

# 人参-知母-赤芍提取物对血管性痴呆大鼠 海马神经元的保护作用及机制

郭洋洋<sup>1</sup>, 韩振蕴<sup>2</sup>, 田丹枫<sup>2</sup>, 王东辉<sup>1</sup>, 于雪<sup>1</sup>, 郭婕<sup>1</sup>, 张丹丹<sup>2</sup>, 潘彦舒<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学 中医学院, 北京 100029; 2. 北京中医药大学 东方医院, 北京 100078)

**[摘要]** 目的: 观察人参-知母-赤芍提取物对血管性痴呆大鼠海马 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 1 (NMDAR1) 的影响, 探讨其保护海马神经元的作用机制。方法: 60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 随机分为正常组, 假手术组, 模型组, 人参-知母-赤芍提取物组 (0.20 g·kg<sup>-1</sup>) 和美金刚组 (2.1 mg·kg<sup>-1</sup>), 每组 12 只。采用双侧颈总动脉反复夹闭合并腹腔注射硝普钠的方法建立血管性痴呆大鼠模型, 造模后, 正常组, 假手术组, 模型组给予同等体积生理盐水, 每日 1 次, 连续 14 d。采用 Morris 水迷宫评价各组大鼠学习记忆能力; 苏木素-伊红 (HE) 染色观察海马 CA1 区病理改变; 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测海马神经元胞膜 NMDAR1 的蛋白表达水平; 免疫组化法 (IHC) 检测海马 NMDAR1 的表达情况; 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测海马组织中 NMDAR1 mRNA 的表达水平。结果: 与正常组和假手术组比较, 模型组大鼠逃避潜伏期显著延长 ( $P < 0.01$ ), 在平台所在象限停留时间及穿越平台的次数显著减少 ( $P < 0.01$ ), 海马 CA1 区神经细胞层次减少, 排列紊乱、出现核固缩、神经元丢失, NMDAR1 蛋白及 mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 人参-知母-赤芍提取物组, 美金刚组逃避潜伏期明显缩短 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 在平台所在象限停留时间及穿越平台的次数明显增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 海马 CA1 区神经元数目与形态有明显改善, 海马神经元 NMDAR1 蛋白及 NMDAR1 mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。结论: 人参-知母-赤芍提取物能够改善血管性痴呆大鼠的学习记忆能力, 减轻海马 CA1 区神经元的损伤, 其机制可能与下调海马神经元 NMDAR1 的表达有关。

**[关键词]** 人参-知母-赤芍提取物; 血管性痴呆; 学习记忆; 海马; *N*-甲基-*D*-天门冬氨酸受体 1

**[中图分类号]** R285.5; R331.3; R322.81; R743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)08-0047-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20190837

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190102.1026.004.html>

**[网络出版时间]** 2019-01-04 10:24

## Protective Effect and Mechanism of Extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Anemarrhenae Rhizoma and Paeoniae Radix Rubra on Hippocampal Neurons in Rats with Vascular Dementia

GUO Yang-yang<sup>1</sup>, HAN Zhen-yun<sup>2</sup>, TIAN Dan-feng<sup>2</sup>, WANG Dong-hui<sup>1</sup>, YU Xue<sup>1</sup>, GUO Jie<sup>1</sup>,  
ZHANG Dan-dan<sup>2</sup>, PAN Yan-shu<sup>1\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China  
2. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Anemarrhenae Rhizoma and Paeoniae Radix Rubra on *N*-methyl-*D*-aspartate receptors (NMDAR1) in hippocampal neurons in rats with vascular dementia and investigate its possible mechanism. **Method:** The 60 SPF male rats were randomly divided into normal group, sham-operated group, model group, traditional Chinese medicine group (0.20 g·kg<sup>-1</sup>) and memantine group (2.1 mg·kg<sup>-1</sup>), with 12 rats in each group. The model was established by repeated

**[收稿日期]** 20181108(009)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(8167150452); 西藏自治区藏医药区域协同创新中心第一批培育项目(2017XTCX014)

**[第一作者]** 郭洋洋, 在读硕士, 从事脑血管病的中西医防治研究, E-mail: guoyangyang39@163.com

**[通信作者]** \* 潘彦舒, 博士, 教授, 从事脑血管病的中西医防治研究, E-mail: 13911209998@163.com

ischemia-reperfusion combined with intraperitoneal injection of sodium nitroprusside. After modelling, normal group, sham-operated group and model group were dosed the similar volume of normal saline once a day for 14 days. The learning and memory capacity was assessed by Morris water maze; pathologic change in the CA1 district of hippocampus was assessed by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the expression level of NMDAR1 in hippocampal neuron membrane protein was detected by Western blot and immunohistochemistry (IHC), the NMDAR1 mRNA in hippocampal tissue was detected by Real-time PCR. **Result:** Compared with normal and sham-operated group, the latency period was prolonged in model group ( $P < 0.01$ ), the time in the platform quadrant and the frequency of crossing the platform were lessened significantly ( $P < 0.01$ ), the disorder of the neurons, the decrease of the neuronal number, and the neuronal necrosis and apoptosis were observed in the CA1 district, expression of membrane NMDAR1 of the hippocampal neuron and NMDAR1 mRNA were increased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with model group, the latency period of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Anemarrhenae Rhizoma and Paeoniae Radix Rubra group and memantine group were shortened significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the time and frequency were increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the pathologic change was improved markedly, the protein expression of membrane NMDAR1 in hippocampal neuron and NMDAR1 mRNA were decreased significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Anemarrhenae Rhizoma and Paeoniae Radix Rubra can improve the learning and memory capacity of rats with vascular dementia, and alleviate the injury in CA1 district of hippocampus. The mechanism may be related to the down-regulation of NMDAR1 expression in hippocampal neurons.

[**Key words**] extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Anemarrhenae Rhizoma and Paeoniae Radix Rubra; vascular dementia; learning and memorizing; hippocampus; *N*-methyl-*D*-aspartate receptors 1

血管性痴呆(VD)是由各种脑血管因素引起的脑功能减退而出现的以学习记忆能力下降和严重认知功能障碍为特征的痴呆综合征。2015年世界卫生组织(WHO)估计全世界有4 750万人患有痴呆症,预计到2050年,患病人数将增加2倍,达到1.355亿人,严重危害人类的生命健康。*N*-甲基-*D*-天门冬氨酸受体(NMDAR)是广泛分布于中枢神经系统的谷氨酸离子通道受体,它不仅通过调节钙离子内流,保持神经元正常的生理功能,而且参与中枢神经系统的发育,与学习和记忆功能密切相关<sup>[1]</sup>。研究表明脑缺血再灌注引起的神经元死亡主要与NMDAR有关<sup>[2]</sup>,且实验结果表明,在脑缺血早期,VD大鼠海马CA1区NMDAR1表达增多,加剧了谷氨酸的兴奋性毒性作用<sup>[3]</sup>,而谷氨酸兴奋性毒性被认为是VD的关键致病因素<sup>[4]</sup>。

虽然VD是唯一可以预防的痴呆类型<sup>[5]</sup>,但迄今尚无较理想的预防与治疗药物,已有临床研究表明,中医药治疗VD具有独特优势<sup>[6-7]</sup>,但具体的机制尚不明确。扶正解毒通络的中药在VD的治疗中被广泛应用,其中人参-知母-赤芍提取物组成的参知健脑方是基于王永炎院士的“正虚毒损络阻”理论,优化组方配伍而成,是治疗痴呆的协定处方药物。本课题组前期已经证明人参-知母-赤芍提取物

可以降低拟VD大鼠皮层中的神经递质Glu和GABA的含量,改善其学习记忆功能<sup>[8]</sup>。因此,本次实验采用3种中药的有效部位提取物根据临床用药比例1:3:3混合,以观察人参-知母-赤芍提取物对VD大鼠学习记忆能力和海马NMDAR1的影响,探讨其保护海马神经元的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级健康雄性SD大鼠,10周龄,体质量(240±20)g,购自北京维通利华实验动物有限公司,动物合格证号SCXK(京)2016-0006,饲养于北京中医药大学病理学三级科研实验室动物房,温度(22±1)℃,相对湿度40%~60%,自由饮水和进食,适应性饲养1周。本实验经过北京中医药大学医学实验动物伦理委员会批准,审核批号BUCM-4-2017121725-4025。

**1.2 药物** 人参提取物由金艾农生物科技有限公司提供,批号20170518,提取率为5%;知母、赤芍提取物由中日友好医院中药制剂室提供,经乙醇提取,过滤,滤液减压浓缩至无醇味,加水溶解,过滤,制成含生药0.2 kg·L<sup>-1</sup>的溶液,过大孔吸附树脂柱,蒸馏水洗涤除杂,乙醇洗脱,减压干燥得干膏粉,提取率为10%。所选药物均为道地药材,单味药成分人参皂苷Rb<sub>1</sub>,人参皂苷Rg<sub>1</sub>,人参皂苷Re,知母皂苷元,

芍药苷,由中日友好医院中试车间马秉志副主任医师鉴定均符合 2015 年版《中国药典》规定及标准,原方临床使用剂量为人参片 3 g,知母、赤芍各 9 g,根据提取率算出相应提取物的量,3 种提取物混合后用无菌蒸馏水配置为质量浓度为  $38 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的混悬液;盐酸美金刚片(丹麦灵北药厂,批号 697346),用无菌蒸馏水配置为质量浓度为  $0.42 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的混悬液;注射用硝普钠(华润双鹤药业股份有限公司,批号 18053112)。

**1.3 试剂** 膜蛋白和细胞组分分离提取试剂盒,膜蛋白溶解液(美国 Invent 公司,批号分别为 SM-005, WA-009);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号 KGP902);兔抗 NMDAR1 单克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号 ab68144);兔抗  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)多克隆抗体(美国 Proteintech 公司,批号 20536-1-AP);辣根过氧化物酶标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京普利莱公司,批号 C1309);BSA, DAB 显色试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为 G5001, G1211);trizol RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 15596018);cDNA 第一链合成试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司,批号 00587815); $2 \times$  UltraSYBR Mixture 试剂盒(北京康为世纪生物技术有限公司,批号 30223);PCR 引物由生工生物(上海)股份有限公司设计合成, $\beta$ -actin 上游引物 5'-GCAGTTGGTTGGAGCAA-3',下游引物 5'-ATGCCGTGGATACTTGA-3',长度为 114 bp;NMDAR1 上游引物 5'-ATGTGGTGGCTGTGATGCTGTAC-3',下游引物 5'-TTCCTCCTCCTCCTCACTGTTAC-3',长度为 198 bp。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 ZLI9610, ZLI9613)。

**1.4 仪器** YLS-3T 型跳台记录仪, Morris 型水迷宫视频分析系统(淮北正华生物仪器设备有限公司);RM2245 型病理切片机(德国徕卡仪器有限公司);BX53 型生物显微镜(日本 Olympus 公司);Multiskan GO 型酶标仪, Arktik 5020 型 PCR 扩增仪, (美国 Thermo 公司);1658001 型电泳槽, Trans-blot 型转印槽, CFX96 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪(美国 Bio-Rad 公司);FluorChem 5500 型凝胶图像分析系统(美国 Alpha 公司)。

## 2 方法

**2.1 造模及分组** 造模前先采用随机数字表法选出正常组、假手术组各 12 只,其余大鼠制作 VD

模型。采用双侧颈总动脉反复夹闭合并腹腔注射硝普钠的方法制作 VD 大鼠模型<sup>[9]</sup>。大鼠术前禁食 12 h,采用 10% 水合氯醛以  $0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量腹腔注射麻醉,颈部常规消毒,沿颈前正中切口,分离双侧颈总动脉,腹腔注射硝普钠  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。双侧颈总动脉用无创动脉夹阻断血流 10 min,再灌注 10 min,重复 3 次,伤口撒适量青霉素粉末,逐层缝合伤口放回笼中保温饲养。假手术组仅分离双侧颈总动脉,暴露同等时间后缝合伤口。在全部造模过程中保持动物肛温在  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  左右,以防止低温对脑缺血损伤的保护作用。

造模后第 2 天采用跳台实验评定 VD 模型<sup>[10]</sup>。实验开始前,将 2 只动物同时分别置于 2 个大鼠跳台反应箱的隔间内,适应 3 min,熟悉环境,通以 40 V 的交流电,持续 5 min,开始测试时将大鼠放于测试箱平台,开始计时,第一次跳到铜栅上所需时间记为潜伏期,5 min 内从跳下铜栅再跳回平台上的次数算作错误次数,潜伏期和错误次数作为测试学习成绩。将造模后大鼠的学习及记忆成绩与正常组比较,以单因素方差分析显著性水平,评定 VD 模型。将造模成功的 36 只大鼠,随机分为模型组、人参-知母-赤芍提取物组、美金刚组,每组 12 只。

**2.2 药物干预** 人参-知母-赤芍提取物组成的方药临床使用剂量为人参片 3 g,知母 9 g,赤芍 9 g,根据提取率算出相应提取物的量,以人临床剂量按动物体表面积换算,参考前期参知健脑方的药效学实验研究结果<sup>[11]</sup>,本次实验的给药剂量为  $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,相当于中等有效剂量。造模后第 2 天,人参-知母-赤芍提取物组按照  $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  剂量灌胃;美金刚组按照  $2.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃,而正常组、假手术组和模型组给予  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  生理盐水灌胃,1 次/d,14 d 后取材。

**2.3 Morris 水迷宫测试** 各组大鼠在给药第 10 天开始水迷宫测试。定位航行实验历时 4 d,每天训练 4 次,每次训练间隔 60 s。训练时随机选择一个入水点入水(4 次分别从 4 个象限入水),将大鼠面向池壁放入水中,迫使大鼠学习寻找设于水面以下的平台。记录 60 s 内寻找平台所需时间,即逃避潜伏期。如果大鼠入水 60 s 内未能找到平台,则将其引导至平台,并在平台停留 10 s,逃避潜伏期记录为 60 s。定位航行实验结束后进行空间探索实验,撤除平台,选平台相对象限为入水点,将大鼠面向池壁放入水中,记录 60 s 内进入原平台象限的时间及跨越原平台位置的次数。整个水迷宫过程中维持水温

在 20 ~ 22 ℃, 每天水迷宫结束后将每只大鼠擦干放回笼中饲养。

**2.4 样本处理及苏木素-伊红(HE)染色观察大鼠海马 CA1 区的病理改变** 水迷宫测试结束后, 每组随机选取 6 只大鼠, 大鼠经 10% 水合氯醛(350 mg·kg<sup>-1</sup>) 麻醉后迅速断头, 在冰盒上快速分离双侧海马组织, 置于液氮中快速冷冻, 再转移到 -80 ℃ 冰箱冷冻保存待测。其余大鼠麻醉后, 经心脏灌注 37 ℃ 生理盐水 50 ~ 100 mL, 再先快后慢灌注含 4% 多聚甲醛的磷酸缓冲液(0.1 mol·L<sup>-1</sup>, pH 7.2) 100 mL, 30 min 灌注完毕。取出整脑, 在上述固定液内浸泡 12 h。经过石蜡包埋、冠状切片, HE 染色, 于光镜下观察各组大鼠海马 CA1 区的病理改变。

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马神经元膜蛋白 NMDAR1 的表达** 按照膜蛋白和细胞组分分离试剂盒说明, 分离海马神经元总膜蛋白, 膜蛋白组分加入膜蛋白溶解液充分溶解, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。将等量蛋白样品与上样缓冲液按比例混合, 100 ℃ 水浴锅加热 10 min, 使蛋白充分变性, 电泳分离蛋白, 再将蛋白电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭后, PVDF 膜与 NMDAR1 抗体(1:2 000),  $\beta$ -actin 抗体(1:50 000) 于 4 ℃ 反应过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。后与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:2 000) 室温反应 1 h, ECL 试剂盒显色曝光, 将曝光后的底片扫描, 用 FlourChem 软件分析 NMDAR1 与  $\beta$ -actin 条带灰度值的比值, 作为其各自的相对表达量。

**2.6 免疫组化法检测大鼠海马 NMDAR1 的表达** 石蜡切片常规二甲苯脱蜡复水后, 柠檬酸修复液高温高压抗原修复, 自然冷却至室温, 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 3 次, 每次 3 min, 3% 双氧水溶液室温孵育 10 min, 3% BSA 封闭, 滴加 NMDAR1 一抗(1:100), 4 ℃ 孵育过夜。PBS 洗 3 次, 再滴加适量生物素标记的二抗工作液, 37 ℃ 孵育, DAB 显色, 复染, 脱水, 透明, 封片。光学显微镜下观察, 棕褐色为阳性表达。采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件进行半定量分析, 每张切片随机选取 5 个海马 CA1 区不重复的高倍视野, 计算阳性染色积分吸光度 IA 和阳性区域的面积, 分别取其平均值进行分析, 蛋白相对表达量以平均 IA 表示。

**2.7 Real-time PCR 检测海马组织 NMDAR1 mRNA 的表达** 用 trizol 破碎各组大鼠海马组织, 4 ℃,

12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min 取上清, 依次加入三氯甲烷和异丙醇等提取总 RNA; 根据 cDNA 第一链合成试剂盒说明书进行逆转录反应, 反应条件为 42 ℃ 60 min, 70 ℃ 5 min。PCR 扩增条件为 95 ℃ 预变性 15 s, 95 ℃ 变性 10 s, 55 ℃ 退火 30 s, 共 39 个循环。反应结束后, 读取 PCR 软件内循环阈值, 采用  $\Delta\Delta C_t$  法处理结果, 以  $\beta$ -actin 为内参, 用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示 NMDAR1 mRNA 的相对表达量。

**2.8 统计学方法** 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 若数据呈正态分布且方差齐, 采用单因素方差分析 One-way ANOVA 统计, 组间多重比较采用 LSD 检验; 方差不齐者采用非参数检验统计,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 模型评定** 与正常组和假手术组比较, 模型组大鼠学习与记忆成绩的潜伏期显著缩短( $P < 0.01$ ), 错误次数显著增加( $P < 0.01$ ), 表明 VD 模型组大鼠学习记忆成绩显著低下, 造模成功。见表 1。

表 1 学习记忆成绩检测结果( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Learning and memory test results( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	n	潜伏期/s	错误次数/次
正常	-	12	122.42 ± 37.68	1.83 ± 0.94
假手术	-	12	112.08 ± 39.20	2.33 ± 0.98
模型	2.5	36	44.03 ± 18.57 <sup>1,2)</sup>	3.39 ± 1.54 <sup>1,2)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ , 与假手术组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 对大鼠定位航行潜伏期的影响** 与正常组和假手术组比较, 模型组大鼠的逃避潜伏期显著延长( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 人参-知母-赤芍提取物组, 美金刚组大鼠的平均逃避潜伏期明显缩短( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2。

**3.3 对大鼠空间探索实验的影响** 与正常组和假手术组比较, 模型组大鼠在平台象限停留的时间和穿越平台位置的次数显著减少( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 人参-知母-赤芍提取物组, 美金刚组大鼠在平台象限停留的时间明显增加( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 穿越平台位置的次数明显增加( $P < 0.05$ )。见表 3。

**3.4 对大鼠海马组织病理形态的影响** 正常组、假手术组大鼠海马 CA1 区神经元形态、结构正常, 细胞排列整齐紧密, 层次丰富, 核仁清晰, 胞质丰富。VD 模型组海马 CA1 区细胞层次和数量减少, 胞体缩小, 细胞排列散乱, 有神经元丢失, 核固缩现象。

表 2 人参-知母-赤芍提取物对大鼠定位航行潜伏期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 2 Effect of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Anemarrhenae Rhizoma and Paeoniae Radix Rubra on directional navigation incubation period of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
正常	-	41.66 ± 9.74	31.80 ± 13.93	21.23 ± 6.76	14.84 ± 5.86
假手术	-	44.30 ± 7.44	32.20 ± 12.25	21.29 ± 9.54	15.96 ± 4.62
模型	2.5	52.22 ± 7.19 <sup>1,2)</sup>	46.89 ± 12.18 <sup>1,2)</sup>	34.47 ± 11.51 <sup>1,2)</sup>	28.30 ± 8.54 <sup>1,2)</sup>
人参-知母-赤芍提取物	200	47.43 ± 8.95	36.05 ± 11.94 <sup>3)</sup>	24.59 ± 8.41 <sup>4)</sup>	17.51 ± 7.82 <sup>4)</sup>
美金刚	2.1	50.42 ± 8.15	37.20 ± 12.06	26.62 ± 13.60 <sup>3)</sup>	18.74 ± 7.45 <sup>4)</sup>

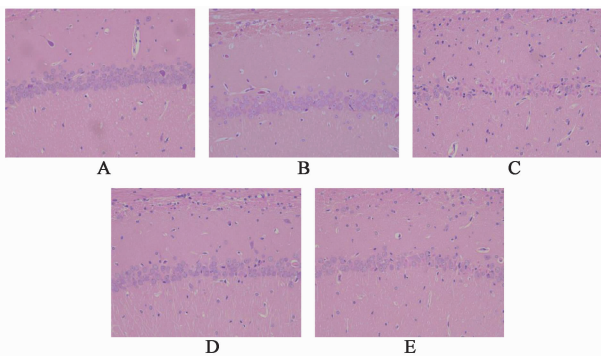
注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ,与假手术组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 3,4 同)。

表 3 人参-知母-赤芍提取物对大鼠空间探索能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 3 Effect of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Anemarrhenae Rhizoma and Paeoniae Radix Rubra on spatial probe test of rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	目标象限停留时间/s	穿越平台位置次数/次
正常	-	20.38 ± 4.24	3.33 ± 1.50
假手术	-	19.65 ± 4.72	3.17 ± 1.40
模型	2.5	12.66 ± 3.67 <sup>1,2)</sup>	1.67 ± 0.89 <sup>1,2)</sup>
人参-知母-赤芍提取物	200	18.57 ± 4.34 <sup>4)</sup>	2.92 ± 1.38 <sup>3)</sup>
美金刚	2.1	16.98 ± 5.57 <sup>3)</sup>	2.75 ± 1.36 <sup>3)</sup>

人参-知母-赤芍提取物组海马 CA1 区细胞排列较疏松,细胞形态和数量较模型组有改善。美金刚组海马 CA1 区细胞层次减少,排列疏松,细胞形态较模型组均有明显改善。见图 1。



A. 正常组;B. 假手术组;C. 模型组;D. 人参-知母-赤芍提取物组;E. 美金刚组(图 2,3 同)

图 1 人参-知母-赤芍提取物对大鼠海马 CA1 区病理变化的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Anemarrhenae Rhizoma and Paeoniae Radix Rubra on pathological changes of hippocampal CA1 of rats (HE, ×200)

### 3.5 对大鼠海马神经元胞膜 NMDAR1 蛋白及 mRNA 表达的影响

与正常组和假手术组比较,

模型组大鼠海马神经元膜 NMDAR1 蛋白及 mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,人参-知母-赤芍提取物组海马膜蛋白 NMDAR1 明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 2,3 及表 4。

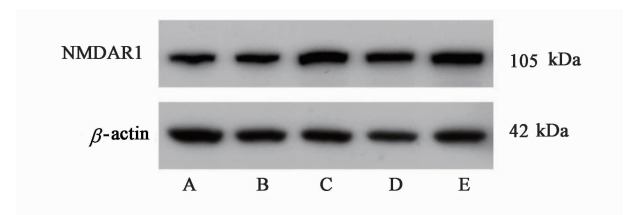


图 2 大鼠海马神经元胞膜 NMDAR1 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of NMDAR1 protein in hippocampal neurons membrane of rats

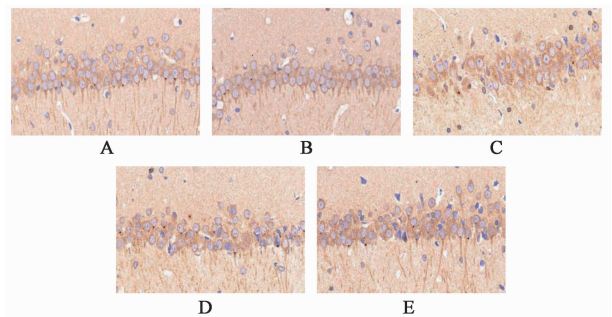


图 3 人参-知母-赤芍提取物对海马神经元 NMDAR1 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Anemarrhenae Rhizoma and Paeoniae Radix Rubra on protein expression level of NMDAR1 in hippocampal neurons of rats (IHC, ×400)

## 4 讨论

VD 是由各种脑血管疾病引起脑组织损害所致的痴呆,是最常见的痴呆类型之一,也是目前唯一可防治的痴呆性疾病,早期进行干预治疗,有望使病情逆转<sup>[12]</sup>。根据最新流行病学统计<sup>[13]</sup>,欧美等国家 VD 患者占痴呆总患者的 10% ~ 20% ;

表 4 人参-知母-赤芍提取物对大鼠海马神经元 NMDAR1 蛋白及 NMDAR1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 4 Effect of extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Anemarrhenae Rhizoma and Paconiae Radix Rubra on mRNA and protein expression of NMDAR1 in hippocampal neurons in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	NMDAR1/ $\beta$ -actin	NMDAR1/IA	NMDAR1 mRNA
正常	-	0.97 ± 0.02	0.085 ± 0.017	1
假手术	-	0.96 ± 0.04	0.096 ± 0.021	1.14 ± 0.55
模型	2.5	1.20 ± 0.02 <sup>1,2)</sup>	0.148 ± 0.006 <sup>1,2)</sup>	1.90 ± 0.85 <sup>1,2)</sup>
人参-知母-赤芍提取物	200	1.07 ± 0.03 <sup>4)</sup>	0.119 ± 0.022 <sup>4)</sup>	1.22 ± 0.65 <sup>3)</sup>
美金刚	2.1	1.18 ± 0.05	0.130 ± 0.012	1.24 ± 0.76 <sup>3)</sup>

我国 VD 的患病率为 1.1% ~ 3.0%，年发病率在 (5~9)/1 000 人。对于 VD 的治疗，西医主要从预防卒中，改善脑代谢、脑循环，神经元保护等方面进行治疗，具有代表性的药物包括胆碱酯酶抑制剂、谷氨酸受体拮抗剂、钙离子阻滞剂等，虽然短期内能够改善患者的认知功能，但并不能有效的阻止神经细胞的继发性凋亡和迟发性坏死<sup>[14]</sup>。中医药治疗 VD 历史悠久，疗效确切。中药治疗有望能提高 VD 的治疗效果，发挥其多靶点治疗的优势。VD 属于中医“呆病”的范畴，王永炎院士指出，VD 的发病以精气亏虚为本，风火痰瘀为标，而且率先将“毒邪”“络病”理论联系起来认识卒中后痴呆的病机为“毒损脑络”，而扶正解毒通络是治疗 VD 的关键<sup>[15]</sup>。在前期的研究中，人参知母赤芍组成的参知健脑方已被证明，对  $A\beta$  引起的神经元毒性损害有保护作用<sup>[16]</sup>，对阿尔茨海默病细胞模型的凋亡有一定的保护作用<sup>[17]</sup>，对缺氧致 AD 细胞模型可以有效的保护缺氧诱导的细胞死亡，保护线粒体的活性，改善线粒体 DNA 损伤，抑制毒性线粒体  $A\beta$  积累<sup>[18]</sup>。本实验采用人参知母赤芍提取物，有效成分为人参皂苷、知母皂苷元、芍药苷，均有改善脑内神经递质含量、保护神经元和突触、抗脑缺血、清除自由基等，从而提高学习能力，改善痴呆的作用<sup>[19]</sup>。

NMDAR 是离子型谷氨酸受体的一种，在中枢神经系统中既参与了学习与记忆的生理过程，又与脑缺血缺氧时发生的谷氨酸兴奋性毒性作用密切相关。当发生脑缺血、缺氧性损伤时，细胞间隙的谷氨酸过高致使 NMDAR 过度激活，引起细胞膜内外离子失衡，产生神经毒性效应，使得神经细胞损伤或死亡。有研究表明，海马神经元表面与记忆密切相关的 NMDAR 在老化和变性脑中发生显著的变化<sup>[20]</sup>，但其机制不清楚。对于  $\alpha$ -突触核蛋白 ( $\alpha$ -Syn) 对原代海马神经元膜表面 NMDAR 含量和功能的调节，

可能是通过促进 NMDAR 的内在化，使神经元膜表面功能性的 NMDAR 减少<sup>[21-22]</sup>。以上研究表明 VD 发生后谷氨酸大量增多，过度激活了神经元膜 NMDAR，从而导致兴奋毒性增强，最终导致神经元死亡。

本研究发现，采用反复夹闭双侧颈总动脉配合腹腔注射硝普钠的方法造成的拟血管性痴呆大鼠模型，学习和记忆能力明显减退，海马 CA1 区神经元出现损伤和丢失，而且海马神经元胞膜和海马组织 NMDAR1 表达较正常组明显增多，而人参-知母-赤芍提取物能够改善 VD 大鼠的学习记忆能力，减轻海马 CA1 区神经元的损伤，降低海马神经元胞膜及海马组织 NMDAR1 表达。美金刚组海马神经元胞膜 NMDAR1 表达与模型组没有显著差异，海马组织 NMDAR1 mRNA 的表达显著降低，可能与美金刚通过拮抗 NMDAR 发挥药理作用有关，其发挥脑保护作用可能与其抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 介导的细胞凋亡通路、减少自由基的产生以及减少 DNA 断裂来减少神经细胞死亡有关<sup>[23]</sup>。

综上所述，人参-知母-赤芍提取物可改善 VD 大鼠学习与记忆能力，减轻海马 CA1 区神经元损伤，其机制可能与下调海马神经元膜表面和海马组织中的 NMDAR1 的表达，减少谷氨酸的兴奋性毒性，从而发挥对 VD 大鼠海马神经元的保护作用有关。

[参考文献]

[1] LI N, LIU R J, Dwyer J M, et al. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. [J]. Biol Psychiat, 2011, 69(8):754-761.

[2] 王业梅, 胡建鹏, 程惠娟. 两种中药复方对脑缺血再灌注大鼠脑组织 Glu 含量及 NMDA 受体亚单位 NR1 表达的影响 [J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(12): 33-34.

- [ 3 ] 姚国恩,王景周,陈曼娥. 血管性痴呆大鼠认知障碍的 NMDAR 机制研究[J]. 第三军医大学学报,2002,(12):1408-1410.
- [ 4 ] Ashby E L, Kierzkowska M, Hull J, et al. Altered expression of human mitochondrial branched chain aminotransferase in dementia with lewy bodies and vascular dementia[J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(1): 306-319.
- [ 5 ] Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia[J]. *Neuron*, 2013, 80(4):844-866.
- [ 6 ] 刘雪景. 补阳还五汤治疗血管性痴呆临床观察[J]. 北方药学,2017,14(2):97.
- [ 7 ] 蔡颖颖,蒋卫民. 中医药干预血管性认知障碍的研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(10):1837-1841.
- [ 8 ] 马克信,韩振蕴,马大勇,等. 参知健脑胶囊对拟血管性痴呆大鼠模型皮层和海马中 Glu 和 GABA 的影响[J]. 辽宁中医杂志,2016,43(11):2421-2424.
- [ 9 ] 王蕊,杨秦飞,唐一鹏,等. 大鼠拟血管性痴呆模型的建立及中药 9602 防治作用初探[J]. 北京中医药大学学报,2000,23(5):30-32.
- [ 10 ] 王频,汤敬一,杨骏,等. 艾灸对血管性痴呆大鼠海马内 VEGF、flt-1、bFGF 及 bFGF-r 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2012,32(1):97-101.
- [ 11 ] 马克信,韩振蕴,张韩瑜嘉,等. 参知健脑胶囊对脑缺血大鼠局部脑血流量的影响[J]. 吉林中医药,2018,38(1):72-75.
- [ 12 ] Thal D R, Grinberg L T, Attems J. Vascular dementia: different forms of vessel disorders contribute to the development of dementia in the elderly brain[J]. *Exp Gerontol*, 2012, 47(11):816-824.
- [ 13 ] 王枫,刘敬霞,顾玉宝,等. 血管性痴呆的中医研究进展和治疗现状[J]. 辽宁中医杂志,2016,43(9):1997-2000.
- [ 14 ] Erkinjuntti T, Román G, Gauthier S, et al. Emerging therapies for vascular dementia and vascular cognitive impairment[J]. *Stroke*, 2004, 35(4):1010-1017.
- [ 15 ] 田金洲,王永炎,刘岷,等. 血管性痴呆发病机理的研究[J]. 中医杂志,2003,44(8):565-567.
- [ 16 ] 杨傲然. 参知健脑片组分配伍对拟阿尔茨海默病细胞模型的保护作用及机制探讨[D]. 北京:北京中医药大学,2007.
- [ 17 ] 杨傲然,田昕,钟华,等. 参知健脑片组方配伍对 A $\beta$  致阿尔茨海默病细胞模型细胞周期和凋亡率的影响[J]. 中华中医药学刊,2010,28(3):562-564.
- [ 18 ] 牛美英. 参知健脑方对缺氧致 AD 细胞模型线粒体损伤的保护机制的实验研究[D]. 北京:北京中医药大学,2016.
- [ 19 ] 马大勇,韩振蕴,范吉平,等. 参知健脑胶囊对记忆障碍小鼠模型行为学的影响[J]. 中国医药导报,2012,9(7):32-34.
- [ 20 ] Foster T C, Kyritsopoulos C, Kumar A. Central role for NMDA receptors in redox mediated impairment of synaptic function during aging and Alzheimer's disease[J]. *Behav Brain Res*, 2017, 322(Pt B):223-232.
- [ 21 ] 于文娇,杨巍巍,李昕,等.  $\alpha$ -突触核蛋白通过 Rab5B 下调海马神经元膜表面 NMDA 受体含量及其介导的 Ca<sup>2+</sup>内流和内向电流[J]. 首都医科大学学报,2017,38(6):868-873.
- [ 22 ] CHENG F, LI X, LI Y, et al. Alpha-Synuclein promotes clathrin-mediated NMDA receptor endocytosis and attenuates NMDA-induced dopaminergic cell death[J]. *J Neurochem*, 2011, 119(4):815-825.
- [ 23 ] 赵宝敏,张楠,程焱. 盐酸美金刚对血管性痴呆大鼠 N-甲基-D 天冬氨酸受体的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2015,17(3):303-306.

[责任编辑 孙丛丛]