

头穴透刺联合地黄汤调节脑梗死后痴呆小鼠 PI3K/AKT 通路研究

桑鹏, 赵佳辉, 杨辉

黑龙江省中医药科学院针灸脑病五科 黑龙江哈尔滨

【摘要】目的 研究头穴透刺联合益智地黄汤 (Reh) 对脑梗死后痴呆 (VD) 治疗作用及对磷脂酰肌醇-3-羟激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT/PKB)调节氧化应激损伤和细胞凋亡的影响。**方法** 将小鼠分为4组:假手术组、VD组、多奈哌齐组、头穴透刺地黄汤组。采用水迷宫实验对学生的记忆能力进行评价。检测海马组织中 caspase-3 活性、MDA 含量及 SOD 酶活性。体外将 HT22 细胞分为4组:假手术组、VD组、多奈哌齐组、头穴透刺地黄汤组。流式细胞术检测细胞内 ROS 含量及细胞凋亡。**结果** 与假手术组相比, VD组小鼠学习记忆能力明显下降。海马内 p-AKT 蛋白表达及 SOD 酶活性降低, Caspase-3 活性及 MDA 含量明显升高。头穴透刺地黄汤组 VD 模型小鼠学习记忆能力明显提高, p-AKT 蛋白表达及 SOD 酶活性上调, Caspase-3 活性及 MDA 含量降低。**结论** 头穴透刺地黄汤通过调节 PI3K/AKT 途径来减轻氧化应激, 抑制细胞凋亡以改善脑功能。

【关键词】 脑梗死后痴呆; 头穴透刺; 地黄汤

【基金项目】 黑龙江省中医药管理局科技项目课题 (ZHY2022-072)

【收稿日期】 2024年9月22日

【出刊日期】 2024年10月28日

【DOI】 10.12208/j.ijcr.20240410

Study on the regulation of PI3K/AKT pathway in mice with post-stroke dementia by scalp acupuncture combined with Reh decoction

Peng Sang, Jiahui Zhao, Hui Yang

Department of Acupuncture and Encephalopathy 5, Heilongjiang Academy of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang

【Abstract】Objective To study the therapeutic effect of scalp acupuncture combined with Yizhi Reh decoction (Reh) on post-stroke dementia (VD) and its effect on phosphatidylinositol-3-hydroxykinase (PI3K)/protein kinase B (AKT/PKB) regulating oxidative stress injury and cell apoptosis. **Methods** Mice were divided into 4 groups: sham operation group, VD group, donepezil group, and scalp acupuncture Reh decoction group. The water maze test was used to evaluate the learning and memory ability of students. The activity of caspase-3, the content of MDA and the activity of SOD in hippocampal tissue were detected. HT22 cells were divided into 4 groups in vitro: sham operation group, VD group, donepezil group, and scalp acupuncture Reh decoction group. Flow cytometry was used to detect the content of intracellular ROS and cell apoptosis. **Results** Compared with the sham operation group, the learning and memory ability of mice in the VD group was significantly decreased. The expression of p-AKT protein and SOD enzyme activity in the hippocampus decreased, while the activity of Caspase-3 and the content of MDA increased significantly. The learning and memory ability of VD model mice in the head-point penetrating Rehmannia decoction group was significantly improved, the expression of p-AKT protein and SOD enzyme activity were upregulated, and the activity of Caspase-3 and the content of MDA decreased. **Conclusion** Head-point penetrating Rehmannia decoction can reduce oxidative stress and inhibit cell apoptosis to improve brain function by regulating the PI3K/AKT pathway.

【Keywords】 Post-infarction dementia; Head-point penetrating Rehmannia decoction

脑梗死后痴呆是一种脑功能障碍综合征, 主要症状是学习记忆能力受损。临床研究头穴透刺地黄汤具有治疗脑梗死后痴呆、缓解患者的临床症状及营养脑神经作

用。^[1]磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (PI3K) 是信号转导通路中生长因子及受体超家族的重要组成, 可被多种细胞因子和有丝分裂原激活。激活的 PI3K 通过一系列中间分子激

活下游蛋白激酶 B (蛋白激酶 B, PKB/AKT), 调节细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡。研究表明 PI3K/AKT 信号通路与脑梗死后痴呆相关^[2], 本实验探讨头穴透刺联合地黄汤对脑梗死后痴呆小鼠 PI3K/AKT 通路的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和材料

24 只雄性 C57BL/6 小鼠 (6 周龄, 20±2g), 黑龙江省医学实验动物中心购买; DMEM 培养液, FBS, 胰酶和 Dipase (购自美国 Gibco); 兔抗 AKT、p-AKT 和 β-肌动蛋白多克隆抗体 (购自美国 CST)。

(1) 头穴透刺联合地黄汤

头穴透刺: 穴区常规消毒后, 对六组头穴依次透刺, 分别是百会透曲鬓 (双侧)、神庭透颌厌 (双侧)、前顶透悬厘 (双侧)、曲差透本神 (双侧)、头维透悬颅 (双侧)、玉枕透天柱 (双侧), 透刺角度为 15° -30°, 施快速捻转手法, 频率 200 次/分左右, 每组透穴行针 1min。1 次/日, 留针 8h, 一周为 1 个疗程

地黄汤: 地黄 20 克, 巴戟天 15 克, 山茱萸 15 克, 石斛 15 克, 肉苁蓉 15 克, 远志 20 克, 肉桂 15 克, 五味子 15 克, 茯苓 15 克, 麦冬 15 克, 菖蒲 15 克, 牛膝 15 克, 甘草 10g。

(2) 脑梗死后痴呆模型的建立

小鼠腹腔注射 10% 水合氯醛, 钝性分离术固定于手术台, 暴露右侧颈总动脉和颈外动脉。结扎颈外动脉, 在颈总动脉分叉处结扎, 保留结扎线远端。在线的远端剪断颈总动脉。将颈总动脉切成备用线近端小切口。从颈总动脉小切口缓慢插入至大脑中动脉起始端, 当有较强阻力时立即终止插入, 提示右侧大脑中动脉闭塞。

(3) 实验动物分组、给药及标本收集

24 只 VD 小鼠随机分为 4 组: 1.VD 组 (n=6), 建立 VD 模型后正常喂养, 给予相应体积的生理盐水。2.假手术组 (n=6): 仅分离暴露右侧颈总动脉。3.多奈哌

齐组 (n=6), VD 模型小鼠灌胃多奈哌齐 (0.5g/kg/d) 30 天; 4.头穴透刺地黄汤组 (n=6), VD 模型小鼠灌胃 Reh (50g/kg/d) 30 天。Morris 水迷宫试验后, 小鼠处死切断大脑, 收集海马。

1.2 Morris 水迷宫

水迷宫的中心放置一个透明的圆柱形有机玻璃平台。水面高出平台表面约 2 厘米, 加入墨水使水面呈现黑色。水温保持在 25°C 左右。将老鼠扔进面向池壁的水中。记录小鼠找到平台并站在平台表面所需的时间。

1.3 通过免疫印迹的蛋白表达检测

RIPA 裂解液在冰上裂解细胞或组织 20min, 10000 g 离心 10min, 将上清液蛋白转移到新的预冷 EP 管中。用 BCA 法测定蛋白质浓度后, 在 SDS-PAGE 上分离 40μg 样品, 转移到 PVDF 膜上, 在室温下用含 5% 脱脂奶粉的 PBST 放置 60min, 然后与一级抗体 (AKT、P-AKT 或 β-肌动蛋白的稀释比为 1: 1000、1: 2000, 1: 10000) 在 4°C 下夜间保存。第二天用 PBST 洗涤 3 次, 在室温下与 HRP 偶联的二级抗体 (1: 10000) 孵育 60min, 然后用 PBST 洗涤 3 次, 加入 ECL 发光。在暗室中反应 2-3min 后, 免疫印迹膜暴露、显影并固定。扫描胶片, 数据分析。

2 统计分析

SPSS 22 软件对数据进行统计分析。计量资料以均值±标准差表示, 组间数据比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 益智地黄汤改善 VD 模型小鼠大脑功能

3.2 头穴透刺地黄汤激活 VD 小鼠脑组织中 PI3K/AKT 通路

免疫印迹结果显示, 与假手术组相比, VD 模型小鼠脑组织中 p-AKT 蛋白表达明显降低 (图 2A、2B)。且头穴透刺地黄汤组 p-AKT 蛋白的表达显著高于多奈哌齐组 (图 2A、2B)。

表 1 各组水迷宫检测的学习能力和记忆能力比较

组别	学习能力	记忆能力
	延迟时间 (s)	停留在平台之前象限内的时间 (s)
假手术组	40.65± 5.3	39.1± 4.1
VD 组	83.7± 5.8*	23.8± 3.2*
多奈哌齐药物对照组	68.8± 6.2#	27.9± 3.6#
头穴透刺地黄汤组	53.6± 4.3#	36.1± 4.1#

注: *与假手术组比较, P<0.05. #与 VD 组比较, P<0.05。

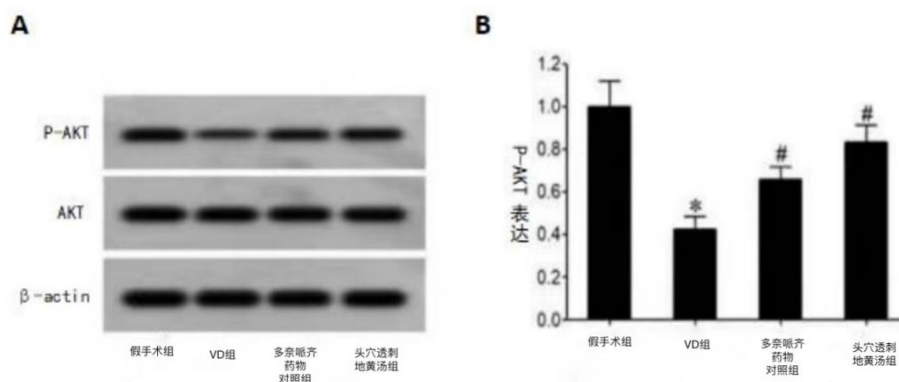


图1 头穴透刺地黄汤激活 VD 小鼠脑组织中 PI3K/AKT 通路

4 讨论

随着人类社会的老龄化,脑血管疾病的发生率逐年增高,脑梗死后痴呆(VD)的发病率也随之上升,据统计60岁以上的脑梗死患者中,约25%-41%的患者三个月内会发展为VD。目前脑梗死后VD已经成为仅次于阿尔茨海默病导致老年性痴呆的第2位因素。VD最终导致患者日常生活能力减退和社会活动能力逐渐丧失,给患者家庭及社会带来沉重的经济和心理负担。世界卫生组织已将VD的预防与治疗列为21世纪重点科研项目之一。

祖国医学对痴呆认识较早,历代医家从不同角度多有论述,对本病的描述见于“健忘”“善忘”“呆病”“文痴”“癡证”等疾病。先秦《左传》云“不慧,盖世所谓白痴”。《灵枢·天年》记载“六十岁,心气始衰,苦忧悲……八十岁,肺气衰,魄离,故言善误”。痴呆病名一词首见于汉代《华佗神医外传·治痴呆神方》。杨继洲在《针灸大成》中分别以“呆痴”和“痴呆”命名。叶天士在《临证指南医案》描述,“神呆不寐,不食,不饥,不便”“神呆脉沉……语言不甚明了”。明张景岳《景岳全书》首次记载了痴呆的病名并首次对本病的病因病机和证治有了较为详细的论述“痴呆证,凡平素无痰,而或以郁结,或以不遂,或以思虑,或以惊恐而渐到痴呆”。对于本病病因病机的认识,古代医家认为本病多因年老体衰,脑髓空虚,肾精不足,劳倦伤心,或因七情所伤,变证从起,导致五脏功能失调。脑梗死后痴呆是一种慢性进行性疾病,特征是认知能力、

记忆能力、计算能力、判断和逻辑思维能力以及社会生活能力下降^[3]。笔者临床研制头穴透刺地黄汤遵循“补虚泻实、攻补结合”原则起到填精益髓、化痰开窍、补益心肾作用。

磷脂酰肌醇-3-羟激酶(PI3K)是信号转换中生长因子及受体超家族的重要组成,可被多种细胞因子和有丝分裂原激活。激活的PI3K通过一系列中间分子激活下游蛋白激酶B(蛋白激酶B,PKB/AKT),调节细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡。研究表明PI3K/AKT信号通路与血管性痴呆相关。PI3K/AKT是广泛分布于多种组织细胞的信号转导通路。在生长因子丝裂原等因素的刺激下,PI3K被激活并且促进磷脂酰肌醇(4,5)-二磷酸和PIP2磷脂酰肌醇(3,4,5)-3磷酸,PIP3在3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶的协助下磷酸化AKT。磷酸化AKT在多种信号转导分子的协同作用下,可以调控各种靶基因的转录和翻译过程,从而调节细胞存活、增殖和凋亡。PI3K/AKT信号通路在脑梗死后痴呆的发病机制中起着重要作用^[4]。本研究结果表明,VD模型小鼠脑组织Caspase-3的活性和MDA的含量明显升高,但SOD酶活性明显降低。说明VD模型小鼠脑组织氧化应激和细胞凋亡明显增加,抗氧化能力下降。头穴透刺地黄汤可提高抗氧化能力,降低氧化应激水平。同时,VD模型小鼠脑组织中p-AKT蛋白表达明显下降,提示PI3K/AKT通路活性下降与模型小鼠脑组织中细胞凋亡增加有关。提示头穴透刺地黄汤可能通过调节PI3K/AKT通路,减轻海马神经元的氧化应激和细胞凋

亡,从而改善脑神经的功能。头穴透刺地黄汤治疗能显著延长小鼠的路径,增加跨越平台的次数,缩短跨越平台的时间,提高 VD 模型小鼠的学习记忆能力。头穴透刺地黄汤能显著降低 VD 模型小鼠脑内 NO 的含量,可引起神经毒性和氧化损伤,改善 VD 模型小鼠的学习记忆能力,表明头穴透刺地黄汤对脑梗死后痴呆的保护作用与抗氧化作用有关^[5]。

本实验表明头穴透刺地黄汤能显著提高 VD 模型小鼠的学习记忆能力,可能与氧化应激水平的降低有关。头穴透刺地黄汤能显著降低经地黄汤处理的 HT22 细胞的凋亡率和活性氧的产生,上调 P-AKT 蛋白的表达,降低 I-R 对 P-AKT 表达下调的影响。体外研究结果更直接地显示头穴透刺地黄汤在脑缺血缺氧的条件下,通过调节 PI3K/AKT 通路可以减少细胞凋亡和活性氧的生成^[6]。本研究表明头穴透刺地黄汤可增强 PI3K/AKT 通路的活性,减少脑神经细胞凋亡,减轻氧化应激损伤,在脑梗死后痴呆的治疗中发挥作用。

脑梗死后痴呆的治疗一直是世界医学界的一大难题。目前临床局限于药物溶栓、降纤、抗自由基及脑保护治疗,这无法从根本上解决脑梗死的病理进程^[7]。目前脑梗死后痴呆临床治疗上的热点在于控制急性期神经元损伤,针灸作为一种独特、安全、高效的治疗方法已经越来越多地运用于临床,疗效确切。但有关针灸保护脑梗死后痴呆患者神经元损伤作用机制的深入研究还较少^[8]。本课题首次通过脑梗死后痴呆模型头穴透刺地黄汤治疗前后的神经元损伤变化,从 Caspase-3 活性、AKT (p-AKT) 表达;PI3K/AKT 平衡调节探究头穴透刺地黄汤治疗脑梗死后痴呆的细胞分子机制,既往国内尚未见报道^[9]。

本项课题首次验证了头穴透刺地黄汤对脑梗死后痴呆模型大鼠的治疗作用,显著改善了脑梗死后痴呆神经功能缺损评分;并通过调控 Caspase-3 活性、AKT (p-AKT) 表达以及调节 PI3K/AKT 平衡状态这二个不同靶点探讨头穴透刺地黄汤对脑梗死后痴呆神经元损伤干预途径及其脑保护的作用机制^[10-12],为指导临床提供了重要的理论与实验依据,具有重大意义。在此基础之上,根据头穴透刺地黄汤对脑梗死后痴呆神经元损伤的保护作用,为临床优化脑梗死后痴呆的治疗方法提供了创新性思路和实验依据。

参考文献

[1] N. Munoz-Rivas, M. Mendez-Bailon, J.M. Miguel-Yanes, V. Hernandez-Barrera, J. Miguel-Diez, R. Jimenez-Garcia, and

A. Lopez-de-Andres, Observational study of vascular dementia in the Spanish elderly population according to type 2 diabetes status: trends in incidence, characteristics and outcomes (2004-2013), *BMJ Open* 7, e016390 (2017).

- [2] A.R. Borenstein, Y. Wu, J.D. Bowen, W.C. McCormick, J. Uomoto, S.M. McCurry, G.D. Schellenberg, and E.B. Larson, Incidence rates of dementia, Alzheimer disease, and vascular dementia in the Japanese American population in Seattle, WA: the Kame Project, *Alzheimer Dis Assoc Disord* 28, 23-29 (2014).
- [3] Z. Lin, J. Gu, J. Xiu, T. Mi, J. Dong, and J.K. Tiwari, Traditional chinese medicine for senile dementia, *Evid Based Complement Alternat Med* 2012, 692621 (2012).
- [4] H. Yan, L. Li, and X.C. Tang, Treating senile dementia with traditional Chinese medicine, *Clin Interv Aging* 2, 201-208 (2007).
- [5] E.S. Chan, D.T. Bautista, Y. Zhu, Y. You, J.T. Long, W. Li, and C. Chen, Traditional Chinese herbal medicine for vascular dementia, *Cochrane Database Syst Rev* 12, CD010284 (2018).
- [6] X.J. Li, and H.Y. Zhang, Potential anti-dementia agents in traditional Chinese medicine, *Nat Prod Commun* 4, 877-886 (2009).
- [7] 毕天威, 徐子绚, 宋杰,等. 基于TLR-4/MyD88/NF-κB 通路探讨针刺改善血管性痴呆大鼠认知功能的机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2023,25(12):4032-4038.
- [8] 刘传珍, 周丽华, 水正. 通窍活血汤合补阳还五汤治疗血管性痴呆 36 例临床研究[J]. 中医杂志,2002,43(7):526-527.
- [9] 师会, 赵锐. 补肾活血法治疗血管性痴呆的理论探讨[J]. 辽宁中医杂志,2015,42(2):266-268.
- [10] 郝静, 白龙跃, 牛志学,等. 益气补肾活血化痰方联合常规治疗对肾虚血瘀、痰浊阻滞型血管性痴呆认知功能障碍患者的临床疗效[J]. 中成药,2022,44(03):789-793.
- [11] 艾艳萍, 丁涛, 蔡桃英. 天麻素对急性缺血性脑卒中后痴呆患者的疗效分析[J]. 西南国防医药,2018,28(11):1048-1051.
- [12] 白春艳, 赵丽宏. 长春西汀注射液治疗脑卒中后痴呆的临床疗效分析[J]. 中国医药指南,2013(29):129-130.

版权声明: ©2024 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS