

参龙健脑胶囊对脑缺血损伤大鼠海马区胆碱乙酰基转移酶表达的影响

许成勇,张岗,黄泉智,王发渭*,陈利平
(解放军总医院 中医科,北京 100853)

[摘要] **目的:**探讨参龙健脑胶囊对脑缺血损伤大鼠脑保护作用及对海马区胆碱乙酰基转移酶(ChAT)表达的影响。**方法:**采用结扎双侧颈总动脉制备脑缺血模型,参龙健脑胶囊低、高剂量组和吡拉西坦组剂量分别为 0.4,1.2,0.45 g·kg⁻¹,ig 1 次/d。ig 28 d 后观察神经功能并评分、脑病理组织切片并应用免疫组织化学染色法观察 ChAT 在缺血脑损伤大鼠海马区的表达。**结果:**模型组大鼠神经功能缺损明显($P < 0.05$),海马区 ChAT 表达减少($P < 0.01$);与模型组相比,参龙健脑胶囊治疗组大鼠的神经功能缺损改善($P < 0.05$),大鼠海马区 ChAT 表达显著增加($P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论:**参龙健脑胶囊对脑组织损伤的保护作用与其促进脑组织 ChAT 表达密切相关。

[关键词] 参龙健脑胶囊;脑缺血;胆碱乙酰基转移酶;免疫组织化学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0191-03

Effect of Shenlong Jiannao Capsule on Expression of Choline Acetyltransferase in Hippocampus of Cerebral Ischemia Rats

XU Cheng-yong, ZHANG Gang, HUANG Quan-zhi, WANG Fa-wei*, CHENG Li-ping

(Department of Traditional Chinese Medicine, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Shenlong Jiannao capsule on the expression of choline acetyltransferase(ChAT) in hippocampus of cerebral ischemia rats. **Method:** Two-vessel occlusion were adopted to reproduce the cerebral ischaemia animal model. Rats were randomly divided into 5 groups as following: sham operation group, model control group, positive control group with pisacetam, Shenlong Jiannao capsule groups(low and high dosage). Shenlong Jiannao capsule groups low and high dosage treated by gavage with Shenlong Jiannao capsule at the dosage of 0.4,1.2 g·kg⁻¹·d⁻¹. After 28 days, changes of neurological scores and pathological tissue sections of brain in rats were observed, immunohistochemistry were adopt used to assay the expression of ChAT in hippocampus of cerebral ischaemia rats. **Result:** Shenlong Jiannao capsule could improve the neurological scores, ameliorate the morphology and increase the number of ChAT immunoreactive positive neurons. Comparing to model control group, the neurological scores were improved($P < 0.05$), the expression of ChAT was increased in Shenlong Jiannao capsule group($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion:** Shenlong Jiannao capsule can ameliorate the cerebral injury involved in enhancing the ChAT protein expression.

[Key words] Shenlong Jiannao capsule; cerebral ischaemia; choline acetyltransferase; immunohistochemis; rat

缺血性脑血管病(ischemic cerebral vascular disease, ICVD)属中医“中风”、“呆证”等范畴,为中

[收稿日期] 20110415(005)

[基金项目] 北京市科技计划研发基金课题(Z07050700690709)

[第一作者] 许成勇,硕士研究生,从事中西医结合老年病研究,E-mail:79633378@qq.com

[通讯作者] *王发渭,主任医师,硕士生导师,Tel:010-66939450,E-mail:WFW301@sina.com

老年人常见病,常伴发多种临床疾病,可导致获得性智能损害和认知障碍,是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、血管性痴呆(vascular dementia, VD)发病的重要病理基础。其认知功能损害的形态学基础可能是大脑额叶皮层及海马胆碱能神经元的损伤,胆碱能系统功能障碍可能是其认知损害机制之一^[1],胆碱乙酰基转移酶(choline acetyltransferase, ChAT)作为决定乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)的关键因素,常作为研究胆碱能神经元的特殊标志。本实验通过建立脑缺血大鼠模型,运用免疫组化的方法观测其海马区 ChAT 的表达变化,研究参龙健脑胶囊对脑缺血大鼠海马区 ChAT 表达的影响,从而探讨其脑保护的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 50 只,鼠龄 3 个月,体重 180 ~ 220 g,雌雄各半(由解放军总医院动物实验中心提供,许可证编号 SCXK(京)2009-0007)。

1.2 药物及试剂 参龙健脑胶囊(由生晒参、制首乌、淫羊藿、石菖蒲、地龙、川芎、远志等组成,解放军总医院中药房提供),吡拉西坦(石家庄中诺药业有限公司),ChAT 免疫组织化学试剂(武汉博士德生物工程有限公司),real Envision detection kit 二抗检测系统试剂盒(广谱)(基因科技有限公司)。

1.3 仪器 EG1140H 型包埋机(Laica);RM2135 型切片机(LAICA),BX60 型显微镜(Olympus),Image-proplus 5.1 图像分析软件。

2 方法

2.1 制备大鼠脑缺血模型 采用双侧颈总动脉永久性结扎法(2-VO)制备脑缺血模型^[2]。模型制作完毕后,将动物送至通风间饲养,保持室温 20 ℃。假手术组仅分离双侧颈总动脉而不结扎。按照 Longa^[3] 等的 5 级评分法,在造模大鼠清醒后,立即进行动物神经功能的评定:正常(0 分);对侧肢体屈曲(1 分);拖鼠尾后拉时,对侧肢体无力(2 分);拖鼠尾后拉时,向对侧转圈(3 分);自发向对侧转圈或倾倒(4 分)。选取评分为 2 分以上者入围实验。

2.2 分组及给药 除假手术组(8 只)外,其余造模后存活大鼠(29 只)进行神经功能评分后,随机分为 4 组:参龙健脑胶囊低剂量组(1 组,7 只)、参龙健脑胶囊高剂量组(2 组,8 只)、吡拉西坦对照组(3 组,7 只)、模型组,7 只,在造模成功后第 3 天开始 ig 给药。按照成人与鼠的体重折算系数比公式($d_b =$

$d_A \times k_B/k_A$)^[4] 计算,1,2,3 组剂量分别按 0.4,1.2,0.45 g·kg⁻¹,每天 ig 1 次。假手术组和模型组 ig 等体积的生理盐水。连续 ig 28 d,并于术后 1,14,28 d 进行神经功能评分。

2.3 标本采集 给药 28 d 后,以 10% 水合氯醛(30 mg/100 g)腹腔注射麻醉成功后,开胸暴露心脏,经左心室 200 mL 生理盐水快速冲洗,待流出液体清亮后,灌注 4 ℃ 4% 多聚甲醛约 200 mL(PBS 缓冲液配置),断头后取脑,入 4% 多聚甲醛内固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片。

2.4 HE 染色 切片常规脱蜡;苏木素染色后,盐酸乙醇溶液分色,自来水冲洗反蓝;伊红染色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明后,封片。

2.5 ChAT 免疫组化染色方法 采用免疫组织化学染色法(两步法)染色,具体步骤如下:①切片常规脱蜡入水;②以新鲜配置的 3% 过氧化氢灭活内源酶。③切片置于柠檬酸缓冲液中,微波炉加热以修复抗原。④滴加稀释后的一抗(兔抗鼠 ChAT 1:100),4 ℃ 湿盒内过夜。⑤加入生物素标记的二抗,置于湿盒中,37 ℃ 温箱内孵育 30 min。⑥滴加 DAB 工作液,室温孵育 5 ~ 10 min,光镜下控制显色,水洗终止反应。⑦苏木素衬染,盐酸乙醇分化后反蓝。⑧常规脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。阴性对照采用 PBS 代替一抗。

2.6 显微镜观察 显微镜观察并照像。ChAT 免疫阳性细胞胞质及突起呈棕黄色,每组取 4 个标本切片,每张切片随机选取 3 个高倍视野,计数阳性细胞数,取平均值作为计数结果。

2.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行数据处理,多组间比较采用单因素方差分析,并进行两两比较。非正态分布数据用中位数表示,统计分析采用 Kruskal-Wallis 法秩和检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 神经功能评定 术后 1 d(给药前)各治疗组和模型组之间神经功能学评分均为 3 分,差异无统计学意义;给药 14 d 后,模型组神经功能学评分为 3 分,1,2,3 组评分分别为 2,1,1 分,与模型组相比,治疗组大鼠的神经功能缺损改善($P < 0.05$);给药 28 d 后,模型组神经功能学评分为 2 分,1 ~ 3 组评分分别为 1,0,1 分,与模型组相比,治疗组大鼠的神经功能缺损显著改善($P < 0.05$)。

3.2 脑病理组织观察 HE染色,光镜下模型组与假手术组相比,海马锥体细胞密度减低,排列松散,层次减少,有核固缩、深染的细胞出现。与模型组相比,参龙健脑胶囊高、低剂量组和吡拉西坦组变性、坏死的神经细胞较少,海马锥体细胞层次较为清楚,排列整齐,核固缩、深染的细胞数目减少。

3.3 ChAT免疫组化染色 光镜下,脑组织切片中正常的ChAT免疫阳性细胞的胞质及包膜呈棕黄色。假手术组大鼠皮质和海马有较多ChAT免疫阳性神经元分布,模型组与假手术组相比ChAT免疫阳性神经元分布稀疏,染色较淡,数量明显减少。参龙健脑胶囊高、低剂量组和吡拉西坦组与模型组相比ChAT免疫阳性神经元表达增多,差异有统计学意义(表1)。

表1 参龙健脑胶囊对脑缺血大鼠海马区ChAT阳性细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$	CA1区	CA3区
假手术	-	25.08 ± 5.68	19.42 ± 4.30
模型	-	11.92 ± 3.85 ²⁾	13.58 ± 2.88 ²⁾
参龙健脑	0.4	20.00 ± 3.64 ²⁾	15.92 ± 3.12 ²⁾
	1.2	22.67 ± 6.76 ²⁾	17.75 ± 4.69 ¹⁾
吡拉西坦	0.45	22.42 ± 3.63 ²⁾	17.08 ± 4.46 ²⁾

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

缺血性脑血管病是一个复杂的病理过程,其重要组织病理学改变之一是皮层及海马神经元的变性。中枢胆碱能神经广泛分布于运动和感觉系统、边缘系统、脑干网状结构及大脑皮质等部位,有促进学习记忆、激活脑电、维持觉醒、参与精神意志活动等重要生理功能^[5]。ChAT是中枢神经系统合成乙酰胆碱的限速酶,在胆碱能神经元胞体内合成,与乙酰胆碱的分布平行,可作为间接反映乙酰胆碱水平的指标,故常作为研究胆碱能神经元的特殊标志^[6]。正常大鼠的免疫组化染色发现其海马区有大量的ChAT免疫反应阳性神经元和纤维分布,皮质各层中ChAT免疫反应阳性神经元和纤维呈弥散分布。缺血大鼠皮质和海马ChAT阳性神经元数目与正常组相比表达减少,其原因与额叶皮层和海马区神经元变性、神经细胞数目减少,伴胶质细胞活化有关。本实验采用双侧颈总动脉结扎造成大鼠慢性脑供血不足,制备脑缺血模型,通过免疫组化染色观察符合上述病理改变特征。

缺血性脑血管病历代医家多从“痰、瘀、虚”等

方面立论,现代临床多认为其基本病机在于肾虚、血瘀、痰阻,为本虚标实之患,其本为肾虚,其标为血瘀、痰阻,治疗多以补肾活血化痰为基本治法。参龙健脑胶囊由生晒参、制首乌、淫羊藿、干地龙、石菖蒲、川芎、远志等药物组成。方以君药人参大补五脏之元气、益气生血,首乌养血益肝,固精益肾;淫羊藿温肾壮阳,两者共助人参补益先天之本,佐以地龙、川芎行气、活血、化瘀通络。石菖蒲、远志开窍、化痰、醒脑。全方共奏补肾填精、益气活血、化痰醒脑的功效,用于缺血性脑血管病属肾精不足,气虚血瘀痰阻之证。临床参龙健脑胶囊对于脑缺血及血管性痴呆具有较好的疗效^[7],前期实验已从行为学、氧自由基损伤等方面探讨了参龙健脑胶囊治疗缺血性脑血管病的可能机制^[8]。本实验证实:与模型组相比,参龙健脑胶囊组变性、坏死的脑神经元细胞较少,海马锥体细胞结构较为完整,核固缩、深染的细胞数目减少,海马区ChAT免疫阳性神经元表达增多,提示参龙健脑胶囊改善脑病理形态,减轻脑神经元坏死,维护脑组织超微结构完整性,是其脑保护作用机制之一。

[参考文献]

- [1] 范文辉,李露斯,刘之荣. 血管性痴呆的动物模型、神经病理及其胆碱能机制[J]. 中国临床康复, 2002, 21(6): 3172.
- [2] Olsson Y, Brun A, Englund E. Fundamental pathological lesions in vascular dementia [J]. Acta Neurol Scand, 1996, 168(Suppl): 31.
- [3] Zea Longa E L, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 203.
- [5] 李世泽, 刘其强, 白宏英, 等. 丁咯地尔对慢性脑缺血大鼠海马CA1区星形胶质细胞及认知功能的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2006, 9(3): 64.
- [6] 沈瑞乐, 王兴荣, 吴艳芝, 等. 大鼠慢性脑缺血后ChAT表达特征及丁基苯酚的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2007, 10(3): 104.
- [7] 陈利平, 王发渭, 贾建军, 等. 参龙健脑汤治疗轻度认知障碍临床研究[J]. 中国中医急症, 2009, 18(3): 354.
- [8] 张岗, 许成勇, 耿森, 等. 参龙健脑胶囊对慢性脑缺血大鼠氧化损伤及胆碱能神经递质的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(1): 41.

[责任编辑 聂淑琴]