

天麻乙酸乙酯提取物对大鼠中动脉栓塞模型大鼠神经突触可塑性的影响

段小花¹, 李国花², 吴霜¹, 文金隆¹, 林青^{1*}

(1. 云南中医学院, 昆明 650500; 2. 大理州人民医院, 云南大理 671000)

[摘要] 目的: 观察天麻乙酸乙酯提取物对大鼠中动脉栓塞模型大鼠神经突触可塑性的影响。方法: 将动物随机分为 3 组, 即假手术组、模型组、天麻乙酸乙酯提取物组(以下简称乙提组, 剂量按生药量计为 $7.29 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)。预防性连续灌胃给予药物 7 d, 末次给药 0.5 h 后复制大鼠中动脉栓塞模型, 然后再进行治疗性连续灌胃给药 7 d, 统计模型复制后 7 d 时的死亡率、各组大鼠在规定时间内进行神经行为学评定及脑组织取材检测 GAP-43 的表达。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠死亡率和神经病学评分明显升高、肌力评分和 GAP-43 表达明显降低; 与模型组比较, 乙提组大鼠术后第 7 天死亡率和神经病学评分明显降低、肌力评分和 GAP-43 表达明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 天麻乙酸乙酯提取物对大鼠中动脉栓塞模型大鼠神经突触可塑性有一定的改善作用。

[关键词] 天麻乙酸乙酯提取物; 死亡率; 神经病学评分; 肌力评分; GAP-43 表达

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0202-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121030.1143.009.html>

[网络出版时间] 2012-10-30 11:43

Effects of Ethyl Acetate Extraction from *Gastrodia elata* on Neuroplasticity of Rat Cerebral Ischemia Injury Model

DUAN Xiao-hua¹, LI Guo-hua², WU Shuang¹, WEN Jin-long¹, LIN Qing^{1*}

(1. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2. People's Hospital of Dali, Dali 671000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of ethyl acetate extraction from *Gastrodia elata* on the neuroplasticity of rat cerebral ischemia injury model. **Method:** Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operation group, model group and ethyl acetate extraction from *G. elata* group (ethyl acetate extraction group, $7.29 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). The rat models of middle cerebral artery occlusion were replicated 0.5 h later after the last dose of continuous oral administration of drug on the 7th day and keep administration of drug for another 7 days. Statistic data were collected on death rate of model on 7th day, as well as neurological behavior and expression of GAP-43 at specified time point. **Result:** Compared with the sham-operation group, the death rate and neurological syndromes of model group were markedly increased and the hanging wire and expression of GAP-43 were significantly decreased. Compared with the model group, the death rate and neurological syndromes of the ethyl acetate extraction group were significantly decreased and the hanging wire and expression of GAP-43 were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The results suggest that the ethyl acetate extraction from *G. elata* can improve the neuroplasticity of cerebral ischemia injury model rat.

[Key words] ethyl acetate extraction from *Gastrodia elata*; death rate; neurological syndromes; hanging wire; expression of GAP-43

[收稿日期] 20120703(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160514); 云南省科技计划项目(2010CG022)

[第一作者] 段小花, 助教, 医学硕士, 从事中药药理与应用研究, Tel:0871-5918134, E-mail:y_zdxh@163.com

[通讯作者] * 林青, 教授, 从事中药药理与应用研究, Tel:0871-5918134, E-mail:kmlinqing@yahoo.com.cn

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是指各种脑血管疾病(CVD)引起的脑功能障碍而产生的获得性智能障碍综合征,为一慢性进行性疾病,是严重困扰老年人生活质量的常见疾病^[1]。研究证实,CVD是卒中后痴呆的基本原因^[2]。基于天麻可以明显改善与脑供血不足有关的老年性痴呆症状的临床报道,我们前期研究表明天麻乙酸乙酯提取物能够明显改善大鼠VD模型的学习记忆障碍,其作用机制与升高模型大鼠海马组织内皮型一氧化氮合酶表达、降低神经型和诱导型一氧化氮合酶表达密切相关^[3],提示天麻提乙酸乙酯提取物具有一定的神经保护作用。在脑卒中后数月内,脑神经功能的恢复主要依赖于健在神经元轴突芽生形成新的突触联结,即突触重构(突触可塑性),以及神经干细胞增殖、迁移、分化形成新的神经元,即神经新生,这一阶段持续时间比较长,是神经元轴突、树突再生,突触重构的关键时期,也是药物治疗的关键时期^[4]。本研究从神经突触可塑性的角度入手,进一步探讨天麻乙酸乙酯提取物神经保护作用的机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠,体重 250 ~ 300 g,四川省医学科学院动物研究所提供。许可证号 SCXK(川)2004-16。

1.2 药物 天麻 *Gastrodia elata* Blume 由昭通天麻研究所陈顺芳副教授鉴定并提供,按乙醇提取和乙酸乙酯萃取的方法制备实验用药。

1.3 试剂 GAP-43 抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BA0878);兔超敏二步法免疫组化检测试剂(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 PV-9001);DAB(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZLI-9032)。

1.4 仪器 石蜡包埋机(Leica),轮式切片机(浙江金华益迪医疗设备厂),HI1210 型石蜡摊片机(Leica),蜡烘片机 HI1220 (Leica),光学显微镜(Olympus),电子分析天平(Precisa XS125A)。

2 方法

2.1 动物模型复制 按照 Koizumi 等介绍的方法^[5],采用经颈内动脉线栓法制备大鼠中动脉栓塞模型。复制方法如下:大鼠以 10% 水合氯醛(300 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,仰卧固定在手术台上,颈正中切口,分离右侧颈总动脉(CCA),颈外动脉(ECA),颈内动脉(ICA),结扎 ICA 的重要分支翼腭动脉,结扎 CCA,结扎并游离 ECA 主干一段,用无

创动脉夹分别夹闭 ICA 颅底端,在 ECA 近 CCA 分岔处打一活结并剪一“V”形口,将制备好的尼龙线顺着 ECA 的“V”形口插入,松开 ICA 上的动脉夹,将尼龙线顺势经过 CCA 分岔处通过 ICA 入颅至大鼠中动脉(MCA),尼龙线插入深度为 18 ~ 20 mm (ECA 与 ICA 分岔处为起点),微遇阻力时停止,使尼龙线头端通过 MCA 起始处,到达较细的大脑前动脉,此时即完成一侧大鼠中动脉阻塞(MCAO),固定尼龙线,逐层缝合切口。术毕给予注射用青霉素钠水溶液适量局部涂敷,放入笼中饲养,每日肌注青霉素钠 20 万 U/只,连用 3 d(如出现感染者可延长至 1 周),防治感染。

2.2 动物分组及给药 将体重在 250 ~ 300 g 的雄性 SD 大鼠,随机分为 3 组,即假手术组、模型组、天麻乙酸乙酯提取物组生药 7.29 g·kg⁻¹)。预防性连续灌胃给予药物 7 d(10 mL·kg⁻¹),假手术组、模型组分别灌胃给予等量的溶媒,每天 1 次,于造模前 0.5 h 再给药 1 次,复制大鼠中动脉栓塞模型,然后再进行治疗性连续灌胃给药 7 d,各组大鼠在规定时间内进行神经行为学评定及脑组织取材。

2.3 指标检测

2.3.1 对大鼠大脑中动脉栓塞模型复制 7 d 时死亡率的影响 大鼠大脑中动脉栓塞模型复制 7 d,对其死亡只数进行统计,计算死亡率。

$$\text{死亡率} = (\text{死亡数} / \text{动物只数}) \times 100\%$$

2.3.2 对大鼠中动脉栓塞模型大鼠神经病学的影响 以经修改的 Bederson 评分法^[6]作为评分标准,具体如下:①提尾悬空大鼠,手术对侧前肢无屈曲、腕屈及同时腕屈与肘屈分别计为 0,1,2 分。②大鼠行走路径向手术对侧无偏移、有偏移及偏移呈圆形甚至原地旋转分别计为 0,1,2 分。③刺激大鼠手术对侧颊须,反应灵敏、不灵敏及没有反应分别计为 0,1,2 分。④动物躯体向手术对侧无扭转、偶尔扭转及频繁扭转分别计为 0,1,2 分。⑤总分为 8 分。指标观察时间:分别于术后 1,4,7,15 d 分别进行评分。

2.3.3 对大鼠中动脉栓塞模型大鼠肌力评定的影响 取直径为 0.15 cm 的铁丝,长 100 cm,在距地面 70 cm 处水平固定其两端,其下放厚 5 cm 的海绵垫以避免大鼠掉下时摔伤。让大鼠两前爪放在铁丝绳上后松手,观察大鼠的行为并记录其在绳上的悬吊时间。根据大鼠的肢体放置情况和悬挂时间,分为 4 个等级记分^[7]。即:①0 分:挂在绳上 0 ~ 2 s;②1 分:挂在绳上 3 ~ 4 s;③2 分:挂在绳上超过 5 s;④3

分:挂在绳上超过 5 s,并可将后肢放在绳上。指标观察:术后 1, 4, 7, 15 d 分别对各组大鼠进行肌力测定实验,每个观察时点评定 3 次,取 3 次的平均分作为当日评定的最后得分。

2.3.4 对大脑中动脉栓塞模型大鼠脑组织 GAP-43 表达的影响 病灶侧大脑冠状位切取视交叉至视交叉后 2 mm 厚脑组织块,用 4% 中性多聚甲醛固定 2 周后,用石蜡包埋制成蜡块,备用。沿视交叉末端连续切取冠状 3 微米厚切片两张,粘于多聚赖氨酸处理后的玻片上。采用免疫组织化学法检测 GAP-43 的表达。在 10 × 40 光学显微镜下观察每一组动物病灶侧大脑皮质部位,选择 6 个不重复视野进行阳性细胞数统计。阳性细胞为棕黄色,表现为胞浆着色。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据,计量资料用表示,方差齐者采用 LSD 法检验,方差不齐者采用 Tamhane's 法检验;计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 对大鼠大脑中动脉栓塞模型复制 7 d 时死亡率的影响 天麻乙酸乙酯提取物对大鼠大脑中动脉栓塞模型复制 7 d 时的死亡率有保护趋势,但结果无统计学意义。见表 1。

3.2 对大脑中动脉栓塞模型大鼠神经病学的影响 天麻乙酸乙酯提取物在术后第 7 天能明显改善模型大鼠的神经病学症状,与模型组相比,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),其余术后各时点天麻乙酸乙酯提取物组与模型组相比,差异均无统计学意义,但对模型大鼠的神经病学症状有改善趋势。见表 2。

表 1 天麻乙酸乙酯提取物对大鼠大脑中动脉栓塞模型复制 7 d 时的死亡率的影响

组别	剂量	动物数	死亡数	存活数	死亡率
	/g·kg ⁻¹	/只	/只	/只	/%
假手术	-	8	0	8	0
模型	-	21	11	10	52.38 ¹⁾
天麻提取物	7.29	21	7	14	33.33

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 对大脑中动脉栓塞模型大鼠肌力评定的影响 天麻乙酸乙酯提取物在术后第 7 天能明显改善模型大鼠的肌力,与模型组相比,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),其余术后各时点天麻乙酸乙酯提取物组与模型组相比,差异均无统计学意义,但对模型大鼠的肌力有改善趋势。见表 3。

3.4 对大脑中动脉栓塞模型大鼠脑组织 GAP-43 表达的影响 天麻乙酸乙酯提取物能明显增强模型大鼠脑组织内 GAP-43 的表达。见图 1。

4 讨论

缺血性脑血管病是 VD 最主要的致病因素^[8],临床上脑缺血最多见于大脑中动脉(MCA),其供血区脑组织由于缺血缺氧、能量代谢耗竭而导致缺血性坏死,相应支配区出现运动、感觉和语言障碍,学习记忆能力减退。因此模拟人局灶性脑缺血的动物模型最好通过阻断 MCA 而复制。我们选用了颈内动脉线栓法复制大鼠大脑中动脉栓塞模型,此法操作简便,无需开颅,缺血部位较恒定,脑梗死范围差异较小^[9]。而神经病学评分是评价局部脑缺血及缺血性脑损害最重要的终末指标之一。课题研究结

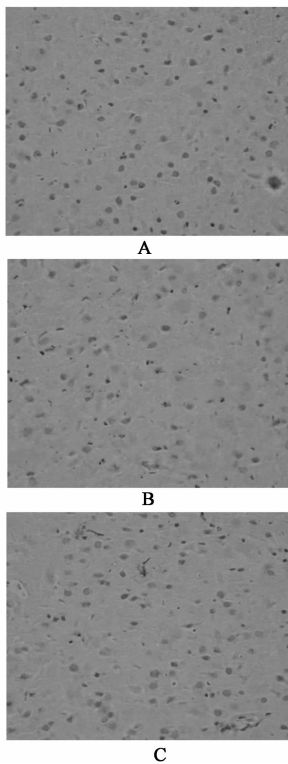
表 2 天麻乙酸乙酯提取物对大鼠大脑中动脉栓塞模型大鼠神经病学的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	神经病学评分/分				
			1 d	4 d	n	7d	15 d
假手术	8	-	0 ± 0	0 ± 0	8	0 ± 0	0 ± 0
模型	21	-	5.50 ± 1.60 ¹⁾	4.38 ± 1.19 ¹⁾	10	3.75 ± 1.04 ¹⁾	2.88 ± 0.83 ¹⁾
天麻提取物	21	7.29	4.38 ± 1.41	3.38 ± 0.92	14	2.13 ± 0.83 ²⁾	2.00 ± 0.76

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

表 3 天麻乙酸乙酯提取物对大鼠大脑中动脉栓塞模型大鼠肌力评定的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	肌力评分/分				
			1 d	4 d	n	7 d	15 d
假手术	8	-	3 ± 0	3 ± 0	8	3 ± 0	3 ± 0
模型	21	-	0.54 ± 0.25 ¹⁾	0.58 ± 0.24 ¹⁾	10	0.88 ± 0.25 ¹⁾	1.17 ± 0.31 ¹⁾
天麻提取物	21	7.29	0.58 ± 0.24	0.79 ± 0.30	14	1.25 ± 0.23 ²⁾	1.33 ± 0.18



A. 假手术组;B. 模型组;C. 天麻提乙酸乙酯提取物 $7.29 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图1 天麻乙酸乙酯提取物对大鼠中动脉栓塞模型大鼠脑组织 GAP-43 表达的影响(免疫组织化学法 $\times 400$)

果显示,天麻乙酸乙酯提取物对模型大鼠有降低死亡率的趋势,在一定程度上能够改善模型大鼠神经病理学改变和改善模型大鼠的肌力。

VD 发病率日益增高,但发病机制不明确,缺乏有效治疗手段,因此各方面研究日益受重视。目前研究表明,突触损伤在血管性痴呆发病的早期即存在,且与其认知功能障碍密切相关。突触是神经元之间的结构和功能的接触点,突触的可塑性是学习记忆的神经生物学基础^[10]。突触可塑性主要是指突触连接在结构和功能上的修饰,包括^[11]:①突触的脱联,以及必要时变性产物的清除;②轴突生长的开始以及新轴突端分化;③建立新的突触联系;④新突触的成熟,即出现突触小泡和突触前后密度增加等4个阶段。一般认为,突触可塑性主要是在形态上的轴突出芽和在生理上的突触传递效应增强。新研究证实突触形态可塑性还应该包括突触复合体形态的增大和突触复合体的数量增多两个方面^[12]。

神经生长相关蛋白(neuronal growth associated protein, GAP-43)是一种神经特异性的磷蛋白,与神经的生长、发育和再生过程密切相关^[13]。它在突触前膜和生长锥的动态结构中含量极高,胞浆中含量极低。GAP-43通过引导轴突生长和调节新连接

形成而影响轴突的生长能力,即使在缺乏其他营养因子时也能使神经元发出新的终末,且它在神经发育和再生过程中呈现高表达,故被作为是突触生长的标志物^[14]。突触形态结构变化可导致 GAP-43 表达的升高,如神经系统发育过程中神经的分化、轴突再生以及神经受损后的修复。本研究对天麻乙酸乙酯提取物对 GAP-43 表达的影响进行了考察,结果显示天麻乙酸乙酯提取物能显著增强模型大鼠脑组织 GAP-43 的表达。

综上所述,天麻乙酸乙酯提取物对大鼠中动脉栓塞模型大鼠神经突触可塑性有一定的改善作用,推测天麻乙酸乙酯提取物可能是通过增强脑组织 GAP-43 的表达在一定程度上影响神经突触的可塑性,从而减轻神经元损伤。

[参考文献]

- [1] Wu H X, Cai J W, Xiang H B, et al. Effects of shuanggen cephalocathartic decoctum on model rats with vascular dementia in behavioristics[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006,20(1):3.
- [2] Junko H, Toshikazu S, Shigeyoshi D, et al, Phenolic compounds from Gastrodia rhizome and relaxant effects of related compounds on isolated smooth preparation [J]. Phytochemistry,2002,59(2):513.
- [3] 段小花,代蓉,李秀芳,等.天麻酚类成分对脑缺血大鼠海马 NO 和 NOS 的影响[J].中华老年心脑血管杂志,2011,13(7):657.
- [4] 徐振华,许能贵,易玮,等.不同针刺量对大鼠脑缺血后突触可塑性的影响[J].广州中医药大学学报,2009,26(1):33.
- [5] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic ea[J]. Jpn Jstroke, 1986,8(1):1.
- [6] 陈立峰,徐琳本,王晓洪,等.加味芎归汤对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用和血液流变学的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(11):157.
- [7] 万东. 梓醇促神经修复作用及其脑可塑性机制研究[D].重庆:重庆医科大学博士学位论文,2007:55.
- [8] 王晋平,赵贞.血管性痴呆动物模型研究进展[J].山西中医学院学报,2008,9(5):60.
- [9] 李显华,杜佳林,包玉龙,等.丹龙胶囊对脑缺血模型动物的保护作用[J].中国实验方剂学杂志.2011,17(22):219.
- [10] 石苗茜,刘卫平.血管性痴呆发病机制研究进展[J].第四军医大学学报,2007,28(9):860

全蝎-蜈蚣药对哮喘模型大鼠气道炎症及气道重塑的影响

李海燕¹, 杨佩兰¹, 黄海茵¹, 崔金刚², 汤杰^{1*}, 吴银根³

(1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院呼吸内科, 上海 200437;

2. 上海市中医药研究院中西医结合临床研究所, 上海 200437;

3. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

[摘要] 目的: 观察全蝎-蜈蚣药对哮喘模型大鼠气道炎症及气道重塑的影响, 初探全蝎-蜈蚣治疗哮喘的作用机制。方法: 30 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组: 正常组(A 组)、模型组(B 组)、全蝎-蜈蚣组(C 组), 每组 10 只。以卵白蛋白致敏并长期吸入激发, 制备大鼠支气管哮喘模型。C 组予以全蝎-蜈蚣($0.625 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) ig, 每天 1 次, A 组、B 组则同时予以等量生理盐水 ig, 治疗 3 周。检测各组大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中白细胞(WBC)、嗜酸粒细胞(E)、吞噬细胞(M)、淋巴细胞(L)、中性粒细胞(N)计数及百分比, 取支气管肺组织制作病理切片, HE 染色、Masson 染色观察各组大鼠支气管肺组织病理改变, 医学图像分析软件检测支气管壁厚度(Wat/Pbm)、平滑肌厚度(Wam/Pbm)、胶原纤维厚度(Wac/Pbm), 反映气道重塑的程度。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠 BALF 中细胞数量、中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸粒细胞比例明显增加($P < 0.01$), 模型组 Wat/Pbm, Wam/Pbm, Wac/Pbm 分别为(155.32 ± 39.92), (22.11 ± 3.42), (8.47 ± 3.01) $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$, 正常组分别为(71.01 ± 11.02), (5.51 ± 1.76), (2.37 ± 1.03) $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$, 模型组支气管壁、平滑肌层厚度明显增加($P < 0.01$)、胶原纤维明显增生($P < 0.01$); 与模型组比较, 全蝎-蜈蚣组大鼠 BALF 中细胞数量、中性粒细胞、淋巴细胞、嗜酸粒细胞比例明显减少($P < 0.01$), Wat/Pbm, Wam/Pbm, Wac/Pbm 分别为(100.67 ± 15.04), (17.08 ± 4.92), (4.07 ± 1.08) $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$, 支气管壁、平滑肌层厚度明显减轻($P < 0.01$)、胶原纤维增生程度明显减轻($P < 0.01$)。结论: “全蝎-蜈蚣”可改善哮喘模型大鼠气道炎症, 同时减少支气管壁和平滑肌厚度, 减轻胶原纤维增生, 对气道重塑有一定的改善或延缓作用。

[关键词] 全蝎; 蜈蚣; 支气管哮喘; 气道炎症; 气道重塑

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0206-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121030.1143.006.html>

[网络出版时间] 2012-10-30 11:43

Effects of Scorpio-Scolopendra on Expressions of Airway Inflammation and Airway Remodeling in Asthmatic Rats

LI Hai-yan¹, YANG Pei-lan¹, HUANG Hai-yin¹, CUI Jin-gang², TANG Jie^{1*}, WU Yin-gen³

(1. Yueyang Hospital of Integrative Chinese & Western Medicine Affiliated to Shanghai University of Traditional

[收稿日期] 20120814(011)

[基金项目] 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院项目(11yj02)

[第一作者] 李海燕, 硕士, 主治医师, 从事中西医结合防治呼吸系统疾病研究, Tel: 021-65161782-6038, E-mail: bluesnp5@126.com

[通讯作者] * 汤杰, 副主任医师, 从事中西医结合防治慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘的研究, E-mail: tangtanghaihai@sohu.com

[11] 沈方, 张晓明, 朱晞. 学习记忆与突触可塑性及相关物质的研究[J]. 解剖学杂志, 2004, 27(5): 568.

[12] Trachtenberg J T, Chen B E, Knott G W, et al. Long-term *in vivo* imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult jcortex [J]. Nature, 2002, 420 (6917): 788.

[13] 张宏军, 范顺武. 神经生长相关蛋白 43 在大鼠椎间

盘炎症模型中的表达及意义[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2007: 3.

[14] 王海涛, 杨明峰, 曹晓岚, 等. 补阳还五汤联合运动训练对脑梗死大鼠神经元突触重建的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 132.

[责任编辑] 聂淑琴