

● 实验研究 ●

引用:向军军,陈炜,赖菁菁,吴林,胡跃强. 温肺降浊方调节 Nogo-A、NgR 表达对 VaD 大鼠神经元突触重塑的影响[J]. 湖南中医杂志,2023,39(5):138-142.

温肺降浊方调节 Nogo-A、NgR 表达对 VaD 大鼠神经元突触重塑的影响

向军军¹,陈炜¹,赖菁菁¹,吴林²,胡跃强¹

(1. 广西中医药大学第一附属医院,广西 南宁,530023;

2. 广西中医药大学,广西 南宁,530001)

[摘要] 目的:观察温肺降浊方对血管性痴呆(VaD)大鼠 Nogo-A 和 NgR mRNA 及其蛋白表达的影响。方法:将 30 只大鼠随机分为假手术组、模型组、中药组,每组各 10 只。采用双侧颈总动脉永久性结扎方法制作 VaD 大鼠模型,造模成功后中药组予温肺降浊方灌胃,假手术组、模型组予以等量 0.9%氯化钠注射液灌胃,疗程均为 4 周。采用 Morris 水迷宫行为学测试大鼠学习记忆能力;RT-PCR、Western blot 检测各组大鼠 Nogo-A 和 NgR mRNA 及其蛋白表达水平,透射电镜观察神经元突触结构变化。结果:与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期延长、穿越平台次数减少($P<0.01$ 或 $P<0.05$);海马中 Nogo-A 和 NgR 蛋白及 mRNA 表达增多($P<0.01$)。与模型组比较,中药组逃避潜伏期缩短、穿越平台次数增加($P<0.05$);海马中 Nogo-A 和 NgR mRNA 及其蛋白减少($P<0.05$)。海马神经元突触及细胞器完整、突触间隙及小泡正常。结论:温肺降浊方可改善 VaD 大鼠学习记忆能力,其机制可能与降低 Nogo-A 和 NgR mRNA 及蛋白表达含量,促进神经突触再生,改善海马突触可塑性有关。

[关键词] 血管性痴呆;神经元突触可塑;温肺降浊方;Nogo-A;NgR;实验研究

[中图分类号]R285.5 **[文献标识码]**A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2023.05.035

Effect of Wenfei Jiangzhuo prescription on neuronal synaptic plasticity in rats with vascular dementia by regulating the expression of Nogo-A and NgR

XIANG Junjun¹, CHEN Wei¹, LAI Jingjing¹, WU Lin², HU Yueqiang¹

(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi, China;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Wenfei Jiangzhuo prescription on the mRNA and protein expression levels of Nogo-A and NgR in rats with vascular dementia (VaD). Methods: A total of 30 rats were randomly divided into sham-operation group, model group, and traditional Chinese medicine (TCM) group, with 10 rats in each group. Permanent occlusion of both common carotid arteries was performed to establish a rat model of VaD, and after successful modeling, the rats in the TCM group were given Wenfei Jiangzhuo prescription by gavage, while those in the sham-operation group and the model group were given an equal volume of 0.9% sodium chloride injection by gavage, with a course of treatment of 4 weeks for all groups. The Morris water maze was used to assess learning and memory abilities; RT-

基金项目:国家自然科学基金项目(81860842);广西中医药大学研究生教育创新计划项目(YCBXJ2021008);广西高等学校高水平创新团队及卓越学者计划(桂教人才 202006);广西中医脑病临床研究中心项目(桂科 AD20238028)

第一作者:向军军,男,2020 级博士研究生,研究方向:缺血性脑血管病的中医药防治

通信作者:胡跃强,男,教授,博士研究生导师,研究方向:中医内科学,E-mail:137463195@qq.com

PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression levels of Nogo-A and NgR; a transmission electron microscope was used to observe the change in neuronal synaptic structure. Results: Compared with the sham-operation group, the model group had a significant increase in escape latency and a significant reduction in the number of platform crossings ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), as well as significant increases in the protein and mRNA expression levels of Nogo-A and NgR in the hippocampus ($P < 0.01$). Compared with the model group, the TCM group had a significant reduction in escape latency and a significant increase in the number of platform crossings ($P < 0.05$), as well as significant reductions in the protein and mRNA expression levels of Nogo-A and NgR in the hippocampus ($P < 0.01$). Hippocampal neurons had complete synapses and organelles, with normal synaptic cleft and vesicle. Conclusion: Wenfei Jiangzhuo prescription can improve the learning and memory abilities of VaD rats, possibly by reducing the mRNA and protein expression levels of Nogo-A and NgR, promoting neuronal synapse regeneration, and improving hippocampal synaptic plasticity.

[**Keywords**] vascular dementia; neuronal synaptic plasticity; Wenfei Jiangzhuo prescription; Nogo-A; NgR; experimental study

血管性痴呆 (vascular dementia, VaD) 的发病机制尚不完全清楚, 目前认为脑血管病变是导致 VaD 认知障碍的主要环节^[1-2]。而突触可塑性是认知功能的神经生物学基础, 在神经损伤修复以及学习和记忆中起着重要的作用^[3]。最新研究证实, 髓鞘抑制蛋白 Nogo-A 被认为是影响神经轴突再生的关键因素, 抑制其与糖基磷脂酰肌醇相连接的轴突表面蛋白 (NgR) 结合, 可促进轴突再生, 而作用机制可能与抑制其下游 RhoA/ROCK 信号途径, 进而改善海马组织结构及神经元的存活相关, 有助于脑部损伤后脑功能的恢复^[4-6]。

课题组长期致力于 VaD 的中医药研究工作, 并认识到 VaD 的中医病理因素为“痰瘀”之阴邪, 责之于肺肾虚衰, 由此我们提出了从肺论治痴呆的新观点, 凝练出了温肾益肺、祛瘀化痰法 (简称温肺降浊法), 并创制了温肺降浊方^[7-8]。前期研究证实温肺降浊方可抑制促凋亡蛋白表达, 减轻大鼠海马神经组织结构, 改善其认知障碍^[9-10], 而其药理药效机制还有待于进一步阐明。因此, 本研究探讨温肺降浊方对 VaD 大鼠神经元轴突相关基因 Nogo-A 和 NgR 表达及海马组织神经元结构的影响, 阐明该方的神经保护机制, 以期为本病防治提供新思路。

1 实验材料

1.1 动物 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 30 只, 3 月龄, 体质量 (250 ± 50) g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 生产许可证号: SCXK 湘 2019-0004。大鼠自由饮食、饮水, 室温为 60% 湿度的受控环境, 适应性喂养 1 周。本研究已经广西中医药大学伦理委员会批准 (伦理号: DW20211204-196)。

1.2 药物 温肺降浊方: 制附子 20 g, 党参 15 g, 干

姜 10 g, 酒大黄 10 g, 三七 10 g, 炙甘草 10 g。由广西中医药大学第一附属医院药剂科统一采购备用 (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), 中药生药浓度为 0.08 g/ml。

1.3 主要试剂与仪器 主要试剂: Nogo-A 兔多克隆抗体 (Bioass 公司, 批号: AB06291236); NgR 兔单克隆抗体 (Bioass 公司, 批号: OP0307235); 山羊抗兔 IgG HRP (索莱宝公司, 批号: 20164515); RIPA 蛋白裂解液 (索莱宝公司, 批号: 20160307); Trizol 试剂 (simgen, 货号: 5301100); RNA 提取试剂盒 (天漠生物, 货号: TR205-50); 反转录试剂盒 (美国 BI-OMIGA, 货号: RT0213-01)。

主要仪器: PCR 扩增仪 (Applied Biosystems 公司, 型号: 7500); Morris 水迷宫视频分析系统 (上海软隆科技发展有限公司, 型号: BW-MMM101); 凝胶成像仪 (Thermo 公司, 型号: GDS-8000); 水平电泳仪 (北京六一仪器厂, 型号: DYCP-31DN); 半干转膜仪系统 (ATTO 公司, 型号: WSE-4040); EM-1200EX 型透射电子显微镜 (美国 FEI 公司); 大鼠脑立体定位仪 (日本成茂公司)。

2 实验方法

2.1 动物分组 按随机数字表法将 30 只大鼠分成 3 组: 假手术组、模型组、中药组 (温肺降浊方), 每组各 10 只。

2.2 模型制备 采用双侧颈总动脉永久性结扎法制备 VaD 模型^[11]。10% 水合氯醛 (30 mg/100 g) 腹腔注射麻醉, 仰卧固定后颈前部消毒, 沿颈正中切开, 分离出双侧颈总动脉, 以双重丝线结扎。假手术组动物仅行颈前切开, 不结扎颈总动脉。大鼠造

模后第3天进行 Morris 水迷宫行为学测评,以假手术组大鼠逃避潜伏期为参考值,计算其余各组大鼠的逃避潜伏期与参考值之比,若该比值 $>20\%$,则被评定为有认知功能障碍,即造模成功^[12]。

2.3 干预方法 参考《中药药理研究方法学》^[13],依据成人给药量换算得到大鼠给药量,术后第1天中药组开始予以温肺降浊方 $2\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 灌胃。假手术组、模型组灌胃等量 0.9% 氯化钠注射液。1次/d,疗程为4周。

2.4 观察指标

2.4.1 学习记忆能力 1) 定位航行实验:每组大鼠每天上午下午从4个象限各训练1次,将大鼠寻找平台的时间设置为120 s,周期为28 d;第7、14天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。2) 空间搜索实验:大鼠完成定位航行实验后于第7、14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,分别以其跨越原来平台的次数作为空间记忆的检测指标。

2.4.2 大鼠海马 Nogo-A、NgR mRNA 表达 采用 RT-PCR 检测大鼠海马 Nogo-A、NgR mRNA 表达。Trizol 法提取总 RNA,提取完成后检测 RNA 浓度,按照说明书进行逆转录。逆转录后扩增,条件如下: 94°C 预变性 2 min, 94°C 变性 30 s, 48°C 退火 30 s, 72°C 延伸 2 min, 共 40 个循环,最后完成 72°C 总延伸 5 min,取 $5\ \mu\text{l}$ PCR 产物电泳,凝胶成像仪获取图像, $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 对样本基因进行表达差异相对定量分析。(见表1)

表1 引物序列

基因名称	序列	产物长度
β -actin	上游:5'-GCGCAAGTACTCTGTCTGG-3'	159bp
	下游:5'-AGGGTGTAACACG CAGCTCAG-3'	159bp
Nogo-A	上游:5'-TGCAGTGTGATGTGGGTGT-3'	125bp
	下游:5'-CTATCTGCACCTGATGCCGT-3'	125bp
NgR	上游:5'-AATGCAC TCAAGGGACGTGT-3'	212bp
	下游:5'-CTACGGGTGCGGTTCCTTCT-3'	212bp

表2 各组大鼠学习记忆能力比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	逃避潜伏期/s			跨越平台次数/次		
		术前	术后1周	术后4周	术前	术后1周	术后4周
假手术组	10	23.24 \pm 2.53	21.67 \pm 3.57	22.24 \pm 4.59	4.75 \pm 0.73	4.82 \pm 0.80	4.90 \pm 0.84
模型组	10	46.95 \pm 5.01	44.35 \pm 5.23 ^a	42.02 \pm 4.05 ^a	2.15 \pm 0.43	2.12 \pm 0.40 ^b	2.20 \pm 0.39 ^b
中药组	10	45.43 \pm 6.25	41.76 \pm 5.24	36.19 \pm 4.12 ^c	2.50 \pm 0.47	2.73 \pm 0.46	3.56 \pm 0.45 ^c

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与模型组比较,^c $P<0.05$ 。

2.4.3 大鼠海马 Nogo-A、NgR 蛋白表达 采用 Western Blot 检测大鼠海马 Nogo-A、NgR 蛋白表达。按说明书提取大鼠海马组织蛋白;用 BCA 试剂盒测定并调整每个样本蛋白浓度之后上样;连接电泳装置及电源,电压设为 120 V 恒压,1.5 h 后停止电泳;用封闭液[含 5% 脱脂奶粉的磷酸盐缓冲液(PBST)溶液]室温封闭膜 2 h,用新配制的封闭液稀释抗体 4°C 孕育过夜;用封闭液稀释各蛋白一抗对应的二抗,室温下孵育膜 1 h,用 PBST 洗膜,用于图像采集;加 ECL 工作液,在凝胶成像仪下曝光成像,采用凝胶成像分析系统进行图像分析,获取各组 Western blot 条带的平均光密度(OD)值,内参为 β -actin,目的蛋白与内参光密度比值即为目的蛋白的相对值。

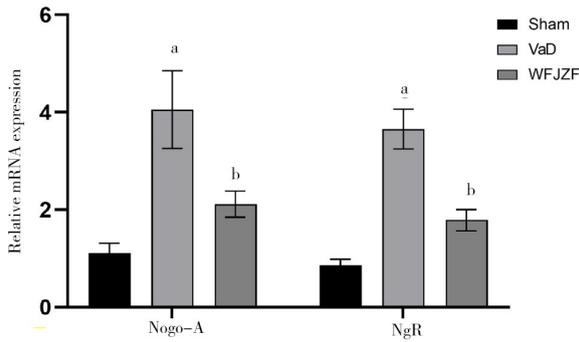
2.4.4 大鼠海马超微结构 采用透射电镜观察海马超微结构。大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后迅速取出脑组织,取 $2\text{ mm}\times 2\text{ mm}\times 2\text{ mm}$ 大小海马区组织 1 块,置于 2.5% 戊二醛预固定,然后入 1% 锇酸继续固定,经 70%、80%、95% 乙醇、无水丙酮脱水,环氧树脂 Epon 812 浸透和包埋,全自动石蜡切片机超薄切片,厚度约 $4\ \mu\text{m}$,3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色,透射电子显微镜观察海马组织的结构变化。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据统计,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠学习记忆能力比较 各组大鼠逃避潜伏期及跨越平台次数术前组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$);术后1周,模型组与中药组2项指示比较差异无统计学意义($P>0.05$),模型组与假手术组比较差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);术后4周,中药组与模型组2项指标比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。(见表2)

3.2 各组大鼠海马 Nogo-A、NgR mRNA 表达比较
与假手术组比较,模型组 Nogo-A、NgR mRNA 表达量升高($P < 0.01$);与模型组比较,中药组 Nogo-A、NgR mRNA 含量下降($P < 0.05$)。(见图 1)



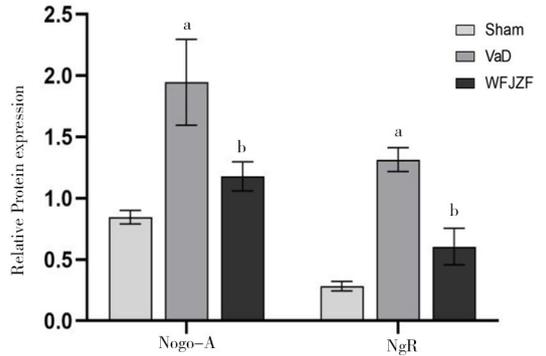
注:Sham—假手术组;VaD—模型组;WFJZF—中药组。与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠海马 Nogo-A、NgR mRNA 表达比较

3.3 各组大鼠海马 Nogo-A、NgR 蛋白表达比较
与假手术组比较,模型组 Nogo-A、NgR 蛋白表达量升高($P < 0.05$);与模型组比较,中药组 Nogo-A、NgR 蛋白表达量下降($P < 0.05$)。(见图 2、3)

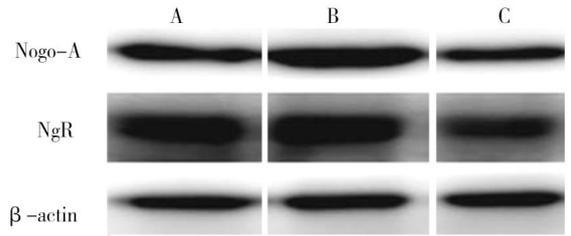
3.4 各组大鼠海马超微结构比较 假手术组突触结构正常且清晰,突触前膜有大量球形突触小泡,可见清晰的线粒体,突触间隙宽度及形态正常,突触后膜厚度正常且均匀;模型组突触形态结构不完整,

细胞器结构不清晰,突触小泡分布零散且形态模糊;中药组突触结构清晰,前膜和后膜形态正常,可见清晰的线粒体结构,突触间隙宽度正常。(见图 4)



注:Sham—假手术组;VaD—模型组;WFJZF—中药组。与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠海马 Nogo-A、NgR 蛋白 OD 值比较



注:A—假手术组;B—模型组;C—中药组。

图 3 各组大鼠海马 Nogo-A、NgR 蛋白电泳图

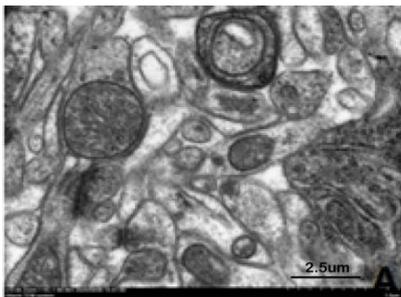


图 4-1 假手术组

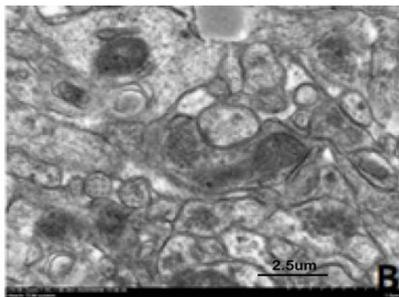


图 4-2 模型组

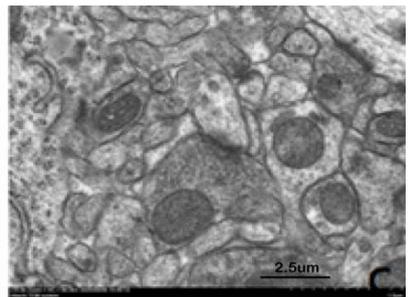


图 4-3 中药组

图 4 各组大鼠海马电镜下超微结构比较(透射电镜,×10000)

4 讨论

VaD 属于中医学“呆病”范畴。《灵枢·本神》记载:“愁忧者,气闭塞而不行。”忧悲过度,必伤于肺,肺气虚损,导致肺的宣降功能失调。《灵枢·天年》中还指出:“八十岁,肺气衰,魄离,故言善误。”肺虚可影响肾的藏精生髓功能,加之患者年老、久病,易致肾精亏损,肾阳不足。《素问·四时刺逆从论》中记载:“阳气竭绝,令人善忘。”阳气衰弱,则肺

气不足,肺失宣降则瘀浊停聚大肠,必然造成脑髓消而出现痴呆症状。因此,我们提出了肺气虚和浊毒蕴结肠道是 VaD 发生发展和演变的重要因素,在此独创性理论的基础上提出了温肺降浊法和温肺降浊方。该方以附子与党参合用,温阳化气,既补益脾肺,更资肺卫宣发之源;干姜助附子温阳,滋肺生精;三七活血化瘀,亦有补益之功;大黄泻下降浊,荡涤肠胃,推陈致新;炙甘草补中缓急,调和药

性。诸药合用,共奏温肺补肾、祛瘀化浊之功。经前期临床实践证实其对 VaD 疗效确切^[14]。由于突触损伤是神经退行性疾病早期的、共同的病理改变,与认知损害联系最为密切^[3]。基于此,我们提出假设:既然温肺降浊方可改善大鼠认知功能,而 Nogo-A 和 NgR 在神经轴突再生及功能重塑中起关键作用,那么本方可能通过调节 Nogo-A、NgR 途径重塑突触结构,保护神经元而改善认知功能。

研究表明,勿动蛋白(Nogo)被确定是中枢神经系统相关的主要轴突髓磷脂相关抑制分子,Nogo-A 完全依赖于 NgR/P75NTR/Lingo-1 膜受体复合物的结合激活 Rho/ROCK 信号通路^[15]。而研究已证实,Rho/ROCK 信号通路作为 3 种抑制蛋白下游的共同信号通路,该通路的激活是神经生长抑制的关键因素^[16],最终能引起细胞骨架的重排和轴突生长的抑制^[17-20]。NgR 作为 Nogo-A 的受体,两者结合后可激活胞内下游靶基因,抑制轴突再生^[4],成为影响神经元生长的关键,是防治 VaD 的关键调控蛋白。本实验研究结果表明,模型组 VaD 大鼠的 Nogo-A 和 NgR mRNA 及蛋白表达均上升,温肺降浊方干预后二者表达均下降;行为学测试也证实该方对大鼠的学习记忆能力有显著改善作用;通过透射电镜观察海马组织超微结构也证实该方能显著改善海马神经突触的结构,这与于倩等^[21]的研究结果一致。

综上所述,我们推测温肺降浊方可能通过下调 Nogo-A 的表达,抑制其与 NgR 的结合,进而抑制下游通路相关蛋白的表达水平,从而促进神经突触的再生及重塑,达到改善海马神经元损伤,减轻认知功能障碍的作用,这可能为本方治疗 VaD 提供新的靶点和理论依据。

参考文献

[1] YUAN M,ZHU H,CHEN J,et al. A novel squaramide compound alleviates cognitive deficits through activation of Akt and Erk1/2 in a rat model of vascular dementia. [J]. J Integr Neurosci,2019,18(4):401-408.

[2] 唐慧,白雪,李双阳. 基于玄府气血理论研究风药组方对血管性痴呆大鼠海马突触兴奋性氨基酸受体的影响[J]. 亚太传统医药,2021,17(3):23-28.

[3] LIU B,LIU JX,ZHANG JX,et al. Effects of autophagy on synaptic-plasticity-related protein expression in the hippocampus CA1 of a rat model of vascular dementia[J]. Neurosci Lett,2019,707:134312.

[4] CHANG J,YAO X,ZOU H,et al. BDNF/PI3K/Akt and Nogo-

A/RhoA/ROCK signaling pathways contribute to neurorestorative effect of Houshiheisan against cerebral ischemia injury in rats[J]. Ethnopharmacol,2016,194:1032-1042.

[5] SCHWAB ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system[J]. Nat Rev Neurosci,2010,11(12):799-811.

[6] LU WZ,CHEN ZW,WEN JY. RhoA/ROCK signaling pathway and astrocytes in ischemic stroke[J]. Metab Brain Dis,2021,36(6):1101-1108.

[7] 唐农,黄立武. 对血管性痴呆从肺论治的思考[J]. 广西中医学院学报,2004,7(4):1-3.

[8] 赖菁菁,向建军,汪庭龙,等. 浅谈温肺补肾方治疗血管性痴呆的理论基础[J]. 湖南中医杂志,2015,31(12):134-135.

[9] 胡跃强,向建军,赖菁菁,等. 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[J]. 中医药通报,2017,16(2):59-62.

[10] 胡跃强,赖菁菁,汪庭龙,等. 温肺降浊方对血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡的影响[J]. 中华中医药杂志,2017,32(4):1804-1807.

[11] ZHANG ZH,SHI GX,LI QQ,et al. Comparison of cognitive performance between two rat models of vascular dementia[J]. INT J Neurosci,2014,124(11):818-823.

[12] 谭子虎,陈延,刘茜,等. 加减薯蓣丸对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区细胞凋亡及 PTEN 信号通路的影响[J]. 中华中医药学刊,2017,35(10):2471-2474.

[13] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006:445.

[14] 胡跃强,唐农,吴林,等. 温肺降浊方联合盐酸多奈哌齐片治疗血管性痴呆的疗效及其机制[J]. 现代中西医结合杂志,2019,28(13):1378-1381.

[15] 李丹东,宋锦宁,庞宏刚,等. Rho/ROCK 通路在大鼠实验性弥漫性轴索损伤中的作用[J]. 西安交通大学学报:医学版,2015,36(1):16-22.

[16] YAMASHITA T. Molecular mechanism and regulation of axon growth inhibition[J]. Brain Nerve,2007,59(12):1347-1353.

[17] DERGHAM P,ELLEZAM B,ESSAGIAN C,et al. Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair[J]. J Neurosci,2002,22(15):6570-6577.

[18] FILBN MT. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS[J]. Nat Rev Neurosci,2003,4(9):703-713.

[19] WANG J,YANG J,MA Y,et al. Nogo-A expression dynamically varies after spinal cord injury[J]. Neural Regen Res,2015,10(2):225.

[20] VILAR M,SUNG TC,CHEN Z,et al. Heterodimerization of p45-p75 modulates p75 signaling: Structural basis and mechanism of action[J]. PLoS Biol,2014,12(8):e1001918.

[21] 于倩,安喆妮. 黄芪甲苷通过 RhoA/ROCK2 通路对脑膜炎大鼠皮层神经元的保护作用[J]. 中医药导报,2021,27(11):12-17.

(收稿日期:2022-11-03)

[编辑:刘珍]