

加味脑泰方对血管性痴呆模型大鼠海马组织 mRNA 表达谱的微阵列分析

易亚乔^{1,2,3}, 余婧萍², 郭艳幸³, 贺春香², 陈易璇¹, 王彦婷¹, 谢丽风¹, 李园园¹, 宋祯彦^{1,2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

3. 河南省洛阳正骨医院, 河南 洛阳 471002

摘要: **目的** 采用微阵列技术分析加味脑泰方干预前后血管性痴呆 (VD) 模型大鼠海马组织 mRNA 表达谱, 以探究其治疗 VD 的分子机制。 **方法** 采用双侧颈总动脉结扎术制作 VD 大鼠模型, 给予加味脑泰方治疗 30 d, HE 染色和水迷宫实验评价治疗效果, Agilent mRNA 表达谱芯片获取加味脑泰方干预前后 VD 模型大鼠海马组织 mRNA 表达数据, 微阵列分析筛选显著差异表达的基因, 构建蛋白与蛋白相互作用 (PPI) 网络, GO 和 Pathway 富集分析差异基因主要参与的生物学过程和信号通路, 利用免疫组化和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证芯片分析结果。 **结果** HE 染色和水迷宫实验显示 VD 大鼠呈现脑缺血、海马神经细胞损伤、空间学习记忆能力下降, 加味脑泰方可以部分逆转该现象。微阵列技术分析筛选出加味脑泰方干预前后差异表达的基因 469 个, 其中上调 180 个, 下调 289 个, IL6、FGF2、TNF、IL1b 等可能是其治疗 VD 的主要药效靶点, 免疫组化和 qRT-PCR 验证了该分析结果。GO 和 Pathway 富集分析显示, 这些基因与炎症反应、凋亡过程等生物学过程密切相关, 主要参与了 TNF 信号通路、Toll 样受体信号通路、细胞凋亡途径等的调控。 **结论** 加味脑泰方对 VD 模型大鼠的治疗作用是多基因多途径共同参与调控的过程, 抑制海马神经炎症可能是其抗 VD 的重要机制之一。

关键词: 加味脑泰方; 血管性痴呆; 微阵列分析; 炎症; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)24-6064-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.022

Differential mRNA expression profiles of supplemented Naotaifang in vascular dementia rats by microarray analyses

YI Ya-qiao^{1,2,3}, YU Jing-ping², GUO Yan-xing³, HE Chun-xiang², CHEN Yi-xuan¹, WANG Yan-ting¹,
XIE Li-feng¹, LI Yuan-yuan¹, SONG Zhen-yan^{1,2}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Key Laboratory of Hunan Province for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital of Henan Province, Luoyang 471002, China

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of the supplemented Naotaifang (sNTF) in the treatment of vascular dementia (VD), and the mRNA expression profiles of hippocampal tissue of VD model rats before and after the intervention of modified sNTF were investigated by microarray analysis. **Methods** VD model was established by bilateral common carotid artery ligation. VD rats were treated with sNTF for 30 days. HE staining and Morris water maze were used to evaluate the therapeutic effect of sNTF. The mRNA expression profiles data of VD model rats before and after intervention of sNTF were obtained by Agilent mRNA expression chip. The significantly differentially expressed genes were screened by microarray analysis, and the protein-protein interaction (PPI) network was constructed. The biological processes and signaling pathways in which differentially expressed genes were mainly involved and analyzed by GO and pathway enrichment. Immunohistochemistry and qRT-PCR were used to verify the chip analysis results. **Results** HE staining and Morris water maze experiments showed that VD rats showed cerebral ischemia, hippocampal

收稿日期: 2019-07-09

基金项目: 中国博士后科学基金面上资助项目 (2018M632972); 湖南省自然科学基金资助项目 (2019JJ50441); 湖南省自然科学基金资助项目 (2019JJ50434); 湖南省教育厅资助科研项目 (18A206, 18B246); 湖南省中医药科研计划项目 (201822, 201825); 湖南中医药大学校级科研基金 (2017XJJ09); 湖南中医药大学大学生研究性学习和创新性实验计划课题 (2018017, 201705)

作者简介: 易亚乔, 博士, 副教授, 从事中西医结合防治心脑血管疾病基础研究。Tel/Fax: (0731)88458257 E-mail: 375248683@qq.com

***通信作者** 宋祯彦 Tel/Fax: (0731)88458257 E-mail: songzhenyan2013@hnu.edu.cn

neuron damage, and decreased spatial learning and memory function, but sNTF can partially reverse this trend. 469 differential expression genes were screened by microarray analysis, including 180 up-regulated genes and 289 down-regulated genes. IL6, FGF2, TNF, and IL1b may be the main pharmacodynamic targets of sNTF in the treatment of VD rats, and the results were verified by immunohistochemistry and qRT-PCR. GO and pathway enrichment analysis showed that these genes were closely related to biological processes such as inflammation and apoptosis, and these genes were mainly involved in the regulation of TNF signaling pathway, toll-like receptor signaling pathway and the apoptosis pathway. **Conclusion** The results suggested that the therapeutic effect of DSS on AD involves multiple genes and pathways, and inhibition of hippocampal neuroinflammation may be one of the important mechanisms of its anti-VD.

Key words: supplemented Naotaifang; vascular dementia; microarray analyses; inflammation; apoptosis

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是由于缺血性、出血性脑卒中等多种脑血管病变导致的认知功能障碍综合征^[1-2]。随着人口老龄化加剧, VD 呈逐年上升趋势, 并成为继阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 之后第 2 种常见的痴呆类型^[3-4]。目前, VD 发病机制尚未完全阐明, 西医干预主要从改善脑微循环、促进细胞代谢及保护脑细胞等方面着手, 多数用药沿用 AD 的治疗药物, 然而其远期疗效不甚理想, 具有副作用大、易复发、患者治疗依从性差等诸多缺憾^[5]。中药立足整体、辨证论治, 在 VD 等慢性疾病的防治中已显示出独特的优势, 可对其进行多途径、多环节、多靶点调节^[6-7]。

加味脑泰方由补阳还五汤化裁而成, 由黄芪、当归、川芎、地龙、石菖蒲、三七、远志 7 味药物组成。VD 的预后与引起血管损害的基础疾病和颅内血管病灶的部位有关, 通过改善脑循环、预防脑血管病复发可减轻症状、防止病情进一步恶化^[8]。本课题组前期研究已经证实脑泰方有较好的抗脑缺血作用, 能减少脑缺血动物模型的脑梗死面积, 改善脑缺血后神经功能障碍^[9], 促进血管新生^[10]和抑制神经细胞凋亡^[11]等途径有效改善脑缺血后神经元损伤, 且发现加味脑泰方也能改善 VD 大鼠学习记忆能力^[12], 但其改善 VD 的具体机制还有待进一步深入研究。本实验拟采用双侧颈总动脉结扎法 (2-VO) 复制 VD 大鼠模型, 采用微阵列分析技术探讨加味脑泰方对 VD 模型大鼠海马神经元的保护作用及其分子机制。

1 材料

1.1 实验动物

SD 大鼠购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2013-0004, 共计 120 只, SPF 级, 雄性, 体质量 250~300 g, 饲养于湖南中医药大学实验动物中心。饲养环境为室温 (24±1) °C, 相对湿度 (50±5) %, 12 h/12 h

昼夜交替, 自由饮水、摄食, 适应性饲养 2 周后开始实验。整个实验程序通过湖南中医药大学伦理委员会批准。

1.2 药品

加味脑泰方取补阳还五汤之意加减化裁而成, 由黄芪、川芎、地龙、当归、石菖蒲、三七、远志组成, 药材购自湖南中医药大学附属第一医院药料科。由湖南中医药大学刘林副教授鉴定均为《中国药典》2015 年版规定的正品。

1.3 仪器与试剂

赛默飞石蜡切片机 (Thermo Scientific 公司); 麦克奥迪显微成像系统 (Motic 公司); CFX96 Real-time PCR 系统 (Bio-Rad 公司); RE-5002 旋转蒸发器 (瑞德仪器设备有限公司); SMART 3.0 小动物行为学视频采集与分析系统 (Panlab 公司); 2% TTC 染色液 (索莱宝公司); TRIzol (Invitrogen 公司); 逆转录 cDNA 试剂盒、SYBR 染料 (TaKaRa 公司); 白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司); 通用二步法检测试剂盒 (小鼠/兔增强聚合物法检测系统, 北京中杉金桥生物技术有限公司); 所用引物由上海生工生物有限公司根据 NCBI 检索的核酸序列设计合成。

2 方法

2.1 药品制备

将加味脑泰方 7 种药材混合, 放入 5 倍体积蒸馏水中浸泡 2 h, 武火煮沸 0.5 h, 文火慢煎 1 h。然后收集滤液, 用 3 倍体积蒸馏水按上述步骤再次提取滤液, 2 次滤液混合后采用旋转蒸发器浓缩中药水提液, 最终药物质量浓度为 5.1 g/mL (每毫升水提液相当于 5.1 g 生药^[13])。HPLC 检测黄芪甲苷质量分数 >0.04%。

2.2 分组

前期研究^[12,14]结果表明加味脑泰方 34 g/kg (以

生药量计算)干预对 VD 模型大鼠学习记忆能力改善效果最佳,因此本实验选取 34 g/kg 为给药剂量。将 60 只合格大鼠分成假手术组、模型组和加味脑泰方干预组,每组 20 只。除假手术组外共 40 只大鼠采用双侧颈总动脉结扎术制备 VD 模型,剔除造模和给药过程中死亡及水迷宫实验中造模不成功大鼠,最后每组纳入统计的大鼠不少于 8 只。根据水迷宫测试结果在模型组和加味脑泰方组中各挑选 3 只送公司做基因芯片实验。剩余大鼠每组纳入 5 只用于病理形态和分子生物学检测的统计分析。

2.3 模型制备与给药

采用双侧颈总动脉结扎术制作 VD 模型:大鼠术前禁食 12 h,禁水 4 h,10%水合氯醛麻醉,钝性分离颈部肌肉,暴露双侧颈总动脉,用 4.0 号手术缝线双重结扎颈总动脉,缝合切口,消毒保温饲养。假手术组大鼠只分离血管,不结扎颈总动脉。Morris 水迷宫实验评价模型,逃逸潜伏时间明显延长的模型大鼠视为模型成功纳入后续实验。造模后 1 周加味脑泰方组大鼠 ig 给药 34 g/kg,连续给药 30 d,假手术组、模型组大鼠 ig 给予等剂量生理盐水。

2.4 Morris 水迷宫实验

Morris 水迷宫实验参照 Cheng 等^[15]的方法。主要步骤如下:在充满水的圆形水池中将逃生平台隐藏在水位以下 1 cm。大鼠被放入水池游泳,直到其找到 1 个隐藏的平台,或者 60 s 后将其引导到平台上,停留 10 s。连续 5 d 每天记录 4 次逃逸时间。在采集阶段结束的最后 1 天,通过移除平台,在 60 s 的测试中,记录大鼠寻找先前正确象限的时间。2 h 后,放置高出水面 1 cm 的逃生平台进行可见平台实验。

2.5 组织处理和病理形态实验

2.5.1 组织处理 大鼠末次给药后 2 h 断头取材,预冷的生理盐水灌注取出脑组织。TTC 染色取新鲜脑组织;HE 染色用 4%多聚甲醛固定 4 ℃保存;Agilent mRNA 表达谱芯片实验、Western blotting 和 qRT-PCR 实验取新鲜脑组织放入冻存管液氮速冻保存待用。

2.5.2 HE 染色 固定好的脑组织石蜡切片行冠状位切片,切片厚度为 4 μm,烘片,脱蜡,蒸馏水冲洗 1 min。入苏木素染色液中浸染 5 min,蒸馏水稍洗,盐酸乙醇分化,水洗,蒸馏水返蓝,入梯度乙醇脱水,二甲苯透明,加盖玻片,中性树胶封片。

2.5.3 免疫组织化学实验 石蜡切片载于防脱玻片上,烘片,脱蜡、复水。磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,微波抗原修复,3% H₂O₂ 封闭 5~10 min 去除

内源性过氧化物酶,一抗(1:200)4 ℃孵育过夜,二抗(1:1 000)37 ℃孵育 1 h,DAB 显色,苏木精复染,自来水冲洗,PBS 返蓝 5 min,脱水透明,中性树胶封片。随机取 5 个视野,采用 Motic 图像分析系统测定其平均吸光度(A)值。

2.6 Agilent mRNA 表达谱芯片实验

将新鲜取材的大鼠海马组织,快速剥离海马,分别放入 1.5 mL EP 管中,用纱布包裹后,-70 ℃液氮速冻后置于足量干冰中,寄至北京博奥晶典生物技术有限公司进行 mRNA 的抽提纯化与检测,检测合格的 RNA 进行 Agilent mRNA 芯片杂交,并进行图像扫描和数据分析,得到两组间的 mRNAs 差异表达信息。

2.7 蛋白与蛋白相互作用(PPI)网络分析

PPI 网络是从生物化学、信号转导和遗传网络的角度来可视化构建蛋白与蛋白之间的相关性,能更好地理解基因编码的蛋白直接或间接的参与细胞的生物学功能^[16]。本研究利用基因/蛋白质相互作用检索工具在线数据库 STRING(<https://string-db.org/>)获取差异基因编码蛋白的 PPI 网络数据(score≥0.9)^[17],并使用 Cytoscape-v3.6.1 构建可视化 PPI 网络图。

2.8 基因本体(GO)分析和通路分析

使用在线基因功能分类工具 DAVID 6.8(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)^[18]和 KEGG 通路注释公共数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>)^[19]进行 GO 富集分析和通路(pathway)富集分析,分析差异表达基因的功能^[20]。本研究以 $P<0.05$ 和错误发现率(FDR)<0.05 为阈值,满足这一条件的 GO 条目和通路被定义为差异基因在给定基因集中显著富集的 GO 条目和通路。并使用 Omicshare 生物信息学分析平台(<http://www.omicshare.com>)构建高级气泡图。

2.9 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

使用 TRIzol 法提取大鼠海马组织总 RNA,按照逆转录 cDNA 试剂盒说明书将总 RNA 逆转录成 cDNA。采用 SYBR 染料法使用 CFX96 Real-time PCR 系统按照试剂盒说明书所述方法进行 qRT-PCR 分析,具体引物见表 1。

2.10 数据统计

采用 Prism GraphPad 6.0 统计分析软件进行数据统计分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组比较采用 t 检验,重复测量采用单因素方差分析。将差异倍数(fold change, FC)≥1.5, $P<0.05$ 设为阈值筛选差异表达 mRNA。

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

基因	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
Rdh7	AGTGTGCTGGATGTGAACCT	TGGTGCTGGCGATGTTGA
Apold1	CCTGTTGCGAAGTCCTGAGA	CACACCTGGCTGGAGATGAA
Ddit4	GTTGGCATCAGTTCGCTCAC	AGAGGAAGAGGAGGACGAGAA
Esm1	GACCACGCTCCTGATTCTCT	GTCATCCAGCACTGTCCTCT
Liph	CACCAGATGTCCGTCTTCTCT	CTCCAGTTGTTCAGCATAGTAGC
Il1b	ACAGCAGCATCTCGACAAGAGC	CCACGGGCAAGACATAGGTAGC
Tnf	TGGGCTCCCTCTCATCAGTTCC	GCTCCTCCGCTTGGTGGTTTG
GAPDH	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	TGATGGCAACAATGTCCACT

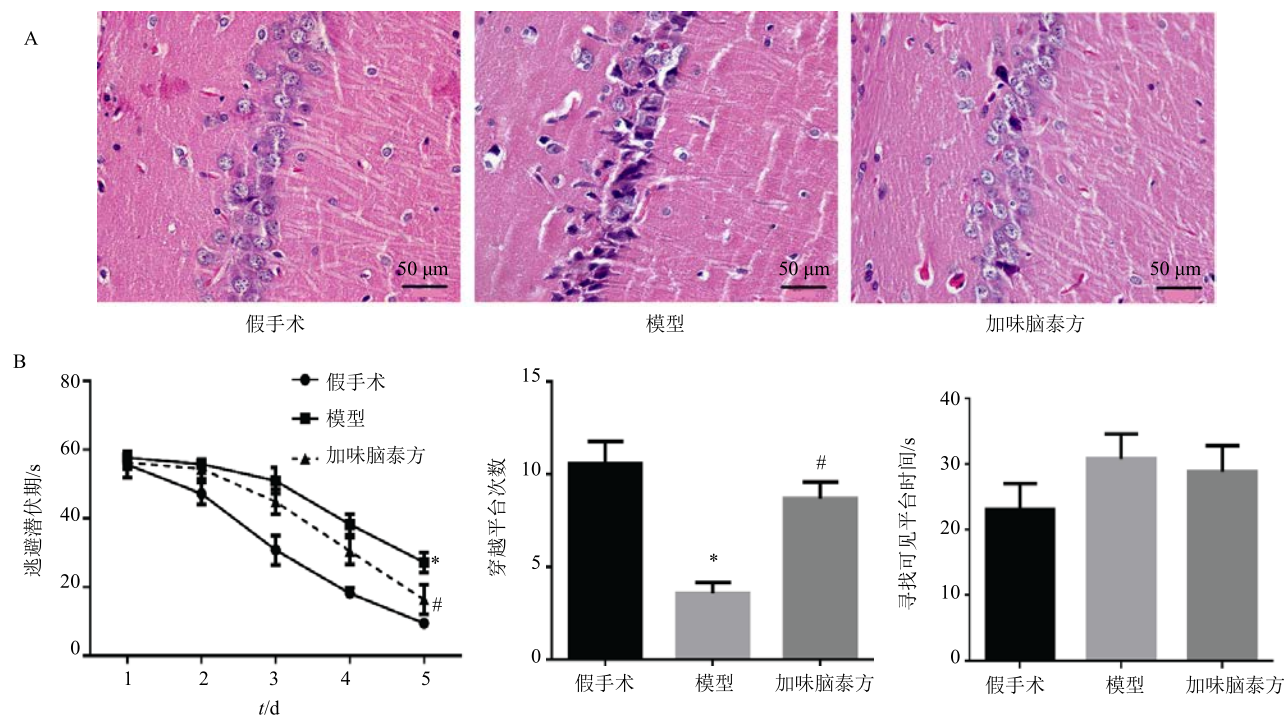
3 结果

3.1 加味脑泰方对 VD 大鼠学习和记忆能力的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠出现不同程度的精神萎靡和行为迟缓, 体表毛枯暗变稀疏, 失去光泽。HE 检测结果显示, 与假手术组比较, VD 模型大鼠海马神经元锥体细胞稀疏、排列松散且不规则, 细胞间距增宽, 锥体细胞胞核固缩且体积变小 (图 1-A)。水迷宫实验结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠逃避潜伏期延长, 撤出平台后穿越平台次数明显减少, 寻找可见平台时间无差异 (图 1-B)。

提示 VD 大鼠呈现脑缺血、海马神经细胞损伤、空间学习记忆能力下降等 VD 典型症状。

与模型组比较, 加味脑泰方组大鼠行为、活动有所恢复, 毛发光泽度有所增加。HE 染色显示加味脑泰方干预后大鼠海马神经元锥体细胞排列相对较整齐, 细胞间隙变小, 细胞胞核增大, 核仁清晰 (图 1-A)。水迷宫实验显示, 与模型组比较, 加味脑泰方干预后 VD 大鼠逃避潜伏期显著减少, 撤出平台后穿越平台次数明显增加, 寻找可见平台时间无差异 (图 1-B)。说明加味脑泰方对海马神经元损伤有一定



A-HE 染色结果 B-Morris 水迷宫测试结果 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, 下图同

A-HE staining results B-Morris water maze test results * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group, same as below figures

图 1 加味脑泰方对 VD 大鼠学习和记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effect of sNTF on learning and memory function in VD rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

的保护作用且能改善 VD 大鼠的学习和记忆损伤。

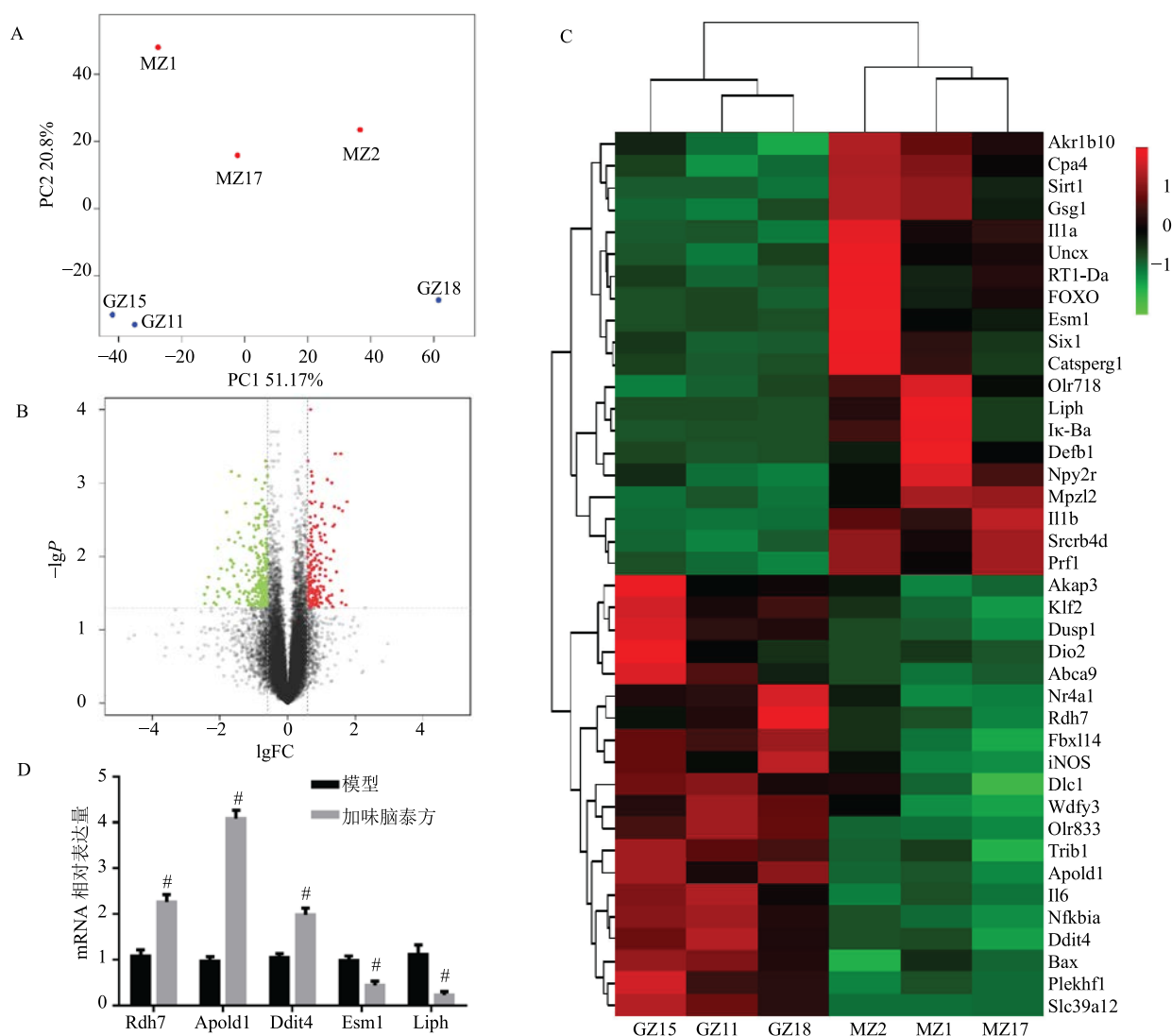
3.2 加味脑泰方组与模型组大鼠的差异表达 mRNA 分析

采用 Agilent mRNA 表达谱芯片检测加味脑泰方组和模型组大鼠的 mRNA 表达谱。通过对样本主成分分析 (PCA) 反映样本相似度, PCA 结果显示总体方差贡献率为 51.17%。药物干预组数据相对聚集 (GZ18 除外), 模型组数据相对发散 (图 2-A)。通过对 2 组基因芯片数据分析, 筛选出差异表达的 mRNA 共 469 个, 其中上调 180 个, 下调 289 个, 其中上调最高的为 Slc39a12 (FC=3.874), 下调最高的为 Liph (FC=5.986)。差异表达的 mRNA 火

山图见图 2-B, 上调和下调 TOP20 的差异表达 mRNA 聚类热图见图 2-C。为了验证基因芯片分析结果的准确性, 从差异表达的 mRNA 中随机选择 5 个 mRNA 使用 qRT-PCR 进行表达检测 (图 2-D)。通过比较, 发现 qRT-PCR 结果与 mRNA 芯片表达谱结果相似。

3.3 差异表达基因的 PPI 网络构建及功能分析

差异表达基因的 PPI 网络构建及功能分析结果见图 3。将 469 个差异表达的基因导入到 STRING 数据库获取这些基因的 PPI 网络 (图 3-A), 排除部分非编码基因和 lncRNA 等未获得蛋白相互作用信息外, 共有 174 个基因编码的蛋白之间存在 351 种



A-主成分分析 B-差异 mRNA 的火山图 C-差异表达 mRNA 的聚类热图 D-5 个差异表达的 mRNA 的 qRT-PCR 验证

A-principal components analysis B-volcanic map of differentially expressed mRNAs C-cluster heatmap of differentially expressed mRNAs D-qRT-PCR validation of 5 differentially expressed mRNAs

图 2 加味脑泰方干预前后 VD 大鼠海马中 mRNA 的表达差异分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Analysis of differentially expressed mRNA in hippocampus of VD rats before and after intervention of sNTF ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

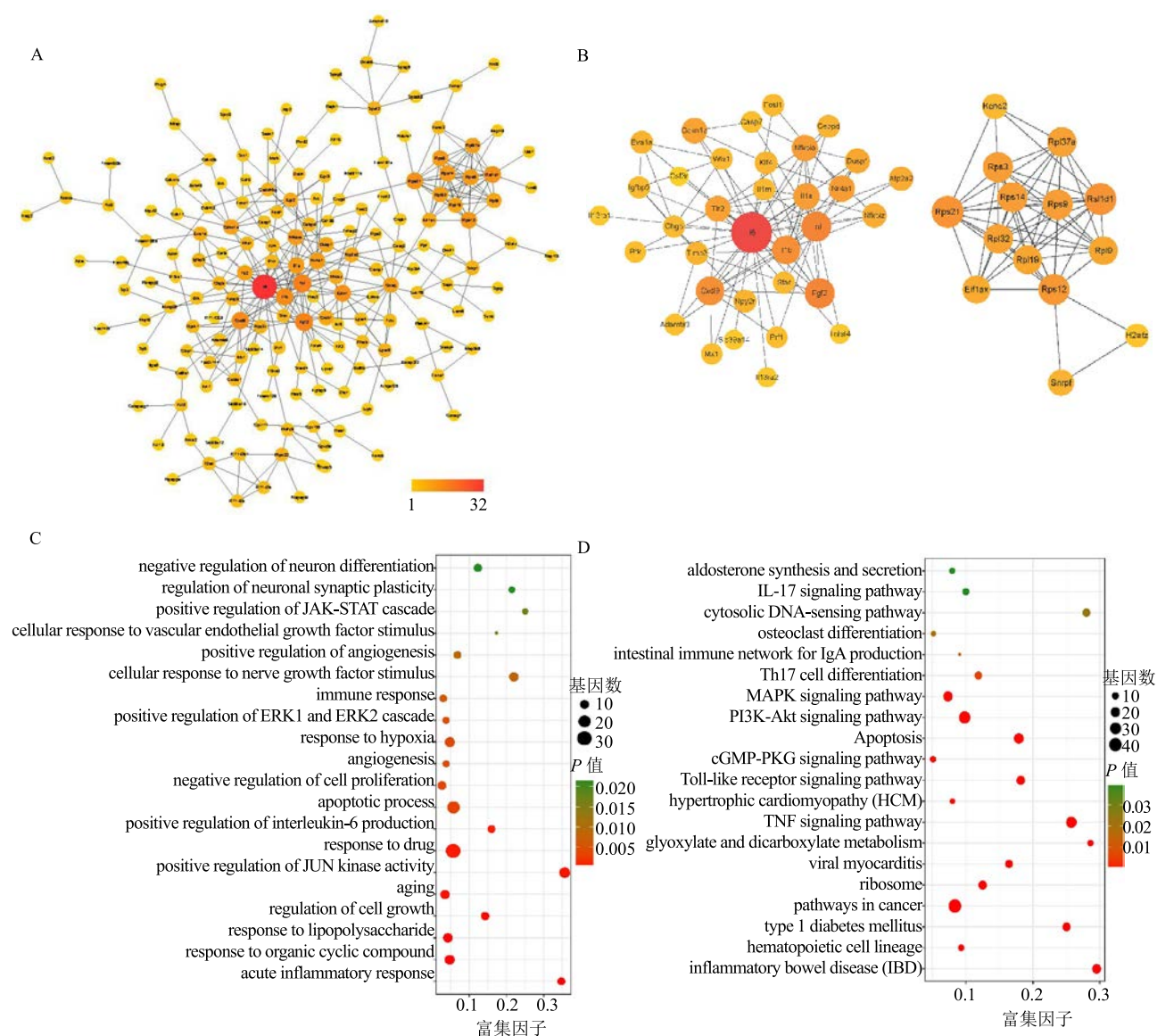


图 3 差异表达基因的 PPI 网络构建及功能分析
A-差异基因的 PPI 网络, 其中圆形节点代表蛋白作用靶点, 圆圈大小和颜色深浅代表靶点蛋白相互作用的数量 B-差异基因 PPI 网络的拓扑模块分析 C-差异表达基因的 GO 富集分析 (生物学过程) D-差异表达基因的通路富集分析; y 轴代表富集条目, x 轴表示富集基因占该条目的比例, 圆圈大小代表富集的基因数, 颜色代表 P 值, $P < 0.05$, $FDR < 0.05$

A-PPI networks of differential genes; The circular nodes represents the protein targets, and the circle size and color depth represent the number of protein and protein interactions B-Topological analysis of PPI network C-GO enrichment analysis of differentially expressed genes (biological process) D-pathway enrichment analysis of differentially expressed genes; y-axis represents pathway terms, x-axis shows the percentage of genes in total genes of pathway terms; The circle size represents the number of genes, the color represents the P value, $P < 0.05$, $FDR < 0.05$

图 3 差异表达基因的 PPI 网络构建及功能分析

Fig. 3 PPI network construction and functional analysis of differentially expressed gene

相互作用关系。网络中根据每个蛋白相互作用关系的多少来确定节点的大小和颜色深度, 其中处于网络中心拥有最多相互作用的蛋白为 Il6 (degree = 32), 其次为 Fgf2 (degree = 17) 和 Tnf (degree = 17)、Il1b (degree = 15)。对 PPI 网络中的基因进行 GO 和通路富集分析描述这些基因在疾病发生发展

中参与的生物学过程。GO 富集结果表明加味脑泰方干预后主要影响了急性炎症反应、衰老、JUN 激酶活性的正调控、凋亡过程、血管生成、缺氧反应、细胞对神经生长因子刺激的反应等生物学过程 (图 3-C), 通路富集分析显示这些基因主要参与了 TNF 信号通路、Toll 样受体信号通路、cGMP-PKG 信号通

路、细胞凋亡途径、PI3K-Akt 信号通路和 MAPK 信号通路 (图 3-D)。同时利用 STRING 数据库的 kmeans_clusters 功能对网络进行拓扑模块 (Cluster) 分析, 获得 2 个重要的拓扑模块 (图 3-B)。其中 Cluster1 处于 PPI 网络中心, 可能是加味脑泰方治疗 VD 大鼠的重要药效途径, 主要与凋亡途径、调节炎症和免疫信号通路 (NOD-like receptor signaling pathway、Toll-like receptor signaling pathway、TNF signaling pathway) 密切相关, 而 Cluster2 主要与核糖体、核蛋白转运及细胞对神经生长因子刺激的反应有关。

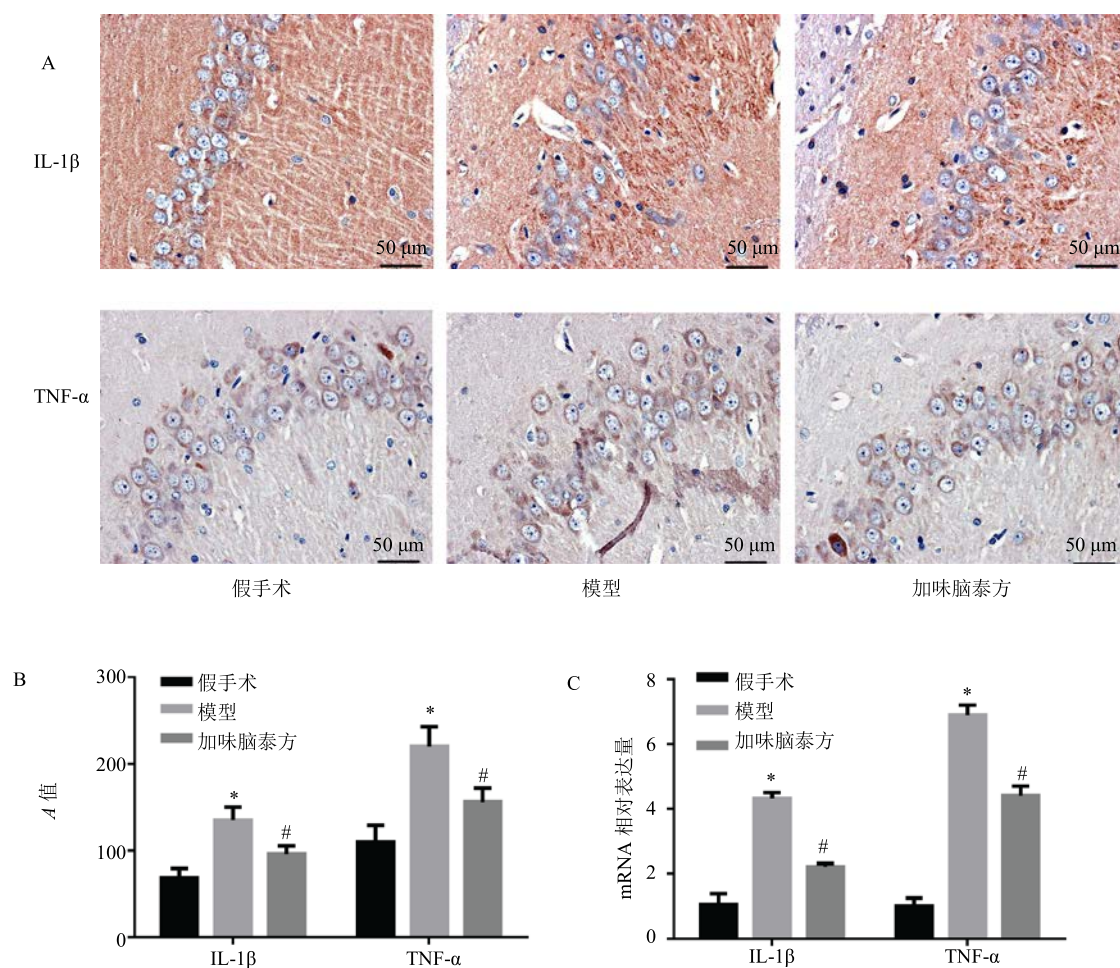
3.4 加味脑泰方对 VD 大鼠海马区 IL-1 β 和 TNF- α 表达的影响

基因芯片分析结果表明加味脑泰方对 VD 大鼠的治疗作用与调节炎症反应相关, 采用免疫组化

学检测细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 在海马区的表达情况。结果 (图 4) 表明, 与假手术组比较, 模型组大鼠海马区炎性细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 而加味脑泰方能抑制其在大鼠海马区的异常表达 ($P < 0.05$)。与免疫组化结果一致, qRT-PCR 结果显示, 与对照组比较, 模型组 IL-1 β 、TNF- α mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 而加味脑泰方逆转了这一趋势 ($P < 0.05$)。

4 讨论

VD 好发于中风之后, 属中医“痴呆”“善忘”等范畴, 病机特点为本虚标实, 病位在脑, 五脏气血亏虚为本, 痰瘀阻络为标, “虚、瘀、痰”是其重要的病因病机^[21]。年老气衰, 气虚行血无力, 可致气虚血瘀、脑络痹阻、脑髓失养发为痴呆。瘀阻脑



A-各组大鼠海马区 IL-1 β 、TNF- α 免疫组化染色结果 B-IL-1 β 和 TNF- α 免疫组化染色结果的统计分析 D-各组大鼠海马区 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达水平

A-immunohistochemistry (IHC) results of IL-1 β and TNF- α in the hippocampus of rats in each group B-IHC statistical analysis of IL-1 β and TNF- α C-expressions of IL-1 β and TNF- α mRNA in the hippocampus of rats in each group

图 4 加味脑泰方对 VD 大鼠海马区 IL-1 β 和 TNF- α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of sNTF on expression of IL-1 β and TNF- α in hippocampus of VD rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

络则发为痴呆,古代医家早有认识,《素问·调经论》云:“血并于下,气并于上,乱而善忘”。《类证治裁》云:“若血瘀于内,而善忘如狂”,明清医家认识到“中风后善忘”。痰浊阻窍是发生痴呆的另一重要病机,故陈无择专立“呆病门”,提出“治呆无奇法,治痰即治呆”。因此,“气虚、血瘀、痰阻”是VD的病机关键,益气活血祛痰法是治疗VD的重要治法。加味脑泰方依据VD“虚、瘀、痰”的核心病机及前期文献研究组方^[12],由黄芪、当归、川芎、地龙、石菖蒲、三七、远志组成,该方以黄芪为君、当归为臣,川芎、地龙等为佐药,全方共奏益气活血、化痰祛瘀之功效。加味脑泰方源于可以治疗VD的“补阳还五汤”之加减^[22],加味脑泰方保留补阳还五汤的君药黄芪、臣药当归、佐药川芎与地龙,根据中医学主证主方的原则,加味脑泰方应具有防治VD的作用。现代药理学研究也发现三七^[23]、石菖蒲^[24]、远志^[25]能显著改善VD大鼠脑缺血和学习记忆功能,这为开展加味脑泰方治疗VD提供依据。

慢性脑缺血是导致VD发病的重要病理过程。目前血管阻断法制作VD大鼠模型的方法有两血管阻断法、三血管阻断法、四血管阻断法。四血管阻断法结扎双侧颈动脉,同时烧灼双侧椎动脉,因手术复杂、梗死部位不稳定、个体差异较大、创伤大、时间长、死亡率过高使其应用受限,常用于一些特殊领域的研究^[26]。三血管阻断法采用先电凝基底动脉再夹闭双侧颈总动脉制备VD模型,但因电凝基底动脉时,极易伤及延髓,操作难度大,手术创伤严重等缺点。双侧颈总动脉永久性结扎术(2-VO法)是指分离出大鼠双侧颈总动脉后将其永久性结扎,造成慢性脑低灌注状态,从而使脑组织尤其是易损区域(如海马、皮层等)产生缺血缺氧性损伤,导致渐进性VD的发生^[27],模拟了慢性脑灌注不足这一VD发病的主要病因,且其操作简单、可重复性好,造模前后大鼠学习记忆能力明显降低,痴呆症状分布均匀,因而被广泛用于VD研究。

为了更好地理解中医药整体、辨证论治的诊疗特点,并对加味脑泰方治疗VD的多途径、多环节、多靶点调节的深入研究,本实验使用基因芯片技术研究了加味脑泰方干预前后VD大鼠中的mRNA表达谱。基因芯片数据分析共筛选出差异常表达的mRNA 469个,其中上调180个,下调289个。随机选择了一些差异表达基因进行qRT-PCR检测,结果与基因芯片结果表达差异基本一致,证明了基因

芯片数据的可靠性。对归一化后的基因芯片表达谱数据的聚类分析、相关性分析、PCA等可以作为样本质量、分组预期和离群样本辨别的参考^[28-29]。聚类热图结果提示,加味脑泰方干预前后的实际聚类情况与预期基本相符,组内样本基因表达情况基本一致,具有较高的组间可比性。PCA结果显示加味脑泰方干预前后2组样本有明显的区分,说明加味脑泰方的治疗对VD模型大鼠的基因表达具有一定的影响,但其影响也具有明显的个体差异性。造成该结果的原因可能与各组送检样本数量偏少、大鼠的个体差异以及造模时的操作误差有关。

研究表明VD与神经炎症密切相关,Belkhef等^[30]观察了VD患者的大脑海马组织,发现存在新生血管化、神经炎症,主要表现为高表达的TNF- α 、IL-1 β 、转化生长因子- β (TGF- β)且与TLR4/RelA信号通路相关。炎症和小胶质细胞的活化释放的细胞因子和趋化因子可诱导白细胞和巨噬细胞炎症浸润,释放大量的促炎和细胞毒性物质:活性氧(ROS)、活性氮物种(RNS)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧化酶-2(COX-2)和各种基质金属蛋白酶诱导神经元和神经胶质细胞死亡以及血脑屏障破坏,从而导致VD的发生^[31-33]。本实验对加味脑泰方干预前后的基因芯片分析结果发现加味脑泰方的干预作用主要与炎症反应、衰老、凋亡、血管生成和细胞对神经生长因子的刺激等生物学过程相关,其核心调控网络主要参与凋亡、炎症和免疫信号通路,处于PPI网络中心的Il6、Fgf2、Tnf和Il1b可能是其重要的药效靶点。从一定程度上说明加味脑泰方改善VD认知功能障碍的机制也与抑制神经炎症密切相关。通过qRT-PCR和免疫组织化学技术检测了IL-1 β 和TNF- α 在海马区的表达变化,证实了加味脑泰方可以通过抑制神经炎症保护VD的神经元损伤。

综上所述,本实验分析了加味脑泰方干预前后VD模型大鼠海马中mRNA的表达谱数据,获取了一些与加味脑泰方治疗VD疗效相关的潜在生物标志物和可能作用途径,为进一步研究加味脑泰方治疗VD作用机制的实验研究和临床研究提供思路。

参考文献

- [1] Grinberg L T. Vascular dementia: Current concepts and nomenclature harmonization [J]. *Dement Neuropsychol*, 2012, 6(3): 122-126.
- [2] Román G C, Erkinjuntti T, Wallin A, et al. Subcortical ischaemic vascular dementia [J]. *Lancet Neurol*, 2002,

- 1(7): 426-436.
- [3] Mori E. How Treatable is vascular dementia? [J]. *Brain Nerve*, 2016, 68(4): 441-450.
- [4] Zhang X, Su J, Gao C, *et al.* Progression in vascular cognitive impairment: Pathogenesis, neuroimaging evaluation, and treatment [J]. *Cell Transplant*, 2019, 28(1): 18-25.
- [5] Korczyn A D. Drugs for vascular dementia [J]. *Lancet Neurol*, 2007, 6(9): 749-751.
- [6] 杨梦琳, 张运辉, 伍大华. 中药复方防治血管性痴呆的实验研究进展 [J]. 中医药信息, 2019, 36(4): 113-116.
- [7] 徐再宁, 谭文澜, 刘凯模, 等. 血管性痴呆中医治疗研究进展 [J]. 实用中医药杂志, 2019, 35(6): 760-761.
- [8] Schneider L S. Reduce vascular risk to prevent dementia [J]. *Lancet*, 2016, 388(10046): 738-740.
- [9] 宋祯彦, 周 瑜, 王珊珊, 等. 中药脑泰方对大鼠脑缺血后 VEGF 和 Angiopoietins 表达的实验研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(1): 19-22.
- [10] 陈 敏, 朱惠斌, 葛金文, 等. 脑泰方对脑缺血再灌注大鼠血管新生作用的实验研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(1): 12-15.
- [11] 石咏梅, 马英民, 廖 君, 等. 内质网应激 PERK 通路在脑泰方提取物保护局灶性脑缺血大鼠海马神经元中的作用 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(22): 5512-5515.
- [12] 易亚乔. 血管性痴呆中医理论探讨及益气活血祛痰法防治作用研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2017.
- [13] 陈 镇. 脑泰方汤剂和胶囊剂中化学成分的含量研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2005.
- [14] 易亚乔, 何清湖, 刘 检, 等. 基于 SIRT1/NF- κ B 炎性通路探讨加味脑泰方对血管性痴呆大鼠学习记忆及海马组织病理形态的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(6): 684-688.
- [15] Cheng S, Cao D, Hottman D A, *et al.* Farnesyltransferase haploinsufficiency reduces neuropathology and rescues cognitive function in a mouse model of Alzheimer disease [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(50): 35952-35960.
- [16] Schwartz A S, Yu J, Gardenour K R, *et al.* Cost-effective strategies for completing the interactome [J]. *Nat Method*, 2009, 6(1): 55-61.
- [17] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, *et al.* STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life [J]. *Nucl Acid Res*, 2015, doi: 10.1093/nar/gku1003.
- [18] Huang da W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- [19] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27-30.
- [20] Chen R, Liu L, Xiao M, *et al.* Microarray expression profile analysis of long noncoding RNAs in premature brain injury: A novel point of view [J]. *Neuroscience*, 2016, doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.01.033.
- [21] 郭 清, 宫洪涛. 从中医五脏论血管性痴呆的病机 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2018, 16(1): 71-72.
- [22] 李 强, 耿秀超, 聂金涛, 等. 中医药治疗血管性痴呆研究概况 [J]. 中医临床研究, 2018, 10(12): 32-36.
- [23] 杨 同, 刘志辉, 王 欣, 等. 三七制剂对血管性痴呆大鼠海马区 COX-2 表达的影响 [J]. 潍坊医学院学报, 2015, 37(3): 183-185.
- [24] 刘 媛. 石菖蒲对脑血管性痴呆的益智研究 [J]. 中国当代医药, 2014, 21(20): 141-143.
- [25] 吴恒宇, 蒋 辉, 姜亚军. 细叶远志皂苷调控胆碱能神经环路改善血管性痴呆小鼠认知功能障碍的研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(16): 1695-1699.
- [26] 马大勇, 范吉平, 朱陵群, 等. 3 种拟血管性痴呆大鼠模型的比较 [J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(12): 832-835.
- [27] Farkas E, Luiten P G, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: A model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases [J]. *Brain Res Rev*, 2007, 54(1): 162-180.
- [28] Guo G, Ren S, Kang Y, *et al.* Microarray analyses of lncRNAs and mRNAs expression profiling associated with diabetic peripheral neuropathy in rats [J]. *J Cell Biochem*, 2019, doi: 10.1002/jcb.28802.
- [29] Guo L, Lv J, Huang Y F, *et al.* Bioinformatics analyses of differentially expressed genes associated with spinal cord injury: A microarray-based analysis in a mouse model [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(7): 1262-1270.
- [30] Belkhef M, Beder N, Mouhoub D, *et al.* The involvement of neuroinflammation and necroptosis in the hippocampus during vascular dementia [J]. *J Neuroimmunol*, 2018, doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.04.004.
- [31] Seo J H, Miyamoto N, Hayakawa K, *et al.* Oligodendrocyte precursors induce early blood-brain barrier opening after white matter injury [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2): 782-786.
- [32] Zhou Y, Wang Y, Wang J, *et al.* Inflammation in intracerebral hemorrhage: From mechanisms to clinical translation [J]. *Prog Neurobiol*, 2014, doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.11.003.
- [33] Block M L, Zecca L, Hong J S. Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8(1): 57-69.