

· 方药研究 ·

首乌益智胶囊对血管性痴呆大鼠 Notch/Delta 信号通路基因表达的影响

李长生¹ 杨晓妮¹ 张志友² 王运满³

(1. 山东省千佛山医院中医科, 济南市经十路16766号, 250014;

2. 泰安医学院预防医学系; 3. 同济大学附属同济医院分院)

[摘要] **目的** 探讨首乌益智胶囊治疗血管性痴呆的作用机制。**方法** 用改良 Pulsinelli 四血管阻断法制造血管性痴呆大鼠模型42只, 随机分为首乌益智胶囊组、脑复康组、模型组, 每组14只, 并设假手术组14只。造模后7天, 首乌益智胶囊组灌胃给予首乌益智胶囊溶液(0.08g/ml), 脑复康组灌胃给予脑复康溶液(0.02g/ml), 模型组与假手术组均灌胃生理盐水。20天后利用实时荧光定量PCR检测 Notch/Delta 信号通路 HES1、Mash1、 β 淀粉样前体蛋白(β APP)的 mRNA 表达。**结果** 与模型组、脑复康组比较, 首乌益智胶囊组 HES1 基因表达明显增高($P < 0.05$), 而 Mash1 和 β APP 基因表达的下降无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 首乌益智胶囊能有效激活 Notch/Delta 信号通路上 HES1、Mash1、 β APP 基因的相互作用, 这可能是首乌益智胶囊治疗血管性痴呆的作用机制之一。

[关键词] 血管性痴呆; 首乌益智胶囊; Notch/Delta 信号通路; HES1; Mash1; β 淀粉样前体蛋白(β APP)

Effect of Shouwu Yizhi Capsule on Gene Expression in Notch/Delta Signal Pathway of Vascular Dementia Model Rats

LI Changsheng¹, YANG Xiaoni¹, ZHANG Zhiyou², WANG Yunman³

(1. Department of Chinese Medicine, Qianfoshan Hospital of Shandong Province, Jinan 250014; 2. Department of Preventive Medicine, Taian Medical College; 3. Affiliated Hospital of Tongji University)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect and mechanism of Shouwu Yizhi Capsule (Capsule of Radix Polygoni Multiflori and Semen Coicis for dementia) on the Notch/Delta signal pathway in experimental rats with vascular dementia (VD). **Methods** The models were established with the modified Pulsinelli⁴ vessel occlusion method. They were randomized into Shouwu Yizhi Capsule group, piracetam group, model group, and sham operation group with 14 rats in each group. Seven days after modeling, the Shouwu Yizhi Capsule group was administered intragastrically Shouwu Yizhi Capsule solution 0.08g/ml, the piracetam group was prescribed intragastrically piracetam solution 0.02g/ml, and the model and sham operation groups were given intragastrically normal saline. Twenty days later, the mRNA expression of HES1, Mash1, and β APP on Notch/Delta signal pathway was determined by real-time quantitative fluorescent PCR. **Results** Compared with the model and piracetam groups, the mRNA expression of HES1 in the Shouwu Yizhi Capsule group was significantly increased ($P < 0.01$), while the decrease of mRNA expression of Mash1 and β APP was not significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Shouwu Yizhi Capsule could effectively activate the interaction of HES1, Mash1, and β APP on the Notch/Delta signal pathway, being the possible mechanism in the treatment of VD.

Key Words Shouwu Yizhi Capsule (Capsule of Radix Polygoni Multiflori and Semen Coicis for dementia); Vascular dementia; Notch/Delta signal pathway; HES1; Mash1; β APP

血管性痴呆(Vascular dementia, VD)是因脑血管疾病所致的智能及认知功能障碍的临床综合征, 该病发病率高, 深入探讨VD的发病机制、研发有效方药具有十分重要的意义。研究表明, Notch/Delta 信号通路可对神经干细胞增殖分化起非常重要的调控作用。Notch/Delta 信号通路上游基因的激活, 可促使神经干细胞向星形胶质细胞、少突胶质细胞的分化、增殖和维

持^[1-4], 分泌神经营养因子, 促进神经细胞的修复。本研究采用改良 Pulsinelli 四血管阻断法制造 VD 大鼠模型, 选取 Notch/Delta 通路上 HES1、Mash1 以及 β 淀粉样前体蛋白(β APP)作为观察指标, 了解中药首乌益智胶囊对 Notch/Delta 通路的调控作用, 进一步探讨其可能的作用机制, 为临床治疗 VD 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 清洁级健康老龄大鼠100只(月龄>15个

文献方法^[9],将 Ct 值转换为相对倍数,△Ct=Ct 目的基因-CtGAPDH。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 11.5统计软件。计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较用单因素方差分析。

2 结果

表2示,假手术组、模型组、脑复康组、首乌益智胶囊组纳入分析鼠数分别为6、5、6、6只。首乌益智胶囊组 HES1基因相对定量较脑复康组和模型组明显增高($P < 0.05$),说明首乌益智胶囊可明显提高 HES1基因表达;首乌益智胶囊组 Mash1基因相对定量较脑复康组和模型组较低水平,但无统计学意义($P > 0.05$),表明仍处于抑制状态;首乌益智胶囊组 βAPP 基因相对定量较脑复康组和模型组呈降低趋势,但无统计学意义($P > 0.05$)。

表2 各组 VD 大鼠脑组织 HES1、Mash1、βAPPmRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	HES1	Mash1	βAPP
假手术组	6	0.90±0.44	1.03±0.62	1.29±0.42
模型组	5	0.94±0.62	0.89±0.46	1.01±0.19
脑复康组	6	0.98±0.76	0.86±0.51	0.99±0.45
首乌益智胶囊组	6	2.20±1.43*△▲	0.61±0.24	0.96±0.43

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,△ $P < 0.05$;与脑复康组比较,▲ $P < 0.05$

3 讨论

Notch/Delta 信号通路是一条在胚胎发育中起调控作用的保守途径。近年来,由于 Notch/Delta 途径与神经组织发生和神经干细胞增殖分化的关系而备受研究者们关注。Mash1是神经干细胞向神经元分化发育形成的基因。Mash1是在中枢神经系统发育过程中的关键基因,其对神经元分化具有促进作用,对胶质细胞的发生有抑制作用^[10]。APP 为淀粉样前体蛋白,位21号染色体上,是一种跨膜蛋白,在神经系统发育阶段及轴突受损时可起到维持和保护轴突结构的重要作用。当 APP 分解过程发生异常时,其产物就会引起疾病。老年斑核心的 β淀粉样多肽(Aβ)就是 APP 在胞内经两步分解后的产物^[11]。本实验选取 Notch/Delta 通路上 HES1、Mash1以及 βAPP 基因作为观察指标。本研究表明,首乌益智胶囊组 HES1基因表达明显增高,表明具有抑制神经干细胞向神经元方向分化的作用;而 Mash1基因表达降低,说明 Mash1基因仍处于抑制状态得到进一步证实,与药物疗程时间短有关,因为从神经祖细胞分化发育成神经元,要经过神经干细胞的分化决定,神经干细胞分化为神经元要经历多次有

丝分裂,在时间上不能少于60天左右,我们用了20天,显然是与疗程太短有关;βAPP 表达各组间无统计学意义($P > 0.05$),说明首乌益智胶囊对维持 APP 正常功能发挥了疗效。说明首乌益智胶囊可能通过激活 Notch/Delta 信号通路发挥作用。

VD 属中医“呆病”范畴,其病性为本虚标实,肾精亏虚为本,瘀血阻络为标,治疗当以补肾填精、化瘀通窍为法。首乌益智胶囊由何首乌、益智仁、黄芪、天麻、丹参、地龙、川芎等药物组成。方中何首乌补益肝肾、益精生髓,为君药。黄芪功专补气升阳;益智补肾阳,温肾经;天麻体肥柔润,富含液质滋补之性,能养液开郁化痰。三药合用鼓舞肾气以生精,助阳以化阴,共为臣药。丹参、地龙共为佐药,与君药、臣药共达益气活血、化瘀通络、推陈致新、填精益髓、开窍聪智之功。川芎辛温香窜,血中之气药,走而不守,为使药。全方配伍共奏补肾填精,化瘀通窍之功能。现代药理研究表明,何首乌能降低血脂、抗动脉粥样硬化,益智仁能清除自由基、对抗脂质氧化活性,黄芪能扩张脑血管、增加脑血流量,上述三药均有抗衰老的作用;丹参、地龙、川芎均可增加脑血流,降低脑血管壁阻力,改善脑代谢。本研究结果表明,首乌益智胶囊可能通过激活 Notch/Delta 信号通路,激活了 NICD-CBF 复合体基因,促进神经干细胞向星形胶质细胞分化,从而使得星形胶质细胞增殖活化,分泌众多神经营养因子,发挥神经保护作用。这对中医药防治 VD 有重要的使用价值和理论意义。但是星形胶质细胞的发生发育可能有多种信号途径和机制参与了这一复杂的过程,首乌益智胶囊是否仅通过 Notch/Delta 信号通路其作用还需进一步研究。

参考文献

[1]Mong JA, Nunez JL, McCarthy MM. GABA mediates steroid-induced astrocyte differentiation in the neonatal rat hypothalamus[J]. J Neuroendocrinol, 2002, 14(1): 45-55.
[2]Nakamura Y, Sakakibara S, Miyata T, et al. The bHLH gene hes1 as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells[J]. J Neurosci, 2000, 20(1): 283-293.
[3]Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, et al. Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate[J]. Neuron, 2001, 29(1): 45-55.
[4]Casarosa S, Fode C, Guillemot F. Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon[J]. Development, 1999, 126(4): 525-534.
[5]Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions[J]. Nature, 1982, 297(5868): 681-683.

表2 各组大鼠 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性比较
($\mu\text{mol Pi mg prot}^{-1} \text{ h}^{-1}, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性
正常组	10	1.541 ± 0.069
模型组	10	$1.415 \pm 0.034^* \Delta$
治疗组	10	$1.471 \pm 0.064^*$

注:与正常组比较, $*P < 0.05$; 与治疗组比较, $\Delta P < 0.05$

4 讨论

津液的生成、输布、排泄,是一个涉及多个脏腑的复杂的生理过程。《素问·经脉别论》曰:“饮入于胃,游溢精气,上输于脾,脾气散精,上归于肺,通调水道,下输膀胱,水精四布,五经并行”。可见,肺的功能正常与否,对水液代谢起着至关重要的作用。本实验以冷风刺激和硫磺烟熏侵犯肺系,使大鼠出现咳喘,通过长期刺激,使之久咳不愈,致肺气耗伤,通调水道功能失常,以致蓄水成痰。如此,外邪—咳喘—肺虚—痰浊的病理机制便产生了,终成肺虚痰阻之证。肺虚痰阻证的病位在肺,“肺为贮痰之器”,肺对维持人体正常水液代谢起重要作用,若肺失宣降,水液可停聚成痰,导致痰证的发生。可见“痰”为水液代谢异常的病理产物,肺在痰证的病理过程中起着重要作用。本研究结果显示,模型组出现咳嗽、咳痰、可明显闻及痰鸣音、动物体重增加缓慢,气促、活动迟缓、毛发枯槁、口鼻分泌物增多等表现。治疗组和模型组咳嗽次数与正常组比较均有统计学差异($P < 0.05$),但治疗组和模型组咳嗽次数无统计学差异($P > 0.05$),考虑因样本数太少或(和)测试时间太短引起。

目前认为,肺泡液体清除依赖肺泡上皮主动转运机制^[5],由肺泡Ⅱ型上皮细胞的钠通道及 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶构成的转运体系,对肺泡液体的清除具有重要意义。 Na^+ 的主动转运带动肺泡液体主动清除。 Na^+ 通过顶膜钠通道进入肺泡Ⅱ型上皮细胞内,基底膜的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶主动将 Na^+ 泵入肺间质,同时主动摄取 K^+ ;细胞内 K^+ 经基底膜上的 K^+ 通道扩散到细胞外,完成 Na^+ 的主动转运过程。在此过程中,产生渗透

压梯度,带动液体转运。肺泡上皮完整性的破坏可导致肺水转运能力下降。研究表明,在感染性休克、酸吸入和烟熏导致肺损伤模型中,若出现肺泡上皮对蛋白通透性显著增加(提示肺泡结构完整性受损),可观察到肺泡上皮对蛋白的通透性增加的同时也伴有肺水清除下降40%~50%^[6]。可见,完整的肺泡上皮结构是钠泵存在并发挥作用的基础。

本研究采用冷风刺激加烟熏法致肺虚痰阻证模型后,即破坏了肺泡上皮结构的完整性,从而影响了钠泵清除肺泡液体的功能。本研究发现,模型组的酶水解活性低于正常组($P < 0.05$),提示肺泡膜上 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶在肺水的转运中起重要作用,其活性的降低可能是产生肺虚痰阻证的重要机制之一。同时经补肺化痰方治疗后酶水解活性较治疗前上升($P < 0.05$),说明补肺化痰方对 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性有一定调节作用,但未达到正常组水平,可能因用药时间不足或(和)肺泡上皮结构破坏不完全可逆引起。总之,本研究从肺脏入手,从肺泡上皮水主动转运系统之一,即 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶探讨肺虚痰阻证的形成机制及补肺化痰方的化痰机制,为肺虚痰阻证研究开辟新的视野。

参考文献

[1]Factor P. Role and regulation of lung $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ [J]. Cell Mol Biol(Noisy-le-grand), 2001, 47(2):347-361.
[2]王九林,姜惟,卞慧敏.肺虚痰阻病理模型的研制[J]. 中国中医基础医学杂志,1996,2(4):44.
[3]陈小野.实用中医证候动物模型学[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1993:314.
[4]沈自尹.中医虚证参考标准[J]. 中西医结合杂志,1986,6(10):598.
[5]Matthay MA, Landohlt CC, Staub NC. Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep[J]. J Appl Physiol, 1982, 53(1):96-104.
[6]Berthiaume Y, Folkesson HG, Matthay MA. Lung edema clearance: 20 years of progress; invited review: alveolar edema fluid clearance in the injured lung[J]. J Appl Physiol, 2002, 93(6):2207-2213.

(收稿日期:2009-07-20;修回日期:2009-08-28)

[编辑:邓 媛]

(上接第644页)

[6]Schmidt-Kastner R, Paschen W, Ophoff BG, et al. A modified four-vessel occlusion model for inducing in complete forebrain ischemia in rats[J]. Stroke, 1989, 20(7):938-946.
[7]Pulsinelli WA, Brierley JB, Plum F. Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia[J]. Ann Neurol, 1982, 11(5):491-498.
[8]赵宪林,李东培,方秀斌,等.血管性痴呆大鼠海马神经元超微结构的研究[J]. 解剖科学进展,2000,6(2):161-163.
[9]Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expres-

sion data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta[\Delta\text{Ct}]}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
[10]Qi H, Rand MD, Wu X, et al. Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian[J]. Science, 1999, 283(5398):91-94.
[11]Mizutani K, Yoon K, Dang L, et al. Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors[J]. Nature, 2007, 449(7160):351-355.

(收稿日期:2009-06-04;修回日期:2009-12-27)

[编辑:行 之]