

脑通胶囊对 VD 大鼠海马 NMDA 受体 mRNA 表达及锥体细胞的影响

张树森¹, 况时祥^{1*}, 肖雁², 官志忠²

(1. 贵阳中医学院第二附属医院, 贵阳 550003;

2. 贵阳医学院分子生物学重点实验室, 贵阳 550004)

[摘要] **目的:**观察脑通胶囊对血管性痴呆(VD)大鼠学习记忆、海马 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体及锥体细胞的影响。**方法:**随机抽取大鼠 19 只作为假手术组,其余采用改良的四血管法(4-VO)制备 VD 模型并随机分为模型组、尼莫地平组(12 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、脑通胶囊高剂量组(1 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、脑通胶囊中剂量组(600 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、脑通胶囊低剂量组(300 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。Morris 水迷宫测定各组大鼠学习记忆能力,实时荧光定量 PCR 检测 NMDA 受体 1 亚基和 2B 亚基 mRNA 的表达情况,光镜观察海马 CA1 区锥体细胞形态及数量变化。**结果:**与模型组比较,脑通胶囊高、中剂量组逃避潜伏期缩短($P < 0.01$),穿越原平台次数增加($P < 0.01, P < 0.05$),NMDA 受体 1 亚基 mRNA 表达降低($P < 0.01$),2B 亚基 mRNA 表达升高($P < 0.01, P < 0.05$);海马 CA1 区锥体细胞形态未见明显病变现象,锥体细胞数量增多,锥体细胞丢失比率减少。与尼莫地平组比较,脑通胶囊高、中剂量组穿越原平台次数增加($P < 0.01$),NMDA 受体 1 亚基 mRNA 相对表达量降低($P < 0.01$),高剂量组 NMDA 受体 2B 亚基 mRNA 相对表达量增加($P < 0.05$),CA1 区锥体细胞增多($P < 0.01$)。**结论:**脑通胶囊可降低海马 NMDA 受体 1 亚基 mRNA 的表达,提高 2B 亚基 mRNA 的表达,减轻海马 CA1 区锥体细胞损伤,减少锥体细胞丢失比率,从而改善 VD 大鼠学习记忆能力,这可能是其治疗 VD 的作用机制之一。

[关键词] 脑通胶囊;血管性痴呆;四血管法;NMDA 受体;锥体细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0230-06

Effect of Naotong Capsule on the NMDA Receptors and Pyramidal Cells in Hippocampus of Vascular Dementia Model Rats

ZHANG Shu-sen¹, KUANG Shi-xiang^{1*}, XIAO Yan², GUAN Zhi-zhong²

(1. The 2nd Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003, China;

2. Guiyang Medical College Key Molecular Biology Laboratory, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Naotong Capsule on N-methyl-D-aspartic acid receptor (NMDA) receptors and pyramidal cells in hippocampus of vascular dementia (VD) model rats. **Method:** Nineteen rats were taken at random into sham group, the rest were VD models established by modified Pulsinelli 4 vascular occlusions method (4-VO) and were randomly divided into model group, nimodipine group (12 mg·kg⁻¹·d⁻¹), Naotong Capsule large-dose group (1 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹), Naotong Capsule middle-dose group (600 mg·kg⁻¹·d⁻¹), and Naotong Capsule low-dose group (300 mg·kg⁻¹·d⁻¹). Morris water maze was used to test learning and memory abilities of rats. The mRNA expression level of NMDA receptors (subunit 1 and 2B) were determined by the Real-time Quantitative PCR. And the morphology and number of neurons in CA1 region of the

[收稿日期] 20111227(018)

[基金项目] 贵州省科技攻关计划项目(黔科合 SY 字[2008]3048 号);教育部春晖计划项目(Z2005-2-5027);贵州省中医药管理局项目(黔中医药 2007020)

[第一作者] 张树森,医学硕士,从事中西医结合防治老年期痴呆研究,Tel:13628510891,E-mail:zhangshusen588@126.com

[通讯作者] *况时祥,教授,主任医师,硕士研究生导师,从事中西医结合防治老年期痴呆临床与基础研究,Tel:13078596068,E-mail:kuangshixiang2009@163.com

hippocampus were observed by light microscope. **Result:** Compare to the model group, the escape time was shortened ($P < 0.01$), times of spanning the previous platform increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), the mRNA expression level of subunit 1 decreased ($P < 0.01$) and the mRNA expression level of subunit 2B increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), pyramidal cells showed no obvious pathogenesis and more pyramidal cells with less pyramidal cells loss rate were found in Naotong Capsule large-dose and middle-dose treatment group. Compare to the Nimodipine group, times of spanning the previous platform increased ($P < 0.01$), the mRNA expression level of subunit 1 decreased ($P < 0.01$) in Naotong Capsule large-dose and middle-dose treatment group, and the mRNA expression level of subunit 2B increased ($P < 0.05$), the number of neurons in CA1 region of the hippocampus increased ($P < 0.01$) in Naotong Capsule large-dose treatment group. **Conclusion:** Naotong Capsule can improve learning and memory abilities of VD rats by decreasing the mRNA expression level of subunit 1, increasing the mRNA expression level of subunit 2B of NMDA receptor and by decreasing pyramidal cells injury and loss rate in CA1 region of the hippocampus, which may be one of the therapeutic mechanisms of VD.

[**Key words**] Naotong capsule; vascular dementia; 4 vascular occlusions; NMDA receptor; pyramidal cells

血管性痴呆(VD)是指各种脑血管疾病引起的脑功能障碍导致的获得性智能损害综合征。*N*-甲基-*D*-天门冬氨酸(NMDA)受体与VD患者认知功能障碍有关^[1]。研究发现,不同脑区的神经元对缺血的敏感性不同,海马结构是最敏感的区域,而海马CA1区与空间辨别及学习记忆关系最为密切^[2]。故此,本实验通过观察脑通胶囊对VD模型大鼠学习记忆能力、海马NMDA受体1亚基和2B亚基mRNA表达水平以及海马CA1区锥体细胞形态、数量的影响,客观反映本药对海马CA1区锥体细胞的保护作用,以阐明其治疗VD的可能机制,为本方的进一步开发研究提供实验依据。

1 材料

SD大鼠180只,雌雄各半,体重(350±20)g,由重庆市中药研究院实验动物研究室提供,SPF级,动物许可证号SCXK(渝)2007-0006。脑通胶囊(组成:西洋参、天麻、黄芪、水蛭等)由贵阳中医学院第二附属医院制剂室生产,批号2009-03-18。尼莫地平片,山西亚宝药业集团股份有限公司。动物组织总RNA提取试剂盒[Tianguen Biotech(北京)Co. Ltd],Quant cDNA第一链合成试剂盒均为Tianguen Biotech(北京)Co. Ltd提供,批号分别为RP080530,RT080530,QP080530。DNS-2型Morris水迷宫(中国医学科学院),JGD-50B高频电刀(张家港市航天医疗电器有限公司);Centrifuge 5804R高速台式冷冻离心机(德国EPPENDORF);DR5000紫外分光光度计(美国HACH公司);iCyclerIQ Multicolor Real-Time PCR(美国BIO-RAD伯乐);全自动凝胶成像分析系统(美国BIO-RAD伯乐);LKB-III超薄切片机(瑞典LKB公司);Motic B型系列生物照相显微

镜(加拿大麦克奥迪实业集团有限公司)。

2 方法

2.1 动物筛选与模型制备 大鼠适应性喂养1周后使用Morris水迷宫对大鼠的学习、记忆能力进行筛查测定。分别以第3象限、第2象限池壁中点为出发点,记录120 s内大鼠从水中爬上平台所需时间为逃避潜伏期,每天2次,历时5 d。第5天潜伏期的平均值为记忆成绩,以平均潜伏期的90%区间作为筛选学习记忆功能正常大鼠的标准,若未能达到此要求的动物则弃去不用。将筛选合格的大鼠随机抽取19只作为假手术组,其余采用改良Pulsinelli四血管阻断(4-VO)法^[3]制造血管性痴呆大鼠模型。**2.2 分组与给药** 造模成功的大鼠按随机数字表法随机分为模型组18只、尼莫地平组17只、脑通胶囊高剂量组18只、脑通胶囊中剂量组12只、脑通胶囊低剂量组15只。各组均于术后1周开始ig,每日1次,连续4周。给药剂量通过公式^[4]换算得出,尼莫地平组(12 mg·kg⁻¹·d⁻¹),脑通胶囊高剂量组(1 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、中剂量组(600 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、低剂量组(300 mg·kg⁻¹·d⁻¹),假手术组、模型组均予纯净水(10 mL·kg⁻¹·d⁻¹)ig。

2.3 大鼠行为学检测与取材方法 灌胃治疗结束后使用Morris水迷宫进行大鼠学习、记忆能力的测定。定位航行试验:操作方法同2.1。空间探索试验:于定位航行试验结束后次日进行。将平台移出Morris水迷宫,大鼠出发点不变,记录大鼠2 min内穿越原平台位置的次数,2次穿越平台次数的平均值作为测试成绩。

Morris水迷宫测试结束后进行取材。以10%水合氯醛(3 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉后,立即断头,在

冰盘上快速剪开头皮,咬骨钳开颅,组织剪剪开脑膜,将全脑置于放在冰盘上的干燥培养皿中,去除脑干、小脑及大脑皮质,分离出海马并修剪成为 0.3 cm³大小的组织块,迅速投入 RNASTore 样品保存液中。于 4 ℃ 条件下过夜渗透,次日将组织从 RNASTore 中取出后,放入经去酶处理的 EP 管中, -80 ℃ 冻存用于 mRNA 检测。用于光镜切片的海马组织于取出后立即投入 10% 的福尔马林溶液中。固定 24 h 后,常规石蜡包埋,蜡块 4 ℃ 保存。石蜡切片机连续冠状切片,切片厚度 5 μm,每侧海马样本制成 4 张切片。分别进行 HE 染色和 Nissl 染色(具体步骤按说明书进行)。HE 染色切片观察海马

CA1 区锥体细胞形态学变化,Nissl 染色切片观察统计海马 CA1 区锥体细胞数量与丢失比率。

2.4 海马组织总 RNA 的提取 按 RNAPrep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)说明书进行。

2.5 逆转录合成 cDNA 与实时荧光定量 PCR 反应 按照 Quant cDNA 第一链合成试剂盒说明方法,进行总 RNA 逆转录合成 cDNA。

按照实时荧光定量试剂盒说明方法进行内参基因与目的基因的实时荧光定量 PCR 反应。

2.5.1 引物制备 引物序列见表 1。

表 1 引物的序列

基因	引物序列(5'-3')	扩增长度/bp
β -actin mRNA	sense: TGGCATTGTGATGGACTC	447
NM_031144	antisense: ACTGTGTTGGCATAGAGG	
NMDAR1 mRNA	sense: AGGAGGAGGAGGAAGATG	171
NM_017010	antisense: AGTTGGCAGTCTAGGAAG	
NMDAR2B mRNA	sense: CATCGGCATCGCTGTCATC	219
NM_012574	antisense: GCTTCTTGGTCGGTGCATC	

2.5.2 凝胶电泳(特异性实验) 扩增产物 1 μL + 5 μL, 6 × DNA 电泳 Loading Buffer 在 2.5% 琼脂糖凝胶板上电泳,电压为 80 V,时间 60 min。EB 染色,在全自动凝胶成像分析系统下观察结果并拍照。

2.6 mRNA 表达结果计算 计算公式为:样品目的基因相对表达量(F) = $10^{\Delta Y_t/B_t - \Delta Y_g/B_g}$ (ΔY_t = 样品目的基因的 CT 值 - 假手术组目的基因的 CT 值), ΔY_g = 样品 β -actin 的 CT 值 - 假手术组 β -actin 的 CT 值, B_t 是目的基因的标准曲线斜率, B_g 是 β -actin 标准曲线斜率。

2.7 海马 CA1 区锥体细胞形态观察与计数 光镜下(×400)对海马 CA1 区锥体细胞进行双盲法计数

(CA1 区选取细胞数较为恒定的中段)。计数方法:每张切片取连续的 2 个视野,并保证锥体细胞层的弧度弦置于目镜的直径上,取两视野的平均值为该切片锥体细胞数,4 张切片的平均值为该样本的锥体细胞数。锥体细胞丢失比率(LR)计算公式:

$$LR = (\text{假手术组锥体细胞数} - \text{其他各组锥体细胞数}) / \text{假手术组锥体细胞数} \times 100\%$$

2.8 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计分析软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析或非参数检验,以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

3 结果

3.1 学习记忆能力测试 从表 1, 2 可以看出,

表 1 脑通胶囊对大鼠定向航行实验中每日平均逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	平均逃避潜伏期/s				
			第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
假手术	-	19	55.56 ± 25.07	38.19 ± 30.45 ²⁾	51.35 ± 23.60	39.30 ± 22.41 ²⁾	37.05 ± 21.50 ²⁾
模型	-	18	57.49 ± 22.37	61.56 ± 25.56	60.61 ± 24.5	63.09 ± 22.79	63.75 ± 25.47
脑通胶囊	1.2	18	43.46 ± 23.87	41.09 ± 16.06 ¹⁾	43.16 ± 15.05 ¹⁾	40.39 ± 12.83 ²⁾	39.89 ± 14.05 ²⁾
	0.6	12	44.77 ± 25.97	41.18 ± 18.51 ¹⁾	44.15 ± 18.12 ¹⁾	48.51 ± 15.61	42.06 ± 17.48 ²⁾
	0.3	15	50.34 ± 33.45	51.88 ± 29.07	40.36 ± 20.63	49.83 ± 20.15	51.74 ± 19.39
尼莫地平	0.012	17	42.91 ± 24.93	46.23 ± 23.45	45.61 ± 25.46 ¹⁾	50.15 ± 24.28	52.96 ± 21.83

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 脑通胶囊对大鼠穿越原平台次数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	穿越原平台数/次
假手术	-	19	$5.87 \pm 1.01^{2)}$
模型	-	18	3.78 ± 1.68
脑通胶囊	1.2	18	$6.24 \pm 1.82^{2,3)}$
	0.6	18	$5.13 \pm 1.94^{1,3)}$
	0.3	12	$4.27 \pm 1.60^{4)}$
尼莫地平	0.012	17	$3.26 \pm 1.61^{4)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与尼莫地平组比较³⁾ $P < 0.01$;与假手术组比较⁴⁾ $P < 0.01$ 。

训练第 5 天,假手术组大鼠逃避潜伏期明显短于模型组,穿越原平台位置次数明显多于模型组($P < 0.01$),这说明模型组大鼠学习能力差,VD 造模成功;与模型组比较,高剂量组、中剂量组大鼠逃避潜伏期明显缩短($P < 0.01$),穿越原平台位置次

表 3 脑通胶囊对大鼠 NMDA 受体 1 亚基 mRNA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	ΔY_t	ΔY_g	$\Delta Y_t/B_t - \Delta Y_g/B_g$	F
模型	-	10	-8.29 ± 1.26	-0.04 ± 1.33	2.13 ± 0.15	141.78 ± 53.91
脑通胶囊	1.2	10	-5.16 ± 2.06	-0.76 ± 2.04	1.12 ± 0.28	$15.40 \pm 8.23^{1,2)}$
	0.6	6	-3.70 ± 2.13	0.01 ± 1.24	0.96 ± 0.55	$16.04 \pm 17.04^{1,2)}$
	0.3	8	-7.50 ± 1.23	0.19 ± 0.89	1.99 ± 0.40	126.54 ± 80.39
尼莫地平	0.012	10	-8.55 ± 1.26	-0.84 ± 1.44	2.05 ± 0.22	124.51 ± 55.41

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与尼莫地平组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

表 4 脑通胶囊对大鼠 NMDAR2B mRNA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	ΔY_t	ΔY_g	$\Delta Y_t/B_t - \Delta Y_g/B_g$	F
模型	-	10	-3.76 ± 1.42	-0.04 ± 1.33	0.96 ± 0.41	12.57 ± 9.45
脑通胶囊	1.2	10	-6.51 ± 1.46	-0.76 ± 2.04	1.47 ± 0.28	$34.71 \pm 20.41^{2,3)}$
	0.6	6	-5.43 ± 1.35	0.01 ± 1.24	1.41 ± 0.12	$26.26 \pm 7.83^{1)}$
	0.3	8	-5.00 ± 1.23	0.19 ± 0.89	1.34 ± 0.15	23.22 ± 8.09
尼莫地平	0.012	10	-5.32 ± 1.84	-0.84 ± 1.44	1.14 ± 0.44	20.26 ± 7.83

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与尼莫地平组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

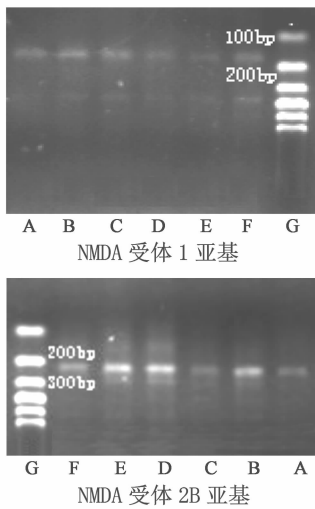
3.3 PCR 产物电泳结果 NMDA 受体 1 亚基 PCR 产物电泳结果见图 1。各组均于 Marker 100 ~ 200 bp 之间约 170 bp 处出现扩增条带,与扩增产物的 bp 数基本相符,故可认为各组大鼠海马组织内均有 NMDA 受体 1 亚基的表达。NMDA 受体 2B 亚基 PCR 产物电泳结果见图 1。各组均于 Marker 200 ~ 300 bp 之间约 220 bp 处出现扩增条带,与扩增产物的 bp 数基本相符,故可认为各组大鼠海马组织内均有 NMDAR2B 的表达。

3.4 海马 CA1 区组织病理形态学变化 假手术组,锥体细胞排列整齐紧密,胞浆透明,细胞核体积较大,呈圆形或椭圆形,染色质分布均匀,核仁清晰

数增多($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明脑通胶囊可改善 VD 大鼠学习记忆能力;与尼莫地平组比较,高剂量组、中剂量组穿越原平台位置次数增多($P < 0.01$),说明脑通胶囊高、中剂量组改善 VD 大鼠学习、记忆障碍作用优于尼莫地平。

3.2 目的基因相对表达量 本实验采取相对定量法检测目的基因的表达量,NMDA 受体 1 亚基及 2B 亚基 mRNA 相对表达量见表 3,4。从表 3 可以看出,与模型组、尼莫地平组比较,高剂量组、中剂量组 NMDA 受体 1 亚基 mRNA 相对表达量降低($P < 0.01$)。从表 4 可知,与模型组比较,高剂量组与中剂量组 NMDA 受体 2B 亚基 mRNA 相对表达量增加,分别具有极显著性差异($P < 0.01$)和显著性差异($P < 0.05$);与尼莫地平组比较,高剂量组亦具有显著性差异($P < 0.05$)。

明显,未见病变表现。模型组,锥体细胞排列散乱,部分胞浆呈苍白均质染色,胞体明显皱缩,或呈空泡状,细胞膜和核膜界限不清晰,大量细胞出现水肿,核溶解或核消失,有时仅见死亡细胞的轮廓或痕迹。尼莫地平组,锥体细胞层结构较松散,部分胞体明显皱缩或呈空泡状,细胞膜和核膜界限不清晰,部分细胞出现水肿,核溶解或核消失。脑通胶囊高剂量组,只有少量的细胞核固缩及染色质呈均匀深染,大部分细胞结构完整,基本无皱缩或水肿的细胞,胞浆透明,胞体饱满,细胞膜和核膜及核仁清晰,细胞核体积较大,形态较接近假手术组。中剂量组,锥体细胞层结构较模型组紧密,部分细胞核固缩及染色质呈

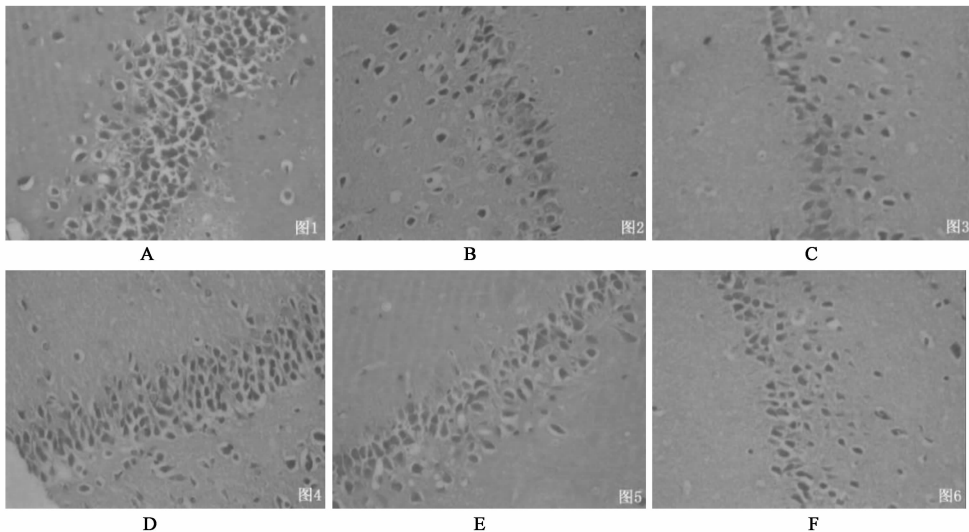


A. 假手术组; B. 模型组; C. 尼莫地平组; D. 脑通胶囊高剂量组;
E. 脑通胶囊中剂量组; F. 脑通胶囊低剂量组; G. Marker

图 1 脑通胶囊对大鼠 NMDA 受体 1 亚基、
NMDA 受体 2B 亚基表达的影响

均匀深染,少量皱缩或水肿的细胞。低剂量组,锥体细胞层结构较松散,部分胞体明显皱缩或呈空泡状,细胞膜和核膜界限不清晰,部分细胞出现水肿,核溶解或核消失。见图 2。

3.5 海马 CA1 区锥体细胞的数量与丢失率 从表 5 可以看出,海马 CA1 区锥体细胞数量以假手术组最多,模型组最少,有极显著性差异 ($P < 0.01$),说明造模可明显导致海马 CA1 区锥体细胞减少,这在形态学上进一步证明造模成功。尼莫地平组、脑通胶囊高、中剂量组海马 CA1 区锥体细胞数量均较模型组多,具有极显著性差异 ($P < 0.01$),且高剂量组 CA1 区锥体细胞多于尼莫地平组 ($P < 0.01$),说明尼莫地平与脑通胶囊高、中剂量组均可减少锥体细胞凋亡、丢失,以高剂量组疗效最佳。海马 CA1 区锥体细胞丢失率与锥体细胞数量呈负相关的关系,即海马 CA1 区锥体细胞数量越多,海马 CA1 区锥体细胞丢失率就越低。



1. 假手术组; B. 模型组; C. 尼莫地平组; D. 脑通胶囊高剂量组; E. 脑通胶囊中剂量组; F. 脑通胶囊低剂量组

图 2 脑通胶囊对大鼠海马 CA1 区组织病理形态学变化的影响 (HE 染色, $\times 400$)

表 5 海马 CA1 区锥体细胞的数量与丢失率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	n	海马 CA1 区 神经元/个	海马 CA1 神经元 丢失率/%
假手术	-	9	$50.36 \pm 3.24^{2)}$	$0.00 \pm 0.00^{2)}$
模型	-	8	$28.16 \pm 1.78^{6)}$	$44.25 \pm 4.83^{6)}$
脑通胶囊	1.2	8	$47.75 \pm 1.90^{2,4)}$	$6.88 \pm 5.74^{2,4)}$
	0.6	6	$41.04 \pm 4.20^{2,5)}$	$20.67 \pm 11.67^{1)}$
	0.3	7	$30.04 \pm 2.80^{3,6)}$	$41.71 \pm 4.39^{3,6)}$
尼莫地平	0.012	7	$35.32 \pm 1.46^{2,6)}$	$31.43 \pm 4.76^{2,6)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与尼莫地平组比较

³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与假手术组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

在 VD 形成和发展的不同阶段,气虚血瘀是其重要的病理基础,因此国内不少学者将补气活血作为 VD 的重要治法。如李小军等^[6]采用益气聪明汤治疗血管性痴呆 34 例,总有效率达 82.4%。刘斌等^[7-9]研究发现,具有养血益气、化痰通络等功效的参芎化瘀胶囊可改善血管性痴呆大鼠的学习记忆能力,并能改善海马 CA1 区损伤的超微结构,上调 Bcl-2 蛋白表达,下调 Bax 蛋白表达,减少细胞凋亡,显示益气活血法对本病治疗确实有突出价值。

作者通过长期的临床观察发现,VD 患者尤其

在早期除表现记忆减退,反应迟慢,精神倦怠,舌质紫暗等气虚血瘀之证外,还常伴发头昏头痛,心烦焦虑,便溏纳呆等清阳不升,虚阳浮越表现,因而提出本病治疗应在补气、活血、通络的同时重视升举清阳,潜降浮阳,并以金元名医李东垣的益气聪明汤为基础研制成中药复方制剂——脑通胶囊,用于 VD 早期治疗。方中主用黄芪补脾升清,使气旺血行,水蛭活血通络,改善大脑供血;辅用葛根升举清阳,兼能和血,天麻潜降浮阳,又可通络;佐以西洋参益气养阴,健脑益智。诸药合用,补中气,升清阳,化瘀通络,潜降浮阳,能针对本病各主要病理环节发挥良好的综合调节作用。临床研究表明,本制剂对血管性痴呆早期具有较好治疗作用^[10]。

目前研究证实,NMDA 受体属于电压、配体双重门控离子通道。NMDA 受体 1 亚基(NR1)是组成 NMDA 受体复合物的必需配件,是其功能性亚单位,NMDA 受体 2B 亚基(NR2B)是受体复合物的调节亚单位,通过多种方式调节 NMDA 受体复合物的功能活性。已有研究显示,在 NR1 缺失小鼠的前脑、海马和丘脑等区域代谢活动明显降低^[11]。另一方面,VD 大鼠学习记忆的改变与海马 NR2B 的变化相关,缺血早期 NR2B 过表达产生神经毒引起学习记忆下降^[12];在慢性缺血期,则因 NR2B 含量不足导致学习记忆的减退。另外,引起 VD 的重要原因之一为脑缺血致海马损伤^[13],海马 CA1 区与空间辨别及学习记忆关系最为密切^[2],故本课题选取 NR1 和 NR2B 作为研究对象,结合海马 CA1 区锥体细胞形态学观察与数量统计,以探讨脑通胶囊治疗 VD 的作用机制。

实验结果显示,造模后 VD 大鼠学习记忆功能减退,空间定向能力障碍,NR1 mRNA 高表达,NR2BmRNA 低表达,海马 CA1 区锥体细胞形态学表现明显异常,锥体细胞数量减少,丢失比率高,这表明 VD 大鼠海马 CA1 区锥体细胞的损伤、凋亡、丢失可能与缺血导致的 NR1,NR2BmRNA 的异常表达相关。脑通胶囊高、中剂量组大鼠学习、记忆成绩提高,NR1 mRNA 表达降低,NR2BmRNA 表达增加,海马 CA1 区锥体细胞病变轻微,锥体细胞数量增多,丢失比率降低;在改善 VD 大鼠学习、记忆能力,减低 NR1 mRNA 表达方面,高、中剂量组均优于尼莫地平,在提高 NR2BmRNA 表达,减轻海马 CA1 区锥体细胞损伤、丢失方面,高剂量组优于尼莫地平,表

明脑通胶囊可能通过调节缺血后的 NR1,NR2B 亚基的异常表达,进而减轻海马区锥体细胞损伤、丢失,其作用有一定的剂量相关性。

概言之,脑通胶囊可降低 NR1 mRNA 表达,增加 NR2B mRNA 的表达,从而减轻海马 CA1 区锥体细胞损伤、凋亡、丢失,改善 VD 大鼠学习、记忆障碍,这可能是本方治疗 VD 的重要机制。

[参考文献]

- [1] 姚国恩,王景周,陈曼娥. 血管性痴呆大鼠认知障碍的 NMDA 受体机制研究[J]. 第三军医大学学报, 2002,24(12):1408.
- [2] Holscher C. Time, Space and hippocampal functions[J]. Rev Neurosci, 2003, 14(3):253.
- [3] 贾健民,贾健平. 大鼠脑反复缺血致不可逆性学习记忆障碍的研究[J]. 心理学报, 1995,27(1):69.
- [4] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2005:203.
- [5] 邹移海,徐志伟,苏钢强. 实验动物学[M]. 北京:科学出版社, 2004:184.
- [6] 李小军,冀孝如. 益气聪明汤治疗血管性痴呆 34 例[J]. 山西中医, 2001,17(3):26.
- [7] 刘斌,赵彬,毛文静,等. 参芎化瘀胶囊对血管性痴呆模型大鼠学习记忆行为的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(10):125.
- [8] 刘斌,马原源,毛文静,等. 参芎化瘀胶囊对血管性痴呆模型大鼠海马 CA1 区超微结构的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(12):125.
- [9] 刘斌,马原源,毛文静,等. 参芎化瘀胶囊对血管性痴呆模型大鼠海马 CA1 区细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):176.
- [10] 姜海鹏,况时祥. 脑通胶囊治疗血管性痴呆早期的疗效观察[J]. 中国中医急症, 2010,19(10):1669.
- [11] Duncan G, Miyamoto S, Gu H, et al. Alterations in regional brain metabolism in genetic and pharmacological models of reduced NMDA receptor function [J]. Brain Res, 2002, 951:166.
- [12] 何雨,张昱,马飞煜,等. 血管性痴呆大鼠 N-甲基-D-天冬氨酸-2B 受体变化机制的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2007,24(2):186.
- [13] Marina V F, Larisa K, Christian G. Specific gap junction enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury[J]. J Neurosci, 2002, 22(3):644.

[责任编辑 古云侠]