

本文引用: 汪辛强, 胡国恒, 谢 丹, 王 焱, 陈 亚, 何 飘. 基于 Nrf2/NQO1/GCL 信号通路探讨益肾健脑方对血管性痴呆大鼠神经元凋亡的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(11): 1975–1983.

基于 Nrf2/NQO1/GCL 信号通路探讨益肾健脑方对血管性痴呆大鼠神经元凋亡的影响

汪辛强¹, 胡国恒¹, 谢 丹^{1,2}, 王 焱^{1,2}, 陈 亚^{1*}, 何 飘^{1*}

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

[摘要] **目的** 研究益肾健脑方对血管性痴呆(vascular dementia, VD)大鼠神经元凋亡的影响及作用机制。**方法** 将 60 只 SPF 级大鼠随机分为模型制备组 50 只和空白组 10 只, 模型制备组分段结扎双侧颈总动脉, 空白组仅分离双侧颈总动脉但不结扎。术后 4 周通过 Morris 水迷宫筛选出模型制备成功大鼠 28 只, 随机分为模型组、多奈哌齐组(0.45 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、益肾健脑方高剂量组(24.3 g·kg⁻¹·d⁻¹)、益肾健脑方低剂量组(12.15 g·kg⁻¹·d⁻¹)各 7 只, 加上空白组 10 只, 共 5 组。给药 4 周后, 行 Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆能力, HE 染色观察大脑皮质和海马 CA1 区组织病理变化, TUNEL 染色观察大脑皮质和海马 CA1 区神经细胞凋亡情况, 免疫组织化学法检测大脑皮质和海马 CA1 区天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (cysteiny aspartate-specific proteinase-3, Caspase-3)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-7(cysteiny aspartate-specific proteinase-7, Caspase-7)蛋白表达水平, Western blot 检测海马组织核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2)、醌氧化还原酶 1(quinone oxidoreductase 1, NQO1)、谷氨酰半胱氨酸连接酶(glutamate-cysteine ligase, GCL)蛋白表达水平。**结果** 与空白组比较, 模型组定位航行实验第 5 天逃避潜伏期明显增加, 空间探索实验穿越平台次数明显减少, 目标象限停留时间明显缩短($P<0.01$); 模型组脑组织病理损伤明显, 神经细胞凋亡率显著升高($P<0.01$); 模型组大脑皮质区和海马 CA1 区 Caspase-3、Caspase-7 阳性表达显著升高($P<0.01$); 模型组海马组织 Nrf2、NQO1、GCL 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。与模型组比较, 多奈哌齐组和益肾健脑方高、低剂量组定位航行实验中第 5 天逃避潜伏期明显缩短, 空间探索实验中穿越平台次数增加, 目标象限停留时间明显延长($P<0.05$, $P<0.01$); 多奈哌齐组和益肾健脑方高、低剂量组脑组织病理损伤减少, 神经细胞凋亡率均显著降低($P<0.01$); 多奈哌齐组和益肾健脑方高、低剂量组 Caspase-3、Caspase-7 阳性表达均显著降低($P<0.01$); 多奈哌齐组和益肾健脑方高、低剂量组海马组织 Nrf2、NQO1、GCL 蛋白表达均显著升高($P<0.01$)。**结论** 益肾健脑方可以改善 VD 大鼠学习记忆能力、抑制 Caspase-3 和 Caspase-7 蛋白表达及减少神经元凋亡, 其机制可能与激活 Nrf2/NQO1/GCL 信号通路有关。

[关键词] 益肾健脑方; 血管性痴呆; 氧化应激; 凋亡; 核因子 E2 相关因子 2; 醌氧化还原酶 1; 谷氨酰半胱氨酸连接酶

[中图分类号] R255

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.11.006

Effects of Yishen Jiannao Formula on neuronal apoptosis in vascular dementia rats based on Nrf2/NQO1/GCL pathway

WANG Xinqiang¹, HU Guoheng¹, XIE Dan^{1,2}, WANG Yan^{1,2}, CHEN Ya^{1*}, HE Piao^{1*}

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects and mechanism of action of Yishen Jiannao Formula (YSJNF) on neuronal

[收稿日期] 2023-07-25

[基金项目] 全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药函人教函[2022]75 号); 湖南省自然科学基金项目(2022JJ40334); 湖南省卫生健康委员会科研计划项目(202203074417); 湖南中医药大学校级科研基金项目(2021XJJ044)。

[通信作者] * 陈 亚, 女, 硕士, 副主任医师, E-mail: 310532@hnuem.edu.cn; 何 飘, 女, 博士, 医师, E-mail: 20212016@stu.hnuem.edu.cn。

apoptosis in rats with vascular dementia (VD). **Methods** Sixty SPF-grade rats were randomized into a model preparation group ($n=50$) and a blank group ($n=10$). The model preparation group underwent staged ligation of the bilateral common carotid arteries, while the blank group had only separation of the bilateral common carotid arteries without ligation. Four weeks after surgery, 28 rats with successful model preparation, as confirmed by the Morris water maze test, were randomized into model group, donepezil group ($0.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), as well as high-dose ($24.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and low-dose ($12.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) YSJNF groups, with seven rats in each group, coupled with the blank group ($n=10$), totaling five groups. Four weeks after administration, Morris water maze was used to assess the learning and memory abilities of the rats. HE staining was employed to observe the histopathological changes in the cerebral cortex and hippocampal CA1 area, and TUNEL staining to evaluate the neuronal apoptosis in these areas. Immunohistochemistry was used to check the protein expression levels of cysteinyl aspartate-specific proteinase-3 (Caspase-3) and cysteinyl aspartate-specific proteinase-7 (Caspase-7) in the cerebral cortex and hippocampal CA1 area, and Western blot to examine the protein expression levels of nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2), quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and glutamate-cysteine ligase (GCL) in the hippocampal tissue. **Results** Compared with the blank group, the model group showed a significantly increased escape latency on the 5th day of the place navigation test, a significantly decreased number of the platform crossings in the spatial probe test, and a significantly shorter time spent in the target quadrant ($P<0.01$); it also exhibited significant pathological damage of the brain tissue and a markedly increased neuronal apoptosis rate ($P<0.01$); the positive expressions of Caspase-3 and Caspase-7 in the cerebral cortex and hippocampal CA1 area were significantly elevated ($P<0.01$), while the protein expressions of Nrf2, NQO1, and GCL in the hippocampal tissue were notably reduced in this group ($P<0.01$). Compared with the model group, the donepezil group and high- and low-dose YSJNF groups showed a significant reduction in the escape latency on the 5th day of the place navigation test, an increase in the number of platform crossings, and an obviously longer time spent in the target quadrant in the spatial probe test ($P<0.05$, $P<0.01$); these groups also demonstrated reduced pathological damage in the brain tissue and a significant decrease in neuronal apoptosis rate ($P<0.01$); furthermore, the positive expressions of Caspase-3 and Caspase-7 were significantly reduced ($P<0.01$), while the protein expressions of Nrf2, NQO1, and GCL in hippocampal tissue were significantly elevated in these groups ($P<0.01$). **Conclusion** YSJNF may improve the learning and memory abilities in VD rats, inhibit the protein expressions of Caspase-3 and Caspase-7, and reduce neuronal apoptosis, the mechanism of which may be related to the activation of the Nrf2/NQO1/GCL signaling pathway.

[**Keywords**] Yishen Jiannao Formula; vascular dementia; oxidative stress; apoptosis; nuclear factor-E2-related factor 2; quinone oxidoreductase 1; glutamate-cysteine ligase

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是指脑卒中等脑血管疾病造成学习、记忆、行为相关脑区血流低灌注, 从而导致运动和认知功能障碍的一组临床综合征。到 2050 年, 全球痴呆患者预计达到 1.52 亿人, 其中 VD 患者约 8 200 万人, VD 患者预后一般, 可生存时间一般为 8~10 年, 主要治疗策略为对症治疗^[1-3]。我国人口老龄化的加剧势必伴随着 VD 患者的增加, 这对于照料者和社会而言都是沉重的经济负担^[4], 预防和治疗 VD 已成为临床亟待解决的问题。

海马 CA1 区是大脑认知功能脑区, 其损伤先于自然衰老大鼠空间认知的变化, 急性脑卒中或长期脑区血流低灌注所致海马 CA1 区神经元损伤是 VD 的病理基础^[5-7]。有研究表明, 在脑组织缺血缺氧时会发生氧化和抗氧化系统失衡, 神经元内产生大量氧自由基, 引发神经元凋亡, 加剧海马 CA1 区衰老退

化, 最终导致 VD 的发生^[8]。因此, 缓解神经元氧化损伤和凋亡是防治 VD 的重要策略。

中药具有多成分、多靶点的优势。近年来, 中药对氧化应激和凋亡的调控作用逐渐得到证实, 对 VD 防治疗效良好。益肾健脑方是基于古方七福饮化裁而成, 是第六批全国名老中医专家学术经验传承指导老师胡国恒教授“肾脑同治”学术思想的体现, 具有益肾生髓、化痰通络的功效, 治疗 VD 临床疗效显著。课题组前期研究证实, 益肾健脑方可以促进受损神经元修复, 改善 VD 大鼠学习记忆能力^[9]。为了进一步研究益肾健脑方治疗 VD 的机制, 本实验采用双侧颈总动脉分时段结扎 (2-VO) 法建立 VD 大鼠模型, 观察益肾健脑方抗氧化应激损伤、抗凋亡的作用及其可能机制, 为益肾健脑方的临床推广应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只, 体质量 250~280 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号: SCXK(湘)2019-0004]。饲养于湖南中医药大学第一附属医院中心实验室 SPF 级实验动物中心[实验单位使用许可证编号: SYXK(湘)2020-0010], 自由摄食饮水, 实验经湖南中医药大学第一附属医院中心实验室实验动物伦理委员会批准(伦理审查批号: ZYFY20210813-37)。

1.2 药物及制备

益肾健脑方药物组成: 熟地黄 20 g, 酒山茱萸 15 g, 黄芪 15 g, 白参 10 g, 川芎 10 g, 石菖蒲 15 g, 红景天 10 g, 丹参 10 g, 当归尾 10 g, 蜜远志 10 g, 炙甘草 10 g。饮片由湖南中医药大学第一附属医院药房提供, 经鉴定符合《中华人民共和国药典》2020 年版一部的规定。常规方法煎煮, 旋转蒸发仪浓缩至原药材浓度为 2.43 g/mL, 于 4℃ 冰箱中保存备用。盐酸多奈哌齐片(安理申)[卫材(中国)药业有限公司, 国药准字: H20050978, 批号: 2203026, 5 mg/片] 5 mg 研成细粉末后溶于 110 mL 蒸馏水, 配制成 0.045 mg/mL 溶液。

1.3 主要试剂与仪器

兔抗核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2) 抗体、鼠抗醌氧化还原酶 1(quinone oxidoreductase 1, NQO1)、兔抗谷氨酰半胱氨酸连接酶(glutamate-cysteine ligase, GCL) 抗体、兔抗 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(中国 proteintech 公司, 批号: 16396-1-AP、67240-1-Ig、12601-1-AP、20536-1-AP、SA00001-1、SA00001-2); 兔抗天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(cysteiny l aspartate-specific proteinase-3, Caspase-3)、兔抗天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-7(cysteiny l aspartate-specific proteinase-7, Caspase-7) 抗体(英国 Abcam 公司, 批号: ab32351、ab255818); TUNEL 试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司, 批号: KGA704); 二步法试剂盒、DAB 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: PV-9004、ZLI-9017); 苏木素伊红染色液、RIPA 裂解液(上海碧云天生物

技术股份有限公司, 批号: BL700A、P0013B); 蛋白酶抑制剂(北京金泰宏达生物科技有限公司, 批号: 583794); 蛋白磷酸酶抑制剂(北京普利莱基因技术有限公司, 批号: P1260); 显影液、定影液(上海市佳信科技有限公司, 货号: BW-61、BW-62); SuperECL Plus 超敏发光液(美国 Advansta 公司, 货号: K-12045-D50)。

Morris 水迷宫视频分析系统(型号: ZS-Morris, 北京众实迪创科技发展有限公司); 包埋机(型号: BMJ-A, 常州市中威电子仪器有限公司); 石蜡切片机(型号: YD-315, 金华市益迪医疗设备有限公司); 病理切片机(型号: RM2016, 上海徕卡仪器有限公司); 双目显微镜[型号: BA210T, 麦克奥迪(厦门)医疗诊断系统有限公司]; 生物样品均质仪(型号: BioPrep-24, 杭州奥盛仪器有限公司); 精密 PH 计(型号: PHS-3C, 上海雷磁仪器有限公司); 酶标仪(型号: SMR60047, 武汉优尔生生命科学装备有限公司); 摇床(型号: TS-1, 江苏其林贝尔仪器制造有限公司); 台式冷冻离心机(型号: H1650R, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 电泳仪、转膜仪(型号: DYY-6C、DYCZ-40D, 北京六一生物科技有限公司)。

1.4 模型制备与评价

60 只 SD 大鼠随机分为空白组 10 只、模型制备组 50 只, 采用改良 2-VO 法(双侧颈总动脉分次结扎法)制备 VD 模型^[9]。大鼠术前禁食 24 h、禁水 4 h。麻醉、备皮、消毒, 颈中切口, 钝性分离右侧颈总动脉后用 5 号无菌手术缝线结扎, 完全阻断右侧颈总动脉血流, 缝合切口, 在切口处均匀涂少量青霉素干粉, 整个实验过程均在无菌手术台进行, 确保无菌操作。7 d 后结扎左侧颈总动脉, 操作同第 1 次手术。空白组分离双侧颈总动脉但不结扎, 其余过程同模型制备组。将大鼠置于温暖环境中, 防止体温过低, 注意监测大鼠的呼吸、心跳、体温等, 连续 3 d 注射青霉素 8 万 U/250 g 抗感染, 增加大鼠存活率。

造模 4 周后, 行 Morris 水迷宫中的定位航行试验, 将水池划分为第 I、II、III、IV 象限, 将平台置于第 IV 象限, 将清水注入迷宫并使水位在平台上 2 cm。前 4 d 为训练期, 将大鼠依次按第 I、II、III、IV 象限放入水中, 若大鼠未在 120 s 内站上平台, 则人为引导至平台上停留 10 s, 第 5 天从第 II 象限将大鼠放入水中, 大鼠爬上平台的时间即为逃避潜伏期(escape-

tency, EL), 120 s 未爬上平台则记为 120 s。以空白组大鼠 EL 平均值为参考值 A, 其余大鼠所测 EL 值为参考值 B, 以 $(B-A)/B > 20\%$ 为造模成功标准, 筛选出模型制备成功的 VD 大鼠 28 只。

1.5 分组及给药

将模型制备成功的 28 只 VD 大鼠分为模型组、多奈哌齐组、益肾健脑方高剂量组、益肾健脑方低剂量组, 每组 7 只, 加上空白组 10 只大鼠, 共 5 组。按照人与大鼠体表面积折算给药剂量, 多奈哌齐组: 成人每天服用 5 mg 生药剂量进行换算, 换算后得出生药剂量为 $0.45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 益肾健脑方低剂量组: 与 70 kg 成人等效剂量, 以成人每天服用 135 g 生药剂量进行换算, 换算后得出生药剂量为 $12.15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 益肾健脑方高剂量组: 益肾健脑方低剂量组两倍量给药, 为 $24.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。空白组和模型组给予等体积蒸馏水灌胃, 均连续干预 4 周。

1.6 观察指标

1.6.1 Morris 水迷宫实验检测学习和记忆能力 灌胃结束后, 行 Morris 水迷宫实验检测大鼠的学习和记忆能力。(1)定位航行实验: 详细操作方法按照“1.4”, 记录各组大鼠第 5 天的逃避潜伏期;(2)空间探索实验: 定位航行实验结束后, 第 6 天撤除平台, 将大鼠从第 II 象限放入水中, 水迷宫软件记录大鼠 120 s 内穿越原平台区域次数和在第 IV 象限停留的时间。

1.6.2 HE 染色观察大脑皮质和海马 CA1 区组织病理变化 Morris 水迷宫实验后禁食 24 h, 麻醉后脊椎脱臼处死大鼠, 断头取脑, 用 4% 多聚甲醛固定, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋切片, HE 染色后梯度乙醇 (95%~100%) 脱水, 透明后中性树胶封片, 400 倍显微镜观察大脑皮质和海马 CA1 区组织病理变化。

1.6.3 TUNEL 检测大脑皮质和海马 CA1 区神经细胞凋亡情况 脑组织用多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋切片、脱蜡水化后进行通透 (热修复抗原), 1% 高碘酸封闭, 生物素封闭, Streptavidin-HRP 标记工作液标记, DAB 显色, 苏木素复染, 晾干后加中性树胶和盖玻片, 400 倍光镜下观察拍照, IPP 软件分析神经元凋亡率 (黄褐色阳性细胞所占百分比)。

1.6.4 免疫组织化学检测大脑皮质和海马 CA1 区 Caspase-3、Caspase-7 蛋白表达水平 取脑组织于 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 切片脱蜡至水, 枸橼

酸盐缓冲液 (pH6.0) 抗原修复溶液处理, 加入 1% 高碘酸灭活内源性酶, 滴加适当稀释的一抗 Caspase-3 (1:200)、Caspase-7 (1:200), 4 ℃ 过夜, PBS 洗涤, 滴加抗兔-IgG 抗体-HRP 多聚体, 37 ℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤后 DAB 显色, 苏木素复染, 脱水透明, 封片后显微镜下观察, 阳性染色为黄色或棕黄色/褐色, 采用 IPP 软件测定平均光密度 (累积光密度/阳性表达面积)。

1.6.5 Western blot 检测海马组织 Nrf2、NQO1、GCL 蛋白表达水平 海马组织低温匀浆, 裂解液裂解后离心, 提取上清液蛋白, 测定蛋白浓度后变性处理, 制胶后上样, 通过 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 75 V 恒压电泳, 300 mA 恒定电流转膜, 牛奶封闭, 稀释后的一抗 Nrf2 (1:1 000)、NQO1 (1:5 000)、GCL (1:2 000)、 β -actin (1:5 000) 4 ℃ 孵育过夜, 洗膜后用稀释 HRP 标记的二抗 (1:6 000) 孵育 90 min, ECL 显色曝光后扫描, Image J 软件进行分析, 以目的蛋白/内参蛋白 (β -actin) 光密度为目的蛋白相对表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 多样本计量资料符合正态分布和方差齐性者, 进行单因素方差分析, 两组之间比较用独立样本 *t* 检验; 方差不齐者, 两组之间比较用 Dunnett's *T3* 法。均以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 益肾健脑方对 VD 大鼠学习记忆能力的影响

与空白组比较, 模型组大鼠定位航行实验第 5 天逃避潜伏期明显增加, 空间探索实验穿越平台次数明显减少, 目标象限停留时间明显缩短 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 多奈哌齐组和益肾健脑方高、低剂量组大鼠定位航行实验中第 5 天逃避潜伏期均明显缩短, 空间探索实验中穿越平台次数均增加, 目标象限停留时间均明显延长 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。详见图 1。

2.2 益肾健脑方对 VD 大鼠大脑皮质区和海马 CA1 区组织病理的影响

空白组大鼠大脑皮质区和海马 CA1 区神经元排列规则紧密, 细胞体形状饱满, 轮廓清晰, 细胞核核仁清晰无皱缩, 染色质分布均匀无凝集; 模型组神经元稀疏, 排列不规则, 细胞胞体肿胀, 形状不规则,

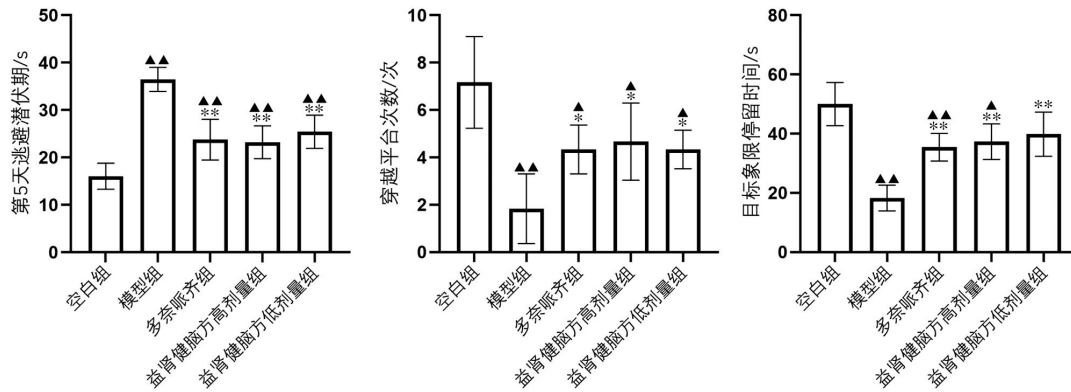


图1 各组大鼠学习记忆能力的变化($\bar{x} \pm s$)

Fig.1 Changes in learning and memory abilities in each group of rats ($\bar{x} \pm s$)

注:与空白组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

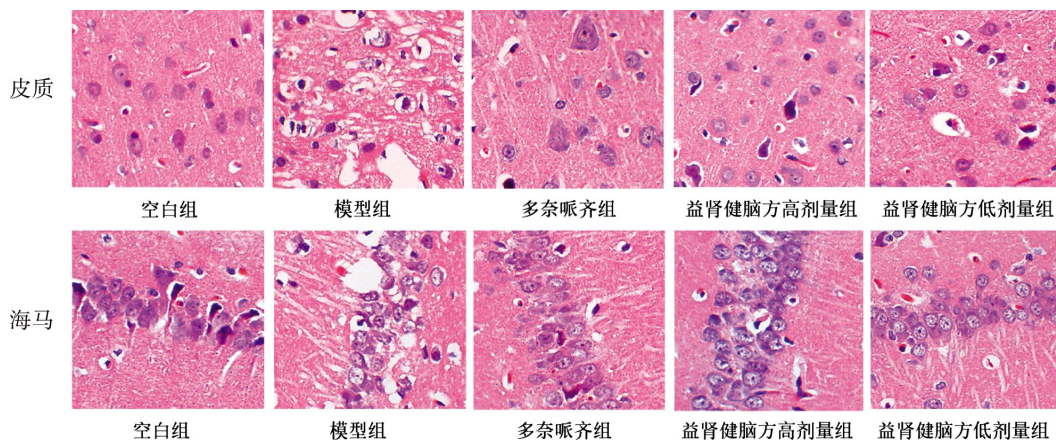


图2 各组大鼠大脑皮质区和海马CA1区组织病理变化(HE, $\times 400$)

Fig.2 Histopathological changes in the cerebral cortex and hippocampal CA1 area in each group of rats (HE, $\times 400$)

细胞核固缩,染色质凝集,细胞质空泡状;多奈哌齐组和益肾健脑方高、低剂量组神经元排列相对紧密,细胞体形状规则,可见少部分多边形细胞体,细胞核核仁及染色质相对清晰,偶见细胞核皱缩、染色质凝集。详见图2。

2.3 益肾健脑方对VD大鼠大脑皮质区和海马CA1区神经细胞凋亡的影响

空白组大鼠大脑皮质区和海马CA1区可散见少量黄褐色凋亡细胞;模型组见多量黄褐色凋亡细胞弥漫分布;多奈哌齐组和益肾健脑方高、低剂量组见黄褐色凋亡细胞散在分布,但数量明显较模型组减少。与空白组比较,模型组大鼠大脑皮质区和海马CA1区神经细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组和益肾健脑方高、低剂量组大鼠大脑皮质区和海马CA1区神经细胞凋亡率均显著降低($P < 0.01$)。详见图3。

2.4 益肾健脑方对VD大鼠大脑皮质区和海马CA1区Caspase-3、Caspase-7蛋白表达的影响

Caspase-3阳性染色呈棕褐色,主要在细胞质表达,Caspase-7阳性染色呈棕黄色,在细胞质和细胞核均有表达。与空白组比较,模型组大鼠大脑皮质区和海马CA1区Caspase-3、Caspase-7阳性表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组和益肾健脑方高、低剂量组大鼠大脑皮质区和海马CA1区Caspase-3、Caspase-7阳性表达均显著降低($P < 0.01$)。详见图4—5。

2.5 益肾健脑方对VD大鼠海马组织Nrf2、NQO1、GCL蛋白表达的影响

与空白组比较,模型组大鼠海马组织Nrf2、NQO1、GCL蛋白表达显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,多奈哌齐组和益肾健脑方高、低剂量组大鼠海马组织Nrf2、NQO1、GCL蛋白表达均显著升高($P < 0.01$)。详见图6。

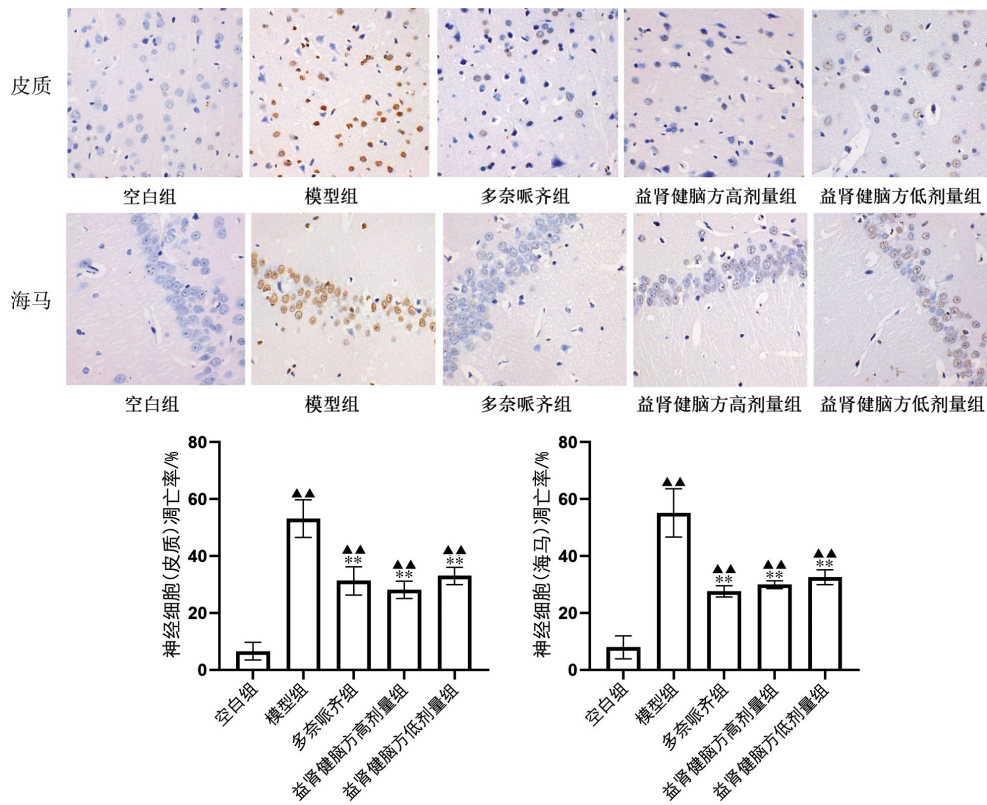


图 3 各组大鼠大脑皮质区和海马 CA1 区神经细胞凋亡阳性表达(TUNEL 染色,×400)

Fig.3 Positive expression of neuronal apoptosis in the cerebral cortex and hippocampal CA1 area in each group of rats (TUNEL staining, ×400)

注:与空白组比较,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$ 。

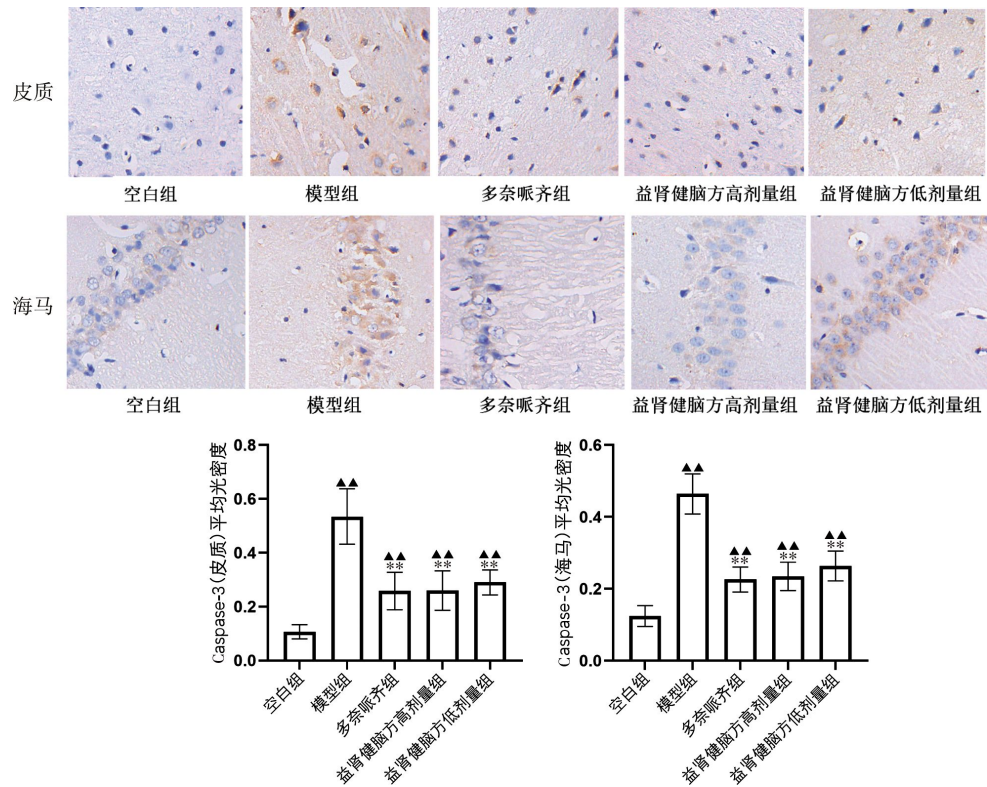


图 4 各组大鼠大脑皮质区和海马 CA1 区 Caspase-3 蛋白表达(DAB 染色,×400)

Fig.4 Protein expression of Caspase-3 in the cerebral cortex and hippocampal CA1 area in each group of rats (DAB staining, ×400)

注:与空白组比较,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$ 。

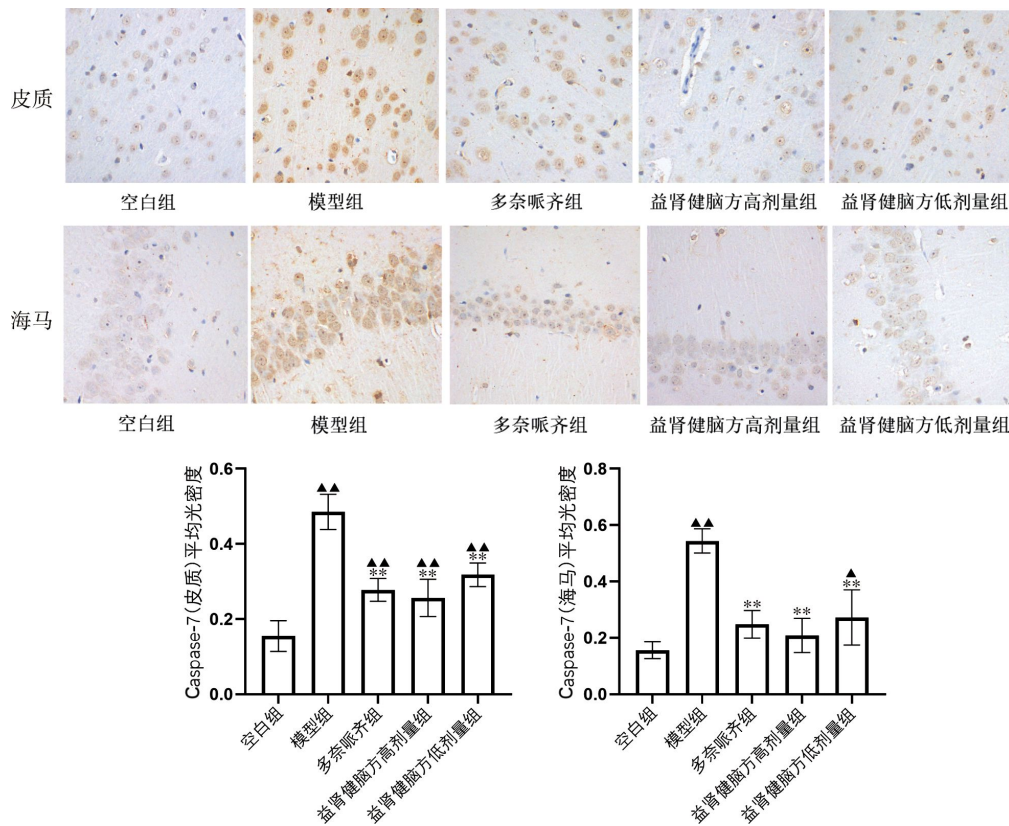


图5 各组大鼠大脑皮质区和海马 CA1 区 Caspase-7 蛋白表达(DAB 染色,×400)

Fig.5 Protein expression of Caspase-7 in the cerebral cortex and hippocampal CA1 area in each group of rats (DAB staining, ×400)

注:与空白组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$ 。

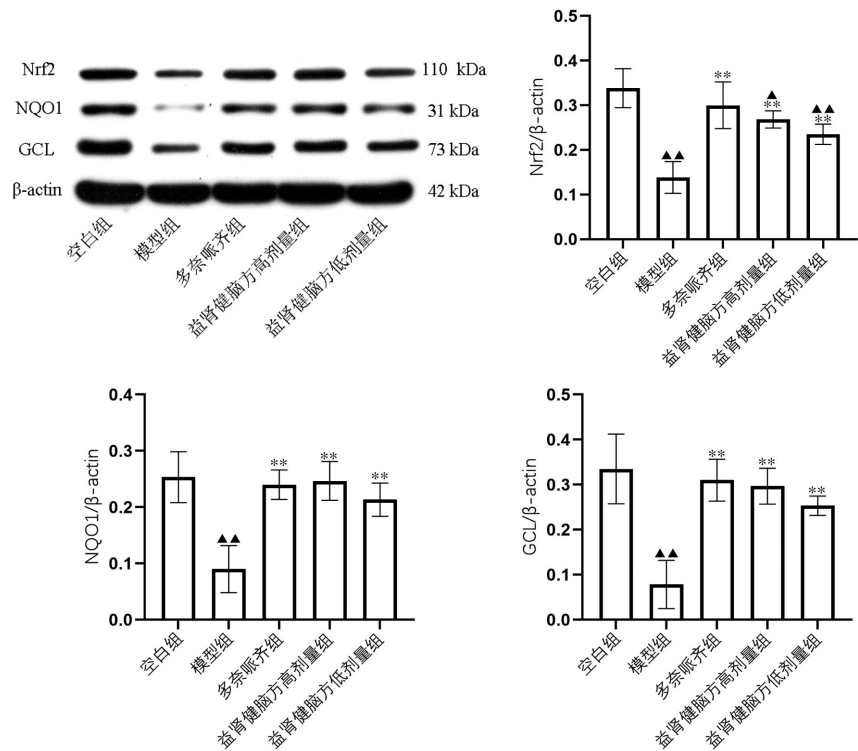


图6 各组大鼠海马组织 Nrf2、NQO1、GCL 蛋白表达水平

Fig.6 Protein expression levels of Nrf2, NQO1, and GCL in hippocampal tissue in each group of rats

注:与空白组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.01$ 。

3 讨论

VD 分为脑卒中后痴呆、皮质下缺血性血管性痴呆、多发梗死性痴呆和混合型痴呆 4 种类型,发病机制尚不完全明确,也无特效治疗药物^[10]。VD 患者的典型症状为认知功能障碍、神经功能障碍和运动功能障碍,严重情况下可致人死亡,我国 VD 的患病率为 1.1%~3.0%,年发病率在 0.5%~0.9%^[3]。随着我国的低生育率及人口老龄化加剧,VD 的患病率和发病率将进一步增加,因此,对于 VD 的防治研究刻不容缓。脑组织主要由易于氧化的脂质组成,耗氧量约占机体耗氧量的 20%,因此,脑组织对氧化应激损伤很敏感,慢性脑低灌注(chronic cerebral hypoperfusion, CCH)诱导的氧化应激损伤导致海马 CA1 区神经元凋亡、突触树突减少和棘密度减低,是 VD 认知障碍的重要因素^[11-12]。

生理情况下,机体内氧化和抗氧化系统处于平衡状态。抗氧化系统分为酶系统和非酶系统,酶类抗氧化系统主要包括超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、硒谷胱甘肽过氧化酶等,非酶类抗氧化系统主要包括维生素 C、谷胱甘肽(glutathione, GSH)等,非酶类抗氧化系统是酶类抗氧化系统产生的基础。因为脑组织耗氧多且代谢旺盛,神经元自身 GSH 含量不多,NQO1 等抗氧化酶含量也较低,抗氧化系统薄弱,所以脑组织相对其他组织更容易受到氧化损伤,缺血缺氧后神经元内产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS),ROS 消耗抗氧化物质,使得 GSH 减少,SOD 等抗氧化酶活性降低,对细胞膜、蛋白质、DNA 产生毒性作用,最终导致神经元的凋亡和老化^[13]。Nrf2 是重要的内源性抗氧化因子,其下游有 200 多种基因,具有维持体内氧化和抗氧化平衡、抑制炎症和细胞凋亡等作用。生理状态下,Nrf2 和 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1(Keap1)耦联稳定存在于细胞质中,脑组织低灌注时,神经元细胞质中的 Nrf2 与 Keap1 解离,易位到细胞核与 ARE 的特异识别位点相互结合,进而启动下游抗氧化酶 NQO1 表达和 GSH 合成^[12,14]。NQO1 是一种抗氧化酶,可抑制 ROS 产生,在氧化应激过程中起到保护细胞的作用,GSH 是体内广泛存在的重要抗氧化剂和自由基清除剂,GCL 是 GSH 生物合成中的第一个限速酶,

GSH 与有毒的过氧化物发生还原反应,减轻氧化应激损伤^[15]。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡,生理状态下细胞凋亡对于维持内环境稳态有重要作用,在神经元缺血缺氧时发生氧化应激反应,则可通过启动程序基因调控细胞凋亡的发生,引起神经元变性,导致认知功能障碍^[16]。细胞凋亡的激活有两条途径,分别是死亡受体通路(外部)和线粒体通路(内部),无论是哪种途径,都与 Caspase 蛋白酶家族密不可分,最终都会激活执行死亡的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 Caspase-3 和 Caspase-7,Caspase-3 和 Caspase-7 能对受损或异常细胞的 DNA、细胞膜和细胞器等进行剪切和降解,引起不可逆的细胞死亡过程。

VD 属于中医学“痴呆”“呆病”范畴,肾虚脑髓失养是其病机关键。益肾健脑方以景岳名方七福饮为基础加减而成,由熟地黄、酒山茱萸、黄芪、白参、川芎、石菖蒲、红景天、丹参、当归尾、蜜远志、炙甘草组成,具有益肾生髓、化痰通络之功效。方中以熟地黄、酒山茱萸为君药,补益肝肾使脑髓得充,取“肝肾同源”之义;以黄芪、白参、红景天为臣药,补益脾胃化生气血且大补元气,使脑得所养;以川芎、当归尾、丹参、石菖蒲、蜜远志为佐药,化痰通络兼化痰益智;炙甘草为使药,调和诸药。

本研究采用双侧颈总动脉分时段结扎(2-VO)法建立 VD 大鼠模型,结果发现 VD 大鼠学习记忆能力明显降低,大脑皮质区和海马 CA1 区神经元稀疏,细胞质空泡状,细胞核固缩,黄褐色调亡细胞弥漫分布,神经元凋亡水平上升,Caspase-3、Caspase-7 蛋白表达升高,海马组织 Nrf2、NQO1、GCL 蛋白表达水平降低,表明 VD 大鼠神经元发生了氧化应激及凋亡,且其引发的氧化应激可以抑制 Nrf2/NQO1/GCL 信号通路促进神经元凋亡;给予盐酸多奈哌齐和益肾健脑方高、低剂量处理的大鼠学习记忆能力提高,大脑皮质和海马 CA1 区病理损伤改善,神经元凋亡水平下降,Caspase-3、Caspase-7 蛋白表达降低,海马组织 Nrf2、NQO1、GCL 蛋白表达水平升高,表明益肾健脑方可能通过激活 Nrf2/NQO1/GCL 信号通路来抑制神经元凋亡,从而减轻氧化应激引起的神经元损伤,改善 VD 大鼠学习记忆能力。

综上所述,益肾健脑方可通过激活 Nrf2/NQO1/

GCL 信号通路抑制氧化应激,减轻慢性脑灌注不足导致的大脑皮质和海马 CA1 区神经元凋亡,这可能是益肾健脑方防治 VD、发挥其改善认知障碍作用的机制之一。

参考文献

- [1] 贾建平, 陈生弟. 神经病学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 231-234.
- [2] SMITH E E, BARBER P, FIELD T S, et al. Canadian Consensus Conference on Diagnosis and Treatment of Dementia (CC-CDTD)5: Guidelines for management of vascular cognitive impairment[J]. *Alzheimer's & Dementia*, 2020, 6(1): e12056.
- [3] 余文骁, 王延江. 亚洲血管性认知损害的流行病学现状和发展趋势[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2020, 12(10): 前插 1, 1-7.
- [4] 秦 茂, 伍大华, 张秀丽, 等. 滋肾活血方对血管性痴呆大鼠分裂与融合蛋白 Mfn1、Mfn2、Drp1、Fis1 的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(1): 21-26.
- [5] WANG N Y, TAN Y H, ZHOU Q X, et al. The impairment of the hippocampal neuro-vascular unit precedes changes in spatial cognition in naturally aged rats[J]. *Neuroscience Letters*, 2022, 776: 136580.
- [6] 王保平, 张 圆, 陈怡名, 等. 龙首参葛丸对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区组织结构变化的影响[J]. *西部中医药*, 2019, 32(6): 6-9.
- [7] 王德秀, 蔡 欣, 王 钢, 等. 银杏叶提取物对血管性痴呆大鼠学习记忆的影响及海马神经元的保护作用[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2019, 28(6): 516-521.
- [8] ZHU T T, ZHU M L, QIU Y, et al. Puerarin alleviates vascular cognitive impairment in vascular dementia rats[J]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2021, 15: 717008.
- [9] 李 腾. 益肾健脑方对血管性痴呆大鼠学习记忆能力及海马 BDNF/TrkB 表达的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [10] CHANG WONG E, CHANG CHUI H. Vascular cognitive impairment and dementia[J]. *Continuum*, 2022, 28(3): 750-780.
- [11] 房娉平, 阚敏宸, 郭立静, 等. 灯盏花素对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区病理改变及 Nrf2/HO-1 通路的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2021, 19(16): 2751-2756.
- [12] LIAO X P, ZHANG Z L, MING M, et al. Imperatorin exerts antioxidant effects in vascular dementia via the Nrf2 signaling pathway[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 5595.
- [13] CORDARO M, D'AMICO R, MORABITO R, et al. Physiological and biochemical changes in NRF2 pathway in aged animals subjected to brain injury[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2021, 55(2): 160-179.
- [14] SHENG M Y, CHEN X, YU Y, et al. Rev-erb α agonist SR9009 protects against cerebral ischemic injury through mechanisms involving Nrf2 pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14: 1102567.
- [15] 南 洁. 马铃薯谷胱甘肽合成相关酶 StGSH1 和 StGSH2 的活性鉴定和蛋白结晶[D]. 广州: 华南农业大学, 2019.
- [16] SUN M, SHEN X M, MA Y Z. Rehmannioside A attenuates cognitive deficits in rats with vascular dementia (VD) through suppressing oxidative stress, inflammation and apoptosis[J]. *BioMedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 120: 109492.

(本文编辑 匡静之)