

天麻多糖对脑瘫幼鼠脑内神经递质的影响

史华^{1*}, 何琦², 娄元俊¹, 邵素菊¹

(1. 河南省中医院, 郑州 450002; 2. 河南中医学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:探讨天麻多糖(Gastrodiae Rhizoma polysaccharide,GRPS)对脑瘫幼鼠神经递质的影响及其机制。方法:58只SD幼鼠,除空白组外,48只幼鼠结扎左侧颈总动脉并缺氧1h造脑瘫模型,成模大鼠随机分为模型组,施普善组(2.5 mL·kg⁻¹),GRPS高、低剂量组(300,150 mg·kg⁻¹)。给药21d后,Y型迷宫及跳台实验检测大鼠记忆力。化学或酶联免疫吸附(ELISA)法检测大脑皮层及左侧海马一氧化氮(nitric oxide,NO),乙酰胆碱脂酶(acetylcholin esterase,ACHE),5-羟色胺(5-hydroxytryptamin,5-HT),去甲肾上腺素(noradrenaline,NE)和γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid,GABA)水平。实时荧光定量PCR(Real-time PCR)及ELISA法检测大脑皮层及海马内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)表达及含量。苏木素-伊红(HE)染色观察右侧海马组织结构。结果:与空白组比较,模型大鼠行为学错误次数增加,跳台潜伏期减少,大脑皮层和海马中5-HT,NE和GABA下降,ACHE和Glu增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比,GRPS高和低剂量组大鼠行为学错误次数减少,跳台潜伏期增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。GRPS高和低剂量组大鼠在大脑皮层中NO,NE,5-HT和eNOS增加,ACHE减少;GRPS高剂量组大鼠海马的NO,NE和eNOS增加,ACHE减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。GRPS低高剂量组大鼠海马组织结构未见水肿,细胞排列整齐。结论:GRPS可以增强脑瘫幼鼠记忆力,其机制与增加大脑皮层及海马中NO,NE和5-HT含量,降低ACHE水平,增加eNOS表达,保护海马区组织有关。

[关键词] 天麻多糖; 脑瘫; 神经递质; 内皮型一氧化氮合酶; 大脑皮层; 海马区

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)23-0140-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017230140

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1347.026.html>

[网络出版时间] 2017-09-06 13:47

Effect of Gastrodiae Rhizoma Polysaccharide on Brain Neutral Transmitter in Immature Rats with Cerebral Palsy

SHI Hua^{1*}, HE Qi², LOU Yuan-jun¹, SHAO Su-ju¹

(1. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the effect of Gastrodiae Rhizoma polysaccharide (GRPS) on neutral transmitter in the immature rats with cerebral palsy. **Method:** A total of 58 SD immature rats were used in the experiment, and except in the blank control ones, common carotid arteries of all the left 48 rats were ligatured and combined with hypoxia treatment to establish cerebral palsy models in immature rats. The successfully modeled rats were randomly divided into model group, cerebrolysin group (2.5 mL·kg⁻¹), GRPS low (150 mg·kg⁻¹) and high dose (300 mg·kg⁻¹) groups. After treatment for 21 days, Y maze and diving platform experiment were used to explore the memory ability of rats. The levels of nitric oxide (NO), acetylcholine esterase (ACHE), 5-hydroxytryptamin (5-HT), noradrenaline (NE) and γ-aminobutyric acid (GABA) in cerebral cortex and hippocampus were measured by using ELISA or chemical method. Real-time PCR and ELISA were used to detect the expression levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA and protein in brain. HE staining was

[收稿日期] 20170615(011)

[基金项目] 国家中医药管理局项目(2012228);河南省教育厅重点科研项目(15A360003)

[通讯作者] *史华,硕士,主治医师,从事儿童神经康复研究,Tel: 0371-60908950,E-mail:fendouhuan6@sina.com

used to observe the hippocampus tissue structure. **Result:** As compared with normal blank group, the error number in behavior was significantly increased in model group rats; the step down latency was decreased; and also, the levels of 5-HT, NE and GABA in cerebral cortex and hippocampus of model group rats were significantly decreased, while the levels of ACHE and Glu were increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with the model group, the levels of NO, NE, 5-HT, and eNOS in cerebral cortex and hippocampus of GRPS low and high dose group rats were increased, while the level of ACHE was decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the levels of NO, NE, and expression of eNOS in hippocampus of GRPS high dose group were increased, while the levels of ACHE were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The regular cell position was observed in hippocampus of GRPS low and high dose groups, without edema. **Conclusion:** GRPS could improve the memory of cerebral palsy immature rats, and the mechanism may be associated with increasing NO, ACHE, NE, 5-HT and eNOS levels in cerebral cortex and hippocampus, and protection on hippocampus tissue structure of rats.

[**Key words**] *Gastrodiae Rhizoma polysaccharide (GRPS)*; cerebral palsy; neutral transmitter; endothelial nitric oxide synthase (eNOS); cerebral cortex; hippocampus

幼儿脑瘫指的是在胎儿出生前后 1 个月内,由于各种原因导致的非进行性脑损伤^[1]。产前的宫内感染、早产、难产以及产后失血、感染等都会导致幼儿脑瘫,主要表现为中枢神经系统的障碍,以及因此导致的智力低下等等,患病率在 0.25%^[2]。目前对于脑瘫的治疗多采用针灸配合康复治疗相结合的方法,鉴于幼儿所处阶段的特殊性,使用药物进行治疗需要严格控制剂量,开发低毒高效的药物是治疗幼儿脑瘫的方向之一。研究表明,脑瘫的发生与大脑缺血缺氧所导致的酸中毒以及神经递质紊乱有关,纠正由大脑缺氧所引起的神经递质紊乱有助于脑瘫儿的智力恢复^[3]。

天麻是兰科植物天麻的干燥块茎,中医认为天麻具有息风止痉、平肝抑阳、祛风通络的作用,可以用于治疗小儿惊风和抽搐等等^[4]。天麻多糖是天麻的主要有效成分之一,近期研究证明,天麻多糖对多种原因导致的脑缺血和脑损伤都有良好的治疗作用^[5]。本研究拟在此基础上,探讨天麻多糖对缺血性脑瘫神经递质的影响,确定天麻多糖在治疗幼儿脑瘫上的作用。

本研究采用永久结扎左侧颈总动脉并低氧 1 h 制备幼鼠脑瘫模型,灌胃给药天麻多糖 21 d 后,观察天麻多糖对脑瘫幼鼠记忆力及大脑皮层、海马区中一氧化氮(nitric oxide, NO)和神经递质乙酰胆碱脂酶(acetyl choline, ACHE), 5-羟色胺(5-hydroxytryptamin, 5-HT), 去甲肾上腺素(noradrenaline, NE)和 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)的水平,以及内皮型一氧化氮合酶(endothelial NOS, eNOS)的表达量的影响,探究天麻多糖对缺血性脑瘫的治疗作用及其机制。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠, 1 周龄, 雌雄各半, SPF 级, 体重 15 ~ 20 g, 共 58 只。购自河南省实验动物中心, 合格证号 SCXK(豫) 2013-0008。实验获得河南中医学院实验动物伦理委员会批准(编号 ACCDU2015110)。

1.2 试剂及药物 磷酸盐缓冲液(PBS, 广州赛业生物技术有限公司, 批号 20150910); 组织细胞裂解液(碧云天生物技术有限公司, 批号 20161115); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司, 批号 ML166920); NO 试剂盒(南京建成, 批号 20161010); trizol, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 及 Maxima SYBR Green/ROX Qpcr Mastr Mix(美国 ThermoFisher 批号分别为 28228, 03120, 03326); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH, 英国 Abcam 公司, 批号 ab3718); 化学试剂为国产分析纯(天津大茂); eNOS, ACHE, NE, 5-HT 和 GABA 酶联免疫试剂盒(武汉华美生物技术有限公司, 批号分别为 20160809, 20160816, 20160909, 20160810, 20161001); 施普善(奥地利 EVER Neuro pharma GmbH 公司, 批号 T28014032)。

天麻多糖制备: 天麻购于北京同仁堂, 由河南中医学院邵素菊教授鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* 的干燥根茎。参照文献方法^[6]提取天麻多糖, 取天麻粉末 500 g, 加入石油醚 1 000 mL 冷浸过夜后, 残渣加入 80% 乙醇 1 000 mL 回流提取 2 次, 残渣挥干乙醇后使用蒸馏水 1 500 mL 煮沸 4 h 后, 真空浓缩, 使用 1/5 倍体积三氯甲烷除蛋白, 收集水层加入无水乙醇至 80% 浓度过夜, 过滤干燥后即得天麻多糖, 天麻多糖得率为 22.17%。

1.3 仪器 680 型酶联免疫检测仪(美国 Bio-Rad 公司), Milli-Q Advantage 系列纯水仪(美国 Millipore 公司), CPA223S 型电子天平(德国 Sartorius 公司), DOiT01-YME 型 Y 型迷宫和 DOiT01-M-8 型跳台仪(上海多毅), Forma 900 型超低温冰箱(美国 Forma Scientific 公司), DK-S22 型电热恒温水槽(上海精宏公司), TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂), FE20 型 pH 计(德国 Mettler Toledo 公司), Wellwash 型洗板机及 ATI7500 型荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Scientific 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 58 只 SD 幼鼠, 随机分为空白组(10 只)和造模组(48 只), 所有大鼠于新环境中适应性饲养 3 d 后, 造模组大鼠使用乙醚浅麻, 仰卧位固定于手术台上, 剪去颈部毛并消毒, 颈正中切口, 分离左侧颈总动脉, 钝性分离黏附于颈总动脉上的迷走神经, 结扎时避免伤及迷走神经致使动物死亡, 7 号手术线结扎动脉, 逐层缝合伤口。整个实验过程需在高温空调(30 ℃)下进行, 以保证大鼠存活率。待大鼠清醒(翻正反射出现)立即将大鼠放入自制密闭玻璃容器中(通 8% 氧气 + 92% 氮气)中 1 h 造成幼鼠脑瘫模型(可见苏醒幼鼠偏瘫)^[7]。造模成功大鼠随机分为模型组(9 只), 施普善(2.5 mg·kg⁻¹)组, 天麻多糖高剂量(300 mg·kg⁻¹, 生药量 1.4 g·kg⁻¹)和低剂量组(150 mg·kg⁻¹, 生药量 0.7 g·kg⁻¹)各 10 只, 于手术 3 d 后, 给药组动物分别给予药物灌胃给药, 空白组及模型组给予等量的蒸馏水, 1 次/d, 连续 21 d。

2.2 Y 型迷宫及跳台实验 检测大鼠记忆力 Y 型迷宫实验分为训练和正式实验 2 个部分。于灌胃给药后 17 d 开始训练, Y 型迷宫共 3 臂, 大鼠置于 A 臂中, 适应 10 min 后开放 B 及 C 臂, B 臂有红色标记并带有电击, 动物错误进入 B 臂被电击(50 V), 动物进入 C 臂则完成 1 次训练。灌胃后的 17 ~ 20 d, 所有大鼠每天训练 2 次。21 d 灌胃 1 h 后, 即开始正式行为学观察, 每只大鼠放入 A 臂内适应 1 min 后开放 B 及 C 臂, 记录大鼠行为的错误次数, 每只大鼠进行 20 次。跳台实验分为训练和正式实验两个部分, 使用跳台仪进行, 一台跳台仪有 5 个间隔室, 每个间隔室跳台底部有 20 V 的电力, 且配备一个绝缘的跳台, 以大鼠跳下平台的次数作为错误次数, 以跳下跳台的第一次的时间为跳台潜伏期。于灌胃给药 20 d 后, 大鼠放入跳台内进行训练, 适应 3 min 后开启电源, 每次训练持续 3 min, 2 次/d。

于 21 d 灌胃给药并完成 Y 型迷宫实验后, 大鼠放入跳台仪内进行实验, 记录大鼠在 3 min 内跳下平台的错误次数。

2.3 大鼠大脑皮层及海马区中神经递质及 NO, eNOS 含量的检测 于灌胃 21 d 的行为学观察完成后, 乙醚过量麻醉处死大鼠, 与冰上迅速开颅, 分离大鼠中部大脑皮层及左侧海马区组织, 部分组织置于液氮急冻后至于 -80 ℃ 保存。待指标检测时, 室温解冻组织并精确称重, 于组织裂解液中匀浆后, 酶联免疫吸附法(ELISA)检测 ACHE, 5-HT, NE, GABA 和 eNOS 含量, 化学试剂盒法检测 NO 含量。

2.4 大鼠大脑皮层及海马区中 eNOS 的表达 分离得到的大鼠中部大脑皮层及左侧海马区组织, 剪取 40 mg 至于 trizol 试剂内, 按照试剂盒说明方法提取 RNA, 并逆转录成 cDNA。参照表 1 引物, 扩增条件为 95 ℃, 15 min, 40 个循环的 94 ℃, 15 s; 60 ℃, 32 s; 72 ℃, 60 s。数据使用 2^{-ΔΔC_t} 法分析。

表 1 引物序列

Table 1 Sequence of primers

目标基因	目标长度 /bp	引物长度 /bp	序列(5'-3')
eNOS	128	19	上游 GCAGAGGAGTCCAGCGAAC
		22	下游 CACAGCTACAGTGAGGTGGATC
GADPH	541	19	上游 TTAGCACCCCTGGCCAAAGG
		20	下游 CTTACTCCTTGAGGCCATG

2.5 大鼠海马区组织结构检测 冰上分离的大鼠右侧海马区组织, 部分置于 4% 的多聚甲醛内固定, 石蜡包埋后切成 10 μm 厚切片, 常规苏木素-伊红(HE)染色, 光镜下观察各组大鼠海马区的组织结构。

2.6 统计学方法 数据使用 SPSS 17.0 进行分析, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组比较采用 ANOVA 法进行分析, 以 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

3 结果

3.1 大鼠一般情况比较 空白组 10 只幼鼠状态良好, 造模组大鼠于造模后死亡 8 只, 开始灌胃前模型组死亡 1 只。

3.2 天麻多糖对大鼠 Y 型迷宫及跳台的影响 Y 型迷宫实验结果表明, 与空白组大鼠比较, 模型组大鼠的错误反应次数明显升高($P < 0.01$)。与模型组大鼠比较, 施普善组、天麻多糖低、高剂量组大鼠的错误反应次数明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。跳台实验结果表明, 与空白组大鼠比较, 模型组大鼠的错误次数明显增加, 潜伏期明显缩短($P < 0.01$)。与

模型组大鼠比较,施普善、天麻多糖低剂量和高剂量组大鼠的错误次数明显减少,潜伏期明显增加($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2,3。

表 2 各组大鼠 Y 型迷宫错误反应次数($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Number of mistake reaction of Y maze experiment in various group rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	错误反应/次
空白	-	1.22 ± 0.71
模型	-	10.91 ± 1.73 ²⁾
施普善	2.5 mL·kg ⁻¹	2.95 ± 2.79 ⁴⁾
天麻多糖	150 mg·kg ⁻¹	7.42 ± 1.01 ³⁾
	300 mg·kg ⁻¹	5.00 ± 1.83 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3~6 同)。

表 3 各组大鼠 3 min 跳台实验错误反应次数及潜伏期($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Number of mistake reaction and latency of diving platform experiment in various group rats in 3 min($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	错误反应/次	潜伏期/s	错误动物数/只
空白	-	0.58 ± 0.11	93.4 ± 24.1	3
模型	-	4.63 ± 0.95 ²⁾	10.7 ± 1.92 ²⁾	9
施普善	2.5 mL·kg ⁻¹	0.95 ± 0.41 ⁴⁾	41.4 ± 7.1 ⁴⁾	3
天麻多糖	150 mg·kg ⁻¹	1.61 ± 0.64 ³⁾	39.9 ± 9.9 ⁴⁾	8
	300 mg·kg ⁻¹	0.99 ± 0.29 ³⁾	48.1 ± 12.3 ⁴⁾	5

表 4 各组大鼠大脑皮层中 ACHE,5-HT,NE,GABA 蛋白和 NO 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Levels of ACHE, 5-HT, NE GABA and NO in cerebral cortex in various group rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	n	ACHE/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5-HT/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	NE/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	GABA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
空白	-	10	400.28 ± 50.17	19.01 ± 2.12	13.99 ± 2.91	17.58 ± 3.64	45.24 ± 2.10
模型	-	9	569.25 ± 49.01 ²⁾	11.44 ± 2.50 ²⁾	7.26 ± 1.61 ¹⁾	6.09 ± 1.16 ²⁾	7.09 ± 3.90 ²⁾
施普善	2.5 mL·kg ⁻¹	10	463.33 ± 33.10 ⁴⁾	18.01 ± 2.01 ⁴⁾	10.22 ± 2.89 ⁴⁾	13.53 ± 2.51 ³⁾	28.32 ± 3.04 ⁴⁾
天麻多糖	150 mg·kg ⁻¹	10	504.21 ± 31.92 ³⁾	14.49 ± 3.92 ³⁾	9.01 ± 1.77 ³⁾	7.22 ± 1.30	23.46 ± 4.88 ⁴⁾
	300 mg·kg ⁻¹	10	479.87 ± 40.99 ³⁾	14.91 ± 2.41 ⁴⁾	8.91 ± 1.56 ³⁾	8.12 ± 2.17	21.43 ± 4.31 ⁴⁾

表 5 各组大鼠海马区中 ACHE,5-HT,NE,GABA 蛋白和 NO 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Levels of ACHE, 5-HT, NE, GABA and NO in hippocampus in various group rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	n	ACHE/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5-HT/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	NE/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	GABA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
空白	-	10	421.47 ± 55.91	20.44 ± 3.91	14.02 ± 2.33	18.45 ± 4.96	47.94 ± 4.91
模型	-	9	572.39 ± 54.64 ²⁾	14.10 ± 5.96 ¹⁾	5.29 ± 2.76 ¹⁾	7.82 ± 2.88 ²⁾	5.43 ± 1.07 ¹⁾
施普善	2.5 mL·kg ⁻¹	10	444.28 ± 57.43 ⁴⁾	15.27 ± 3.17 ³⁾	9.84 ± 2.04 ⁴⁾	11.06 ± 3.57 ³⁾	21.85 ± 3.97 ³⁾
天麻多糖	150 mg·kg ⁻¹	10	541.21 ± 44.78	13.20 ± 2.50	6.91 ± 1.41	8.59 ± 2.55	18.53 ± 4.90 ³⁾
	300 mg·kg ⁻¹	10	509.62 ± 33.72 ³⁾	14.87 ± 3.36	7.75 ± 1.79 ³⁾	9.82 ± 3.12	12.25 ± 6.61

3.3 天麻多糖对大脑皮层和海马区中 ACHE,5-HT,NE,GABA 和 NO 水平的影响

3.3.1 对各组大鼠大脑皮层中 ACHE,5-HT,NE,GABA 和 NO 水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠在大脑皮层中的 NO,5-HT,NE 和 GABA 水平下降,ACHE 水平增加($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,施普善组大鼠在大脑皮层中的 NO,5-HT,NE 和 GABA 水平上升,ACHE 水平降低($P < 0.05, P < 0.01$);天麻多糖低剂量和高剂量大鼠在大脑皮层中的 NO,5-HT 和 NE 水平上升,ACHE 水平下降。见表 4。

3.3.2 对各组大鼠海马区中 ACHE,5-HT,NE,GABA 和 NO 水平的影响 与空白组比较,模型组大鼠在海马区的 NO,5-HT,NE 和 GABA 水平下降,ACHE 水平增加($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,施普善组大鼠在海马区的 NO,5-HT,NE 和 GABA 水平上升,ACHE 水平降低($P < 0.05, P < 0.01$);天麻多糖高剂量的 NO 和 NE 水平上升,ACHE 水平下降($P < 0.05$)。见表 5。

3.4 对各组大鼠大脑皮层及海马区 eNOS 基因表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠在大脑皮层和海马区的 eNOS mRNA 表达及蛋白含量明显下降($P < 0.05, P < 0.01$)。与模型组比较,施普善组和天麻多糖高剂量组大鼠在大脑皮层和海马区的 eNOS mRNA 表达及蛋白含量明显上升($P < 0.05, P < 0.01$);

天麻多糖低剂量大鼠在大脑皮层的 eNOS mRNA 表达及蛋白含量明显上升 ($P < 0.05$)。见表 6。

表 6 各组大鼠大脑皮层及海马区中 eNOS mRNA 及蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Level of eNOS in cerebral cortex and hippocampus in various group rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	n	大脑皮层		海马区	
			eNOS mRNA	eNOS 蛋白/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	eNOS mRNA	eNOS 蛋白/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
空白	-	10	1.119 \pm 0.109	21.20 \pm 1.94	1.021 \pm 0.031	24.89 \pm 2.13
模型	-	9	0.510 \pm 0.056 ¹⁾	10.33 \pm 2.01 ²⁾	0.692 \pm 0.070 ¹⁾	9.92 \pm 2.49 ²⁾
施普善	2.5 mL \cdot kg ⁻¹	10	0.952 \pm 0.091 ⁴⁾	15.42 \pm 1.09 ³⁾	0.843 \pm 0.027 ³⁾	13.32 \pm 1.62 ³⁾
天麻多糖	150 mg \cdot kg ⁻¹	10	0.790 \pm 0.066 ³⁾	14.86 \pm 1.11 ³⁾	0.774 \pm 0.019 ³⁾	13.21 \pm 1.93 ³⁾
	300 mg \cdot kg ⁻¹	10	0.682 \pm 0.047 ³⁾	13.99 \pm 1.03 ³⁾	0.710 \pm 0.038	11.20 \pm 2.69

3.5 各组大鼠右侧海马区组织结构的变化 空白组大鼠海马区结构整齐,神经元细胞突起明显。模型组大鼠海马区结构出现空隙,神经元疏松,并且出现水肿。施普善组大鼠海马区组织结构较为整齐,未见明显的水肿。天麻多糖低剂量组大鼠海马区可见少量空隙,未见水肿。天麻多糖低剂量组大鼠海马区组织结构清晰,未见水肿。见图 1。

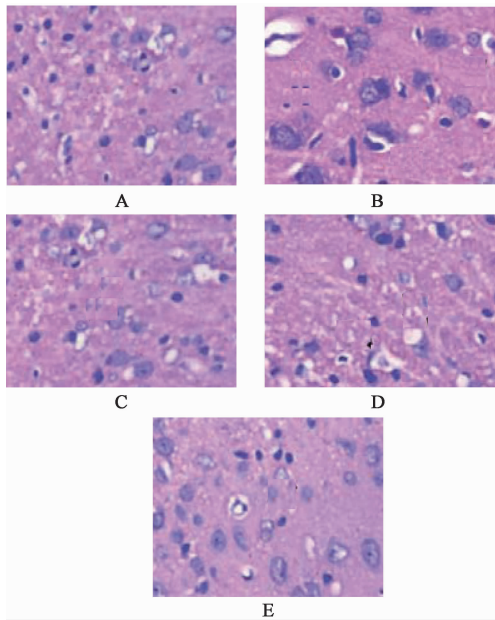


图 1 各组大鼠海马区组织结构 (HE, $\times 400$)

图 1 各组大鼠海马区组织结构 (HE, $\times 400$)

Fig. 1 Structure of hippocampus tissue of various group rats (HE, $\times 400$)

4 讨论

多种因素诱发的新生儿脑缺氧或者脑血流量减少是导致脑瘫的主要原因^[8]。目前对于脑瘫的治疗,国内多采用针灸配合药物的方法进行治疗,新生儿肝肾功较弱,在用药时需要加强对量的控制^[9]。中医药的毒副作用小,药效温和,适合于新生儿的治

疗。天麻在古代即被用于治疗小儿的惊风等,多种实验亦证实,天麻是一种安全、可靠的中药^[10-11]。天麻多糖是天麻的主要有效成分之一,本研究探讨天麻多糖治疗脑瘫的作用,探索了天麻多糖对大脑皮层和海马区两个部分神经递质的影响。

本实验首先使用了 Y 型迷宫和跳台仪对天麻多糖改善记忆功能的作用进行了研究,发现天麻多糖可以有效提高脑瘫幼鼠的记忆能力,减少大鼠在迷宫及跳台中的错误行动次数,延迟错误潜伏期。而大脑的记忆功能需要由各种神经递质的传递来完成,因此本实验在天麻多糖改善记忆功能的基础上进一步探讨了天麻对大脑神经递质的影响。海马区是“叙述性记忆”的主要功能区,与大脑皮层共同作为记忆的掌控区^[12-13],本实验分离了大脑皮层及海马区,对天麻多糖对不同区域的作用进行了研究,发现天麻多糖对两个区域均的神经递质含量及组织结构均有一定的改善作用。乙酰胆碱是目前研究最为广泛的神经递质,而 ACHE 则是分解乙酰胆碱的主要酶类,目前市面上最多的增强记忆力药物都是通过抑制 ACHE 达到的^[14]。5-HT 和 NE 同属于单胺类神经递质,其作用也是相反的,NE 为兴奋性,而 5-HT 为抑制性,两者共同调节大脑功能^[15]。GABA 是 Glu 的后神经元,可以调控 Glu 这一具有毒性的神经递质在大脑中的作用^[16]。本研究证实了,天麻多糖可以增强脑瘫大鼠的记忆能力,而这种增强作用和调控大脑的神经递质有关,天麻多糖可以抑制 ACHE 活性增加乙酰胆碱含量,增加 5-HT 和 NE 的水平,增加 GABA 水平以抑制 Glu 过高产生的大脑毒性作用。NO 是机体中最早发现的气体信号分子之一,具有舒张血管改善缺血供应的作用,而作用于大脑皮层及海马区的 NO 主要是由 eNOS 诱导产生的^[17],本实验证实天麻多糖给药后大鼠大脑皮层及

海马区中 NO 的含量有明显上升,进而采用 Real-time-PCR 法和 ELISA 法检测了两个部位中 eNOS 的基因表达和蛋白含量,发现天麻多糖具有增加 eNOS 表达的作用,低剂量天麻多糖未表现出增加海马区 eNOS 表达的作用,考虑为血脑屏障阻止了大脑对于药物的吸收作用,而在海马区的有效药物量明显低于大脑皮层,具体原因需要进一步实验加以证实。增加 eNOS 表达促进血管舒张因子 NO 的释放是天麻多糖改善脑瘫幼鼠大脑损伤的机制之一。

[参考文献]

[1] Kumar R, LI X J, KONG X Y. The effect of early intervention and rehabilitation in the expression of aquaporin-4; and ultrastructure changes on rat's off spring's damaged brain caused by intrauterine infection [J]. J Korean Neurosurg Soc, 2015, 58(1):14-21.

[2] 梁海英. 儿童脑瘫综合治疗进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(1):232-233.

[3] 徐鹏, 赵毅, 张新. 脑瘫患儿脑脊液氨基酸类神经递质的变化[J]. 吉林大学学报:医学版, 2004, 30(1):117-119.

[4] XU D Q, ZHOU J J, LIU Y H. Research the extraction and detection method of gastrodin content in *Gastrodia elata* [J]. J Chin Medl Mater, 2012, 35(11):1799-1804.

[5] 黄锐, 赵健, 吴锋, 等. 电针联合天麻多糖对脑缺血大鼠基底外侧杏仁核巢蛋白、脑源性神经营养因子表达的影响[J]. 针刺研究, 2016, 41(3):230-234.

[6] 任守利, 刘塔斯, 刘宇婧, 等. 天麻多糖提取工艺的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(1):37-40.

[7] Rumajogee P, Bregman T, Miller S P, et al. Rodent hypoxia-ischemia models for cerebral palsy research; asystematic review [J]. Front Neurol, 2016, doi:

10.3389/fneur.2016.00057.

[8] 王丽敏, 郭佳丽, 杨自金, 等. 人脐血间充质干细胞移植与神经节苷脂注射治疗脑瘫大鼠的对比研究[J]. 中国康复, 2015, 30(5):331-334.

[9] 杜鹏. 针灸配合康复训练治疗小儿脑瘫 30 例临床观察[J]. 中医儿科杂志, 2014, 10(3):57-59.

[10] 毛勇, 苏敏, 那敏, 等. 天麻粉喂养大鼠 30d 毒性试验[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3):561.

[11] 于滨, 左增艳, 孔维佳. 天麻细粉片毒性及安全性的实验研究[J]. 中国当代医药, 2014, 21(21):6-10.

[12] Bird C M. The role of the hippocampus in recognition memory[J]. Cortex, 2017, 1(93):155-165.

[13] Witt J A, Helmstaedter C, Elger C E. Is there evidence of a subordinate role of the hippocampal CA1 field for declarative memory formation? [J]. Brain, 2015, 138(4):e343.

[14] Gautam A, Wadhwa R, Thakur M K, et al. Assessment of cholinergic properties of ashwagandha leaf-extract in the amnesic mouse brain [J]. Ann Neurosci, 2016, 23(2):68-75.

[15] Sundaramurthy S, Annamalai B, Samuvel D J, et al. Modulation of serotonin transporter function by kappa-opioid receptor ligands[J]. Neuropharmacology, 2017, 113(1):281-292.

[16] 孔繁一, 刘诗翔, 张皓, 等. 脑内谷氨酸和 5-羟色胺增高是高原睡眠障碍的独立预测因素[J]. 疑难病杂志, 2013, 12(11):843-847.

[17] 卢桃利, 罗勇, 孙宏毅, 等. 电针对局灶脑缺血再灌注大鼠大脑皮质 eNOS mRNA 及蛋白、MMP-9 蛋白表达的影响[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(2):158-163.

[责任编辑 邹晓翠]