

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.21.018

益肺宣肺降浊方对血管性痴呆大鼠脑组织海马 CaMPK-II 及突触蛋白表达的影响

吴 林¹, 赵海涛¹, 陈 炜², 郑福奎², 曾东娟¹, 白硕宇¹, 唐 农^{*}

(1. 广西中医药大学, 广西壮族自治区南宁市青秀区仙湖经济开发区五合大道 13 号, 530029; 2. 广西中医药大学第一附属医院)

[摘要] 目的 探讨益肺宣肺降浊方治疗血管性痴呆的可能作用机制。方法 165 只 SD 大鼠造模前随机选出 24 只作为假手术组, 其余 141 只大鼠采用结扎双侧颈总动脉阻断血流法建立血管性痴呆模型, 将造模成功的 96 只大鼠随机分为中药高、中、低剂量组和模型组、石杉碱甲组、脑复康组, 每组 16 只。造模第 15 天开始灌胃给药, 中药高、中、低剂量组分别给予益肺宣肺降浊方 24.36、12.18、6.09 g/(kg·d), 石杉碱甲组、脑复康组分别给予石杉碱甲片、脑复康片 0.15 mg/(kg·d), 模型组及假手术组均予等体积双蒸水。各组均灌胃 30 天后采用 Western blot 法检测大鼠脑组织海马钙调素依赖性蛋白激酶 II (CaMPK-II) 及突触蛋白水平。结果 模型组大鼠脑组织海马 CaMPK-II、突触蛋白表达均明显低于假手术组 ($P < 0.05$), 石杉碱甲组、脑复康组和中药中、高剂量组 CaMPK-II、突触蛋白表达均较模型组升高 ($P < 0.05$), 并且以中药高剂量组 CaMPK-II 升高最明显 ($P < 0.05$)。结论 益肺宣肺降浊方可能通过上调脑组织海马 CaMPK-II、突触蛋白表达, 改善学习和记忆功能, 从而治疗血管性痴呆。

[关键词] 血管性痴呆; 益肺宣肺降浊方; 钙调素依赖性蛋白激酶 II; 突触蛋白

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是由脑血管病变引起的学习、记忆及认知障碍。学习、记忆及认知功能是大脑的高级功能, 其中枢主要位于海马, 而突触又是神经元联系及信息传递的重要部位, 其中突触前囊泡膜蛋白钙调素依赖性蛋白激酶 II (CaMPK-II) 及突触蛋白 (synapsin) 是参与学习、记忆及长时程增强效应诱导的一类重要蛋白^[1], 而长时程增强效应是学习记忆的分子基础。我们认为, 血管性痴呆的中医病因为肺气不足, 宣降失司, 从而导致大肠功能不能正常传导, 形成的浊毒及糟粕不能及时排除, 上扰清窍所致^[2], 因此可以从肺论治。前期研究结果显示, 益肺宣肺降浊方治疗血管性痴呆患者疗效肯定^[3]。本研究观察益肺宣肺降浊方对血管性痴呆大鼠海马 CaMPK-II 及突触蛋白活性的影响, 探讨其治疗血管性痴呆的可能作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级大鼠 165 只, 雄性, 3 月龄, 体重

(200 ± 20) g, 由湖南斯南莱克景达实验动物有限公司提供, 实验动物合格证号: 43004700002251。

1.2 实验药品及试剂

益肺宣肺降浊方组成: 黄芪 15 g, 人参 15 g, 麦冬 15 g, 桔梗 10 g, 苦杏仁 10 g, 三七粉 15 g, 苏子 15 g, 石菖蒲 15 g, 酒大黄 6 g, 免煎颗粒由江苏江阴天江药业有限公司生产, 批号: 1406033。石杉碱甲片 (双益平): 上海复旦复华药业有限公司生产, 批号: 130403; 脑复康片: 湖南迪诺制药有限公司生产, 批号: H43020666; 头孢氨苄缓释片 (美丰): 江苏豪森药业股份有限公司生产, 批号: H32022936; 水合氯醛: 上海碧云天生物技术有限公司, 批号: H37022673; CaMPK-II (货号: 3361s) 及突触蛋白 (货号: 5297s) 免疫蛋白印迹试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

MT-200 型 Morris 水迷宫: 成都泰盟科技有限公司; 电泳仪: 北京百晶生物技术有限公司; 低速离心机: 德国 Sigma 公司; 转移电泳槽、垂直电泳槽: 美国 Bio-Rad 公司; 大鼠脑立体定位仪: 天津市医疗器械研究所 (型号: NDY-2 型)。

基金项目: 国家自然科学基金 (81160435)

* 通讯作者: ntang@gxtcmu.cn, (0771) 3116641

1.4 造模方法

参照文献 [4] 建立血管性痴呆大鼠模型, 165 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周, 术前 8 ~ 12 h 禁食, 自由饮水, 经 10% 水合氯醛 3 ml/kg 腹腔注射麻醉后, 固定于大鼠脑立体定位仪上。大鼠颈部去毛, 常规消毒后, 行颈正中切口, 依次应用玻璃分针分离出双侧颈总动脉并用 0 号丝线结扎, 术中勿牵拉刺激迷走神经, 阻断血流 20 min, 同时在大鼠距尾尖 1 cm 处断尾, 放血约 0.3 ml, 然后松开丝线恢复血流 10 min, 再次阻断血流 20 min, 如此重复 3 次。第 3 次血流再灌注后观察呼吸、心跳均平稳, 切口给予适量抗生素预防感染后, 即行缝合皮肤, 放回笼中正常饲养, 饲养喂水加入头孢氨苄缓释片抗感染 3 天。假手术组只分离双侧颈总动脉不结扎也不阻断。

造模 10 天后采用 Morris 水迷宫法^[5]进行血管性痴呆模型筛选。Morris 水迷宫置于房间的中央, 水池内壁被漆为黑色, 池水用黑炭墨均匀染成黑色, 水温保持在 $(22 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 。将水迷宫水池等分为 4 个象限, 即第一、第二、第三、第四象限, 在第二象限中心放置一黑色平台, 平台为圆形, 直径 11 cm, 平台高 28 cm (即平台低于水面 2 cm, 称隐藏平台)。有一小型摄像机安装在水迷宫正上方 2 cm 高处, 记录大鼠定位航行实验中的逃避潜伏期时间及空间探索中的跨越平台次数, 共进行 6 天。1) 定位航行实验: 共进行 5 天, 每天按顺序从水迷宫水池的 4 个起点将大鼠面向池壁放入池中 (大鼠头向上, 以防溺水), 记录其 60 s 内成功进驻平台 (大鼠找到平台并滞留其上 5 s 为成功) 所需时间 (即逃避潜伏期)。如果大鼠在 60 s 内不能成功进驻平台, 则将其引上平台并令其停留 10 s, 记录逃避潜伏期为 60 s, 每次训练时间间隔至少 1 min。每天 4 次潜伏期的算术均数作为这一天的成绩。2) 空间探索实验: 定位航行实验结束后的第二天撤除平台, 按顺序从不同等分水池的 4 个起点将大鼠面向池壁放入池中, 分别记录 1 min 内大鼠跨越第二象限平台次数, 取四个象限的算术平均值作为最终成绩。参照文献 [6] 标准进行筛选, 即以假手术组大鼠逃避时间的均值为参考值, 计算模型组大鼠的平均逃避潜伏期与参考值之差占该鼠的平均逃避潜伏期时间的比例, 该值 $> 20\%$ 定为血管性痴呆大鼠。造模组大鼠成功个数占造模组大鼠总数的比率为造模成功率。

1.5 动物分组及给药

165 只大鼠造模前先采用随机数字表法选出 24

只作为假手术组, 其余 141 只大鼠造模。造模期间假手术组大鼠死亡 2 只, 141 只造模大鼠死亡 12 只, 经水迷宫法筛选出血管性痴呆大鼠 96 只进行后续实验。将造模成功大鼠按随机数字表法分为中药高、中、低剂量组和模型组、石杉碱甲组、脑复康组, 每组 16 只。造模第 15 天开始灌胃给药, 中药高、中、低量组分别给予益肺宣肺降浊方 24.36、12.18、6.09 g/(kg · d), 每日 1 次; 石杉碱甲组、脑复康组分别给予石杉碱甲片、脑复康片 0.15 mg/(kg · d), 每日 1 次。模型组及假手术组均予等体积的双蒸水灌胃。各组均灌胃 30 天。

1.6 观察指标及方法

采取断头低温新鲜取脑, 用 10% 的水合氯醛 0.3 g/kg 腹腔注射麻醉, 然后迅速将大鼠断头, 在冰台上分离出海马, 然后放入 -80°C 液氮中保存备用。取 EP 管, 把组织剪切成小块装入 EP 管中, 称重。按每 20 mg 组织加 200 ~ 400 μl 的比例加入裂解液, 用手握式电动组织细胞匀浆器匀浆约 1 min 或直至充分裂解, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清, 即可进行 Western blot 法检测海马 CA1 区 CaMPK-II 及突触蛋白水平。CaMPK-II 表达采用 CaMK II (D11A10)、CaMK II (Thr286) 两种抗体, 并显示上下两组条带。突触蛋白采用突触蛋白 I、突触蛋白 II 两种亚型表示。每组蛋白均进行 3 次检测, 计算其平均灰度值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用单因素方差分析, 所有的统计检验均采用双侧检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠海马 CaMPK-II 表达比较

表 1 示, 模型组 CaMPK-II 表达明显低于假手术组 ($P < 0.05$); 石杉碱甲组、脑复康组和中药低、中、高剂量组 CaMPK-II 表达均较模型组升高 ($P < 0.05$), 并且以中药高剂量组升高最明显 ($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠海马突触蛋白表达比较

表 2 示, 模型组突触蛋白表达均明显低于假手术组 ($P < 0.05$); 石杉碱甲组、脑复康组和中药中、高剂量组突触蛋白表达均较模型组升高 ($P < 0.05$); 与石杉碱组比较, 脑复康组突触蛋白表达升高明显 ($P < 0.05$)。中药中、高剂量组突触蛋白

表达显著高于中药低剂量组，并且中药高剂量组突触蛋白 I 表达高于中药中、低剂量组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠海马 CA1 区 CaMPK-II 表达
平均灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	CaMPK-II (D11A10)	CaMPK-II (Thr286)
假手术组	22	0.49 ± 0.22	0.67 ± 0.50
模型组	16	0.07 ± 0.04*	0.17 ± 0.06*
石杉碱甲组	16	0.31 ± 0.11 [△]	0.58 ± 0.14 [△]
脑复康组	16	0.47 ± 0.23 [△]	0.82 ± 0.13 ^{△▲}
中药低剂量组	16	0.26 ± 0.13 ^{△#▼}	0.48 ± 0.10 ^{△#▼}
中药中剂量组	16	0.37 ± 0.07 ^{△▼}	0.63 ± 0.13 ^{△▼}
中药高剂量组	16	0.61 ± 0.17 ^{△▲#}	0.90 ± 0.04 ^{△▲}

注: CaMPK-II, 钙调素依赖性蛋白激酶 II; 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与石杉碱甲组比较, $\Delta P < 0.05$; 与脑复康组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药中剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠海马 CA1 区突触蛋白阳性区
平均灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	突触蛋白 I	突触蛋白 II
假手术组	22	0.75 ± 0.11	0.55 ± 0.08
模型组	16	0.29 ± 0.10*	0.29 ± 0.03*
石杉碱甲组	16	0.36 ± 0.13 [△]	0.44 ± 0.04 [△]
脑复康组	16	0.71 ± 0.19 ^{△▲}	0.62 ± 0.05 ^{△▲}
中药低剂量组	16	0.33 ± 0.12 [#]	0.32 ± 0.18 [#]
中药中剂量组	16	0.55 ± 0.03 ^{△▽}	0.47 ± 0.10 ^{△▽}
中药高剂量组	16	0.76 ± 0.06 ^{△▲▽▼}	0.53 ± 0.07 ^{△▽}

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与石杉碱甲组比较, $\Delta P < 0.05$; 与脑复康组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药中剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨论

我们认为，血管性痴呆的主要病因就是大脑的缺血缺氧，与肺之宣发障碍有直接关系，记忆的不同程度丧失则与肺之肃降障碍密切相关，因为记忆的丧失实际上是肾的“藏纳”功能障碍。肾为封藏之本，其功能都与主藏直接相关，而肾藏精，主骨生髓，脑为髓海，肾所藏之精皆储于脑，故肾封藏的能力直接关系着髓海的盈亏，若肾之收藏不利，就会直接影响到信息的存储。而肾之“藏”是以肺之“收”为前提的，肺是启动记忆存储过程的关键环节^[7]。前期临床研究表明，益肺宣肺降浊方对血管性痴呆患者的记忆、认知等功能有明显改善作用^[8]。方中黄芪和人参二药相须为用，黄芪性微温、味甘，归肺、脾经，《神农本草经》列为上品，为补气之圣药，云“人参，味甘微寒，主补五脏，安精神，止惊悸，……开心益智，

久服轻身延年”。肺主气，主宣降，朝百脉。肺得人参补益，肺气充盛，其助肾则藏精生髓，助脾则散布精气，助心则资宗气运血脉，助肝则柔筋疏泄，故人参亦为主药之一。麦冬，味甘，性微苦寒，归心、肺、胃经，滋阴生津、降气润肺；桔梗，味苦、辛，性平，具有宣通肺气之效；苏子，味辛，性温，归肺、大肠经，降气消痰，润肠通便；三七，性温，味辛，具有散瘀通络的功效；石菖蒲，味辛、苦，性微温，归心、肝、脾经，芳香开散，健胃醒脾，以资后天之本，保生化之源；酒大黄，味苦，性寒，归胃、大肠经，具有通便降浊的功效。诸药相合，补而不腻，温而不燥，既可益肺宣肺、健脾醒胃治本，又能通络祛痰、通腑降浊除标，从而真正达到“升清”和“降浊”双重功用。

突触是神经系统内进行信息传递的结构基础，突触蛋白是一种位于突触囊泡的膜蛋白，其基因功能的缺陷能够造成突触囊泡数目的减少和神经递质释放的明显改变^[9]。突触蛋白有 10 个亚型，其中突触蛋白 I、突触蛋白 II 研究较多。突触蛋白 I、突触蛋白 II 通过磷酸化及去磷酸化作用调节神经递质的释放，磷酸化后作用于囊泡释放池释放囊泡、囊泡与突触前膜的着位融合和囊泡的再循环等几个环节以调节神经递质的释放^[10]。突触蛋白有多个磷酸化位点，是蛋白激酶依赖性底物，痴呆后突触蛋白 I、突触蛋白 II 合成减少，神经细胞内钙超载，引起 CaMPK-II 活性及表达降低^[11]。CaMPK-II 是脑内含量最丰富的蛋白激酶，并且它的自身磷酸化是记忆的一种分子机制。CaMPK-II 含量减少及活性降低直接影响学习和记忆^[12]。本研究结果显示，益肺宣肺降浊方可提高血管性痴呆模型大鼠海马突触蛋白 I、突触蛋白 II 及 CaMPK-II 表达及活性，改善大鼠学习及记忆功能，其可能是益肺宣肺降浊方防治血管性痴呆的作用机制之一。

参考文献

- [1] 张冰清, 王玉良. 血管性痴呆大鼠海马 synapsin I 及其磷酸化水平的动态变化 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(10): 1980-1984.
- [2] 关姝明, 杨晓波. 血管性痴呆病因病机与发病机制研究概况 [J]. 实用中医内科杂志, 2014, 28(8): 178-181.
- [3] 唐农, 胡跃强, 吴林, 等. 益肺宣肺降浊胶囊对血管性痴呆患者的疗效及脑神经递质的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(10): 2108-2110.
- [4] 吕佩源, 王伟斌, 尹昱, 等. 石杉碱甲对血管性痴呆小

- 鼠额叶皮层和海马 cAMP 水平的影响 [J]. 中华神经科杂志, 2005, 38(5): 325-327.
- [5] Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I, et al. Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease [J]. J Neural Transm, 2005, 112(6): 813-838.
- [6] 赵宪林, 方秀斌, 李东培. 大鼠血管性痴呆模型制作 [J]. 中国医科大学学报, 2002, 31(3): 166-167.
- [7] 唐农, 胡跃强, 吴林, 等. 益肺宣肺降浊胶囊治疗血管性痴呆的随机对照临床研究 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(12): 3778-3781.
- [8] 唐农, 胡跃强, 吴林, 等. 益肺宣肺降浊胶囊治疗血管性痴呆患者 107 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2014, 55(12): 1025-1028.
- [9] 胡金凤, 宁娜, 苑玉和, 等. synapsin I 参与(-) 黄皮酰胺增强齿状回突触传递功能 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(5): 580-584.
- [10] 张振涛, 张国新, 王洪财, 等. 钙蛋白酶通过降解突触蛋白 I 介导脑出血后继发性神经元损伤 [J]. 中国卒中杂志, 2014, 9(12): 993-998.
- [11] 袁慧, 焉传祝, 毛蕾蕾, 等. 蛛网膜下腔出血 synapsin I 及其磷酸化水平动态变化的研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2011, 19(19): 1634-1637.
- [12] 徐秋玲, 刘涛. 电针对老年性痴呆大鼠海马 CaMPK-II 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 236-238.

Impact of *Yifei Xuanfei Jiangzhuo Formula* (益肺宣肺降浊方) on Expressions of Brain Tissues Hippocampus Calmodulin-dependent Protein Kinases II and synapsin in Vascular Dementia Rats

WU Lin¹, ZHAO Haitao¹, CHEN Wei², ZHENG Fukui², ZENG Dongjuan¹, BAI Shuoyu¹, TANG Nong¹

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, 530029; 2. First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Yifei Xuanfei Jiangzhuo Formula* (益肺宣肺降浊方) treating vascular dementia (VD). **Methods** Before modeling, 24 rats among 165 SD rats were randomized into sham operation group. The other 141 rats were established VD models by the method of bilateral common carotid artery ligation to block blood circulation. Ninety-six successfully modeled rats were randomized into Chinese medicine high, middle and low dose groups, model group, huperzine A group and piracetam group, 16 rats in each group. On the 15th day of modeling, rats were given medicine by gavage. Chinese medicine high, middle and low dose groups were given *Yifei Xuanfei Jiangzhuo Formula* 24.36, 12.18 and 6.09 g/(kg·d) respectively. Huperzine A group and piracetam group were given Huperzine A and piracetam tablets 0.15 mg/(kg·d) respectively. Model group and sham operation group were given equivalent double distilled water. After 30 days of administration by gavage, detect the expressions of rats' brain tissues hippocampus Calmodulin-dependent protein kinases II (CaMPK-II) and synapsin with western blot method. **Results** The expressions of brain tissues hippocampus CaMPK-II and synapsin in model group were lower than those in sham operation group ($P < 0.05$). The expressions of CaMPK-II and synapsin in Huperzine A group, piracetam group, Chinese medicine high, middle and low dose groups were higher than those in model group ($P < 0.05$). The increase in Chinese medicine high dose group was the most significant ($P < 0.05$). **Conclusion** *Yifei Xuanfei Jiangzhuo Formula* might up-regulate brain tissue hippocampus CaMPK-II and synapsin expressions and improve study and memorization function to treat VD.

Keywords vascular dementia; *Yifei Xuanfei Jiangzhuo Formula*; calmodulin-dependent protein kinases II; synapsin

(收稿日期: 2015-01-05; 修回日期: 2015-05-19)

[编辑: 邓媛]