

养血清脑颗粒对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区 CD11b 表达的影响

李 晶 马原源 刘 斌 毛文静 张晋霞 李世英

摘要 目的 观察养血清脑颗粒对血管性痴呆(vascular dementia, VD)大鼠海马 CA1 区 CD11b 表达的影响,探讨养血清脑颗粒对小胶质细胞的调控作用。**方法** 将 144 只 SD 大鼠随机分为假手术组、血管性痴呆模型组(模型组)及养血清脑颗粒治疗组(治疗组),采用改良的 Pulsinelli 四血管阻断法制备血管性痴呆大鼠模型,假手术组及模型组给予生理盐水[10 mL/(kg·d)]灌胃,治疗组以浓度为 0.32 g/mL 养血清脑颗粒 10 mL/(kg·d)灌胃,每日 1 次,连续给药 8 周。分别在给药 1、2、4、8 周采用免疫组化法及 Western blot 法检测海马 CA1 区 CD11b 的表达水平。**结果** 与假手术组比较,模型组各时间点大鼠海马 CA1 区 CD11b 蛋白表达均增高($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组各时间点 CD11b 蛋白表达均下降($P < 0.01$),尤以 2 周时最明显。**结论** VD 大鼠海马 CA1 区小胶质细胞明显增生和活化,养血清脑颗粒可抑制小胶质细胞的增生和活化。

关键词 血管性痴呆;小胶质细胞;CD11b;海马;养血清脑颗粒

Effect of Yangxue Qingnao Granule on the Expression of CD11b in CA1 Region of Hippocampus of Vascular Dementia Rats LI Jing, MA Yuan-yuan, LIU Bin, MAO Wen-jing, ZHANG Jin-xia, and LI Shi-ying First Department of Neurology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Hebei (063000)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Yangxue Qingnao Granule (YQG) on the expression of CD11b in CA1 region of hippocampus of vascular dementia rats, and to explore its regulation on microglia. **Methods** Totally 144 SD rats were randomly divided into the sham-operation group, the vascular dementia model group (model), and the YQG treated group (treated). The vascular dementia rat model was prepared by modified Pulsinelli's four-vessel occlusion. Rats in the sham-operation group and the model group were administered with normal saline (at the daily dose of 10 mL/kg) by gastrogavage, while those in the treated group were administered with YQG (0.32 g/mL, at the daily dose of 10 mL/kg) by gastrogavage. All administration was performed once per day for 8 successive weeks. The expression of CD11b in CA1 region of hippocampus of vascular dementia rats was detected at week 1, 2, 4, and 8, respectively. **Results** Compared with the sham-operation group, the expression of CD11b in CA1 region of hippocampus of vascular dementia rats were significantly enhanced in the model group at each time point ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of CD11b in CA1 region of hippocampus of vascular dementia rats significantly decreased in the treated group at each time point ($P < 0.01$), especially at week 2. **Conclusion** Obvious activation and proliferation of microglia could be seen in CA1 region of hippocampus of vascular dementia rats, and YQG could inhibit activation and proliferation of microglia.

KEYWORDS vascular dementia; microglia; CD11b; hippocampus; Yangxue Qingnao Granule

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是由脑血

管疾病导致的脑组织损害,造成脑组织功能减退的认知缺损综合征^[1]。VD 的发病机制尚未完全明确,研究表明,炎症反应及免疫活性因子参与了 VD 的发病过程^[2]。慢性脑缺血可引起小胶质细胞、星形胶质细胞及少突胶质细胞的增生和活化^[3],激活的小胶质细胞产生大量炎症因子和氧自由基发挥神经毒性作用,在 VD 的发病机制中起着重要作用^[4]。CD11b 是细

基金项目:河北省高等学校科学技术研究重点项目(No. ZH2012046);

河北省省级重大医学科研课题资助项目(No. zd2013087)

作者单位:华北理工大学附属医院神经内科(河北 063000)

通讯作者:刘 斌, Tel: 0315 - 3725963, E-mail: liubintsh @

126.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 05. 0619

胞黏附分子整合素家族成员之一,参与细胞的黏附与迁移,CD11b 的阳性表达能反映小胶质细胞的增生与活化^[5],是小胶质细胞的特异性蛋白标记物^[6]。近年来,中药在 VD 治疗中的作用逐渐得到重视。养血清脑颗粒能明显改善 VD 患者认知功能和日常生活能力^[7],但其具体作用机制尚不明确。本研究通过观察养血清脑颗粒对 VD 大鼠海马 CA1 区 CD11b 表达变化的影响,探讨养血清脑颗粒治疗 VD 的作用及可能机制。

材料与方法

1 动物 144 只健康雄性 SD 大鼠,体重 250~280 g,3 月龄,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号:SCXK(京)2013-0013。在华北理工大学屏障环境动物实验室自由进食喂养,室温控制在 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,自然光照,实验前适应性喂养 2 周。

2 药物、试剂及仪器 养血清脑颗粒由川芎、当归、白芍、钩藤、熟地黄、鸡血藤、决明子、夏枯草、细辛、延胡索、珍珠母组成(4 g/袋,由天津天士力制药股份有限公司提供,批号:130366);兔抗大鼠 CD11b 抗体、山羊血清封闭液、多聚赖氨酸溶液均购于北京博奥森生物技术公司;DAB 显色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术公司。低温离心机购自美国 Sigma 公司,电凝仪由张家港市航天医疗电器有限公司提供,切片机由上海亿欣生物科技有限公司提供,透射电子显微镜由日本 HITACHI 公司提供。

3 动物分组及模型制备 将 144 只 SD 大鼠随机分为假手术组、血管性痴呆模型组(模型组)及养血清脑颗粒治疗组(治疗组)。采用改良 Pulsinelli 四血管阻断(4-VO)法制备 VD 大鼠模型^[8],具体造模方法:术前 12 h 禁食,用 10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉后,背侧行颈正中切口以暴露双侧第一颈椎横突小孔,将直径为 0.5 mm 的电凝针插入双侧翼小孔烧灼双侧椎动脉,造成双侧永久性闭塞。然后将大鼠仰卧位固定,行腹侧颈正中切口,分离双侧颈总动脉(common carotid artery, CCA),以 4 号丝线穿线。于 24 h 后用微动脉夹夹闭双侧 CCA 5 min,共夹闭 3 次,每次间隔 1 h。术后手术部位喷洒庆大霉素抗感染,然后缝合切口,继续常规饲养观察。假手术组大鼠操作步骤同上,但不烧灼和夹闭血管。术后各组大鼠均给予庆大霉素(10 000 U/kg)腹腔注射,连续 3 天。采用 Morris 水迷宫实验,观察大鼠穿越平台次数,筛选出造模成功的大鼠^[9]。造模成功判定标准参

照本课题组既往文献报道^[10]。4 周左右大鼠出现 VD 行为学改变,其中 5 只由于病情过重给予淘汰,另有 3 只死亡。均给予相应补充。实验过程严格遵循《关于善待实验动物的指导性意见》。

4 给药方法 3 组大鼠均灌胃给药,每日 1 次。假手术组大鼠双侧 CCA 分离后,不进行缺血处理,给予生理盐水灌胃 $[10 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 。VD 模型制备成功后,模型组分别在 1、2、4、8 周给予生理盐水灌胃 $[10 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ 。治疗组参照陶涛等^[11]报道的方法,将养血清脑颗粒用蒸馏水配置成混悬液[浓度为 0.32 g/mL,10 mL/(kg·d)],每日给予养血清脑颗粒 3.2 g/kg 灌胃,分别连续给药 1、2、4、8 周。养血清脑颗粒给药剂量参照《药理学实验方法学》人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值进行换算,每组给药剂量均根据大鼠体重按成人一日剂量折算[大鼠等效剂量(mg/kg) = 折算系数 × 成人剂量(mg/kg)],计算出大鼠等效剂量。

5 标本制备及检测方法 用 10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉后暴露心脏,经左心室快速灌注生理盐水 100 mL,持续灌注 4%多聚甲醛-PBS 100 mL,断头取脑,每组取 6 只大鼠,将大脑矢状位切成对等的两份,一份用于免疫组化,另一份用于免疫印迹。

5.1 免疫组化法检测 CD11b 阳性细胞 4%多聚甲醛-PBS 固定过夜,冠状面切断包含大鼠海马的脑组织(视交叉后),石蜡包埋,5 μm 连续切片,在显微镜下观察组织微观结构变化。将制备好的组织标本,加入正常山羊血清封闭液中,先后滴加一抗 4 $^\circ\text{C}$ 过夜、滴加二抗和适量辣根酶标记链霉卵白素工作液,进行 DAB 显色。免疫组化法具体操作步骤严格按试剂说明书操作要求进行。CD11b 免疫组化阳性标准:光学显微镜下,胞浆和胞膜呈棕黄色细颗粒状,颜色较深,颗粒较粗。组织切片采用 400 倍 Olympus 摄像显微镜摄像,选择各组大鼠海马 CA1 区不重叠的 6 个视野,应用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统进行 CD11b 阳性细胞计数。

5.2 Western blot 法检测 CD11b 蛋白表达水平 用 10%水合氯醛(350 mg/kg)对大鼠进行深度麻醉。断头后于冰上开颅取脑,用冷 PBS 漂洗残余血,立即分离出新鲜海马,将海马组织置于 15 mL 离心管中,组织匀浆机 12 000 r/min 匀浆 15 s,加入 4 $^\circ\text{C}$ 预冷的组织裂解液,振荡混匀,4 $^\circ\text{C}$ 作用 30 min,细胞悬液 4 $^\circ\text{C}$ 低温离心 12 000 r/min 离心 10 min,留取上清液 4 $^\circ\text{C}$ 保存。经蛋白定量后分装,用 4 $^\circ\text{C}$ 预

冷的 PBS 调蛋白浓度到一致(750 μg/mL),加入等体积的上样缓冲液,沸水中煮至少 5 min。等量蛋白样品(每个泳道50 μg)经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)电泳分离后,以湿转法电转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。转移缓冲液(甘氨酸 5.8 g, Tris 2.9 g, SDS 0.37 g, 800 mL 重蒸馏水溶解后加入 200 mL 甲醇)。转移后的 PVDF 膜放入封闭液中封闭,然后加入稀释好的兔抗大鼠 CD11b 一抗(1:1 000) 4 ℃ 孵育过夜。PBS 洗膜,加入相应稀释好的二抗(羊抗兔,1:2 000),37 ℃ 反应 1 h,洗膜,以 ECL 显色,胶片曝光显影,采用 Image J 软件进行结果分析。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组不同时间点大鼠海马 CA1 区 CD11b 阳性细胞计数比较(表 1,图 1) 假手术组大鼠海马

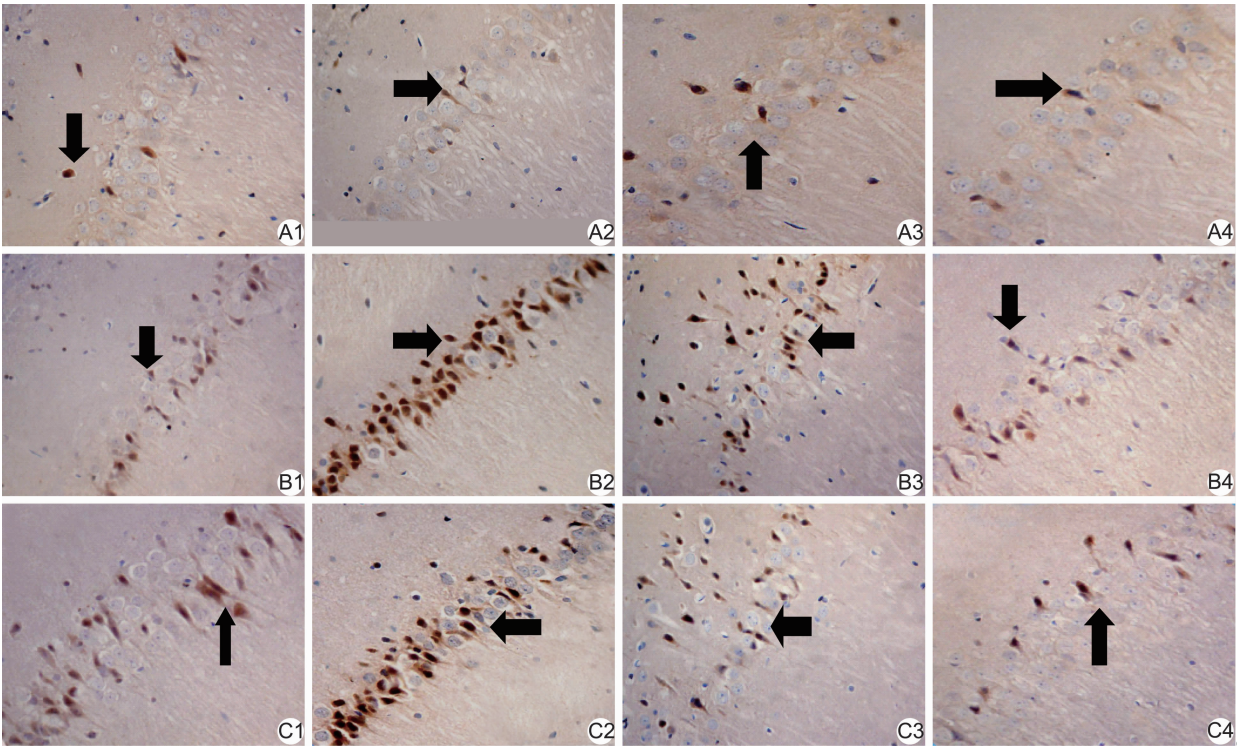
CA1 区可见少量 CD11b 蛋白表达,模型组各时间点 CD11b 阳性细胞计数增多,2 周时达高峰,4 周时下降。与假手术组同期比较,模型组各时间点 CD11b 蛋白阳性细胞计数增加($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组各时间点 CD11b 蛋白阳性细胞计数明显减少($P < 0.01$)。

表 1 各组不同时间点大鼠海马 CA1 区 CD11b 阳性细胞计数比较 (个/高倍视野, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD11b 表达			
		1 周	2 周	4 周	8 周
假手术	6	6.33 ± 2.34	7.33 ± 2.07	7.83 ± 2.14	7.33 ± 2.73
模型	6	37.83 ± 2.79 *	50.33 ± 3.01 *	23.33 ± 3.33 *	17.17 ± 2.14 *
治疗	6	27.17 ± 3.60 [△]	39.83 ± 3.25 [△]	17.67 ± 2.16 [△]	11.33 ± 2.16 [△]

注:与假手术组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, [△] $P < 0.01$;下表同

2 各组不同时间点 CD11b 蛋白表达水平比较(表 2,图 2) 假手术组大鼠海马 CA1 区可见少量 CD11b 蛋白表达,模型组各时间点 CD11b 蛋白表达明显增多,2 周时达高峰,4 周时下降。与假手术组比较,模型组各时间点 CD11b 蛋白表达均增多($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组各时间点 CD11b 蛋白表达明显减少($P < 0.01$)。



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为治疗组;1、2、3、4 分别为 1、2、4、8 周

图 1 各组不同时间点大鼠海马 CA1 区 CD11b 免疫组化结果 (×400)

表 2 各组不同时间点大鼠海马 CA1 区 CD11b 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD11b 蛋白表达			
		1 周	2 周	4 周	8 周
假手术	6	0.60 ± 0.02	0.58 ± 0.02	0.60 ± 0.02	0.60 ± 0.03
模型组	6	0.91 ± 0.03 *	1.17 ± 0.04 *	0.83 ± 0.03 *	0.71 ± 0.04 *
治疗	6	0.77 ± 0.02 Δ	1.00 ± 0.05 Δ	0.74 ± 0.03 Δ	0.67 ± 0.03 Δ

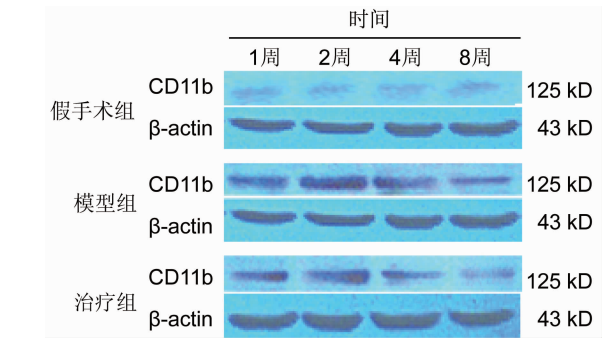


图 2 各组不同时间点大鼠海马 CA1 区 CD11b 蛋白电泳图

讨 论

VD 的发病机制至今尚未完全明确,近年研究表明,炎症反应及免疫活性因子参与了 VD 的发病机制^[12]。胶质细胞是炎症反应的重要参与者,小胶质细胞是脑内神经细胞炎症反应的主要效应细胞,在多种中枢神经系统疾病的病理过程中发挥重要作用。小胶质细胞是脑内特殊的免疫活性细胞,正常情况下,小胶质细胞处于静止状态,病理情况下被激活成为活化的小胶质细胞,激活的小胶质细胞能够分泌大量的生物活性因子(reactive oxygen species,ROS)、环氧化酶-2 等^[13],这些生物活性因子通过不同的途径反过来加重小胶质细胞的活化效应,促进神经元损伤。同时活化的小胶质细胞产生大量炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和基质金属蛋白酶-9 等神经毒性物质介导脑缺血损伤的发生^[14,15],从而导致神经元损伤。此外还可直接对神经组织产生作用,加重炎症反应,在 VD 的发病机制中起着重要作用。

CD11b 是一种相对分子质量为 165 000 ~ 170 000 的整合素 α 蛋白,是参与炎症反应的重要黏附分子^[16],对于炎症细胞迁移和功能具有重要的作用,CD11b 是小胶质细胞的特异性蛋白标记物^[6]。本研究采用免疫组化法和 Western blot 检测结果均显示,VD 模型组各时间点大鼠海马 CA1 区 CD11b 表达均增多,提示 VD 模型大鼠海马 CA1 区有明显的小胶质细胞增生和活化,小胶质细胞呈激活状态,这与

Lunemann A 等^[17]报道的结果一致。

养血清脑颗粒是天津天士力制药股份有限公司研制、生产的国家三类中药新药,是以中医传统名方四物汤为基础改良而成的中药复方制剂,其主要成分为川芎、当归、白芍、钩藤、熟地黄、鸡血藤、决明子、夏枯草、细辛、延胡索、珍珠母,具有养血活血、平肝潜阳的作用,标本兼治,符合中医治疗 VD 的要求^[18]。养血清脑颗粒作为现代中药复方制剂,具有多靶点、多环节、整体性调节机体的特点。文献报道,养血清脑颗粒在改善软脑膜微循环,增加脑血管量,减轻脑损伤等方面具有显著效果^[19],具有抑制神经细胞凋亡,保护神经元缺血性损害^[20]。本研究提示,养血清脑颗粒治疗组大鼠海马 CA1 区 CD11b 表达明显降低,提示养血清脑颗粒可抑制 VD 大鼠海马 CA1 区 CD11b 蛋白表达,抑制小胶质细胞的增生和活化,且随着用药时间的延长,作用更明显。

由上述研究结果可推测,VD 大鼠海马 CA1 区小胶质细胞明显增生和活化,养血清脑颗粒可能通过抑制小胶质细胞的增生和活化,发挥对 VD 的治疗作用。因此,通过抑制小胶质细胞的增生和活化来减轻缺血性脑损伤,可能成为阻止 VD 发展的途径之一。

参 考 文 献

[1] Benisty S. Current concepts in vascular dementia [J]. Geriatr Psychol Neuropsychiatr Veil, 2013, 11(2): 171 - 180.

[2] 张梅, 高吉国, 赵腾, 等. MCP-1 与血管性痴呆[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(6): 1728 - 1730.

[3] 滕厚军, 赵瑛. 慢性脑缺血神经胶质细胞损伤与血管性痴呆的研究进展[J]. 中国脑血管病杂志, 2008, 5(10): 473 - 476.

[4] 宋兆晶, 吉训明, 牛小媛, 等. 脑缺血后炎症反应机制的研究进展[J]. 中国脑血管病杂志, 2010, 7(3): 154 - 157.

[5] Mika J, Wawrzczak-Bargiela A, Osikowicz M. Attenuation of morphine tolerance by minocycline and pentoxifylline in naive and neuropathic mice [J]. Brain Behav Immun, 2009, 23(1): 75 - 84.

[6] Maalood N, Meister B. Protein components of blood-brain barrier (BBB) in the brainstem area postrema-nucleus tractus solitarius region[J]. J Chem Neuroanat, 2009, 37(3): 182 - 195.

[7] 沈玉梅. 养血清脑颗粒治疗血管性痴呆临床评价[J]. 药物与临床, 2012, 23(12): 1482 - 1483.

[8] 刘斌, 毛文静, 李爱春, 等. 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[J].

- 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 161-164.
- [9] 陈罗西, 郭玲玲, 李亮. 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, 10(8): 55-57.
- [10] 李世英, 刘洋洋, 刘斌, 等. 养血清脑颗粒对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区突触素及微管相关蛋白-2 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(8): 1876-1879.
- [11] 陶涛, 秦新月, 徐广会. 养血清脑颗粒对大鼠缺血再灌注损伤后轴突再生及 RGMA 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(70): 635-638.
- [12] Wang Q, Tang XN, Yenar MA. The inflammatory response in stroke[J]. J Neuroimmunol, 2007, 184(12): 5368.
- [13] Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF- κ B and AP-1: Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1 β and TNF- α [J]. Neurobiol Aging, 2010, 31(4): 665-677.
- [14] Yirmiya R, Goshen I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis [J]. Brain Behav Immun, 2011, 25(2): 181-213.
- [15] Williamson LL, Sholar PW, Mistry RS, et al. Microglia and memory: modulation by early-life infection [J]. Neuroscience, 2011, 31(43): 15511-15521.
- [16] Friedrichs K, Adam M, Remane L, et al. Induction of atrial fibrillation by neutrophils critically depends on CD11b/CD18 integrins [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89307.
- [17] Lunemann A, Ullrich O, Diestel A, et al. Macrophage/microglia activation factor expression is restricted to lesion-associated microglial cells after brain trauma[J]. Glia, 2006, 53(4): 412-419.
- [18] 张玲, 褚扬, 马晓慧, 等. 养血清脑颗粒的药理作用研究进展[J]. 医学综述, 2011, 17(5): 769-771.
- [19] Xiong L, Zhang JJ, Sun D, et al. Therapeutic benefit of Yangxue Qingnao Granule on cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats[J]. Chin J Integr Med, 2011, 17(2): 134-140.
- [20] 梁迎春, 杨海燕, 赵林, 等. p38MAPK 参与血管性痴呆大鼠海马细胞凋亡机制研究及养血清脑颗粒的保护作用[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2014, 8(6): 1104-1108.

(收稿:2015-01-15 修回:2015-09-09)

2016 年全国危重病急救医学学术交流会议征文通知

2016 年全国危重病急救医学学术交流会议拟定于 2016 年 9 月在湖南长沙召开,会议由中国中西医结合学会急救医学专业委员会主办,湖南省人民医院承办。现将征文事宜通知如下。

征文内容 (1) 中西医结合急救医学的基础、临床科研进展和技术交流;(2) 脓毒症的国内、国外研究成果交流、回顾和展望;(3) 交流中西医结合急救医学治疗的新技术、新进展,推广急救医学领域的临床治疗成果。(4) 老年多脏器功能不全的诊断与治疗。

征文范围 (1) 西医、中医、中西医结合的内科、外科、儿科、妇科、神经科、五官科、麻醉科、急诊科、ICU、血液净化、医学检验、医学影像、窥镜、创伤、中毒、烧伤、微创治疗、护理、心理、干细胞移植医学等专业的基础与临床研究论文;(2) 全身炎症反应综合征(SIRS)及脓毒症(Sepsis)、多脏器功能不全综合征(MODS)、危重病临床监测新技术、急救用药、急诊、ICU、干细胞移植医学质量控制标准、急救医疗行政管理和危重病急救医学领域的循证医学研究等方面的论文。

征文要求 (1) 全文在 3 000 字以内(附 400 字中英文摘要,包括目的、方法、结果、结论)。要求标点符号准确,著者顺序排列。请自留底稿。(2) 投稿采用 Word 文档格式,以电子邮件发出,并于发出后 72 小时内确认是否收到。(3) 来稿请注明“会议征文”。

截稿日期 2016 年 5 月 30 日(以邮戳或发送电子邮件时间为准)。

联系方式 天津市经济技术开发区第三大街 65 号(邮编:300457),天津泰达医院。联系人:夏欣华,电话 13502001878, E-mail:tedahib@163.com;天津市南开区复康路 24 号(邮编:300192),天津市第一中心医院中西医结合科,联系人:王东强,电话 13032279963, E-mail:wdqklm@sina.com。