

活血化痰方对认知障碍大鼠认知功能及 p53 的影响^{*}

葛华迅, 罗国东, 罗家祺[△]

(上海中医药大学附属普陀医院, 上海 200062)

摘要: **目的** 通过观察活血化痰方对认知障碍大鼠认知功能及大脑皮层及海马区 p53 的影响, 探讨其在改善大鼠认知障碍的机制。**方法** 采用双侧颈总动脉阻断改良法制作大鼠慢性脑缺血模型, 给予活血化痰方干预 4 周后, 采用 Morris 水迷宫定位航行实验(place navigation)及空间探索实验(spatial probe)测定各组大鼠学习和记忆能力, western blot 法检测乙酰化 p53 的含量变化情况。**结果** 模型大鼠 4 周后显示逃避潜伏期增长, 跨越平台次数减少, 这种改变可以被活血化痰方所抑制。活血化痰方可以降低大鼠额叶皮层、海马、伏隔核处脑组织乙酰化 p53 的表达。**结论** 活血化痰方可明显改善认知障碍大鼠学习记忆功能, 其机制可能与该方抑制 p53 表达有关。

关键词: 活血化痰方; 血管性认知障碍; 认知障碍大鼠; Morris 水迷宫; 乙酰化 p53

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2017)01-0010-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.01.003

血管性认知障碍 (vascular cognitive impairment, VCI) 是由 Hachinski 等于 1993 首次提出的一个新概念^[1], 是最常见的认知功能障碍类型之一, 是在对血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 不断研究的基础上提出来的, 其内涵较 VD 更为广泛^[2], 目前认为本病是由脑血管病危险因素 (高血压、糖尿病和高血脂等)、明显 (脑梗死和脑出血等) 或不明显的脑血管病 (白质疏松和慢性脑缺血) 引起的从轻度认知障碍到痴呆的一大类综合征^[3-4], 据研究显示, 脑血管病病人的认知障碍发生率达到 26.56%, 严重影响病人的预后及生活质量^[5]。据研究显示, 早期给予适当的治疗, 对延缓疾病进展具有关键意义, 因此, 对 VCI 进行早期干预显得尤为重要^[6]。

活血化痰方由毛冬青、全蝎、胆南星、菖蒲、泽兰、郁金、竹茹、川芎、牛膝组成, 具有活血化痰通络之效。前期研究发现^[7], 活血化痰方能改善非痴呆型血管性认知功能障碍患者的认知功能, 但其作用机制不明。

本研究采用认知障碍模型大鼠, 旨在从 p53 表达的机制考察活血化痰方的改善认知功能的作用, 为

其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验药物及试剂

活血化痰方由冬青、全蝎、胆南星、菖蒲、泽兰、郁金、竹茹、川芎、牛膝等组成, 按比例称取后水煎浓缩至每毫升药液相当于原生药 1.5g, 以上中药和煎剂均由上海中医药大学附属普陀医院中药房及制剂科提供。大鼠 sirt-1、p53 等抗体 (上海巴傲得生物科技有限公司); 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液 (Beyotime Institute of Biotechnology, 南京); 兔抗大鼠 GAPDH 多克隆抗体 (上海巴傲得生物科技有限公司); ECL 发光液 (Millipore Corporation, Billerica, USA)。

1.2 实验动物

1.2.1 动物模型的制备

成年 SD 雄性大鼠, SPF 级, 12 周龄, 体质量 250~280g, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供, 动物合格证号: 2007000566860, 实验动物许可证号: SYXK (沪) 2013-0055。将大鼠用的水合氯醛麻醉后, 仰卧固定在手术台上, 常规消毒, 颈正中切口, 分离双侧

^{*} 基金项目: 上海市普陀区中心医院院级课题 (2013PT030)

收稿日期: 2017-01-03

作者简介: 葛华迅 (1981-), 男, 上海人, 主治医师, 研究方向: 中西医结合防治心脑血管病。

[△] 通信作者: 罗家祺, E-mail: luojiaqi8166@163.com

颈总动脉(common carotid arteries, CCA),模型组在夹闭双侧之前,腹腔注射硝普钠(北京制药工业研究所实验药厂:2.5mg/kg),以降低血压,保持脑血流低灌注状态,维持大鼠脑部缺血性损伤状态^[8]。随即用无创动脉夹夹闭双侧 CCA,10min 后,再通 10min,再夹闭 10min,再通后缝合伤口,放回笼中保温饲养。假手术组手术过程与模型组相同,但不阻断及注射硝普钠。在全部造模过程中保持动物直肠温度在 37℃ 左右,以防止低温对脑缺血损伤的保护作用。

1.2.2 动物分组、给药

将认知障碍模型大鼠 35 只随机分为 5 组:假手术组、模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组 7 只;另有雄性同周龄 SD 大鼠 7 只作为正常对照组。低剂量组灌胃活血化痰方汤剂 7.5g 生药/kg,中剂量组灌胃活血化痰方汤剂 15g 生药/kg,高剂量组灌胃活血化痰方汤剂 30g 生药/kg,其余 3 组均灌胃等体积蒸馏水,各组灌药体积均为 2.5mL,根据剂量高低予以浓缩或稀释,持续 4 周。

1.3 大鼠认知功能的测定

采用 Morris 水迷宫法^[9],直径为 130cm,高 50cm 的圆形水池,水深 30cm,水温保持(26±1)℃。分别于给药后 2 周和 4 周行定位航行实验及空间探索实验。

定位航行实验:实验共历时 4d,每天定于固定时间段,上下午各 2 次,每个时间段训练 4 次,实验开始时将大鼠放入水池中自由游泳 2min,让其先熟悉水迷宫环境。将平台置于 NW 象限,从池壁四个起始点的任一点将大鼠面向池壁放入水池。自由录像记录系统记录大鼠找到平台的时间(逃避潜伏期)和游泳路径,4 次训练即将大鼠分别从 4 个不同的起始点(不同象限)放入水中。大鼠找到平台后或 180s 内找不到平台(潜伏期记为 180s,则由实验者将其拿上平台,在平台上休息 10s 再进行下一次试验。每天以大鼠 4 次训练潜伏期的平均值作为大鼠当日的学习成绩。

空间探索实验:第 5 天撤除原平台,将大鼠任选 1

个人水点放入水中,所有大鼠必须为同一入水点,记录大鼠在 2min 内跨越原平台的次数。上下午各 2 次,计算平均成绩。

1.4 Western Blotting

于给药 4 周行为学测试后大鼠断头取额叶皮层^[10]、海马、伏隔核处脑组织组织 20mg,采用裂解液抽提细胞蛋白,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒和紫外分光光度计拟合蛋白质浓度标准曲线测出蛋白。取 30μg 蛋白煮沸 5min 后,经电泳后,转至硝酸纤维素膜上,在 5%脱脂奶粉 TBST 溶液中室温封闭 2h。洗膜后,将膜放入一抗孵育液(稀释浓度 1:1 000)中孵育,4 摄氏度过夜。次日,洗膜后将膜放入 HRP 标记的二抗孵育液(稀释浓度 1:1 000)中孵育,室温 2h。洗膜后用 ECL 发光液显影。应用 GAPDH 作为蛋白上样量对照,取乙酰化 P53 光密度比值作为所得数据。

1.5 数据统计

所有数据用 SPSS 18.0 统计软件分析处理,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA 检验),组间比较方差齐者用 LSD 检验,方差不齐者用 Dunnett's T3 检验,当 $P < 0.05$ 时表示有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠认知功能的影响

2.1.1 对大鼠学习功能的影响

如表 1 所示,干预 2 周及 4 周后,模型组大鼠定位航行实验的潜伏期明显长于对照组及假手术组大鼠。模型大鼠给予中药活血化痰方低、中、高剂量后潜伏期明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$),提示活血化痰方改善学习能力的作用,而且中、高剂量组较低剂量组下降更明显($P < 0.05$),中、高剂量相比较则无明显差异($P > 0.05$),提示中剂量是其最优剂量。

2.1.2 对大鼠记忆功能的影响

如表 2 所示,干预 2 周及 4 周后,模型组大鼠空间探索实验的跨越平台次数明显少于对照组及假手术组大鼠。模型大鼠给予中药活血化痰方低、中、高

表 1 活血化痰方对血管性认知障碍大鼠潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, s$)

干预期	潜伏期					
	对照组	假手术组	模型组	低剂量	中剂量	高剂量
2 周	18.32±2.14	17.94±1.05	50.12±6.46 [#]	44.93±4.95 [*]	38.98±4.01 ^{△▲}	38.82±4.38 [△]
4 周	17.93±2.28	17.15±2.04	56.43±7.03 [#]	46.92±4.17 [△]	40.63±3.06 ^{△▲}	39.97±4.09 [△]

注:与对照组比较,[#] $P < 0.01$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,[△] $P < 0.01$,与低剂量组比较,[▲] $P < 0.01$

表 2 活血化痰方对血管性认知障碍大鼠跨越平台次数的影响($\bar{x} \pm s$)

干预期	跨越平台次数					
	对照组	假手术组	模型组	低剂量	中剂量	高剂量
2 周	7.36 $\pm$ 0.56	7.21 $\pm$ 0.76	3.14 $\pm$ 0.48 [#]	4.04 $\pm$ 0.30 [△]	4.68 $\pm$ 0.57 ^{△▲}	4.71 $\pm$ 0.42 ^{△▲}
4 周	7.79 $\pm$ 0.62	7.82 $\pm$ 0.72	2.82 $\pm$ 0.45 [#]	3.92 $\pm$ 0.62 [△]	4.64 $\pm$ 0.56 ^{△▲}	4.82 $\pm$ 0.45 ^{△▲}

注:与对照组比较,[#] $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,[△] $P<0.01$,与低剂量组比较,[▲] $P<0.01$

剂量后跨越平台次数明显增多($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$),提示活血化痰方改善记忆能力的作用,而且中、高剂量组较低剂量组增多更明显($P<0.05$),中、高剂量相比较则无明显差异($P>0.05$),提示中剂量是其最优剂量。

2.2 对脑组织乙酰化 p53 的影响

如图 1 所示,干预 4 周后,模型组 A-p53 明显高于对照组及假手术组大鼠。模型组大鼠给予中药活血化痰方低、中、高剂量后,A-p53 随剂量增加有明显下降趋势。

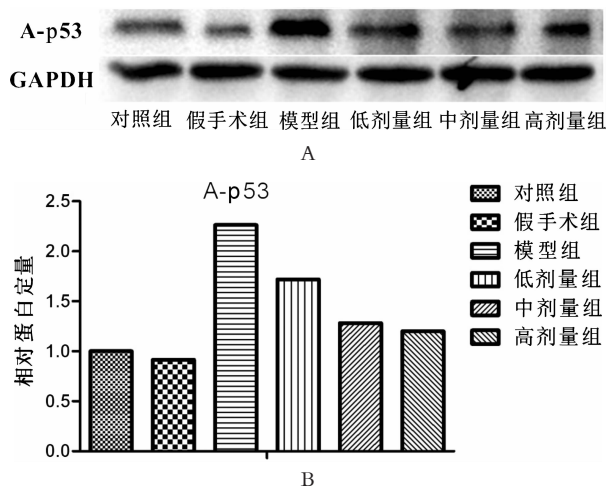


图 1 活血化痰方对脑组织乙酰化 p53 的影响

3 讨论

本研究显示活血化痰方可显著改善大鼠的认知功能,该效应可能与其调控大鼠额叶皮层、海马、伏隔核处脑组织乙酰化 p53 的表达水平有关。

活血化痰方由毛冬青、全蝎、胆南星、菖蒲、泽兰、郁金、竹茹、川芎、牛膝等组成。此方中以毛冬青、全蝎活血通络为君药,以胆南星、菖蒲化痰开窍为臣药,佐以泽兰、郁金、竹茹加强活血化痰通络之效,再以川芎、牛膝为使,引药入经,“上行头目、下行血海”,诸药合用则活血化痰通络,畅通脑络,使气血精微濡养脑窍,从而神明自清。前期临床研究表明活血化痰方能改善非痴呆型血管性认知功能障碍患者的

认知功能,然而其作用机制不明^[7]。本研究中 Morris 水迷宫实验是用于评价大鼠空间学习、记忆能力的试验,体现了大鼠的认识功能^[11],认知障碍模型大鼠的潜伏期明显长于正常大鼠和假手术组大鼠,跨越平台次数明显少于正常大鼠和假手术组大鼠,提示大鼠出现认知障碍。经活血化痰方治疗则可显著抑制上述改变,显示了该方对大鼠的改善认知功能作用。

VCI 这一新概念的提出,使我们在血管性痴呆(vascular dementia, VD)发生前识别疾病成为一种可能,被公认是一种高度流行和可以预防的综合征^[12]。发展至 VD 的患者,其日常生活行为能力已经明显受损,生活质量明显下降,临床治疗效果差,预后不佳,故早期筛查与其有关的生物学标志物可有助于早期诊断及治疗本病,避免发展到不可逆的 VD 阶段,对提高患者的生活质量具有十分重要的意义^[13]。VCI 的发病涉及到诸多因素,近年来研究发现 p53 蛋白异常表达是 VCI 的发病的重要因素之一,在参与细胞衰老的抑癌基因中,p53 是一种多功能转录调节因子^[14],在细胞衰老、凋亡的发生和维持中起着枢纽作用,其表达越多,说明脑损害越严重。当脑组织发生缺血及再灌注损伤时,引起细胞 DNA 损伤,p53 蛋白的 320 和 382 位点被乙酰化,进而促进靶基因的转录及提高 p53 与 DNA 的结合活性,p53 的表达还可以启动或调控与细胞凋亡有关的因子(如:C095/Fas、Bax、P53AIP1、IGF、mdm2 基因等)的水平改变,调控下游多种基因表达,促进致细胞凋亡^[15]。p53 是平衡有氧呼吸和糖酵解的一种重要物质,影响线粒体能量的产生,其表达量增高导致细胞凋亡,加速 VCI 的病程的发生和加速^[16]。本研究发现,活血化痰方在改善大鼠认知功能的同时,还可降低 p53 的乙酰化程度,提示可能是活血化痰方改善大鼠认知功能的机制之一。

综上所述,本实验从细胞凋亡的角度考察了活血化痰方对血管性认知障碍大鼠认知障碍的影响,结

果显示其能改善认知功能,该效应可能与降低 p53 有关。

参考文献:

- [1] Hachinski VC, Bowler JV. Vascular dementia [J]. Neurology, 1993, 43 (10): 2159-2160.
- [2] 骆迪, 毕齐. 血管性认知功能障碍研究进展 [J]. 中国全科医学, 2011, 14 (35): 4003-4006.
- [3] Rockwood K, Howard K, MacKnight C, et al. Spectrum of disease in vascular cognitive impairment [J]. Neuroepidemiology, 1999, 18 (5): 248-254.
- [4] 贾建平. 重视血管性认知障碍的早期诊断和干预 [J]. 中华神经科杂志, 2005, 38 (1): 4-6.
- [5] 张建男, 陈长香, 李建民, 等. 脑血管病病人认知障碍及相关因素调查 [J]. 脑与神经疾病杂志, 2008, 16 (1): 14-16.
- [6] Gorelick PB. Status of risk factors for dementia associated with stroke [J]. Stroke, 1997, 28 (2): 459-463.
- [7] 罗家祺, 胡慧菁, 范华昌, 等. 活血化痰方治疗非痴呆型血管性认知功能障碍的临床研究 [J]. 中成药, 2013, 35 (3): 476-478.
- [8] 王蕊, 杨秦飞, 唐一鹏, 等. 大鼠拟“血管性痴呆”模型的改进 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16 (10): 914-916.
- [9] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat [J]. J Neurol Sci Methods, 1984, 11 (1): 47-60.
- [10] 魏秀娥, 耿德勤, 刘永海, 等. 大鼠全脑缺血再灌注后额叶神经细胞凋亡与 p53 蛋白表达的实验研究 [J]. 河南实用神经疾病杂志, 2003, 6 (3): 1-3.
- [11] 朱燕珍, 林凌. p53、Noxa 在血管性痴呆大鼠海马 CA1 区中表达及意义 [J]. 山西医科大学学报, 2008, 39 (10): 865-868.
- [12] Hachinski V, Iadecola C, Petersen RC, et al. National institute of neurological disorders and stroke-canadian stroke network vascular cognitive impairment harmonization standards [J]. Stroke, 2006, 37 (9): 2220-2241.
- [13] 丁斌蓉, 涂秋云, 王轶群. 血管性认知功能障碍生物学标志物研究进展 [J]. 中国全科医学, 2011, 14 (8): 816-819.
- [14] 王莉元, 聂坤, 刘金凤, 等. 针刺抑制 p53mRNA 过表达并改善 SAMP8 小鼠的认知能力 [J]. 天津中医药, 2013, 30 (5): 294-297.
- [15] 祝峙, 朱明华. p53 基因网络的研究进展 [J]. 癌症, 2003, 22 (5): 547-511.
- [16] 刘金凤, 张莹, 孙金平, 等. 针刺疗法对老年痴呆小鼠脑内 p53 蛋白表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33 (10): 1367-1371.

(编辑:徐建平)

Effects of Huoxue Huatan Formula on Cognitive Function and Acetylated p53 in Cognitive Impairment Rats

GE Huaxun, LUO Guodong, LUO Jiaqi

(Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China)

ABSTRACT: Objective To observe the effects of Huoxue huatan Formula cognitive function and acetylated p53 in cognitive impairment rats. **Methods** By bilateral common carotid artery occlusion to establish chronic cerebral ischemia model of rats, the learning and memory ability of the rats in each group were evaluated after the intervention of Huoxue Huatan Formula in 4 weeks by using Morris water maze test and Spatial probe test and detecting the contents of acetylated p53 changes by western blot. **Results** After 4 weeks of treatment, that escape latency period were found increased while the times crossing the platform decreased which could be inhibited by the decoction. The acetylated p53 expression were found decreased in frontal cortex, hippocampus and the nucleus accumbens of the rats. **Conclusions** HuoXue Huatan Formula could significantly improve cognitive function in cognitive impairment rats. The mechanism could be attributed to its inhibition of Acetylated p53.

KEY WORDS: Huoxue Huatan Formula; vascular cognitive impairment; cognitive impairment rats; Morris water maze; Acetylated p53