

# 芍药苷对多梗塞性痴呆神经元损伤的保护作用

李晓宇<sup>1,2</sup>, 孙蓉<sup>2,3\*</sup>, 任海勇<sup>4</sup>, 欧阳兵<sup>1,3</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省中医药研究院, 济南 250014;  
3. 山东中医药大学中医学博士后站, 济南 250355; 4. 济南杏林生物技术有限公司, 济南 250101)

**[摘要]** **目的:**用改良多梗塞性痴呆(multi-infarct dementia, MID)模型,观察芍药苷对 MID 模型大鼠保护作用与路径,为开发神经原保护剂的候选化合物奠定药理学基础。**方法:**建立大鼠 MID 模型,观察剂量分别为 20,10,5 mg·kg<sup>-1</sup>的芍药苷对 MID 大鼠的保护作用并观察行为学及认知功能,用免疫组织化学检测不同脑组织内 Bcl-2, Bax 蛋白表达,用 HE 染色和电镜观察大脑皮层及神经元结构变化。**结果:**假手术组无神经行为改变,与假手术组相比, MID 模型组大鼠的苏醒时间、神经行为学评价、斜板试验、学习记忆等认知功能障碍和脑组织神经元均受影响,与模型组相比,各用药组大鼠的苏醒时间、神经行为学评价、斜板试验、学习记忆等认知功能障碍和脑组织神经元均有明显改善。**结论:**芍药苷可改变 MID 大鼠的神经行为,对大鼠 MID 模型有明显的改善作用,抑制 Bax 表达,促进 Bcl-2 的表达,有抗神经元凋亡的作用。

**[关键词]** 芍药苷; 多梗塞性痴呆; 神经元损伤; 保护作用

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0230-06

**[doi]** 10.11653/syfy2013240230

## Neuroprotective Effects of Paeoniflorin on Multi-infarct Dementia (MID) Model

LI Xiao-yu<sup>1,2</sup>, SUN Rong<sup>2,3\*</sup>, REN Hai-yong<sup>4</sup>, OUYANG Bing<sup>1,3</sup>

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Shandong Academy of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China;

3. Postdoctoral Station of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

4. Ji'nan Xinglin Biology Technology Corporation, Ji'nan 250101, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish the improved multi-infarct dementia (MID) model, and observe the protective effect and pathway of paeoniflorin on MID model rats. **Method:** The classic rat's MID model was used to observe protective effect and pathway of different doses of paeoniflorin. The learning and memory abilities of rats were detected by Morris water maze. The expressions of Bcl-2 and Bax protein were detected by immunohistochemical. The changes of cerebral cortex and the neuron structure were detected by HE staining and electron microscopy. **Result:** The control group had no behavior change. The nerve behavior evaluation, oblique pull test, learning and memory and Brain neurons were affected compared with the sham-operation group. But the nerve behavior evaluation, oblique pull test, learning and memory and Brain neurons were all significantly improved compared with model group, the expression of Bcl-2 was increased and Bax was restrained. **Conclusion:** The paeoniflorin has significant improvement effect on the rats' MID model, So its protective mechanism is related with the Bcl-2 and Bax protein expression.

**[Key words]** paeoniflorin; multi-infarct dementia; neuron damage; protective effect

**[收稿日期]** 20130305(005)

**[基金项目]** 山东省重大新药创制专项项目(2009ZX09502~015);山东省博士后创新项目(200801002);山东省重大新药创制综合性大平台建设项目(2009ZX09301-013)

**[第一作者]** 李晓宇,在读硕士,从事中药药理与毒理研究, Tel:15954901833, E-mail:luoluozanglei@126.com

**[通讯作者]** \*孙蓉,博士,研究员,博士生导师,从事中药药理与毒理研究, Tel:0531-82949843, E-mail:sunrong107@163.com

芍药苷具有抗自由基损伤、抗 KA 神经毒性<sup>[1]</sup>和抑制细胞凋亡<sup>[2-3]</sup>、活化腺苷 A1 受体<sup>[4-5]</sup>、对抗兴奋性氨基酸海人藻酸所致的神经细胞损伤<sup>[6-7]</sup>、抑制细胞内钙超载<sup>[7]</sup>等活性,体内实验证明有降低血液黏度、抗血小板聚集、扩张血管、改善微循环等作用。芍药苷对全脑缺血、局灶性脑缺血(CMAO)复灌后动物神经行为学、脑梗死范围、脑组织含水量、病理组织学检查、血脑屏障通透性、脑血流均有较好的改善和保护作用<sup>[8]</sup>。MID 发病率日趋增高,以多次、反复发作的脑梗死造成累积性脑组织损伤为主,呈现大脑多发、不固定、尤其是边缘系统 pazer-ston 环路完整性和系统性受损等特点,临床表现为波动性、间歇性加重的认知功能损害,且呈局限性神经系统体征;因此,改善脑血流、脑代谢、认知功能障碍已成为临床治疗本病的有效手段,上述指标也成为药物筛选和药效评价的依据。

本研究借鉴大鼠经典 MID 模型进行方法学研究,观察芍药苷对左侧大鼠多梗塞性痴呆模型的保护作用和路径研究,观察行为学、认知功能、脑组织形态变化。

## 1 材料

**1.1 药物** 芍药苷由山东明新医药科技公司提供,经与芍药苷对照品进行对照标定纯度为 98.7%。参照前期试验结果,确定大鼠高、中、低剂量分别为 20, 10, 5 mg·kg<sup>-1</sup>,均按 1 mL·kg<sup>-1</sup> 体积静脉给药。

**阳性药:** 甲黄酸双氢麦角毒碱注射液(dihydroergotoxine methanesulfonate for injection),生产厂商: Novartis Pharma Schweiz AG,批号 X19990341)。用法用量:每次 0.3 mg (1 支),用 5% 葡萄糖注射液或生理盐水 20 mL 溶解后缓慢静脉注射,或溶于 5% 葡萄糖或生理盐水 250 mL 中静脉滴注,每日 1 次或 2 次。按体表面积比值折算大鼠的等效剂量为 0.010 8 mg·kg<sup>-1</sup>。

**假手术对照组和模型对照组:**均按上述同等体积给予生理盐水静脉注射。

**1.2 动物** SPF 级 Wistar 大鼠,10 月龄以上,体重(400 ± 50)g,雄性,由山东大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK 鲁 2009-0004。

**1.3 仪器** 动物跳台记录系统、大鼠 Morris 水迷宫由成都泰盟科技有限公司提供,日本 Olympus 光学显微镜和 HITACHI H-600 型透射电子显微镜。

## 2 方法

**2.1 栓塞液制备** 同种属大鼠心脏采血,无菌自然干燥血凝块,研碎分级过 200 目筛,在显微镜下测量

微血栓颗粒直径在 40 ~ 60 μm,悬于生理盐水中,制备成 30 g·L<sup>-1</sup> 的栓塞液备用。

**2.2 大鼠实验前学习能力测试** 实验前取上述大鼠进行水迷宫隐蔽平台实验,连续训练 5 d,以观察其学习成绩,并记录各自学习成绩作为随机分组基础数据,以减少学习能力本底所造成的实验误差。

**2.3 左侧 MID 模型制备** 10% 水合氯醛按 0.35 mg·g<sup>-1</sup> 体重腹腔麻醉,颈部正中切口,分离左侧颈内、颈外动脉及颈总动脉,用动脉夹暂时夹闭颈总动脉,结扎并离断颈外动脉,从颈外动脉插入 24 号静脉留置针,将针芯拔出,于近心端逆向颈内动脉快速注入 0.5 mL 栓子悬液,结扎颈外动脉同时开放颈总动脉动脉夹。让颈总动脉强大的血流将栓子冲进大脑前、中动脉及其分支,造成多发性脑梗死痴呆模型,然后结扎颈外动脉,缝合皮肤。

手术后麻醉清醒,即观察行为学积分,并依据积分将模型组动物,随机分为 MID 模型组、芍药苷(PF)高、中、低剂量组、喜得镇组,并经脉注射上述各组药物和生理盐水;假手术对照组给予等体积的生理盐水注射。

**2.4 免疫组织化学研究不同脑组织内 Bcl-2, Bax 蛋白表达** 上述大鼠后立即开胸暴露心脏,左心室迅速插管,同时剪开右心房,快速灌注生理盐水,待肝脏变白后,改灌 4% 的多聚甲醛(pH 7.4)250 mL,速度先快后慢,至大鼠四肢僵硬,取脑置于 4% 多聚甲醛中浸置 4 ~ 6 h(4e)后,取额叶脑组织连续 4 μm 厚切片,用兔抗鼠 Bcl-2 抗体、兔抗鼠 Bax 抗体、DAB 显色剂、SP 试剂盒、多聚赖氨酸等进行免疫组化染色。在 40 × 10 倍光镜下随机选择 5 个视野,以/个/视野为单位做免疫反应阳性细胞数计数,求其平均值进行统计。

## 2.5 观察指标与检测方法

**2.5.1 大鼠术后苏醒时间** 以出现翻正反射反应为苏醒评价指标,记录各组术后苏醒时间。

**2.5.2 大鼠神经行为分级** 手术后第 7, 14 天,24 h 观察动物的活动,按表 1 进行神经行为计分。

表 1 神经行为学评分标准

级别	分值	神经行为学表现
0	1	动物肢体活动无明显障碍
I	2	提起鼠尾头垂下患侧,前肢下垂
II	3	动物行走出现追尾现象
III	4	动物行走障碍

**2.5.3 大鼠斜板试验** 斜板中央宽 15 cm,长

30 cm,粗糙面,斜板与地面夹角 85°,手术后第 10,20 天,将动物放于粗糙面中央后开始计时,记录动物在斜板上的停留时间,超过 180 s 者以 180 s 计算。

**2.5.4 大鼠跳台试验** 手术后第 7,14 天,观察上述各组大鼠跳上跳台的错误次数,进行再记忆测定及对比分析。

**2.5.5 大鼠水迷宫空间探索能力测定** 采用 morris 水迷宫法进行大鼠的行为学检测。Morris 水迷宫由一直径 120 cm,高 50 cm 的圆形水池组成。每天实验开始时,向池中注水,并加入适量增白剂,使水成不透明乳白色。一摄像头置于水迷宫中央的上方,使用自动采集和图像分析系统(成都泰盟科技有限公司)自动记录相关的各项参数。

水迷宫实验包括隐蔽平台实验,反向实验,探索实验,可视平台实验等实验类型。于造模后第 7,14 天对各组大鼠进行隐蔽平台实验 3 d、反向实验 2 d、探索实验 1 d,可视平台实验 2 d,以评价 PF 对 MID 模型大鼠空间记忆能力的影响。

**2.5.5.1 隐蔽平台实验** 实验时,一圆柱形平台置于东北象限中央,平台的中点距离池壁 30 cm。在平台对侧,选择一个固定入水点将大鼠而朝池壁轻轻放入水中,记录它们的逃避潜伏期,即从入水至找到平台的时间。如果 120 s 内找不到平台,潜伏期记为 120 s,并将大鼠置于平台上休息 10 s。

**2.5.5.2 反向实验** 将平台位置移至对而象限(西南象限的中央,平台中点离池壁 30 cm),其余同上。

**2.5.5.3 探索实验** 撤除平台,并任意选择一个相同入水点将大鼠放入水中,记录大鼠在 120 s 内的游泳路径。对大鼠原平台象限的经过次数进行统计分析。

**2.5.5.4 可视平台实验** 为排除感觉或运动功能障碍对空间学习记忆的影响,最后 1 d 进行可视平台实验,让平台位置露出水而 2 cm,其余同上。

**2.5.6 大鼠脑组织病理学检查** 分别于造模后 14 h 处死大鼠,快速低温取脑,将脑组织置于脑模具中进行徒手切片,用三苯四唑蓝(TTC)染色,观察梗塞面积及大体病理变化。另同法取脑,固定于福尔马林液内,常规制片,HE 染色光学显微镜下检查病理变化。需要做电镜检查者,用 2.5% 戊二醛固定,常规做修块、锇酸两次固定、梯度酒精两次脱水、包埋、切片、染色,于日立 H-600 透射电镜下观察。

**2.6 统计学分析** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检

验判定组间差异, $P < 0.05$  为具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 芍药苷对大鼠 MID 模型麻醉清醒时间的影响

左侧 MID 损伤模型可以造成大鼠麻醉清醒时间延长,PF 各个剂量组和阳性药组大鼠的麻醉清醒时间较模型对照组相比,有不同程度的缩短作用,统计学差异见表 2,PF 各个剂量组之间有一定的剂量依赖关系。

表 2 芍药苷对大鼠 MID 模型麻醉清醒时间的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	麻醉清醒时间/min
假手术对照	-	123.1 ± 21.5 <sup>3)</sup>
模型对照	-	185.8 ± 18.8
PF	20.0	130.1 ± 15.7 <sup>3)</sup>
	10.0	149.7 ± 17.8 <sup>3)</sup>
	5.0	160.3 ± 22.5 <sup>1)</sup>
甲黄酸双氢麦角毒碱注射液	0.010 8	147.9 ± 17.0 <sup>3)</sup>

注:与模型对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.001$ 。

#### 3.2 芍药苷对大鼠 MID 模型斜板滞留时间的影响

左侧 MID 损伤模型可以造成大鼠斜板滞留时间缩短,且随着造模时间延长,斜板滞留时间日益缩短,个别动物甚至在斜板上站立不住,与假手术对照组比较有显著性差异。PF 各个剂量组和阳性药组大鼠的斜板滞留能力明显优于模型对照组,且随着给药时间的延长,模型对照组相比,有不同程度改善作用,斜板滞留时间明显延长,统计学差异见表 3,PF 各个剂量组之间有一定的剂量依赖关系。

表 3 芍药苷对大鼠 MID 模型斜板滞留时间的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	药后 7 d 斜板滞留时间/s	药后 14 d 斜板滞留时间/s
假手术对照	-	141.0 ± 17.5	145.0 ± 18.1 <sup>3)</sup>
模型对照	-	35.6 ± 13.7	27.6 ± 6.6
PF	20.0	118.1 ± 23.5 <sup>3)</sup>	132.9 ± 11.8 <sup>3)</sup>
	10.0	111.1 ± 18.5 <sup>3)</sup>	122.6 ± 14.4 <sup>3)</sup>
	5.0	102.9 ± 20.6 <sup>3)</sup>	115.5 ± 21.6 <sup>3)</sup>
甲黄酸双氢麦角毒碱注射液	0.010 8	114.2 ± 22.4 <sup>3)</sup>	124.6 ± 23.3 <sup>3)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ,<sup>3)</sup> $P < 0.001$ (表 4 ~ 8 同)。

#### 3.3 芍药苷对大鼠 MID 模型行为学积分的影响

左侧 MID 损伤模型可以造成大鼠行为障碍,表现在行为学积分增加,且随着造模时间延长,行为学积分日益增加,与假手术对照组比较有显著性差异。PF

各个剂量组和阳性药组大鼠的行为学积分较模型组低,且随着给药时间的延长,模型对照组相比,有不同程度改善作用,行为学积分明显降低,统计学差异见表4,PF各个剂量组之间有一定的剂量依赖关系。

表4 芍药苷对大鼠MID模型行为学积分的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	药后7 d 行为学积分	药后14 d 行为学积分
假手术对照	-	0.2 ± 0.4	0.1 ± 0.3 <sup>3)</sup>
模型对照	-	3.7 ± 0.5	3.8 ± 0.4
PF	20.0	1.9 ± 0.7 <sup>3)</sup>	1.8 ± 0.8 <sup>3)</sup>
	10.0	2.3 ± 1.2 <sup>2)</sup>	2.2 ± 0.6 <sup>3)</sup>
	5.0	2.6 ± 0.8 <sup>2)</sup>	2.5 ± 0.8 <sup>3)</sup>
甲黄酸双氢麦角 毒碱注射液	0.010 8	2.3 ± 0.8 <sup>3)</sup>	2.2 ± 0.9 <sup>3)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.001$ 。

**3.4 芍药苷对大鼠MID模型跳台实验的影响** 左侧MID损伤模型可以造成大鼠学习能力和记忆能力下降,表现在跳台错误次数的变化,且随着造模时间延长,错误次数日益增加,与假手术对照组比较有显著性差异。PF各个剂量组和阳性药组大鼠的跳台错误次数较模型组有明显的改善作用,且随着给药时间延长,与模型对照组比较改善作用加强,错误

次数减少,统计学差异见表5,PF各个剂量组之间有一定的剂量依赖关系。

表5 芍药苷对大鼠MID模型跳台错误次数的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	药后7 d跳台 错误数/次	药后14 d跳台 错误数/次
假手术对照	-	2.9 ± 1.2	3.3 ± 2.4 <sup>3)</sup>
模型对照	-	10.5 ± 3.0	11.1 ± 4.1
PF	20.0	7.9 ± 2.7	7.0 ± 3.3 <sup>1)</sup>
	10.0	9.3 ± 2.7	8.2 ± 4.4
	5.0	10.0 ± 3.6	9.2 ± 3.6
甲黄酸双氢麦角 毒碱注射液	0.010 8	7.0 ± 3.3 <sup>1)</sup>	5.8 ± 2.9 <sup>2)</sup>

**3.5 芍药苷对大鼠MID模型水迷宫学习记忆能力的影响** 左侧MID损伤模型可以造成大鼠学习获取、再学习和记忆形成于保持能力的下降,且随着造模时间延长,上述能力日益下降,与假手术对照组比较有显著性差异,但对由于运动和感觉所致学习能力的改变不明显。PF各个剂量组和阳性药组大鼠对上述学习获取、再学习和记忆形成于保持能力下降有明显的改善作用,且随着给药时间延长作用强度增加,与模型对照组比较统计学差异见表6~7,PF各个剂量组之间有一定的剂量依赖关系。

表6 药后7 d,芍药苷对大鼠MID模型水迷宫隐蔽平台、反向、探索、可视平台实验的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	隐蔽平台实验	水迷宫反向实验	探索实验	可视平台实验
假手术对照	-	32.3 ± 9.9	17.7 ± 6.2	21.1 ± 6.0 <sup>2)</sup>	11.2 ± 2.3
模型对照	-	101.9 ± 15.2	31.6 ± 9.6	9.7 ± 8.3	11.5 ± 3.0
PF	20.0	68.1 ± 21.7 <sup>3)</sup>	26.0 ± 7.9	17.5 ± 6.8 <sup>1)</sup>	11.3 ± 2.9
	10.0	75.7 ± 24.3 <sup>2)</sup>	30.1 ± 11.3	12.7 ± 3.4	13.0 ± 2.8
	5.0	82.0 ± 18.5 <sup>1)</sup>	32.2 ± 9.7	11.5 ± 2.4	11.4 ± 2.8
甲黄酸双氢麦角毒碱注射液	0.010 8	71.4 ± 20.5 <sup>2)</sup>	25.2 ± 8.6	19.7 ± 10.7 <sup>1)</sup>	14.7 ± 5.8

表7 药后14 d,芍药苷对大鼠MID模型水迷宫隐蔽平台、反向、探索、可视平台实验的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	隐蔽平台实验	水迷宫反向实验	探索实验	可视平台实验
假手术对照	-	27.6 ± 13.3 <sup>3)</sup>	16.9 ± 7.6 <sup>3)</sup>	20.6 ± 4.5 <sup>3)</sup>	9.8 ± 1.9
模型对照	-	109.7 ± 15.5	36.7 ± 10.8	7.3 ± 3.4	9.1 ± 3.9
PF	20.0	53.1 ± 19.8 <sup>3)</sup>	22.2 ± 4.9 <sup>2)</sup>	20.9 ± 8.0 <sup>3)</sup>	11.7 ± 2.8
	10.0	65.5 ± 26.1 <sup>3)</sup>	25.4 ± 7.7 <sup>1)</sup>	14.5 ± 4.9 <sup>2)</sup>	10.8 ± 2.1
	5.0	77.1 ± 27.3 <sup>2)</sup>	29.6 ± 8.9	11.8 ± 4.8 <sup>1)</sup>	11.3 ± 1.6
甲黄酸双氢麦角毒碱注射液	0.010 8	58.3 ± 15.1 <sup>3)</sup>	21.6 ± 7.8 <sup>2)</sup>	15.0 ± 3.7 <sup>3)</sup>	11.1 ± 2.1

**3.6 芍药苷对大鼠MID模型脑组织内Bcl-2和Bax阳性神经元数量的影响** 左侧MID损伤模型可以

造成大鼠Bcl-2, Bax免疫阳性细胞胞浆内出现棕黄色颗粒。假手术组少有Bcl-2, Bax免疫阳性细胞,

表 8 芍药苷对大鼠 MID 模型脑组织内 Bcl-2 和 Bax 阳性神经元数量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	Bcl-2 阳性 神经元数	Bax 阳性 神经元数
假手术对照	-	6.1 ± 2.0 <sup>3)</sup>	6.7 ± 4.2 <sup>3)</sup>
模型对照	-	21.8 ± 7.1	40.3 ± 14.1
PF	20.0	29.2 ± 8.0 <sup>1)</sup>	26.7 ± 12.8 <sup>1)</sup>
	10.0	27.0 ± 13.3	30.3 ± 12.3
	5.0	24.3 ± 12.6	32.2 ± 5.2
甲黄酸双氢麦角 毒碱注射液	0.010 8	30.1 ± 10.1 <sup>1)</sup>	24.4 ± 13.9 <sup>1)</sup>

阳性反应弱。MID 模型大鼠脑组织内 Bcl-2 和 Bax 免疫阳性细胞数增高,呈强阳性表达。PF 各个剂量组与模型组比较,Bcl-2 免疫阳性细胞数明显增多,Bax 免疫阳性细胞数明显减少,与模型对照组比较有一定的差异。PF 各个剂量组之间剂量依赖关系不明显。

**3.7 病理学检查结果** 正常对照组和假手术对照组:大脑皮层结构正常,神经元结构未见明显异常。MID 模型组:皮层脑软膜水肿及少部分充血,部分

血管腔内见有颗粒状或丝絮状物,皮层小血管腔亦见上述变化,有脑水肿及多发软化坏死灶;神经元肿胀变性,部分细胞核呈空泡样或颗粒样变性,染色质稀疏或丢失,有小胶质细胞增生。PF 可以减轻上述神经元细胞变性程度,可见软化灶,有胶质细胞增生。阳性药组可见上述神经元变性改善不明显,胶质细胞轻度增生,软化灶明显减少。见图 1。

假手术对照组:大脑皮层结构正常,神经元结构未见明显异常。模型组:神经元细胞高度变性坏死,核染色质丢失并出现髓样小体,线粒体及内质网高度变性,多呈空泡样变,神经纤维变性呈“板状”分离,微血管内见红细胞、血小板及纤维素的凝集,血管内皮收缩变性,血管周边水肿。PF 各个剂量组:神经元及胶质细胞病变有不同程度的减轻,核染色质稀疏,核糖体减少。血管腔内无凝集物,血管内皮无变性收缩。神经纤维轻度变性,但未见“板状”分离,血管内皮收缩变性,周边轻度水肿。阳性药组:神经元及胶质细胞呈轻度变性,神经纤维亦见轻度变性,但未见“板状”分离,血管内皮无明显收缩变性。见图 2。

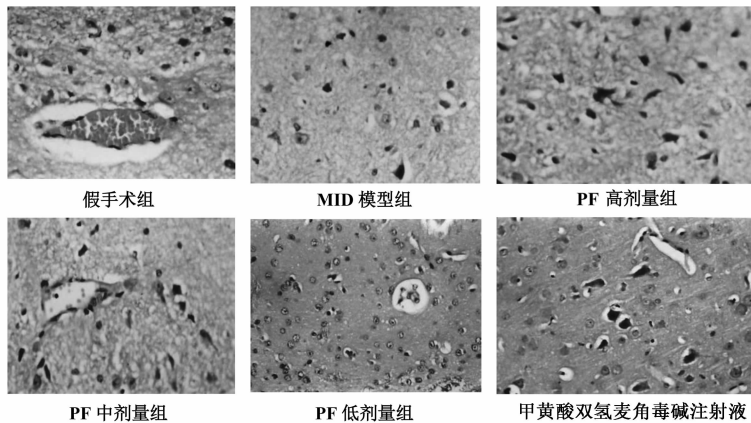


图 1 芍药苷对 MID 模型保护作用的脑组织光镜 (HE 染色)

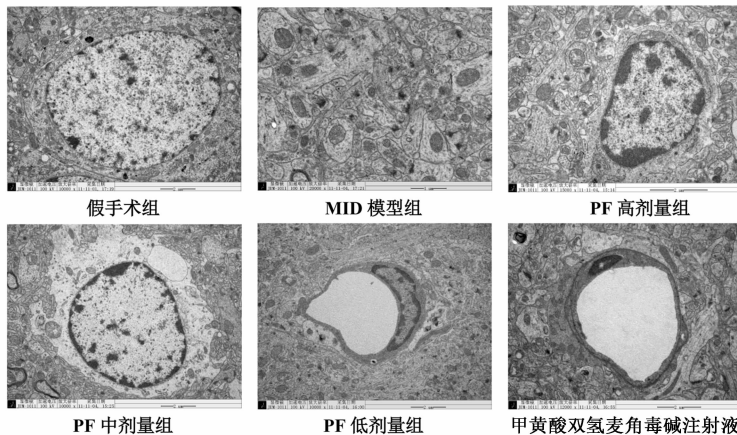


图 2 芍药苷对 MID 模型保护作用的脑组织电镜照片 (三苯四唑蓝染色)

## 4 讨论

多发梗死性痴呆(MID)的病因为多次、反复发作的脑梗死造成累积性脑组织损伤,损伤的脑组织达到60~80 mL以上或脑结构发生重大改变即可使脑功能受损而才导致痴呆<sup>[4-5]</sup>。芍药苷对大鼠MID模型治疗作用,表现在麻醉苏醒时间、斜板试验滞留时间、行为学评价、跳台实验、病理组织学观察等方面的指标改善,提示本品有一定的治疗MID的研发前景。水迷宫实验包括隐蔽平台、反向实验、探索实验、可视平台实验,分别代表着动物的学习获取能力、再学习能力、记忆保持能力和感觉或运动功能差异对其空间记忆能力的影响,芍药苷对上述大鼠MID模型水迷宫的系统测试说明PF有显著的改善认知功能障碍的作用。

细胞凋亡是程序性的细胞死亡,其发生受多种基因调控,如Bcl-2家族、Caspase家族、Fas等。Bcl-2基因家族具有促进和抑制凋亡两种活性,其中Bax是凋亡促进基因,Bcl-2是凋亡抑制基因,Bcl-2/Bax是反映神经细胞生存能力的重要指标<sup>[9]</sup>,通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡<sup>[10]</sup>。Bcl-2位于线粒体外膜、核膜和滑面内质网上,能够抑制多种因素诱导的线粒体跨膜电位和CytC的释放,阻止凋亡的发生;而Bax散布在线粒体基质中,能改变线粒体膜的通透性,促进CytC的释放,通过Caspase途径激活Caspase-3,促进细胞凋亡,两者表达水平高低与直接调控凋亡有关<sup>[11]</sup>。当Bax蛋白高表达时,Bax/Bcl-2同源二聚体的形成增多,抑制Bcl-2的作用,则促进细胞凋亡;当Bcl-2蛋白高表达时Bcl-2/Bax异源二聚体增多,则抑制细胞凋亡<sup>[12-13]</sup>。本研究应用免疫组化法观察大鼠脑组织神经元数量的变化,PF各个剂量组与模型组比较,Bcl-2免疫阳性细胞数明显增多,Bax免疫阳性细胞数明显减少,表明芍药苷神经元保护作用与抑制细胞凋亡有关。

芍药苷可通过多途径、多靶点抑制神经细胞损伤及凋亡,对神经保护有独特优势<sup>[14]</sup>。但芍药苷是否在抑制神经细胞的损伤及凋亡方面有其独特的作用靶点,目前尚不完全清楚,故对其神经保护机制仍有待进一步研究。

胞钙超载损伤的保护作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2001,15(3):164.

- [ 2 ] Renolleau S, Aggoun Z D, Ben-Are Y, et al. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat morphological change indicative of apoptosis[J]. *Stroke*, 1998, 29:1454.
- [ 3 ] 孙蓉,武栋栋,刘国卿.一氧化氮诱导PC12细胞凋亡及芍药苷的保护作用[J].中国临床药理学与治疗学,2005,10(11):1266.
- [ 4 ] Collis M G, Hourani S M O. Adenosine receptor subtypes[J]. *Trends Pharmac Sci*, 1993, 14:360.
- [ 5 ] Sweeney M I. Neuroprotective effects of adenosine in cerebral ischemia: window of opportunity[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1997, 21(2):207.
- [ 6 ] Liu H Q, Zhang W Y, Luo X T, et al. Paeoniflorin attenuates neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease by activation of adenosine A1 receptor[J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 148(3):314.
- [ 7 ] 吴玉梅,许汉鹏,王春婷,等.芍药苷对培养小鼠皮层神经元的保护作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2002,16(3):172.
- [ 8 ] 陈春富,常高峰,郭述芳,等.黄芪对大鼠海马缺血性损伤的保护作用[J].解放军医学杂志,1997,22(5):365.
- [ 9 ] 赵润英,郝伟,孟祥军,等.阿魏酸川芎嗪对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及分子机制研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(19):230.
- [ 10 ] 谢广茹,吴雄志.中药诱导肝癌细胞凋亡的研究进展[J].临床肿瘤学杂志,2007,12(3):225.
- [ 11 ] Youle R J, Strasser A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9(1):47.
- [ 12 ] Rawat S, Gray C, Johnson T S, et al. Apoptosis and expression of BCL-2 and BAX in cyclosporine-induced experimental renal fibrosis[J]. *Transplant Proc*, 2003, 35(1):187.
- [ 13 ] 王卫东,陈正堂. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运”[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2007,14(4):393.
- [ 14 ] 胡增晓,徐岚,闫蓉,等.芍药苷作用于神经系统的研究进展[J].中国中药杂志,2013,38(3):297.

[责任编辑 邹晓翠]

## [参考文献]

- [ 1 ] 杨军,何丽娜,何素冰,等.芍药苷对大鼠皮层神经细