

加味脑泰方对血管性痴呆大鼠学习记忆和 海马区 NR2A 及 NR2B 表达的影响

易亚乔¹, 肖碧跃¹, 刘英飞², 刘 林³, 陈 懿³, 廖 君³, 葛金文³

(1. 湖南中医药大学仲景学说教研室, 湖南 长沙 410208; 2. 益阳医学高等专科学校附属医院神经内科;
3. 湖南中医药大学中西医结合基础重点学科)

摘要: **目的** 观察加味脑泰方对血管性痴呆(VaD)大鼠学习记忆的影响,同时检测海马区 NR2A 及 NR2B 表达情况以探讨其可能机制。 **方法** 将 36 只 SD 大鼠随机均分成假手术组、模型组和加味脑泰方组。采用四血管阻断法制备血管性痴呆模型。Morris 水迷宫评价大鼠学习记忆能力;应用免疫组织化学技术观察各组大鼠海马 NR2A 及 NR2B 的表达情况。 **结果** 加味脑泰方组逃避潜伏期(27.4 ± 6.5 s)显著低于模型组(64.4 ± 10.1 s),穿越平台次数(8.1 ± 0.98 次)显著多于模型组(5.6 ± 0.8 次),差异均有显著性($P < 0.05$);加味脑泰方组海马 NR2A +、NR2B + 分别是 22.4 ± 2.6 、 18.9 ± 3.0 个,模型组分别为 14.8 ± 3.3 、 12.6 ± 2.9 个,两组 NR2A +、NR2B + 相比,差异均有显著性($P < 0.05$);加味脑泰方组海马 NR2A +、NR2B + 的平均光密度值较模型组显著提高($P < 0.05$)。 **结论** 加味脑泰方可改善 VaD 大鼠学习记忆能力,其机制可能与上调大鼠海马区 NR2A 及 NR2B 的表达相关。

关键词: 加味脑泰方; 血管性痴呆; 海马

中图分类号:R743

文献标识码:A

Effect of the Supplemented Naotaifang on the Vascular Dementia Rats' Learning and Memory and the Expression of the NR2A, NR2B in Hippocampus

YI Yaqiao, XIAO Biye, LIU Yingfei, et al

(Department of Zhongjing Theory, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan, 410208, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of the supplemented Naotaifang on the Vascular dementia rats' learning and memory and the expression of the NR2A, NR2B in Hippocampus. **Methods** 36 rats were randomly divided into three groups, the dementia model was made using 4-vessel occlusion, the learning and memory was evaluated by Morris water maze; the expression of NR2A, NR2B was watched by the immunohistochemical technique. **Results** The escape latency in the SNTF group is (27.4 ± 6.5)s, which is lower than that (64.4 ± 10.1)s in the vehicle group ($P < 0.05$); the times across platform between the SNTF group and vehicle group is (8.1 ± 0.98)s, (5.6 ± 0.8)s respectively ($P < 0.05$); the NR2A +, NR2B + in the SNTF group is 22.4 ± 2.6 , 18.9 ± 3.0 respectively, the NR2A +, NR2B + in the vehicle group is 14.8 ± 3.3 , 12.6 ± 2.9 respectively, which was statistical comparing the NR2A +, NR2B + between two groups ($P < 0.05$); the mean optical density of the NR2A +, NR2B + in the SNTF group is higher than that in the vehicle group ($P < 0.05$). **Conclusion** Supplemented Naotaifang can up-regulate the expression of NR2A, NR2B in hippocampus, and improve the vascular dementia rats' learning and memory.

Key words: Supplemented Naotaifang; Vascular dementia; hippocampus

收稿日期:2013-09-12

基金项目:湖南省中医药科研基金重点项目(201213);湖南省教育厅青年基金(13B083);湖南省教育厅科学研究一般项目(13C958);湖南省科技厅项目(2013TT2025)。

作者简介:易亚乔,在读博士,讲师,研究方向:心脑血管疾病的中医药防治研究, E-mail:375248683@qq.com. 通讯作者葛金文,教授,博士,博士生导师,研究方向:心脑血管疾病的中医药防治研究, E-mail:cmgjw@tom.com.

血管性痴呆 (Vascular dementia, VD) 是迄今为止唯一可防治的痴呆,如早期治疗会具有可逆性。关于 VD 的发病机制目前尚不十分清楚,多数学者认为,VD 的发病机制主要与脑血管病变导致局部或全脑缺血或缺氧后引起脑部与认知、记忆等相关的特定神经组织损害有关^[1-3],因而对于一般 VD 而言,存在一般性脑缺血缺氧的病理生理改变。短暂性脑缺血或缺血后再灌注最易损伤海马,导致代谢异常,诱发神经元死亡,引起永久性脑组织损伤^[4]。NR2A 和 NR2B 是分布于海马的 N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-Methyl-D-Aspartate Receptor, NMDAR) 的主要调节亚单位, NR2A 基因敲除明显降低海马 CA1 区 NMDA 受体电流和 LTP, 损害空间学习能力, NR2B 基因敲除后小鼠记忆能力下降,而移植转染 NR2B 基因细胞可使大鼠记忆明显增高^[5-7]。目前已有研究证实血管性痴呆 (VaD) 引起大鼠学习记忆能力下降, NR2A、NR2B 在 CA1 区的表达水平下降,但是关于加味脑泰方对血管性痴呆的作用鲜有报道。本实验通过建立大鼠四血管阻断法制备血管性痴呆模型,然后服用加味脑泰方,观察加味脑泰方对血管性痴呆大鼠学习记忆和海马区 NR2A 及 NR2B 表达的影响,探讨加味脑泰方在治疗血管性痴呆中的可能作用及机制。

1 材料与方法

1.1 实验仪器和试剂

兔抗 NR2A 抗体 (Abcam 公司)、兔抗 NR2B 抗体 (Sigma 公司), 3, 3-Diaminobenzidine (DAB) (Vector 公司), 生物素化广谱 (Vector 公司), MT-200Morris 水迷宫 (成都泰盟科技有限公司), IgG O-lympus E53 显微镜 (Olympus 公司)。

1.2 药物制备

加味脑泰方煎剂浓缩液的制备:该方由黄芪、益智仁、石菖蒲、田七、葛根、地龙、川芎组成。饮片由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供。购回后置入容器内加自来水 (量为药材量 5 倍) 浸泡 2 h, 煮沸后再以微火煎煮 30 min, 过滤取汁得头煎。药渣再加 3 倍水煎煮 20 min, 过滤取汁得二煎, 两煎混合, 于水浴上浓缩至 100% 浓度 (每毫升药液相当于生药 1 g), 置 4℃ 冰箱中保存备用。

1.3 实验动物及分组

36 只 SD 大鼠, 健康清洁级, 3 月龄, 体重 $342.7 \pm$

25.8 g (湖南省长沙市东创实验动物中心提供)。所有实验动物饲养于湖南中医药大学实验动物部, 室温保持 22℃, 相对湿度 55%, 饲养于 12-12 h 光暗环境, 给予标准饮食和自由饮水。所有 SD 大鼠随机分成假手术组、模型组以及加味脑泰方组, 每组 12 只。模型制备过程尽量减少大鼠的痛苦和应激。

1.4 实验方法

1.4.1 实验动物模型的建立 假手术组 (Sham group): 模型动物只做皮肤切口和组织分离处理, 不进行椎动脉烧灼和颈总动脉夹闭, 术后大鼠保温。模型组 (Vehicle group): 模型的建立如 Schmidt-Kastner 等^[8] 人所描述: 将大鼠行背侧颈正中切口, 逐层钝性分离暴露双侧第一颈椎横突翼小孔, 用直径 0.5 mm 的电凝针烧灼双侧翼小孔内的椎动脉, 造成永久性闭塞。24 h 后再将大鼠麻醉, 行腹侧颈正中切口, 钝性分离双侧颈总动脉, 用微动脉夹夹闭双侧颈总动脉 5 min, 共 3 次, 每次间隔 1 h。模型制备成功后不给任何干预。加味脑泰方组 (SNTF group): 造模成功后开始每天给药 5 g/kg, 每日 1 次, 连续灌胃给药 30 天。

1.4.2 行为学检测 3 个组别在造模成功 30 天后进行水迷宫实验检测学习记忆。采用 MT-200Morris 水迷宫视频跟踪系统。水迷宫为圆形不锈钢水池, 水池直径为 120 cm, 高 60 cm。池壁上标有四个不同符号, 将水池等分为 4 个象限, 表示 4 个入水点。目标象限的中央放置高为 50 cm, 直径 10 cm 的圆形隐藏平台, 平台低于水面 1 cm, 水温保持在 $(22 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。预先在水池中注入清水, 加入碳素墨水使池水变为不透明的黑色以隐藏平台并便于摄像。迷宫上方安置带有显示系统的摄像机, 计算机自动跟踪计时并同步记录大鼠的游泳轨迹, Morris 水迷宫数据采集和分析软件记录相关数据及图象结果。整个实验期间水池、光源等外部条件保持不变。

定位航行试验 (place navigation): 检测大鼠对水迷宫学习记忆的获取能力。大鼠先适应训练 1 天, 剔除明显异常者。大鼠连续接受 5 天训练, 每天将大鼠面向池壁分别从 4 个入水点放入水中, 每次实验以 120 s 为限, 记录动物寻找并爬上平台所需时间即逃避潜伏期 (escape latency, EL), 以爬上平台所需时间作为学习和记忆成绩。如在 120 s 内未找到平台, 计算机停止跟踪, 将未找到平台的动物由操作者将其引上平台停留 30 s。每天训练完成后, 迅速将动物用布擦干, 置于加热器旁。计算每天各组大鼠 4 次逃避潜伏期的平均值。

空间探索试验(spatial probe):测量大鼠学会寻找平台后,对平台空间位置的记忆保持能力。在定位航行试验后(即水迷宫的第 6 天)撤去平台,然后任选一个固定象限作为入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录其 120 s 内的游泳轨迹及穿越原平台位置的次数。

1.4.3 脑组织标本的制备 服用加味脑泰方 30 天后,灌注取材 3 组 SD 大鼠。过量 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,待麻醉成功后,使用 0.9% 生理盐水快速灌注,然后改用 4% 多聚甲醛溶液快速灌注,快速灌注一段时间后,然后慢灌。取出脑组织后固定过夜、沉糖(过 30% 糖 2 遍)和包埋。采用邻切法,切片厚度为 30 μm 。

1.4.4 免疫组织化学染色 NR2A、NR2B 免疫组织化学染色的实验步骤主要如下:当天切好组织后,0.01 mol/L PBS + 0.1% tritonX - 100 缓冲液(pH = 7.3)漂洗 3 次,每次 10 min;3% H_2O_2 处理 30 min,然后漂洗 3 次,方法如上;5% 马血清孵育 2 h,然后加入一抗(NR2A、NR2B 的抗体浓度依次为 1:200、1:500),4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜;第二天拿出组织复温(26 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$,漂洗 3 次,加入二抗(1:400)室温孵育 2 h;ABC 复合物:A 液(卵白素)与 B 液(生物素)提前半小时配好,浓度比为 1:400,室温孵育 2 h;DAB 显色:显微镜下控制组织显色时间;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

1.5 免疫组织化学染色结果分析

3 组脑片在同等曝光值和像素下使用 Olympus E53 显微镜拍照,应用 Image pro plus 6.0 图像分析软件检测 3 组相同部位等面积下细胞光密度值。以上所有实验数据以均数 $\pm$ 标准差表示,通过单因素方差分析(One-way ANOVA)统计不同组间差异。实验结果采用 Prism GraphPad5.0 统计软件进行统计分析和处理。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 定位航行试验和空间探索试验

在定位航行试验中,以训练的最后一天计算成绩(第 5 天)。假手术组、模型组、加味脑泰方组的逃避潜伏期(EL)分别为 18.7 $\pm$ 5.4、64.4 $\pm$ 10.1、27.4 $\pm$ 6.5 s,假手术组、加味脑泰方组与模型组比较,差异均有显著性($t = 11.28, t = 9.13$,表 1)。水

迷宫试验第 6 天进行空间探索实验,假手术组、模型组、加味脑泰方组的穿越平台次数分别为 9.1 $\pm$ 1.30、5.6 $\pm$ 0.80、8.1 $\pm$ 0.98 次,假手术组、加味脑泰方组与模型组比较,差异均有显著性($t = 6.43, t = 4.63$,表 1)。

表 1 三组逃避潜伏期和穿越平台次数的比较

	逃避潜伏期(秒)	穿越平台次数(次)
假手术组	18.7 $\pm$ 5.4 ^a	9.1 $\pm$ 1.30 ^a
模型组	64.4 $\pm$ 10.1	5.6 $\pm$ 0.80
加味脑泰方组	27.4 $\pm$ 6.5 ^a	8.1 $\pm$ 0.98 ^a
P 值	<0.01	<0.01

与模型组比较,a; $P < 0.01$

2.2 CA1 区 NMDA 受体 NR2A、NR2B 在 3 个组别的表达

NR2A + 细胞在假手术组、模型组、加味脑泰方组分别为 26.9 $\pm$ 4.7、14.8 $\pm$ 3.3、22.4 $\pm$ 2.6 个;假手术组、加味脑泰方组分别与模型组比较,差异均有显著性($t = 6.16, t = 3.88, P < 0.01$)。NR2B + 细胞在假手术组、模型组、加味脑泰方组分别为 23.9 $\pm$ 6.2、12.6 $\pm$ 2.9、18.9 $\pm$ 3.0 个;假手术组、加味脑泰方组分别与模型组比较,差异均有显著性($t = 4.89, t = 2.72, P < 0.01$)。NR2A + 细胞单位面积的平均光密度值假手术组、模型组、加味脑泰方组分别为 0.45 $\pm$ 0.06、0.30 $\pm$ 0.03、0.41 $\pm$ 0.04 mm^2 ;假手术组、加味脑泰方组分别与模型组比较,差异均有显著性($t = 4.78, t = 6.69, P < 0.01$)。NR2B + 细胞单位面积的平均光密度值假手术组、模型组、加味脑泰方组分别为 0.43 $\pm$ 0.04、0.24 $\pm$ 0.03、0.34 $\pm$ 0.04 mm^2 ;假手术组、加味脑泰方组与模型组比较,差异均有显著性($t = 9.15, t = 4.81, P < 0.01$),见表 2。

3 讨 论

血管性痴呆(VaD)好发于老年人中风之后,是老年人常见的痴呆^[9]。血管性痴呆相当于祖国医学“呆疾”、“文痴”、“善忘”等病症,其病位在脑,属本虚标实之症,以正气亏虚为本,瘀痰浊毒为标,气虚是其病理基础,病因以痰瘀多见,气血亏虚,痰瘀阻络为其常见病机。加味脑泰方是在中医药理论指导下,以《医林改错》中的“补阳还五汤”为基础方,结合临床用药经验加减而成,由黄芪、益智仁、石菖

表 2 三组 NR2A + ,NR2B + 以及它们平均光密度值的比较

	NR2A 阳性细胞(个)	NR2B 阳性细胞(个)	NR2A 平均光密度值(mm ²)	NR2B 平均光密度值(mm ²)
假手术组	26.9 ± 4.7 ^a	23.9 ± 6.2 ^a	0.45 ± 0.06 ^a	0.43 ± 0.04 ^a
模型组	14.8 ± 3.3	12.6 ± 2.9	0.30 ± 0.03	0.24 ± 0.03
加味脑泰方组	22.4 ± 2.6 ^a	18.9 ± 3.0 ^a	0.41 ± 0.04 ^a	0.34 ± 0.04 ^a
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

与模型组比较,a;P<0.01

蒲、田七、葛根、地龙、川芎组成。方中黄芪其力专、性走,周行全身,大补脾胃元气,令气旺则血活,血活则瘀除,益智仁有温脾温肾益智之功,两药为君以治其本;豁痰开窍之石菖蒲,活血祛瘀之田七为臣药;行气活血的川芎,通经活络的地龙,升阳、解肌的葛根为佐药,诸味配合,共奏理气活血、豁痰开窍、益智醒神之效。前期研究应用益气活血、祛瘀通络的脑泰方治疗中风有良好的临床效果^[10]。本研究前期的实验也表明脑泰方能促进大鼠缺血脑组织血管新生^[11]。

海马参与大脑的学习和记忆活动,是脑边缘系统的一个重要组成部分,NR2A 和 NR2B 是 NMDA 主要调节亚单位,NR2 和 NR1 聚合形成功能性复合物形成功能性受体,表现出活性。NMDA 受体构成的变化引起 NMDA 受体活性改变从而导致学习与记忆改变。本研究发现,与假手术组相比,NMDA 受体调节亚型(NR2A 和 NR2B)在血管性痴呆大鼠海马各区的表达水平都呈下降的趋势,学习记忆能力也下降($P<0.0001$)。这可能是加味脑泰方通过调控 NR2A,NR2B 在海马的表达而提高血管性痴呆大鼠的学习记忆,与 Olivares D^[12]、赵晖^[13] 以及李君等^[14]人报道的结果相一致。关于加味脑泰方干预后 VaD 大鼠海马组织 NR2A,NR2B 及 mRNA 表达情况以及长时程增强(LTP)的变化将在以后的实验中进一步研究和阐述。

参考文献:

[1] Roman GC. Brain hypoperfusion; a critical factor in vascular dementia[J]. Neurol Res, 2004, 26(5): 454-458.

[2] Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia[J]. Acta Neuropathol, 2010, 120(3): 287-296.

[3] Alvarez-Sabin J, Roman GC. Citicoline in vascular cognitive impairment and vascular dementia after stroke[J]. Stroke, 2011, 42(1 Suppl): S40-S43.

[4] 张敏,周颖斌,金毅. 缺血再灌注对大鼠学习记忆及海马神经元 Glu、NR₁ 和 NR_(2B) 表达的影响[J]. 齐鲁医学杂志, 2006, 21(4): 283-285.

[5] Lim IA, Merrill MA, Chen Y, et al. Disruption of the NM-DA receptor-PSD-95 interaction in hippocampal neurons with no obvious physiological short-term effect[J]. Neuropharmacology, 2003, 45(6): 738-754.

[6] Bi C, Cui Y, Mao Y, et al. The effect of early auditory deprivation on the age-dependent expression pattern of NR2B mRNA in rat auditory cortex[J]. Brain Res, 2006, 1110(1): 30-38.

[7] Hillman BG, Gupta SC, Stairs DJ, et al. Behavioral analysis of NR2C knockout mouse reveals deficit in acquisition of conditioned fear and working memory[J]. Neurobiol Learn Mem, 2011, 95(4): 404-414.

[8] Schmidt-Kastner R, Paschen W, Ophoff BG, et al. A modified four-vessel occlusion model for inducing incomplete forebrain ischemia in rats[J]. Stroke, 1989, 20(7): 938-946.

[9] Kim Y, Kong M, Lee C. Association of intronic sequence variant in the gene encoding spleen tyrosine kinase with susceptibility to vascular dementia[J]. World J Biol Psychiatry, 2013, 14(3): 220-226.

[10] 贺运河,郝晓元,葛金文. 脑泰方治疗气虚血瘀证脑梗塞临床研究[J]. 中国中医急症, 2001, 10(6): 319-320, 334.

[11] 陈敏,朱惠斌,葛金文,等. 脑泰方对脑缺血再灌注大鼠血管新生作用的实验研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(1): 12-15.

[12] Olivares D, Deshpande VK, Shi Y, et al. N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor antagonists and memantine treatment for Alzheimer's disease, vascular dementia and Parkinson's disease[J]. Curr Alzheimer Res, 2012, 9(6): 746-758.

[13] 赵晖,王蕾,张秋霞,等. 竹节参总皂苷对血管痴呆大鼠递质氨基酸及自由基代谢的影响[J]. 中国老年学杂志, 2010(21): 3096-3098.

[14] 李君,钱涛,高维娟,等. 补阳还五汤对血管性痴呆大鼠学习记忆和海马 N-甲基-D-天冬氨酸受体表达的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2012, 14(12): 1316-1320.

(此文编辑:蒋湘莲)