



丹参酮 II_A 对血管性痴呆大鼠的神经保护作用机制

何治^{1*}, 潘志红², 鲁文红³

(1. 三峡大学 医学院, 湖北 宜昌 443002;

2. 宜昌市第一人民医院, 湖北 宜昌 443002;

3. 华中科技大学 同济医学院 公共卫生学院, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的:初步探讨丹参酮主要成分丹参酮 II_A 对血管性痴呆大鼠的神经保护作用机制。方法:大鼠血管性痴呆模型采用永久性结扎大鼠双侧颈总动脉制作而成。动物随机分为假手术组、缺血模型组、丹参酮 II_A (2, 4 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) 治疗组。持续缺血 30 d 后开始观测各组的学习记忆功能,然后断头取脑,分离皮层和海马组织,分光光度法测定丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)以及谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性的变化;运用高效液相色谱法测定不同组大鼠皮层和海马组织内谷氨酸和 γ-氨基丁酸的含量。结果:丹参酮 II_A 可以改善血管性痴呆大鼠的学习记忆功能;丹参酮 II_A 可减少 MDA 的生成,增加 SOD, GPX 活性;慢性缺血 30 d 后,大鼠皮层和海马组织谷氨酸和 γ-氨基丁酸的含量减低,丹参酮 II_A 可增加血管性痴呆大鼠皮层和海马组织内谷氨酸和 γ-氨基丁酸的含量。结论:丹参酮 II_A 在血管性痴呆大鼠可发挥抗氧化作用并调节兴奋性氨基酸和抑制性氨基酸的含量。

[关键词] 丹参酮 II_A; 谷氨酸; γ-氨基丁酸; 血管性痴呆

随着当今世界人口老龄化日益严重,血管性痴呆(vascular dementia, VD)发病率日趋增高^[1-2],寻找有效的治疗药物已成为当务之急。丹参是我国传统中药,丹参酮是丹参脂溶性成分的代表物质,具有清除氧自由基、改善微循环、钙拮抗等广泛的药理作用,现已成为研究的热点^[3-6]。目前有报道丹参酮对中风模型大鼠有一定的神经保护作用^[4],但有关其神经保护机制目前仍然不是很清楚,相关工作开展较少,本课题对这方面进行了初步的探索,前期已发现 TSA 可以减轻海马细胞缺氧缺糖损伤,表现出抗氧化作用和抑制兴奋性氨基酸释放作用^[7],本实验利用大鼠血管性痴呆模型观察丹参酮 II_A 对整体动物学习记忆是否有改善作用,并对其作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 丹参酮 II_A (红色结晶粉末,纯度 >98%,西安冠宇生物技术有限公司);谷氨酸和 γ-氨基丁酸对照品(Sigma 公司);β-巯基乙醇(AM-RESCO Inc.);邻苯二甲醛(O-phthaldialdehyde,

OPA, Sigma);甲醇(色谱纯, Fisher Scientific);磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硼酸钠均为国产分析纯,实验前用四蒸水配成所需浓度;MDA, SOD, GPx 以及蛋白定量试剂盒(考马斯亮蓝法,南京建成生物工程公司);VARIAN Prostar 高效液相色谱仪;VARIAN 363 型荧光检测器;依利特 ODS C₁₈ 反相色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。

1.2 动物分组和模型制备 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g,雄性,华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。随机分为 4 组,假手术组,血管性痴呆组,丹参酮 II_A 低剂量治疗组,丹参酮 II_A 高剂量治疗组。痴呆动物模型的制备:参照文献[8]。缝合后腹腔注射生理盐水 4 ~ 5 mL,放回笼中饲养;假手术组除不结扎、不剪断双侧颈总动脉外,其余过程与手术组相同;丹参酮 II_A 治疗组,术后第 1 天开始腹腔注射给药,给予丹参酮 II_A 2 mg · kg⁻¹ (低剂量组)或 4 mg · kg⁻¹ (高剂量组),共 30 d。

1.3 学习记忆功能测定 利用 Morris 水迷宫对各组动物学习记忆能力进行检测, Morris 水迷宫实验系统由中国医学科学院药物研究所研制。基本方法参照文献[8]。各组均于造模 30 d 后开始进行,每组取 7 ~ 10 只动物进行测试。数据由水迷宫实验软件系统获得,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据用

[稿件编号] 201002

[基金项目] 三峡大学博士科研启动基金项目(KJ2008B053)

[通信作者] * 何治, Tel: (0717) 6397466, E-mail: hezhi2003@126.com



SPSS 12.0 统计软件处理, 采用重复测量方差分析结合 Tukey's 检验, $P < 0.05$ 有统计学差异。

1.4 MDA, SOD 以及 GPx 活性的测定方法 操作均按照试剂盒说明书进行。

1.5 高效液相色谱法测定海马组织内氨基酸含量 将各组大鼠快速断头取出全脑, 在冰板上迅速分离出皮层和海马, 用冰生理盐水 1:9 匀浆, 低温离心机 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $3\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液 $50\ \mu\text{L}$ 进行蛋白定量; 取上清 $200\ \mu\text{L}$ 加入 4 倍体积的冰冷甲醇, 充分混匀后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 2 h, $13\ 400\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清待测。色谱条件参照文献[7]。

1.6 统计分析 采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间均数比较采用 One-Way analysis of variance (ANOVA) 及 Fisher LSD test (Least-significant difference)。 $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 丹参酮 II_A 对血管性痴呆大鼠认知功能障碍的作用 丹参酮 II_A 对逃避潜伏期的影响: 学习训练结束时, 假手术组、血管性痴呆组、丹参酮 II_A 低剂量组、丹参酮 II_A 高剂量组逃避潜伏期分别为 (9.25 ± 2.18) , (80.38 ± 20.36) , (28.56 ± 4.29) , (16.38 ± 5.27) s。模型组与假手术组比较逃避潜伏期有显著性差异 ($P < 0.05$); 丹参酮 II_A 低剂量组、丹参酮 II_A 高剂量组明显缩短潜伏期, 与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$), 但高剂量组与低剂量组之间并无统计学差异 (图 1)。

量组在原平台所在象限探索时间占探索总时间分别为 $(44.28 \pm 8.46)\%$, $(19.58 \pm 4.28)\%$, $(35.28 \pm 5.88)\%$, $(40.21 \pm 8.39)\%$ (图 2)。

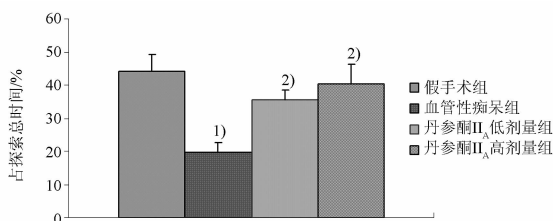


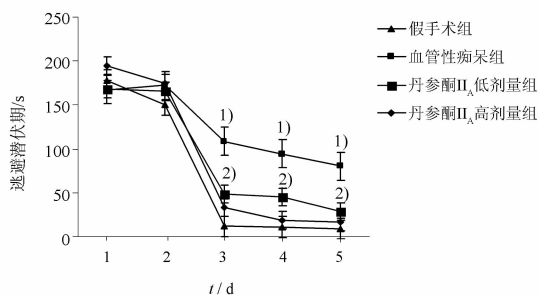
图 2 丹参酮 II_A 对血管性痴呆大鼠空间记忆能力的影响

2.2 丹参酮 II_A 对血管性痴呆大鼠 MDA, SOD, GPx 的影响 与假手术组相比, 缺血性脑损伤 30 d 后, 大鼠皮层和海马 MDA 含量分别增加了 $(47.49 \pm 8.39)\%$ ($P < 0.05$) 和 $(95.53 \pm 19.35)\%$ ($P < 0.01$), 丹参酮 II_A 明显降低缺血性脑损伤后 MDA 的产生, 而且丹参酮 II_A 作用呈剂量依赖性; 皮层和海马 GPx 含量分别减少了 $(34.80 \pm 8.27)\%$ ($P < 0.05$) 和 $(31.55 \pm 7.16)\%$ ($P < 0.05$), 丹参酮 II_A 明显增加缺血性脑损伤后 GPx 的产生, 而且丹参酮 II_A 作用呈剂量依赖性; 皮层和海马 SOD 含量分别减少了 $(56.40 \pm 14.25)\%$ ($P < 0.01$) 和 $(27.50 \pm 4.27)\%$ ($P < 0.05$), 丹参酮 II_A 明显增加缺血性脑损伤后 SOD 的产生, 而且丹参酮 II_A 作用呈剂量依赖性 (表 1)。

2.3 丹参酮 II_A 对血管性痴呆大鼠皮层和海马组织谷氨酸和 γ -氨基丁酸含量的影响 血管性痴呆大鼠皮层和海马谷氨酸和 γ -氨基丁酸的含量均明显低于假手术组 ($P < 0.05$); 而丹参酮 II_A 组大鼠谷氨酸和 γ -氨基丁酸含量与血管性痴呆组比较, 均明显增加, 具有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2)。

3 讨论

大量研究表明, 氧化应激损伤在多种神经退行性病变包括神经元缺血性损伤中亦起关键作用[9, 10]。脑缺血和再灌注期间均可产生大量的自由基, 使 MDA 含量升高, 并消耗 SOD 而使其活性下降, 而自由基的大量产生是迟发性神经元损害的主要原因。已有报道指出丹参酮 II_A 能显著降低心肌缺血再灌注后组织中 MDA 的生成和减少心肌肌酸激酶的释放, 认为它直接清除氧自由基是防治家



与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, 与缺血组比较²⁾ $P < 0.05$ (图 2 同)。

图 1 丹参酮 II_A 对血管性痴呆大鼠逃避潜伏期的影响

丹参酮 II_A 对空间记忆能力的影响: 假手术组、血管性痴呆组、丹参酮 II_A 低剂量组、丹参酮 II_A 高剂



表 1 丹参酮 II_A 对大鼠皮层和海马 MDA, GPx, SOD 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$		GPx/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$		SOD/ $\mu\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	
	皮层	海马	皮层	海马	皮层	海马
假手术	23.18 ± 4.11	20.59 ± 5.01	100.28 ± 16.37	95.36 ± 10.24	2256.38 ± 245.36	1963.25 ± 300.28
脑缺血	34.19 ± 5.29 ¹⁾	40.26 ± 6.23 ²⁾	65.38 ± 10.25 ¹⁾	65.27 ± 6.66 ¹⁾	983.65 ± 199.27 ²⁾	1423.21 ± 196.31 ¹⁾
丹参酮 II _A 低	29.58 ± 5.25 ³⁾	35.18 ± 5.29 ³⁾	75.29 ± 11.11 ³⁾	74.29 ± 5.89 ³⁾	1455.82 ± 167.29 ³⁾	1563.89 ± 177.58 ³⁾
丹参酮 II _A 高	25.09 ± 5.49 ³⁾	29.77 ± 4.4	85.27 ± 14.79 ³⁾	81.26 ± 8.27 ³⁾	1681.45 ± 287.43 ³⁾	1582.89 ± 247.23 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与血管性痴呆组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 丹参酮 II_A 对大鼠皮层和海马的谷氨酸和 γ -氨基丁酸的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

$\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$

组别	皮层		海马	
	谷氨酸	γ -氨基丁酸	谷氨酸	γ -氨基丁酸
假手术	210.95 ± 30.22	156.38 ± 20.11	210.39 ± 20.14	100.24 ± 14.95
脑缺血	123.88 ± 34.78 ¹⁾	93.27 ± 18.74 ¹⁾	123.87 ± 10.29 ¹⁾	60.21 ± 10.29 ¹⁾
丹参酮 II _A 低	143.29 ± 21.09 ²⁾	110.28 ± 6.39 ²⁾	140.28 ± 10.89 ²⁾	72.09 ± 20.47 ²⁾
丹参酮 II _A 高	186.30 ± 18.79 ²⁾	136.99 ± 10.24 ²⁾	198.55 ± 14.20 ²⁾	88.26 ± 14.36 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与血管性痴呆组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

兔心肌缺血再灌注损伤的机制之一^[6-7]。本实验结果表明丹参酮 II_A 能改善血管性痴呆大鼠学习记忆功能,能降低缺血大鼠脑内 MDA 含量,增加 GPx 和 SOD 含量,对慢性脑缺血动物表现出良好的抗氧化作用,与离体实验结果一致^[7],故推测丹参酮 II_A 的抗氧化作用可能亦是其发挥神经保护作用的机制之一。

目前均认为,缺血性脑损伤与兴奋性氨基酸的毒性作用有关,较多报道均指出脑缺血急性期神经细胞外液主要的兴奋性氨基酸谷氨酸水平都有较明显升高,但随着缺血时间的延长,其水平逐渐恢复到正常水平^[11]。关于较长时间的慢性低灌注导致的大鼠不完全性脑缺血后脑组织内氨基酸水平如何变化目前国外报道并不多见,国内较多报道均认为血管性痴呆模型大鼠脑组织内兴奋性氨基酸水平升高^[12]。但本实验发现血管性痴呆模型大鼠皮层和海马组织内谷氨酸和 γ -氨基丁酸含量均较假手术组大鼠脑内氨基酸含量低,且有统计学意义($P < 0.05$),而丹参酮 II_A 治疗组的大鼠脑内谷氨酸和 γ -氨基丁酸含量则均高于血管性痴呆模型组。血管性痴呆模型大鼠谷氨酸和 γ -氨基丁酸含量降低是否可以这样理解:缺血初期,由于能量障碍,大量兴奋性氨基酸释放,触发兴奋性毒性作用,而较长时间大脑供血不足后,脑细胞代谢障碍,使各种氨基酸吸收和合成障碍,故而谷氨酸和 γ -氨基丁酸含量

均减少低于正常水平。本实验结果表明,长期慢性脑缺血可使大鼠脑组织内谷氨酸和 γ -氨基丁酸含量均降低,而谷氨酸和 γ -氨基丁酸为中枢神经活动必需氨基酸,丹参酮 II_A 通过提高脑组织内谷氨酸和 γ -氨基丁酸含量,改善血管性痴呆模型大鼠的学习记忆功能,加强神经电生理活动,这一作用对血管性痴呆病人的治疗可能有一定益处。至于丹参酮 II_A 提高血管性痴呆大鼠脑组织内谷氨酸和 γ -氨基丁酸的具体机制,尚需要更深入实验进行探讨,初步推测认为可能是丹参酮 II_A 通过其抗氧化应激作用而发挥神经元保护作用,改善其代谢障碍,促进各种氨基酸吸收和合成,从而提高谷氨酸和 γ -氨基丁酸含量。

总之,丹参酮 II_A 在血管性痴呆大鼠可发挥抗氧化作用并调节兴奋性氨基酸和抑制性氨基酸的含量,从而发挥出一定的神经保护作用。除此之外,亦有可能有其他机制参与,尚需要进一步的研究,从而阐明丹参酮的神经保护作用机制,为临床上更好的利用丹参酮治疗脑缺血性病人提供理论依据。

【参考文献】

[1] Myron D G. Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future [J]. Neuropharmacology, 2008, 55: 363.
[2] Suresh L M, Namratta M, Ram R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics [J]. Brain Res Rev, 2007, 54: 34.
[3] Han J Y, Fan J Y, Horie Y, et al. Ameliorating effects of compounds derived from Salvia miltiorrhiza root extract on microcir-



- culatory disturbance and target organ injury by ischemia and reperfusion [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 117: 280.
- [4] Yu X Y, Lin S G, Zhou Z W, et al. Tanshinone II_A, a primary active constituent from *Salvia miltiorrhiza*, exhibits neuro-protective activity in experimentally stroked rats [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 417: 261.
- [5] 钟先阳, 罗仁, 魏华, 等. 丹参酮II_A对大鼠出血性休克再灌注肾损伤的保护作用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2002, 22 (S1): 114.
- [6] 王蓉, 曾晓荣, 王贞, 等. 丹参酮II_A磺酸钠对家兔缺血预处理心肌保护作用的影响 [J]. *中国微循环*, 2004, 8 (5): 335.
- [7] 鲁文红, 何治. 丹参酮II_A对海马细胞缺氧缺糖损伤的保护作用及其机制初步研究 [J]. *广东医学*, 2009, 30 (3): 364.
- [8] He Z, Liao Y, Zheng M, et al. Piracetam improves cognitive deficits caused by chronic cerebral hypoperfusion in rats [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2008, 28: 613.
- [9] Adibhatla R M and Hatcher J F. Phospholipase A₂, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia [J]. *Free Radical Biolog Med*, 2006, 40: 376.
- [10] Chong Z Z, Li F, Maiese K. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease [J]. *Prog Neurobiol*, 2005, 75: 207.
- [11] Phillis J W and O'Regan M H. Characterization of modes of release of amino acids in the ischemic/reperfused rat cerebral cortex [J]. *Neurochem Int*, 2003, 43: 461.
- [12] 封银曼, 郑攀, 任小巧. 补肾醒脑方对实验性血管性痴呆大鼠脑组织中谷氨酸、 γ -氨基丁酸含量的影响 [J]. *中医研究*, 2004, 17 (2): 22.

Neuroprotective effects of tanshinone II_A on vascular dementia in rats

HE Zhi^{1*}, PAN Zhihong², LU Wenhong³

(1. Medical School, China Three Gorges university, Yichang 443002, China;

2. First Renmin Hospital of Yichang, Yichang 443002, China;

3. Public Health Institute, Tongji Medical school, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the underlying neuroprotective mechanisms of Tanshinone II_A (TSA) on rat cerebral ischemia *in vivo*. **Method:** Study of TSA on rat cerebral ischemia *in vivo*: Male SD rats were divided into four groups (sham-operated, ischemic and treated group (lower dose and higher dose). Chronic cerebral ischemia after permanent bilateral carotid artery ligation was introduced as an *in vivo* ischemic model. After ischemia impairment, TSA (2, 4 mg · kg⁻¹ · d⁻¹) was administrated by ip for 30 days in treated group. We used morris water maze to investigate the learning and memory. Levels of malondialdehyde (MDA), activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) in brain tissue were detected by spectrophotometer. High-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection was applied to measure the contents of glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA) in cortex and hippocampus. **Result:** TSA can improve learning and memory deficits in vascular dementia. An elevation of SOD and GPX activity and decrease of MDA level were shown in TSA treated group after brain ischemia. Decreased glutamate and gamma-aminobutyric acid induced by chronic brain ischemia were markedly inhibited by TSA pretreatment. **Conclusion:** The neuroprotective effect of TSA are partly due to its functions as follow: anti-free radical injury; regulating the content of glutamate and gamma-aminobutyric acid.

[Key words] tanshinone II_A; glutamate; GABA; vascular dementia

doi: 10.4268/cjcm20101426

[责任编辑 刘 璈]