, 化痰祛痰方高剂量组对于模型沙鼠海马体的保护效果更佳。

脑组织海马 CA1 区对缺血缺氧最为敏感, 而海马又是大脑记忆形成、组织和存储过程中的关键部位。脑缺血能够导致该部位神经细胞的坏死, 水迷宫的实验结果表明脑海马组织缺血后沙鼠的学习和记忆能力均下降。CaMK II 调节许多信号级联, 并被认为是一个学习和记忆的重要调解者。大脑缺血可以降低海马 p-CaMK II 水平并降低 CaMK II 在 CA1 区的活性^[12]。这些结果与本研究结果一致, 模型组海马组织的 p-CaMK II/CaMK II 表达显著降低。CREB 是一个神经系统疾病相关的基因转录因子, 在中枢神经系统很丰富, 尤其是神经元^[13]。CREB 磷酸化与神经元的可塑性和神经营养因子介导的神经元存活密切相关^[14]。有研究表明, 在实验动物体内使用反义寡脱氧核苷酸或基因敲除技术降低 p-CREB 的表达, 结果表现出空间记忆的损害^[15]。PKA 使 CREB 磷酸化与启动子的 CRE 元件结合促进 BDNF 转录^[16]。BDNF 作为一个重要的神经细胞营养因子, 在突触可塑性、神经发生和神经细胞存活中发挥关键作用^[17]; 其在齿状回颗粒细胞层(GCL)中高度表达, 其通过 TrkB 受体参与突触可塑性和神经元发育。由此可见 CaMK II/CREB/BDNF 通路在脑组织缺血导致的学习记忆中发挥重要作用^[18]。本实验的结果也验证了这一点。

通过化痰祛痰方的干预上调了 CaMK II 和 CREB 的磷酸化水平, 进而增加了 BDNF 的表达, 增加了沙鼠的学习和记忆能力。本团队前期研究表

明,化痰祛痰方含药血清可以改善外源性 H_2O_2 导致的内皮细胞活力下降,其作用与提高细胞超氧化物歧化酶(SOD),一氧化氮(NO)活性,减少 LDH 外漏相关^[19]。而脑组织缺血再灌注损伤最先受损的就是血脑屏障的内皮细胞,内皮细胞出现肿胀、坏死等影响氧、营养物质的转运,推测化痰祛痰方可能作用与脑血管的内皮细胞,改善内皮细胞的功能,进而保护神经细胞。以前的研究也证实化痰祛痰方药抑制内皮细胞 Toll 样受体 4 (TLR4)/核转录因子- κ B (NF- κ B)炎症信号通路^[9]及抑制单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)表达而发挥其对炎症^[20],可见化痰祛痰方的作用是多靶点,从抗氧化和抗炎等方面发挥作用,本研究推测其改善血管性痴呆的作用可能与此相关。本研究目前的工作表明,化痰祛痰方可以减轻海马神经元损伤,改善全脑缺血沙鼠的记忆缺陷模型,其神经保护作用可能与 CaMK II/CREB/BDNF 信号通路相关。其具体的调控机制将在后续的工作中进一步证明。

[参考文献]

[1] 陈梅,王立新. 中药联合干细胞疗法治疗缺血性脑卒中的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(19): 218-226.

[2] 曲艳吉,卓琳,王华丽,等. 1980-2011 年中国社区 55 岁及以上人群中血管性痴呆流行病学的 Meta 分析[J]. 中国卒中杂志, 2013, 8(7): 533-543.

[3] XU W L, QIU C X, Gatz M, et al. Mid-and late-life diabetes in relation to the risk of dementia: a population-based twin study [J]. Diabetes, 2009, 58(1): 71-77.

[4] Yamagata Y, Kobayashi S, Umeda T, et al. Kinase-dead knock-in mouse reveals an essential role of kinase activity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II α in dendritic spine enlargement, long-term potentiation, and learning [J]. J Neurosci, 2009, 29(23): 7607-7618.

[5] Morioka M, Fukunaga K, Yasugawa S, et al. Regional and Temporal Alterations in Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and calcineurin in the hippocampus of rat brain after transient forebrain ischemia [J]. J Neurochem, 1992, 58(5): 1798-1809.

[6] Marie H, Morishita W, YU X, et al. Generation of silent synapses by acute *in vivo* expression of camkiv and creb [J]. Neuron, 2005, 45(5): 741-752.

[7] Shieh P B, HU S C, Bobb K, et al. Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of

BDNF expression [J]. Neuron, 1998, 20(4): 727-740.

[8] 贾连群,杨关林,任路,等. 化痰祛痰方药及其拆方含药血清对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞炎症因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 144-148.

[9] 贾连群,杨关林,任路,等. 化痰祛痰方药及其拆方对内皮细胞 TLR4/NF- κ B 炎症信号通路干预的研究 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(23): 5159-5161.

[10] 王齐. 二苯乙炔苷对改善全脑缺血再灌注致沙鼠海马损伤的研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013.

[11] 张久亮,柳翼,史载祥,等. 缺血性脑卒中的中医病因病机再认识 [J]. 中医杂志, 2008, 49(6): 569-570.

[12] ZHANG Y, QIAO L, XU W, et al. Paeoniflorin attenuates cerebral ischemia-induced injury by regulating Ca^{2+} /camkii/creb signaling pathway [J]. Molecules, 2017, 22(3): 359.

[13] QU L, GAO Y, SUN H, et al. Role of pten-akt-creb signaling pathway in nervous system impairment of rats with chronic arsenite exposure [J]. Biol Trace Elem Res, 2016, 170(2): 366.

[14] Schmid R S, Graff R D, Schaller M D, et al. Ncam stimulates the ras-mapk pathway and creb phosphorylation in neuronal cells [J]. Develop Neurobiol, 2015, 38(4): 542-558.

[15] ZHU Y P, XI S H, LI M Y, et al. Fluoride and arsenic exposure affects spatial memory and activates the Erk/creb signaling pathway in offspring rats [J]. Neurotoxicology, 2017, 59(3): 56-64.

[16] 荆玉谱. 蜕皮激素引发的钙离子/钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II 信号转导途径以及蛋白激酶 A 信号转导途径对基因组转录的调控 [D]. 济南: 山东大学, 2015.

[17] Vaynman S, YING Z, Gomez - pinilla F. Hippocampal Bdnf mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition [J]. Eur J Neurosci, 2015, 20(10): 2580-2590.

[18] DUAN S, WANG T, ZHANG J, et al. HuatuoZaizao pill promotes functional recovery and neurogenesis after cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1): 19.

[19] 贾连群,杨关林,任路,等. 化痰祛痰方药对 H_2O_2 诱导人脐带静脉内皮细胞氧化应激保护作用的研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(9): 44-45.

[20] 赵钢,杨关林,李志明. 化痰祛痰颗粒剂对血管内皮细胞表达 MCP-1 的影响研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2011, 25(5): 3-6.

[责任编辑 孙丛丛]