

本文引用:任晨斌,伍大华,郭晨,谢乐.滋肾活血方对血管性痴呆大鼠 NR2A 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(2):141-144.

滋肾活血方对血管性痴呆大鼠 NR2A 表达的影响

任晨斌¹,伍大华^{1*},郭晨²,谢乐¹

(1.湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙 410006;2.宁波老年康复医院,浙江宁波 315033)

[摘要] **目的** 探讨滋肾活血方对血管性痴呆(vascular dementia,VD)大鼠 NR2A 表达的影响。**方法** 采用改良的双侧颈总动脉结扎法(2-VO法)制作 VD 大鼠模型,将其随机分为假手术组、模型组、滋肾活血组及奥拉西坦组。给药 4 周后,用免疫组化和 RT-PCR 检测 NR2A 及其 mRNA 的表达。**结果** 与假手术组相比,模型组 NR2A 及其 mRNA 表达均降低($P<0.05$);与模型组相比,滋肾活血组及奥拉西坦组 NR2A 及其 mRNA 表达增高($P<0.05$)。**结论** 滋肾活血方可提高 VD 大鼠的学习记忆能力,这可能与上调 NR2A 的表达有关。

[关键词] 滋肾活血方;血管性痴呆;N-甲基-D-天门冬氨酸

[中图分类号] R285.5;R338.64

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.02.006

Effect of Zishen Huoxue Decoction on Expression of NR2A in Rats with Vascular Dementia

REN Chenbin¹, WU Dahua^{1*}, GUO Chen², XIE Le¹

(1.The Affiliated Hospital of Hunan Institute of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 2.Ningbo Geriatric Rehabilitation Hospital, Ningbo, Zhejiang 315033, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Zishen Huoxue decoction on the expression of NR2A in rats with vascular dementia (VD). **Methods** This VD model rats were built by the improved 2-VO. The rats were randomly divide into the sham-operation group, the model group, the Zishen Huoxue group and the oxiracetam group. After giving medicine for 4 weeks later, the expression of NR2A and its mRNA were measured by immunohistochemical analysis and RT-PCR. **Results** Compared with the model group, the expression of NR2A and its mRNA in Zishen Huoxu decoction group and oxiracetam group increased ($P<0.05$). **Conclusion** Zishen Huoxue decoction could improve the ability of learning and memory, which might be associated with the up-regulation of the expression of NR2A.

[Keywords] Zishen Huoxue decoction; vascular dementia; N-methyl-D-aspartate

血管性痴呆(vascular dementia,VD)以学习记忆功能缺损为主要症状。现在大量研究表明学习记忆过程和长时程增强(long-term potentiation,LTP)密切相关^[1]。LTP形成后,动物的学习能力增强;而阻

抑其产生,则动物的学习记忆受损。据报道,LTP的产生和维持与谷氨酸(Glu)及其受体有关^[2]。Glu大量释放或重摄取受阻时,可产生兴奋性毒性作用^[3],可致脑组织广泛的病理性损伤^[4]。研究发现,组成

[收稿日期]2017-02-19

[基金项目]湖南省中医药管理局重点项目(201528)。

[作者简介]任晨斌,男,硕士,研究方向:中西医结合神经内科。

[通讯作者]*伍大华,女,教授,硕士研究生导师,E-mail:893049352@qq.com

Glu受体的亚单位NR2A在此病理过程中起着关键作用^[5]。既往研究显示,滋肾活血方可以改善VD大鼠慢性脑缺血缺氧症状,减轻海马损伤,提高其学习和记忆能力^[6]。本文研究滋肾活血方对VD大鼠NR2A表达的影响,探讨滋肾活血方在治疗VD中的可能作用机制。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

80只健康雄性SD大鼠,体质量220~250g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证编号:SYXK(湘)2015-0008。

1.2 药品、试剂及仪器

滋肾活血方(由桑椹、石菖蒲、丹参等组成)由湖南省中医药研究院附属医院提供。奥拉西坦胶囊,由欧意药业有限公司生产,批号:059160250。兔抗NMDAR2A多克隆抗体:Bioss;一步法RT-PCR试剂盒:大连宝生物公司;100bp标准DNA分子量:美国thermo公司;2×Taq PCR MIX:天根生物公司;Triozi:Life Technologies Corporation;PCR引物:上海生物工程公司合成。紫外分光光度仪、DNA热循环扩增仪:美国Thermo公司;凝胶扫描分析系统:美国Startgance公司;图像分析系统:麦克奥迪实业集团有限公司。

1.3 动物分组及造模

80只大鼠造模前先采用随机数字表法选出14只作为假手术组,其余66只大鼠造模。采用改良2-VO法制作VD大鼠模型^[7]。大鼠术前12h禁食,4h禁水。大鼠腹腔麻醉,固定于鼠板上,钝性分离右侧颈总动脉,而后以外科线双重结扎,7d后进行相同操作,结扎左侧颈总动脉。假手术组:仅分离颈总动脉但不结扎,余操作相同。术后3d青霉素钠50万U/kg腹腔注射。造模期间假手术组大鼠死亡2只,66只造模大鼠死亡13只,术后7d行水迷宫测试,以正常大鼠逃避潜伏期(escape latency, EL)的平均值为参考值,计算每只造模大鼠EL与参考值之差占该鼠EL的比值。若该值>20%为痴呆鼠^[8]。剔除掉大鼠游泳姿势不良以及未明显痴呆的大鼠。经水迷宫筛选出血管性痴呆大鼠36只进行后续实验。将造模成功大鼠按随机数字表法分为奥拉西坦组、滋肾活血

组和模型组,每组12只。

1.4 干预

每组大鼠灌胃剂量为9 mL/(kg·d)。其中奥拉西坦组给予奥拉西坦液216 mg/(kg·d)(相当于临床等效剂量),滋肾活血组给予滋肾活血方17.8 g/(kg·d)(相当于临床等效剂量),模型组、假手术组给予蒸馏水。药物剂量参照文献计算^[9]而得。采用灌胃法,每天1次,连续干预4周。

1.5 免疫组化检测NR2A的表达

水迷宫测试结束后,大鼠处死后将针头自左心室穿入至升主动脉,同时剪破右心耳,先用生理盐水快速灌注至流出液体清亮,然后用4%多聚甲醛灌注至肢体完全硬化。取脑,用多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片。按照二步法免疫组化操作步骤,对大鼠海马组织CA1区NR2A进行免疫染色。用图像分析软件检测,图像上出现棕黄色颗粒即免疫组化染色的阳性表达成分,以平均光密度值来表示NR2A的表达。

1.6 RT-PCR检测NR2AmRNA的表达

大鼠断头,取海马组织(冰盒上操作,用Triozi一步法提取RNA,按说明逆转录为cDNA。根据提供的基因序列设计特异性引物,引物设计由上海生工公司合成。 β -actin引物序列为F:5'—TGTCAC-CAACTGGGACGATA—3',R:5'—GGGTGTTGAAG-GTCTCAAA—3',扩增片段长度为207 bp。按照说明进行反应,扩增条件:50℃,30 min;94℃变性2 min;变性94℃30 s;复性58℃30 s。延伸72℃1 min,共进行30个循环。NR2A引物序列为F:5'—TTCTCCACCTTTCCGATTG—3',R:5'—GGTCAATCT-GCCTCTTCCAG—3',扩增片段长度为302 bp。按照说明进行反应,扩增条件:50℃,30 min;94℃变性2 min;变性94℃30 s;复性58℃30 s。延伸72℃1 min,共进行30个循环。扩增产物在1%琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下分析PCR结果。以 β -actin的表达量为基准,凝胶成像分析系统测定目的片段的灰度值来表示NR2AmRNA的表达。

1.7 统计学处理

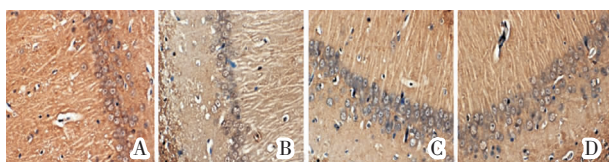
采用SPSS 17.0统计软件处理数据。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示。符合方差齐性和正态分布用单因素方差分析组间差异,组间多重比较选用LSD检验。不符合方差分析条件的数据,用Kruskal-Wallis H检

验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化结果

NR2A 免疫组化结果见图 1、表 1。与假手术组比较,模型组平均光密度减少($P<0.05$);与模型组相比,滋肾活血组与奥拉西坦组平均光密度增加,差异均有统计学意义($P<0.05$)。

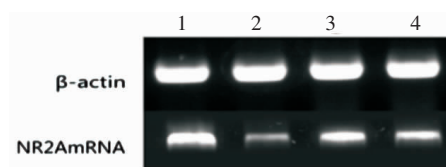


注:A.假手术组;B.模型组;C.滋肾活血组;D.奥拉西坦组

图 1 各组大鼠 CA1 区免疫组化图片(免疫组化,×400)

2.2 RT-PCR 结果

NR2AmRNA RT-PCR 结果见图 2、表 1。与假手术组比较,模型组灰度值明显减少($P<0.05$);与模型组相比,滋肾活血组与奥拉西坦组灰度值增加,差异均有统计学意义($P<0.05$)。



注:1.假手术组;2.模型组;3.滋肾活血组;4.奥拉西坦组

图 2 各组大鼠 RT-PCR 电泳图

表 1 各组大鼠 NR2A 及 NR2 mRNA 表达比较

组别	NR2A	NR2AmRNA
假手术组	0.696±0.206	1.167±0.151
模型组	0.316±0.058*	0.302±0.095*
滋肾活血组	0.490±0.050*▲	0.549±0.097*▲
奥拉西坦组	0.532±0.081*▲	0.568±0.134*▲
F 值	8.87	27.70
P 值	0.001	0.000

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,▲ $P<0.05$ 。

3 讨论

记忆障碍是 VD 的早期核心症状。学习和记忆的神经生物学基础是突触可塑性^[10]。作为学习记忆细胞突触模式的 LTP 成为衡量突触可塑性的客观

标准^[11]。在谷氨酸受体中,N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体与学习记忆的关系最为密切。一方面认为,NMDA 受体是突触可塑性和 LTP 的主要调控者,与学习记忆功能密切相关;另一方面,NMDA 受体可介导兴奋性毒性作用,引起 Ca^{2+} 过度内流,导致海马区神经细胞坏死,引发认知功能障碍^[12]。研究报道,在缺血后期,学习记忆损害与 NMDA 受体表达下降相一致,说明其可能参与了学习记忆障碍的分子生物学机制^[13]。介导 NMDA 受体发生活性改变的病理状态之一就是慢性脑缺血带来的脑组织微循环损伤。有研究表明缺血缺氧的大鼠全脑中 NR2A 表达下降较 NR1 和 NR2B 更为明显^[12]。国外文献指出,与正常人相比,VD 患者的脑皮质和海马组织中 NR2A 表达明显降低^[14]。分析其原因可能是脑缺血、缺氧时兴奋性氨基酸谷氨酸释放增多,进而激活 NMDA 受体 NR2A,而其主要对二价钙离子通透,钙离子大量内流,引起神经元毒性反应;另外神经元坏死,又会导致 NMDA 受体 NR2A 表达减少,从而引起学习记忆的障碍。既往研究发现^[9],与模型组相比,滋肾活血组逃避潜伏期缩短($P<0.05$),跨越平台次数增多($P<0.05$),说明滋肾活血方可以改善 VD 大鼠的学习和记忆能力。本研究发现,模型组大鼠海马 NR2A 表达水平下降,经滋肾活血方干预后,其表达水平上升。综上表明滋肾活血方改善 VD 大鼠的学习记忆能力与 NR2A 的表达有关。

国医大师刘祖贻认为:VD 病位在脑,属本虚标实之证。以正气亏虚为本,瘀痰浊毒为标。肾阴亏虚、瘀血阻络为其常见病机。国医大师刘祖贻在中医药理论指导下,结合自己多年临床经验,运用滋肾活血方治疗 VD,疗效显著。方中制首乌、枸杞子滋补肝肾,两者共为君药。桑椹子滋阴养血;益智仁助阳化阴,两者可使化源得滋,脑髓得充,共为臣药。葛根轻清升阳;丹参活血祛瘀;五味子滋肾涩精;远志宁心安神;石菖蒲开窍宁神;全蝎搜风通络,六药为佐。郁金血中气药;山楂消食健胃,共为使药。诸药配合,共奏活血通窍、滋阴补肾、益智健脑之效。

本研究提示滋肾活血方的作用机制可能与改善 VD 大鼠慢性脑缺血缺氧症状,提高 NR2A 的表达,减轻海马神经元损伤,从而提高学习记忆能力有关。据国外资料报道,VD 是迄今为止唯一可防治的痴

呆性疾病^[5]。因此运用中医药治疗VD越来越受到人们的关注。本研究揭示了中药复方在脑缺血损伤治疗中发挥重要生理效应,值得进一步研究和推广。

参考文献:

- [1] BILISS T V, COLLINGRIDGE G L. Asynaptic model of memory long term potentiation in the hippocampus[J]. *Nature*, 1993,361(6407):31-39.
- [2] 樊敬峰,王伟斌.谷氨酸受体通路及其功能研究进展[J].*疑难病杂志*,2005,4(5):313-315.
- [3] 常姗姗.亚慢性染毒 B[a]P 对大鼠脑区 NMDAR mRNA 表达的影响及替普瑞酮保护作用的研究[D].太原:山西医科大学,2011.
- [4] KUMAR A, ZOU L, YUAN X, et al. N-methyl-D-aspartate receptor: transient loss of NR1/NR2B subunits after traumatic brain injury in a rodent model[J]. *J Neurosci Res*, 2002,67(6):781-786.
- [5] CHEN C T, GREEN J T, ORR S K, et al. Regulation of brain polyunsaturated fatty acid uptake and turnover[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2008,79(3-5):85-91.
- [6] 任晨斌,伍大华,张发友,等.滋肾活血方对血管性痴呆大鼠学习记忆能力和海马形态学的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2017,37(10):1082-1085.
- [7] HUANG X W, LI H, QIN D L, et al. The model of VD rats was established by the method of ligation bilateral common carotid artery at two times[J]. *Chin J Gerontol*, 2010,30(14):2006-2007.
- [8] ZHAO X L, FANG X B, LI D P. Establishing vascular dementia model in rats[J]. *J Chin Med Univ*, 2002,31(3):166-167,176.
- [9] 贺石林,王 键,王净净.中医科研设计与统计学[M].2版.长沙:湖南科技出版社,2001:48-49.
- [10] HOWLAND J G, WANG Y T. Synaptic plasticity in learning and memory stress effects in the hippocampus[J]. *Prog Brain Res*, 2008,169(1):145-158.
- [11] STRAMIELLO M, WAGNER J J. NMDA receptor mediated enhancement of LTP requires PKA, Src family kinases, and NR2B-containing NMDARs [J]. *Neuropharmacology*, 2008, 55(5): 871-877.
- [12] 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.
- [13] 陈 文.血管性痴呆大鼠 NMDA 受体与学习记忆的研究[J].*菏泽医学专科学校学报*,2014,26(2):76-77.
- [14] BI H, SZE C I. N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messenger RNA levels are altered in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease [J]. *J Neurol Sci*, 2002, 200(1):11-18.
- [15] GORELICK P B. Status of risk factors for dementia associated with stroke[J]. *Stroke*, 1997,28(2):459-463.

(本文编辑 杨 瑛)