

# 人参皂苷Rb<sub>3</sub>联合β-细辛醚对血管性痴呆模型小鼠的改善作用及其机制研究<sup>Δ</sup>

邓敏贞<sup>1\*</sup>, 钟晓琴<sup>1</sup>, 高志杰<sup>1</sup>, 孙一凡<sup>1</sup>, 黄丽平<sup>2#</sup> (1. 广州中医药大学第二附属医院/广东省中医院脑病一科, 广州 510120; 2. 岭南师范学院化学化工学院, 广东 湛江 524048)

中图分类号 R743.3; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)16-1967-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.16.09

**摘要** 目的: 研究人参皂苷Rb<sub>3</sub>联合β-细辛醚对血管性痴呆(VD)模型小鼠的改善作用及其机制。方法: 将ICR小鼠随机分为模型组、人参皂苷Rb<sub>3</sub>组(10 mg/kg)、β-细辛醚组(10 mg/kg)、联合用药组(人参皂苷Rb<sub>3</sub> 10 mg/kg+β-细辛醚10 mg/kg)、阳性对照组(盐酸多奈哌齐1 mg/kg)和蛋白激酶B(Akt)抑制剂组(LY294002, 1 mg/kg), 并设假手术组, 每组10只。除假手术组外, 其余各组小鼠均按四血管阻断法复制VD模型。造模后, 假手术组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水, Akt抑制剂组腹腔注射相应药物, 其余各组均灌胃相应药物, 每日2次, 连续30 d。末次给药后, 采用避暗实验检测各组小鼠的学习记忆能力, 酶联免疫吸附测定法检测其海马组织中4-羟基壬烯酸(4-HNE)、8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)、活性氧(ROS)含量, 实时荧光定量聚合酶链式反应技术检测海马组织中B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)及其X蛋白(Bax) mRNA的表达, 免疫荧光法检测皮质中Bcl-2蛋白的表达, Western blotting法检测海马组织中Bcl-2、Bax蛋白的表达。结果: 与假手术组比较, 模型组小鼠的避暗潜伏期显著缩短, 错误次数显著增多, 4-HNE、8-OHdG、ROS含量以及Bax mRNA、蛋白的表达水平均显著升高, Bcl-2 mRNA、蛋白的表达水平均显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较, 人参皂苷Rb<sub>3</sub>组、β-细辛醚组、联合用药组和阳性对照组小鼠的避暗潜伏期均显著延长, 错误次数均显著减少, 4-HNE、8-OHdG、ROS含量以及Bax mRNA、蛋白的表达水平均显著降低, Bcl-2 mRNA、蛋白的表达水平均显著升高, 且联合用药组的效果最为显著( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ); 而Akt抑制剂组小鼠的避暗潜伏期显著缩短, 错误次数显著增多, 4-HNE、8-OHdG、ROS含量以及Bax mRNA、蛋白的表达水平均显著升高, Bcl-2 mRNA、蛋白的表达水平均显著降低( $P<0.05$ )。结论: 人参皂苷Rb<sub>3</sub>联合β-细辛醚对VD模型小鼠学习记忆能力具有一定改善作用, 且效果优于各化合物单用。这种作用可能与抗氧化应激、抗海马组织凋亡有关。

**关键词** 人参皂苷Rb<sub>3</sub>; β-细辛醚; 血管性痴呆; 氧化应激; 凋亡; 小鼠

## Study on the Improvement Effect of Ginsenoside Rb<sub>3</sub> Combined with β-asarone on Vascular Dementia Model Mice and Its Mechanism

DENG Minzhen<sup>1</sup>, ZHONG Xiaoqin<sup>1</sup>, GAO Zhijie<sup>1</sup>, SUN Yifan<sup>1</sup>, HUANG Liping<sup>2</sup> (1. The First Department of Encephalopathy, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM/Guangdong Provincial Hospital of TCM, Guangzhou 510120, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Lingnan Normal University, Guangdong Zhanjiang 524048, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the improvement effects of ginsenoside Rb<sub>3</sub> combined with β-asarone on vascular dementia (VD) model mice and its mechanism. METHODS: ICR mice were randomly divided into model group, ginsenoside Rb<sub>3</sub> group (10 mg/kg), β-asarone group (10 mg/kg), drug combination group (ginsenoside Rb<sub>3</sub> 10 mg/kg+β-asarone 10 mg/kg), positive control group (donepezil hydrochloride 1 mg/kg) and Akt inhibitor group (LY294002, 1 mg/kg), and sham operation group was set up, with 10 mice in each group. Except for sham operation group, VD model was induced by four vessel occlusion method in other groups. After modeling, sham operation group and model group were given constant volume of normal saline, Akt inhibitor group was given relevant medicine intraperitoneally, and other groups were given relevant medicine intragastrically, twice a day, for consecutive 30 d. After last administration, the learning and memory ability of mice was detected by avoiding darkness test. The contents of 4-hydroxydecenoic acid (4-HNE), 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and reactive oxygen species (ROS) in

<sup>Δ</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81904104, No.31900297); 广东省自然科学基金——粤东西北创新人才联合培养项目(No.2018A030307037); 广东省中医药局科研基金项目(No.20181114)

\* 研究实习员, 博士。研究方向: 中医药治疗脑病。E-mail: deng-mz1@126.com

# 通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 中医药治疗脑病。E-mail: xiaoyinlanlp@126.com

hippocampus was detected by ELISA. RT-PCR assay was used to detect the mRNA expression of Bcl-2 and Bax in hippocampus. The protein expression of Bcl-2 in cortex was detected by immunofluorescence method. Western blotting assay was used to detect the protein expression of Bcl-2 and Bax in hippocampus. RESULTS: Compared with sham operation group, the incubation period of avoiding darkness test in model group was shortened significantly; and the

number of errors was increased significantly; 4-HNE, 8-OHdG and ROS contents, mRNA and protein expression of Bax were increased significantly, and mRNA and protein expression of Bcl-2 was decreased significantly ( $P<0.01$ ). Compared with model group, the incubation period of avoiding darkness test was prolonged significantly in ginsenoside Rb<sub>3</sub> group,  $\beta$ -asarone group, drug combination group and positive control group, the number of errors was decreased significantly; 4-HNE, 8-OHdG, ROS contents, mRNA and protein expression of Bax were decreased significantly, and mRNA and protein expression of Bcl-2 were increased significantly, especially in drug combination group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). But the incubation period of avoiding darkness test was shortened significantly in Akt inhibitor group, and the number of errors was increased significantly; 4-HNE, 8-OHdG, ROS contents, mRNA and protein expression of Bax were increased significantly, and mRNA and protein expression of Bcl-2 were decreased significantly ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: Ginsenoside Rb<sub>3</sub> combined with  $\beta$ -asarone has a protective effect on VD model mice, and the effect was better than that of each compound alone. The mechanism of which may be associated with anti-oxidative stress and anti-apoptosis of hippocampus.

**KEYWORDS** Ginsenoside Rb<sub>3</sub>;  $\beta$ -asarone; Vascular dementia; Oxidative stress; Apoptosis; Mice

血管性痴呆(Vascular dementia, VD)是一种由缺血性脑血管疾病所致脑组织局部脑血流量减少、缺氧等因素所造成的中枢神经功能障碍性疾病,主要临床表现为认知功能障碍<sup>[1]</sup>。研究发现,VD和散发性阿尔茨海默病的共同始动环节是慢性脑组织血液供应不足<sup>[2]</sup>。目前,临床尚无理想的防治认知功能障碍的药物。中药复方由于具有多途径、多靶点的作用特点,对痴呆疾病的预防和治疗具有一定的优势<sup>[3]</sup>,故有潜在的开发价值。

人参发挥药效的主要物质基础是人参总皂苷,其中人参皂苷Rb类成分的含量较高。有研究发现,人参总皂苷具有提高学习记忆的能力<sup>[4]</sup>。石菖蒲临床广泛用于中风后遗症、健忘等神经系统疾病的治疗<sup>[5]</sup>。 $\beta$ -细辛醚作为石菖蒲挥发油的主要活性成分,具有保护心血管、易透过血脑屏障等特点,在心脑血管疾病的防治中具有重要价值<sup>[6]</sup>。人参和石菖蒲都是益智古方定志小丸的主要成分<sup>[7]</sup>。本课题组前期研究发现,人参总皂苷联合石菖蒲挥发油可有效改善痴呆模型小鼠的学习记忆能力<sup>[8]</sup>;此外有研究证实, $\beta$ -细辛醚可减缓痴呆模型小鼠的认知功能障碍<sup>[9-10]</sup>,人参皂苷Rb<sub>3</sub>对心脏血管再灌注和大脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用<sup>[11-12]</sup>。在上述研究的基础上,本文主要探索人参皂苷Rb<sub>3</sub>与 $\beta$ -细辛醚联用对VD模型小鼠的改善作用,并初步研究其作用机制,以期治疗VD的新药开发提供试验依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

SBA-2型小鼠避暗仪(中国医学科学院药物研究所);IKA T10基础型分散机(德国IKA公司);5804R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);ME403型电子天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];Biotek-EON型酶标仪(美国Bio Tek公司);CFX96型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Bio Rad公司);TI2-E型全自动倒置荧光显微镜(日本Nikon公司)。

### 1.2 药品与试剂

人参皂苷Rb<sub>3</sub>对照品、 $\beta$ -细辛醚对照品(四川维克奇生物技术有限公司,批号:wkq18020701/wkq18042602,纯度均大于98%);盐酸多奈哌齐片[卫材(中国)药业有限

公司,批号:1706077,规格:5 mg];LY294002[蛋白激酶B(Akt)抑制剂,美国Med Chem Express公司,批号:154447-36-6];水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号:20170414);4-羟基壬烯酸(4-HNE)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:UK92FFJBWN);8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)ELISA试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,批号:C22013999);活性氧(ROS)ELISA试剂盒(南京草本源生物科技有限公司,批号:07/2019);Trizol试剂(美国Invitrogen公司,批号:191012);PrimeScript™ RT Reagent Kit,SYBR® Premix Ex Taq II[宝生物工程(大连)有限公司,批号:RR037A,RR820A];B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)及其X蛋白(Bax)、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)基因引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成;4%多聚甲醛(广州晶欣生物科技有限公司,批号:JX0100);兔源Bcl-2克隆抗体(批号:ab182858和#3498S)、兔源Bax抗体(批号:#2772S)多克隆、兔源GAPDH单克隆抗体(批号:5174S)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG二抗(批号:7074S)均购自美国CST公司;SABC-FITC免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号:SA1062);生理盐水(辰欣药业股份有限公司,批号:1910242706);蛋白裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0013B);其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

### 1.3 动物

SPF级ICR小鼠70只,雄性,3月龄,体质量(25±2)g,由广东省医学动物实验中心提供,动物生产许可证号为SCXK(粤)2014-0035。所有小鼠均适应性饲养3d再进行后续实验。本实验方案通过广东省中医院实验动物伦理委员会审核同意。

## 2 方法

### 2.1 造模

参考相关文献<sup>[13]</sup>按四血管阻断法复制VD模型。腹腔注射10%水合氯醛(350 mg/kg)进行麻醉,分离小鼠双侧颈总动脉,用动脉夹阻断其血流30 min,松开动脉夹恢复血流10 min,重复3次。于第1次阻断血流5 min后,断尾放血约0.3 mL。于第3次缺血再灌注后30 min,

观察小鼠呼吸、心跳,待其恢复正常后即可缝合皮肤。

## 2.2 分组与给药

根据前期预实验结果设置给药剂量。将60只VD模型小鼠随机分为模型组、人参皂苷Rb<sub>3</sub>组(10 mg/kg)、 $\beta$ -细辛醚组(10 mg/kg)、联合用药组(人参皂苷Rb<sub>3</sub> 10 mg/kg+ $\beta$ -细辛醚 10 mg/kg)、阳性对照组(盐酸多奈哌齐, 1 mg/kg)和Akt抑制剂组(LY294002, 1 mg/kg),并另设假手术组(按“2.1”项下方法操作,但不行缺血再灌注),每组10只。模型组和假手术组小鼠灌胃等体积生理盐水,Akt抑制剂组小鼠腹腔注射相应药物,其余各组小鼠灌胃相应药物,每日2次,连续30 d。

## 2.3 小鼠学习记忆能力评价

采用避暗实验评价各组小鼠的学习记忆能力。第29天给药结束后,将各组小鼠置于避暗仪中适应2 min后,将其背对暗室的洞口放入明室。小鼠进入暗室,受到电击后逃出暗室,如此训练5 min。24 h后(即末次给药后)正式检测,将每只小鼠分别置于明室,记录其从明室第1次进入暗室的时间(避暗潜伏期)和5 min内小鼠进入暗室的次数(错误次数)。

## 2.4 小鼠海马组织中4-HNE、8-OHdG、ROS含量检测

采用ELISA法检测各组小鼠海马组织中4-HNE、8-OHdG、ROS含量。避暗实验结束后,颈椎脱臼处死各组小鼠,迅速取出其左侧海马组织,精密称定质量后以生理盐水制成10%海马组织匀浆,于4℃、3 500 r/min条件下离心15 min,吸取上清液,使用酶标仪检测各组小鼠海马组织中4-HNE、8-OHdG、ROS含量。严格按照相应试剂盒说明书操作。

## 2.5 小鼠海马组织中Bcl-2、Bax mRNA表达情况检测

采用实时荧光定量PCR法检测各组小鼠海马组织中Bcl-2、Bax mRNA表达情况。取各组小鼠右侧部分海马组织,按照Trizol试剂盒操作提取总RNA,根据Prime-Script™ RT Reagent Kit说明书操作逆转录得cDNA,置PCR仪中进行扩增。反应体系(共25  $\mu$ L):2 $\times$ SYBR® Premix Ex Taq II 12.5  $\mu$ L,上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各1  $\mu$ L, DNA模板2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L。反应条件:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,40次循环。以 $\beta$ -actin为内参,使用2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>法分析各组小鼠海马组织中Bcl-2、Bax mRNA的表达水平。引物序列及产物长度见表1。

表1 引物序列及产物长度

Tab 1 Primer sequence and product length

基因名称	引物序列	产物长度, bp
Bcl-2	上游:5'-GCGTCAACAGGGAGATGTC A-3'	138
	下游:5'-GCATGCTGGGGCCATATAGT-3'	
Bax	上游:5'-CTGGATCCAAGACCAGGGTG-3'	96
	下游:5'-GTGAGGACTCCAGCCACAAA-3'	
$\beta$ -actin	上游:5'-ACACTCTCCCAAGAGGGG-3'	147
	下游:5'-TTTATAGGACCCACAGCGG-3'	

## 2.6 小鼠皮质中Bcl-2蛋白表达情况检测

采用免疫荧光法检测各组小鼠皮质中Bcl-2蛋白表达情况。各组随机取3只小鼠左侧大脑皮质置于4%多聚甲醛中固定24 h,常规脱水,石蜡包埋、切片、脱蜡至水后,于3%双氧水中浸泡30 min,用柠檬酸钠进行抗原修复,恢复室温后用组化笔划圈,磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.0)漂洗3次,每次5 min,随后滴加正常山羊血清,室温下孵育30 min,不漂洗直接滴加Bcl-2一抗(稀释比例为1:50),37℃孵育2 h;PBS漂洗3次,每次5 min;滴加生物素(稀释比例为1:100),室温孵育30 min;滴加SABC-FITC(稀释比例为1:200),室温避光孵育30 min;PBS漂洗3次,每次5 min。用4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)室温避光孵育5 min, PBS漂洗3次,每次5 min,最后用防荧光淬灭封片,在荧光显微镜下观察Bcl-2荧光强度并以阳性细胞百分比表示其蛋白表达水平。

## 2.7 小鼠海马组织中Bcl-2和Bax蛋白表达情况检测

采用Western blotting法检测各组小鼠海马组织中Bcl-2和Bax蛋白表达情况。各组随机取3只小鼠右侧海马组织,称定质量,加入现配的含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液,冰上匀浆促其充分裂解,于4℃下12 000 r/min离心10 min,取其上清液以BCA法检测蛋白质浓度。取煮沸变性后的蛋白样本40  $\mu$ g,以10%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,湿法转膜,再以5%牛血清白蛋白室温封闭1 h,加入Bcl-2、Bax、GAPDH一抗(稀释比例均为1:1 000),于4℃孵育过夜,再用TBST溶液清洗;加入HRP标记的山羊抗兔IgG二抗于室温下孵育1 h,再用TBST溶液清洗。经ECL化学发光液显影和定影后采用Image J 8.0软件分析,以目标蛋白与内标(GAPDH)的灰度值比值表示该蛋白的表达水平。

## 2.8 统计学方法

采用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 小鼠学习记忆能力

与假手术组比较,模型组小鼠的避暗潜伏期显著缩短,错误次数显著增多( $P < 0.01$ )。与模型组比较,人参皂苷Rb<sub>3</sub>组、 $\beta$ -细辛醚组、联合用药组和阳性对照组小鼠的避暗潜伏期均显著延长,错误次数均显著减少( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );而Akt抑制剂组小鼠的避暗潜伏期显著缩短,错误次数显著增多( $P < 0.05$ )。与人参皂苷Rb<sub>3</sub>组、 $\beta$ -细辛醚组、Akt抑制剂组比较,联合用药组小鼠的避暗潜伏期显著延长,错误次数显著减少( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。各组小鼠学习记忆能力的变化情况见表2。

### 3.2 小鼠海马组织中4-HNE、8-OHdG和ROS含量

与假手术组比较,模型组小鼠海马组织中4-HNE、8-OHdG、ROS含量均显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比

表2 各组小鼠学习记忆能力的变化情况( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
**Tab 2 Changes in learning and memory abilities of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )**

组别	避暗潜伏期,s	错误次数
假手术组	290.40±1.81	1.02±0.13
模型组	91.61±12.31**	4.65±0.34**
人参皂苷Rb <sub>3</sub> 组	148.90±5.60 <sup>#Δ</sup>	2.75±0.16 <sup>#Δ</sup>
β-细辛醚组	153.31±3.42 <sup>#Δ</sup>	2.62±0.18 <sup>#Δ</sup>
联合用药组	198.43±4.32 <sup>#</sup>	2.15±0.15 <sup>#</sup>
阳性对照组	182.12±9.74 <sup>#</sup>	2.02±0.13 <sup>#</sup>
Akt抑制剂组	68.02±9.91 <sup>#ΔΔ</sup>	5.28±0.11 <sup>#ΔΔ</sup>

注:与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与联合用药组比较,<sup>Δ</sup> $P<0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ; vs. drug combination group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

较,人参皂苷Rb<sub>3</sub>组、β-细辛醚组、联合用药组和阳性对照组小鼠海马组织中4-HNE、8-OHdG、ROS含量均显著降低( $P<0.01$ );而Akt抑制剂组小鼠海马组织中4-HNE、8-OHdG、ROS含量均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与人参皂苷Rb<sub>3</sub>组、β-细辛醚组、Akt抑制剂组比较,联合用药组小鼠海马组织中4-HNE、8-OHdG、ROS含量均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组小鼠海马组织中4-HNE、8-OHdG、ROS含量的检测结果见表3。

表3 各组小鼠海马组织中4-HNE、8-OHdG、ROS含量的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
**Tab 3 Determination results of contents of 4-HNE, 8-OHdG and ROS in hippocampus of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )**

组别	4-HNE,ng/mL	8-OHdG,pg/mL	ROS,U/mL
假手术组	5.05±0.02	1.40±0.01	19.05±0.16
模型组	6.07±0.03**	2.80±0.02**	22.27±0.21**
人参皂苷Rb <sub>3</sub> 组	5.77±0.02 <sup>#Δ</sup>	2.25±0.01 <sup>#Δ</sup>	19.94±0.11 <sup>#Δ</sup>
β-细辛醚组	5.73±0.02 <sup>#Δ</sup>	2.24±0.01 <sup>#Δ</sup>	19.81±0.14 <sup>#Δ</sup>
联合用药组	5.53±0.01 <sup>#</sup>	2.19±0.01 <sup>#</sup>	19.50±0.11 <sup>#</sup>
阳性对照组	5.33±0.01 <sup>#</sup>	2.10±0.01 <sup>#</sup>	19.44±0.15 <sup>#</sup>
Akt抑制剂组	6.35±0.02 <sup>#ΔΔ</sup>	2.95±0.02 <sup>#ΔΔ</sup>	22.96±0.16 <sup>#ΔΔ</sup>

注:与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与联合用药组比较,<sup>Δ</sup> $P<0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ; vs. drug combination group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

### 3.3 小鼠海马组织中Bcl-2、Bax mRNA表达水平

与假手术组比较,模型组小鼠海马组织中Bcl-2 mRNA表达水平显著降低,Bax mRNA表达水平显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,人参皂苷Rb<sub>3</sub>组、β-细辛醚组、联合用药组和阳性对照组小鼠海马组织中Bcl-2 mRNA表达水平均显著升高,Bax mRNA表达水平均显著降低( $P<0.01$ );而Akt抑制剂组小鼠海马组织中Bcl-2 mRNA表达水平显著降低,Bax mRNA表达水平显著升高( $P<0.05$ )。与人参皂苷Rb<sub>3</sub>组、β-细辛醚组、Akt抑制剂组比较,联合用药组小鼠海马组织中Bcl-2 mRNA表达水平显著升高,Bax mRNA表达水平显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组小鼠海马组织中Bcl-2、

Bax mRNA表达水平的检测结果见表4。

表4 各组小鼠海马组织中Bcl-2、Bax mRNA表达水平的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=10$ )  
**Tab 4 Determination results of mRNA expression of Bcl-2 and Bax in hippocampus of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n=10$ )**

组别	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA
假手术组	1.00±0.05	1.00±0.00
模型组	0.42±0.02**	2.19±0.01**
人参皂苷Rb <sub>3</sub> 组	0.60±0.02 <sup>#ΔΔ</sup>	1.45±0.08 <sup>#ΔΔ</sup>
β-细辛醚组	0.67±0.02 <sup>#Δ</sup>	1.36±0.02 <sup>#Δ</sup>
联合用药组	0.79±0.01 <sup>#</sup>	1.21±0.01 <sup>#</sup>
阳性对照组	0.81±0.01 <sup>#</sup>	1.26±0.03 <sup>#</sup>
Akt抑制剂组	0.34±0.01 <sup>#ΔΔ</sup>	2.30±0.04 <sup>#ΔΔ</sup>

注:与假手术组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与联合用药组比较,<sup>Δ</sup> $P<0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P<0.01$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$ ; vs. drug combination group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$ ,<sup>ΔΔ</sup> $P<0.01$

### 3.4 小鼠皮质中Bcl-2蛋白表达水平

与假手术组比较,模型组小鼠皮质中Bcl-2蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ )。与模型组比较,人参皂苷Rb<sub>3</sub>组、β-细辛醚组、联合用药组和阳性对照组小鼠皮质中Bcl-2蛋白表达水平均显著升高( $P<0.01$ );而Akt抑制剂组小鼠皮质中Bcl-2蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ )。与人参皂苷Rb<sub>3</sub>组、β-细辛醚组、Akt抑制剂组比较,联合用药组小鼠皮质中Bcl-2蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组小鼠皮质中Bcl-2蛋白表达的荧光显微图见图1,表达水平的检测结果见表5。

### 3.5 小鼠海马组织中Bcl-2和Bax蛋白表达水平

与假手术组比较,模型组小鼠海马组织中Bcl-2蛋白表达水平显著降低,Bax蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较,人参皂苷Rb<sub>3</sub>组、β-细辛醚组、联合用药组和阳性对照组小鼠海马组织中Bcl-2蛋白表达水平均显著升高,Bax蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$ );而Akt抑制剂组小鼠海马组织中Bcl-2蛋白表达水平显著降低,Bax蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与人参皂苷Rb<sub>3</sub>组、β-细辛醚组、Akt抑制剂组比较,联合用药组小鼠海马组织中Bcl-2蛋白表达水平显著升高,Bax蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。各组小鼠海马组织中Bcl-2、Bax蛋白表达的电泳图见图2,表达水平的检测结果见表6。

## 4 讨论

急慢性缺血性脑血管病发病的主要病理基础是慢性脑缺血<sup>[14]</sup>。随着人口老龄化的加剧,VD的发病率越来越高,故深入探讨VD的发病机制可为其防治提供依据<sup>[15]</sup>。在VD的传统临床治疗中,化学药治疗为主要的治疗手段,但长期使用副作用较大;同时,有临床经验证实,中医药治疗VD具有一定的优势,日益受到学者的关注<sup>[16]</sup>。

中医理论中没有痴呆的概念,VD属于“健忘”“癫

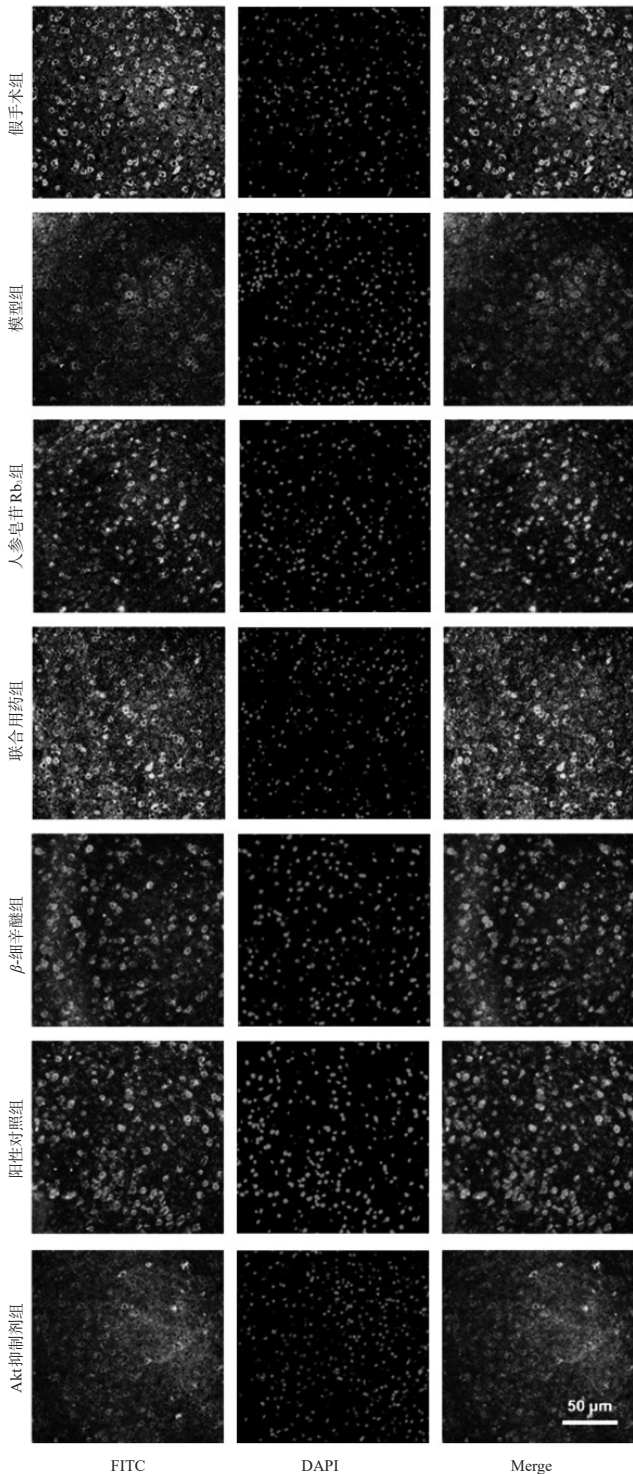


图1 各组小鼠皮质中Bcl-2蛋白表达的荧光显微图(×400)

Fig 1 Fluorescence micrographs of protein expression of Bcl-2 in cortex of mice in each group(×400)

狂”等范畴,主要病变部位集中在脑部,该病症发生的一个主要病因与痰浊壅盛有关,脑络受阻导致脑供血不足,从而最终引发痴呆等症<sup>[7]</sup>。石菖蒲具有豁痰开窍的功效,人参具有补益元气的作用,而在中医药治疗痴呆的方剂中,人参与石菖蒲的配伍使用频率较高,如定

表5 各组小鼠皮质中Bcl-2蛋白表达水平的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 5 Determination results of protein expression of Bcl-2 in cortex of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Bcl-2, %	组别	Bcl-2, %
假手术组	51.35 ± 4.48	联合用药组	35.49 ± 2.48 <sup>##</sup>
模型组	10.56 ± 1.02 <sup>**</sup>	阳性对照组	43.57 ± 2.54 <sup>##</sup>
人参皂苷Rb <sub>1</sub> 组	24.15 ± 1.78 <sup>##ΔΔ</sup>	Akt抑制剂组	6.24 ± 0.51 <sup>##Δ</sup>
β-细辛醚组	29.64 ± 2.04 <sup>##Δ</sup>		

注:与假手术组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ ; 与联合用药组比较,  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ ; vs. drug combination group,  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

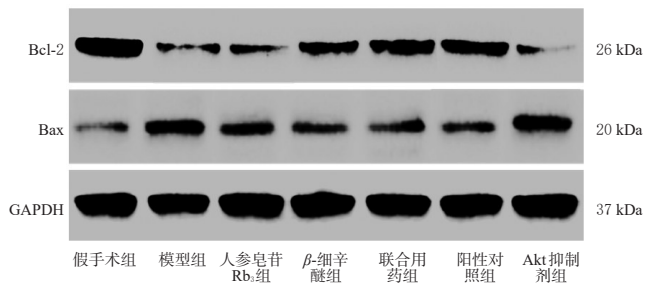


图2 各组小鼠海马组织中Bcl-2、Bax蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretograms of Bcl-2 and Bax protein expression in hippocampus of mice in each group

表6 各组小鼠海马组织中Bcl-2、Bax蛋白表达水平的检测结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 6 Determination results of protein expression of Bcl-2 and Bax in hippocampus of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Bcl-2	Bax
假手术组	1.62 ± 0.09	0.11 ± 0.01
模型组	0.15 ± 0.01 <sup>**</sup>	1.23 ± 0.06 <sup>**</sup>
人参皂苷Rb <sub>1</sub> 组	0.26 ± 0.02 <sup>##ΔΔ</sup>	0.80 ± 0.04 <sup>##ΔΔ</sup>
β-细辛醚组	0.48 ± 0.04 <sup>##Δ</sup>	0.67 ± 0.03 <sup>##Δ</sup>
联合用药组	0.69 ± 0.06 <sup>##</sup>	0.51 ± 0.02 <sup>##</sup>
阳性对照组	0.76 ± 0.07 <sup>##</sup>	0.45 ± 0.02 <sup>##</sup>
Akt抑制剂组	0.09 ± 0.01 <sup>##Δ</sup>	1.48 ± 0.07 <sup>##ΔΔ</sup>

注:与假手术组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ ; 与联合用药组比较,  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. model group,  $^{\#}P < 0.05$ ,  $^{\#\#}P < 0.01$ ; vs. drug combination group,  $^{\Delta}P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

心小丸等<sup>[7,18]</sup>。基于此,本课题组推测人参与石菖蒲的联合用药可能对VD模型小鼠具有一定的改善作用。

避暗实验是评价动物学习记忆能力较常用方法之一,是根据鼠类喜暗恶光的生理习性而设计的,属于动物被动回避性条件反射的范畴<sup>[9]</sup>。从本实验结果可知,与假手术组比较,模型组小鼠避暗潜伏期显著缩短,错误次数显著增加,说明VD模型建立成功。与模型组比

较,人参皂苷 Rb<sub>3</sub>组、 $\beta$ -细辛醚组、联合用药组和阳性对照组小鼠的避暗潜伏期均显著延长,错误次数均显著降低,且联合用药组上述指标显著优于各单药组,说明盐酸多奈哌齐、人参皂苷 Rb<sub>3</sub>、 $\beta$ -细辛醚或人参皂苷 Rb<sub>3</sub>联合 $\beta$ -细辛醚都能一定程度地缓解 VD 模型小鼠的认知障碍,并且联合用药的效果优于人参皂苷 Rb<sub>3</sub>或 $\beta$ -细辛醚单用。此外,本研究结果还显示,与模型组比较,Akt 抑制剂组小鼠的避暗潜伏期显著缩短,错误次数显著增加,说明抑制 Akt 表达会加重 VD 模型小鼠的认知障碍。

有研究表明,痴呆患者脑组织出现病理改变之前,脑组织就处于氧化应激状态,如 ROS 等高活性分子大量堆积<sup>[20]</sup>。脂质过氧化水平升高是痴呆发生的早期标志,其主要强毒性过氧化物 4-HNE 会在痴呆患者脑中积累并损伤脑组织<sup>[21]</sup>。8-OHdG 是 DNA 氧化损伤的标志物,可触发多种细胞内信号传导通路导致神经细胞的损伤及凋亡<sup>[22]</sup>。Bax、Bcl-2 同属于 Bcl-2 家族,其中 Bcl-2 是细胞凋亡抑制因子,Bax 不仅拮抗 Bcl-2 的抑制凋亡作用,而且具有促进细胞凋亡的功能<sup>[23]</sup>。本研究结果显示,与假手术组比较,模型组小鼠海马组织中 4-HNE、8-OHdG、ROS 含量和 Bax 蛋白及 mRNA 的表达都显著升高,皮质和海马组织中 Bcl-2 蛋白及 mRNA 的表达显著降低,说明 VD 会产生较强的氧化应激反应,导致小鼠海马组织出现严重损伤及凋亡;与模型组比较,人参皂苷 Rb<sub>3</sub>组、 $\beta$ -细辛醚组、联合用药组和阳性对照组小鼠海马组织中 4-HNE、8-OHdG、ROS 含量和 Bax 蛋白及 mRNA 的表达均显著降低,Bcl-2 蛋白及 mRNA 的表达显著升高,且联合用药组上述指标显著优于各单药组,说明盐酸多奈哌齐、人参皂苷 Rb<sub>3</sub>、 $\beta$ -细辛醚或人参皂苷 Rb<sub>3</sub>联合 $\beta$ -细辛醚都能一定程度地减缓氧化应激对 VD 模型小鼠海马细胞的损伤,并且联合用药的效果优于人参皂苷 Rb<sub>3</sub>或 $\beta$ -细辛醚单用。此外,本研究结果还显示,与模型组比较,Akt 抑制剂组小鼠海马组织中 4-HNE、8-OHdG、ROS 含量和 Bax 蛋白及 mRNA 的表达均显著升高,Bcl-2 蛋白及 mRNA 的表达显著降低,说明抑制 Akt 表达可加重小鼠海马组织的氧化应激损伤,促进其凋亡。

综上所述,人参皂苷 Rb<sub>3</sub>联合 $\beta$ -细辛醚对 VD 模型小鼠具有改善作用,主要体现在改善学习能力,其作用机制可能与抗氧化应激、抗海马组织凋亡有关,可为 VD 的进一步机制研究提供实验依据。

## 参考文献

[1] 方玲,杨莉莉. CREB1 对血管性痴呆大鼠认知功能障碍的影响及机制研究[J]. 中国现代医学杂志,2019,29(8): 1-6.

[2] 赵静,常文龙,宋伟丽,等. 基于 DTI 探讨慢性脑低灌注所致脑白质损伤程度与轻度认知功能障碍的相关性[J]. 现代医学,2020,48(4): 438-442.

[3] 张菁华. 中医药治疗老年痴呆患者的研究进展[J]. 医疗装备,2020,33(4): 203-204.

[4] 康安,钱静,单进军,等. 人参总皂苷主要成分大鼠体内药动学研究[J]. 中草药,2015,46(20): 3045-3050.

[5] 郭美彤,赵佳奇,韩诚,等. 石菖蒲药效物质基础和作用机制研究进展[J]. 中药药理与临床,2019,35(2): 179-184.

[6] 刘家欣,王丹,刘森,等.  $\alpha$ -细辛醚和 $\beta$ -细辛醚在心脑血管病中的作用及机制研究进展[J]. 现代生物医学进展,2019,19(9): 1797-1800.

[7] 孙思邈. 备急千金要方[M]. 北京: 人民卫生出版社,1982: 265.

[8] 邓敏贞,黄丽平,方永奇. 石菖蒲挥发油联合人参总皂苷对 D-半乳糖联合氯化铝致阿尔茨海默病模型小鼠学习记忆能力及脑组织细胞凋亡的影响[J]. 中药材,2015,38(5): 1019-1024.

[9] DENG MZ, HUANG LP, NING BL, et al.  $\beta$ -asarone improves learning and memory and reduces acetyl cholinesterase and beta-amyloid 42 levels in APP/PS1 transgenic mice by regulating beclin-1-dependent autophagy[J]. *Brain Res*, 2016. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.10.008.

[10] 马宇昕,李国营,刘靖,等.  $\beta$ -细辛醚对阿尔茨海默病大鼠海马神经元突触可塑性的影响[J]. 广东医学,2017,38(10): 1489-1492.

[11] 吴惠珍,贾庆忠. 人参皂苷 Rb<sub>3</sub>对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的保护[J]. 中国组织工程研究,2016,20(49): 7320-7326.

[12] 陈健文,谭敏谊,陈浩凡,等. 人参皂苷 Rb<sub>3</sub>对脑缺血-再灌注后大鼠脑组织中兴奋性氨基酸的作用研究[J]. 中药材,2012,35(8): 1301-1304.

[13] SUN MK. Potential therapeutics for vascular cognitive impairment and dementia[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16(7): 1036-1044.

[14] FULOP GA, TARANTINI S, YABLUCHANSKIY A, et al. Role of age-related alterations of the cerebral venous circulation in the pathogenesis of vascular cognitive impairment[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 316(5): H1124-H1140.

[15] MA X, XU W, ZHANG Z, et al. Salvianolic acid B ameliorates cognitive deficits through IGF-1/Akt pathway in rats with vascular dementia[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(4): 1381-1391.

[16] 李心沁,崔华锋,王康锋,等. 针刺“安神穴组”治疗老年痴呆患者睡眠障碍临床研究[J]. 山东中医杂志,2019,38(1): 55-58.

[17] 张祥慧,张卫华. 中西医结合疗法治疗脑卒中所致血管性痴呆的疗效[J]. 中国城乡企业卫生,2019(9): 153-154.

[18] 夏小珣. 基于中医传承辅助系统治疗老年认知障碍组方规律分析[D]. 北京: 中国中医科学院,2015.

[19] 童庆,吴晓军,张盼红,等. 建立小鼠学习记忆损伤模型的方法学研究[J]. 实验动物科学,2019,36(2): 21-26.

[20] 杜斯琪,王雪蕊,朱雯,等. 针刺对血管性痴呆大鼠前额叶皮层氧化应激及神经元损伤的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2017,24(6): 53-55.

# 基于EGC研究大建中汤对肠易激综合征内脏痛模型大鼠的改善作用<sup>Δ</sup>

武静<sup>1\*</sup>, 王慧<sup>1</sup>, 杨毅<sup>1</sup>, 李尧锋<sup>1</sup>, 王俊霞<sup>1</sup>, 杨莎莎<sup>2#</sup> (1. 贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学第一附属医院五官科, 贵阳 550002)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)16-1973-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.16.10

**摘要** 目的: 研究大建中汤对肠易激综合征(IBS)内脏痛模型大鼠的改善作用及其机制。方法: 将48只雄性未断乳大鼠随机分为正常对照组、模型组、匹维溴铵组(阳性对照, 45 mg/kg)和大建中汤高、中、低剂量组(2.16、1.08、0.54 g/kg, 以生药总量计), 每组8只。除正常对照组外, 其余各组大鼠经母子分离、乙酸灌肠、卵清白蛋白腹腔注射等复制IBS内脏痛模型, 造模共57 d。第58天, 给药组大鼠灌胃相应药物, 模型组和正常对照组大鼠灌胃等体积水, 每日1次, 连续14 d。观察各组大鼠一般情况; 采用腹壁撤退反应(AWR)评估各组大鼠在20、40、60、80 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)压力下的内脏敏感性; 采用苏木精-伊红染色方法观察各组大鼠结肠组织病理学特征; 采用Western blotting技术检测结肠组织中肠胶质细胞标志物纤维酸性蛋白(GFAP)和神经生长因子(NGF)及其受体酪氨酸蛋白激酶A(TrkA)蛋白的表达情况。结果: 正常对照组大鼠结肠组织未见明显病理学改变。模型组大鼠结肠组织黏膜不连续, 腺体水肿, 固有层内散在分布淋巴细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞; 大建中汤低剂量组大鼠结肠组织黏膜不完整, 部分腺体轻度水肿, 固有层内有少量淋巴细胞和中性粒细胞; 大建中汤中、高剂量组和匹维溴铵组大鼠结肠黏膜上皮结构完整, 腺体排列规则, 未见变性坏死和炎症细胞浸润。与正常对照组比较, 模型组和大建中汤低剂量组大鼠20、40、60 mmHg压力下的AWR评分和结肠组织中GFAP、NGF、TrkA蛋白的相对表达量均显著升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与模型组比较, 大建中汤中、高剂量组和匹维溴铵组大鼠20、40 mmHg压力下的AWR评分, 大建中汤高剂量组和匹维溴铵组大鼠60 mmHg压力下的AWR评分, 大建中汤中、高剂量组和匹维溴铵组大鼠结肠组织中GFAP、NGF、TrkA蛋白的相对表达量均显著降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论: 大建中汤可能通过抑制肠胶质细胞活化、减少NGF和TrkA的表达, 进而改善IBS模型大鼠的内脏痛。

**关键词** 肠易激综合征; 内脏痛; 肠胶质细胞; 神经生长因子; 大建中汤; 大鼠

## Study on the Improvement Effects of Dajianzhong Decoction on Irritable Bowel Syndrome Visceral Pain Model Rats Based on EGC

WU Jing<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>1</sup>, YANG Yi<sup>1</sup>, LI Yaofeng<sup>1</sup>, WANG Junxia<sup>1</sup>, YANG Shasha<sup>2</sup> (1. College of Basic Medicine, Guizhong University of TCM, Guiyang 550025, China; 2. Dept. of Ophthalmology and Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital of Guizhou University of TCM, Guiyang 550002, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the improvement effect and mechanism of Dajianzhong decoction on irritable bowel syndrome (IBS) visceral pain model rats. METHODS: Totally 48 male non-weaning rats were randomly divided into normal control group, model group, pinaverium bromide group (positive control, 45 mg/kg) and Dajianzhong decoction high-dose, medium-dose and low-dose groups (2.16, 1.08, 0.54 g/kg, by crude drug), with 8 rats in each group. Except for normal control group, IBS visceral pain model was established by mother and child separation, acetic acid enema, ovalbumin intraperitoneal

[21] 钱倩宇, 应娜, 杨贞, 等. 丹参酮II<sub>A</sub>通过激活PPAR $\alpha$ 减轻4-HNE诱导的肝细胞损伤的机制研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(9): 1862-1868.

<sup>Δ</sup> 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81960821); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(No. 黔教合KY字[2017]170); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(No. QZYY-2018-026); 贵阳中医学院时珍学院大学生创新创业训练计划项目(No. 贵中医时珍大创合字[2018]2号)

\* 副教授, 硕士。研究方向: 中西医结合基础与临床。E-mail: wujingbay@163.com

# 通信作者: 副主任医师, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中西医结合基础与临床。电话: 0851-88233023。E-mail: yangyuansha88@163.com

[22] JIN W, XU W, CHEN J, et al. Remote limb preconditioning protects against ischemia induced neuronal death through ameliorating neuronal oxidative DNA damage and parthanatos[J]. *J Neurol Sci*, 2016. DOI: 10.1016/j.jns.2016.04.038.

[23] 王传杰, 吴毅, 陶峰, 等. 丰富环境对缺血性脑卒中小鼠海马区Bcl-2和Bax蛋白表达和认知功能的效果[J]. 中国康复理论与实践, 2020, 26(5): 539-543.

(收稿日期: 2020-03-26 修回日期: 2020-07-02)

(编辑: 邹丽娟)