

天麻超微粉调控胆碱能系统改善血管性痴呆大鼠 学习记忆能力

陈婷婷¹, 周雪¹, 徐旖旎¹, 杨非¹, 吴小盈¹, 冉芮¹, 向泉¹, 梁斌², 陶玲¹, 沈祥春^{1*}

(1. 贵州医科大学天然药物优效利用重点实验室, 贵州省高等学校天然药物药理与成药性评价特色
重点实验室, 贵阳 550025; 2. 贵州威门制药有限公司, 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 天麻超微粉(UPG)是否可以改善血管性痴呆(VD)大鼠的学习记忆功能障碍并且延缓VD的进程, 该作用是否与乙酰胆碱酯酶(AChE)和胆碱乙酰转移酶(ChAT)调节乙酰胆碱(Ach)的释放从而调控胆碱能系统有关。方法: 将SD大鼠随机分出假手术组, 其余大鼠通过永久性大脑中动脉闭塞法(pMCAO)复制VD大鼠模型, 并随机分为模型组, 天麻超微粉低剂量组($0.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 天麻超微粉高剂量组($1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 石杉碱甲组($80 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组各12只。给药组每天灌胃1次, 持续8周, 假手术组和模型组给予等量蒸馏水灌胃后, 通过Morris水迷宫实验对各组大鼠的学习和记忆能力进行评估; 苏木素-伊红(HE)染色对大鼠海马CA1区进行病理形态学观察; 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠海马组织中Ach的水平; 蛋白免疫印迹法检测大鼠海马组织中AChE, ChAT的蛋白表达; 免疫组化实验观察海马组织CA1区ChAT的表达情况。结果: 与假手术组比较, 模型组的逃避潜伏期增加, 穿过平台的次数和在目标象限停留的时间显著减少($P < 0.01$), 模型组海马CA1区神经细胞排列无序, 细胞核固缩且胞浆颜色较深, 坏死细胞数量增多, 海马组织中Ach的水平显著下降($P < 0.01$), AChE蛋白表达水平显著上调($P < 0.01$), ChAT蛋白表达水平明显下调($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组能够显著降低模型大鼠的逃避潜伏期, 显著增加穿过平台的次数和在目标象限停留的时间($P < 0.01$), 神经细胞排列趋于整齐, 细胞核呈圆形且胞浆染色浅, 坏死细胞减少, 海马组织中Ach水平明显增加($P < 0.05$), AChE蛋白表达显著下调, ChAT蛋白表达显著上调($P < 0.01$)。结论: 天麻超微粉能够改善血管性痴呆大鼠的学习记忆障碍, 其作用机制与上调ChAT蛋白, 抑制AChE蛋白, 提高脑内乙酰胆碱的作用密切相关。

[关键词] 天麻超微粉; 血管性痴呆; 学习记忆功能障碍; 乙酰胆碱酯酶(AChE); 胆碱乙酰转移酶(ChAT)

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)15-0026-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201503

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200507.1725.008.html>

[网络出版日期] 2020-5-8 10:46

Effect of Ultrafine Powder of *Gastrodiae Rhizoma* in Improving Learning and Memory Ability of Vascular Dementia Rats by Regulating Cholinergic System

CHEN Ting-ting¹, ZHOU Xue¹, XU Yi-ni¹, YANG Fei¹, WU Xiao-ying¹, RAN Rui¹, XIANG Quan¹,
LIANG Bin², TAO Ling¹, SHEN Xiang-chun^{1*}

(1. Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicine Resources, Key Laboratory for
Natural Medicinal Pharmacology and Drugability Evaluation for Institutions of Higher Education in
Guizhou Province, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China;
2. Guizhou Weimen Pharmaceutical Co. Ltd, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate whether ultrafine powder of *Gastrodiae Rhizoma* (UPG) can

[收稿日期] 20191122(016)

[基金项目] 贵州省天然药物成药性人才基地项目(黔人颁发[2018]3号); 贵州省社会攻关计划项目(黔科合[2016]支撑2826); 贵州省科技厅联合学术新苗项目(黔科合平台人才[2017]5718); 贵州省科技厅联合学术新苗项目(黔科合平台人才[2018]5779-20)

[第一作者] 陈婷婷, 在读硕士, 从事心脑血管药物药理研究, E-mail: 2991123353@qq.com

[通信作者] * 沈祥春, 博士, 教授, 博士生导师, 从事心脑血管药理研究, E-mail: sxc@gmc.edu.cn

alleviate the learning and memory impairment of vascular dementia rats and delay the process of VD, and whether this effect is related to the release of acetylcholine (ACh) through the regulation with acetylcholinesterase (AChE) and choline acetyltransferase (ChAT) and control of cholinergic system. **Method:** SD rats were randomly divided into sham operation group, UPG low dose group ($0.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), UPG high dose group ($1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Huperzine A group ($80 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), with 12 rats in each group. The drug administration groups were given orally drugs once a day for 8 weeks, and sham group and model group were given orally the same amount of distilled water. The learning and memory ability of the rats with VD were evaluated by the Morris water maze. Htoxylin eosin(HE) staining was used for pathomorphological observation of hippocampus CA1 area of the rats. The content of ACh was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), AChE and ChAT protein expressions were detected by Western blot, and expression of ChAT in hippocampus CA1 area was observed by immunohistochemistry. **Result:** Compared with the sham operation group, the escape latency of the model group was significantly increased ($P < 0.01$), and the frequency of crossings platform and the time of staying in the target quadrant were reduced significantly ($P < 0.01$). HE staining of hippocampal tissues from VD rat showed neuron disorders, loss and degeneration and necrosis, pyknosis of the nucleus and light coloration of the cytoplasm. The level of acetylcholine in the hippocampus was significantly decreased by ELISA ($P < 0.05$), the expression level of AChE protein was significantly up-regulated, and the expression level of ChAT protein was significantly down-regulated ($P < 0.01$). Compared with model group, each administration group could significantly reduce the escape latency of the model rats, and significantly increase the frequency of crossing platform and the time of staying in the target quadrant ($P < 0.01$), the content of ACh was significantly increased ($P < 0.05$), the expression of AChE protein was significantly down-regulated ($P < 0.01$), while the expression of ChAT protein was significantly up-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion:** UPG improves the learning and memory ability of vascular dementia rats, and its mechanism may be related to the increase of ACh, ChAT level and the decrease of AChE level.

[Key words] ultrafine powder of *Gastrodia Rhizoma*; vascular dementia; learning and memory impairment; acetylcholinesterase (AChE); choline acetyltransferase (ChAT)

血管性痴呆(VD)是由于大脑长期缺氧和低灌注导致皮质、海马等部位严重损伤,最终导致认知功能障碍^[1]。VD是第2种最常见的痴呆类型^[2],其发病机制尚不明确。以往的研究发现VD的发病可能与tau蛋白的过度磷酸化, β 淀粉样蛋白(A β)的沉积,神经纤维缠结,自噬障碍,细胞凋亡,中枢胆碱能系统的破坏等有关^[3-4]。脑血流量不足导致大脑皮层、海马体和白质慢性低灌注,引起神经元损伤,从而破坏胆碱能通路,引起学习记忆功能障碍^[5]。

慢性脑缺血模型大鼠的学习记忆能力显著降低,脑内的乙酰胆碱(ACh)的水平持续降低,而给予ACh受体激活剂时可以明显改善模型大鼠的记忆障碍^[6]。SOHN等^[7]发现,番荔枝的提取物通过调节胆碱能系统对东莨菪碱所导致的小鼠认知缺陷具有改善作用。故VD所伴随的认知功能障碍可能是由于中枢胆碱能神经递质功能缺损导致的。因此以中枢胆碱能系统为研究靶点,寻找治疗VD的有效药物将是一个新的突破口。

天麻为兰科植物 *Gastrodia elata* 干燥块茎,具有镇静催眠、抗炎、抗氧化等作用^[8]。天麻的常见方剂有天麻丸、半夏白术天麻汤、天麻钩藤饮等。其中天麻丸能够缓解各种神经性疼痛;半夏白术天麻汤对痰湿壅盛型高血压具有较好的治疗作用;天麻钩藤饮联合丁苯酞能够减轻脑缺血损伤^[9-11]。本课题组前期通过生物活性限值测定法研究天麻的镇静催眠作用,同时发现天麻粉可通过抗氧化作用改善APP/PS1痴呆小鼠的学习记忆障碍^[12-13]。研究证实天麻酚类成分可通过增加神经元和星形胶质细胞的存活率减轻海马半影区的病理损伤,改善大鼠大脑缺血再灌注后认知功能障碍。天麻提取物通过调节胆碱能通路改善记忆获得障碍模型小鼠的记忆获得能力^[14-15]。但目前对天麻是否可以通过调节中枢胆碱能系统从而改善VD伴随的认知功能障碍并未见报道。

本实验采用MCAO法建立大鼠痴呆模型,以ACh为研究的关键靶位,探讨天麻超微粉改善VD

的作用机制,为传统中药防治VD开拓新的实验基础和理论指导。

1 材料

1.1 动物 雄性SD大鼠,体质量(260 ± 20) g,实验动物均按照国家实验动物饲养和使用指南,饲养于贵州医科大学动物实验中心SPF级环境,合格证号SCXK(黔)2018-0001,批准号NO1800157。适应性喂养7 d后开始实验。本实验所涉及动物的相关操作均在贵州医科大学实验动物伦理委员会的批准下进行,并严格遵循相关准则。

1.2 药品与试剂 全天麻胶囊(贵州益康制药有限公司,批号20170702);石杉碱甲(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号H107335);ACh测定试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号SN368);乙酰胆碱酯酶(AChE),胆碱乙酰转移酶(ChAT), β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国Proteintech公司,批号分别为20747-1-AP,66009-1-Ig,66009-1-Ig);抗兔二抗,抗鼠二抗(美国Bioworld公司,批号分别为BS13278,BS12478);通用SP试剂盒,DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为K186614B,ZLI-9018);苏木素染色液,伊红染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为G1140,G1100)。

1.3 仪器 MWT-100型Morris水迷宫视频分析系统(成都泰盟科技有限公司);700-SERIES型超低温冰箱(美国Thermo Scientific公司);CFX型凝胶成像系统仪,16580002型转膜仪和电泳仪(美国Bio-Rad公司);ELX800型全自动酶标仪(美国BioTek公司);XDS-2B型倒置显微镜(日本尼康公司)。

2 方法

2.1 动物造模、分组与给药 Longa线栓法^[16]复制VD模型。造模前12 h内不能进食但可自由饮水,在大鼠腹中线的一侧将10%水合氯醛($4\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$)注入腹腔。在大鼠完全麻醉后,将大鼠仰卧,四肢用橡皮筋轻轻的固定于手术台上,剪刀将颈部的毛去除,75%乙醇和碘伏擦拭颈部皮肤进行消毒。手术刀在气管的正上方切口3~4 cm,用带钩弯镊、玻璃分针分离左侧颈总动脉,结扎近心端,远心端下方提前准备棉线备用。首先钝性分离颈外动脉予以结扎,其次分离左颈内动脉。距离分叉2 mm的CCA处剪V形小口,缓慢插入线栓,遇阻力时停止,进线大约18 mm,CCA上的备用线固定线栓。取出ICA上的备用线,剪掉多余线栓。缝合颈部皮肤,碘伏消毒,仰卧于鼠笼中,头部轻轻抬高。单笼饲养,

连续3 d腹腔注射青霉素预防术后感染死亡。假手术组不插线栓,其余操作同之前所述。使其缺血24 h,采用Longa法^[17]对神经功能损伤进行评分。将分数为0分和4分的大鼠淘汰,留下1分至3分者。由于72 h之内>2分者死亡率较高,因此将评分为1~2分的大鼠用于后续实验。将1分和2分的大鼠随机分为模型组,天麻超微粉低剂量组($0.45\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),天麻超微粉高剂量组($1.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),石杉碱甲组($80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组各12只。假手术组也是12只。假手术组和模型组通过灌胃的方式给予等量蒸馏水,各给药组给予药物灌胃,1次/d,灌胃8周。

2.2 Morris水迷宫实验 参考文献方法^[18],每天同一时间开始,随机将各组的大鼠进行定位航行实验,每天进行4次,共训练5 d。训练开始前,在水迷宫反应桶中注水至高出平台2 cm时,放入加热棒,将水温保持在25℃。再将平台移置目标象限的中心,设置实验程序即可开始实验。将大鼠从设置的4个象限的桶边缘背对目标象限放入水中,系统自动记录大鼠游过的轨迹。让120 s内登陆平台的大鼠停留20 s,超过120 s未登陆平台指引到平台停留20 s。5 d后开始空间探索实验,系统自动记录大鼠行动的轨迹。

2.3 苏木素-伊红(HE)染色检测脑组织病理学变化 取脑组织固定于4%多聚甲醛中,石蜡包埋,切片,HE染色,细胞核呈蓝色,胞浆及其他组织染成粉红色,置于电子显微镜下观察,拍照并分析。

2.4 ACh水平测定 分别取各组大鼠的海马组织20 mg,350 μL 预冷PBS匀浆,2 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min,取上清。标准孔中加入不同浓度的标准溶液50 μL ,加入样本10 μL ,稀释液补足50 μL 体积,加酶标试剂100 μL ,37℃培养箱放置1 h,洗涤5次,空白孔不做上述操作。每个孔中加入显色剂,37℃培养箱避光显色15 min,加入终止液(浅蓝色变为黄色),波长为450 nm处检测吸光度A,根据标准曲线计算ACh水平。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测AChE,ChAT蛋白的表达 每组5只大鼠左侧的海马组织20 mg,加入PIPA裂解液350 μL 匀浆,于摇床低速摇30 min后在4℃低温条件下12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min。使用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度;每组分装30 μg 蛋白样品,加入loading补足20 μL 体积,在100℃的条件下使蛋白变性。使用12%SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,5%BSA室温封闭2 h。

膜上加入AChE(1:1 000),ChAT(1:1 000), β -actin(1:1万)抗体后置于4℃冰箱。次日,一抗在室温低速摇1 h后,TBST洗去一抗,加入二抗(1:1万)孵育90 min,再用TBST洗去二抗。采用Bio-Rad系统进行成像,Image Lab 5.0软件分析灰度值。

2.6 免疫组化检测ChAT蛋白表达 脑组织切片脱蜡,并通过 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸盐缓冲液中微波加热20 min实现抗原修复。将切片依次与3% H_2O_2 孵育15 min,山羊血清封闭30 min,滴加一抗ChAT(1:200)于4℃孵育过夜。滴加生物素标记山羊抗小鼠/兔IgG孵育30 min,之后滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液孵育20 min,最后用DAB底物染色并用苏木素复染。每组取3例,每例测5个海马CA1区的200倍视野用图像分析软件Image J对海马组

织切片CA1区免疫荧光阳性区域的面积进行统计。

2.7 统计学方法 采用SPSS 22.0软件进行统计学处理,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组数据间的比较采用单因素方差分析,方差齐时用LSD法,方差不齐时用Dunnett's T3,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Morris水迷宫实验

3.1.1 天麻超微粉对VD大鼠定位航行实验的影响 与假手术组比较,第2天模型组大鼠首次登上平台的时间(逃避潜伏期)明显延长($P<0.05$);与模型组比较,天麻超微粉高剂量组和石杉碱甲组在第3天以后的逃避潜伏期显著降低($P<0.01$);与石杉碱甲组比较,天麻超微粉高剂量组大鼠的逃避潜伏期的变化差异无明显统计学意义。见表1。

表1 天麻超微粉对VD大鼠空间探索实验的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of ultrafine powder of Gastrodiae Rhizoma(UPG) on navigation test in VD model rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
假手术	—	85.00±39.08	45.44±25.75	33.00±23.50	26.70±10.33	19.70±11.61
模型	—	111.20±21.73	103.33±30.87 ¹⁾	102.78±26.23 ²⁾	84.00±27.04 ²⁾	68.89±24.52 ²⁾
天麻超微粉	0.45	108.90±23.4	107.20±29.84	82.44±24.07	66.75±22.42 ³⁾	50.63±15.43 ⁴⁾
	1.8	95.50±34.72	84.70±39.27	41.33±21.58 ⁴⁾	45.33±16.07 ⁴⁾	32.71±15.79 ⁴⁾
石杉碱甲	8×10^{-5}	107.70±21.68	61.40±43.01	45.90±43.12 ⁴⁾	39.71±13.78 ⁴⁾	28.50±21.29 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2~5同)。

3.1.2 对VD大鼠空间探索实验的影响 与假手术组比较,第6天时模型组大鼠首次穿过平台的时间显著延长($P<0.01$),2 min时大鼠穿过平台次数降低,停留在目标象限的时间显著减少($P<0.01$);

与模型组比较,给予天麻超微粉,大鼠第1次穿过平台的时间显著降低($P<0.01$),进入平台次数和在目标象限的停留时间显著增加($P<0.05$)。见表2。

表2 天麻超微粉对VD大鼠空间探索实验的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of UPG on space exploration test in VD model rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

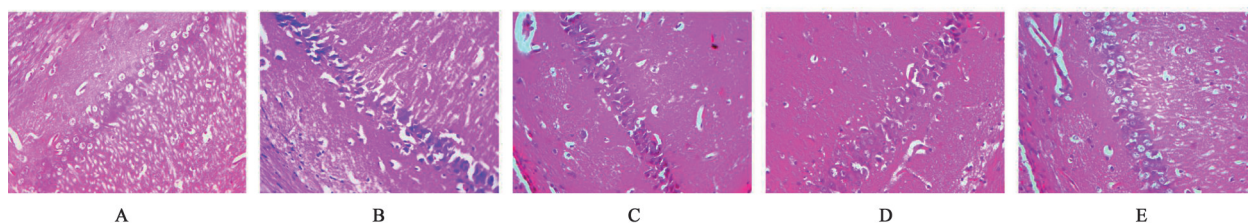
组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	第1次穿过平台时间/s	穿台次数/次	目标象限所占百分比/%
假手术	—	19.90±5.42	6.40±1.42	34.44±11.67
模型	—	89.37±31.03 ²⁾	1.73±1.01 ²⁾	19.78±4.12 ²⁾
天麻超微粉	0.45	84.85±12.61	3.00±1.32 ³⁾	21.35±2.92
	1.8	45.42±16.24 ⁴⁾	4.50±2.22 ⁴⁾	32.97±12.56 ⁴⁾
石杉碱甲	8×10^{-5}	31.12±19.43 ⁴⁾	5.00±1.85 ⁴⁾	33.32±13.53 ⁴⁾

3.2 对VD大鼠脑组织病理形态的影响 假手术组大鼠CA1区神经元细胞应有序排列、细胞与细胞之间联系紧密,细胞核呈圆形且胞浆颜色浅而均匀;与假手术组比较,模型组细胞结构紊乱,细胞外间隙变大,胞核固缩且染色较深,变形和坏死细胞数量明显增加;给予天麻超微粉可逆转以上病变,由图可见神经细胞排列趋于整齐,坏死细胞减少,

细胞核呈圆形,胞浆染色变浅。见图1。

3.3 对VD大鼠海马组织中ACh水平的影响 与假手术组比较,VD大鼠海马中ACh水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,给予天麻超微粉后,可以显著的增加VD大鼠海马中ACh的水平($P<0.01$)。见表3。

3.4 对VD大鼠海马中AChE和ChAT蛋白表达水



A.假手术组;B.模型组;C.天麻超微粉低剂量组;D.天麻超微粉高剂量组;E.石杉碱甲组(图2,3同)

图1 天麻超微粉对VD大鼠海马CA1区病理形态的影响(HE,×200)

Fig.1 Effect of UPG on microstructure of hippocampal CA1 in rats with vascular dementia(HE,×200)

表3 天麻超微粉对VD大鼠脑组织中ACh水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of UPG on ACh content in brain tissue of rats with vascular dementia($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ACh/mg·g ⁻¹
假手术	—	52.47±3.97
模型	—	40.17±3.09 ¹⁾
天麻超微粉	0.45	43.80±5.07
	1.80	50.62±1.94 ³⁾
石杉碱甲	8×10 ⁻⁵	52.56±3.17 ³⁾

平的影响 与假手术组比较,模型组中AChE蛋白水平显著上调($P<0.01$),ChAT蛋白表达显著下调($P<0.01$);与模型组比较,天麻超微粉高剂量显著下调AChE蛋白的表达($P<0.01$),显著上调ChAT蛋白的表达($P<0.01$)。见图2,表4。

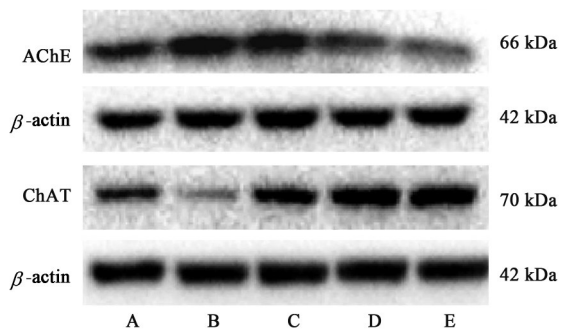


图2 大鼠海马中AChE和ChAT蛋白电泳

Fig.2 Electropherogram of AChE and ChAT proteins in hippocampus of rats

3.5 对VD大鼠CA1区ChAT蛋白表达的影响 与假手术组比较,显著下调模型组中ChAT蛋白水

表4 天麻超微粉对VD大鼠海马中AChE和ChAT蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of UPG on expression of AChE and ChAT in microstructure of hippocampal in rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	AChE/β-actin	ChAT/β-actin
模型	—	1.51±0.11 ²⁾	0.43±0.07 ²⁾
天麻超微粉	0.45	1.10±0.14 ³⁾	0.76±0.012 ⁴⁾
	1.80	0.95±0.13 ⁴⁾	0.90±0.04 ⁴⁾
石杉碱甲	8×10 ⁻⁵	0.88±0.10 ⁴⁾	0.99±0.09 ⁴⁾

设:假手术组各蛋白相对表达量为1。

平;与模型组比较,给予药物处理之后,可以显著改善ChAT的异常降低。见图3,表5。

表5 天麻超微粉对VD大鼠海马中CA1区ChAT蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of UPG on protein expression of ChAT protein in hippocampal CA1 region of VD rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ChAT
假手术	—	1
模型	—	0.39±0.07 ²⁾
天麻超微粉	0.45	0.54±0.05 ³⁾
	1.80	0.87±0.11 ⁴⁾
石杉碱甲	8×10 ⁻⁵	1.24±0.05 ⁴⁾

4 讨论

VD是脑血管相关疾病引起的以学习记忆障碍为主要特征的获得性智能损害综合征。随着我国老龄人口数量的快速增加,VD的发病率也呈逐年上升的趋势,使得人类生命健康受到严重威胁^[19]。因此探讨VD的诱发因素及病理机制,寻找新的有

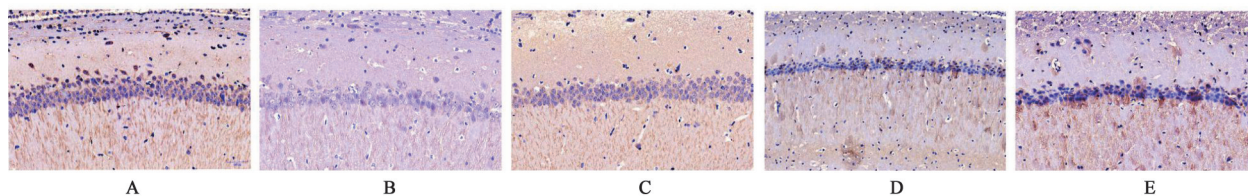


图3 天麻超微粉对VD大鼠CA1区ChAT蛋白表达的影响(免疫组化,×200)

Fig.3 Effect of UPG on expression of ChAT in hippocampal CA1 area of rats with vascular dementia(IHC,×200)

效治疗药物已成为脑血管相关疾病研究的重心。

中枢胆碱能神经元的变化是导致VD认知和行为障碍发生的关键事件之一^[20]。当大脑长期处于缺氧缺血状态时,引起大脑海马神经元的磷脂代谢减慢,氧自由基大量累积以及胞内钙离子超载等异常病理变化,从而导致ACh的水平降低,最终使患者的认知功能受损^[21]。ACh由ChAT催化合成、释放,后被AChE水解,因此ChAT和AChE的动态平衡是维持哺乳动物正常进行学习记忆的必要条件^[22]。AChE将ACh水解为胆碱和乙酸而失活的过程主要是在神经突触连接处进行,进而调控胆碱能神经突触间的信息传递,最终影响大脑功能^[23]。AChE活性在VD大鼠皮质、海马、纹状体3个不同部位均显著升高,提示脑部长期供血不足使得胆碱能神经元发生病变,促进AChE释出,促使脑内可溶性AChE活性升高,从而降低ACh水平,引起认知功能障碍^[24]。同时也有研究显示,VD模型大鼠的学习记忆能力显著降低,海马CA1区ChAT表达减少,说明胆碱乙酰转移酶参与VD的发生^[25]。本实验同样发现,VD大鼠海马中的ACh的释放显著降低,合成乙酰胆碱的关键酶ChAT的表达显著下调,水解ACh的关键酶AChE的表达显著增加,以上结果提示在长期大脑供血不足的情况下,可能使得神经递质ACh的合成受阻,最终引起海马释放ACh的水平减少,从而导致认知功能受损。

胆碱酯酶抑制剂增加了大脑突触中ACh的利用率,并且是临床上已被证明可用于治疗痴呆的少数药物疗法之一,从而使胆碱能系统成为该疾病的重要治疗靶点^[26]。已有研究报道石杉碱甲可通过调节海马神经细胞缺血、缺氧状态,上调ChAT异常低表达,改善VD小鼠的学习、记忆障碍^[27]。EHRET等^[28]提出降低AChE的活性、促进ACh释放是一种常用于治疗AD患者的方法。而临床研究显示,天麻具有良好的中枢神经药理作用,可以用于防治中枢神经系统疾病^[29]。本实验通过MCAO法建立VD模型,长期给予天麻超微粉灌胃后,探讨天麻超微粉对VD大鼠胆碱能系统调控作用。结果显示,天麻超微粉可显著的降低VD模型大鼠的逃避潜伏期,增加进入平台的次数及目标象限的停留时间,提示天麻超微粉对VD大鼠学习记忆功能的降低具有改善作用。ELISA和Western blot以及免疫组化实验结果显示,与模型组比较,天麻超微粉显著增加海马组织中ACh水平,ChAT的蛋白表达,降低AChE蛋白表达。同时韩春妮等^[15]也发现天麻提取

物通过调节胆碱能通路改善记忆获得障碍模型小鼠的记忆能力。因此推测天麻超微粉可能通过调节胆碱能系统促进神经递质ACh的释放,从而改善VD大鼠的学习记忆障碍。

[参考文献]

- [1] KALARIA R N. Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathologica*, 2016, 131(5): 659-685.
- [2] 陈可爱. 电针“长强”穴对血管性痴呆大鼠学习记忆及海马CA1区细胞凋亡的影响[D]. 福州: 福建中医药大学, 2013.
- [3] TANG S C, YANG K C, CHEN C H, et al. Plasma β -amyloids and tau proteins in patients with vascular cognitive impairment [J]. *Neuromolecular Med*, 2018, 20(4): 498-503.
- [4] BO L, JIAN-MEI G, FEI L, et al. Gastrodin attenuates bilateral common carotid artery occlusion-induced cognitive deficits via regulating $A\beta$ -related proteins and reducing autophagy and apoptosis in rats [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 405.
- [5] ANTONIO L, BERNARD B, JOHN N M, et al. Evaluation of novel dual acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors as potential anti-alzheimer's disease agents using pharmacophore, 3D-QSAR, and molecular docking approach [J]. *Molecules*, 2017, 22(8): e1254.
- [6] YUKINISA M, QI Z, KOUSUKE H, et al. Choto-san, a kampo formula, improves chronic cerebral hypoperfusion induced spatial learning deficit via stimulation of muscarinic M1 receptor [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2005, 81(3): 616-625.
- [7] SOHN E, LIM H S, KIM Y J, et al. Annona atemoya leaf extract improves scopolamine-induced memory impairment by preventing hippocampal cholinergic dysfunction and neuronal cell death [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3538.
- [8] 郭莲, 宋娜丽, 万春平. 天麻的鉴定与药理活性研究进展 [J]. *云南中医中药杂志*, 2019, 40(7): 76-78.
- [9] 段海燕. 穹天麻丸治疗各型神经痛的疗效观察 [J]. *中国民族民间医药*, 2010, 19(24): 163.
- [10] 徐男, 时海燕, 王淑玲, 等. 基于正交试验配合多药效指标综合评价半夏白术天麻汤治疗痰湿壅盛型高血压的有效组分配伍 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(21): 7-13.
- [11] 聂宗泉. 天麻钩藤饮联合丁苯酞治疗急性脑梗死患者的临床效果 [J]. *世界中医药*, 2019, 14(9): 2363-

- 2366.
- [12] 周雪,陈婷婷,蒋朝晖,等. 基于镇静催眠作用的天麻超微粉生物活性限值测定方法研究[J]. 中药药理与临床,2018,34(5):134-138.
- [13] 高玉梅,王晓玲,邓于新,等. 天麻粉预防痴呆小鼠模型发病及其对抗氧化作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(2):52-58.
- [14] ANHUAN S, JIANMING X, FANGYAN H, et al. The phenolic components of *Gastrodia elata* improve prognosis in rats after cerebral ischemia/reperfusion by enhancing the endogenous antioxidant mechanisms[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, doi: 10.1155/2018/7642158.
- [15] 韩春妮,何芳雁,田野,等. 天麻提取物对记忆获得障碍模型小鼠胆碱能系统的影响[J]. 中国药业,2014(21):3-4.
- [16] 顾力华,杨仁华,陈奇刚,等. 桑芪首乌片对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积及脑组织形态病理的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2018,24(8):48-50,59.
- [17] 廖金明,余梦黎,秦莎莎,等. 羟基红花黄色素A、芍药苷单用及联合对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织NF- κ B及炎症因子的影响[J]. 中药药理与临床,2018,34(3):51-55.
- [18] 姜舒,易湘茜,沈关媛,等. 榄钱含片对东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的改善作用研究[J]. 中国药房,2019,30(1):36-39.
- [19] 李启正,杨东东,刘美君,等. 中医治疗血管性痴呆的临床研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘:电子版,2018,18(6):54-55.
- [20] SHEN J X, TU B, YAKEL J L. Inhibition of α 7-containing nicotinic ACh receptors by muscarinic M1 ACh receptors in rat hippocampal CA1 interneurons in slices[J]. *J Physiol*, 2009, 587(5):1033.
- [21] NI J W, MATSUMOTO K, LI H B, et al. Neuronal damage and decrease of central acetylcholine level following permanent occlusion of bilateral common carotid arteries in rat[J]. *Brain Res*, 1995, 673(2):290-296.
- [22] ZHAO R R, XU F, XU X C, et al. Effects of α -lipoic acid on spatial learning and memory, oxidative stress, and central cholinergic system in a rat model of vascular dementia[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 587:113-119.
- [23] LUO Y, ZHAO H P, ZHANG J, et al. Effect of ferulic acid on learning and memory impairments of vascular dementia rats and its mechanism of action[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2012, 47(2):256-260.
- [24] SEZ-VALERO J, GONZLEZ-GARCA C. Acetylcholinesterase activity and molecular isoform distribution are altered after focal cerebral ischemia[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2003, 117(2):240-244.
- [25] 吴桓宇,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,2018,272(16):19-23.
- [26] HARALD H, M-MARSEL M, CLAUDIO C A, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease[J]. *Brain*, 2018, 141(7):1917-1933.
- [27] 吕佩源,宋春,樊敬峰. 石杉碱甲对血管性痴呆小鼠学习记忆及海马胆碱乙酰转移酶的影响[J]. 中国行为医学科学,2005,14(12):1068-1070.
- [28] EHRET M J, CHAMBERLIN K W. Current Practices in the treatment of alzheimer disease: where is the evidence after the phase III trials?[J]. *Clin Ther*, 2015, 37(8):1604-1616.
- [29] 张成宸,石京山. 天麻的酚类成分及其中枢神经药理学作用研究进展[J]. 中药药理与临床,2019,35(2):167-174.

[责任编辑 周冰冰]