

· 药理 ·

基于PI3K/Akt/mTOR通路探讨补肾通络方对血管性痴呆大鼠 海马神经元突触可塑性的影响

张杰¹, 周媛¹, 马云枝¹, 赵敏^{1*}, 代景妍², 李思敏²

(1. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450008; 2. 河南中医药大学, 郑州 450046)

【摘要】 目的:探讨补肾通络方对血管性痴呆(VD)模型大鼠海马神经元突触可塑性的影响及其作用机制研究。方法:选用SPF级SD大鼠,采用双侧颈总动脉分次结扎法,建立VD大鼠模型。选取造模成功的大鼠,随机分为模型组,补肾通络方高、中、低剂量组,胰岛素样生长因子-1(IGF-1)组,并设假手术对照组,分别给予对应的药物灌胃,1次/d,连续4周;其中补肾通络方高、中、低剂量组的灌胃剂量分别为3,1.5,0.75 g·kg⁻¹,IGF-1组灌胃剂量20 μg·kg⁻¹,模型组和假手术组给予同体积的生理盐水灌胃。末次灌胃结束后,采用Morris水迷宫法观察各组大鼠空间学习记忆能力,原位末端标记法(TUNEL)检测海马神经元细胞凋亡情况,高尔基染色法(Golgi)观察海马神经元突触形态及树突棘数量变化,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K),蛋白激酶B(Akt),哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR),突触素(SYP)及淀粉样前体蛋白(APP)蛋白的表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期、游泳路程明显延长,撤除平台后跨越原平台次数明显减少($P<0.05$),细胞凋亡数目明显增多($P<0.05$);树突棘数量明显减少($P<0.05$);PI3K, Akt, mTOR, SYP蛋白表达明显减少,APP表达明显增多($P<0.05$);与模型组比较,补肾通络方组,IGF-1组逃避潜伏期、游泳路程明显缩短,撤除平台后跨越原平台次数明显增多($P<0.05$),细胞凋亡数目明显减少($P<0.05$);PI3K, Akt, mTOR, SYP蛋白表达明显增多,APP表达明显减少($P<0.05$);与IGF-1组比较,在大鼠逃避潜伏期、游泳路程、撤除平台后跨越原平台次数,细胞凋亡数目,树突棘数量,PI3K, Akt, mTOR, SYP, APP蛋白表达等,补肾通络方高剂量组差异均无统计学意义;补肾通络方中、低剂量组差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:补肾通络方能够改善VD大鼠学习记忆能力,其机制可能与激活PI3K/Akt/mTOR自噬通路,改善海马神经元细胞突触可塑性有关。

【关键词】 血管性痴呆; 补肾通络方; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路; 突触可塑性

【中图分类号】 R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2021)18-0025-07

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20211701

【网络出版地址】 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210720.1100.002.html>

【网络出版日期】 2021-07-20 13:11

Effect of Bushen Tongluo Prescription on Synaptic Plasticity of Hippocampal Neurons of Vascular Dementia Model Rats Based on PI3K/Akt/mTOR Pathway

ZHANG Jie¹, ZHOU Yuan¹, MA Yun-zhi¹, ZHAO Min^{1*}, DAI Jing-yan², LI Si-min²

(1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

【Abstract】 Objective: To explore the effect of Bushen Tongluo prescription (BSTLP) on the synaptic plasticity of hippocampal neurons in vascular dementia (VD) model rats and its mechanism. **Method:** SD male rats of SPF grade were selected. The rat model of VD was established by permanent bilateral ligation of the common carotid artery several times. The model rats were randomly divided into a model group, an insulin-like

【收稿日期】 20210409(009)

【基金项目】 河南省中医药科学研究专项基金项目(2019ZY2142,2016ZY2050);国家自然科学基金项目(81904264)

【第一作者】 张杰,博士,副主任医师,从事中医药防治脑病研究,Tel:0371-66200352,E-mail:jie830@163.com

【通信作者】 *赵敏,博士,主任医师,博士生导师,从事中医药防治脑病研究,Tel:0371-66288898,E-mail:byts1969@126.com

growth factor-1 (IGF-1, $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, high-dose ($3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium-dose ($1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low-dose ($0.75 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) BSTLP groups. A sham operation group was also set. Drugs were administered to rats by gavage once a day for four weeks. The model group and the sham operation group received the same volume of normal saline. After the last administration, all the rats were detected for spatial learning and memory by the Morris water maze. The apoptosis of hippocampal neurons was detected by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay. The changes in synaptic morphological structure and the number of dendritic spines in hippocampal neurons were detected by Golgi's method. The expression levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), mammalian target of rapamycin (mTOR), synaptophysin (SYP), and amyloid precursor protein (APP) in hippocampal neurons were detected by Western blot. **Result:** Compared with the sham operation group, the model group showed prolonged escape latency, lengthened swimming distance, dwindled the number of times for the platform crossing after platform removal ($P<0.05$), increased apoptotic cells ($P<0.05$), declining synaptic dendritic spines ($P<0.05$), down-regulated expression levels of PI3K, Akt, mTOR, and SYP proteins, and up-regulated expression level of APP protein in hippocampal neurons ($P<0.05$). Compared with the model group, the BSTLP groups and the IGF-1 group showed shortened escape latency and swimming distance, increased number of times for the platform crossing after platform removal ($P<0.05$), declining apoptotic cells ($P<0.05$), up-regulated expression levels of PI3K, Akt, mTOR, and SYP proteins, and down-regulated expression level of APP protein in hippocampal neurons ($P<0.05$). Compared with the IGF-1 group, the high-dose BSTLP group showed no significant difference in the escape latency, swimming distance, the number of times for the platform crossing after platform removal, apoptotic cells, synaptic dendritic spines, and expression levels of PI3K, Akt, mTOR, SYP, and APP proteins in hippocampal neurons. However, the differences were significant in the medium-dose and low-dose BSTLP groups ($P<0.05$). **Conclusion:** BSTLP can improve the learning and memory of rats with VD. The mechanism is presumably related to the activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway and improvement of synaptic plasticity of hippocampal neurons.

[Keywords] vascular dementia (VD); Bushen Tongluo prescription (BSTLP); phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway; synaptic plasticity

血管性痴呆是指因各种急、慢性脑血管病变导致认知功能相关脑区长期低灌注造成的,以认知障碍为主要表现的临床综合征。严重影响患者的生活能力和身心健康,给家庭和社会带来沉重的负担。因此,研究血管性痴呆(VD)的发病机制,对寻求有效的防治措施具有重要意义。

海马区神经元细胞凋亡及突触树突分支减少,树突棘密度减低是导致VD认知障碍的重要因素^[1-2]。自噬在慢性低灌注状态时,可降解异常蛋白、受损细胞器等为细胞供能和促进损伤修复,具有神经保护作用^[3-4]。磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)通路是经典的自噬通路,在维持细胞存活、结构重塑和内环境稳定方面具有重要作用。研究发现,PI3K/Akt/mTOR通路对突触形态^[5]和传递效能^[6]具有一定的影响。而长期的低灌注状态存在自噬降解功能障碍^[7],导致异常蛋白清除受阻和突触形态发育

调节蛋白合成不足,在VD认知障碍发病中扮演重要角色。因此,通过调控自噬功能修复突触损伤,将为防治VD研究的重要内容。

近年来,中药对自噬的调控作用逐渐得到了证实。对认知障碍的改善,研究认为主要与中药调控自噬清除 β 淀粉样蛋白(A β)和微管相关蛋白(tau)沉积有关^[8]。补肾通络方源自河南中医药大学第一附属医院名老中医马云枝教授治疗VD经验方,该方作为院内特色制剂在临床应用20余年疗效确切^[9]。前期实验研究发现,该方能改善突触损伤提高VD模型大鼠学习记忆能力^[10],但其作用机制尚未明确。由于A β 的沉积也参与了VD的发病,但目前中药调控自噬降解功能在VD研究中较少。补肾通路方对认知障碍的改善是否与减轻异常蛋白沉积和修复突触损伤有关,需进一步探讨。因此,在本研究中通过建立VD动物模型,探讨PI3K/Akt/mTOR通路对神经元突触可塑性的影响以及补肾通

络方的调控作用,以期为中医药治疗VD提供依据。

1 材料

1.1 动物 健康SPF级雄性SD大鼠,6周龄,体重(200±10)g,由河南省实验动物中心提供,动物使用许可证号SYXK(豫)2016-0009,本研究得到河南省中医院伦理委员会批准(伦理批件编号PZ-HNSZYY-20180138)。

1.2 药物及试剂 补肾通络方由熟地黄15g,制首乌15g,山萸肉12g,石菖蒲12g,远志10g,黄芪15g,葛根15g,川芎12g,桃仁10g等药物组成,所用中药材由河南中医药大学第一附属医院中药房提供,并由孟菲副主任药师鉴定符合2020年版《中华人民共和国药典》标准。上药经浸泡、煎煮、过滤、浓缩后制备成含生药1g·mL⁻¹溶液,冷藏备用。原位末端标记法(TUNEL)凋亡试剂盒(上海罗氏制药有限公司,批号11684817910);微量BCA蛋白质定量试剂盒,DAB显色试剂盒,超敏ECL发光显色液试剂盒,丽春红染色液,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为AR1110, SA2020, AR1172, AR0142, A00227);考马斯亮蓝试剂G-250(北京索莱宝科技有限公司,批号C8420);重铬酸钾,硝酸银,胰岛素样生长因子-1(IGF-1)(美国Sigma公司,批号分别为5271, 204390, 121767);一抗PI3K, Akt, mTOR, 突触素(SYP), 淀粉样前体蛋白(APP), 辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(英国Abcam公司,批号分别为ab32089, ab38449, ab32028, ab32127, ab32136, ab205718)。

1.3 仪器 Morris水迷宫设备及动物行为学视频分析软件(上海欣软信息科技有限公司);图象采集系统(德国Lecia显微照像系统);Minn PROTEAN System型电泳仪, Power Pac™HC型电泳电源, Criterion转印仪, Trans-Blot型转印槽, Gel Doc XR⁺型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司);Multiskan-FC型酶标仪(美国Thermo公司)。

2 方法

2.1 动物造模 适应性喂养7d后,采用颈总动脉分次结扎法^[11]复制VD模型。大鼠术前12h禁食,4h禁水,采用3.5%水合氯醛麻醉,仰卧固定,颈前部去毛,消毒后沿颈正中切开,钝性分离出颈总动脉,先结扎一侧颈总动脉远心端和近心端,以确保阻断血流,缝合皮肤,切口用红霉素软膏适量局部涂敷。术后第4天采用同样的方法结扎另一侧颈总动脉。假手术组大鼠操作步骤同上,除不结扎颈总

动脉外,余过程与模型组相同。IGF-1(PI3K激动剂)组大鼠在术前1h及术后24h经侧脑室注射IGF-1(给药量20 μg·kg⁻¹),给药体积均为10 μL。术后各组大鼠每日给予腹腔注射青霉素钠针12万U/只,连续注射3d。术后分别将各组动物于Morris水迷宫中连续定位航行训练4d,每天训练2次,每次均从E, S, W, N 4个入水点顺序面向池壁放入水中,训练120s。若动物在120s之内找到平台,使其在平台上停留15s;若120s之内未找到平台,则将其诱导到平台上并停留15s方结束训练。如此训练4d,分别记录每只动物的潜伏期,潜伏期越短,路程越近,说明大鼠学习记忆能力越好。取第4天假手术组大鼠逃避潜伏期的均值为参考值,同时计算造模大鼠第4天的平均逃避潜伏期与参考值之差占该鼠的平均逃避潜伏期时间的比值,该值>20%的大鼠定为造模成功。

2.2 分组给药 选取造模成功的大鼠,随机分为模型组, IGF-1组, 补肾通络方高、中、低剂量组,并设假手术对照组,每组10只。根据体表面积法计算大鼠相当于成人的临床等效剂量,并以此剂量作为补肾通络方中剂量组的灌胃剂量(1.5 g·kg⁻¹·d⁻¹),并以此按比例设定补肾通络方高、低剂量组(3, 0.75 g·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃剂量。IGF-1组大鼠分别与造模术后7, 14, 21, 28d经侧脑室注射IGF-1,给药量同前。模型组, IGF-1组剂组和假手术组每日给予等体积蒸馏水灌胃。观察周期为4周。

2.3 指标检测

2.3.1 行为学检测 在末次灌胃结束后进行检测。
①定位航行试验,操作方法同前。
②空间搜索试验,定位航行试验结束后撤除平台,选取原平台对侧象限中一个入水点将大鼠放入水中,计算其2min内跨原平台相应位置的次数,评价大鼠学习记忆能力。

2.3.2 TUNEL检测海马神经元细胞凋亡 在末次灌胃及行为学检测结束后,将大鼠用3.5%的水合氯醛腹腔麻醉后,打开胸腹腔,暴露心脏,剪开右心耳放血,将穿刺针头经左心室刺入主动脉,先用生理盐水灌注至四肢、眼、耳等变白后,然后再用4%多聚甲醛液灌注,待大鼠头颈部变僵直即可,开颅后取出脑组织。各组取5只大鼠脑组织置于真空组织脱水仪中梯度乙醇脱水以及二甲苯透明,石蜡包埋。经海马冠状连续切片,切片厚度5 μm。按照TUNEL凋亡试剂盒说明进行检测,用抗荧光淬灭封片液封片,在荧光显微镜下观察海马神经元细胞凋

亡情况并计数。观察时标本放大400倍,随机选取10个视野,计算神经元细胞凋亡指数(AI)。AI=凋亡细胞核数量/总细胞核数量×100%。

2.3.3 海马神经元细胞突触形态学观察 在末次灌胃及行为学检测结束后,大鼠灌注取脑。将取出的脑组织放置于3.5%重铬酸钾中避光媒染3 d,每天更换溶液。媒染后倒掉重铬酸钾溶液,加入1%硝酸银溶液浸泡镀银,在37℃避光放置浸染3 d使浸银充分,每天更换溶液。然后用振动切片机经海马冠状位连续切片。切片经2%重铬酸钾溶液、蒸馏水漂洗,依次脱水、透明、用二甲苯透明中性树胶封片,在光镜下观察。选择背景清晰的切片以供检测,每只大鼠的切片中选择5张,每张切片选取4个细胞做统计,从胞体发出的树突第1次分支开始计算,每个细胞计算3个分支,以每10 μm树突棘个数反映其密度。

2.3.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马区PI3K, Akt, mTOR, SYP, APP蛋白的表达 末次灌胃及行为学检测结束后,将大鼠脱颈椎处死,迅速断头取脑,并将迅速分离出海马组织放入-80℃冰箱保存备用。取海马区脑组织约0.2 g置于匀浆器中,按裂解液10 μL组织块1 mg的比例加入蛋白提取试剂,在匀浆裂解前按每1 mL蛋白提取试剂加入PMSF 10 μL的比例,加入适量的PMSF。研磨,并4℃条件下12 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径6 cm),离心后提取上清液,采用BCA蛋白定量法测定蛋白浓度。加上样缓冲液和RIPA制备样品,上样量蛋白50 μg。经SDS-PAGE电泳后,转移至PVDF膜上,加入5%脱脂奶粉封闭2 h,加入一抗PI3K, Akt, mTOR, SYP, APP(1:1 000), GAPDH(1:3 000), 4℃孵育过夜,洗涤后加入羊抗兔二抗(1:4 000), 37℃孵育1 h, ECL显影并扫描拍照。用凝胶图像处理系统分析目标条带和GAPDH的灰度值,以两者比值表达其相对含量。

2.4 统计学分析 实验数据采用SPSS 20.0统计软件处理,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,方差齐的用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐的用Dunnett's *T*检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对VD大鼠学习记忆能力影响 与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期、游泳路程明显延长,撤除平台后跨越原平台次数明显减少($P < 0.05$);与模型组比较,IGF-1组、补肾通络方高、中、低剂量组逃

避潜伏期、游泳路程均缩短,跨越原平台次数明显升高($P < 0.05$);与IGF-1组比较,补肾通络方高剂量组逃避潜伏期、游泳路程、跨越原平台次数,差异无统计学意义;补肾通络方中、低剂量组大鼠空间学习记忆能力下降,逃避潜伏期、游泳路程延长,跨越原平台次数增多($P < 0.05$)。见表1。

表1 补肾通络方对VD大鼠逃避潜伏期、跨越平台次数和游泳路程影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Bushen Tongluo prescription(BSTLP) on escape latency, times of crossing platform and swimming distance of VD rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	逃避潜伏期 /s	游泳路程 /cm	跨原平台 /次
假手术		25.00±3.27	128.40±9.91	9.30±1.64
模型		54.40±4.62 ¹⁾	186.80±11.63 ¹⁾	2.40±0.97 ¹⁾
补肾通络方	3.0	33.60±5.10 ²⁾	145.00±15.14 ²⁾	7.40±1.43 ²⁾
	1.5	37.60±3.89 ^{2,3)}	156.20±9.40 ^{2,3)}	6.10±1.37 ^{2,3)}
	0.75	40.90±4.68 ^{2,3)}	161.00±8.79 ^{2,3)}	5.50±1.08 ^{2,3)}
IGF-1	0.000 02	30.70±3.62 ²⁾	139.30±11.69 ²⁾	7.80±1.48 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与IGF-1组比较³⁾ $P < 0.05$ (表2~4同)。

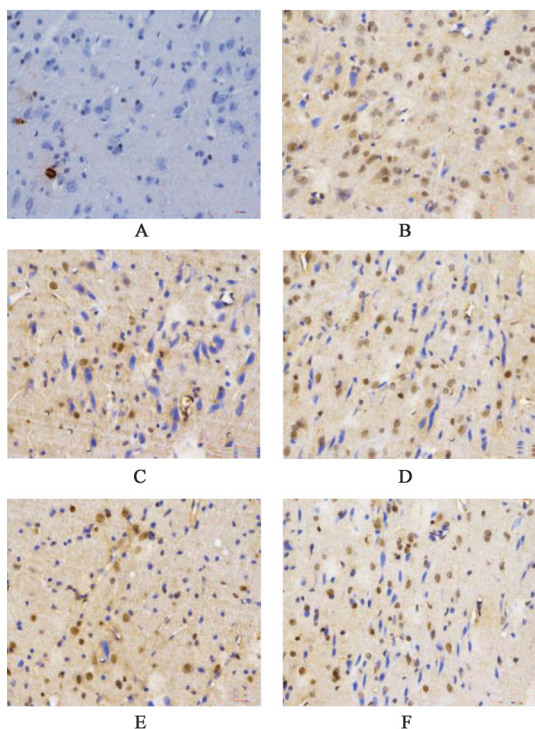
3.2 对VD大鼠海马区神经元细胞凋亡影响 采用TUNEL检测细胞凋亡时,正常细胞核染色呈蓝色,凋亡细胞呈棕黄色。结果显示,假手术组仅见少量染色呈棕黄色的细胞,大部分细胞呈蓝色。与假手术组比较,模型组棕黄色细胞明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较,IGF-1组、补肾通络方高、中、低剂量组棕黄色细胞数明显减少($P < 0.05$)。与IGF-1组比较,补肾通络方高剂量组棕黄色细胞数差异无统计学意义;补肾通络方中、低剂量组凋亡细胞数明显增多($P < 0.05$)。见表2,图1。

表2 补肾通络方对VD大鼠海马神经元细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of BSTLP on number of apoptotic cells in hippocampus neurons of VD rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AI/%
假手术		13.00±1.70
模型		39.40±1.17 ¹⁾
补肾通络方	3.0	26.20±3.43 ²⁾
	1.5	30.90±2.64 ^{2,3)}
	0.75	32.80±2.94 ^{2,3)}
IGF-1	0.000 02	22.50±3.03 ²⁾

3.3 对VD大鼠海马神经元细胞突触形态学影响 在光镜下观察发现,假手术组神经元浸染充分,



A. 假手术组; B. 模型组; C. 补肾通络方高剂量组; D. 补肾通络方中剂量组; E. 补肾通络方低剂量组; F. IGF-1组(图2同)

图1 补肾通络方对VD大鼠海马神经元细胞凋亡的影响(TUNEL, ×400)

Fig. 1 Effect of BSTLP on number of apoptotic cells in hippocampus neurons of VD rats (TUNEL, ×400)

神经元树突形态正常,分支较多,树突棘分布较密。与假手术组比较,模型组海马神经元树突分支较少,树突棘分布稀疏,树突棘数量差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,IGF-1组、补肾通络方高、中、低剂量组树突棘数量明显增多($P<0.05$);与IGF-1组比较,补肾通络方高剂量组树突棘数量差异无统计学意义;补肾通络方中、低剂量组树突棘数量减少($P<0.05$)。见表3,图2。

表3 补肾通络方对VD大鼠海马神经元树突棘数量的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of BSTLP on number of synaptic dendritic spines in hippocampus neurons of VD rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	树突棘数量/个/10 μm
假手术		31.20±4.02
模型		11.30±2.67 ¹⁾
补肾通络方	3.0	24.10±3.34 ²⁾
	1.5	19.60±2.41 ^{2,3)}
	0.75	17.4.50±2.46 ^{2,3)}
IGF-1	0.000 02	26.60±3.37 ²⁾

3.4 对VD大鼠海马区PI3K, Akt, mTOR, SYP, APP蛋白表达影响 与假手术组比较,模型组大鼠

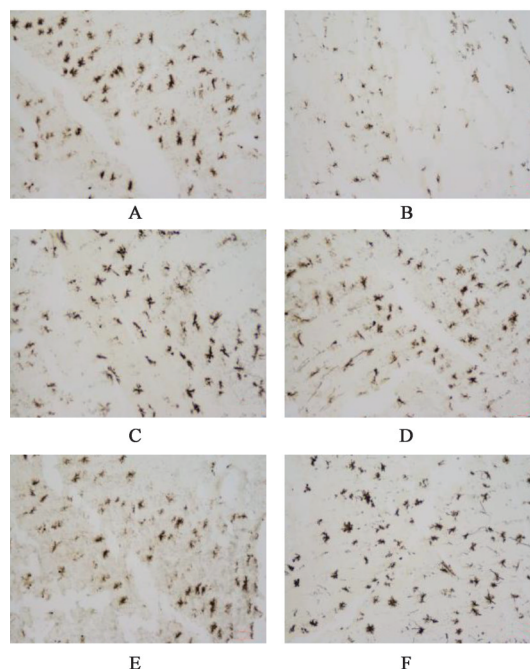


图2 补肾通络方对VD大鼠海马区神经元突触形态的影响(Golgi, ×100)

Fig. 2 Effect of BSTLP on synaptic morphological in hippocampal neurons of VD rats (Golgi, ×100)

海马区PI3K, Akt, mTOR, SYP蛋白表达明显减少, APP蛋白表达明显增多($P<0.05$);与模型组比较, IGF-1组、补肾通络方高、中、低剂量组PI3K, Akt, mTOR, SYP蛋白表达明显增多, APP蛋白表达明显减少($P<0.05$);与IGF-1组比较,补肾通络方高剂量组PI3K, Akt, mTOR, SYP, APP蛋白表达差异无统计学意义;补肾通络方中、低剂量组PI3K, Akt, mTOR, SYP蛋白表达明显减少, APP蛋白表达明显增多($P<0.05$)。见表4,图3。

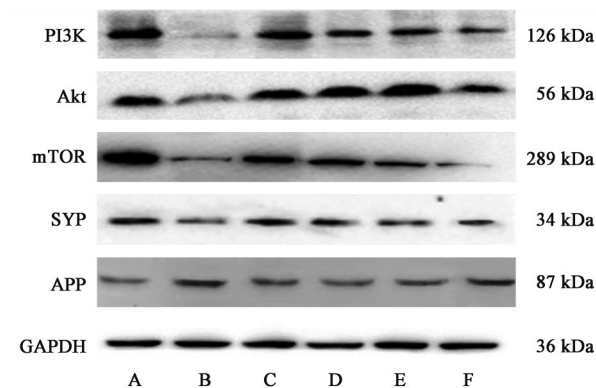
4 讨论

突触是神经系统信息传递和功能活动的结构基础^[12],对保证神经元获得信息、传递信息以及加工和贮存信息具有重要作用。其结构和功能随外部因素发生改变的现象称为突触可塑性^[13]。树突棘为神经元突触树突上的棘装小突起,是维持突触形态和功能的关键结构^[14]。SYP是分布在突触囊泡内的一种钙结合蛋白,其表达水平反映了突触结构和功能状态^[15]。当突触出现丢失、数量减少时或突触传递障碍时, SYP的表达亦随之降低^[16]。脑缺血会导致突触结构破坏和功能异常,如树突长度变短,分支减少,树突棘密度降低^[17],导致突触效能改变,且其损害程度与脑缺血时间长短和程度密切相关^[18]。本研究采用改良的双侧颈总动脉结扎法,复制大鼠永久性慢性低灌注的VD模型,引起海马区

表 4 补肾通络方对 VD 大鼠 PI3K, Akt, mTOR, SYP, APP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effect of BSTLP on PI3K, Akt, mTOR, SYP and APP expression in hippocampus of rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH	mTOR/GAPDH	SYP/GAPDH	APP/GAPDH
假手术		0.96±0.01	0.83±0.02	0.83±0.02	0.91±0.03	0.43±0.02
模型		0.44±0.02 ¹⁾	0.45±0.03 ¹⁾	0.38±0.03 ¹⁾	0.39±0.03 ¹⁾	0.89±0.03 ¹⁾
补肾通络方	3.0	0.86±0.03 ²⁾	0.73±0.01 ²⁾	0.73±0.03 ^{2,3)}	0.73±0.02 ²⁾	0.52±0.02 ²⁾
	1.5	0.82±0.04 ^{2,3)}	0.70±0.03 ^{2,3)}	0.69±0.04 ^{2,3)}	0.70±0.02 ^{2,3)}	0.56±0.02 ^{2,3)}
	0.75	0.80±0.03 ^{2,3)}	0.68±0.03 ^{2,3)}	0.67±0.02 ^{2,3)}	0.68±0.03 ^{2,3)}	0.58±0.02 ^{2,3)}
IGF-1	0.000 02	0.89±0.02 ²⁾	0.76±0.03 ²⁾	0.77±0.02 ²⁾	0.75±0.03 ²⁾	0.49±0.02 ²⁾



A. 假手术组; B. 模型组; C. IGF-1 组; D. 补肾通络方高剂量组; E. 补肾通络方中剂量组; F. 补肾通络方低剂量组

图 3 大鼠海马区 PI3K, Akt, mTOR, SYP, APP 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of PI3K, Akt, mTOR, SYP and APP proteins in hippocampus of rats

神经细胞损害。该方法与传统方法相比,造模效果无差异,但动物的存活率可显著提高,模型稳定性强^[19]。在研究中也发现,与假手术组比较,造模后的大鼠海马神经元树突分支明显较少,树突棘分布较为稀疏,同时 SYP 表达也明显降低。

自噬对缺血后神经损伤具有保护作用,可通过降解异常蛋白质和靶向性调节突触可塑性参与对认知功能的调控^[20-21]。脑缺血后导致 A β 沉积参与了 VD 的发病^[22],而自噬是 A β 重要清除机制^[23]。长期慢性低灌注状态时存在自噬降解功能障碍^[7],影响 APP 水解导致 A β 沉积造成突触损伤^[24]。本研究也证实,造模后各自大鼠海马区 APP 表达明显增高,细胞大量凋亡,树突棘较为稀疏。在给予 IGF-1 上调 PI3K/Akt/mTOR 通路活性后 APP 表达下降,细胞凋亡受到抑制。上调 PI3K/Akt/mTOR 通路活性,可以靶向性促进突触支架蛋白合成,维持突触形态,改善突触可塑性^[25]。这可能与突触后的支架蛋白中含有与自噬蛋白结合的结合域有关^[26]。在本研究中发现,采用 IGF-1 激活 PI3K/Akt/mTOR 通路后 SYP 表达随之上调,树突棘密度明显增加,大鼠

的学习记忆能力得到改善。

中医认为肾虚脑髓失养为 VD 发病之本,气虚络瘀,痰瘀浊毒损伤脑络是病机关键^[27]。补肾通络方中以制何首乌养血益精填髓为君药,熟地黄、山萸肉滋阴益精填髓共为臣药,川芎善行气活血,桃仁为治血瘀之专药,葛根活血通络兼具生津化血之效,佐黄芪补脾胃之气以达化瘀通窍之功,石菖蒲辛散善宣气除痰,远志苦降善祛痰开窍,二药合用可交通上下,祛痰醒神。全方以益肾填髓为主,化痰祛瘀通络为辅。肾为先天之本,藏精生髓,精血互生,肾中精气具有促进机体生长发育的功能。药理学研究发现,补肾中药具有改善代谢、调节免疫机能、延缓衰老等功效^[28]。自噬清除异常细胞、促进细胞重建和发育的机制,是肾精气化功能的微观体现。肾中精气充沛,一方面能生髓化血为机体提供必需的物质基础,另一方面气化功能正常可以促进痰瘀浊毒之邪的清除。从微观角度分析,脑缺血后产生的异常蛋白质和受损细胞器等代谢物质即为痰瘀之内生浊毒^[29]。若自噬降解功能障碍异常代谢物质在细胞内大量堆积会诱发细胞损伤、死亡。通过补肾通络中药可以调节自噬不足导致的功能异常,从而促进细胞功能恢复和机体生命活动正常。在本研究中发现,应用补肾通络方后各组大鼠 PI3K, Akt, mTOR 表达显著升高,提示补肾通络方具有上调自噬通路作用。随着 PI3K/Akt/mTOR 通路激活, APP 表达减少,减轻了异常蛋白沉积造成的细胞损害,细胞凋亡数量减少,同时 SYP 表达明显升高,树突分支增多、增长,树突棘密度增加,大鼠学习记忆能力得到了改善。说明补肾通络方改善 VD 认知功能机制可能与上调 PI3K/Akt/mTOR 通路活性,改善自噬降解功能障碍,抑制细胞凋亡,促进突触损伤修复,从而调节突触可塑性有关。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LEWIS S. Learning and memory: how synapses form memories[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17(10):604.
- [2] 谭雪,高莉,任佳,等. 突触可塑性对阿尔茨海默病影响的研究进展[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(9): 52-55.
- [3] WANG P, SHAO B Z, DENG Z, et al. Autophagy in ischemic stroke [J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 163: 98-117.
- [4] KUANG H, TAN C Y, TIAN H Z, et al. Exploring the bi-directional relationship between autophagy and Alzheimer's disease[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2020, 26(2):155-166.
- [5] 段立洁,王子高,祖恒兵. 双氢睾酮对 $A\beta_{1-42}$ 诱导的突触损害的保护作用[J]. *神经解剖学杂志*, 2019, 35(5):493-498.
- [6] 薛星莉,李欢,李亚芹,等. 亚慢性铝暴露抑制大鼠海马区突触可塑性PI3K/AKT/mTOR信号通路机制[J]. *中国职业医学*, 2020, 47(2):141-146.
- [7] 邹文颖,李玉梅,付剑亮. 慢性脑低灌注所致认知障碍大鼠海马区自噬机制的初步研究[J]. *中国临床神经科学*, 2016, 24(1):43-51.
- [8] 于博,崔娜,许洁,等. 电针对非痴呆型血管性认知障碍的疗效及其对事件相关电位的影响[J]. *世界中医药*, 2020, 15(4):632-636.
- [9] 张杰,马云枝,杨泽锋,等. 针药结合治疗非痴呆型血管认知功能障碍[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(15):217-220.
- [10] 张杰,马云枝,沈晓明,等. 复智胶囊对血管性痴呆模型大鼠学习记忆能力改善的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(2):128-132.
- [11] 马明,赵晴,杜建时,等. 大鼠颈总动脉分次结扎建立血管性痴呆模型评价[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(1):72-74.
- [12] GODA Y, SABATINI B L. Synaptic function and regulation [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2011, 21(2): 205-207.
- [13] HARRIS K P, LITTLETON J T. Transmission, development, and plasticity of synapses[J]. *Genetics*, 2015, 201(2):345-375.
- [14] KORKOTIAN E, SEGAL M. Structure-function relations in dendritic spines: is size important? [J]. *Hippocampus*, 2000, 10(5):587-595.
- [15] KWON S E, CHAPMAN E R. Synaptophysin regulates the kinetics of synaptic vesicle endocytosis in central neurons[J]. *Neuron*, 2011, 70(5):847-854.
- [16] 肖雁,苏艳丽,井沆,等. 血管性痴呆大鼠海马突触素、发动蛋白I的mRNA及蛋白表达变化[J]. *临床神经病学杂志*, 2014, 27(1):37-40.
- [17] 李平,余婧萍,陈易璇,等. 脑缺血再灌注损伤对大鼠大脑皮质EPL区和海马CA1区神经元损伤病理形态的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(3):466-470.
- [18] 邹兆鹏,范锦阁,赵博,等. 脑缺血后突触可塑性研究进展[J]. *广东医学*, 2018, 39(23):3573-3577.
- [19] 吴章福,高晓平,李光武. 改良双侧颈总动脉结扎法与传统法制备的大鼠慢性脑缺血模型比较[J]. *中国康复医学杂志*, 2012, 27(3):206-210.
- [20] JAROME T J, DEVULAPALLI R K. The ubiquitin-proteasomesystem and memory: moving beyond protein degradation[J]. *Neuroscientist*, 2018, 24(6): 639-651.
- [21] GLATIGNY M, MORICEAU S, RIVAGORDA M, et al. Autophagy is required for memory formation and reverses age-relatedmemory decline [J]. *Curr Biol*, 2019, 29(3):435-448.
- [22] ZONG W, ZENG X, CHEN S Y, et al. Ginsenoside compound K attenuates cognitive deficits in vascular dementia rats by reducing the $A\beta$ deposition [J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 139(3):223-230.
- [23] MANCZAK M, KANDIMALLA R, YIN X, et al. Hippocampal mutant APP and amyloid beta-induced cognitive decline, dendritic spine loss, defective autophagy, mitophagy and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2018, 27(8):1332-1342.
- [24] GULISANO W, MELONE M, LI PUMA D D, et al. The effect of amyloid- β peptide on synaptic plasticity and memory is influenced by different isoforms, concentrations and aggregation status [J]. *Neurobiol Aging*, 2018, 71:51-60.
- [25] TOMODAT, YANG K, SAWA A. Neuronal autophagy in synaptic functions and psychiatric disorders[J]. *Biol Psychiatry*, 2020, 87(9):787-796.
- [26] 张汉斌,潘越,汪洋,等. 突触可塑性中自噬的功能和分子机制[J]. *生命科学*, 2020, 32(7):731-737.
- [27] 高颖,谢颖桢. 试论浊毒在血管性痴呆发病中的作用[J]. *中国中医急症*, 2000, 9(6):266-267.
- [28] 孙琳林,梁绍栋,任公平,等. 四种经典补肾抗衰老方对衰老大鼠免疫炎症性损伤影响的比较研究[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(4):830-833.
- [29] 姜文秀,常诚. 自噬与泄毒活血法治疗血管性痴呆的探讨[J]. *辽宁中医杂志*, 2019, 46(1):56-58.

[责任编辑 周冰冰]