

天智颗粒对慢性脑缺血大鼠海马外小胶质细胞表达的影响

冯涛*

(南阳医专第一附属医院神经内科, 河南 南阳 473058)

[摘要] 目的:观察天智颗粒对慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区小胶质细胞(microglia, MG)表达的影响,探讨天智颗粒的脑保护作用机制。方法:45 只雄性 SD 大鼠,随机分为对照组、对照组、天智颗粒组。采用大鼠双侧颈总动脉永久阻断的方法制作慢性脑缺血模型。天智颗粒组在造模成功后给予天智颗粒($5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) ig 12 周,采用 Y 迷宫、免疫组化染色和特异性尼氏染色方法观察比较各组大鼠学习记忆能力、OX42(小胶质细胞的标志)表达及海马 CA1 区神经元计数的差异。结果:与对照组相比,天智颗粒组学习记忆能力明显增加($P < 0.01$);对照组大鼠海马 CA1 区 OX42 少量表达,神经元数正常,对照组海马 CA1 区 OX42 表达明显增多,神经元数明显减少,天智颗粒组与对照组相比 OX42 表达明显减少,神经元数明显增加($P < 0.01$)。结论:天智颗粒能明显减少慢性脑缺血大鼠脑内 OX42 表达,抑制 MG 的过度激活,使海马区神经元死亡减少,具有脑保护作用。

[关键词] 天智颗粒;慢性脑缺血;小胶质细胞;脑保护

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0296-03

随着老龄人口的逐渐增多,慢性脑缺血(chronic cerebral ischemia, CCI)导致的血管性痴呆普遍受到关注。小胶质细胞(microglia, MG)是脑内的主要免疫炎症细胞,参与血管性痴呆的病理损伤过程。MG 生理状况下维持脑内环境稳态,病理损害时大量激活损伤神经元。目前天智颗粒已广泛应用于慢性脑缺血、老年血管性痴呆的治疗,但其机制并非完全清楚,本试验建立大鼠慢性脑缺血模型,观察天智颗粒对小胶质细胞、神经元的影响,探讨其脑保护作用的机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 45 只,体重($220 \pm$

30) g, 郑州大学实验动物中心提供。在温度及湿度适宜的动物室内饲养,随机分为对照组、对照组、天智颗粒组,每组 15 只。造模前禁食水。

1.2 药物与试剂 天智颗粒天智颗粒,购于河南宛西制药公司,5 g/包,批号 091201。天智颗粒组方:桑寄生 9 g, 益母草 9 g, 钩藤 12 g, 石决明 18 g, 栀子 9 g, 首乌藤 9 g, 黄芩 9 g, 川牛膝 12 g, 天麻 10 g, 杜仲 9 g, 茯神 9 g^[1]。OX42 抗体、DAB 显色试剂盒及 SP9001 试剂盒均选购于北京中杉生物工程公司。

1.3 仪器 显微照像系统(德国 Leica), Y 型电迷宫(张家港市生物医学仪器厂)。

2 方法

2.1 造模 采用 Wakita 等^[2]方法制备动物模型。10%水合氯醛($3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) ip 麻醉,常规备皮、消毒,颈部正中切口,切开皮肤(长 1.5 ~ 2 cm),钝性分离皮下组织,分离暴露双侧颈总动脉,将迷走神经

[收稿日期] 20120615(404)

[通讯作者] *冯涛,主治医师,硕士,从事神经内科临床工作,
Tel:15638996063, E-mail:631740898@qq.com

[2] 李萍,陶敏芳,吴氢凯,等.盆底功能障碍性疾病患者宫颈组织 I 型胶原蛋白及 MMP1 mRNA 的表达[J]. 同济大学学报:医学版,2009,30(5):57.
[3] 罗新,李瑞满.盆底肌康复治疗对女性性功能障碍的疗效观察[J]. 中华妇幼临床医学杂志,2008,4(6):522.
[4] Xu Y Y, Yao Z W, Wang H Y, et al. The relationship between postpartum sexual life quality and the way of delivery[J]. Obstet Gynecol, 2003, 38(4):219.
[5] 李祥云. 李祥云治疗妇科病精华[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:33.

[6] 刘新军,苏式兵,王秀峰,等.碧血胶囊对急性血瘀证模型大鼠血液流变性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):174.
[7] 马秀娟,郑颖.不同产科因素对产后早期盆底功能的影响[J]. 中国误诊学杂志,2011,1(17):4108.
[8] 张玉萍. 女科秘决大全[M]. 福州:福建科学技术出版社,2008:176.
[9] 刘剑刚,史大卓.影响血液流变学的活血化瘀中药药物研究[J]. 中国血液流变学杂志,2004,14(1):135.

[责任编辑 何伟]

与颈总动脉分离开,分别结扎双侧颈总动脉远心端和近心端,在结扎之间剪断双侧颈总动脉,缝合皮下、皮肤,等待其自然醒来,大鼠慢性脑缺血模型制作成功。对照组大鼠除双侧颈总动脉不进行结扎,其他同对照组。造模失败的动物随机等量补齐。

2.2 分组给药及动物处理 给药组每日给予天智颗粒 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (溶解于 5 mL 蒸馏水) ig , 对照组与对照组每日用等量蒸馏水 ig , 均持续 12 周。各组大鼠采用 Y 电迷宫进行主动逃避学习能力测试^[3]后,深度麻醉大鼠后用生理盐水从左心室进行心脏加压灌注,4% 多聚甲醛溶液约 200 mL 灌注固定,取脑。脑组织放入 4% 多聚甲醛液中固定 24 h,常规冠状石蜡切片(厚度 $4 \mu\text{m}$)。

2.3 指标检测

2.3.1 学习记忆能力测试 在安静暗室内采用 Y 电迷宫进行主动逃避学习能力测试。Y 电迷宫分为不通电的安全区和 $50 \sim 70 \text{ V}$ 交流电的电击区,然后无规则的变换安全区,观察大鼠逃避电击区进入安全区的能力。以达到学会标准的电击次数为学习成绩,电击次数越多表明学习能力差。

2.3.2 大鼠海马 CA1 区 OX42 (小胶质细胞的标志)的表达 用免疫组化染色(SP法):石蜡切片二甲苯 2 次脱蜡,柠檬酸修复液修复;3% H_2O_2 去离子水孵育,封闭内源性生物素;滴加 1:100 稀释的一抗(OX42) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜;滴加生物素二抗工作液后滴加辣根酶液,各 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min;滴加 DAB 显色剂、苏木素复染、脱色、梯度乙醇脱水、中性树胶封片;免疫组化阳性细胞为棕黄色染色,在高倍镜($400 \times$)下对海马 CA1 区观察,显微照像系统采集图像,对阳性区的平均积分吸光度(IA)进行分析。

2.3.3 大鼠海马 CA1 区神经元计数 尼氏染色在高倍镜($400 \times$)下观察海马 CA1 区神经元,计数每个视野的阳性神经元数。

2.4 统计学方法 应用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,多组均数间比较采用单因素方差分析,均数间两两比较采用 LSD 检验,以 $\alpha = 0.05$ 作为显著

性检验水准。

3 结果

3.1 学习能力的测定 对照组大鼠反应正常,对照组大鼠表现为反应迟钝,精神萎靡,所需要达标训练次数明显多于对照组($P < 0.01$),说明其学习能力下降明显;天智颗粒组大鼠达标所需训练次数明显少于对照组($P < 0.01$),说明天智颗粒能提高慢性脑缺血大鼠的空间分辨学习能力,见表 1。

表 1 天智颗粒对大鼠 Y 电迷宫学习能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	训练次数/次
对照	-	32.48 ± 1.29
模型	-	$67.52 \pm 3.07^{1)}$
天智颗粒	5	$47.25 \pm 2.34^{1,2)}$

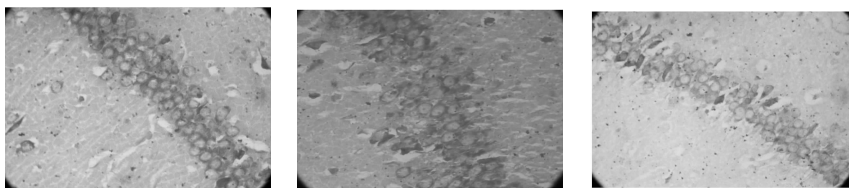
注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。(表 2~3 同)。

3.2 海马 CA1 区 OX42 的表达 对照组大鼠海马 CA1 区 OX42 有少量表达,对照组表达明显高于对照组($P < 0.01$)。天智颗粒组大鼠海马 CA1 区 OX42 表达较对照组明显减少($P < 0.01$),说明天智颗粒能明显抑制大鼠海马 CA1 区 OX42 表达,减少小胶质细胞的激活,减轻炎症反应,具有脑保护作用,见表 2。

表 2 天智颗粒对大鼠海马 CA1 区 OX42 的表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IA
对照	-	91.52 ± 2.24
模型	-	$143.17 \pm 4.21^{1)}$
天智颗粒	5	$111.07 \pm 3.17^{1,2)}$

3.3 海马 CA1 区神经元计数 对照组大鼠海马 CA1 区尼氏染色神经元数较多(75.27 ± 2.38)个;对照组神经元数明显减少,400 倍视野下为(18.26 ± 2.15)个;天智颗粒组神经元数较对照组明显增多为(36.42 ± 3.03)个;3 组之间具有明显差异($P < 0.01$)。说明天智颗粒能明显减少慢性脑缺血大鼠海马 CA1 区神经元的死亡,具有脑保护作用,见图 1。



A. 空白对照组;B. 对照组;C. 天智颗粒 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 天智颗粒对大鼠海马 CA1 区神经元的影响(尼氏染色, $\times 400$)

3 讨论

慢性脑缺血导致的老年性痴呆和慢性脑白质病近些年来愈来愈受到重视。慢性脑缺血、长期脑低灌注导致脑功能受到损伤,其损伤机制涉及到多个病理生理过程,如氧自由基的大量生成、细胞内钙离子的超载、兴奋性氨基酸的毒性作用,慢性炎症反应及过度炎症免疫反应引起的病理损伤等过程^[4-5]。其中颅内慢性过度炎症反应是慢性脑缺血损伤的重要原因之一。干预其中的某一环节,即可减轻逐级连锁反应,降低脑损害的程度。

小胶质细胞(microglia, MG)是一种兼有神经保护作用 and 神经毒性的免疫效应细胞,在颅内广泛分布,约为胶质细胞的 5% ~ 20%^[6],是脑内的主要免疫炎症细胞。生理状态下或在脑损伤早期, MG 呈分枝状,具有神经营养、抗氧化酶、抗炎因子、分泌生长因子和免疫、吞噬等作用^[7-8],维持颅内环境的平衡,表现为保护性作用和防御性作用。病理状态下如慢性脑缺血时 MG 持续增殖、活化,大量激活,形态上由静止时的分枝状转变为阿米巴状,分泌大量神经毒性因子,导致脑损伤。过度的脑损伤再次加速了 MG 的激活,加重脑损伤,形成恶性循环^[9]。因此抑制 MG 的过度激活,可减轻炎症反应,使其神经毒性因子分泌减少,减少神经元的过度死亡,保护神经元^[10]。海马区是主管近期主要记忆的重要中枢,血供丰富,对缺血缺氧非常敏感,是慢性脑缺血的易损区域,也是 MG 的主要分布区域,是观测慢性脑缺血的最佳区域^[11]。

近年来,在防治慢性脑缺血导致的脑损害中,天智颗粒得到了广泛的应用。天智颗粒的组方为天麻钩藤饮,来源于《杂病证治新义》,具有平肝潜阳、益智安神功效^[12]。有资料表明天智颗粒可抑制兴奋性氨基酸的神经毒性,降低 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA 受体)活性,提高胆碱能神经功能、增加谷胱甘肽过氧化酶活性等途径改善认知功能^[13]。本文采用永久阻断双侧颈总动脉制作慢性大鼠脑缺血模型,观察天智颗粒对海马区 MG 表达的影响,探讨其治疗慢性脑缺血、老年性痴呆的机制。结果显示天智颗粒能明显抑制海马区 MG 的过度激活,降低慢性脑缺氧大鼠海马区神经元的死亡,提高其空

间分辨学习能力,具有脑保护作用,为临床上应用天智颗粒提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] 付国惠,张保朝,陈烈冉. 天智颗粒对慢性脑缺血大鼠神经元特异性烯醇化酶表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(8):71.
- [2] Wakita H, Tominoto H, Kimura J. Glia activation and white matter change in the rat brain induced by chronic cerebral hypoperfusion: an immunohistochemical study [J]. Acta Neuropathol Berl, 1993, 87:484.
- [3] 赵崇侃,程光,陈起胜. 一种智能化的 Y 型迷宫[J]. 中国应用生理学杂志,1997,13(4):363.
- [4] 杨佳丹,董志. 脑缺血再灌注损伤的病因学研究进展[J]. 中国康复医学杂志,2006,21(10):935.
- [5] 李建章. 神经科医师手册[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:161.
- [6] 彭玲梅,黄泳. 小胶质细胞在阿尔茨海默病炎症反应中的双重作用[J]. 医学综述,2009,15(19):2889.
- [7] 袁琼兰,李瑞祥,羊惠君,等. 大鼠脑缺血再灌注时小胶质细胞或巨噬细胞的活化与增殖[J]. 中国神经免疫学与神经病学杂志,2003,10(1):54.
- [8] 武继涛. 天智颗粒治疗轻、中度血管性痴呆 27 例[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):272.
- [9] 杜家琇,娄季宇,白宏英,等. 环孢素 A 对大鼠急性脑缺血再灌注损伤小胶质细胞的活化及 iNOS 表达的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志,2010,24(13):9.
- [10] Chen M, Lu T J, Chen X J, et al. Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance [J]. Stroke, 2008, 39(11):3042.
- [11] 雷万龙,袁群芳,张怀波,等. 慢性局灶性脑缺血区小胶质细胞/吞噬细胞呈持续性反应[J]. 中国病理生理学杂志,2002,18(3):295.
- [12] 王光伟,周良辅,任惠民,等. 局灶性脑缺血和再灌注损伤中一氧化氮合成酶和髓过氧化物酶相互关系研究[J]. 中国神经精神疾病杂志,2002,28(2):142.
- [13] 谢正凯. 天智颗粒治疗遗忘型轻度认知损害肝阳上亢证的临床研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(9):95.

[责任编辑 何伟]