

·方药研究·

本文引用:易亚乔,何清湖,刘 检,刘 林,成绍武,廖 君,王国佐,谭 琥,刘吉勇,陈俊炜,郭艳幸,葛金文.基于 SIRT1/NF- κ B 炎性通路探讨加味脑泰方对血管性痴呆大鼠学习记忆及海马组织病理形态的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(6):684-688.

基于 SIRT1/NF- κ B 炎性通路探讨加味脑泰方对血管性痴呆大鼠学习记忆及海马组织病理形态的影响

易亚乔¹,何清湖¹,刘 检²,刘 林²,成绍武¹,廖 君³,王国佐¹,谭 琥¹,刘吉勇¹,陈俊炜¹,郭艳幸³,葛金文^{1*}

(1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007;

3.河南省洛阳正骨医院,河南 洛阳 471002)

[摘要] **目的** 探讨加味脑泰方(以下简称 JWF)对血管性痴呆(vascular dementia, VD)大鼠 SIRT1/NF- κ B p56 炎性通路的调控作用。**方法** 采用双侧颈总动脉结扎法(two-vessel occlusion, 2-VO)复制 VD 大鼠模型。实验设正常组,假手术组,模型组, JWF 高、中、低剂量组和奥拉西坦组,其中 JWF 高、中、低剂量组和奥拉西坦组分别灌胃给予 JWF 17.0、34.0、51.0 g/kg 和奥拉西坦 0.216 g/kg,其余 3 组灌服等容量蒸馏水,连续干预 30 d。采用 Morris 水迷宫、HE 染色分别检测大鼠学习记忆能力和海马组织病理形态变化;采用免疫组化检测沉默信息调节因子-1 (silent information regulator-1, SIRT1)、核因子 κ B 抑制蛋白 d 亚基(The nuclear factor κ B inhibits the protein subunit, I κ B α)、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)蛋白表达情况。**结果** 与正常组比较,模型组大鼠学习记忆能力显著降低($P<0.05$),海马神经元变性、坏死,炎性细胞浸润增加,且 SIRT1、I κ B α 表达下调,NF- κ B p56 表达上调($P<0.05$);与模型组比较,奥拉西坦组和 JWF 高、中剂量组大鼠学习记忆能力显著增强($P<0.05$),海马组织中神经元锥体细胞排列较整齐,轮廓清晰,炎性细胞浸润显著减少,且海马组织内 SIRT1、I κ B α 表达上调,NF- κ B p56 表达下调($P<0.05$)。**结论** JWF 对血管性痴呆大鼠炎性相关信号通路 SIRT1/NF- κ B p56 具有明显的调控作用,这可能是其保护 VD 大鼠海马神经元继而改善学习记忆能力的重要机制之一。

[关键词] 加味脑泰方;血管性痴呆;海马组织;沉默信息调节因子-1;核因子 κ B 抑制蛋白 d 亚基;核因子- κ B

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.06.002

Effects of Jiawei Naotai Formula on Learning, Memory and Pathological Morphology of Hippocampal Tissue Based on Inflammatory Pathway of SIRT1/NF- κ B in Rats with Vascular Dementia

YI Yaqiao¹, HE Qinghu¹, LIU Jian², LIU Lin², CHEN Shaowu¹, LIAO Jun³, WANG Guozuo¹, TAN Hu¹, LIU Jiyong¹,

CHEN Junwei¹, GUO Yanxing³, GE Jinwen^{1*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Luoyang Bone-setting Hospital of Henan Province, Luoyang, Henan 471002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the regulatory effects of Jiawei Naotai Formula (JWF) on inflammatory pathway of SIRT1/NF- κ B p56 in rats with vascular dementia (VD). **Methods** The model of VD rats was established by bilateral common carotid artery ligation assay (two-vessel occlusion, 2-VO). There were normal group, sham operation group, model group, JWF groups

[收稿日期]2018-08-14

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(81774129);湖南省自然科学基金(2019JJ50434);中国博士后科学基金面上项目(2018M632972);湖南省中医药科研项目(201822);湖南中医药大学校级科研项目(2017XJJ09);湖南省“双一流”学科中西医结合;湖南省教育厅科学研究项目(重点编号:18A206)。

[作者简介]易亚乔,女,博士,研究方向:中西医结合防治脑血管疾病。

[通讯作者]* 葛金文,男,教授,博士研究生导师,E-mail:40831556@qq.com。

of high, moderate and low dose, as well as oxiracetam group in this experiment. The JWF groups of high, moderate and low dose, and the oxiracetam group were given 17.0, 34.0 and 51.0 g/kg Jiawei Naotai Formula and 0.216 g/kg oxiracetam respectively, while the other 3 groups were given the same amount of distilled water, for 30 d of consecutive intervention. The learning and memory ability and the pathological morphology changes of hippocampal tissue of rats were detected by Morris water maze and HE staining, respectively. The protein expressions of SIRT1, I κ B α and NF- κ B were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the normal group, the learning and memory ability of rats in the model group was obviously decreased ($P < 0.05$); degeneration and necrosis of hippocampal neurons was detected and inflammatory cell infiltration was increased; the expressions of SIRT1 and I κ B α were decreased, while that of NF- κ B p56 was increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the learning and memory ability of rats in the oxiracetam group and the JWF groups of high, moderate and low dose were notably improved ($P < 0.05$); the neuron pyramidal cells in the hippocampal tissue were more orderly arranged with clear outlines, and inflammatory cell infiltration was obviously decreased; the expressions of SIRT1 and I κ B α was increased, while that of NF- κ B p56 was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** There are significant regulatory effects of JWF on inflammatory pathway of SIRT1/NF- κ B p56 in rats with vascular dementia, which may be one of the important mechanisms for protecting hippocampal neurons of VD rats and subsequently improving the learning and memory ability.

[**Keywords**] Jiawei Naotai Formula; vascular dementia; hippocampal tissue; SIRT1; I κ B α ; NF- κ B

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是指各种脑血管疾病所致的严重认知功能障碍综合征^[1],且其发病机制依旧未明。目前,临床治疗 VD 主要从改善认知功能紊乱及保护脑细胞等方面着手^[2-3],西药疗效不佳。研究发现沉默信息调节因子-1(silent information regulator-1, SIRT1)在调控细胞衰老、代谢紊乱等方面发挥着重要作用^[4],另 SIRT1 mRNA 在海马神经元具有丰富表达,其能通过抗炎效应而减轻缺血缺氧性脑损伤,而炎症反应在血管痴呆等慢性脑缺血后的继发性神经损伤疾病发生、发展过程中起着重要作用,由此推测 SIRT1 可能是 VD 的重要防治靶点。加味脑泰方(以下简称 JWF)由黄芪、川芎、远志等七味药组成。我们前期研究发现,JWF 能有效改善 VD 大鼠学习记忆能力,并显著抑制炎症因子(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的表达^[5-6]。因此,本文拟采用双侧颈总动脉结扎法(two-vessel occlusion, 2-VO)复制大鼠血管性痴呆模型,同时基于 SIRT1/NF- κ B p56 炎性通路进一步探讨 JWF 对 VD 大鼠的保护作用及潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,5~6 周龄,体质量 220~240 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号为 SCXK(湘)2013-0004。

1.2 药物与试剂

JWF 由黄芪、当归、地龙、川芎、三七、石菖蒲、远志组成,中药饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院。JWF 大鼠等效剂量为 17.01 g/kg。奥拉西坦胶

囊,购自石药集团,大鼠临床等效剂量为 0.216 g/kg。兔抗大鼠多克隆抗体 SIRT1、核因子 κ B 抑制蛋白 d 亚基(The nuclear factor κ B inhibits the protein subunit, I κ B α)、NF- κ B p56 均购自 Proteintech 公司(其货号分别为 10268-1-AP、10268-1-AP 及 10745-1-AP)。

1.3 主要仪器

MT-200 型 Morris 水迷宫(成都泰盟科技有限公司);Motic B5 型图像分析系统(麦克奥迪公司)。

1.4 动物造模、分组及干预

50 只大鼠适应性饲养 3 d 后,随机选取 44 只,其中 6 只大鼠仅游离双侧颈总动脉而不结扎,作为假手术组大鼠,其余 38 只参照文献方法[7]采用 2-VO 法复制 VD 大鼠模型,术后 24 h 合计 3 只大鼠死亡。采用 Morris 水迷宫试验剔除造模后不合格大鼠(即逃避潜伏期小于 5 s 或大于 120 s),经筛选后有 5 只大鼠不符合模型标准,最后将 6 只正常大鼠、6 只假手术大鼠及造模成功的 30 只模型大鼠分为正常组,假手术组,模型组,JWF 高、中、低剂量组和阳性药组,其中 JWF 高、中、低剂量组和阳性药组大鼠分别灌胃给予 17.0、34.0、51.0 g/kg JWF 和 0.216 g/kg 奥拉西坦,其余 3 组灌服等容量蒸馏水,连续干预 30 d。

1.5 学习记忆能力检测

采用 Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆能力,主要步骤如下:连续训练大鼠 5 d,于第 6 天撤走水面平台,将大鼠分别从 4 个象限放入水中,采用 Motic B5 型图像分析系统记录 120 s 内大鼠穿越平台的次数,并将其作为学习记忆能力的体现指标。

1.6 海马组织病理学检测

采用 HE 染色检测大鼠海马组织病理学变化,

各组大鼠海马组织样本经4%多聚甲醛固定、乙醇梯度脱水等操作后,切片,染色,最后在显微镜下观察海马神经元形态变化。

1.7 SIRT1、I κ B α 、NF- κ B p56 蛋白检测

采用免疫组化检测大鼠海马组织中 SIRT1、NF- κ B p56、I κ B α 蛋白表达情况。各组大鼠海马组织经4%多聚甲醛固定、切片脱蜡、3%双氧水处理、修复抗原等操作后,加入一抗(1:200)4 °C 过夜,然后加入 HRP-IgG 二抗(1:400),最后经显色、脱水、封片等操作后,于光镜下随机取5个视野,采用 Motic 图像分析系统测定其平均灰度值,其中灰度值越小,提示蛋白阳性表达量越高。

1.8 统计学处理

实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用 SPSS 16.0 软件,通过 One-Way ANOVA 检验,比较各组间的显著性差异, $P<0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 JWF 对 VD 大鼠学习记忆能力的影响

Morris 水迷宫实验,模型组大鼠跨越平台次数明显减少($P<0.05$);与模型组比较,奥拉西坦组及 JWF 高、中剂量组大鼠跨越平台次数显著增加($P<0.05$),经药物干预后大鼠记忆能力均有一定改善。见表1。

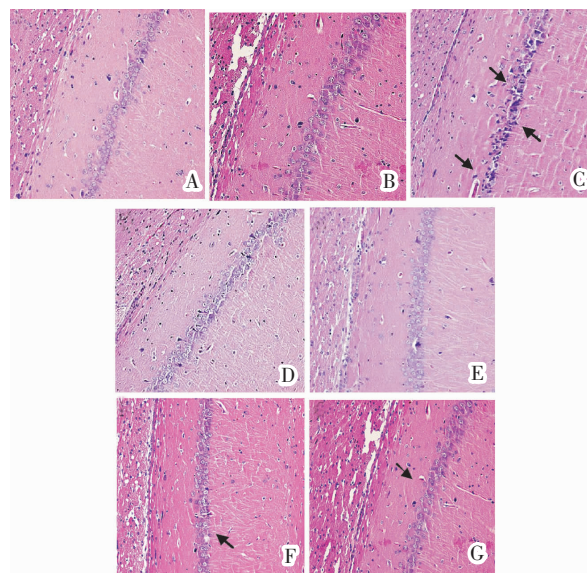
表1 各组大鼠学习记忆能力比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	跨越平台次数/次
正常组	-	14.1±2.3
假手术组	-	13.7±1.8
模型组	-	5.5±1.2*
奥拉西坦组	0.216	11.5±1.9 [#]
JWF 高剂量组	17.0	10.1±1.3 [#]
JWF 中剂量组	34.0	9.5±1.1 [#]
JWF 低剂量组	51.0	6.4±1.0
F 值		13.2
P 值		0.000

注:与正常组及假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$

2.2 JWF 对 VD 大鼠海马组织病理形态的影响

HE 染色结果显示,模型组大鼠海马神经元变性、坏死(如箭头所示),炎性细胞浸润增加;与模型组比较,奥拉西坦组及 JWF 各剂量组大鼠海马神经元锥体细胞排列较整齐,轮廓清晰,炎性细胞浸润显著减少。见图1。



注:A.正常组;B.假手术组;C.模型组;D.奥拉西坦组;E.JWF 高剂量组;F.JWF 中剂量组;G.JWF 低剂量组

图1 各组大鼠海马组织病理光镜图(HE,×200)

2.3 JWF 对 VD 大鼠炎性通路 SIRT1、I κ B α 、NF- κ B p56 蛋白表达的影响

免疫组化结果显示,SIRT1、NF- κ B p56、I κ B α 蛋白阳性表达呈棕黄色或棕褐色。结果显示,模型组大鼠海马组织中 SIRT1、I κ B α 阳性表达降低,NF- κ B p56 阳性表达明显升高($P<0.05$);与模型组比较,奥拉西坦组及 JWF 高、中剂量组大鼠海马组织中 SIRT1、I κ B α 阳性表达增加,NF- κ B p56 阳性表达显著减少($P<0.05$),见表2、图2-4。

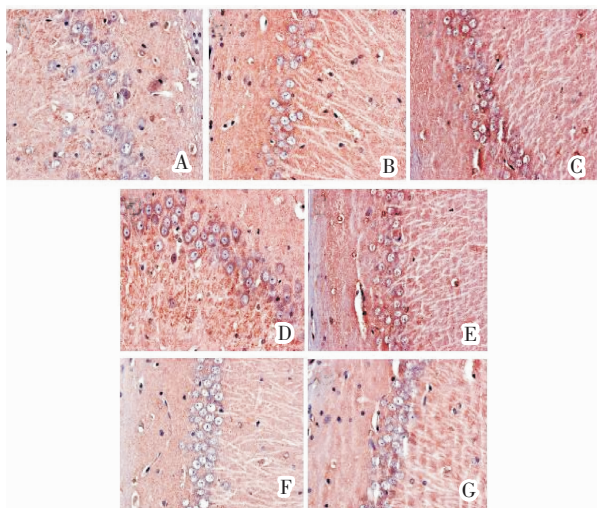
表2 各组大鼠 SIRT1、I κ B α 、NF- κ B p56 蛋白灰度值比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SIRT1	I κ B α	NF- κ B p56
正常组	-	50.32±8.06	79.01±9.73	98.68±10.79
假手术组	-	55.78±9.28	81.12±11.74	93.89±12.39
模型组	-	88.46±11.39*	106.03±10.87*	58.91±8.91*
奥拉西坦组	0.216	64.57±11.01 [#]	85.32±12.31 [#]	74.21±10.56 [#]
JWF 高剂量组	17.0	74.36±9.05 [#]	88.54±9.72 [#]	72.40±9.82 [#]
JWF 中剂量组	34.0	72.34±10.42 [#]	90.18±9.82 [#]	66.71±10.31 [#]
JWF 低剂量组	51.0	80.23±12.52	98.2±10.38	60.71±9.91
F 值		5.076	9.233	6.692
P 值		0.006	0.001	0.002

注:与正常组及假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组相比,[#] $P<0.05$

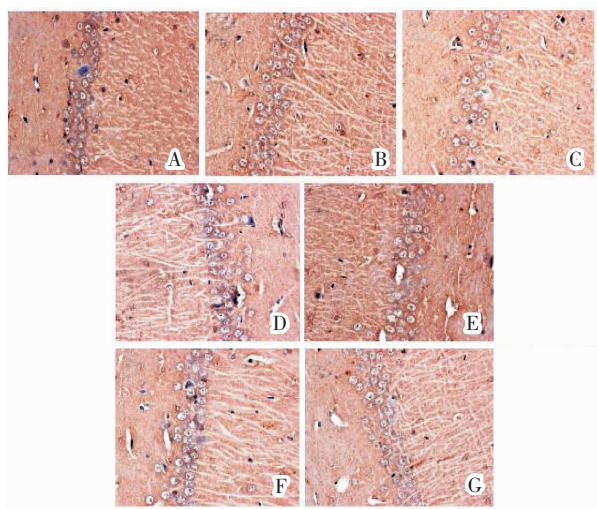
3 讨论

VD 是指各种脑血管疾病所致的学习记忆、认知功能紊乱综合征,临床特点为遇事易忘、情绪失调、理解错误等。目前 VD 发病机制不明,研究发现其与



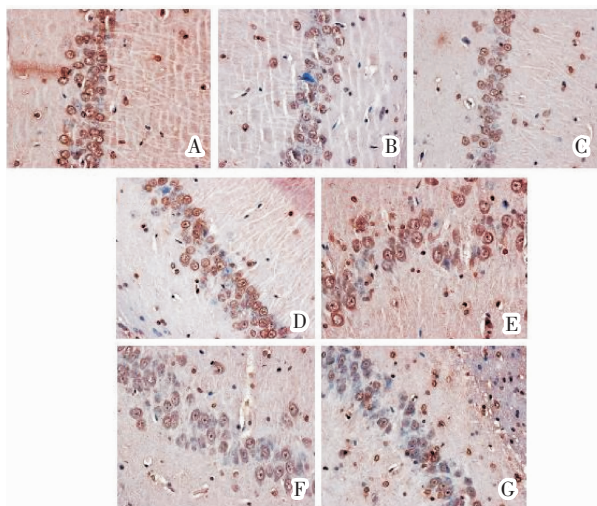
注:A.正常组;B.假手术组;C.模型组;D.奥拉西坦组;E.JWF 高剂量组;F.JWF 中剂量组;G.JWF 低剂量组

图 2 各组大鼠 SIRT1 蛋白表达光镜图(免疫组化,×400)



注:A.正常组;B.假手术组;C.模型组;D.奥拉西坦组;E.JWF 高剂量组;F.JWF 中剂量组;G.JWF 低剂量组

图 3 各组大鼠 I κ B α 蛋白表达光镜图(免疫组化,×400)



注:A.正常组;B.假手术组;C.模型组;D.奥拉西坦组;E.JWF 高剂量组;F.JWF 中剂量组;G. JWF 低剂量组

图 4 各组大鼠 NF- κ B p56 蛋白表达光镜图(免疫组化,×400)

脑缺血缺氧,继而引起的特定神经组织损害息息相关,因此慢性脑缺血缺氧可能是探究 VD 发病机制的有效途径。既往研究表明,双侧颈总动脉永久性结扎法(2-VO 法)能促使海马、皮层等脑组织产生缺血缺氧性损伤,继而诱发 VD^[8],且该法操作简便、重现性佳,现已被广泛用于 VD 研究^[9]。

SIRT1 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性去乙酰化酶,其涉及机体 DNA 损伤修复、氧化应激、炎症反应等生理过程。研究发现,敲除 SIRT1 后,海马神经元突触可塑性明显降低,小鼠学习记忆、认知能力显著下降^[10-12]。SIRT1/NF- κ B 信号通路参与了 VD 病理机制的炎症过程,当 VD 发生时,SIRT1 促进下游信号 NF- κ B 亚基 RelA/p65 去乙酰化,抑制其转录活性而调控炎症。I κ B α 是 NF- κ B 抑制因子,炎症发生时前者磷酸化,并促使后者转位至细胞核,进而激活炎症反应^[13]。此外,SIRT1 还可直接乙酰化 NF- κ B p65,同时抑制 I κ B α 磷酸化,进而减少炎症因子和趋化因子的产生,防止炎症引起的神经元损伤^[14]。本文采用 2-VO 法复制 VD 大鼠模型,并予以 JWF 干预后,结果发现模型大鼠学习记忆能力明显下降,海马锥体细胞明显受损,炎性细胞浸润增加,炎性通路相关蛋白 SIRT1、I κ B α 表达明显降低、NF- κ B p56 表达明显增加,而给予 JWF 干预后,大鼠学习记忆能力显著改善,海马神经元锥体细胞排列较整体,轮廓清晰,炎性细胞浸润显著减少,SIRT1、NF- κ B 和 I κ B α 蛋白表达异常被明显逆转,这提示 JWF 可能是通过调控 SIRT1/NF- κ B p56 信号通路保护海马神经元继而改善 VD 大鼠学习记忆能力。

VD 属于中医学“呆病”“善忘”等范畴^[5],其为本虚标实之病,本虚为气血亏虚,标实为痰瘀阻络,年老气衰,气虚行血无力,瘀阻脑络则发为痴呆,基本病机特点可用“虚、瘀、痰”来概括。加味脑泰方经补阳还五汤加减而成,由黄芪、川芎、当归、石菖蒲、远志、地龙、三七组成,方中黄芪为君、当归为臣,佐以川芎、地龙等,全方共奏益气活血、化痰祛瘀之功效。我们前期发现脑泰方具有抗血栓、抗炎等作用,能明显保护缺血缺氧脑组织^[16]。现代药理学研究亦发现,当归多糖、三七皂苷等具有明显的抗炎、抗氧化、改善脑缺血及 VD 大鼠学习记忆功能^[17]。本文结果亦再次佐证了调控炎性通路可有效保护海马神经元继而改善 VD 大鼠学习记忆能力。

综上所述,JWF对VD大鼠SIRT1/NF- κ B p56炎症通路具有明显的调控作用,这可能是其保护海马神经元继而抗血管性痴呆的重要机制之一,后续实验我们将以SIRT1上下游的关键靶点为核心,并辅以受体阻断剂与激动剂,进一步阐明加味脑泰方对血管性痴呆大鼠的深层保护机制。

参考文献

- [1] BENISTY S. Current concepts in vascular dementia[J]. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil*, 2013, 11(2):171-180.
- [2] MORI E. How treatable is vascular dementia?[J]. *Brain Nerve*, 2016, 68(4):441-450.
- [3] JELLINGER K A. Pathogenesis and treatment of vascular cognitive impairment[J]. *Neurodegener Dis Manag*, 2014,4(6):471-490.
- [4] GOMES B A Q, SILVA J P B, ROMEIRO C F R, et al. Neuroprotective Mechanisms of Resveratrol in Alzheimer's Disease: Role of SIRT1[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*,2008: 8152373.
- [5] 易亚乔,肖碧跃,刘英飞,等.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[J].*中南医学科学杂志*, 2014,42(1):17-20.
- [6] 廖君,张薇,夏兴,等.脑泰方对局灶性脑缺血大鼠脑组织核因子- κ B、基质金属蛋白酶9及其抑制剂表达的影响[J].*中国中医药信息杂志*, 2013,20(9):28-30.
- [7] 任晨斌,伍大华,郭晨,等.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.
- [8] BANG J, JEON W K, LEE I S, et al. Biphasic functional regulation in hippocampus of rat with chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral common carotid artery[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(7):e70093.
- [9] LIU J M, WU P F, RAO J, et al. ST09, a Novel thioester derivative of tacrine, alleviates cognitive deficits and enhances glucose metabolism in vascular dementia rats[J]. *Central Nervous System Neuroscience Therapeutics*, 2016, 22(3):220-229.
- [10] TIAN F, YUAN C, YUE H. MiR-138/SIRT1 axis is implicated in impaired learning and memory abilities of cerebral ischemia/reperfusion injured rats[J]. *Experimental Cell Research*, 2018, 367(2):232-240.
- [11] RAMADORI G, LEE C E, BOOKOUT A L, et al. Brain SIRT1:Anatomical Distribution and Regulation by Energy Availability [J]. *Jeurosci*, 2008, 28(40):9989-9996.
- [12] MICHAN S, LI Y, CHOU M M, et al. SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2010, 30(29):9695-9707.
- [13] YANG H, ZHANG W, PAN H, et al. SIRT1 activators suppress inflammatory responses through promotion of p65 deacetylation and inhibition of NF- κ B activity[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7:e46364.
- [14] KAUPPINEN A, SUURONEN T, OJALA J, et al. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(10):1939-1948.
- [15] 郭清,宫洪涛.从中医五脏论血管性痴呆的病机[J].*中国中医药现代远程教育*,2018,16(1):71-72.
- [16] 石咏梅,马英民,廖君,等.内质网应激 PERK 通路在脑泰方提取物保护局灶性脑缺血大鼠海马神经元中的作用[J].*中国老年学杂志*,2017,37(22):5512-5515.
- [17] 曾晖,胡洁.当归小分子多糖对血管性痴呆大鼠学习与记忆功能的影响[J].*中国临床药理学杂志*,2015,31(11):954-956.

(本文编辑 杨瑛)