

# 益肾化浊法对慢性脑缺血血管性痴呆大鼠脑组织海马 HIF-1 $\alpha$ 和 VEGF 表达的影响

王建伟 金香兰 刘雪梅 梁晓 闫妍 郑宏 张允岭

**【摘要】 目的** 观察益肾化浊法对慢性脑缺血血管性痴呆大鼠脑组织海马低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1 $\alpha$ ) 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达的影响。**方法** 采用双侧颈总动脉永久性阻断法建立血管性痴呆大鼠模型,造模后 7 天随机分为假手术组,模型组和聪圣颗粒低、中、高剂量组和尼麦角林片组,给药治疗 60 天后,采用 Western-blot 及 Real Time-PCR 方法检测大鼠海马 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 表达水平。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的蛋白表达量和 mRNA 的表达量均升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,聪圣颗粒中、高剂量组可升高模型组 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 的蛋白和 mRNA 的表达 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论** 益肾化浊法对慢性脑缺血血管性痴呆大鼠作用机制可能与调控海马区 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 的表达有关。

**【关键词】** 血管性痴呆; 益肾化浊法; 缺氧诱导因子 1 $\alpha$ ; 血管内皮生长因子

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.04.005

**Influence of Yishen Huazhuo Therapy on expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in hippocampus of rats with chronic ischemic vascular dementia** WANG Jian-wei, JIN Xiang-lan, LIU Xue-mei, et al. The second clinical medical college, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China  
Corresponding author: JIN Xiang-lan, Email: jxlan2001@126.com

**【Abstract】 Objective** To observe the influence of Yishen Huazhuo Therapy on expression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1 $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in hippocampus of rats with chronic ischemic vascular dementia. **Methods** Vascular dementia rat models were established by using bilateral carotid artery block method. 7 days after animal model establishment, rats were randomly divided into sham-operated group, model group, high, middle and low dosage of Shengcong Particle groups and nicergoline tablets group. After 60 days of treatment, the expression level of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in hippocampus of rats was tested by using Western blot and Real time PCR. **Results** Compared with sham-operated group, the protein and mRNA expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in hippocampus of rats in model group was increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, the protein and mRNA expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in hippocampus of rats in high and middle dosage of Shengcong Particle group was increased significantly ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion** Yishen Huazhuo therapy could improve the status of rats with chronic ischemic vascular dementia and the mechanism might be related with the regulation on expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in hippocampus of rats.

**【Keywords】** Vascular dementia; Yishen Huazhuo Therapy; hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ; vascular endothelial growth factor

基金项目:高等学校博士学科点专项科研基金(20110013120014); 国家自然科学基金(81302959)。

作者单位:100029 北京中医药大学第二临床医学院[王建伟(硕士研究生)、梁晓(博士研究生)];北京中医药大学东方医院脑病二科(金香兰);北京中医药大学东方医院实验中心(刘雪梅、闫妍、郑宏、张允岭)

作者简介:王建伟(1987 - ),2012 级在读硕士研究生。研究方向:中医药防治脑血管病及痴呆。E-mail:wangjw1987@126.com

通讯作者:金香兰(1976 - ),女,博士,副主任医师。研究方向:中医药防治脑血管病及痴呆,E-mail:jxlan2001@126.com

血管性痴呆(vascular dementia, VD)包括所有主要由于脑血管因素所致的脑实质损害引起的痴呆,包括缺血性、出血性中风以及急、慢性脑缺血引起的痴呆<sup>[1]</sup>。随着对 VD 研究的深入,研究人员发现动脉硬化、高血压等引起血管损害或颈动脉狭窄/闭塞,使大脑参与认知功能的重要部位长期处于缺血状态,重要脑区如海马、基底神经节、白质产生损害,逐渐出现认知功能障碍,即慢性脑缺血成为 VD 发生的重要病理

生理学基础,已成为研究的热点<sup>[2-3]</sup>。

低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1 $\alpha$ )作为调节细胞内氧代谢的关键因子,其在组织缺血缺氧时可诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、葡萄糖转运蛋白-1(glucose transporter-1, GLUT-1)等靶基因的转录而成为低氧应答时稳定细胞内环境的调节中心。本实验采用双侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)永久性阻断法建立 VD 大鼠模型,聪圣颗粒治疗 60 天后,观察大鼠脑组织海马及皮层区 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 的表达,初步探讨益肾化浊法治疗慢性脑缺血血管性痴呆大鼠作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康 Wistar 雄性大鼠,体质量( $220 \pm 20$ )g, SPF 级,由北京维通利华实验技术有限公司提供[动物合格证号:SCXK(京)2012-0001]。

### 1.2 受试药品

聪圣颗粒(制何首乌 20 g、荷叶 15 g、漏芦 6 g、肉苁蓉 10 g、地龙 10 g)由北京中医药大学东方医院提供,尼麦角林片(由海南赞邦制药有限公司生产,国药准字 H10980103)。

### 1.3 主要实验仪器

涡旋振荡仪,分光光度计,荧光定量 PCR 仪, MultiSkan3 酶标仪, Mini P-4 电泳槽,湿转电泳槽,电泳仪,半干槽等。

### 1.4 主要试剂

超纯 RNA 提取试剂盒(CWbio. Co. Ltd, Cat# CW0581,批号:1213E), HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒(CWbio. Co. Ltd Cat# CW0744,批号:1013C), UltraSYBR Mixture(CWbio. Co. Ltd, Cat# CW0956,批号:2113C), DNase 1(CWbio. Co. Ltd, Cat# CW2090,批号:2513C), 5x RNA Loading Buffer(CWbio. Co. Ltd, Cat# CW0611A,批号:1813A), 一抗 HIF-1 $\alpha$ (ab51608)和 VEGF(ab1316)均购自 Abcam 公司,  $\beta$ -actin 抗体(天德悦, TDY041), HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 引物均由上海生工生物有限公司设计。

### 1.5 模型的建立

采用双侧 CCA 永久性阻断法建立 VD 模型。10%水合氯醛腹腔注射麻醉,大鼠颈前部正中切口,钝性分离双侧 CCA,套以 1 号手术线双重结扎,逐

层缝合。假手术组仅分离暴露双侧 CCA 而不结扎。

### 1.6 动物分组及给药

造模成功后,随机分为假手术组(sham),模型组(model),聪圣颗粒(CSKL) 1 g/kg 组、3 g/kg 组、6 g/kg 组和尼麦角林(Nicergoline)7 g/kg 组。每组 10 只,动物建模 7 天后开始灌胃给药,每日 1 次,连续 60 天。假手术组和模型组给予同等体积的生理盐水。

### 1.7 Real Time-PCR 方法检测大鼠脑组织 HIF-1 $\alpha$ mRNA 及 VEGF mRNA 的表达

实验结束后,断头取大鼠的脑组织,分离海马区,用液氮进行研磨后,按照试剂盒操作提取海马区大脑组织 RNA。用 1%琼脂糖凝胶进行电泳,检测 RNA 的完整性,随即对 RNA 中残留的基因组 DNA 进行消化处理。用 HiFi-MMLVcDNA 第一链合成试剂盒进行反转录。在反应管中依次加入 Primer mix 2  $\mu$ L,消化后的 RNA 10  $\mu$ L,65 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟,迅速冰浴 2 分钟,瞬离。然后继续加入 5xRT Buffer 4  $\mu$ L,0.1M DTT 2  $\mu$ L,10 mM dNTP Each 1  $\mu$ L,HiFi-MMLV Enzyme Mix 1  $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 50 分钟,70 $^{\circ}$ 保温 10 分钟,得到 cDNA, -20 $^{\circ}$ C 保存。RealTime 反应体系为:2 $\times$  UltraSYBR Mixture 10  $\mu$ L, HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 上游引物(10  $\mu$ M)0.4  $\mu$ L, HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 下游引物(10 $\mu$ M)0.4  $\mu$ L,模板 2  $\mu$ L,加入灭菌蒸馏水至 20  $\mu$ L。扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 10 分钟,(95 $^{\circ}$ C 15 秒,60 $^{\circ}$ C 60 秒),45 个循环。从 60 $^{\circ}$ C 到 95  $^{\circ}$ C 每上升 0.5  $^{\circ}$ C 取一次荧光值,生成溶解曲线,所有的样本均重复检测 3 次,最后计算出 Ct 值。HIF-1 $\alpha$  mRNA 及 VEGF mRNA 的表达量采用  $\Delta\Delta$ Ct 方法进行计算, $\Delta\Delta$ Ct = (待测样品目的基因的 Ct 平均值 - 待测样本内参基因的 Ct 平均值) - (对照样品目的基因的 Ct 平均值 - 对照样本内参基因的 Ct 平均值)。目的基因的相对拷贝量  $F = 2^{-\Delta\Delta$ Ct}。引物序列见表 1。

### 1.8 Western Blot 方法检测脑组织海马区及皮层 HIF-1 $\alpha$ 及 VEGF 蛋白的表达

实验结束后,断头取大鼠的脑组织,分离海马区,并称取重量,然后按照 1:9 的比例加入 RIPA 裂解液(提前加入蛋白酶抑制剂),然后制成组织匀浆,冰上孵育 20 分钟,13000 rpm,4 $^{\circ}$ C 离心 20 分钟。取其上清液,BCA 法检测蛋白浓度。取 20  $\mu$ g 蛋白行 SDS-PAGE 电泳,然后 300 mA 恒流,0.45  $\mu$ m 孔径 NC 膜,转膜时间 1 小时,将蛋白转移至膜上。

表 1 引物序列设计

引物名称	引物序列(5'to 3')	产物大小(bp)
VEGFA 上游引物	CCAGGCTGCACCCACGACAG	182
VEGFA 下游引物	AGCCCGCACACCGCATTAGG	
HIF-1α 上游引物	GATGAATCAAAAGCAGTGACGAAGG	106
HIF-1α 下游引物	ATGCCTTAGCAGTGCTCATTTCTTG	
GAPDH 上游引物	TGGAGTCTACTGGCGTCTT	138
GAPDH 下游引物	TGTCATATTTCTCGTGGTTCA	

3% BSA-TBST 中室温轻摇封闭 30 分钟后分别加入 HIF-1α(1:2000)及 VEGF(1:5000)一抗,4℃过夜。洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:20000)室温孵育 40 分钟,洗膜,加发光剂显影,定影,洗片。凝胶成像分析系统进行灰度扫描,以同一标本 β-actin 的产物灰度值作为内参,并计算出相对值。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行分析处理。计量资料采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较用方差分析中的 LSD 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠海马区 HIF-1α 及 VEGF mRNA 的表达

与假手术组比较,模型组大鼠海马区 HIF-1α 和 VEGF mRNA 表达水平上调( $P < 0.05$ );与模型组比较,聪圣颗粒中剂量组、高剂量组大鼠海马区 HIF-1α 及 VEGF mRNA 的表达上调( $P < 0.05$ ),其中聪圣颗粒中、高剂量组间比较无明显差异( $P > 0.05$ ),具体见表 2。

表 2 各组大鼠海马区 HIF-1αmRNA 及 VEGF mRNA 的表达( $\bar{x} \pm s$ )

分组	HIF-1αmRNA	VEGF mRNA
假手术组	0.64 ± 0.10	0.61 ± 0.09
模型组	1.09 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.13 <sup>a</sup>
聪圣颗粒低剂量组	1.26 ± 0.12	0.89 ± 0.16
聪圣颗粒中剂量组	1.61 ± 0.19 <sup>b</sup>	1.29 ± 0.13 <sup>b</sup>
聪圣颗粒高剂量组	1.80 ± 0.23 <sup>b</sup>	1.32 ± 0.06 <sup>b</sup>
尼麦角林组	1.79 ± 0.31 <sup>b</sup>	1.20 ± 0.08 <sup>b</sup>

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

2.2 大鼠海马区 HIF-1α、VEGF 蛋白表达的检测结果

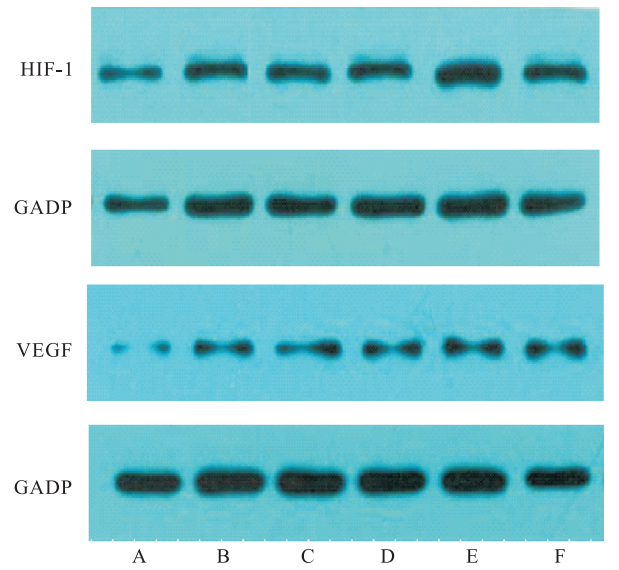
与假手术组比较,模型组大鼠的 HIF-1α 和

VEGF 蛋白表达量上调( $P < 0.01$ );与模型组比较,聪圣颗粒中剂量组和高剂量组 HIF-1α 和 VEGF 蛋白表达量上调, ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),其中聪圣颗粒中剂量组与聪圣颗粒高剂量组组间比较无明显差异( $P > 0.05$ ),见表 3,图 1。

表 3 各组大鼠海马区 HIF-1α 及 VEGF 蛋白的表达( $\bar{x} \pm s$ )

分组	HIF-1α	VEGF
假手术组	0.68 ± 0.08	0.76 ± 0.08
模型组	0.96 ± 0.14 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.03 <sup>a</sup>
聪圣颗粒低剂量组	1.15 ± 0.14	1.09 ± 0.11
聪圣颗粒中剂量组	1.38 ± 0.06 <sup>c</sup>	1.25 ± 0.08 <sup>b</sup>
聪圣颗粒高剂量组	1.46 ± 0.12 <sup>c</sup>	1.39 ± 0.08 <sup>b</sup>
尼麦角林组	1.42 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.18 ± 0.08 <sup>b</sup>

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ,<sup>c</sup> $P < 0.01$ 。



A 假手术组;B 模型组;C 聪圣颗粒低剂量组;D 聪圣颗粒中剂量组;E 聪圣颗粒高剂量组;F 尼麦角林组

图 1 各组大鼠海马区 HIF-1a 和 VEGF 蛋白表达

### 3 讨论

随着社会老龄化,VD 发病率逐年增高。中医认为其发病原因脑髓空虚,痰浊、瘀血等蒙蔽脑窍所致,且多为虚实夹杂。如王清任《医林改错·脑髓说》云“高年无记性者,脑髓渐空”,说明老年肝肾亏虚,脑髓失养是致病的主要原因。而《石室秘录》曰“痰气最盛,呆气最深”,并认为“治呆无奇法,治痰即治呆也”。针对 VD“肾虚痰浊蒙窍”的病机<sup>[3]</sup>,益肾化浊法为治疗 VD 的重要方法。本研究用聪圣颗粒以何首乌为君药,补肝肾精血,肉苁蓉、荷叶、地龙、漏芦共为臣药。肉苁蓉助君药制何首乌填精助阳。荷叶升发清阳,降痰浊,化瘀血。地龙有通络、清热利尿作用,与荷叶同奏升降清降浊之功效。漏芦排毒消肿、通经活络,可除痰浊瘀血产生的浊毒之邪,疏通血脉,解除浊毒痹阻脑络之害。诸药合用共奏益肾化浊之功。

VD 发病机制复杂,其中慢性脑缺血是 VD 发生的重要病理生理学基础。有研究表明<sup>[4-9]</sup>,HIF-1 $\alpha$  及其下游靶标 VEGF、EPO 等在慢性缺血导致的脑损伤中起着重要的调控作用,其参与缺血缺氧后血管生成、血管重塑、能量代谢、血管舒缩反应、细胞凋亡与增殖、红细胞生成等代偿过程,成为低氧应答时稳定细胞内环境的调节中心,尤其是缺血缺氧性疾病的发生发展中具有重要作用,具有重要的病理生理学意义。HIF-1 是一个异二聚体复合物,由 HIF-1 $\alpha$  和 HIF-1 $\beta$  2 个亚基构成。HIF-1 $\beta$  主要在细胞核内持续表达,不受氧浓度影响;HIF-1 $\alpha$  在细胞浆内表达,受氧浓度的调节,所以 HIF-1 的活性主要由 HIF-1 $\alpha$  决定,缺氧是诱导 HIF-1 $\alpha$  表达最敏感的指标。VEGF 是迄今为止已知的最强的促血管生长因子,能够直接刺激新生毛细血管和淋巴管的形成,更多的毛细血管使机体输氧能力和氧交换面积大大提高,从而减轻了低氧对机体带来的损害,在缺血性脑血管病的微循环重建过程中起着至关重要的作用。对 HIF-1 $\alpha$  的体内功能研究发现<sup>[10-11]</sup>,HIF-1 $\alpha$  是调节细胞内氧代谢的关键因子,是血管生长信号途径的关键上游转录因子,调控 VEGF 基因转录,刺激内皮细胞增殖,提高微血管渗透性,促进缺血后局部微循环重建,增加脑组织血液灌注量及供氧。在组织或细胞内缺氧时,

HIF- $\alpha$  是调节氧代谢的重要因子,缺氧后 HIF- $\alpha$  表达上调,与 VEGF 启动子中的缺氧反应元件发生特异性结合,增强 VEGF 生物学功能的稳定性,同时促进 VEGF 表达、转录和翻译<sup>[12]</sup>。

本研究中发现益肾化浊法增强了 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 在慢性脑缺血 VD 大鼠海马中的表达,具有加速血管再生,改善神经功能的作用,说明益肾化浊法可能通过调节 HIF-1 $\alpha$  及下游靶点 VEGF 来改善慢性脑缺血 VD 病理损伤,从而发挥治疗作用。

### 参 考 文 献

- [1] Tomimoto. Hidekazu. Are cerebrovascular white matter lesions an early sign of vascular cognitive impairment and vascular dementia? [J]. Vascular disease prevention, 2006, 3(3): 159-164.
- [2] Strub R. Vascular dementia [J]. South Med J, 2003, 96(4): 363-366.
- [3] O'Brien JT. Vascular cognitive impairment [J]. Am J Geriatr Psychiatry, 2006, 14(9): 724-33.
- [4] 张允岭,梅建勋,谢颖桢,等. 老年期血管性痴呆分期分证探讨 [J]. 中医杂志, 2008, 49(2): 173.
- [5] Kasuno K, Takabuchi S, Fukuda K, et al. Nitric oxide induces Phosphatidylinositol 3-kinase signaling [J]. Biol Chem, 2004, 279(4): 2550-2558.
- [6] Chavez A, Miranda LF, Pichiale P, et al. Mitochondria and hypoxia-induced gene expression mediated by hypoxia-inducible factors [J]. Ann. N. Y. Acad. Sci, 2008, 1147(1): 312-320.
- [7] Liu LX, Lu H, Luo Y, et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia inducible factor 1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291(4): 908-914.
- [8] Fan LF, Diao LM, Chen DJ, et al. Expression of HIF-1 alpha and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer [J]. Cancer, 2002, 21(3): 254-258.
- [9] 魏爱宣,徐忠信,郭洪亮,等. 慢性脑缺血致认知功能障碍大鼠皮层 HIF-1 $\alpha$ 、HO-1 表达的变化 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(4): 913-915.
- [10] Liu LX, Lu H, Luo Y, et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia inducible factor 1 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 291(4): 908-914.
- [11] Zhu Y, Lawton MT, Du R, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor in response to venous hypertension [J]. Neurosurgery, 2006, 59(3): 687-696.
- [12] 钟建,李夏露. 益肾活血通络法对单侧输尿管梗阻大鼠肾脏缺氧诱导因子-1 血管内皮生长因子信号通路干预作用的实验研究 [J]. 环球中医药, 2014, 7(1): 12-16.

(收稿日期: 2015-02-10)

(本文编辑: 蒲晓田)