

从线粒体相关凋亡蛋白表达探讨温肺降浊方对 VD 大鼠学习记忆能力的影响[※]

● 胡跃强¹ 向军军¹ 赖菁菁¹ 汪庭龙² 吴林² 唐农^{2▲}

摘 要 目的:探讨温肺降浊方对血管性痴呆(VD)大鼠海马组织 Cytc、Bax 蛋白表达变化及大鼠学习记忆能力的影响。方法:雄性 SPF 级 SD 大鼠 120 只,随机分为假手术组、模型组、中药组、西药组,每组各 30 只。采用双侧颈总动脉永久性结扎法制作 VD 大鼠模型,中药组给予温肺降浊方灌胃,西药组予盐酸多奈哌齐灌胃,其余两组则予以等量生理盐水灌胃。采用 Morris 水迷宫测试大鼠学习、记忆能力,RT-PCR 检测大鼠海马 Cytc、Bax mRNA 含量,Western blot 检测大鼠海马 Cytc、Bax 蛋白表达水平。结果:①Morris 水迷宫学习记忆能力测试结果证实与假手术组比较,模型组大鼠学习成绩与记忆成绩下降,各用药组大鼠的学习成绩与记忆成绩均有显著提高($P < 0.05$);②与模型组比较,中药组及西药组大鼠海马 Cytc、Bax mRNA 及蛋白表达量含量显著下降($P < 0.05$),且药物组之间比较无统计学意义($P > 0.05$)。结论:温肺降浊方可明显改善 VD 大鼠学习记忆能力,其机制可能与其抑制海马 Cytc 及 Bax 表达有关。

关键词 温肺降浊方 血管性痴呆 细胞凋亡 Cytc Bax

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是因脑血管病变引发脑损伤从而进一步导致痴呆的病症,主要是以记忆、学习能力缺损为主的获得性智力持续性损害^[1]。随着社会人口老龄化的加剧,VD 的发病率不断升高。目前,对于 VD 的治疗,西医尚无特殊有效的方法,而中医药以其多途径、多靶点、疗效好及副作用少的特点,在 VD 的治疗中显示出良好的前景。笔者发现^[2],肺脏虚损及功能失调在 VD 发病中起着重要作用,并在此基础上提出经验方温肺降浊方,并在临床上取得一定效果^[3],但其机制有待于进一步阐明。本研究通过检测线粒体凋亡相关基因 Cytc、Bax

的表达,以探讨其对 VD 大鼠学习记忆能力的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 120 只,3 月龄,体重 200 ± 50 g,由广西医科大学动物实验中心提供,动物许可证号:SCXK 桂 2014-0002。按随机数字表进行分成 4 组:假手术组、模型组、中药组、西药组,每组 30 只。

1.2 药物制备及主要仪器试剂 ①实验药物:温肺降浊方:制附子 20g、党参 15g、干姜 10g、酒大黄 10g、田七 10g、炙甘草 10g 共 6 味中药组成,由我院药剂科统一采购备用(每单味药要求同一产地、同一质量层次、同一批次)(由江苏江阴天江药业有限公司提供,批号:1406033)的用量。盐酸多奈哌齐片:卫材药业有限公司制造,每片 5mg。其浓度及等效剂量按体表面积折算换算,灌胃中药为生药浓度,药物浓度均按 0.02 g/mL,按每天 1 mL/100g 体重灌胃。②主要试剂及仪器:总 RNA 提取试剂盒、PCR 反应试剂盒、逆转录试剂盒,引物及内参(GAPDH)均由大连宝生物有限公司(TaKaRa)提供;Cytc 兔抗、BAX 兔抗均有美国

※基金项目 广西中医基础理论重点实验室系统课题(No. KJT13076);广西医学高层次骨干人才“139”计划培养人选资助项目;广西高等学校优秀中青年骨干教师培养工程资助项目(No. JS13069)

▲通讯作者 唐农,男,医学博士,教授,主任医师,博士研究生导师。长期从事中医内科的临床、教学、科研和管理工作。E-mail:137463195@qq.com

• **作者单位** 1. 广西中医药大学第一附属医院(530023);2. 广西中医药大学(530023)

Cell Signaling Technology 公司;MT-200 型 Morris 水迷宫(成都泰盟科技有限公司)。

1.3 实验模型制备及药物干预方法 VD 大鼠模型采用双侧颈总动脉永久结扎方法制备^[4],将麻醉完全的大鼠仰卧位固定大鼠于自制的鼠板上,沿着颈部中线正中切开,钝性分离肌肉及结缔组织,分离出双侧颈总动脉并埋线,操作过程避免损伤迷走神经,用无菌丝线依次结扎双侧颈总动脉,术后第1天开始,中药组予温肺降浊方汤剂按浓度 0.08g/mL,每天 1mL/100g 体重灌胃,1次/天。西药组予多奈哌齐溶液灌胃,其灌胃浓度 0.02g/mL,按每天 1mL/100g,按体重灌胃,1次/天,连续 29 天。模型组与假手术组均予相同剂量的生理盐水灌胃。

1.4 指标观察

1.4.1 学习记忆功能测定 定位航行实验:连续 5 天,每组大鼠每天上午下午从四个象限各训练 1 次,将大鼠寻找平台的时间设置为 120s,记录大鼠从入水到爬上平台所需时间,即逃避潜伏期,此作为大鼠空间学习能力的检测指标。空间搜索实验:大鼠完成定位航行实验后,于第 6 天进行空间探索实验,撤走平台,依次将大鼠从 4 个象限放入水中,分别记录其停留在平台象限的时间及跨越原来平台的次数作为空间记忆的检测指标。

1.4.2 荧光定量(SYBR Green) RT-PCR 检测大鼠海马 CytC、Bax mRNA 表达 大脑组织总 RNA 提取:参考 Trizol 试剂盒说明书提取总 mRNA;总 RNA 纯度浓度测定:采用紫外分光光度法,测定其 260 及 280nm 的吸光度,并根据 OD260/OD280 比值评估 RNA 的纯度;引物合成:CytC、Bax 和 GAPDH 引物序列如下:Bax 上游 5'-CGATTGCGCATGAACTGGA-3';下游:5'-CAAACATGTCAGCTGCCACAC-3',产物长度为 109 bp;CytC 上游:5'-GTCAGATGCCCCGACACATTCA-3';下游:5'-CTGCTTCATTCCGGAC-CAGACAC-3',产物长度为 80 bp;GAPDH 上游 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG'-3';下游 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3',产物长度 143bp;
④比较两基因扩增效率:通过对照样品、检测样品的目的基因及管家基因的 Ct 值,然后以管家基因的 Ct 值为依据对目的基因进行差值校正;⑤反应体系及条

件:种基因同管扩增,反应体系均为 20μl,其中 SYBR Premix Ex Taq II (2 ×) 10μl, cDNA 模板 2.0μl、两种基因上下游引物 (10pmol/μl) 各 0.8μl、ROX Reference Dye II (50 ×) 30.4μl,加无 RNA 酶的水 6μl。在 Applied Biosystem 7500 Real PCR System 中进行扩增反应,反应条件为:94℃ 预变性 30s,95℃ 5s,60.0℃ 34s,40 个循环,4℃ 保存。每例样品及阴性对照均设 4 个平行复孔,取均值。

1.4.3 Western blot 检测大鼠海马组织 CytC、Bax 蛋白水平 提取大鼠海马组织蛋白,分装保存于 -20℃ 冰箱备用;用 BCA 试剂盒测定蛋白含量;蛋白上样 20μl,经电泳分离后,转至 PVDF 膜上;于室温条件下封闭 1h,经 TBST 漂洗 3 次后,分别于一抗 CytC (1:1000)、Bax (1:1000)、β-actin (1:1000) 4℃ 摇床上孵育过夜;再经 TBST 漂洗 3 次后,再加入二抗室温下振荡孵育 1h;经漂洗后,加入 ECL 孵育 3min,暗室进行 X 胶片显影、定影;采用 Image-J 图像分析软件对条带进行灰度分析;以目的条带与内参 β-actin 的灰度比值表示 CytC、Bax 蛋白表达水平。

1.5 数据统计方法 采用统计学分析软件 SPSS 17.0 进行数据统计,计量资料用均数 ± 标准 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组数据间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学测试

2.1.1 定位航行实验 随着训练天数的增加,各组大鼠逃避潜伏期逐渐缩短,其中假手术组最明显,中药组及西药组次之;第 3 天与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期显著延长 ($P < 0.05$),第 4、5 天与模型组比较,中药组与西药组逃避潜伏期显著下降 ($P < 0.05$);中药组与西药组比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.1.2 空间搜索试验 与空白组比较,模型组大鼠穿越平台次数及在平台象限滞留的时间显著减少 ($P < 0.05$);与模型组比较,中药组与西药组穿越平台次数及在平台象限滞留的时间显著增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);中药组与西药组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表1 VD大鼠 Morris 水迷宫实验测试成绩比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	定位航行(潜伏期)(s)					空间搜索	
	d1	d2	d3	d4	d5	平台象限停留时间(s)	成功次数
假手术组	86.8 ± 18.4	74.1 ± 14.2	56.8 ± 10.6	23.3 ± 4.7	13.2 ± 6.1	30.8 ± 4.2	4.30 ± 0.67
模型组	93.2 ± 19.5	81.5 ± 11.3	78.5 ± 17.3 [#]	78.4 ± 12.1 [#]	70.7 ± 12.6 [#]	14.5 ± 3.0 [#]	1.80 ± 0.78 [#]
中药组	87.4 ± 16.7	75.1 ± 13.3	58.0 ± 9.1 [*]	33.0 ± 10.7 [*]	20.4 ± 7.3 [*]	27.0 ± 4.9 [*]	4.0 ± 0.81 [*]
西药组	88.3 ± 19.9	76.0 ± 14.5	56.8 ± 10.6 [*]	23.3 ± 4.8 [*]	13.2 ± 6.2 [*]	25.8 ± 3.9 [*]	3.2 ± 0.78 [*]

注:与假手术组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

2.2 大鼠海马 Cytc、Bax mRNA 的表达变化 与假手术组比较,模型组 Cytc、Bax mRNA 表达量明显升高($P < 0.05$),与模型组比较,中药组二者 mRNA 含量显著下降($P < 0.05$),而中药组与西药组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表2。

表2 各组 Cytc、Bax mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	Bax	Cytc
假手术组	0.65 ± 0.46	0.72 ± 0.03
模型组	1.11 ± 0.73 [#]	1.12 ± 0.11 [#]
中药组	0.79 ± 0.12 [*]	0.97 ± 0.13 [*]
西药组	0.82 ± 0.077 [*]	0.98 ± 0.10 [*]

注:与假手术组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

2.3 大鼠海马 Cytc、Bax 蛋白的表达变化 与假手术组比较,模型组表达水平明显升高($P < 0.05$),与模型组比较,中药组表达显著下降($P < 0.05$),而中药组与西药组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)见表3及图1。

表3 各组 Cytc、bax 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	Bax	Cytc
假手术组	0.42 ± 0.22	0.48 ± 0.31
模型组	0.92 ± 0.24 [#]	1.24 ± 0.12 [#]
中药组	0.60 ± 0.22 [*]	0.82 ± 0.26 [*]
西药组	0.62 ± 0.20 [*]	0.99 ± 0.20 [*]

注:与假手术组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

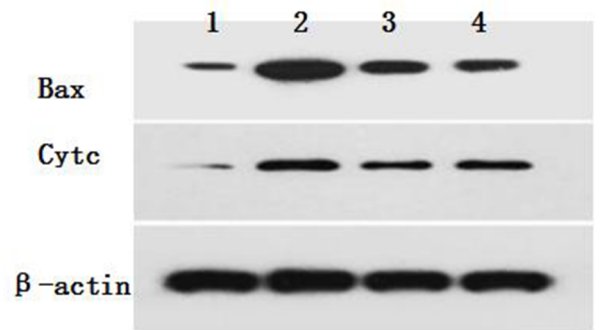


图1:各组大鼠海马 Cytc、Bax 蛋白表达变化(1:假手术组;2:模型组;3:中药组;4:西药组)

3 讨论

目前,对于 VD 的治疗,西医多从某个单一环节着手如用胆碱酯酶抑制剂改善认知功能^[5]。而中医以其疗效好、多靶点、副作用少的特点,越来越受到重视^[6-7],但对于准确认识疾病病因病机的是前提。目前中医普遍认为肾虚、痰浊、瘀血是 VD 发生发展的主要因素,治疗上仍主要采取补肾、活血、益气、化痰等法,但临床疗效并不令人满意^[8]。而我们通过长期理论研究发现此病与肺密切相关,因而提出从肺论治,已经临床观察证实有较好的疗效^[9]。

《灵枢·天年》中记载:“肺气衰,魄离,故言善误”。《至真要大论》又云:“诸气贖郁皆属于肺”。《素问·四时逆从刺论》曰:“阳气衰竭,令人善忘。”提示了肺气虚衰可能是神机失用的关键。结合经典,我们认为肺具有“水精四布,五经并行”之功,肺失宣降则痰浊停聚;阳主动,主温煦,阳失温化,必然造成经络脏器及九窍不通,因此温肺降浊是治疗血管性痴呆的关键,故拟定了温肺降浊方。方中附子补肾阳;干姜温脾阳;党参合干姜同补脾胃之气;三七活血化瘀,疏通血管;大黄荡涤瘀滞,有推陈出新之功;甘草和干姜

辛甘化阳,培土生金,且能调和诸药。全方配伍精良,以温肺降浊阳为主,兼有化痰通络、活血化瘀,温中有清,先天与后天兼顾,故而能使机体吸收、分布、代谢、排泄等功能正常。多靶点的消除VD的诱发因素,起到预防和治疗的三重功效。

近来研究发现,大鼠学习记忆能力的改变与海马CA1区凋亡细胞有很强的相关性^[10]。而抑制脑神经细胞凋亡对血管性痴呆大鼠有明显治疗作用^[11]。最新文献也记载,线粒体凋亡蛋白Cyt_c、Bax在凋亡过程中发挥主要作用^[12]。胡迪等^[13]通过对红景天苷对镉中毒的保护作用,其机制可能减低线粒体中Cyt_c的释放,降低Bax的表达有关。史志勤^[14]等也证实了通过抑制抑制线粒体Cyt_c及Bax的表达,可对细胞起到显著保护作用。本研究显示中药组大鼠学习记忆明显改善,且Cyt_c、Bax的mRNA及蛋白的表达量下降,这与上述研究结论基本一致。

综上所述,本研究结果提示温肺降浊方可抑制促凋亡蛋白Cyt_c、Bax的表达,改善大鼠的学习记忆能力,其可能是防治血管性痴呆的作用机制之一。

参考文献

[1] Lebage Gamarallage MM, Galloway S, Takechi R, et al. Probucolesuppresses enterocytic accumulation of amyloid - induced by saturatedfat and cholesterol feeding[J]. Lipids, 2012, 47(1): 27 - 34.
 [2] 赵清山,王清碧,唐农,等.唐农教授从肺论治血管性痴呆的经验[J].贵阳中医学院学报, 2014, 36(1): 6 - 8.

[3] 唐农,胡跃强,吴林,等.益肺宣肺降浊胶囊对血管性痴呆患者的疗效及脑神经递质的影响[J].辽宁中医杂志, 2014, 41(10): 2108 - 2110.
 [4] Zhang ZH, Shi GX, Li QQ, et al. Comparison of cognitive performance between two rat models of vascular dementia[J]. The International Journal Of Neuroscience, 2014, 124(11): 818 - 823.
 [5] 李强,胡长林,王景周.地黄益智浸膏对老年性痴呆大鼠海马磷酸化CREB、GSK-3 β 表达的影响[J].中国老年学杂志, 2008, 28(6): 539 - 542.
 [6] 徐炎,李学军.多靶点药物治疗及药物发现[J].药学学报, 2009, 44(3): 226 - 230.
 [7] 致公党中央调查组.推进中医药事业健康发展[J].中国发展, 2013, 13(6): 1 - 6.
 [8] 姜雄,况时祥.益气升阳活血法治疗血管性痴呆早期机理探讨[J].时珍国医国药, 2015, 26(8): 1967 - 1968.
 [9] 唐农,胡跃强,吴林,等.益肺宣肺降浊胶囊治疗血管性痴呆患者107例临床观察[J].中医杂志, 2014, 55(12): 1025 - 1028.
 [10] 隋竹欣,刘昊,王海涛,等.创伤后应激障碍大鼠海马、杏仁核神经元自噬和凋亡改变[J].西安交通大学学报(医学版), 2014, 35(1): 136 - 138.
 [11] 马云枝,史继鑫,孟闯,等.复智胶囊对血管性痴呆大鼠脑组织海马区神经细胞凋亡的影响[J].时珍国医国药, 2011, 22(9): 2177 - 2178.
 [12] 陈小睿,唐光曦,孟宪丽,等.通脉醒脑滴丸对线栓法致脑缺血再灌注大鼠细胞凋亡线粒体信号转导通路的影响[J].时珍国医国药, 2015, 21(7): 1803 - 1804.
 [13] 胡迪,刘学忠,谢俊泽,等.红景天苷对镉中毒的保护作用及机制研究[J].毒理学杂志, 2015, 29(5): 361 - 365.
 [14] 史志勤,卞红磊,魏艳静,等.重组人红细胞生成素对癫痫持续状态大鼠海马线粒体凋亡途径相关调控因子的影响及作用机制[J].中国全科医学, 2015, 18(19): 2310 - 2316.

中医文化

曹雪芹名中藏玄机

《红楼梦》的作者是清代的曹雪芹,他有三个号:雪芹、芹圃、芹溪,都有“芹”字。这绝不是因为他江郎才尽,想不出更好的名字,而是缘于他对一种叫做“水芹”的植物的钟爱,也因水芹治好了不少疑难病症。

相传曹家被抄后,曹雪芹开始了漫长的“举家食粥酒常赊”的穷苦生活。酒馆里有个年过半百的老伙计叫马青,见曹雪芹满腹学问,便不时地接济他。久而久之,两人成了推心置腹的好朋友。

有一回曹雪芹一连三天未见马青露面,一打听才知马青病得不轻,便跑到马青家看望。一进家门却见马青躺在炕上呻吟,见到挚友这般境况,曹雪芹心中十分难受。他走近炕前,为马青号了号脉,随即便跑到村头的池塘边,割下一把野生的水芹,熬成汤,喂马青服下。此后三天,曹雪芹日日到马青家中,为病友熬水芹汤。三天后,马青竟在未服用其他药物的情况下完全恢复了健康。

从此,曹雪芹名声大振,前来求医的村民络绎不绝。他也因此就地取材,以水芹和从山中采来的草药为主,为当地百姓治病,分文不收。为了表达自己为民治病的志向,他便自号“雪芹”,以后又起了“芹圃”“芹溪”两个号,以表达矢志为民医治疾病的心愿。