

芪仙通络方对脑梗死大鼠突触可塑性与功能恢复的影响及机制研究

周胜强^{1,2}, 寿雅琨², 王琦², 李博³, 刘芳¹, 邓奕辉²(1. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410006; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 3. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

摘要: **目的** 观察芪仙通络方对脑梗死大鼠突触可塑性与功能恢复的影响, 从脑源性神经营养因子(BDNF)/酪氨酸激酶受体 B (TrkB)/环磷酸腺苷应答元件结合蛋白(CREB)信号通路角度探讨其作用机制。**方法** 线栓法复制大鼠中动脉阻塞(MCAO)大鼠模型。将 36 只模型复制成功的大鼠随机分为模型组、芪仙通络方组(15.66 g·kg⁻¹, 灌胃给药)、K252a 组(50 μg·kg⁻¹, 腹腔注射)、芪仙通络方(15.66 g·kg⁻¹, 灌胃给药)+K252a(50 μg·kg⁻¹, 腹腔注射)组、胞磷胆碱组(0.054 g·kg⁻¹, 灌胃给药)以及溶剂对照组, 另设假手术组 6 只。术后第 3 天开始干预给药, 每日 1 次, 连续干预 12 d。于术后第 3、7、14 天采用 Longa 评分法评定大鼠神经功能; 术后第 14 天采用镀银染色和透射电镜分别观察缺血周边组织神经元突触一般结构与超微结构变化, 免疫组化法检测缺血周边组织中突触可塑性标志蛋白突触素(SYN)、突触后致密物-95(PSD-95)表达, Western Blot 法检测缺血周边组织中 BDNF、TrkB、CREB 以及磷酸化环磷酸腺苷应答元件结合蛋白(p-CREB)表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能缺损症状明显, 各时间点神经功能评分明显升高($P<0.01$); 缺血周边组织神经元树突分支数量、树突棘与突触数量明显减少, 突触结构模糊, 部分突触囊泡出现膨大破损, 突触后致密物质减少; 突触可塑性标志蛋白 SYN 与 PSD-95 表达均明显减少($P<0.01$); BDNF 与 p-CREB 蛋白表达均增加($P<0.05$), 而 TrkB 与 CREB 蛋白表达相当($P>0.05$)。与模型组比较, 芪仙通络方组第 14 天神经功能评分明显降低($P<0.01$); 缺血周边组织神经元树突分支数量、树突棘与突触数量明显增加, 突触结构较为清晰, 突触后致密物质与突触囊泡数目增多; SYN、PSD-95、BDNF 与 p-CREB 蛋白表达均明显增加($P<0.05$, $P<0.01$), 但 TrkB 与 CREB 蛋白表达相当($P>0.05$)。与芪仙通络方组比较, 芪仙通络方+K252a 组第 14 天神经功能评分有所升高($P<0.01$); 缺血周边组织神经元树突分支数量、树突棘密度与突触数量减少, 神经元突触超微结构损伤程度加重; SYN、PSD-95、BDNF 与 p-CREB 蛋白表达均减少($P<0.01$), 而 TrkB 与 CREB 蛋白表达相当($P>0.05$)。**结论** 芪仙通络方可促进脑梗死大鼠突触可塑性与功能恢复, 其机制与调控 BDNF/TrkB/CREB 信号通路活性有关。

关键词: 芪仙通络方; 脑梗死; 突触可塑性; BDNF/TrkB/CREB 信号通路; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)07-0912-08

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783.2021.07.002

Effect and Mechanism of *Qixian Tongluo* Formula on Synaptic Plasticity and Functional Recovery in Rats with Cerebral Infarction

ZHOU Shengqiang^{1,2}, SHOU Yakun², WANG Qi², LI Bo³, LIU Fang¹, DENG Yihui²(1. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006 Hunan, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208 Hunan, China; 3. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007 Hunan, China)

Abstract: Objective To observe the effect of *Qixian Tongluo* formula on synaptic plasticity and functional recovery

收稿日期: 2021-04-10

作者简介: 周胜强, 男, 主治医师, 博士, 研究方向: 中医药防治脑病的临床与基础研究。Email: 549160941@qq.com。通信作者: 刘芳, 女, 研究员, 研究方向: 名老中医经验继承与脑病研究。Email: msliufang23@126.com。邓奕辉, 女, 教授, 研究方向: 中西医结合防治糖尿病血管并发症。Email: 644138330@qq.com。

基金项目: 国家中医药管理局“刘祖贻国医大师传承工作室建设项目”(2015 年); 湖南省教育厅重点项目(18A225); 湖南省教育厅优秀青年项目(18B253); 湖南省中医药管理局一般课题(2021083); 湖南省中医药研究院院级重点课题(201902); 湖南省“国内一流培育学科”中西医结合开放基金项目(2019ZXYJH01)。

in rats with cerebral infarction and explore the mechanism of action from the perspective of brain derived neurotrophic factor (BDNF)/tyrosine kinase receptor B (TrkB)/cAMP response element binding protein (CREB) signaling pathway. **Methods** The middle cerebral artery occlusion (MCAO) rat model was established by suture method. Thirty-six model rats were randomly divided into model group, *Qixian Tongluo* formula group ($15.66 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, intragastric administration), K252a group ($50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, intraperitoneal injection), *Qixian Tongluo* formula ($15.66 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, intragastric administration) + K252a ($50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, intraperitoneal injection) group, Citicoline group ($0.054 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, intragastric administration) and solvent control group. In addition, six rats underwent sham operation. The intervention administration was started on the 3rd day after operation once a day for 12 consecutive days. On the 3rd, 7th, and 14th day after operation, neurological function was evaluated by Longa score. On the 14th day after operation, the general structure and ultrastructural changes of synapse in the peri-ischemia tissue were observed by silver staining and transmission electron microscope, respectively. The expression of synaptic plasticity marker protein [synaptophysin (SYN) and postsynaptic density-95 (PSD-95)] in the peri-ischemia tissue were detected by immunohistochemistry, and the expression of BDNF, TrkB, CREB and phosphorylated cAMP response element binding protein (p-CREB) in the peri-ischemia tissue were detected by Western Blot. **Results** Compared with the sham operation group, model group had obvious symptoms of neurological deficits, the neurological function scores were significantly increased at each time point ($P < 0.01$), the number of neuronal dendritic branches, dendritic spines and synapses in the peri-ischemia tissue were significantly reduced, the synapse structure was blurred, some synaptic vesicles were enlarged and damaged, the post-synaptic dense material was reduced, the expressions of synaptic plasticity marker proteins SYN and PSD-95 were significantly decreased ($P < 0.01$), the protein expressions of BDNF and p-CREB were increased ($P < 0.05$), but the expressions of TrkB and CREB protein were similar ($P > 0.05$). Compared with the model group, the neurological function scores were significantly reduced on the 14th day ($P < 0.01$), the number of dendritic branches, dendritic spines and synapses in the peri-ischemia tissue were significantly increased, the synaptic structure was relatively clear, the number of post-synaptic dense substances and synaptic vesicles were increased, the expressions of SYN, PSD-95, BDNF and p-CREB protein were all significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but there was no significant difference between TrkB and CREB protein expression in *Qixian Tongluo* formula group ($P > 0.05$). Compared with the *Qixian Tongluo* formula group, the neurological function scores were increased to a certain degree on the 14th day ($P < 0.01$), the number of dendritic branches, dendritic spines and synapses in the peri-ischemia tissue were decreased, the degree of synaptic ultrastructure damage was worse, the expressions of SYN, PSD-95, BDNF and p-CREB protein were all decreased ($P < 0.01$), while the expressions of TrkB and CREB protein were equivalent in *Qixian Tongluo* formula + K252a group ($P > 0.05$). **Conclusion** *Qixian Tongluo* formula can promote synaptic plasticity and functional recovery in rats with cerebral infarction, and the mechanism is related to regulating the activity of BDNF/TrkB/CREB signaling pathway.

Keywords: *Qixian Tongluo* formula; cerebral infarction; synaptic plasticity; BDNF/TrkB/CREB signaling pathway; rats

脑梗死是目前导致人类残疾的主要原因之一^[1]。急性期时间窗内静脉溶栓或机械取栓是西医治疗本病的有效方法,但由于严格的时间窗限制,临床获益率较低,大部分患者均会留下不同程度的肢体瘫痪、痴呆等神经功能障碍^[2]。功能障碍的根本原因为有效神经环路的减少或缺失,突触作为神经元之间信号传递的关键部位,重塑神经元突触可以形成新

的神经环路,因此如何促进脑梗死后突触可塑性以改善受损神经功能越来越引起了医务工作者的关注^[3]。

近年来,中医药治疗脑梗死已取得公认的疗效,其作用机理的研究亦较为深入,但多限于急性期,而对于脑梗死慢性期,特别是中医药促进缺血后功能恢复的机制探讨方面则报道较少^[4]。中医学认为脑梗死后功能障碍可归属为“中风”“偏枯”等疾病范

畴,其病机主要为肾虚血瘀,因此补肾活血为其重要治法^[5]。

芪仙通络方系国医大师刘祖贻教授经 60 余年临床经验总结形成的中风病防治效验方,具有补肾活血功效。前期临床研究^[6]表明,芪仙通络方能明显改善脑梗死恢复及后遗症期肾虚血瘀证患者的神经功能,提高其日常生活活动能力,且具有良好的安全性。实验研究^[7]发现,该方能明显促进脑梗死大鼠功能恢复,上调缺血脑内脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)表达。但目前尚不明确其是否可通过调节 BDNF/酪氨酸激酶受体 B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)/环磷酸腺苷应答元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)信号通路来改善脑梗死大鼠突触可塑性及神经功能。

为进一步阐明芪仙通络方促进脑梗死后功能恢复的作用机理,本研究利用大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型,从突触可塑性角度,结合 TrkB 特异性酪氨酸激酶抑制剂 K252a,探究其促进脑梗死后功能恢复的关键作用环节及与 BDNF/TrkB/CREB 信号通路的关系,以期为本方的临床推广应用及产业化开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠,雄性,SPF 级,9 周龄,体重(300 ± 20) g,湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK(湘)2016-0002,动物质量合格证号:1107271911000315。饲养于湖南省中医药研究院 SPF 级实验动物中心,使用许可证号:SCXK(湘)2015-0008。饲养环境温度(24 ± 0.5)℃,相对湿度 50%,自由饮食进水,昼夜光照节律。本实验获湖南省中医药研究院实验动物伦理委员会批准,批准号:2019-0038,实验过程中严格遵守《实验动物管理条例》。所有大鼠适应性喂养 7 d。

1.2 药物及试剂 芪仙通络方由黄芪、淫羊藿、丹参、枸杞子、制首乌、葛根、水蛭、山楂组成,中药饮片购自湖南省中医药研究院附属医院中药房,由药剂科田其学主任药师鉴定为正品。胞磷胆碱钠胶囊,齐鲁制药有限公司,批号:8A0284E20;K252a,美国 CST 公司,批号:1275S;二甲基亚砜(DMSO),北京索莱宝科技有限公司,批号:DB371;电镜固定液、4%多聚甲醛固定液、甘氨酸银染液套装和免疫组化试剂盒,武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为:G1102、G1101、

G1052、G1215;Anti-突触素(synaptophysin, SYN) Rabbit pAb、Anti-突触后致密物-95 (postsynaptic density-95, PSD-95) Rabbit pAb、Anti-beta Actin Rabbit pAb、HRP 标记山羊抗兔、HRP 标记的山羊抗小鼠和 Anti-TrkB Rabbit pAb,武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为:GB11553、GB11277、GB1101、GB23303、GB23301、GB11295-1;Anti-BDNF Rabbit pAb,武汉三鹰生物技术有限公司,批号:25699-1-AP;Mouse Anti-CREB Monoclonal Antibody 和 Rabbit Anti-phospho-CREB (Ser133) Polyclonal Antibody,北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为:bsm-33196M、bs-0036R。

1.3 仪器 2838A4 型 MCAO 线栓,北京西浓科技有限公司;JJ-12J 型组织脱水机、JB-P5 型石蜡包埋机,武汉俊杰电子有限公司;RM2016 型石蜡切片机,上海徕卡仪器有限公司;KD-P 型组织摊片机,浙江省金华市科迪仪器设备有限公司;Eclipse E100 型正置光学显微镜,日本 Nikon 公司;BV-2 型电泳仪、BT-2 型转膜仪,武汉赛维尔生物科技有限公司;ChemiScope 6000 型化学发光成像系统,上海勤翔科学仪器有限公司;EM UC7 型超薄切片机,德国 Leica 公司;HT7700 型透射电子显微镜,日本 Hitachi 公司。

1.4 模型复制 采用线栓法复制大鼠 MCAO 模型^[7]。术前禁食不禁水 12 h,大鼠给予 10%水合氯醛腹腔注射麻醉后,仰卧位固定于手术操作台上,取颈部正中切口,分离左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,结扎颈总动脉、颈外动脉,动脉夹夹闭颈内动脉;于颈总动脉上端近分叉处约 4 mm 处用注射器针头刺一小孔,将直径为 0.28 mm 的线栓插入颈内动脉,线栓头端至大脑中动脉开口处,插入深度由分叉部计约 18.0 mm,固定线栓,依次关闭切口。假手术组仅切开皮肤,暴露颈总、颈外和颈内动脉,不插入线栓,其余步骤同前。模型以提尾时不能完全伸展右前肢,或行走时向右侧倾倒或转圈为成功标准。

1.5 分组及给药方法 将 36 只模型复制成功的大鼠按随机数字表法随机分为模型组、芪仙通络方组、K252a 组、芪仙通络方+K252a 组、胞磷胆碱组以及溶剂对照组,每组 6 只。另设假手术组 6 只。术后第 3 天开始干预,芪仙通络方水煎后浓缩药液至 1.566 g·mL⁻¹,根据成人临床等效剂量换算,灌胃给药剂量为 15.66 g·kg⁻¹;胞磷胆碱用生理盐水溶解稀释至 0.005 4 g·mL⁻¹,灌胃给药剂量为 0.054 g·kg⁻¹;

假手术组、模型组、K252a 组及溶剂对照组分别予以等体积生理盐水灌胃。同时, K252a 组用含 25% DMSO 的生理盐水溶解 K252a 至 $15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 腹腔注射剂量为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1[9]}$; 溶剂对照组予以等体积含 25% DMSO 的生理盐水腹腔注射。以上每日 1 次, 连续干预 12 d。

1.6 标本采集与处理 各组大鼠于术后第 14 天, 药物干预后 4 h 取材。10%水合氯醛腹腔注射麻醉后, 打开大鼠胸腔暴露心脏, 剪开右心耳, 将注射器针头经心尖插入至主动脉端并固定好, 用 100 mL 生理盐水通过注射器快速注入; 待心脏无血污流出及前爪、肺部颜色变成白色后, 开颅取脑, 去除小脑、脑干及嗅球后, 切取缺血周边组织。一部分置于 4% 多聚甲醛中固定, 用于镀银染色和免疫组化检测。另外一部分分成 2 份, 一份迅速投入液氮中冷冻, 然后存放于 -80°C 冰箱保存, 用于 Western Blot 检测; 一份切成 1 mm^3 大小的组织块, 迅速投入预冷的电镜固定液中, 于 4°C 冰箱保存, 用于透射电镜检测。

1.7 Longa 评分法评定大鼠神经功能 于术后第 3、7、14 天对各组大鼠进行神经功能评定。0 分: 无神经损伤症状; 1 分: 提尾后不能完全伸展对侧前爪; 2 分: 向对侧转圈; 3 分: 向对侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失。评分越高, 神经功能缺损越严重。

1.8 缺血周边组织突触形态学观察

1.8.1 镀银染色法观察缺血周边组织神经元突触一般结构 脑组织常规脱水、透明、浸蜡、包埋, $4 \mu\text{m}$ 连续冠状切片, 60°C 烤片 2 h 后常规脱蜡至水, 然后将脑组织切片放入甘氨酸银染液中染色 8~10 min, 脱水后, 中性树胶封片。在光学显微镜下高倍镜视野($\times 400$)观察缺血周边组织神经元树突分支、树突棘和突触数量。

1.8.2 透射电镜观察缺血周边组织神经元突触超微结构 将在透射电镜液前固定 48 h 的标本放入 1% 的锇酸室温后固定 2 h, 乙醇梯度逐级脱水, 丙酮再度脱水, 先将组织放入不同比例丙酮与 812 包埋剂中渗透过夜, 再将组织放入纯 812 包埋剂中 60°C 聚合 48 h 进行包埋; 将组织切成 60~80 nm 超薄切片后, 醋酸铀和柠檬酸铅双染色, 室温下干燥过夜; 透射电子显微镜观察, 选取清晰观察到突触前膜、突触后膜和突触囊泡的突触拍照, 加速电压 80.0 kV。

1.9 免疫组化法检测缺血周边组织中突触可塑性标志蛋白 SYN、PSD-95 的表达 将常规脱蜡至水的脑组织切片, 置于 EDTA(pH 9.0)抗原修复液中进行抗

原修复 20 min, 放入 3% 双氧水溶液室温避光孵育 25 min, 滴加 3% BSA 室温封闭 30 min; 加入 Anti-SYN Rabbit pAb(1:200)或 Anti-PSD95 Rabbit pAb(1:200), 于 4°C 冰箱孵育过夜, 滴加 HRP 标记山羊抗兔 (1:500), 室温孵育 50 min, DAB 显色, 苏木素复染细胞核, 脱水后中性树胶封片。每张切片在光学显微镜下($\times 200$)观察, 每只大鼠随机取 1 张切片, 每张切片观察 5 个视野, 拍照采集图像。采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件计算 SYN、PSD-95 平均光密度(MOD)值, 进行相对定量分析。

1.10 Western Blot 法检测缺血周边组织中 BDNF、TrkB、CREB 及 p-CREB 蛋白的表达 将在 -80°C 保存的脑组织加入 RIPA 裂解液后, 离心收集上清, 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度; 蛋白煮沸变性, 上样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 300 mA 恒流转膜 30 min, 5% 的脱脂牛奶封闭; 加入一抗(内参蛋白 β -actin 稀释比例为 1:3 000, 目的蛋白 BDNF、TrkB、CREB 及 p-CREB 稀释比例均为 1:1 000), 摇床上 4°C 孵育过夜; 以 1:1 000 稀释比例加入 HRP 标记二抗, 室温下孵育 30 min, ECL 显色液显影, 化学发光系统成像。以 ImageJ 软件测量灰度值, 将目的蛋白与内参蛋白条带灰度比值计算平均灰度值, 进行蛋白表达的相对定量分析。

1.11 统计学处理方法 采用 SPSS 22.0 统计软件处理数据, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析, 若方差齐时采用 LSD 法进行两两比较, 若方差不齐时则采用 Tamhane's T^2 法进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芪仙通络方对脑梗死大鼠神经功能评分的影响

结果见表 1。与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能缺损症状明显, 各时间点神经功能评分明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 芪仙通络方组、胞磷胆碱组及芪仙通络方+K252a 组第 14 天神神经功能评分明显降低, K252a 组明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), 而溶剂对照组的差异无统计学意义($P > 0.05$); 与芪仙通络方组比较, 芪仙通络方+K252a 组第 14 天神神经功能评分有所升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明, 芪仙通络方能有效改善脑梗死大鼠神经功能, 而该作用能够被 TrkB 特异性酪氨酸激酶抑制剂 K252a 部分逆转。

表 1 各组大鼠不同时间点神经功能评分比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Table 1 Comparison of neurological function score of rats in each group at different time points($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	评分/分		
	第 3 天	第 7 天	第 14 天
假手术组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	2.33±0.81 ^{▲▲}	2.16±0.75 ^{▲▲}	1.83±0.40 ^{▲▲}
芪仙通络方组	2.50±0.83	1.83±0.75	0.66±0.51 ^{**}
K252a 组	2.50±0.54	2.33±0.51	2.00±0.00 ^{**}
芪仙通络方+K252a 组	2.33±1.03	2.00±0.89	1.66±0.51 ^{***}
胞磷胆碱组	2.33±0.81	1.83±0.75	1.33±0.81 ^{**}
溶剂对照组	2.33±0.51	2.00±0.00	1.83±0.75

注:与假手术组比较, ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与芪仙通络方组比较, ^{##} $P < 0.01$

2.2 芪仙通络方对脑梗死大鼠缺血周边组织突触形态学的影响

2.2.1 芪仙通络方对脑梗死大鼠缺血周边组织神经元突触一般结构的影响 结果见图 1。镀银染色显示假手术组(图 1-A)大鼠缺血周边组织神经元树突分支数量较多,树突棘与突触数量密集。与假手术组比较,模型组(图 1-B)神经元树突分支数量、树突棘与突触数量明显减少。与模型组比较,芪仙通络方

组(图 1-C)、胞磷胆碱组(图 1-F)及芪仙通络方+K252a 组(图 1-E)神经元树突分支数量、树突棘与突触数量明显增加。溶剂对照组(图 1-G)与模型组相似;而 K252a 组(图 1-D)则更加减少。与芪仙通络方组比较,芪仙通络方+K252a 组(图 1-E)神经元树突分支数量、树突棘与突触数量均有所减少。

2.2.2 芪仙通络方对脑梗死大鼠缺血周边组织神经元突触超微结构的影响 结果见图 2。透射电镜显示假手术组(图 2-A)大鼠缺血周边组织中神经元突触结构完整,清晰可见突触前膜、突触间隙、突触后膜以及突触后致密物质,突触囊泡分布均匀且密集,呈完整的圆形或椭圆形。与假手术组比较,模型组(图 2-B)突触结构模糊,部分突触囊泡出现膨大破损,突触后致密物质减少。与模型组比较,芪仙通络方组(图 2-C)、胞磷胆碱组(图 2-F)及芪仙通络方+K252a 组(图 2-E)突触结构较为清晰,突触后致密物质与突触囊泡数目增多;溶剂对照组(图 2-G)神经元突触超微结构损伤程度与模型组相似;而 K252a 组(图 2-D)则损伤更加明显。与芪仙通络方组比较,芪仙通络方+K252a 组(图 2-E)神经元突触超微结构损伤程度有所加重。

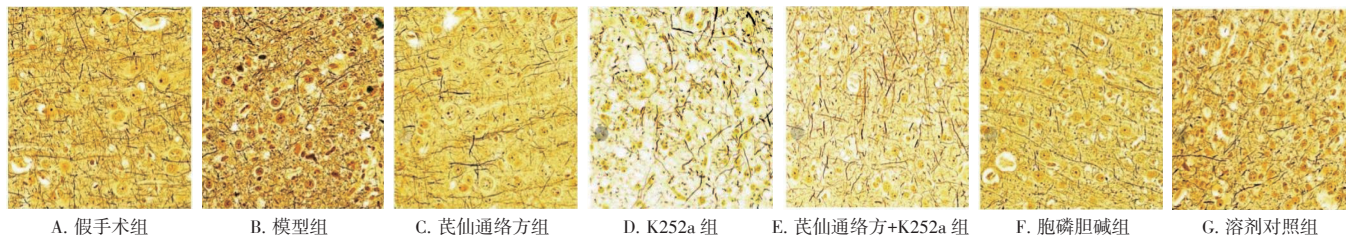
图 1 芪仙通络方对脑梗死大鼠缺血周边组织神经元突触一般结构的影响(镀银染色, $\times 400$)

Figure 1 Effect of *Qixian Tongluo* formula on the general structure of synapses in the peri-ischemia tissue of rats with cerebral infarction(silvered staining, $\times 400$)

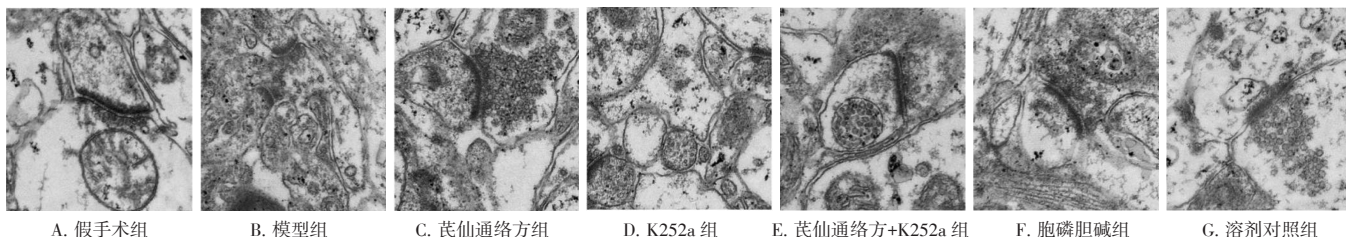
图 2 芪仙通络方对脑梗死大鼠缺血周边组织神经元突触超微结构的影响(透射电镜, $\times 15\ 000$)

Figure 2 Effect of *Qixian Tongluo* formula on the ultrastructure of synapses in the peri-ischemia tissue of rats with cerebral infarction(transmission electron microscope, $\times 15\ 000$)

2.3 芪仙通络方对脑梗死大鼠缺血周边组织突触可塑性标志蛋白 SYN、PSD-95 表达的影响 结果见图 3~5。与假手术组比较,模型组大鼠缺血周边组织

突触可塑性标志蛋白 SYN 与 PSD-95 表达均明显减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,芪仙通络方组、胞磷胆碱组及芪仙通络方+K252a 组

大鼠缺血周边组织 SYN 与 PSD-95 表达均明显增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 溶剂对照组的 SYN 与 PSD-95 表达与模型组相当, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); K252a 组的 SYN 与 PSD-95 表达均明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与芪仙通络

方组比较, 芪仙通络方+K252a 组大鼠缺血周边组织中 SYN 与 PSD-95 表达均有所减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结合图 1、图 2 结果, 提示芪仙通络方能够明显提高脑梗死大鼠缺血周边组织突触可塑性水平, 而该作用能够被 K252a 部分抑制。

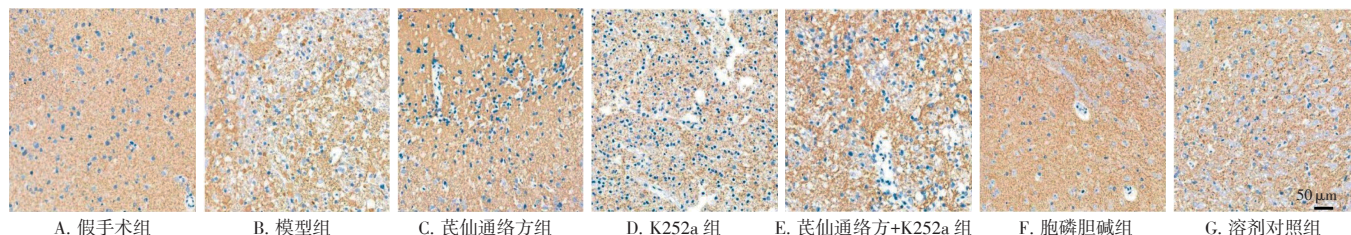


图 3 芪仙通络方对脑梗死大鼠缺血周边组织突触可塑性标志蛋白 SYN 表达的影响(免疫组化, $\times 200$)

Figure 3 Effect of *Qixian Tongluo* formula on the expression of synaptic plasticity marker protein SYN in the peri-ischemia tissue of rats with cerebral infarction (immunohistochemistry, $\times 200$)

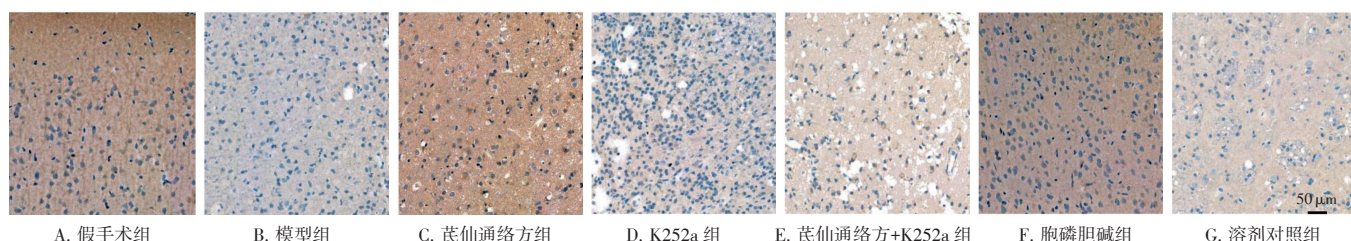
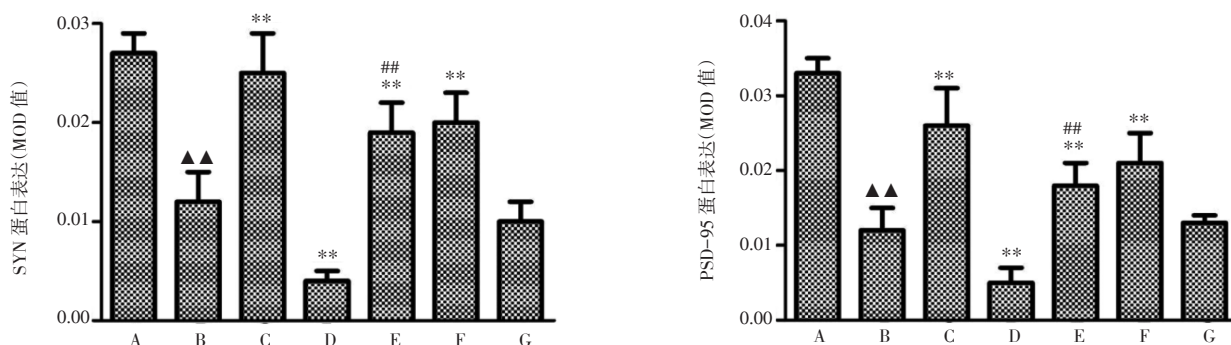


图 4 芪仙通络方对脑梗死大鼠缺血周边组织突触可塑性标志蛋白 PSD-95 表达的影响(免疫组化, $\times 200$)

Figure 4 Effect of *Qixian Tongluo* formula on the expression of synaptic plasticity marker protein PSD-95 in the peri-ischemia tissue of rats with cerebral infarction (immunohistochemistry, $\times 200$)



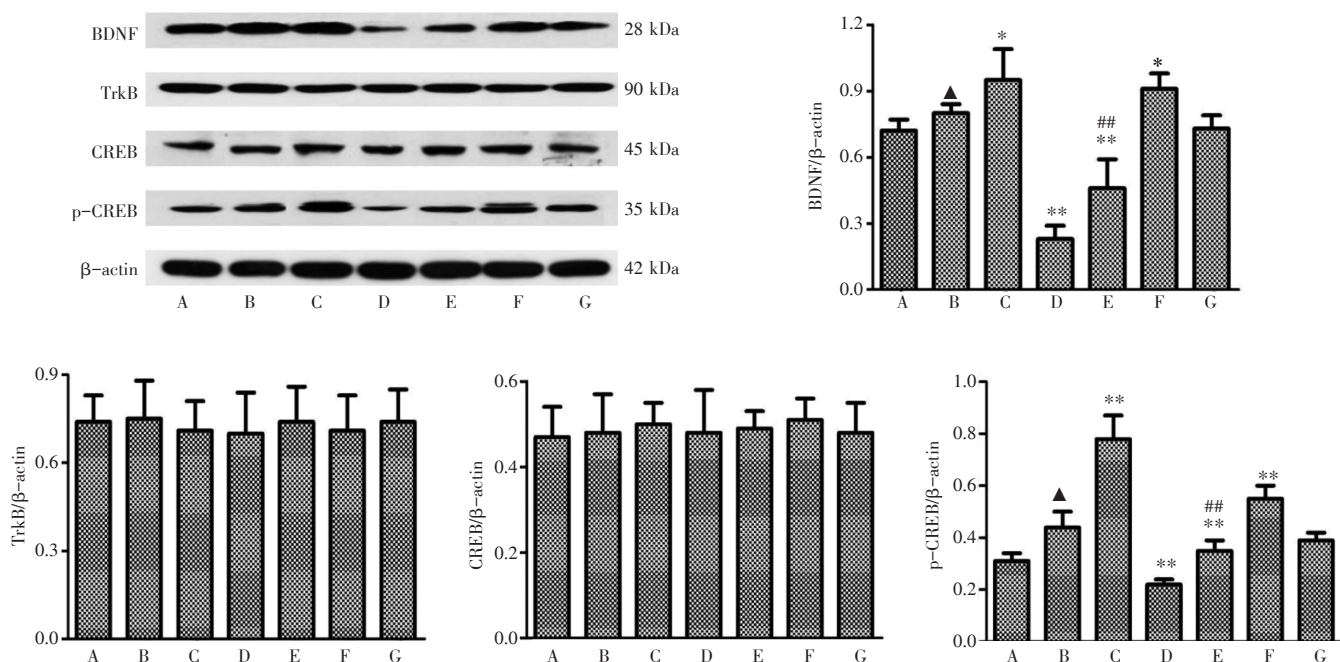
注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 芪仙通络方组; D. K252a 组; E. 芪仙通络方+K252a 组; F. 胞磷胆碱组; G. 溶剂对照组。与假手术组比较, $^{**}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{**}P < 0.01$; 与芪仙通络方组比较, $^{**}P < 0.01$

图 5 芪仙通络方对脑梗死大鼠缺血周边组织突触可塑性标志蛋白 SYN、PSD-95 表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 5 Effect of *Qixian Tongluo* formula on the expression levels of synaptic plasticity marker protein SYN and PSD-95 in the peri-ischemia tissue of rats with cerebral infarction ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.4 芪仙通络方对脑梗死大鼠缺血周边组织 BDNF、TrkB、CREB 及 p-CREB 蛋白表达的影响 结果见图 6。与假手术组比较, 模型组大鼠缺血周边组织中 BDNF 与 p-CREB 蛋白表达均增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 TrkB 与 CREB 蛋白表达则相当, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 芪仙通络方组及胞磷胆碱组大鼠缺血周边组织中 BDNF

与 p-CREB 蛋白表达均明显增加, 芪仙通络方+K252a 组及 K252a 组 BDNF 与 p-CREB 蛋白表达均明显减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 溶剂对照组 BDNF 与 p-CREB 蛋白表达则与模型组相当, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 此外, 芪仙通络方组、胞磷胆碱组、芪仙通络方+K252a 组及溶剂对照组的 TrkB 与 CREB 蛋白表达均无明显差



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 芪仙通络方组; D. K252a 组; E. 芪仙通络方+K252a 组; F. 胞磷胆碱组; G. 溶剂对照组。与假手术组比较, $^{\Delta}P < 0.05$; 与模型组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与芪仙通络方组比较, $^{##}P < 0.01$

图6 芪仙通络方对脑梗死大鼠缺血周边组织 BDNF、TrkB、CREB 及 p-CREB 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 6 Effect of *Qixian Tongluo* formula on the protein expression of BDNF, TrkB, CREB and p-CREB in the peri-ischemia tissue of rats with cerebral infarction($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

别, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与芪仙通络方组比较, 芪仙通络方+K252a 组大鼠缺血周边组织中 BDNF 与 p-CREB 蛋白表达均明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 而 TrkB 与 CREB 蛋白表达相当, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结果表明, K252a 能够明显抑制芪仙通络方对缺血周边组织中 BDNF 及 p-CREB 蛋白表达的促进作用。

3 讨论

神经功能是临床上脑梗死患者最关注的终点指标, 而评估脑梗死后功能障碍最直接有效的方法是神经行为学检测, 通过观察并分析脑梗死动物肢体活动是否对称, 以及动作的协调和整合能力等, 可以对功能损伤程度做出直观评估^[10]。本研究发现, 大脑中动脉阻塞(MCAO)模型大鼠经芪仙通络方干预后, 其神经功能缺损评分明显减少, 表明芪仙通络方可以促进脑梗死大鼠的神经功能恢复。

突触是神经元之间相互连接的“桥梁”, 亦是神经元之间信息传递的关键部位, 因此突触结构和功能的完整是神经元之间信息传递、加工和存储顺利进行的基础^[11]。突触可塑性是指突触在一定条件下随着神经元的活性调整传递效能、改变形态和增减数

目的能力, 包括突触结构与突触功能的可塑性, 是脑梗死后大脑重塑与功能恢复的基础^[12]。突触结构可塑性主要是指神经元树突分支、树突棘密度、突触数量以及突触超微结构的变化, 而突触功能可塑性主要与长时程增强和长时程抑制有关, 两者相互协调, 受到突触可塑性相关蛋白的调控^[13]。其中突触素 SYN 位于突触前膜, 是一种与突触结构和功能密切相关的膜蛋白, 主要调节神经递质的释放, 且其表达与突触的形成呈现一致性, 被认为是突触可塑性的标志蛋白^[14]。而位于突触后膜的 PSD-95 是突触后致密物中含量最丰富的结构蛋白, 通过其自身不同的结构域与离子通道受体、谷氨酸受体以及胞质蛋白等结合形成耦联体, 在维持突触发育、突触结构可塑性和突触兴奋过程中十分重要^[15]。研究^[16]表明, 神经元突触对缺血性损伤极为敏感, 缺血会导致突触结构、功能与数目发生改变, 而这种变化直接影响到脑梗死后神经信息的传递与功能改善。本实验从神经元突触一般结构、超微结构、突触可塑性标志蛋白 3 个层面, 检测了模型大鼠突触损伤情况, 证实在脑梗死发生后缺血周边区域神经元突触形态、结构及功能蛋白均有明显变化, 具体表现为神经元树突分支数量、树突棘与突触数量明显减少,

突触结构模糊,部分突触囊泡出现膨大破损,突触后致密物质减少,突触可塑性标志蛋白 SYN 与 PSD-95 表达明显下调,与既往研究^[17]结果一致;而芪仙通络方能够逆转上述病理趋势,上调 SYN 与 PSD-95 表达,提示促进缺血周边组织突触可塑性可能是其发挥促神经功能恢复作用的关键环节。

脑内神经营养信号 BDNF/TrkB/CREB 通路与脑梗死后突触可塑性调控密切相关^[18]。研究^[19]表明,持续性上调脑内 BDNF 水平或激活 BDNF/TrkB/CREB 信号通路均能够提高神经元轴突及树突的生长速度,增加突触可塑性水平,促进脑梗死后神经功能恢复。BDNF 通过与其高亲和力受体 TrkB 结合,继而引起 TrkB 的磷酸化,然后激活下游分子,促使核转录因子 CREB 磷酸化,促进系列靶基因(其中包括 BDNF)转录,从而发挥促神经元发生、轴突再生、突触形成等生物学效应^[20]。本研究发现,芪仙通络方能够明显上调脑梗死大鼠缺血周边组织 BDNF 及 p-CREB 蛋白的表达,而应用 TrkB 特异性酪氨酸激酶抑制剂 K252a 后减少了芪仙通络方介导的 BDNF 和 p-CREB 蛋白的表达,结合神经功能评分、突触形态学与突触可塑性标志蛋白 SYN、PSD-95 检测结果,表明芪仙通络方能够通过上调缺血周边组织 BDNF/TrkB/CREB 信号通路关键蛋白表达及磷酸化水平,激活 BDNF/TrkB/CREB 信号通路,进而促进脑梗死大鼠突触可塑性与功能恢复。

综上所述,芪仙通络方可以促进脑梗死大鼠神经功能恢复,恢复树突棘及树突分支与突触数量,缓解神经元突触超微结构缺血损伤,上调突触结构与功能蛋白的表达,促进缺血周边组织突触可塑性,而发挥上述作用与调控 BDNF/TrkB/CREB 信号通路活性有关。但是否涉及到其他分子调控机制,还需要进一步探讨。

参考文献:

- [1] NOGUEIRA R C, BEISHON L, BOR-SENG-SHU E, et al. Cerebral autoregulation in ischemic stroke: from pathophysiology to clinical concepts[J]. *Brain Sci*, 2021, 11(4): 511.
- [2] OSPEL J M, HOLODINSKY J K, GOYAL M. Management of acute ischemic stroke due to large-vessel occlusion: JACC focus seminar [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(15): 1832-1843.
- [3] ALAM J J, KRAKOVSKY M, GERMANN U, et al. Continuous administration of a p38 α inhibitor during the subacute phase after transient ischemia-induced stroke in the rat promotes dose-dependent functional recovery accompanied by increase in brain BDNF protein level[J]. *PLoS One*, 2020, 15(12): e0233073.

- [4] 彭玉芝, 彭玉霞, 闫咏梅. “化痰”法治脑梗死研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(11): 68-71.
- [5] 单金平, 单晓晶, 杨国峰, 等. 补肾活血法治缺血性中风吞咽障碍临床研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(2): 104-107.
- [6] 周胜强, 刘芳, 邓奕辉, 等. 芪仙通络方治疗脑梗死恢复及后遗症期肾虚血瘀证的回顾性研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(10): 81-86.
- [7] 林秀慧, 周春吉, 马珂, 等. 芪仙通络方对脑缺血大鼠内源性神经干细胞再生的影响及机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(24): 141-147.
- [8] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] JIMENEZ-MALDONADO A, VIRGEN-ORTIZ A, MELNIKOV V, et al. Effect of moderate and high intensity chronic exercise on the pancreatic islet morphometry in healthy rats: BDNF receptor participation[J]. *Islets*, 2017, 9(1): 1-10.
- [10] OTANI H, TOGASHI H, JESMIN S, et al. Temporal effects of edaravone, a free radical scavenger, on transient ischemia-induced neuronal dysfunction in the rat hippocampus[J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, 512(2-3): 129-137.
- [11] 郭斌, 王彭汉, 黄麟荇, 等. 电针、加味芍药甘草汤及针药结合对脑卒中肢体痉挛模型大鼠海马突触超微结构及可塑性蛋白的影响[J]. *中医杂志*, 2021, 62(2): 151-157.
- [12] LUSCHER C, ISAAC J T. The synapse: center stage for many brain diseases[J]. *J Physiol*, 2009, 587(4): 727-729.
- [13] 赵洪庆, 刘检, 孟盼, 等. 百合地黄汤对焦虑性抑郁症模型大鼠海马突触可塑性的影响[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(5): 1205-1210.
- [14] WANG X, HUANG X, YANG M, et al. Tongxinluo promotes axonal plasticity and functional recovery after stroke[J]. *Transl Neurosci*, 2020, 11(1): 428-438.
- [15] 王雪岩, 郭易楠, 阴赓宏. PSD-95 的生物学功能与应用研究进展[J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(18): 2015-2017.
- [16] 邹兆鹏, 范锦因, 赵博, 等. 脑缺血后突触可塑性研究进展[J]. *广东医学*, 2018, 39(23): 3573-3577.
- [17] SHEN W, JIN L, ZHU A, et al. Treadmill exercise enhances synaptic plasticity in the ischemic penumbra of MCAO mice by inducing the expression of Camk2a via CYFIP1 upregulation[J]. *Life Sci*, 2021, 270: 119033.
- [18] LI F, GENG X, HUBER C, et al. In search of a dose: the functional and molecular effects of exercise on post-stroke rehabilitation in rats[J]. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 186.
- [19] 赵景. 黄芩素对脑缺血小鼠运动功能恢复及轴突生长、突触重塑相关因子的影响[D]. 河北: 河北医科大学, 2016.
- [20] YIN C, DENG Y, LIU Y, et al. Icariside II ameliorates cognitive impairments induced by chronic cerebral hypoperfusion by inhibiting the amyloidogenic pathway: involvement of BDNF/TrkB/CREB signaling and up-regulation of PPAR α and PPAR γ in rats[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1211.

(编辑: 修春)