

参芎化瘀胶囊对血管性痴呆大鼠 海马 CA1 区 p38 丝裂原活化蛋白激酶表达的影响

刘斌^{1?}, 毛文静¹, 李爱春¹, 马原源¹, 张晋霞¹, 李世英¹, 李建民²

(1. 华北煤炭医学院附属医院神经内一科; 2. 华北煤炭医学院附属医院神经外科, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的: 探讨参芎化瘀胶囊对血管性痴呆(vascular dementia, VD) 大鼠海马 CA1 区 p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK) 表达的影响。方法: 采用反复夹闭双侧颈总动脉同时 ip 硝普钠的方法制备血管性痴呆大鼠模型。SD 大鼠随机分为: 正常组、假手术组、痴呆模型组(模型组)、参芎化瘀胶囊治疗组。应用 Morris 水迷宫检测 VD 大鼠学习记忆能力, 免疫组化染色检测海马 CA1 区 p38MAPK 表达的变化。结果: (1) 与正常对照组及假手术组相比, 模型组大鼠平均逃避潜伏期时间延长($P < 0.01$), 跨越平台的次数及在原平台象限停留时间明显减少($P < 0.01$, $P < 0.01$); 与模型组比较, 参芎化瘀胶囊治疗组随时间延长大鼠平均逃避潜伏时间缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$), 穿越平台的次数及在原平台象限停留时间增多($P < 0.05$, $P < 0.05$)。(2) 与正常组及假手术组相比, 模型组大鼠海马 CA1 区 p38MAPK 阳性细胞明显增多($P < 0.01$); 与模型组比较, 参芎化瘀胶囊治疗组大鼠海马 CA1 区 p38MAPK 阳性细胞减少($P < 0.01$)。结论: VD 大鼠学习记忆成绩下降与 p38MAPK 表达增加有关, 参芎化瘀胶囊可减少 VD 大鼠海马 CA1 区 p38MAPK 的表达, 改善 VD 大鼠的学习记忆功能。

[关键词] 血管性痴呆; P38 丝裂原活化蛋白激酶; 参芎化瘀胶囊

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0161-05

Effect of Shenxiong Huayu Capsule on Expression of p38MAPK in CA1 Area of Hippocampus in Vascular Dementia Rats

LIU Bin^{1*}, MAO Wen-jing¹, LI Ai-chuen¹, MA Yuan-yuan¹, ZHANG Jin-xia¹, LI Shi-ying, LI Jian-min²

(The Affiliated Hospital of North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Shenxiong Huayu Capsule on the expression of p38 MAPK in the CA1 area of hippocampus in vascular dementia rats. **Method:** A model of vascular dementia (VD) was established by combining repeated occlusion of common carotid artery and intraperitoneal injection of sodium nitroprusside. The SD rats were evenly randomized into 4 groups: blank control group, sham-operation group, VD model group and Shenxiong Huayu Capsule intervention group. The learning and memory abilities of rats were detected by Morris water maze, and the expression of P38MAPK was detected by immunohistochemistry. **Result:** (1) Compared with the sham-operation group and blank control group, the escape latent period was increased in the VD model group($P < 0.01$), and the times of traversing terrace and the period of staying in the pristine quadrant were obviously decreased in the VD model group($P < 0.01$, $P < 0.01$). The escape latent period in the Shenxiong Huayu Capsule intervention group was gradually decreased compared with the VD model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the times of traversing terrace and the period of staying in the pristine quadrant were increased compared with the VD model group($P < 0.05$, $P < 0.05$). (2) The expression of p38MAPK in the CA1 area of hippocampus was increased in the VD model group compared with that in the sham-operation group and blank control group ($P < 0.01$). The expression of p38MAPK in the CA1 area of hippocampus was declined in Shenxiong Huayu Capsule

[收稿日期] 20100107(002)

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题(08410); 河北省中医药管理局基金课题(2007010)

[通讯作者] 刘斌, 主任医师, 研究方向脑血管病基础与临床, E-mail: liubin919tsh@sina.com

intervention group compared with that in the VD model group ($P < 0.01$). **Conclusions:** The decline of learning and memory abilities of the VD rats is related to the increasing of P38MAPK, and Shenxiong Huayu Capsule could decrease the expression of P38MAPK in the CA1 area of hippocampus in VD rats and improve the abilities of learning and memory for the VD rats.

[Key words] vascular dementia; p38MAPK; Shenxiong Huayu Capsule

脑血管病患者常并发认知功能障碍和血管性痴呆(Vascular dementia, VD)^[1-2]。目前认为海马区的缺血性病变是血管性痴呆的重要病理基础^[3]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是一类重要信号转导通路。p38MAPK 信号途径是 MARK 家族中的重要组成部分,研究发现 p38MAPK 信号通路与脑缺血损伤有密切关系^[4]。参芎化瘀胶囊由人参、地鳖虫、川芎、乳香、没药、全蝎、紫河车、龙血竭、五味子、石菖蒲、郁金、桑葚子等组成,具有养血益气、化瘀通络,疗伤定通等功效,但对血管性痴呆患者 p38MAPK 蛋白表达变化的影响还未见报道。本研究通过观察参芎化瘀胶囊对血管性痴呆大鼠海马 CA₁ 区 p38MAPK 蛋白表达变化的影响,探讨参芎化瘀胶囊对血管性痴呆的防治作用,为临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,体重 200 ~250 g,由中国医学科学院实验动物研究所供给,合格证号 SCXK(京)2005-0013。

1.2 试剂与仪器 参芎化瘀胶囊,由华北煤炭医学院附属医院药剂科提供,批号冀药制字 Z20051586,规格 0.40 g/粒,实验时用生理盐水配制成 48 mg · mL⁻¹ 的药液备用。硝普钠粉针剂,北京双鹤生产,批号 0302162,规格 50 mg/支,用双蒸水配制成 0.25 mg · mL⁻¹ 的药液,黑纸包裹避光备用。兔抗鼠 p38MAPK 多克隆抗体, SABC 免疫组化试剂盒, DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德生物技术有限公司。Morris 水迷宫由淮北正华生物仪器设备有限公司提供。

2 方法

2.1 动物分组及给药 实验动物随机分为 4 组:正常组、假手术组、模型组和参芎化瘀胶囊治疗组,每组各 10 只大鼠。治疗组 ig 给药,每日 1 次,术前预防给药 7 d,术后继续给药 28 d。参芎化瘀胶囊治疗组:参芎化瘀胶囊(0.048 g · mL⁻¹)ig 1 mL · 100g⁻¹

(0.48 g · kg⁻¹,相当于成人用量的 12 倍)。正常组、假手术组和模型组:生理盐水 ig, 1 mL · 100g⁻¹。**2.2 动物模型制备** 参照王蕊等^[5]的方法制作 VD 动物模型。大鼠术前 12 h 禁食,4 h 禁水,用 10% 水合氯醛(300 mg · kg⁻¹)ip 麻醉。大鼠麻醉成功后,将其仰卧固定在手术台上,颈前部去毛,常规消毒,颈部正中切口,分离双侧颈总动脉(CCA),模型组及药物治疗组在夹闭双侧颈总动脉(CCA)之前,ip 硝普钠(2.5 mg · kg⁻¹,用双蒸馏水溶解),随即用无创动脉夹夹闭双侧 CCA,10 min 后,再通 10 min,共间歇阻断双侧颈总动脉血流 3 次,每次间隔 10 min,之后缝合伤口,放回笼中保温饲养。假手术组仅分离双侧颈总动脉,但不夹闭双侧 CCA 及注射硝普钠。术中大鼠肛温保持在 36.5 ~37.5 ,以防止低温对脑缺血损伤的保护作用。术后连续 3 d 庆大霉素,预防感染。

2.3 学习记忆能力测定 采用 Morris 水迷宫法。术后第 29 天,进行 Morris 水迷宫实验,进行行为学测试。Morris 水迷宫装置包括一个圆形不锈钢游泳池,直径 120 cm,高 50 cm;池壁上有东南西北 4 个入水点标志,将水池等分为 4 个象限。目标象限的中央放置一直径为 10 cm,高 23 cm 的圆形隐藏平台。水温保持(24 ±2) ,室温 24 ,实验期间迷宫外参照物始终保持不变。迷宫上方安置带有显示系统的摄象机,同步记录大鼠运动轨迹, Morris 水迷宫数据采集和分析软件记录相关数据及图象结果。各组均在 ig 4 周后进行检测。测试包括:学习训练:实验前让每只大鼠在安全平台上站 15 s,然后将其头朝下背对水池壁依次从 NE, SE, SW, NW 4 个象限投入水中,游泳时间设定为 120 s。若 120 s 未爬上安全平台,结束本象限实验,同时操作者将其引向平台,停留 20 s 后继续下一象限实验。每次训练 4 个象限,分上、下午两个时间段进行,连续 4 d。定位航行试验:在学习训练结束后第 5 天进行,将大鼠从某一固定象限如前操作投入水中,记录找到平台的时间为逃避潜伏时间(escape latency, ST)。若 120 s

内找不到平台者, ST 记为 120 s。 空间探索试验: 在定位航行试验后进行, 撤走安全平台, 将大鼠从某一固定象限如前操作投入水中, 记录大鼠 120 s 穿过平台所在位置的次数和在原平台所在象限停留的时间。

2.4 标本制备 各组大鼠在进行行为学测试结束后, 以致死量 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水合氯醛($300\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) 腹腔麻醉后, 仰卧位固定于手术台上, 剪开胸腔, 暴露心脏, 从心尖插入灌注针至左心室, 同时剪开右心耳, 快速滴入 37°C 生理盐水 300 mL, 无血污后改为滴入固定液 4% 的多聚甲醛 400 mL。待大鼠呈僵硬状态迅速断头, 取出脑组织, 固定于 4% 多聚甲醛溶液中 12~24 h, 取视交叉至乳头体组织, 取厚为 2 mm 的冠状切片, 常规脱水透明及浸蜡包埋, 在切片机上冠状面连续切片, 厚度约 $5\text{ }\mu\text{m}$, 用经多聚赖氨酸处理过的载玻片捞片, 晾干后至于 60°C 的烤箱中烘烤备用。

2.5 免疫组化染色 切片常规脱蜡至无水; PBS 冲洗 3 次, 5 min/次; 切片滴加 0.3% 过氧化氢溶液室温 20 min, 以封闭内源性过氧化物酶活性; PBS 冲洗 3 次, 5 min/次; 高压热修复抗原, 冷却至室温; PBS 冲洗 3 次, 5 min/次; 切片上滴加正常山羊血清封闭, 室温 20 min, 以减少非特异性染色, 倾去, 勿洗; 切片上滴加稀释第一抗体(抗 P38MAPK 抗体稀释浓度为 1:100), 置湿盒内 4°C 冰箱过夜, PBS 冲洗 3 次, 5 min/次; 切片上滴加生物素化工作液(二级抗体), 置湿盒内 37°C 温箱 30 min, PBS 冲洗 3 次, 5min/次; 切片上滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液, 置湿盒内 37°C 温箱 30 min, PBS 冲洗 3 次, 5 min/次。DAB 显色, 镜下控制反应时间, P38MAPK 阳性细胞均为胞体内出现棕黄色颗粒(以胞浆出现

为主, 强阳性时细胞核也出现棕黄色颗粒)。苏木素复染 1 min, 充分水洗、1% 盐酸酒精分化、1% 氨水反蓝、充分水洗、脱水、透明、封片。

2.6 p38MAPK 蛋白检测 采用免疫组化 SABC 法, 具体操作步骤按试剂盒说明书进行。p38MAPK 免疫组化阳性标准: 光镜下观察, p38MAPK 蛋白染色呈棕黄色颗粒, 位于胞浆内。高倍镜下随机分别观察各组大鼠海马 CA1 区不重叠的 6 个视野, 进行 p38MAPK 蛋白阳性细胞计数, 计算阳性细胞平均数及标准差。

2.7 统计学处理 所得数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$) 表示, 以 Excel 数据库整理后用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析, 两组之间均数比较采用 t 检验, 以 $P<0.05$ 认为有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠学习记忆能力测定结果

3.1.1 各组大鼠逃避潜伏期结果的比较如表 1 所示, 随着训练天数的增加, 各组大鼠的逃避潜伏期均缩短。但前两天各组大鼠找到平台的时间没有明显差异($P>0.05$), 从第 3 天起, 模型组大鼠平均逃避潜伏期时间较正常组及假手术组延长($P<0.01$), 且到 4, 5 d 两者之间一直保持这种差异。第 4 天时, 参芎化瘀胶囊治疗组与模型组比较大鼠平均逃避潜伏时间缩短($P<0.05$), 第 5 天时, 两者之间的差异更加显著($P<0.01$)。随着训练天数的增加, 模型组大鼠的训练成绩虽有所提高, 但其平均逃避潜伏期时间始终维持在较高的水平。在 5 d 的训练中, 正常组与假手术组比较大鼠平均逃避潜伏期时间无显著性差异。

表 1 各组大鼠 Morris 水迷宫平均潜伏期结果($\bar{x}\pm s$, $n=10$) s

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常	-	111.49 $\pm$ 4.97	89.28 $\pm$ 8.55	64.51 $\pm$ 10.32	51.09 $\pm$ 11.91 ²⁾	21.20 $\pm$ 3.41 ²⁾
假手术	-	111.49 $\pm$ 3.45	90.96 $\pm$ 11.28	65.06 $\pm$ 11.33 ²⁾	51.81 $\pm$ 12.67 ²⁾	20.42 $\pm$ 5.71 ²⁾
模型	-	112.29 $\pm$ 7.88	94.92 $\pm$ 13.20	90.79 $\pm$ 8.01	84.49 $\pm$ 11.71	84.90 $\pm$ 5.33
参芎化瘀胶囊	0.48	111.25 $\pm$ 7.79	86.91 $\pm$ 10.51	74.75 $\pm$ 13.03	62.00 $\pm$ 16.99 ¹⁾	45.60 $\pm$ 18.42 ²⁾

与模型组相比¹⁾ $p<0.05$, ²⁾ $p<0.01$ (下同)
3.1.2 各组大鼠空间探索结果比较如表 2 所示, 撤走安全平台后, 正常组与假手术组大鼠穿越平台的次数及在原平台象限停留时间比较无统计学意义。模型组大鼠于撤走安全平台后跨越平台的次数及在

原平台象限停留时间均较正常对照组及假手术组明显减少($P<0.01$), 参芎化瘀胶囊治疗组大鼠穿越平台的次数及在原平台象限停留时间均较模型组大鼠增多($P<0.05$)。

表 2 各组 Morris 水迷宫空间探索实验结果($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)			
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	跨越平台所在 位置次数/次	在原平台象限 停留时间/s
正常	—	7.33 ±1.21 ²⁾	65.50 ±5.45 ²⁾
假手术	—	7.17 ±2.04 ²⁾	64.00 ±8.83 ²⁾
模型	—	3.00 ±0.90 ²⁾	39.75 ±4.11
参芎化瘀胶囊	0.48	5.67 ±1.63 ¹⁾	51.26 ±6.95 ¹⁾

3.2 血管性痴呆大鼠海马 CA1 区 p38MAPK 免疫组化结果正常对照组与假手术组大鼠海马 CA1 区,可见有一定量的 p38MAPK 免疫反应阳性细胞表达(图 1,2),模型组大鼠海马 CA1 区 p38MAPK 的阳性表达数高于正常对照组与假手术组(图 3),参芎化瘀胶囊治疗组大鼠海马 CA1 区 p38MAPK 免疫反应阳性细胞数低于模型组(图 4)。表 3 显示,与正常组及假手术组相比,模型组海马区 p38MAPK 阳性细胞增多($P < 0.01$);与模型组比较,参芎化瘀胶囊治疗组海马区 p38MAPK 阳性细胞减少($P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠海马 CA1 区 p38MAPK 表达的阳性细胞数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)		
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	p38MAPK 阳性细胞数 (个/高倍视野)
正常	-	1.17 ± 0.75 ²⁾
假手术	-	2.18 ±1.72 ²⁾
模型	-	33.83 ± 11.29
参芎化瘀胶囊	0.48	22.83 ± 4.71 ²⁾

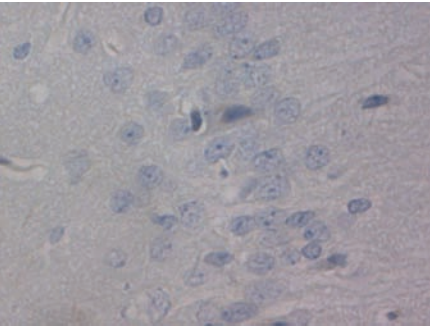


图 1 正常组 P38MAPK

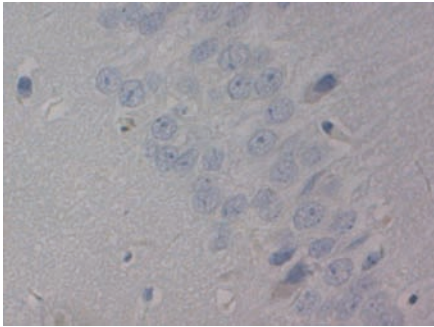


图 2 假手术组 P38MAPK

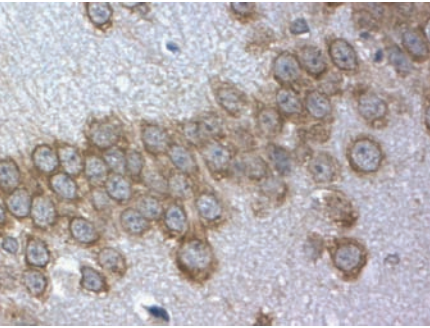


图 3 模型组 P38MAPK

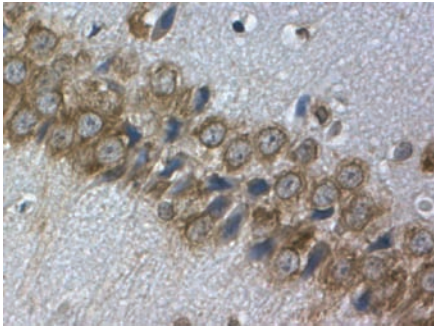


图 4 参芎化瘀胶囊组 P38MAPK

4 讨论

VD 的基础疾病是脑血管疾病,反复脑缺血是 VD 发生的主要原因。本研究采用反复夹闭、再通双

侧颈总动脉伴低血压法制备大鼠血管性痴呆模型,很好地模拟了人类血管性痴呆的发病过程,最终导致神经细胞功能下降,学习记忆功能障碍,是较理想的 VD 动物模型。研究发现,不同脑区的神经元对缺血的敏感性不同,海马结构是最敏感的区域,而海马 CA1 区与空间辨别及学习记忆关系最为密切^[6]。本研究应用 Morris 水迷宫实验^[7]进行学习记忆能力测试,观察各组大鼠的学习记忆能力。实验结果显示,模型组大鼠平均逃避潜伏期时间延长,跨越平台的次数及在原平台象限停留时间明显减少,与正常对照组及假手术组相比,其差异具有显著性($P < 0.01$, $P < 0.01$),符合 VD 痴呆模型判定标准,提示造模成功。参芎化瘀胶囊治疗组与模型组比较,随时间延长大鼠平均逃避潜伏时间缩短($P < 0.05$, $P < 0.01$);另外,参芎化瘀胶囊治疗组大鼠穿越平台的次数及在原平台象限停留时间均较模型组大鼠增多($P < 0.05$)。表明参芎化瘀胶囊可以改善血管性痴呆大鼠的学习记忆能力。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是真核细胞转导细胞外信号到细胞内引起细胞反应的一类重要信号转导通路。它通过影响基因的转录和调控,进而影响细胞的生物学行为,如细胞增殖、分化、转化及凋亡等^[8]。研究发现,其中 p38 MAPK 信号通路参与了细胞的生长发育及细胞间功能同步等多种生理过程,并与炎症、应激反应的调控密切相关,被认为是细胞信息传递的交汇点和共同通路。Wu 等^[9]利用线栓法制作鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型,用免疫组化和免疫印迹方法研究发现造模后 10min,缺血区的神经元及星形胶质细胞内 p38 MAPK 开始被激活,缺血后 2h 达峰值时。这提示 p38MAPK 可能参与了脑缺血损伤过程的信号转导。李子广等^[8]的研究也表明 p38MAPK 的活化在缺血再灌注性脑损伤中发挥着重要作用。本实验结果显示,与正常组及假手术组相比,模型组海马区 p38MAPK 阳性细胞增多($P < 0.01$)。提示血管性痴呆大鼠大脑受到缺血再灌注损伤刺激后,可能激活 p38 MAPK 通路,使 p38 MAPK 蛋白因子大量表达,说明 p38 MAPK 参与了血管性痴呆大鼠神经元细胞损伤的病理过程。与模型组比较,参芎化瘀胶囊治疗组大鼠海马 CA1 区 p38 MAPK 的表达下降($P < 0.01$),提示参芎化瘀胶囊能够显著降低 VD 大鼠海马 CA1 区 p38 MAPK 的

表达,说明参芎化瘀胶囊可抑制 p38 MAPK 的活化。

我们对 VD 大鼠模型组进行学习记忆能力测定,应用免疫组化 SABC 法检测 VD 大鼠海马 CA1 区 p38MAPK 蛋白表达情况,与正常对照组及假手术组比较,结果表明 VD 大鼠学习记忆能力减退,而海马 CA1 区 p38MAPK 蛋白表达增强,说明 p38MAPK 蛋白表达增强与 VD 大鼠学习记忆能力减退有关。经参芎化瘀胶囊治疗后,血管性痴呆大鼠的学习记忆能力明显改善,而 VD 大鼠海马 CA1 区 p38 MAPK 的表达下降,表明参芎化瘀胶囊能改善 VD 模型大鼠的学习记忆能力,其机制可能与参芎化瘀胶囊能下调 p38 MAPK 的表达,促进损伤神经元的修复有关。

[参考文献]

- [1] 王拥军. 脑血管疾病与认知功能障碍[J]. 中华内科杂志, 2005, 44(11) : 872.
- [2] 刘斌, 姜敏, 张晋霞. 急性脑梗死患者认知障碍的临床特征分析[J]. 山东医药, 2009, 49(33) : 5.
- [3] 王玉良, 周永翠, 王益光, 等. 血管性痴呆大鼠海马

CA1 区神经元超微结构的长时程变化[J]. 潍坊医学院学报, 2008, 30(5) : 389.

- [4] Irving E A, Bamford M. Role of mitogen and stressactivated kinases in ischemic injury [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(6) : 631.
- [5] 王蕊, 杨秦飞, 唐一鹤, 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.
- [6] Holscher C. Time , Space ang hippocampal functions [J]. Rev Neurosci , 2003 , 14 (3) : 253.
- [7] 陈罗西, 郭玲玲, 李亮, 等. Morris 圆形水迷宫的应用及其相关检测指标分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 8(8) : 55.
- [8] 李子广, 吴华璞, 郭梅等. 阿魏酸钠对 MCAO 大鼠缺血/再灌注损伤 p38MAPK 信号通路的影响. [J] 中西医结合心脑血管病杂志, 2009; 7(2) : 193.
- [9] Wu D C, Ye W, Che X M, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases after permanent cerebral artery occlusion in mouse brain. J Cereb Blood Flow Metab. 2000 Sep; 20(9) : 1320.

[责任编辑 聂淑琴]