

中药益智胶囊对大鼠全脑缺血后海马 CA1 区神经元迟发性死亡的影响

巴恩平¹, 欧阳石², 李琳², 徐江平² (解放军总医院病理科, 北京 100853; ²第一军医大学药理学教研室, 广东广州 510515)

摘要:目的 观察中药益智胶囊对大鼠全脑缺血后海马 CA1 区神经元迟发性死亡及学习功能的影响。方法 以四血管闭塞 (4-VO) 法制成大鼠急性全脑缺血再灌注模型。采用免疫组织化学方法计数脑缺血再灌注脑损伤后 1、2、4、8 及 40 d 后, 大鼠海马 CA1 区正常神经元数目; 用 Morris 水迷宫实验观察脑缺血再灌注脑损伤后 40 d 时各组大鼠的学习记忆功能。结果 从缺血再灌注后第 2 天起, 益智胶囊 (100 mg/kg·b.w.) 组大鼠海马 CA1 区正常神经元数量显著高于缺血对照组大鼠 ($P < 0.01$)。全脑缺血再灌注脑损伤后 40 d 时, 益智胶囊 (100mg/kg·b.w.) 组大鼠记忆功能明显好于缺血对照组大鼠 ($P < 0.01$)。结论 益智胶囊对全脑缺血后大鼠海马 CA1 区神经元具有保护作用, 并可改善大鼠的记忆功能障碍。

关键词:脑缺血 / 药物疗法; 脑缺血 / 病理生理学; 神经元 / 药物作用; 缺血再灌注损伤; 学习记忆障碍

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588 (2004) 07-0749-03

Effects of *yizhi* capsule, a preparation of traditional Chinese medicines, on delayed neuronal death in hippocampal CA1 region and memory function of rats after ischemia-reperfusion injury

BA En-ping¹, OUYANG Shi², LI Lin², XU Jiang-Ping²

¹Department of Pathology, General Hospital of PLA, Beijing 100850, China; ²Department of Pharmacology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To observe the effects of *Yizhi* capsule, a preparation of traditional Chinese drugs on delayed neuronal death in the hippocampal CA1 region and memory function of rats after ischemia-reperfusion injury. **Methods** Rat models of acute reperfusion injury after global cerebral ischemia were induced by vertebral and carotid arteries occlusion, and 1, 2, 4, 8 and 40 d after model establishment, the neurons in the rat hippocampal CA1 region were obtained and immunohistochemically stained for counting. Morris water maze test was performed to observe the learning and memory capacities of the rats 40 d after the injury. **Results** The number of normal neurons was significantly higher in the rats treated with *Yizhi* capsule (100 mg/kg·b.w.) than in those without the treatment, and the former group of rats used significantly shorter time in finding the platform under the water surface in Morris water maze test. **Conclusion** *Yizhi* capsule may protect the neurons in the hippocampal CA1 region and improve on the learning and memory dysfunction after global ischemia/reperfusion injury in rats.

Key words: cerebral ischemia/drug therapy; cerebral ischemia/physiopathology; neurons/drug effects; ischemia-reperfusion injury; learning and memory disorder

近年来,随着对脑缺血后神经元损害及其病理生理机制的深入研究,人们认识到缺血性神经元损害不是单一的病理损害过程,并由此提出了脑损伤级联反应的概念,此概念包括了兴奋性神经毒作用、自由基毒性作用、Ca²⁺ 超载、线粒体功能障碍、程序性细胞死亡 (凋亡) 等多种机制,它们由缺血、缺氧引起,发生在不同的时间点上,彼此重叠且相互联系,共同造成神经元的损害^[1-3]。因此,当前进一步寻找脑缺血后神经

保护剂的目标是,针对损伤级联反应的不同环节,寻找有效药物以期打断级联反应,保护神经元以减少缺血造成的损害。

由于中药复方由于具有多靶点作用的药理学特点,在缺血性脑损伤的治疗中有一定的应用价值。益智胶囊(Capsule Yi-Zhi) 主要是由首乌、人参、淫羊藿等组成,具有补气安神、益智养精、补肾助阳之功效。本实验中,我们观察了益智胶囊对缺血性脑损伤后大鼠海马 CA1 区神经元迟发性死亡及学习记忆功能的影响,对益智胶囊治疗缺血性脑血管病的药理学作用进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级成年雄性 SD 大鼠 (第一军医大学实验动物中心提供), 体质量 200~250 g, 建模后随机分为下

收稿日期: 2004-02-09

基金项目: 国家“863”计划新药博士基金 (2003AA2Z3535)

Supported by Foundation for Doctorate in New Drug Development in National “863” Program (2003AA2Z3535)

作者简介: 巴恩平 (1962-), 女, 实验师, 主要从事心脑血管和神经系统病理学研究, 电话: 010-66937854。

通讯作者: 徐江平 (1967-), 男, 博士, 现为第一军医大学药理学教研室主任, 副教授, 主要从事脑血管和神经药理学研究, 电话: 020-61648236,

E-mail: xujp@fimmu.com

列各组:缺血对照组、益智胶囊低剂量 (50 mg/kg·b.w.) 组与益智胶囊高剂量 (100 mg/kg·b.w.) 组,每组 30 只大鼠。各组再分为再灌注后 1、2、4、8 及 40 d 5 个时间点,每时间点各 6 只大鼠。

1.2 大鼠全脑缺血模型制作

参照文献 [4, 5], 采用改良四血管闭塞 (4-VO) 法制成大鼠急性全脑缺血再灌注模型。具体方法为:大鼠以戊巴比妥钠 (50 mg/kg·b.w.) 麻醉后,取颈后正中切口,在手术显微镜下暴露第一颈椎双侧翼孔,微型钻扩大翼孔,以双极电凝镊插入翼孔电凝双侧椎动脉,使其永久闭塞,缝合伤口。笼养 24 hr 后同样方法麻醉,颈前正中切口,暴露双侧颈总动脉,头顶部皮下插入针状电极行脑电监测,用无损伤动脉夹迅速夹闭双侧颈总动脉,造成全脑缺血。15 min 后撤去动脉夹,开始再灌注。模型成功的标准为出现静息脑电波。

1.3 益智胶囊药物制备及给药途径

益智胶囊由第一军医大学药理学教研室联合广州奇星药业有限公司提取、纯化,经检测其中可定量有效成分占 50% 以上 [6]。缺血模型制备后各时间点分别给予 50 (低剂量组) 和 100 mg/kg·b.w. (高剂量组) 益智胶囊灌胃,对照组大鼠则喂以等量单蒸水灌胃,2 次/d (早、晚各 1 次),至处死取材。

1.4 脑片标本的制备及海马 CA1 区正常神经元观察

各组大鼠于上述规定时间点静脉注射戊巴比妥钠 (40 mg/kg·b.w.) 麻醉,经升主动脉灌注生理盐水 100 ml, 4% 多聚甲醛液 (pH=7.4) 500 ml 后,断头取脑,将脑组织入 4% 多聚甲醛后固定 48 h 后,常规脱水,石蜡包埋。取背侧海马 (bergma -3.0~-3.8 mm) 连续冠状位切片,片厚 5 μ m,每隔 10 片取一片,每只大鼠随机选取 5 张非连续的脑片,常规 HE 染色,光镜下以显微计数尺,计数大鼠双侧海马 CA1 区 1mm 范围内的正常神经元数。另取一套切片同时行 HE 空白对照染色。

1.5 缺血大鼠学习记忆功能的测试

取全脑缺血后 40 d 时间点的各组大鼠进行学习记忆功能的测试。参照有关文献 [6], 用 MORRIS 水迷宫实验进行。具体方法为:测试开始前第 6 天让各测试大鼠自由游泳 2 min 以适应周围环境,测试开始前第 5 天各测试大鼠于每天第一次给药后 1 h 开始进行 Morris 水迷宫 (中国医学科学院药物研究所研制) 训练,每天训练 4 次,每次随机选择一个入水点,将大鼠面向池壁放入水中,观察并记录大鼠寻找并爬上平台的路线图及所需时间(潜伏期)。4 次训练大鼠分别从四个不同的入水点入水,如果大鼠在 120 s 内未找到平台,需将其引至平台。这时潜伏期记为 120 s,每次训练间隔 60 s、连续 5 d。测试当日末次给药后 1 h 后,大鼠由一固定入水点面向池壁被投入水中,观察

并记录其寻找平台路线及找到平台的时间(潜伏期)。

1.6 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件行统计学分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,行组间方差分析。

2 结果

所有动物在整个再灌注存活期间,未见偏瘫、抽搐等异常表现。所有 HE 空白对照染色结果均阴性。

2.1 CYZ 对全脑缺血后大鼠海马 CA1 区正常神经元数目的影响

缺血再灌注后 1 d 时,对照组与 CYZ 给药组大鼠海马 CA1 区神经元均未见明显缺失,各组大鼠海马 CA1 区正常神经元计数无明显差异;缺血再灌注后 2 d 时,对照组和 CYZ 低剂量组大鼠海马 CA1 区可见少量死亡神经元,表现为胞体缩小,胞核固缩或溶解,并伴有小胶质细胞增生(图 1A),但 CYZ 高剂量组大鼠海马 CA1 区仍未见明显死亡神经元,正常神经元计数高于对照组大鼠;缺血再灌注后 4 d 时,缺血对照组和 CYZ 低剂量组大鼠海马 CA1 区可见较多死亡神经元,CYZ 高剂量组大鼠海马 CA1 区则可见少量死亡神经元;缺血再灌注后 8 d 时,对照组和 CYZ 低剂量大鼠海马 CA1 区神经元可见大部分死亡(图 1B),CYZ 高剂量组仅见部分神经元死亡,正常神经元计数明显高于缺血组;缺血后 40 d 时,CYZ 高剂量组正常神经元计数仍明显高于缺血对照组(图 2)。

2.2 CYZ 对全脑缺血后 40 d 时大鼠学习记忆的影响

在适应训练中,所有动物活动正常。在最初的训练中,大鼠主要以边缘式和随机式寻找平台,随着训练增加,除 CYZ 高剂量治疗组外的大鼠仍有大部分保持此搜索策略,CYZ 高剂量治疗组大鼠的搜索策略则主要为直线式和趋向式。与对照组相比,CYZ 高剂量治疗组大鼠寻找平台的潜伏期明显缩短 (图 3, $P<0.01$)。

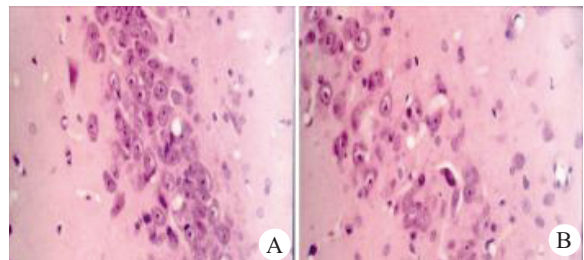


图 1 缺血再灌注损伤后大鼠海马 CA1 区神经元 (HE 染色,原放大倍数:×400)

Fig.1 Neurons in the hippocampal CA1 region after ischemia-reperfusion injury

(HE staining, original magnification: ×400)

A: 2 d after ischemia-reperfusion injury; B: 8 d after ischemia-reperfusion injury

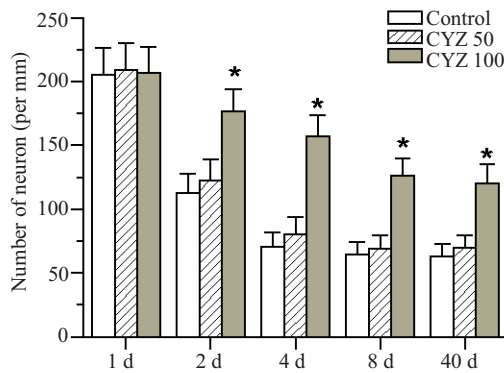


图 2 全脑缺血再灌注后不同时间点大鼠海马 CA1 区正常神经元计数 (个/mm²)

Fig.2 Number of neurons in the hippocampal CA1 region at different time points after ischemia-reperfusion injury

CYZ 50: CYZ 50 mg/kg·b.w.; CYZ 100: CYZ 100 mg/kg·b.w.; * $P<0.01$ vs control group

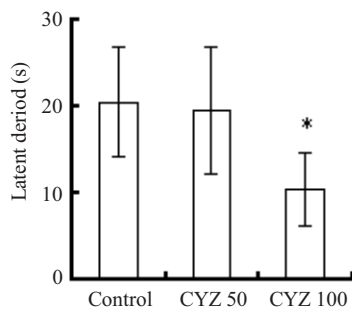


图 3 全脑缺血再灌注后 40 日时 MORRIS 水迷宫实验中各组大鼠寻找平台的潜伏期 (s)

Fig.3 Time used by the rats in finding the platform in Morris water maze test 40 d after ischemia-reperfusion injury

* $P<0.01$ vs control group

3 讨论

全脑缺血再灌注损伤后,鼠海马区神经元的损伤不仅表现出选择性损伤的模式,而且损害具有迟发性的特点。此后该现象在其它动物全脑缺血模型上也得到进一步证实,由此人们提出了脑缺血后迟发性神经元死亡的概念,这使得使人们对缺血性脑损伤有了更新的认识^[7,8]。尽管目前对缺血再灌注发生的机制尚不清楚,但由于缺血再灌注并不在缺血的即刻发生,而是于再灌注一定时间后才出现,这就为缺血后采用一定保护措施治疗,减轻缺血造成的脑损害提供了可能。

本实验中,我们发现益智胶囊可以明显减少大鼠全脑缺血后海马 CA1 区神经元的死亡,表明其对缺血所致的脑损伤具有保护作用。同时,由于海马 CA1 区神经元不仅对缺血具有敏感性选择,而且该区神经元与人类及哺乳动物的学习记忆密切相关^[9]。因此,我们利用 MORRIS 水迷宫对全脑缺血 15 min、再灌注后 40 d 时大鼠的学习记忆能力进行了进一步的测试。结果发现 CYZ 高剂量治疗组大鼠学习记忆功能

明显好于缺血对照组大鼠,表现为 CYZ 高剂量治疗组大鼠寻找平台的潜伏期明显缩短。从而进一步证实中药益智胶囊对缺血性脑损伤产生的中枢保护作用,尤其是对缺血所致学习记忆障碍的保护作用,与其通过减少海马 CA1 区神经元死亡,进而减轻全脑缺血后大鼠的学习记忆障碍有关。

益智胶囊主要是由首乌、人参、淫羊藿等经现代科学方法提取其有效成分而成。何首乌具有补肝肾、养精血之功效,用于肝肾亏虚、头昏目眩、须发早白等证。近年来,首乌作为主药在治疗脑功能障碍方面取得了较好的疗效。人参具有促智、抗衰老的作用,同时对与血管性疾病相关的痴呆具有防治作用,尤其是人参皂苷既可提高脑内乙酰胆碱含量,使胆碱能 M 受体数增加,还能促进核酸和蛋白质的合成。此外,淫羊藿多糖和淫羊藿总黄酮的复合物,也能提高大鼠下丘脑中单胺类神经递质水平,改善大鼠的学习、记忆行为^[9]。

综上所述,本实验发现益智胶囊对全脑缺血后大鼠海马 CA1 区神经元所产生的中枢保护作用,不仅能减轻大鼠缺血后脑组织的病理损害,而且还可改善大鼠的记忆功能障碍,从而进一步证实了益智胶囊对缺血性脑损伤产生的中枢保护作用具有明显效果。

参考文献:

- [1] Kristian T, Siesjo BK. Calcium in ischemic cell death [J]. Stroke, 1998, 29(5): 705-13.
- [2] 程毓华, 王卫东, 孙莉莎, 等. NOS 抑制剂对成年大鼠弥漫性脑损伤后海马齿状回神经发生的影响 [J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(10): 1074-77.
Cheng YH, Wang WD, Sun LS, et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitor on dentate gyrus neurogenesis after diffuse brain injury in adult rats [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(10): 1074-77.
- [3] Danton GH, Dietrich WD. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2003, 62(2): 127-36.
- [4] Wang WD, Jiang W, Wang HD, et al. Study of neurogenesis in the dentate gyrus after global ischemia reperfusion in rats [J]. J Fourth Mil Med Univ/Di Si Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 23(8): 673-77.
- [5] Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia [J]. ILAR J, 2003, 44(2): 85-95.
- [6] 吴航宇, 李琳, 徐江平, 等. 益智胶囊对学习记忆障碍模型的影响及 β 淀粉样肽细胞毒性的保护作用 [J]. 中药材, 2002, 26(7): 495-9.
Wu HY, Li L, Xu JP, et al. Effects of Compound YiZhi on learning and memory disorder and beta-amyloid protein induced neurotoxicity [J]. J Chin Med Mater, 2002, 26(7): 495-9.
- [7] Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia [J]. Brain Res, 1982, 239(1): 57-69.
- [8] Pantoni L, Lamassa M, Inzitari D. Transient global amnesia: a review emphasizing pathogenic aspects [J]. Acta Neurol Scand, 2000, 102(5): 275-83.
- [9] 王卫东, 江文, 王洪典, 等. 缺血性脑损伤与齿状回神经发生 [J]. 中华老年心脑血管病杂志 (Chin J Geriatr Cardiovasc Cerebrovasc Dis), 2002, 10(1): 64-6.