

## · 基础研究 ·

涤痰汤加味方对血管性痴呆大鼠行为学及  
PKA/CREB 信号通路的影响丁瑞丛<sup>1\*</sup> 纪可<sup>1</sup> 吴东南<sup>1△</sup> 刘玲<sup>2</sup>

**摘要** **目的** 研究涤痰汤加味方对血管性痴呆(VD)大鼠行为学、大鼠海马 PKA/CREB 信号通路的影响。**方法** 将 120 只雄性 SD 大鼠随机分为空白组和造模组,空白组 20 只,造模组 100 只,空白组予普通饲料喂养,造模组以高脂饲料喂养复合颈总动脉结扎制作 VD 模型,将模型制作成功大鼠随机分为模型组、多奈哌齐组、活血组、涤痰汤原方组、涤痰汤加味组,每组 18 只,空白组和模型组每天灌胃等量的生理盐水,其他组给予相应药物连续灌胃 4 周。采用水迷宫检测大鼠的行为学,采用 ELISA 和 Western Blot 法检测大鼠海马区 PKA/CREB 信号通路相关因子表达。**结果** 与空白组比较,模型组大鼠发现平台时间和游泳总路程明显增加( $P<0.01$ )。与模型组比较,各给药组大鼠发现平台时间和游泳总路程均减少( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与涤痰汤原方组比较,活血组发现平台时间和游泳总路程增多( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),涤痰汤加味组发现平台时间和游泳总路程减少( $P<0.05$ )。与空白组比较,模型组大鼠穿越平台次数、目标象限时间均明显减少( $P<0.01$ ),首次抵达平台时间明显延长( $P<0.01$ )。与模型组比较,多奈哌齐组大鼠穿越平台次数增加( $P<0.05$ ),首次抵达平台时间明显缩短( $P<0.01$ );涤痰汤原方组、涤痰汤加味组和活血组大鼠穿越平台次数、目标象限时间均增加( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),首次抵达平台时间明显缩短( $P<0.01$ )。与空白组比较,模型组大鼠海马组织中环磷腺苷(cAMP)、蛋白激酶 A(PKA)、环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经生长因子(NGF)含量均明显降低( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠海马组织内 cAMP、PKA、CREB、BDNF、NGF 含量均增高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与涤痰汤原方组比较,活血组大鼠海马中 cAMP、PKA、CREB、BDNF、NGF 含量均减少( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),而涤痰汤加味组大鼠海马中 cAMP、PKA、CREB、BDNF、NGF 含量均增加( $P<0.05$ )。**结论** 涤痰汤加味可以改善 VD 模型大鼠的学习记忆能力,其机制可能与其激活海马 PKA/CREB 信号通路有关。

**关键词** 涤痰汤加味方;行为学;PKA/CREB 信号通路;海马

**Effect of Modified Ditan Decoction on Behavior and PKA/CREB Signaling Pathway in Vascular Dementia Rats** DING Rui-cong<sup>1\*</sup>, JI Ke<sup>1</sup>, WU Dong-nan<sup>1△</sup>, and LIU Ling<sup>2</sup> 1 Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan (430065); 2 Department of Encephalopathy, Hubei Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan (430061)

**ABSTRACT Objective** To study the effect of Modified Ditan Decoction (MDD) on behavior and protein kinase A (PKA)/cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-response element binding protein (CREB) signaling pathway in hippocampus of vascular dementia (VD) rats. **Methods** Totally 120 male SD rats were randomly divided into a blank group ( $n=20$ ) and a model group ( $n=100$ ). The rats in the blank group were fed with normal forage. The VD model was established by high fat diet and ligation of common carotid artery. The successfully modeled rats were randomly divided into model group (sham-operation group), donepezil group, Huoxue group, Ditan Decoction group, and MDD group, 18 in each group. The

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273648)

作者单位:1.湖北中医药大学(武汉 430065); 2.湖北省中医院脑病科(武汉 430061)

作者现在单位:\*河南中医药大学第二临床学院(郑州 450002); △广东省韶关市粤北人民医院中医科(广东 512400)

通讯作者:刘玲, 027-88929230, E-mail: lingliu07199@aliyun.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200331. 319

same amount of normal saline was daily administered to rats in the blank group and the model group by gastrogavage. Corresponding drugs were administered to rats in the other groups for 4 successive weeks. Behavior was detected by water Morris. Expressions of PKA/CREB related factors in hippocampus were detected by ELISA and Western Blot. **Results** Compared with the blank group, the platform time and total swimming distance significantly increased in the model group ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the platform time and the total swimming distance were reduced in each medicated group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with Ditan Decoction group, the platform time and the total swimming distance increased in Huoxue group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); the platform time and the total swimming distance were reduced in MDD group ( $P < 0.05$ ). Compared with the blank group, the times of crossing the platform and the target quadrant time were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), and the first time to reach the platform was significantly longer ( $P < 0.01$ ) in the model group. Compared with the model group, the times of crossing platforms increased ( $P < 0.05$ ), the first time to reach the platform was significantly shortened ( $P < 0.01$ ) in donepezil group. Compared with the model group, the times of crossing the platform and the target quadrant time increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the first time to reach the platform was significantly shortened ( $P < 0.01$ ) in Huoxue group, Ditan Decoction group, and MDD group. Compared with the blank group, the levels of cAMP, PKA, CREB, brain derived neurotrophic factor (BDNF), and nerve growth factor (NGF) in the hippocampus were significantly reduced in the model group ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, the levels of cAMP, PKA, CREB, BDNF, and NGF in the hippocampus significantly increased in each medicated group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with Ditan Decoction group, the levels of cAMP, PKA, CREB, BDNF, and NGF in the hippocampus were reduced in Huoxue group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); they increased in MDD group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** MDD improved the learning and memory ability of VD model rats. Its mechanism might be related to activation of hippocampal PKA/CREB signaling pathway.

**KEYWORDS** Modified Ditan Decoction; behavior; PKA/CREB signaling pathway; hippocampus

涤痰汤记载于《奇效良方》，是治疗痴呆的名方，刘玲教授在此方基础上加用活血化瘀药对丹参、川芎组成涤痰汤加味方，全方具有益元补气、涤痰化瘀开窍作用。前期研究证明涤痰汤加味方可改善痴呆动物模型的学习和记忆能力<sup>[1]</sup>，本实验应用高脂血症复合颈动脉结扎的方法制作血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 大鼠模型，利用水迷宫检测大鼠的行为学，ELISA 和 Western Blot 检测大鼠海马区 PKA/CREB 信号通路相关因子的表达，探讨涤痰汤加味方改善学习和记忆的机制，为中医药防治 VD 提供实验依据。

### 材料与方法

1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 120 只，5 周龄，体重 (150±10) g，由湖北省实验动物研究中心提供，动物编号：4200600021097，许可证号：SCXK (鄂 2015-0018)。设置饲养室温在 18~25℃，相对湿度介于 50%~80% 的环境条件下，自由饮水采食，每天按时换水，适应性饲养 1 周后，进行分组及造模。本动物实验方案通过湖北中医药大学实验动物福利与伦理审查 (No. 81273648)。

2 主要药物 涤痰汤原方：制南星 10 g 法半夏 10 g 炙甘草 10 g 枳壳 10 g 茯苓 15 g 橘红 10 g 石菖蒲 15 g 竹茹 10 g 生晒参 10 g 生姜 10 g。涤痰汤加味方：涤痰汤原方的基础上加丹参 15 g、川芎 10 g 组成。活血组方：由丹参 15 g、川芎 10 g 组成。饮片由湖北中医药大学校医院提供。分别浓缩成浓度为 0.990、1.220、0.225 g/mL 药液。盐酸多奈哌齐片 (安理申)，卫材药业有限公司，批号：1606069。

3 试剂及主要仪器 环磷腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 大鼠 ELISA 试剂盒，深圳欣博盛生物科技有限公司，批号分别为：NOV-BG-RAT10644、ASB-OKEH00023、NOV-NR-E10691；一抗，蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 抗体和环磷腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 抗体，德国 Merck 公司，批号分别为 06-903、MAB5432；HRP 标记羊抗鼠二抗 (IgG)，武汉谷歌生物技术有限公司，批号：GB23302。ZH-M 型 Morris 水迷宫，安徽

正华生物仪器设备有限公司;D-7PC 型紫外分光光度计,上海让奇仪器科技有限公司;JX-2000A 型凝胶图像成像分析系统,美国 Bio-Rad 公司。

4 动物分组 适应性饲养 1 周后,采用随机数字表法将大鼠分为空白组(正常对照组)和造模组,空白组 20 只,造模组 100 只。饲养条件:饲养室温 18~25 ℃,相对湿度 50%~80%,自由饮水采食,每天按时换水。

5 模型制作 空白组予普通饲料喂养,造模组予以高脂饲料(2%胆固醇、3%白糖、0.5%胆盐、10%猪油、0.2%丙基硫氧嘧啶、5%蛋黄粉、79.3%普通饲料)喂养,同时在饲食开始时一次性腹腔注射维生素 D<sub>3</sub> 注射液 70 IU/kg。空白组、造模组分别于 8 周后经腹主动脉采血后处死 5 只大鼠,取血后,4 ℃,3 000 r/min,10 min 离心,取上清液,用于血脂检测,剥离颈总动脉,进行 HE 染色观察颈总动脉<sup>[2]</sup>。确定高脂血症及颈动脉粥样硬化斑块形成后,予戊巴比妥钠 40 mg/kg 进行腹腔注射麻醉,间隔 3 天分别对大鼠右侧、左侧颈总动脉行结扎制作 VD 模型<sup>[3]</sup>,造模成功率 94.74%。将制作成功的 VD 模型大鼠随机分为涤痰汤原方组、活血组、涤痰汤加味组、模型组,每组 18 只。

6 给药方法 造模次日开始给大鼠灌胃,按人和动物体表面积折算的等效剂量给药<sup>[4]</sup>:涤痰汤原方组:9.9 g/(kg·d)、涤痰汤加味方组:12.2 g/(kg·d)、活血组:2.25 g/(kg·d)、西药多奈哌齐组:0.45 mg/(kg·d)、模型组及空白组予生理盐水 0.01 mL/(g·d)灌胃,给药 4 周<sup>[5]</sup>。

7 指标检测及方法

7.1 Morris 水迷宫检测大鼠学习记忆能力 用 Morris 水迷宫进行空间探索实验及定向航行试验。

7.2 ELISA 法检测海马组织 cAMP、BDNF、NGF 含量 以 3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,经腹主动脉采血,处死大鼠,在冰盘上剥离颅骨、枕骨,取出海马组织,用 ELISA 法检测海马组织的 cAMP、BDNF、NGF 含量,检测过程参考试剂盒说明书。

7.3 Western Blot 法检测大鼠海马组织 PKA 和 CREB 蛋白水平 内参为 β-actin。取脑组织 50 mg,加蛋白裂解液,冰上研磨,以 4 ℃,12 000 r/min 离心 30 min,取上清,用 BCA 蛋白质试剂盒分别测定 4 组蛋白量;依次加样、凝胶电泳、转膜和室温封闭;按抗体说明书加入一抗 PKA 和一抗 CREB,置 4 ℃冰箱过夜,洗膜,再加入二抗,ECL

显色;取出硝酸纤维素膜,置于 TBST 中浸泡。取出硝酸纤维素膜,置于凝胶图像成像分析系统,滴加 Western Blot 超敏发光液,运行凝胶图像成像分析系统,曝光各组蛋白条带,拍照。

8 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义

结 果

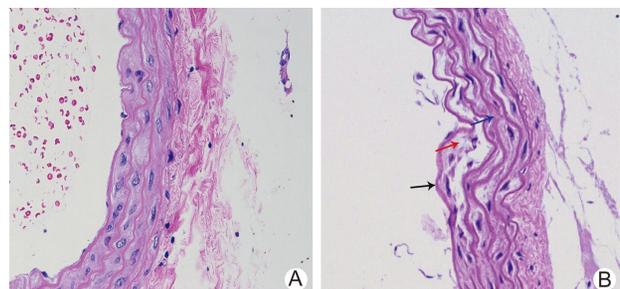
1 两组血脂水平结果比较(表 1) 造模组血中甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-C)较空白组均明显升高(*P*<0.01),高密度脂蛋白(HDL-C)含量明显降低(*P*<0.01)。

表 1 两组血脂水平比较 (mmol/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	TC	TG	HDL-C	LDL-C
空白	5	1.60±0.07	0.57±0.03	6.55±0.05	0.55±0.05
造模	5	3.10±0.22*	1.55±0.05*	0.87±0.08*	2.07±0.13*

注:与空白组比较,\**P*<0.01

2 两组颈总动脉 HE 染色结果比较(图 1) 空白组颈动脉壁管腔厚度一致,各层排列紧密,血管内膜光滑,血管内皮下未见增生,血管平滑肌排列规律。与空白组比较,造模组大鼠颈动脉血管内膜与邻近细胞层之间距离增宽,血管管腔厚度不均一,内膜下可见增生的平滑肌细胞及堆积的脂质斑块,斑块基底部存在较多泡沫样改变,血管内弹力层和中弹力层扭曲。表明 SD 大鼠动脉粥样硬化模型制作成功。



注:A 为空白组;B 为造模组;黑色箭头为血管内膜,红色箭头为内膜下脂质斑块及泡沫样改变,蓝色箭头为血管内弹力层和中弹力层

图 1 两组大鼠颈总动脉 (HE 染色,×400)

3 各组定向航行实验结果比较(表 2) 与空白组比较,模型组发现平台时间和游泳总路程明显增加(*P*<0.01);与模型组比较,各给药组发现平台时间和游泳总路程均减少(*P*<0.05,*P*<0.01)。与涤痰汤原

方组比较,活血组发现平台时间和游泳总路程增多 ( $P<0.05, P<0.01$ ),涤痰汤加味组发现平台时间和游泳总路程减少 ( $P<0.05$ )。

表 2 各组大鼠定向航行实验结果比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	发现平台时间(s)	游泳总路程(cm)
空白	15	44.93±7.55	625.42±54.01
模型	18	92.79±12.08*	1163.99±92.30*
多奈哌齐	18	72.41±12.72 <sup>△△</sup>	988.72±39.91 <sup>△△</sup>
活血	18	82.39±7.21 <sup>△▲</sup>	1041.54±67.12 <sup>△▲▲</sup>
涤痰汤原方	18	60.22±9.20 <sup>△△</sup>	938.45±208.01 <sup>△△</sup>
涤痰汤加味	18	58.09±3.35 <sup>△△▲▲</sup>	819.97±145.37 <sup>△△▲▲</sup>

注:与空白组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ ;与涤痰汤原方组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$ ,<sup>▲▲</sup> $P<0.01$

4 各组空间探索实验结果比较(表 3) 与空白组比较,模型组大鼠穿越平台次数、目标象限时间均明显减少 ( $P<0.01$ ),首次抵达平台时间明显延长 ( $P<0.01$ );与模型组比较,多奈哌齐组大鼠穿越平台次数增加 ( $P<0.05$ ),首次抵达平台时间明显缩短 ( $P<0.01$ ),目标象限时间增多,但差异无统计学意义;涤痰汤原方组、涤痰汤加味组和活血组大鼠穿越平台次数、目标象限时间均有增加 ( $P<0.05, P<0.01$ ),首次抵达平台时间明显缩短 ( $P<0.01$ )。与涤痰汤原方组比较,活血组、涤痰汤加味组大鼠穿越平台次数、目标象限时间及首次抵达平台时间变化不明显,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

表 3 各组大鼠空间探索实验结果比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	穿越平台次数(次)	目标象限时间(s)	首次抵达平台时间(s)
空白	15	8.90±1.66	44.68±6.75	30.88±5.65
模型	18	3.80±0.79*	19.49±6.41*	56.21±6.34*
多奈哌齐	18	5.50±1.58 <sup>△</sup>	23.31±4.86	43.83±6.49 <sup>△△</sup>
活血	18	5.60±1.96 <sup>△</sup>	28.27±7.07 <sup>△△</sup>	38.32±4.48 <sup>△△</sup>
涤痰汤原方	18	6.70±2.11 <sup>△△</sup>	32.98±6.42 <sup>△△</sup>	39.57±5.68 <sup>△△</sup>
涤痰汤加味	18	6.80±2.25 <sup>△△</sup>	33.42±8.69 <sup>△△</sup>	36.69±7.15 <sup>△△</sup>

注:与空白组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$

5 各组大鼠海马 cAMP、BDNF、NGF 含量比较(表 4) 与空白组比较,模型组大鼠海马组织中 cAMP、BDNF、NGF 含量均明显降低 ( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠海马组织内 cAMP、BDNF、NGF 含量均有增高 ( $P<0.05, P<0.01$ )。与涤痰汤原方组比较,活血组大鼠海马中 cAMP、BDNF、NGF 含量均有减少 ( $P<0.05, P<0.01$ ),而涤痰汤加味组大鼠海马中 cAMP、BDNF、NGF 含量均有增加 ( $P<0.05$ )。

表 4 各组大鼠海马 cAMP、BDNF、NGF 含量比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	cAMP(pmol/mL)	BDNF(pg/mL)	NGF(pg/mL)
空白	7	0.77±0.14	65.62±3.34	81.83±10.91
模型	7	0.14±0.02*	37.33±2.78*	52.09±9.71*
多奈哌齐	7	0.43±0.08 <sup>△△</sup>	57.32±8.47 <sup>△△</sup>	77.98±6.66 <sup>△△</sup>
活血	7	0.39±0.03 <sup>△△▲</sup>	44.33±3.78 <sup>△▲▲</sup>	65.83±7.28 <sup>△△▲▲</sup>
涤痰汤原方	7	0.55±0.22 <sup>△△</sup>	54.00±2.98 <sup>△△</sup>	75.87±7.32 <sup>△△</sup>
涤痰汤加味	7	0.69±0.03 <sup>△△▲</sup>	60.43±6.34 <sup>△△▲</sup>	92.29±9.05 <sup>△△▲</sup>

注:与空白组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ,<sup>△△</sup> $P<0.01$ ;与涤痰汤原方组比较,<sup>▲</sup> $P<0.05$ ,<sup>▲▲</sup> $P<0.01$

6 各组大鼠海马 PKA、CREB 表达比较(表 4, 图 2) 与空白组比较,模型组大鼠海马中 PKA、CREB 表达明显降低 ( $P<0.01$ );与模型组比较,各给药组大鼠海马中 PKA、CREB 表达均明显增高 ( $P<0.01$ )。与涤痰汤原方组比较,活血组大鼠海马中 PKA、CREB 表达明显降低 ( $P<0.01$ ),而涤痰汤加味组大鼠海马中 PKA、CREB 表达明显增高 ( $P<0.01$ )。

表 5 各组大鼠海马 PKA、CREB 灰度值结果比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	PKA	CREB
空白	7	0.1±0.03	0.26±0.05
模型	7	0.04±0.01*	0.05±0.02*
多奈哌齐	7	0.17±0.02 <sup>△</sup>	0.25±0.02 <sup>△</sup>
活血	7	0.12±0.02 <sup>△▲</sup>	0.22±0.04 <sup>△▲</sup>
涤痰汤原方	7	0.24±0.03 <sup>△</sup>	0.27±0.05 <sup>△</sup>
涤痰汤加味	7	0.32±0.04 <sup>△▲</sup>	0.39±0.07 <sup>△▲</sup>

注:与空白组比较,\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P<0.01$ ;与涤痰汤原方组比较,<sup>▲</sup> $P<0.01$

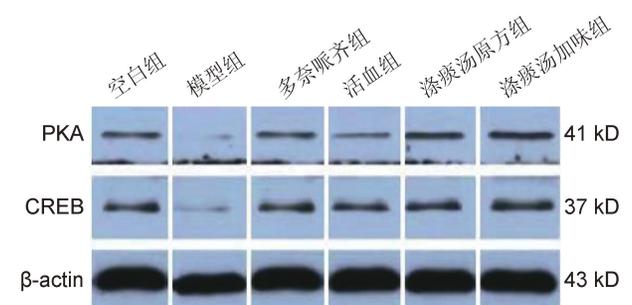


图 2 各组大鼠海马中 PKA、CREB 蛋白条带

### 讨论

涤痰汤出自《奇效良方》,由南星、半夏、枳实、茯苓、橘红、石菖蒲、人参、甘草组成,具有益元补虚、涤痰开窍的作用,用来“治中风,痰迷心窍,舌强不能言”。临床实践中发现,VD 患者在痰浊的病理基础上常合并有瘀血的因素,根据临床实际情况在上方的基础上加用常用活血化瘀药对丹参、川芎,组成涤痰汤加味

方,使全方具有益元补虚、涤痰化瘀开窍的作用。VD 多发于老年患者,老年患者生理上的元气亏虚,脏腑功能失调是痰浊和瘀血生成的根本原因,VD 发病及发病后患者的躯体功能受损,会进一步损伤元气,对此提出益元补气、涤痰化瘀开窍的治法<sup>[6,7]</sup>。

Morris 水迷宫是经典的检测实验动物空间学习记忆能力的方法,常用于老年动物记忆的研究。有研究表明,在此项测试中额叶皮层、嗅区、扣带回、纹状体等相关区域均有参与<sup>[8]</sup>。学习、记忆功能是相互交叉、并存、关联的神经活动过程,其比较直观的反映药物对 SD 大鼠学习记忆的影响<sup>[9]</sup>。在定向航行实验检测中,模型组动物逃避潜伏期、游泳总路程较空白组均有明显增长,说明模型的制作是成功的。用药后各用药组大鼠逃避潜伏期和游泳总路程均有不同程度缩短,其中以涤痰汤加味组最为明显,表明涤痰化瘀开窍治法可有效地改善 VD 模型大鼠的行为学。在空间探索实验中,以实验动物首次抵达平台时间、穿越平台次数、目标象限停留时间衡量各组动物行为学的变化,模型组较空白组首次抵达平台时间延长,穿越平台次数及目标象限停留时间减少。用药 4 周后,各治疗组行为学均有一定的改善,仍以涤痰汤加味组最为明显,说明了涤痰化瘀开窍法可以有效改善 VD 模型大鼠的学习记忆能力。

凋亡、坏死、自噬等是颅脑神经元损伤的常见方式,其中神经元凋亡是脑细胞程序性死亡的重要方式之一<sup>[10,11]</sup>。研究发现神经元缺血缺氧、神经营养因子缺乏、遗传因素等均可引起细胞凋亡,细胞凋亡时伴有多种基因转录和蛋白质合成的增加,既有促凋亡机制参与,又有抗凋亡机制参与,还有协调机制的参与<sup>[12,13]</sup>。有研究者认为,卒中后脑急性缺血中心区域主要以细胞坏死为主要方式,缺血半暗带则以细胞凋亡为主<sup>[14]</sup>。存活的神经细胞数量直接影响神经突触可塑性的效应,脑缺血后的迟发性神经细胞死亡和凋亡都会导致学习记忆功能的障碍。海马是脑组内与学习、记忆相关的重要中枢结构,脑血管疾病导致的脑神经元凋亡是导致认知功能障碍的重要原因<sup>[13,15]</sup>。

cAMP 为细胞内的第二信使,微量存在于动植物的细胞中,当细胞接受信号刺激后,其合成量增多,通过调节酶的活性参与细胞代谢过程<sup>[16]</sup>。PKA 为 cAMP 最主要的效应分子,cAMP 接受信号后,PKA 磷酸化激活,在磷酸化代谢过程中,把一些靶蛋白中的丝氨酸或者苏氨酸残基激活或钝化。这些被磷酸化的靶蛋白常常是关键性的调节酶、功能重要的蛋白质或者转录因子,因此可以介导细胞外信号调节的代谢、基因转录等细胞的效应,广泛参与如生长、分化发生、细

胞凋亡和细胞周期调控等生命过程<sup>[17]</sup>。CREB 存在于脑内各种神经元中,作为多种基因 DNA 序列启动序列,参与调节基因转录,其对突触可塑性的长期变化至关重要,而突触可塑性介导了短期记忆向长期记忆的转换<sup>[18]</sup>。BDNF 为分子量为 13.15 kD 碱性蛋白质,能防止神经元受损、死亡,改善神经元的病理状态,对神经元的存活、分化、生长发育起重要作用<sup>[19]</sup>。NGF 是最早被发现的神经营养因子之一,具有神经元营养和促突起生长双重生物学功能,对中枢及周围神经元的发育、分化、生长、再生和功能特性的表达均具有重要的调控作用<sup>[20]</sup>。PKA/CREB 信号通路作为脑组织内重要的抗凋亡通路,是长时程记忆形成的中心分子途径,PKA 一方面作用于突触部位的细胞骨架蛋白和电压敏感型  $Ca^{2+}$  通道,参与神经递质的合成和释放;另一方面 PKA 对 CREB 磷酸化发挥作用,影响其下游基因转录和蛋白合成,从而干预神经元的存活与生长、突触可塑性和 LTM 的维持<sup>[21]</sup>。此通路受到激活后,下游 BDNF、NGF 等的基因转录表达,这些转录表达的蛋白分子可促进神经细胞的修复与存活,从而减轻细胞凋亡,改善学习和记忆能力<sup>[15,22,23]</sup>。本实验研究发现用药干预后,海马区神经元细胞内第二信使 cAMP 的表达量升高,PKA 及 CREB 蛋白表达增加,表明用药干预后该通路得到了激活。通过检测发现该通路下游的神经保护因子 BDNF、NGF 表达水平亦有增高,可推测该通路激活后促进下游神经保护因子 BDNF、NGF 表达,从而产生抗神经元凋亡、减轻神经损伤的作用,达到改善学习记忆的目的。

本研究发现各中药组行为学均有改善,可能与中药干预后 PKA/CREB 信号通路激活,发挥抗细胞凋亡作用,从而改善实验大鼠的学习记忆能力相关。其中涤痰汤加味方组表现明显,表明益元补气、涤痰化瘀开窍是治疗血管性痴呆的重要治法。

利益冲突:无。

#### 参 考 文 献

- [1] 刘玲,杨怡然,周黎,等. 涤痰汤对老年轻度认知障碍大鼠海马 NMDA 受体亚基表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(2): 394-396.
- [3] 张海燕. 五脏温阳化痰汤对动脉粥样硬化血管性痴呆大鼠作用机理的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2013.
- [3] 马婧怡,张万鑫,陈虹,等. 改良方法制备的血管性痴呆模型大鼠的学习记忆能力表现[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(3): 421-425.
- [4] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生

- 出版社, 1994: 286-288.
- [5] 杨超, 杨佳, 刘玲. 涤痰汤对血管性痴呆大鼠海马 NOX<sub>2</sub>/ROS 通路、GSH、HO-1 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(12): 3052-3055.
- [6] 郑桃云, 王长江, 周玲, 等. 元气亏虚动物模型初探及复元丹的干预作用[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 1800-1803.
- [7] 潘怡宏. 培元固本法的理论探讨及其对老年性痴呆作用的研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.
- [8] D' Hooge R, de Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory[J]. *Br Res Brain Res*, 2001, 36(1): 60.
- [9] 柳维林. 基于 miRNAs 介导突触可塑性探讨电针改善缺血性脑卒中模型大鼠学习记忆功能的作用机制[D]. 福州: 福建中医药大学, 2017.
- [10] 曹丽霞, 杨玉梅. 缺血性脑损伤神经细胞凋亡及其相关基因的表达[J]. 包头医学院学报, 2016, 32(5): 170-172.
- [11] Song SL, Tan J, Miao YY, et al. Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232: 2977-2984.
- [12] Zhou ZL, Ai HH, Li K, et al. Prohibitin 2 localizes in nucleolus to regulate ribosomal RNA transcription and facilitate cell proliferation in RD cells[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1479.
- [13] Grootaert Mandy OJ, Moulis M, Roth L, et al. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4): 622-634.
- [14] 陈本阳, 张智博, 唐璇, 等. 大鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及 Fas 凋亡通路相关因子表达及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(1): 64-67.
- [15] Kriisa M, Sinijärvi H, Vaasa A, et al. Inhibition of CREB phosphorylation by conjugates of adenosine analogues and arginine-rich peptides, inhibitors of PKA catalytic subunit[J]. *Chembiochemis*, 2015, 16(2): 312-319.
- [16] Schmidt M, Dekker Frank J, Maarsingh H, et al. Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multi-domain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions[J]. *Pharmacol Rev*, 2013, 65: 670-709.
- [17] 李大信. 基于炎症反应及 PKA/CREB 通路研究针刺对脑出血大鼠的脑保护机制[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016.
- [18] Saura Carlos A, Valero J. The role of CREB signaling in Alzheimer's disease and other cognitive disorders[J]. *Rev Neurosci*, 2011, 22: 153-169.
- [19] Szuhany Kristin L, Bugatti M, Otto Michael W, et al. A meta analytic review of the effects of exercise on brain derived neurotrophic factor[J]. *J Psychiatr Res*, 2015, 60: 56-64.
- [20] Allen Shelley J, Watson Judy J, Shoemark Deborah K, et al. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 138: 155-175.
- [21] 王鑫铭. 基于 Ca<sup>2+</sup> CaMKII-CREB 通路研究通窍活血汤对血管性痴呆大鼠的作用机制[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- [22] Zou Z, Chen Y, Shen Q, et al. Neural plasticity associated with hippocampal PKA-CREB and NMDA signaling is involved in the antidepressant effect of repeated low dose of Yueju Pill on chronic mouse model of learned helplessness[J]. *Neural Plasticity*, 2017: 1-10.
- [23] 曹丽霞, 杨玉梅. 缺血性脑损伤神经细胞凋亡及其相关基因的表达[J]. 包头医学院学报, 2016, 32(5): 170-172.

(收稿: 2019-04-08 在线: 2020-09-28)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶