

·方药研究·

补阳还五汤对去势脑缺血雌性大鼠海马神经干细胞增殖及 ERK/CREB 信号通路的影响

黄 昕¹,周胜强²,刘胜贤¹,张必超¹,薛科辉¹,刘柏炎^{1,2*}

(1.益阳医学高等专科学校附属医院,湖南 益阳 413000;2.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的 探讨补阳还五汤对去势脑缺血雌性大鼠海马神经干细胞(neural stem cells, NSCs)增殖及 ERK/CREB 信号通路的影响。方法 采用双侧卵巢切除术(OVX)结合大脑中动脉阻塞(MCAO)法复制去势雌性大鼠脑缺血复合模型,将造模后的 36 只大鼠随机分为双假手术组、复合模型组、雌激素组、雌激素+G15 组、补阳还五汤组及补阳还五汤+G15 组 6 组,每组 6 只,术后 24 h 给予相应药物灌胃连续干预 14 d,同时每天腹腔注射 BrdU、G15 分别标记增殖细胞和阻断 GPER-1。采用免疫荧光 BrdU/ Nestin 双标法检测各组大鼠缺血侧海马齿状回 NSCs 增殖情况,免疫组化 SP 法检测 ERK1/2、CREB1 磷酸化蛋白表达水平。结果 补阳还五汤组和雌激素组缺血侧海马 DG 区 BrdU/Nestin 双标阳性细胞及 pERK1/2、pCREB1 阳性细胞表达均增加,与复合模型组比较有显著性差异($P<0.05$),但补阳还五汤组要多于雌激素组($P<0.05$)。与补阳还五汤组比较,补阳还五汤+G15 组缺血侧海马 DG 区 BrdU/Nestin 双标阳性细胞及 pERK1/2、pCREB1 阳性细胞表达均减少($P<0.05$)。结论 补阳还五汤可以促进去势脑缺血雌性大鼠缺血侧海马 DG 区神经干细胞增殖,激活 ERK/CREB 信号通路,可能是其发挥类雌激素作用、促进内源性神经再生作用机制之一。

[关键词] 脑缺血;神经干细胞;ERK/CREB 信号通路;去势大鼠;补阳还五汤

[中图分类号]R285.5

[文献标识码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.12.001

Effects of Buyang Huanwu Decoction on Neural Stem Cells Proliferation and ERK/CREB Signaling Pathway in Hippocampus after Cerebral Ischemia in Ovariectomized Female Rats

HUANG Xin¹, ZHOU Shengqiang², LIU Shengxian¹, ZHANG Bichao¹, XUE Kehui¹, LIU Baiyan^{1,2*}

(1. Yiyang Medical College, Yiyang, Hunan 413000, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Buyang Huanwu Decoction on neural stem cells (NSCs) proliferation and ERK/ CREB signaling pathway in hippocampus after cerebral ischemia in ovariectomized female rats. **Methods** The ovariectomized female rats with cerebral ischemia model was established by the methods of ovariectomy(OVX)and middle cerebral artery occlusion (MCAO). The 36 rats were randomly divided into 6 groups, double sham-operation group, compound model group, estrogen group, estrogen+G15 group and Buyang Huanwu Decoction group and Buyang Huanwu Decoction+G15 group, 6 rats in each group. The rats were given corresponding medicine intragastric administration for 14 days from 24 hours after operation, at the same time, BrdU and G15 were intraperitoneal injected to label the proliferation cells and block GPER-1 in each day, respectively. The NSCs proliferation of ischemic hippocampal dentate gyrus in rats was detected using immunofluorescence BrdU / nestin double staining with paraffin sections, the SP method of immunohistochemistry was used to detect the expression level of ERK1/2, CREB1 phosphorylation protein. **Results** Compared with the composite model group, the number of double positive cells and pERK1/2, pCREB1 positive cells in ischemic hippocampal DG area of Buyang Huanwu Decoction group and estrogen group were increased ($P<0.05$), but the indicators in Buyang Huanwu decoction group were higher than estrogen group ($P<0.05$). Compared with Buyang Huanwu Decoction group, the number

[收稿日期]2016-05-20

[基金项目]国家自然科学基金项目(81273989);湖南省教育厅一般项目(14C1131);湖南省科技厅一般项目(S2014F1023);益阳市科技厅一般项目(YK1541)。

[作者简介]黄 昕,男,硕士,主治医师,研究方向:心脑血管疾病研究。

[通讯作者]* 刘柏炎,男,博士,教授,博士研究生导师, Email: liubaiyan@126.com。

of double positive cells and pERK1/2, pCREB1 positive cells in ischemic hippocampal DG area of Buyang Huanwu Decoction+G15 group were decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Buyang Huanwu Decoction can promote ischemic hippocampal NSCs proliferation in ovariectomized female rats after cerebral ischemia, and to activate ERK/CREB signaling pathway, which may be one of the mechanism of its estrogen-like effect and endogenous neurogenesis.

[**Keywords**] cerebral ischemia; neural stem cells; ERK/CREB signaling pathway; OVX rats; Buyang Huanwu Decoction

缺血性脑卒中是一种发病率、致死率和致残率均极高的脑血管疾病,虽然目前诊治技术不断提高,但尚无有效治疗手段^[1]。神经流行病学研究结果表明,绝经前期妇女缺血性卒中的发病率及其严重程度远低于相应年龄段的男性,而绝经后女性卒中发病率明显增高并且预后较差,女性绝经后雌激素水平的下降与心脑血管病的发生有密切关系,故有学者提出雌激素在脑缺血中起着十分重要的作用^[2]。

细胞外信号调节激酶(extracellular-signal-regulated kinase, ERK)/cAMP反应元件结合蛋白(cAMP responsive element binding protein, CREB)信号通路是所有真核细胞内将细胞外信号传导至细胞核引起增殖、分化等作用的共同信号途径^[3]。越来越多的证据支持,除经典核内雌激素受体介导雌二醇(estrogen-2, E2)直接发挥基因效应外,该通路在神经系统中核外雌激素受体(estrogen receptor, ER)[如G蛋白偶联受体30(G protein-coupled receptor 30, GPR30)/G蛋白偶联雌激素受体1(G protein-coupled estrogen receptor 1, GPER-1)]介导的神经保护、神经再生等生物学效应中发挥重要作用^[4]。

补阳还五汤是治疗缺血性脑卒中后遗症的经典方,有较好的临床疗效。但其是如何促进缺血后神经再生,恢复受损的神经功能,作用机制目前尚不完全清楚^[5]。

课题组前期研究证实,补阳还五汤能够减少脑缺血大鼠脑梗死体积、促进神经功能恢复,上调血清E2、脑组织E2及ER水平,具有类雌激素作用^[6]。因此,本研究拟以雌性去势脑缺血复合模型大鼠为研究对象,旨在深入探讨补阳还五汤对缺血海马内源性神经干细胞(neural stem cells, NSCs)增殖及ERK/CREB信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级SD大鼠45只,♀,体质量(220±20)g,

月龄2~3月,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(湘)2009-0004;合格证号:004535。室温控制在(24±0.5)℃,自由饮食进水,昼夜光照节律,适应性喂养1周后用于实验。

1.2 药物

补阳还五汤(《医林改错》):黄芪120g,归尾6g,赤芍4.5g,桃仁3g,红花3g,地龙3g,川芎3g,饮片购自湖南益阳医学高等专科学校附属医院,煎药浓缩成生药浓度为2.6g/mL;戊酸雌二醇片(拜耳医药保健有限公司广州分公司,1mg/粒),研磨细粉后加入蒸馏水制成浓度为100μg/mL的混悬液;GPER-1特异性阻断剂G15(Chemicon公司):用DMSO和生理盐水稀释成50μg/mL的溶液(DMSO的终浓度为1mmol/L);BrdU(Sigma公司):用DMSO和生理盐水稀释成20mg/mL的溶液(DMSO的终浓度为1mmol/L)的溶液。上述3种药物配制好后均于4℃冰箱避光冷藏备用。

1.3 主要试剂及仪器

通用型SP免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:K156919F);Rabbit Anti-phospho-ERK1(Thr202/Tyr204)+ERK2(Thr183/Tyr185)antibody(北京博奥森生物技术有限公司);Rabbit Anti-phospho-CREB-1Rabbit Anti-phospho-CREB-1(Ser133)antibody(北京博奥森生物技术有限公司)大鼠抗BrdU单克隆抗体(Abcam公司);兔抗Nestin单克隆抗体(Abcam公司);Goat Anti-Rabbit IgG-FITC(Santa Cruz Biotech公司);Texas Red-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG+IgM(H+L)(Jackson公司);进口羊血清工作液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:WP150926);2,3,5-氯化三苯四氮哇(2,3,5-chloride Triphenyltin tetrazolylazo, TTC)(国药集团化学试剂有限公司,批号:20140825);DAB染色液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:K152317J);DAPI染色液(武汉博士德生物工程有限公司);大鼠

雌二醇 ELISA 试剂盒 (上海劲马实验设备有限公司,批号:Wk30608)。硅胶包被线栓(规格:L3200,广州佳灵生物技术有限公司);生物组织自动脱水机(湖北孝感市亚光医用电子技术公司,型号:ZT-12M);石蜡包埋机(德国 LEICA 仪器公司,型号:EG1150H);石蜡切片机(德国 LEICA 仪器公司,型号:RM2235);摊片机(德国 LEICA 仪器公司,型号:HI1220);倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司,型号:BX43);台式高速冷冻离心机(德国 HERMLE 公司,型号:Z32HK);全自动酶标仪(芬兰 Labsystems 公司,型号:MK-3)。

1.4 复合模型的制备及评价

采用双侧卵巢切除术(ovariectomy, OVX)制备雌激素缺乏去势模型大鼠,在此基础上采用大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)法复制局灶性脑缺血模型,制成去势雌性局灶性脑缺血大鼠复合模型。

参照 Zeynalov 等^[7]采用 OVX 术复制去势雌性大鼠模型。10%水合氯醛(3.5 mL/kg)腹腔注射麻醉后,腹位固定,腋下 2 cm 处剪毛备皮,75%酒精消毒,依次剪开皮肤、肌层及腹膜,用镊子深入切口处拽出卵巢切除,手术缝线结扎止血(假手术组的大鼠不摘除卵巢,仅在卵巢与输卵管连接处夹一下),缝合切口。如法摘除另一侧的卵巢。从第五天开始随机选取 6 只大鼠断尾取血,隔天 1 次,ELISA 法检测血清 E2 水平,含量低于 5.0 pg/mL 则确定为去势造模成功。15 d 后将去势组所有动物再行 MCAO 术。

参照 Longa 等^[8]MCAO 法进行改良复制局灶性脑缺血大鼠模型。10%水合氯醛(3.5 mL/kg)腹腔注射麻醉后,将大鼠固定于手术操作台上,取颈部正中切口,游离右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉。结扎颈总动脉、颈外动脉。于颈总动脉分叉部下方 0.2-0.3 cm 处剪一小口,将直径为 0.32 mm 的线栓插入颈内动脉,插入深度由分叉部计为约 (18.0±0.5) mm,固定线栓,依次关闭切口(假手术组仅切开皮肤、分离右侧颈总动脉后即缝合)。动物于清醒后 2 h 参照文献[8]进行神经功能评分,分值在 1~3 分者入组,死亡等原因剔除的动物予以随机替补。

1.5 分组与给药

将 30 只复合造模成功的雌性大鼠随机分为 5

组,每组 6 只:复合模型组、补阳还五汤组、雌激素组、补阳还五汤+G15 组、雌激素+G15 组。双假手术组 6 只。总共 6 组。

术后 24 h 各组给予相对应的药物干预:补阳还五汤组及补阳还五汤+G15 组给予剂量为 12.8 g/(kg·d)补阳还五汤灌胃,1.0 mL/只,每日 1 次;雌激素组及雌激素+G15 组给予 500 μg/(kg·d)戊酸雌二醇灌胃(70 kg 成人临床等效剂量),1.0 mL/只,每日 1 次;复合模型组及双假手术组动物均给予等体积蒸馏水灌胃。连续给药 14 d。所有组大鼠术后第一天起按 100 mg/(kg·d)剂量腹腔注射 Brdu^[9],1.0 mL/(只·d),连续注射 14 d,标记增殖细胞。补阳还五汤+G15 及雌激素+G15 组按 50 μg/(kg·d)剂量腹腔注射 GPER-1 特异性阻断剂 G15^[10],1.0 mL/(只·d),连续 14 d。双假手术组、复合模型组、补阳还五汤组、雌激素组每日均补足等量的载体液(生理盐水与 1 mmol/L 的 DMSO)腹腔注射。

1.6 血清雌二醇 ELISA 检测

血清雌二醇水平采用 ELISA 法检测,具体过程严格按照试剂盒标准流程操作。

1.7 取材

各组大鼠在灌胃后第 14 天,末次灌胃及腹腔注射后 4 h,各组大鼠用 10%水合氯醛(3.5 mL/kg)腹腔注射麻醉,打开胸腔并暴露心脏,用注射用针头经心尖插入至主动脉端并固定好,剪开右心耳同时夹闭腹主动脉,用生理盐水约 100 mL 通过注射器快速滴入,待心脏无血污流出及前爪、肺部颜色也变白后,改用 4%多聚甲醛约 100 mL 灌注,速度先快后慢,固定好后开颅取脑,去除小脑、嗅球和脑干只保留大脑组织,置于 4%多聚甲醛中固定,4 °C 冰箱保存用于免疫组化及免疫荧光双标检测。

1.8 指标检测

1.8.1 免疫荧光双标法检测缺血侧海马 DG 区神经干细胞增殖情况 常规组织脱水、透明、浸蜡、包埋、4 μm 连续冠状切片,65 °C 烤片 2 h 后常规脱蜡至水,柠檬酸盐高温高压修复 10 min,2 mol/L 的 HCl 37.0 °C 孵育 30 min,0.1 mol/L 硼酸漂洗 10 min,5%羊血清封闭内滴加 100 μL 正常山羊血清室温封闭 30 min,甩去不洗,同时加入大鼠抗 BrdU 单克隆抗体(1:100)、兔抗 Nestin 单克隆抗体(1:100)各 50 μL,4 °C 冰箱孵育过夜,室温复温 30 min,PBS

洗 5 min×3 次,滴加 Goat Anti-Rabbit IgG-FITC(1:100)和 Texas Red-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG+IgM (H+L)(1:100) 荧光标记二抗各 50 μL,室温避光孵育 1 h,PBS 洗 5 min×3 次,滴加 DAPI 染色液 50 μL,室温避光孵育 10 min,PBS 洗 5 min×3 次,20 μL 甘油封片,荧光显微镜下观察。同时用 PBS 代替一抗作空白对照以检查免疫反应的特异性。每只动物随机取 5 张切片,每张切片高倍镜视野(×400)观察左侧海马齿状回(dentate gyrus, DG),用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件计算单位面积阳性细胞数,取其平均值作为该组神经干细胞增殖水平。

1.8.2 免疫组化法检测大鼠缺血侧海马 DG 区 pERK1/2、pCREB1 蛋白的表达 严格按照通用型 SP 试剂盒标准流程操作。每只动物随机取 5 张切片,每张切片高倍镜视野(×400)观察左侧海马 DG 区,用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件计算单位面积阳性细胞数,取其平均值作为该组 pERK1/2、pCREB1 蛋白表达水平。

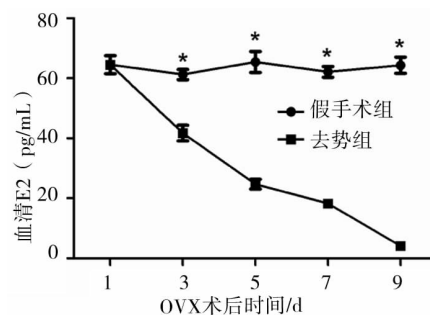
1.9 统计学分析

所有数据均用 SPSS 17.0 统计软件及 Graph Pad Prism 5 作图软件进行处理分析。计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较,用单因素方差分析(One-way ANOVA)。分析前,先进行正态性和方差齐性检验,满足条件者用方差分析,方差分析有统计学意义者,再进行两两比较,两两比较方差齐者用 SNIP 法,方差不齐者用 Tamhane's T_2 法。当资料不符合正态分布时,采用多个独立样本比较的秩和检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义标准。

2 结果

2.1 复合模型判断

OVX 术后,ELISA 结果见去势组大鼠血清雌二醇水平随着时间的推移不断降低,术后第 1 天至术后第 9 天由 (64.5 ± 3) pg/mL 下降至 (4.1 ± 0.5) pg/mL,小于 5.0 pg/mL;假手术组大鼠血清雌二醇在 (63.5 ± 4) pg/mL 范围内波动。说明去势造模成功(见图 1)。且 45 只大鼠 MCAO 术后 24 h,4 只死亡,5 只无明显神经功能缺损症状,36 只均出现不同程度的神经功能缺损,评分在 1~3 分之间,故纳入研究。说明有 36 只大鼠去势局灶性脑缺血复合模型造模成功。

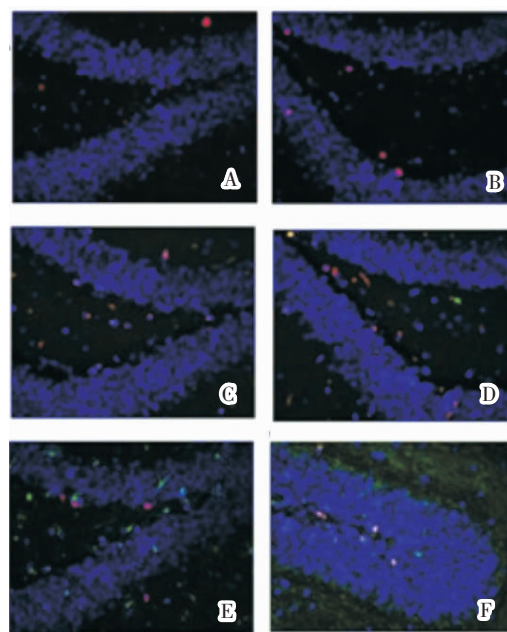


注:与去势组比较,* $P<0.05$ 。

图 1 OVX 术后假手术与去势组大鼠血清雌二醇随时间变化情况 ($n=6, \bar{x}\pm s$)

2.2 补阳还五汤对大鼠缺血侧海马 DG 区 NSCs 增殖的影响

各组大鼠缺血侧海马 DG 区免疫荧光结果显示:胞核呈红色荧光者为 BrdU 阳性细胞(增殖细胞),胞浆呈绿色荧光者为 Nestin 阳性细胞(NSCs),胞核呈蓝色荧光者为细胞核,Merge 后呈桔黄色者为 BrdU 和 Nestin 双标阳性细胞(即增殖的 NSCs)(见图 2)。双假手术组海马 DG 区 BrdU、Nestin 阳性细胞少量分布,表达较弱,无双标阳性细胞;复合模型组可见少量双标阳性细胞。补阳还五汤组和雌激素组模型组双标阳性细胞均增加,与复合模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$)(图 2C、D),而补阳还五汤组要多于雌激素组($P<0.05$)。与雌激素组、补阳还五汤组分别比较,雌激素+G15 组双标阳性细胞、补阳还五汤+G15 组双标阳性细胞均减少($P<0.05$)(见图 2、表 1)。



注:A 双假手术组,B 复合模型组,C 雌激素组,D 补阳还五汤组, E 雌激素+G15 组,F 补阳还五汤+G15 组。

图 2 各组大鼠缺血侧海马 DG 区 NSCs 增殖情况[免疫荧光 BrdU(红)/Nestin(绿)双标,×400]

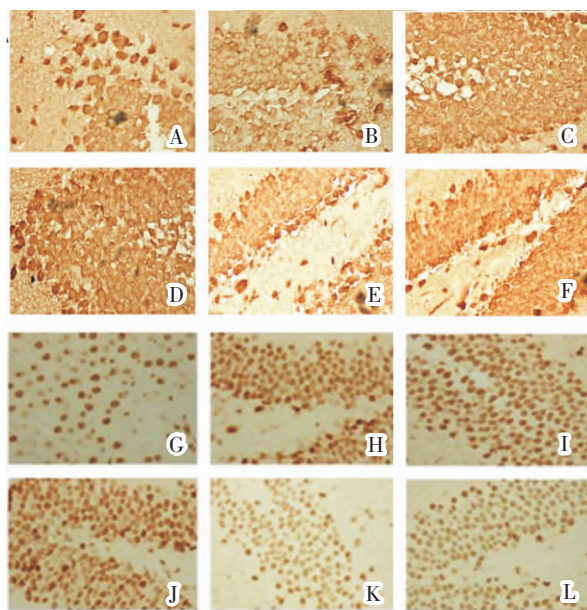
表 1 补阳还五汤对大鼠缺血侧海马 DG 区 NSCs 增殖的影响
($n=6, \bar{x} \pm s, \text{个}/\text{mm}^2$)

组别	BrdU 阳性细胞数	Nestin 阳性细胞数	双标阳性细胞数
双假手术组	3.62±0.91	2.96±0.51	2.50±0.21
复合模型组	6.93±1.83	5.12±1.51	4.36±0.62
雌激素组	14.82±4.21	15.41±3.16	11.62±2.78*
补阳还五汤组	25.21±4.60	26.76±4.87	23.53±3.28*▲
雌激素+G15 组	7.89±1.43	8.54±1.26	6.80±1.31▲
补阳还五汤+G15 组	14.32±2.54	15.57±2.31	13.34±1.76△
F 值	-	-	32.16

注:与复合模型组比较,* $P<0.05$;与雌激素组比较,▲ $P<0.05$;与补阳还五汤组比较,△ $P<0.05$ 。

2.3 补阳还五汤对大鼠缺血侧海马 DG 区 pERK1/2、pCREB1 蛋白表达的影响

各组大鼠缺血侧海马 DG 区免疫组化结果显示:pERK1/2 表达主要位于细胞浆,pCREB 1 表达主要位于细胞核,阳性细胞呈棕黄色或棕褐色(见图 3);双假手术组右侧海马 DG 区可见 pERK1/2、pCREB 1 一定量表达;复合模型组 pERK1/2、pCREB 1 表达稍增加。与复合模型组比较,补阳还五汤组和雌激素组 pERK1/2、pCREB 1 阳性细胞均增加,且差异有统计学意义($P<0.05$),但补阳还五汤组要多于雌激素组($P<0.05$)。与雌激素组、补阳还五汤组分别比较,雌激素+G15 组、补阳还五汤+G15 组 pERK1/2、pCREB1 阳性细胞均减少($P<0.05$)(见图 3、表 2)。



注:A、G 双假手术组,B、H 复合模型组,C、I 雌激素组,D、J 补阳还五汤组,E、K 雌激素+G15 组,F、L 补阳还五汤+G15 组;A、B、C、D、E、F 为 pERK1/2 蛋白表达情况,G、H、I、J、K、L 为 pCREB1 蛋白表达情况。

图 3 各组大鼠缺血侧海马 DG 区 pERK1/2、pCREB1 蛋白表达水平光镜图(免疫组化 SP 法,×400)

表 2 补阳还五汤对大鼠缺血侧海马 DG 区 pERK1/2、pCREB 1 蛋白表达的影响
($n=6, \bar{x} \pm s, \text{个}/\text{mm}^2$)

组别	pERK1/2 阳性细胞数	pCREB 1 阳性细胞数
双假手术组	224.31±13.42	187.36±12.89
复合模型组	243.42±23.76	198.32±14.90
雌激素组	463.90±45.82*	248.92±15.76*
补阳还五汤组	571.97±47.93*▲	289.46±29.13*▲
雌激素+G15 组	276.19±21.68▲	212.14±16.80▲
补阳还五汤+G15 组	284.29±27.96△	233.52±21.91△
F 值	65.40	52.21

注:与复合模型组比较,* $P<0.05$;与雌激素组比较,▲ $P<0.05$;与补阳还五汤组比较,△ $P<0.05$ 。

3 讨论

OVX 术可以有效消除雌性动物体内雌激素对外源性雌激素及其类似物对其干预效应的影响;MCAO 法是目前国际公认的模拟人类缺血性脑卒中的经典局灶性脑缺血造模方法。本实验在雌性大鼠成功去势的基础上采用改良的 Longa 线栓法造模,发现缺血后 2 h 大鼠均有不同程度的神经功能缺损,变异小,模型稳定可靠。OVX 术结合 MCAO 法成功复制了去势雌性大鼠局灶性脑缺血复合模型。

既往研究表明在缺血脑组织中,雌激素具有神经保护、神经营养和促神经再生作用,应用雌激素替代治疗可使脑梗死体积明显缩小,组织病理损害的严重程度亦明显减轻,分子机制主要与激活核受体 ER α 与 ER β 诱导的慢速基因组效应相关^[11]。新近研究发现一种新型膜性雌激素受体 GPR30/GPER-1,同时参与介导了雌激素快速非基因组效应及基因组效应。GPER-1 与雌激素结合后被激活,活化与其相偶联的 G 蛋白,使 G $\alpha\beta\gamma$ 异三聚体解离成 G α 和 G $\beta\gamma$,快速激活细胞内的第二信号系统包括 ERK1/2/CREB1 的激活、钙离子动员等,并间接调节一系列相关基因转录,从而影响细胞的增殖、分化、存活及凋亡^[12]。Jover-Mengual 等^[13]报道 ERK1/2、CREB1 在脑缺血损伤大鼠雌激素神经保护作用中扮演关键角色。本研究发现去势脑缺血雌性大鼠灌服雌二醇后,ERK/CREB 通路亦被激活,且右侧海马 DG 区 NSCs 增殖增加。

目前,尚没有足够的证据表明中风病人能够从雌激素替代治疗中获益,此外,长期使用雌激素替代治疗会增加老年中风高危患者乳腺癌、子宫内膜癌

等疾病的风险,因此,植物类雌激素逐渐引起了众多学者的关注。植物雌激素与哺乳动物雌激素具有相似的分子结构,能够通过结合并激活雌激素受体而发挥弱雌激素样神经保护作用,而不良反应少见^[14]。补阳还五汤是治疗中风后遗症的经典名方,临床疗效较肯定,但其促神经功能恢复的机理尚未完全明确^[5]。课题组前期研究证实该方能促进缺血脑内 NSCs 增殖,提高海马新生神经元数量,增加去势脑缺血大鼠雌二醇水平和雌二醇受体的表达,减少脑梗死体积,具有类雌激素作用^[6, 15]。本研究结果表明补阳还五汤能够促进去势脑缺血雌性大鼠右侧海马 DG 区 NSCs 增殖及 pERK1/2、pCREB1 的表达,且效果优于戊酸雌二醇,同时能被 GPER-1 的特异性阻断剂 G15 部分逆转,进一步说明本方具有类雌激素作用,而通过调控 ERK/CREB 通路活性是其作用的分子机制。

综上所述,补阳还五汤可以促进去势脑缺血雌性大鼠缺血侧海马 DG 区神经干细胞增殖,具有类雌激素作用;通过上调缺血侧海马 DG 区 ERK1/2、CREB1 的磷酸化水平,激活 ERK/CREB 信号通路,可能是其发挥类雌激素作用、促进内源性神经再生、修复受损的神经功能的作用机制之一。

参考文献:

- [1] Mu Q, Liu P, Hu X. Neuroprotective effects of Buyang Huanwu decoction on cerebral ischemia-induced neuronal damage[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(17): 1621-1627.
- [2] Shimada K, Kitazato KT, Kinouchi T, et al. Activation of estrogen receptor- α and of angiotensin-converting enzyme 2 suppresses ischemic brain damage in oophorectomized rats [J]. *Hypertension*, 2011, 57(6): 1161-1166.
- [3] Lim S, Moon M, Oh H, et al. Ginger improves cognitive function via NGF-induced ERK/CREB activation in the hippocampus of the mouse[J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25(10):1058-1065.
- [4] Frick KM, Kim J, Tuscher JJ, et al. Sex steroid hormones matter for learning and memory: estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents [J]. *Learn Mem*, 2015, 22(9):472-93.
- [5] 刘柏炎,沈剑刚,蔡光先,等.补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠脑内 caveolin1、2 的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2008,28(01):22-24.
- [6] Liu BY, Song X, Yi J, et al. Buyang Huanwu Decoction (补阳还五汤) reduces infarct volume and enhances estradiol and estradiol receptor concentration in ovariectomized rats after middle cerebral artery occlusion [J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2014, 20: 782-786.
- [7] Zeynalov E, Rezvani N, Miyazaki C, et al. Reproductive Senescence Blunts Response of Estrogen Receptor- α Expression to Estrogen Treatment in Rat Post-Ischemic Cerebral Microvessels [J]. *PloS one*, 2014, 9(7): e102194.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] Chou J, Harvey BK, Chang CF, et al. Neuroregenerative effects of BMP7 after stroke in rats[J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2006, 240(1): 21-29.
- [10] Dennis M K, Burai R, Ramesh C, et al. In vivo effects of a GPR30 antagonist [J]. *Nature Chemical Biology*, 2009, 5(6): 421-427.
- [11] Zhang D, Xia H, Xu L, et al. Neuroprotective effects of 17 β -estradiol associate with KATP in rat brain [J]. *Neuroreport*, 2012, 23(16): 952-957.
- [12] Lappano R, De Marco P, De Francesco EM, et al. Cross-talk between GPER and growth factor signaling [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2013, 137:50-56.
- [13] Jover-Mengual T, Zukin RS, Etgen AM. MAPK signaling is critical to estradiol protection of CA1 neurons in global ischemia [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(3): 1131-1143.
- [14] Westmark CJ. A hypothesis regarding the molecular mechanism underlying dietary soy-induced effects on seizure propensity[J]. *Front Neurol*, 2014, 5:169.
- [15] 刘柏炎,蔡光先,陈雪梅,等.补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血神经再生的影响[J].*中华神经医学杂志* 2007,6(8):762.

(本文编辑 杨 瑛)