

五脏温阳化痰汤对动脉粥样硬化血管性痴呆大鼠海马组织 Nrf2 蛋白通路的影响*

张海燕, 唐 农[△], 葛金文, 廖 君, 易亚桥

(湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

摘要: **目的** 建立动脉粥样硬化血管性痴呆大鼠模型,从氧化应激反应中 Nrf2-ARE 蛋白通路入手,观察不同剂量五脏温阳化痰汤对血管性痴呆的神经保护机制。**方法** 制作动脉粥样硬化血管性痴呆大鼠模型,之后采用反复夹闭大鼠双侧颈总动脉方法制备血管性痴呆大鼠模型。术后 4 周将大鼠随机分为假手术组、模型组、中低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组、脑复康组,之后灌胃给药,持续 4 周,进行 Morris 水迷宫行为学检测,观察各组大鼠空间学习及记忆能力,western blot 检测大鼠海马区 Nrf2 蛋白细胞核与细胞浆内的表达,同时检测下游蛋白 HO-1 蛋白的表达。**结果** 五脏温阳化痰汤中剂量组和高剂量组从第 3 天开始可以明显缩短动脉粥样硬化血管性痴呆大鼠 Morris 水迷宫的逃避潜伏期,与假手术组、模型组比较 $P<0.01$,有统计学差异。空间搜索实验中中药中剂量组和高剂量组有效停留时间和有效停留距离明显延长,与假手术组、模型组比较 $P<0.05$ 有统计学差异。动脉粥样硬化血管性痴呆大鼠海马区 Nrf2-ARE 通路被激活,Western blot 检测显示五脏温阳化痰汤可以使 Nrf2 蛋白由胞浆转移到胞核内,并激活下游蛋白 HO-1,使其表达增强,nrf2 蛋白胞浆内外的表达以及 HO-1 蛋白的表达各组与假手术组比较 $P<0.01$,与模型组比较 $P<0.01$,有统计学差异。**结论** 五脏温阳化痰汤能改善动脉粥样硬化血管性痴呆大鼠学习记忆能力,其作用机理可能与抑制动脉粥样硬化血管性痴呆大鼠的氧化应激反应,增强脑组织的抗氧化防御机制有关,其中剂量组和高剂量组作用显著。

关键词: 动脉粥样硬化; 血管性痴呆; 五脏温阳; Nrf2 蛋白通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2013)03-0008-04

血管性痴呆 (Vascular dementia, VD) 是指各种脑血管疾病引起的脑功能障碍而产生的获得智能损害综合征,为一慢性进行性疾病。血管性痴呆是继阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 之后第二位最常见的痴呆病因^[1]。动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 在血管性痴呆的发病中起着重要的作用,预防和治疗脑血管动脉粥样硬化对于防治血管性痴呆有着关键性的作用。心脑血管的动脉粥样硬化导致脑组织处于临床或亚临床的缺血状态,促使痴呆的发生。并且在动脉粥样硬化形成过程中的高脂血症期,由于脂质代谢的异常,氧自由基的生成增加,可直接对神经组织细胞产生损伤。

目前,对于血管性痴呆的治疗,西医药尚未有特殊的方法。而中医药在预防和治疗血管性痴呆疾病中越来越显现出其优势。我们运用中医“阳化气,

阴成形”的理论,根据唐农教授的经验方五脏温阳化痰汤,通过温补五脏阳气、化痰逐瘀,对动脉粥样硬化型血管性痴呆动物模型进行动物实验研究,探讨五脏温阳化痰汤治疗动脉粥样硬化血管性痴呆的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体重 220~270g,由湖南中医药大学动物中心提供,合格证书: HNASLKJ20113616。将大鼠随机分为 A 假手术组、B 模型组、C 中剂量组、D 高剂量组、E 低剂量组、F 脑复康组,每组 10 只。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 主要实验仪器及耗材

Morris 水迷宫,成都泰盟科技有限公司。电泳

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(NO:81160435)

收稿日期: 2013-03-26 修回日期: 2013-05-06

作者简介: 张海燕(1979~)女,安徽省蒙城人,讲师,博士在读,主要研究方向:中医药防治脑病的研究。

[△]通信作者: 唐农, E-mail: liubugu621111@yahoo.com.cn

仪,北京六一仪器厂,DYY-6C。垂直板电泳槽,北京六一仪器厂,DYCZ-24D。水平电转槽,北京六一仪器厂,DYCP-40C。水平摇床,北京六一仪器厂,WD-9405B。恒温摇床,金坛,THZ-82A。纯水仪,Heal Force 公司,EASY15。紫外可见分光光度计,上海 spectrum 公司,sp-752。台式冷冻高速离心机,鑫奥,EXPERT 16K-R。酶标仪,Thermo,Multiskan MK3。

1.2.2 主要试剂

蛋白裂解液,西安晶彩,JC-PL006。Bradford 蛋白浓度测定试剂盒,江苏碧云生物科技研究所,P0006。彩色预染蛋白 marker,Fermentas,0081256。超敏化学发光显色试剂盒,碧云天,PA003WB。医用 X 射线光片,Kodak,XBT-1。X 线胶片显影定影粉,Auragene,PA011WB。封闭蛋白干粉,博士德,AR0104。5X SDS-PAGE loading buffer,Auragene,PA003D。羊抗鼠二抗,Jackson,111-035-008。羊抗兔二抗,Jackson,111-035-003。脑复康,上海现代哈森药业,生产批号 H41021942。

1.3 方法

1.3.1 大鼠动脉粥样硬化的建立

实验组喂食高脂饲料,即 3%胆固醇、0.5%胆酸钠、0.2%丙基硫氧嘧啶、5%白糖、10%猪油、81.3%基础饲料。同时在喂食开始时一次性腹腔注射维生素 D₃ 70 万 IU/kg,对照组喂食基础饲料,给予同等体积的生理盐水。

1.3.2 动脉粥样硬化型血管性痴呆模型制作

动脉粥样硬化模型制作成功之后,在动脉粥样硬化模型的基础上,采用双侧颈总动脉夹闭再灌注方法制备大鼠血管性痴呆模型。

方法:用 10%水合氯醛,按 3mL/kg 体重,腹腔麻醉,无菌取颈正中切口,切开皮肤,钝性分离各层组织,找出双侧颈总动脉并将其与迷走神经分离,穿线备用。用小动脉夹夹闭大鼠双侧颈总动脉。每次夹闭时间 5min,再放开 10min。重复 3 次。在手术过程中大鼠体温保持在 37℃左右,之后缝合伤口放回笼中,术后肌注青霉素 0.2U/d,连续 3d,并继续以高脂饲料喂养。假手术组只切开而不做缺血手术^[2]。

所有大鼠在手术后 4 周开始给药,随机分为 6 组,即假手术组、模型组、中药中剂量组、中药高剂量组、中药低剂量组、脑复康组。手术后 4 周开始给药,假手术组和模型组大鼠每天给予同等体积的生理盐水灌胃。动脉粥样硬化型血管性痴呆模型给药

组:以五脏温阳化痰汤药物组成为附子 30g,干姜 15g,巴戟 15g,桂枝 15g,半夏 15g,石菖蒲 15g,田七 15g,淫羊藿 15g,生晒参 15g,大黄 6g。加水回流提取 2 次,第 1 次加 10 倍水提取 2h,第 2 次加 8 倍水提取 1.5h,药液过滤、合并浓缩至含生药 1g/mL,4℃ 保存备用,用时稀释适当浓度。中剂量组以临床人与大鼠体表面积换算给药 2.5g/kg,高剂量组以 5g/kg 给药,低剂量组以 1.25g/kg 给药。阳性药物对照组脑复康:临床人与大鼠体表面积换算,以 0.15g/kg 给药。共持续 4 周,在给药 4 周后进行指标检测。

1.4 指标检测

(1)用 Morris 水迷宫检测动脉粥样硬化血管性痴呆大鼠行为学的改变,定位航行实验记录大鼠潜伏期时间,空间搜索实验记录各组大鼠有效停留距离和有效停留时间。

(2)用 Western blotting 法定量检测大鼠海马组织中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平。取蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 90min,按湿转法将电泳产物转移到 PVDF 膜,封闭液中 1 h,滴加抗 Nrf2 一抗(1:1 000)4℃ 过夜,TBS/T 洗 3 次(10 min/T),二抗(1:3 000)室温下孵育 1h,TBST 洗膜,方法同上,洗去游离二抗。NBT/BCIP 显色,GelDoc 凝胶成像仪采集图像。

1.5 统计方法

各组所得计量数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS17.0 软件处理数据,用完全随机设计资料的单因素方差分析,组间均数比较用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 水迷宫实验定位航行实验潜伏期结果(如图 1 示)

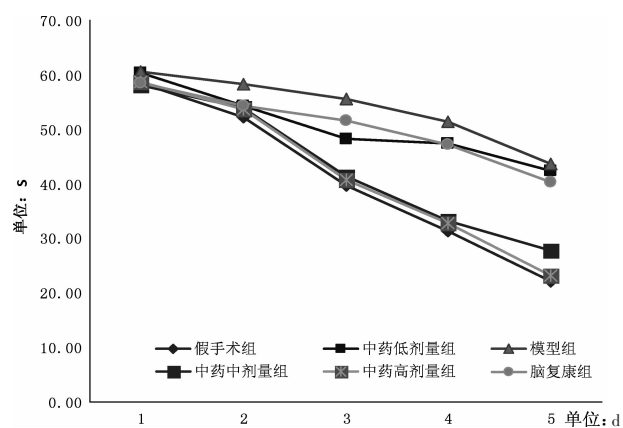


图1 定位航行实验潜伏期

图 1,与假手术组,模型组比较 $P<0.01$,差异有统计学意义。

2.2 水迷宫实验空间搜索实验有效距离和有效时间结果(如表 1)

2.3 大鼠海马组织细胞核 Nrf2, 细胞浆 Nrf2 的表达,大鼠海马组织 HO-1 的表达(如图 2,表 2)

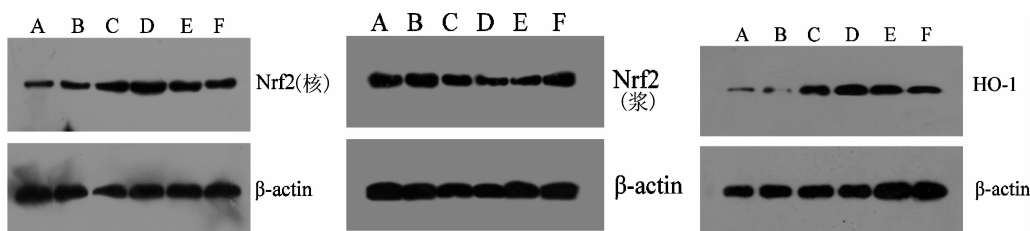
3 讨论

经过中药用药治疗之后, Morris 实验显示,五脏温阳化痰汤中剂量组和高剂量组从第 3 天开始可以明显缩短动脉粥样硬化血管性痴呆大鼠 Morris

表 1 各组大鼠水迷宫有效停留时间和有效停留距离($\bar{x}\pm s$)

组别	n	有效停留距离	有效停留时间
假手术组	10	129.98±17.42	4.86±1.22
模型组	10	46.72±19.81 ^①	2.21±0.90 ^①
中药中剂量组	10	110.26±8.35 ^{②④}	4.26±1.40 ^{②④}
中药高剂量组	10	120.44±27.16 ^{②④}	4.46±1.42 ^{②④}
中药低剂量组	10	82.47±14.70 ^{①③}	2.73±0.81 ^{①③}
脑康复组	10	81.08±14.42 ^{①③}	2.70±0.60 ^{①③}

注:与假手术组比较^① $P<0.01$,^② $P>0.05$,与模型组比较^③ $P>0.05$,^④ $P<0.01$ 。



五脏温阳化痰汤对血管性痴呆大鼠海马组织 nrf2 蛋白和 HO-1 蛋白的影响, A 假手术组, B 模型组, C 中药中剂量组, D 中药高剂量组, E 中药低剂量组, F 脑康复组。

图 2 大鼠海马组织细胞核 Nrf2, 细胞浆 Nrf2 的表达大鼠海马组织 HO-1 的表达

表 2 大鼠海马组织细胞核 Nrf2 的表达, 细胞浆 Nrf2 的表达, 大鼠海马组织 HO-1 的表达

组别	n	Nrf2 胞核	Nrf2 胞浆	HO-1
假手术组	5	0.19±0.01	0.92±0.03	0.15±0.01
模型组	5	0.30±0.02 ^①	0.73±0.02 ^①	0.24±0.02 ^①
中药中剂量组	5	0.53±0.02 ^{①②④}	0.38±0.02 ^{①②④}	0.52±0.04 ^{①②④}
中药高剂量组	5	0.75±0.02 ^{①②④}	0.24±0.001 ^{①②④}	0.64±0.04 ^{①②④}
中药低剂量组	5	0.50±0.01 ^{①②⑤}	0.54±0.01 ^{①②④}	0.40±0.01 ^{①②④}
脑康复组	5	0.46±0.04 ^{①②}	0.60±0.01 ^{①②}	0.31±0.01 ^{①③}

注:与假手术组比较^① $P<0.01$,与模型组比较^② $P<0.01$,^③ $P<0.05$,与脑康复组比较^④ $P<0.01$,^⑤ $P<0.05$ 。

水迷宫的逃避潜伏期 $P<0.01$,低剂量组和脑康复组则差异无统计学意义 $P>0.05$,空间搜索实验中中药中剂量组和高剂量组有效停留时间和有效停留距离明显延长,低剂量组、脑康复组、模型组差异无统计学意义 $P>0.05$ 。Western blotting 法定量检测大鼠脑组织中 Nrf2 细胞核内外的表达提示中药高、中剂量组中大鼠 Nrf2 细胞核内的表达显著增强,在细胞质中的表达降低与其他组比较 $P<0.01$,差异有统计学意义。中药高、中剂量组大鼠 HO-1 蛋白表达显著增强其他组比较 $P<0.01$,差异有统计学意义。实验最终表明,五脏温阳化痰汤对动脉粥样硬化血管性

痴呆大鼠有显著的治疗作用,能够改善大鼠学习记忆能力,其机理可能是激活了 Nrf2 蛋白通路。Nrf2 由胞浆进入到胞核内在细胞核内表达增多,并激活下游蛋白 HO-1,使其表达也增多,其中以中药中剂量组、中药高剂量组作用显著。

脑是人体内耗氧量最多的最多的器官之一,同时其不饱和脂肪酸的含量也是非常丰富。在缺血缺氧的状态下,会产生大量的氧自由基,自由基的化学性质非常活泼,可以直接攻击生物膜磷脂中的不饱和脂肪酸,导致大脑神经细胞损伤,致使神经元丢失而发生痴呆^[3]。核因子 NF-E2 相关因子 (Nu-

clear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 通过与 ARE 相互作用调节编码抗氧化蛋白, 形成 Nrf2-ARE 通路, 是一种新型抗氧化信号通路, 也是最为重要的内源性抗氧化应激通路^[4]。其调控的大批下游分子包括 HO-1 等具有抗氧化应激、调节炎症损伤、抗细胞凋亡等多种功能。最近的研究表明, Nrf2 表达水平异常或其转录活性受损与缺血性脑病的发生关系密切^[5]。

自由基介导的脂质过氧化反应在中枢神经系统疾病如脑卒中、神经退行性病变、精神障碍、神经系统的损伤等疾病起到重要的作用^[6-9]。自由基引起的损伤一直贯穿于神经损伤的进程中^[10]。自由基最易攻击脑细胞的细胞膜中多不饱和酸的双键, 同时, 自由基还会继续损伤蛋白和核酸, 引起细胞的凋亡。在神经系统疾病中, 由于急性或者慢性的各种损伤, 都会产生自由基, 从而引起一系列的细胞凋亡和蛋白质、DNA 的破坏^[11]。

目前研究发现, Nrf2-ARE 调控的下游抗氧化系统 HO-1, 其在中枢神经系统内的含量并不多, 但在促氧化剂、炎症刺激及应激状态下 Nrf2 被激活后, 血红素增加, HO-1 在神经胶质细胞和星形细胞中的表达都会增加。在中枢神经系统退行性疾病中的研究表明, HO-1 的含量也都会有明显增加, 如帕金森病(Parkinson's disease, PD)、多发性硬化(multiple sclerosis, MS)、肌萎缩性侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)^[12]。由于脑细胞中所含还原性谷胱甘肽较低, 所以脑细胞更容易遭受氧化损伤^[13]。脑缺血后增强内源性抗氧化酶活性降低(如 CAT、GPxs、SOD)等的活性能够减小脑组织损伤^[14-15]。

本实验通过建立动脉粥样硬化血管性痴呆大鼠模型, 运用五脏温阳化瘀汤进行治疗。研究结果表明, 五脏温阳化瘀汤可以激活 Nrf2-ARE 通路, 使 Nrf2 由细胞质转入细胞核, 在细胞核内表达增强, 同时 Nrf2 磷酸化, 移动到胞核内可诱导 HO-1 基因的表达。HO-1 是脑细胞对抗应激反应和抗氧化损伤的重要组成部分, 可以对抗氧化应激和外来有害物质损伤细胞的作用, 从而保护脑细胞。

参考文献

[1] Wahlund LET, Gauthier S, ed. Vascular Cognitive Impairment in Clinical Practice[M]. Cambridge, UK: Cambridge U-

niversity Press, 2009.

- [2] 唐启盛, 黄启福, 郭建文. 高脂血症大鼠缺血再灌注诱发行行为学障碍模型的实验研究 [J]. 北京中医药大学学报, 1997, 20(5): 34.
- [3] Forette F, Seux ML, Staessen JA, et al. Prevention of dementia in randomised double-blind placebo-controlled Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) trial [J]. Lancet, 1998, 352(9137): 1347-1351.
- [4] Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention [J]. Mutat Res, 2005, 591(1-2): 93-102.
- [5] Al-Omar, F. A., Nagi, M. N., Abdulgadir, M. N., et al. Immediate and delayed treatments with curcumin prevent forebrain ischemia-induced neuronal damage and oxidative insult in the rat hippocampus [J]. Neurochem Res, 2006, 31(1): 611-618.
- [6] Adibhatla RM, Hatcher JF. Role of lipids in brain injury and diseases [J]. Future Lipidol, 2007, 2(4): 403-422.
- [7] Adibhatla RM, Hatcher JF. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders [J]. Subcell Biochem, 2008, 49: 241-268.
- [8] Adibhatla RM, Dempsy R, Hatcher JF. Integration of cytokine biology and lipid metabolism in stroke [J]. Front Biosci, 2008, 13(1): 1250-1270.
- [9] Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Lipids and lipidomics in brain injury and diseases [J]. AAPS J, 2006, 8(2): E314-E321.
- [10] Lewén A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury [J]. J Neurotrauma, 2000, 17(10): 871-890.
- [11] Adibhatla RM, Hatcher JF. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities [J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 12(1): 125-169.
- [12] 王笑亮. Nrf2 在中枢神经系统疾病中的神经保护作用 [J]. 医学研究生学报, 2011, 24(7): 754-757.
- [13] Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain [J]. Prog Neurobiol, 2000, 62(6): 649-671.
- [14] Shih AY, Li P, Murphy TH. A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo [J]. Neurosci, 2005, 2(5): 10321-10335.
- [15] Zhao J, Kobori N, Aronowski J, et al. Sulforaphane reduces infarct volume following focal cerebral ischemia in rodents [J]. Neurosci Lett. 2006, 39(3): 108-112.

(编辑: 迟越)

(英文摘要见第 20 页)

1405.
[6] Vykhovalnets EV, Resnick MI, MacLennan GT, et al. Experimental rodent models of prostatitis: limitations and potential

[J]. Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 2007, 10 (2): 15-29.

(编辑:迟越)

Influence of Danpu Capsules on COX-2 Expression in Model of Autoimmune Prostatitis

YIN Xue-lai, SONG Shu-qi, HAN Bing, LIU Yong-mei, ZHANG Ya-qiang

(Guang An Men Hospital, China Academia Sciences of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100053)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the molecular mechanism of Danpu Capsules in treating chronic prostatitis pelvic pain. **Methods** The rat model of improved experimental autoimmune prostatitis was established, then the rats were randomly divided into large-dosage, medium-dosage and low-dosage Danpu Capsules groups, Qianleilai group, model group. After 8-week medicine administration the rats were killed and the prostate tissue was taken for the observation of histomorphological changes of prostate with the light microscope in all groups. The COX-2 level of prostate tissue and serum was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the expression of COX-2-mRNA in prostate was determined by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The result of ELISA showed that the COX-2 level of the model group was higher significantly than that of the normal group ($P < 0.01$). After large and medium doses of medicine administration the COX-2 level of the Danpu Capsules group was decreased significantly ($P < 0.01$). The result of RT-PCR showed that the rat model of autoimmune prostatitis had higher expression of COX-2-mRNA, while in the large and medium doses of Danpu Capsules group this expression was inhibited ($P < 0.01$). **Conclusion** 1 The improved EAP rat model is successful. The mechanism of treating autoimmune prostatitis with Danpu Capsules maybe related to that Danpu Capsules can inhibit COX-2 expression.

KEY WORDS: Danpu capsules; chronic prostatitis; autoimmune; COX-2; pain

(原文见第 8 页)

Effect of Nrf2 Protein Pathway in Rat's Hippocampus with Vascular Dementia and Atherosclerosis Treated by Wu zang Wen yang Hua yu Tang

ZHANG Hai-yan, TANG Nong, GE Jin-wen, LIAO Jun, YI Ya-qiao

(Hunan University of TCM, Changsha Hunan 410208, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a vascular dementia (VaD) model in rats based on atherosclerosis and To observe the treatment of vascular dementia rats with different doses of wu zang wen yang hua yu tang. Explore the mechanism of The decoction of wu zang wen yang hua yu tang from the aspects of oxidative stress response. **Methods** The rats in experimental groups were injected with a single dose of vitamin D (70U/kg) and loaded with high fat diet, The VaD model was established by repeatedly clipping the rat's common carotid artery. Four weeks later, these rats were divided randomly into a sham-operated group, a sedentary control group, a low-doses group, a middle-dose group, a high-dose group, and a Piracetam treated group. the rats were administered orally by gastric intubation from the fourth week. Spatial learning and memory were assessed using the Morris water maze after the drug were given for 4 weeks. Following behavioral testing, The protein levels of the rats hippocampus Nrf2 in the nucleus and cytoplasm and HO-1 were examined in Western blotting. **Results** Beginning on day 3, the escape latencies in the Morris water maze of VD rats treated with High dose group and middle dose group were than the VD rats, compared with sham-operated group and sedentary control group $P < 0.01$, which had Statistical differences. The rats treated by High dose with two kinds of dosage spent more time staying in the platform than rats with normal saline in the probe trials. The oxidative stress response of Nrf2-ARE pathway in VD rats' hippocampus were induced. Western blot detection shows wu zang wen yang hua yu tang can remove Nrf2 protein from cytoplasm to nucleus, and activate the HO-1 proteins, enhancing the proteins expression. The proteins expression of nrf2 which in the cytoplasm and then nucleus and HO-1, compared with sham-operated group and sedentary control group $P < 0.01$, which had Statistical differences. **Conclusion** The decoction of wu zang wen yang hua yu tang can improve the cognitive impairment after Atherosclerosis and chronic cerebral hypoperfusion in rats, which may be related to prevent oxidative stress response and enhance the antioxidant mechanism. The high dosage and middle dosage have the significant effects.

KEY WORDS: atherosclerosis; vascular dementia; wu zang wen yang hua yu tang; Nrf2 pathway experimental studies