神经病学研究 文章编号：0253-3626（2011）06-0663-04

葛根素对缺氧缺血脑损伤后学习记忆能力及 NMDA 受体的影响

盛志强，肖 农，许 蓓，张晓萍
（重庆医科大学附属儿童医院康复中心，重庆 400014）

【摘 要】目的：观察葛根素（Puerarin，Pue）对新生鼠缺氧缺血后学习记忆的远期影响及其可能机制。方法：7 d 龄 SD 大鼠随机分为 3 组：假手术组（Sham 组）；对照组（Con 组）；葛根素组（Pue 组）。各组分别于 8 周龄时 Morris 水迷宫检测其学习记忆能力，于 3、4 周和 8 周龄时采用免疫组化方法检测各组 NR2A 和 NR2B 在海马 CA1 区的表达。结果：①8 周时 Con 组比 Sham 组平均潜伏期明显延长（$P<0.05$），穿越平台次数显著减少（$P<0.01$）；与 Con 组相比，Pue 组的平均潜伏期和穿越平台次数均得到明显改善（$P<0.05$）。②Con 组 3、4 周和 8 周时海马 CA1 区 NR2A 和 NR2B 的表达均明显低于 Sham 组（$P<0.01$）；Pue 组 NR2A蛋白在 3 周和 8 周时的表达比同一时间点 Con 组明显增多（$P<0.05$），NR2B 蛋白在 3 周和 4 周时的表达明显比 Con 组增多（$P<0.05$）。结论：Pue 能提高缺氧缺血新生大鼠年长后的学习记忆能力，其保护作用可能和 Pue 增加海马 CA1 区 NR2A 和 NR2B 的表达有关。

【关键词】葛根素；缺氧-缺血；N-甲基-D-天冬氨酸受体；学习记忆
【中国图书分类法分类号】R338.64 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-24

作者介绍：盛志强（1983- ），男，硕士，
研究方向：儿科学神经康复。
通信作者：肖 农，男，教授，Email：xiaonongwl@163.com。
基金项目：重庆市卫生局科研资助项目（编号：2009-2-260）。

[11] Hori S，Sakaguchi.Foxp3:a critical regulator of the development and function of regulatory T cells[J].Microbes Infect，2004，6(8)：745-751.

[12] Chen W，Jin W，Hardegen N，et al.Conversion of peripheral CD4$^+$CD25$^-$ naive T cells to CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3[J].J Exp Med，2003，198(12)：1875-1886.

[13] Roncador G，Brown P J，Maestre L，et al.Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells at the single-cell level[J].Eur J Immunol，2005，35(6)：1681-1691.

[14] Shimizu K，Nakata M，Hirami Y，et al.Tumorinfiltrating Foxp3$^+$ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurence in resected non-small cell lung cancer [J].J Thorac Oncol，2010，5(5)：585-590.

[15] Wolf D，Wolf A M，Rumpold H，et al.The expression of the regulatory T cell specific forkhead box transcriptionfactor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovariancancer[J].Clin Cancer Res，2005，11(23)：8226-8229.

[16] Mizukami Y，Kono K，Kawaguchi Y，et al.Localisation pattern of Foxp3$^+$ regulatory T cells is associated with clinicalbehaviour in gastric cancer[J].Br J Cancer，2008，98(1)：148-153.

[17] Zhou J，Ding T，Pan W，et al.Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients[J].Int J Cancer，2009，125(7)：1640-1648.

[18] Hiraoka N，Onozato K，Kosuge T，et al.Prevalence of FOXP3$^+$ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions[J].Clin Cancer Res，2006，12(18)：5423-5434.

[19] Nagai H，Horikawa T，Hara I，et al.In vivo elimination of CD25$^+$ regulatory T cells leads to tumor rejection of B16F-10 melanoma，when combined with interleukin-12 genetransfer[J].Exp Dermatol，2004，13(10)：613-620.

[20] Vaios Karanikas，Matthaios Speletas，Maria Zamanakou，et al.Foxp3 expression in human cancer cells[J].Journal of Translational Medicine，2008，6(1)：19.

[21] 徐艳静，郭淑兰.FOXP3 在正常人皮肤和表皮肿瘤中的表达及意义[J].山东大学学报，2010，48(3)：149-151.

[22] Wu Y，Borde M，Heissmeyer V，et al.FOXP3 controls regulatory T-cell function through cooperation with NFAT[J].Cell，2006，126(2)：375-387.

[23] Marson A，Kretschmer K，Frampton G，et al.Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulition[J].Nature，2007，445(7130)：931-935.

[24] Chen C，Rowell E A，Thomas R M，et al.Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation[J].J Biol Chem，2006，281(48)：36828-36834.

[25] Zuo T，Wang L，Morrison C，et al.FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene[J].Cell，2007，129(7)：1275-1286.

（责任编辑：关蕴良）

Effects of puerarin on learning and memory and NMDAR in rats following hypoxic-ischemic brain damage

SHENG Zhi-qiang, XIAO Nong, XU Bei, ZHANG Xiao-ping

(*Department of Rehabilitation Center, Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of puerarin on learning and memory ability after hypoxia-ischemia brain damage and to understand the underlying mechanisms. *Methods*: A total of 102 S-D rats (P7) were randomly assigned to three groups (n=34): sham group, Con group, and puerarin group. At 8 weeks after birth, learning and memory ability were tested by Morris water maze. At 3, 4, 8 weeks after birth, expressions of NR2A and NR2B were detected in the CA1 region of the hippocampus by immunohistochemistry. *Results*: ①The average time of escape latency was significantly longer and the number of platform location crossing was less in Con group than these in sham group (P<0.05, P<0.01). Compared with Con group, the average time of escape latency was significantly shorter (P<0.05) and the number of platform location crossing was more (P<0.05) in puerarin group. ②The expression levels of NR2A and NR2B in hippocampal CA1 areas in the Con group were less than those in the sham-operated rats at any time points (P<0.01). These levels of NR2A were significantly increased in the puerarin group when the rats were 3 w and 8 w of age, compared with the Con group (P<0.05). These levels of NR2B were significantly increased in the puerarin group when the rats were 3 w and 4 w of age, compared with the Con group (P<0.05). *Conclusion*: Puerarin can improve learning and memory in hypoxia-ischemia brain damage rats. This protection may be associated with the increased NR2A and NR2B in the CA1 region of hippocampus.

【Key words】puerarin; hypoxic-ischemic; N-methyl-D-aspartate receptor; learning and memory

缺氧缺血性脑损伤（Hypoxic-ischemic brain damage，HIBD）是由于围产期窒息引起的部分或完全性缺氧、脑血流减少或暂停导致的胎儿或新生儿脑损伤，亦是新生儿死亡和伤残的主要原因之一。针对 HIBD，目前治疗手段有限[1]，近年来关于传统中药治疗 HIBD 已逐渐成为热点。本课题组前期的研究发现[2]，传统中药葛根素（Puerarin，Pue）对新生大鼠 HIBD 后的海马细胞具有保护作用，并能提高脑损伤大鼠 5 周龄的学习记忆能力。而 Pue 增强 HIBD 大鼠学习记忆能力的作用能否维持到大鼠成年及其相关作用机制尚不明确。N-甲基-D-天冬氨酸（N-methyl-D-aspartate，NMDA）受体是学习记忆的关键受体，亚基 NR2A 和 NR2B 均参与了学习记忆的形成和维持过程[3]，其与学习记忆的关系主要体现在长时程增强（Long-term potentiation，LTP）方面，LTP 被认为是学习记忆的基础。本实验利用 Morris 水迷宫观察 Pue 对 HIBD 大鼠成年后的学习记忆能力，探讨 Pue 增强 HIBD 大鼠学习记忆能力的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

7 d 龄 SD 新生大鼠 102 只，清洁级，雌雄各半，体重 12~16 g（重庆医科大学实验动物中心提供）；注射用葛根素（浙江震元制药有限公司）；NR2A 和 NR2B 一抗（Cell Signaling Technology，USA）；免疫组化法 SABC 试剂盒和 DAB 显色试剂盒（Cwbiotech，China）。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 102 只新生大鼠随机分为 3 组：葛根素组（Pue 组），对照组（Con 组），假手术组（Sham 组）。Pue 组于缺氧结束后 5 min 腹腔注射葛根素 50 mg/kg；Con 组给予等体积生理盐水，1 次/d，共 14 d；Sham 组只分离左侧颈总动脉，不结扎、不缺氧、不给药。

1.2.2 动物模型和切片制备 Pue 组和 Con 组均采用 Rice 新生大氧缺氧缺血模型[4]：将动物仰卧位固定于手术台上，与 10%水合氯醛麻醉后，分离左侧颈总动脉并行双线永久结扎。动物放回笼中休息 2 h，将术后大鼠放入 1.5 L 的低氧舱中 2 h，低氧舱输入 8% O_2+92% N_2 混合气体，使氧浓度维持在（8±1）%，舱温保持在 37℃。各组动物分别于缺氧缺血后 2、3、7 周即在大鼠 3、4 周和 8 周龄时随机抽取 8 只。常规麻醉消毒，左心室快速注入生理盐水，后缓慢注入 4%多聚甲醛将组织内固定；取出脑组织后放入 4%多聚甲醛继续固定 48 h，常规脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋，冠状面切片 5 μm。

1.2.3 免疫组化检测 NR2A 和 NR2B 在海马 CA1 区的表达 切片经标准程序脱蜡；3%双氧水室温孵育 15 min；微波修复抗原；山羊血清 37℃孵育 30 min，甩干；滴加一抗（NR2A 和 NR2B 稀释比 1:100），4℃过夜；生物素标记的二抗 37℃孵育 30 min；加试剂 SABC 37℃下孵育 30 min。洗净后 DAB 显色，常规脱水、透明、封片。

1.2.4 图像分析 使用平均光密度分析海马 CA1 区 NR2A 和 NR2B 免疫反应强度。每个标本分别从 CA1 区随机抽取 5 个视野，400 倍光镜下照相，Image-ProPlus 5.1 图像分析软件系统计算每个阳性区域的平均光密度。每只大鼠 3 张连续切片，取其平均值。

1.2.5 行为学测试 每组各 10 只大鼠，于 8 周龄时在直径为 150 cm 的圆形水池中进行，水温（24±2）℃，水面高于平台

1.5~2 cm。①定位航行实验：分 5 d 进行，每天将大鼠面向池壁分别从 4 个不同入水点放入池中，记录其寻找隐藏在水面下平台的时间即潜伏期。如果 60 s 内找不到平台，由操作者引导其找到平台并让其在平台上停留 15 s，潜伏期记为 60 s。②空间探索实验：于第 6 天进行，撤出平台，将大鼠放入水池中，记录其 60 s 内穿越平台的次数。

1.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计，所有数值采用（$\bar{x}\pm s$）表示，组间采用单因素方差分析（ANOVA），两两比较采用 LSD-t 检验，$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 行为学测试

在 5 d 的测试期间，各组平均潜伏时间均逐渐缩短。在第 6 天的空间探索实验中（如表 1），与 Sham 组相比，Con 组的平均潜伏期明显延长（$P<0.05$）；经 Pue 治疗后，大鼠的平均潜伏期明显缩短（与 Con 组相比，$P<0.05$）。穿越平台次数方面：Con 组比 Sham 组显著减少（$P<0.01$），与 Con 组相比，Pue 组大鼠穿越平台的次数明显增多。各组大鼠的游泳速度无显著区别（$P>0.05$）。

表 1 水迷宫测试结果（$n=10, \bar{x}\pm s$）

组别	平均潜伏期(s)	穿越平台次数	游泳速度(m/s)
Sham组	7.10 ± 2.95	12.2 ± 1.93	0.261 ± 0.035
Con组	13.85 ± 9.29[a]	7.4 ± 2.46[b]	0.225 ± 0.028
Pue组	7.84 ± 2.28[c]	9.6 ± 2.32[ac]	0.246 ± 0.055

注：a，$P<0.05$，b，$P<0.01$，与 Sham 组比较；c，$P<0.05$，与 Con 组比较

2.2 海马区 NR2A 和 NR2B 的表达

如表 2、3 所示，与 Sham 组同一时间点相比，Con 组NR2A 和 NR2B 的表达均显著降低（$P<0.01$）。在大鼠 3 周和 8 周龄时，Pue 组 NR2A 的表达较 Con 组有明显增多（$P<0.05$），在大鼠 4 周龄，虽有增多，但不具有统计学意义（$P>0.05$）；在 3 周和 4 周龄时，Pue 组 NR2B 的表达较 Con 组明显增多（$P<0.05$），在大鼠 8 周龄时，NR2B 在 Pue 组的表达较 Con 组虽有增多，但不具有统计学意义（$P>0.05$）（如图 1、2）。

表 2 出生后不同时间点 NR2A 的表达（$n=8, \bar{x}\pm s$）

组别	3 周	4 周	8 周
Sham组	0.238 ± 0.056	0.246 ± 0.038	0.271 ± 0.052
Con组	0.150 ± 0.034[b]	0.162 ± 0.042[b]	0.169 ± 0.035[b]
Pue组	0.200 ± 0.025[c]	0.212 ± 0.061	0.226 ± 0.032[ac]

注：a，$P<0.05$，b，$P<0.01$，与 Sham 组比较；c，$P<0.05$，与 Con 组比较

表 3 出生后不同时间点 NR2B 的表达（$n=8, \bar{x}\pm s$）

组别	3 周	4 周	8 周
Sham组	0.309 ± 0.054	0.289 ± 0.047	0.282 ± 0.067
Con组	0.178 ± 0.042[b]	0.198 ± 0.040[b]	0.198 ± 0.045[b]
Pue组	0.231 ± 0.034[bc]	0.260 ± 0.049[c]	0.245 ± 0.037

注：a，$P<0.05$，b，$P<0.01$，与 Sham 组比较；c，$P<0.05$，与 Con 组比较



A. Sham 组　B. Con 组　C. Pue 组

图 1 大鼠海马 CA1 区 NR2A 在 8 周龄时的表达（×400）



A. Sham 组　B. Con 组　C. Pue 组

图 2 大鼠海马 CA1 区 NR2B 在 8 周龄时的表达（×400）

3 讨 论

海马是学习记忆的主要功能区，围产期窒息造成海马损伤引起的学习记忆能力的下降是缺氧缺血性脑病的严重后遗症之一，主要与脑损伤后期海马 NMDA 受体的下调有关[5]。NMDA 受体是离子型谷氨酸受体的一种亚型，根据定位不同，分为突触内和突触外 NMDA 受体[6]，NMDA 受体的激活是LTP 发生和维持的关键，在中枢神经系统的突触传递和突触可塑性调节中起着重要的作用[7]。NR2A 和 NR2B 是目前研究最广泛的两个 NMDA 受体亚基，两者在突触内外的分布大致相当[8]。诱导海马 CA1 区 LTP 时，NR2A 可通过 Ras-GRF2 途径激活下游的效应因子 Erk1/2 MAPK，从而介导海马 CA1 区神经元的 LTP[9]。在长持续长时程增强（Long-lasting long-term potentiation，L-LTP）的恢复过程中，NR2A-NMDA 受体拮抗剂 Zn^{2+}可抑制海马脑片 CA1 区 L-LTP 的恢复，说明 NR2A参与了 L-LTP 的恢复过程[10]，而 NR2B 抑制剂却对 LTP 的复原无明显影响。NR2A 或 NR2A 胞内 C 端的缺失都可以损害小鼠水迷宫的空间工作记忆[11]。NR2B-NMDA 受体介导的 LTP主要通过激活钙-钙调蛋白-依赖蛋白激酶途径，使突触 AMPA 受体磷酸化；当依赖蛋白激酶与钙-钙调蛋白结合时，依赖蛋白激酶能不断地自身磷酸化[12]，从而增强 LTP。在另一项研究中发现[13]，NR2B 的过表达可增强海马 CA1 区的 LTP，但对长时程抑制无明显影响；在随后的水迷宫测试中，NR2B 转基因鼠表现出了较强的学习记忆能力：与野生鼠相比，转基因鼠在寻找平台的用时较少，并且转基因鼠在目标象限的用时较野生鼠明显增多。可见 NR2A 和 NR2B 在学习记忆过程中起到了重要作用。

本实验结果显示：在新生大鼠缺氧缺血后 2、3 周和 7 周，NMDA 受体的 2 个亚基 NR2A 和 NR2B 在 Con 组的表达较 Sham 组显著降低（$P<0.01$），Pue 组大鼠海马 CA1 区NR2A 和 NR2B 的表达较 Con 组增多，但仍低于 Sham 组，说明缺氧缺血已经造成了大鼠的海马损伤，Pue 在一定程度上减轻了 NR2A 和 NR2B 的下调，保护大鼠神经系统的功能。其机制如下：Pue 的主要成分为 4,7-二羟基,8-β D-葡萄糖异黄酮，结

构与内源性雌激素 17β-雌二醇相似，可激活脑内雌激素受体[14]；Pue 还可与 G 蛋白偶联雌激素受体[15]和胰岛素生长因子Ⅰ受体[16]结合。通过 MAPKs 和 PI3K/Akt 两条信号通路发挥作用，进一步促进 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化[17]、钝化 p38-MAPK、减少 p75(NTR)的表达[18]、抑制 JNK 信号通路[19]，最终作用于 cAMP 反应成分结合蛋白，控制基因转录[20]，从而减轻神经元的凋亡、调节海马树突棘突密度和突触可塑性，增加 NR2A 和 NR2B 的表达。

Morris 水迷宫是检测空间学习记忆能力最常用的行为学测试方法之一。本实验在大鼠 8 周龄时行 Morris 水迷宫测试结果表明：各组大鼠的游泳速度并无明显差异（$P>0.05$），提示 HIBD 造成的运动功能障碍并未影响 Morris 水迷宫的测试结果。而 Pue 组大鼠的平均潜伏期较 Con 组明显缩短（$P<0.05$），穿越平台次数也明显增多（$P<0.05$），说明 Pue 能减轻 HIBD 大鼠在 8 周龄时（相当于人类成年期）空间学习能力的损害程度，结合本课题组的前期研究发现[2]：Pue 能提高 HIBD 大鼠 5 周龄的学习记忆能力。提示 Pue 有助于减少或减轻智力低下等 HIBD 后遗症的发生，而非一过性的改善学习记忆能力下降的症状。

综上所述，Pue 不仅提高大鼠缺氧缺血后短期的学习记忆能力，而且能改善 HIBD 大鼠在成年期智力低下的症状。本实验通过检测海马 CA1 区 NR2A 和 NR2B 的表达，证实了 Pue 增强大鼠 HIBD 后的学习记忆能力可能与提高 NMDA 受体的表达、增强 LTP 有关。下一步实验我们将通过 LTP 等电生理手段来验证 Pue 是否直接通过 NMDA 受体影响 LTP 的产生。

参 考 文 献

[1] Sanders R D, Manning H J, Robertson N J, et al. Preconditioning and postinsult therapies for perinatal hypoxic-ischemic injury at term[J]. Anesthesiology, 2010, 113(1): 233-249.

[2] 许 蓓，肖 农，张晓萍. 葛根素对缺氧缺血新生大鼠神经保护作用及其机制[J]. 第四军医大学学报，2009，30(23)：2757-2760.

[3] Izquierdo I, Medina J H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures[J]. Neurobiol Learn Mem, 1997, 68(3): 285-316.

[4] Rice J E, Vannucci R C, Brierley J B. The influence of immaturity on Hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. Ann. Neurol, 1981, 9(2): 131-141.

[5] 刘晓蓉，赵聪敏，于若谷. N-甲基-D-天冬氨酸受体在缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑海马中的远期表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2007，11(16)：3089-3092.

[6] Cottrell J R, Dubé G R, Egles C, et al. Distribution, density, and clustering of functional glutamate receptors before and after synaptogenesis in hippocampal neurons[J]. Neurophysiol, 2000, 84(3): 1573-1587.

[7] Ali D E, Salter M W. NMDA receptor regulation by Src kinase signaling in excitatory synaptic transmission and plasticity[J]. Current Opinion Neurobiology, 2001, 11(3): 336-342.

[8] Thomas C G, Miller A J, Westbrook G L. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons[J]. Neurophysiol, 2006, 95(3): 1727-1734.

[9] Jin S X, Feig L A. *Long-term potentiation in the CA1 hippocampus induced by NR2A subunit-containing NMDA glutamate receptors is mediated by Ras-GRF2/Erk map kinase signaling*[J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11732.

[10] Zhang L, Meng K, Li Y H, et al. *NR2A-containing NMDA receptors are required for L-LTP induction and depotentiation in CA1 region of hippocampal slices*[J]. Neurosci, 2009, 29(11): 2137-2144.

[11] Bannerman D M, Niewoehner B, Lyon L, et al. *NMDA receptor subunit NR2A is required for rapidly acquired spatial working memory but not incremental spatial reference memory*[J]. Neurosci, 2008, 28(14): 3623-3630.

[12] Lisman J, Schulman H, Cline H. *The molecular basis of CaMK Ⅱ function in synaptic and behavioural memory*[J]. Nature Rev Neurosci, 2002, 3(3): 175-190.

[13] Wang D, Cui Z, Zeng Q, et al. *Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not CA1 long-term depression in NR2B transgenic rats*[J]. PLoS One, 2009, 4(10): e7486.

[14] Kuiper G G, Lemmen J G, Carlsson B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta[J]. Endocrinology, 1998, 139(10): 374-377.

[15] Lin B C, Suzawa M, Blind R D, et al. Stimulating the GPR30 estrogen receptor with a novel tamoxifen analogue activates SF-1 and promotes endometrial cell proliferation[J]. Cancer Res, 2009, 69(13): 5415-5423.

[16] Xu L, Chen W F, Wong M S. Ginsenoside Rg1 protects dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease through the IGF-I receptor signalling pathway[J]. Pharmacol, 2009, 158(3): 738-748.

[17] Limor Raz, Mohammad M. Khan, Virendra B. Mahesh, et al. Rapid Estrogen signaling in the brain[J]. Neurosignals, 2008, 16(2-3): 140-153.

[18] El Touny L H, Henderson F, Djakiew D. Biochanin a reduces drug-induced p75NTR expression and enhances cell survival: a new in vitro assay for screening inhibitors of p75NTR expression[J]. Rejuvenation Res, 2010, 13(5): 527-537.

[19] Wang G, Zhou L, Zhang Y, et al. Implication of the c-Jun-NH_2-terminal kinase pathway in the neuroprotective effect of puerarin against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced apoptosis in PC-12 cells[J]. Neurosci Lett, 2011, 487(1): 88-93.

[20] Wang C N, Chi C W. The neuroprotective of phytoestrogen on anyloid protein-induced toxity are mediated by abrogating the activation of caspase cascade in rat cortical neurons[J]. Bio Chemistry, 2001, 276(7): 5287-5291.

（责任编辑：关蕴良）