

复智胶囊对血管性痴呆大鼠脑组织海马区 诱导型一氧化氮合酶表达的影响

马云枝, 史继鑫*, 孟闯, 沈晓明, 张可可, 任应国, 兰瑞, 程传浩
(河南中医学院第一附属医院, 郑州 450003)

[摘要] 目的: 观察复智胶囊对血管性痴呆大鼠的作用及脑组织海马区诱导型一氧化氮合酶表达的影响, 探讨复智胶囊治疗血管性痴呆的疗效和机制。方法: 60 只 SPF 大鼠随机分为 4 组, 每组 15 只, 采用双侧颈总动脉结扎的方法制备血管性痴呆大鼠模型, 然后分别为复智胶囊组 ig 复智胶囊液 $3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 安理申组 ig 安理申液 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 假手术组和模型组均 ig 生理盐水 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 均 1 次/d, 连续给药 4 周后进行行为学分析和脑组织海马区诱导型一氧化氮合酶表达的测定。结果: 行为学实验显示, 模型组大鼠学习成绩(2 min 内寻找平台的时间)与记忆成绩(在 2 min 内跨越平台及其他 3 个象限相应平台位置次数)下降; 各给药组大鼠的学习成绩与记忆成绩均有提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。病理形态学显示, 与假手术组相比, 模型组海马区诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达明显增高, 复智胶囊组及安理申组均可抑制 iNOS 表达水平增加, 复智胶囊组抑制作用更为明显。结论: 复智胶囊对血管性痴呆大鼠有明显改善作用。其作用机制之一可能与通过抑制 iNOS 活性的反应性增强来实现的。

[关键词] 复智胶囊; 血管性痴呆; 诱导型一氧化氮合酶; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)09-0187-04

Influence of Fuzhi Capsule on Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Hippocampus in Rats with Vascular Dementia

MA Yun-zhi, SHI Ji-xin*, MENG Chuang, SHEN Xiao-ming, ZHANG Ke-ke,
REN Ying-guo, LAN Rui, CHENG Chuan-hao

(The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of Fuzhi Capsule on rat with vascular dementia and on expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in brain hippocampus, and to explore the related mechanisms. **Method:** Sixty SPF rats were randomly divided into 4 groups ($n = 15$ each), the vascular dementia of rat was reproduced by bilateral carotid artery ligation. Afterwards, the animals were received different treatments: Fuzhi capsule group ($3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig daily), aricept group ($0.05 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ig daily), sham operation group and model group (saline $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig daily). After 4 weeks of treatments, the behavioral experiments and expression of iNOS in hippocampus were determined. **Result:** The experiment showed that the learning achievement (finding the platform within 2 min) and memory performance (across the platform within 2 min in the other three quadrants) in the model group were decreased. On the other hand, the learning achievement and memory performance were improved in the treatment groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Pathological morphology suggested that the hippocampus iNOS expression

[收稿日期] 20101107(001)

[基金项目] 2009 年度河南省科技创新人才课题(094200510012)

[第一作者] 马云枝, 学士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事中西医结合防治脑病的研究, Tel: 13703956688, E-mail: mayunzhi6688@sohu.com

[通讯作者] * 史继鑫, 2008 级硕士研究生, 研究方向是中西医结合脑病防治, Tel: 13838537924, E-mail: shijixin666666@163.com

was significantly increased the model group compared with sham operation group, and Fuzhi Capsule and aricept could make the expression of iNOS down. The effect of Fuzhi Capsule was more apparent compared with aricept.

Conclusion: Fuzhi Capsule has a significant protective effect on vascular dementia, and the mechanism might be related with inhibiting iNOS expression.

[**Key words**] Fuzhi Capsules; vascular dementia; inducible nitric oxide synthase; rats

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是指因脑血管病所致的智能及认知障碍临床综合征^[1], 主要与缺血性脑血管病有关。据统计, 中国 65 岁以上老年人中痴呆发病率为 39%, 其中 VD 占 68.5%, 而居首位^[2], 已经成为老年人常见病、多发病。目前国内外对 VD 的治疗尚缺乏公认的药物及疗法, 中医药在本病的治疗中具有明显的特色和优势, 因此研究中医药治疗 VD 具有重要的意义。复智胶囊是本院经验方, 临床研究表明本方治疗 VD 有较好的临床疗效。本研究通过观察复智胶囊对 VD 大鼠行为学, 脑组织海马区诱导型一氧化氮合酶表达的影响, 探讨复智胶囊防治 VD 的作用和机制, 为临床治疗 VD 提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康清洁级雄性 SPF 大鼠 60 只, 体重 250 ~ 350 g, 由河南省实验动物中心提供, 健康 SPF 清洁级大鼠, 合格证号 0003703。

1.2 药物 复智胶囊由制首乌、熟地黄、山茱萸、黄芪、葛根、川芎、桃仁等药物组成, 每粒含生药量 0.5 g, 由河南中医学院第一附属医院制剂室提供, 批号 040812。用 0.5% 羧甲基纤维素液研磨配制含量为 0.2 g·mL⁻¹ 的混悬液 (以下简称“复智胶囊”); 安理申片: 卫材 (中国) 药业公司生产, 批号 09122A。用 0.5% 羧甲基纤维素液研磨配制含量 5 mg·L⁻¹ 的混悬液 (以下简称“安理申”)。

1.3 试剂 一氧化氮合酶 (iNOS) 免疫组化试剂盒: 武汉博士德生物公司生产, 批号为 BA0362 rabbit anti-NOS2。

1.4 仪器 Morris 水迷宫, 中国医学科学院; BX60 荧光显微镜, 日本 Olympus 公司; 计算机图像分析系统 TD-2000, 北京天地公司; Leica RM2125 型切片机, 德国 Leica 公司。

2 方法

2.1 动物分组和模型制备 将大鼠随机分为: 假手术组, 模型组, 复智胶囊组, 安理申组。参照文献 [3] 方法将动物用 10% 水合氯醛 (0.35 g·kg⁻¹) ip

麻醉, 颈正中部常规消毒后切口, 分离出双侧颈总动脉, 套以“0”号线双重线结扎, 缝合皮肤, 制备慢性缺血 VD 模型。其中假手术组只分离颈总动脉, 但不结扎。切口用注射用青霉素钠水溶液适量局部涂敷, 术后每日肌注青霉素钠针 40 万 u/只, 连续 3 d。

手术后第 7 天, 伤口完全愈合, 饮食正常开始给药, 复智胶囊组 ig 复智胶囊液 3.0 g·kg⁻¹, 安理申组 ig 安理申液 0.05 mg·g⁻¹, 假手术组和模型组均 ig 生理盐水 10 mL·kg⁻¹, 均 1 次/d, 连续给药 4 周。

2.2 检测方法

2.2.1 行为学检测 采用 Morris 水迷宫法^[4]。给药结束后即开始水迷宫试验。程序包括: ①定位航行试验, 历时 6 d, 每日上、下午各 4 次, 将受试大鼠按顺时针方向依次由 E, S, W, N 4 个人水点顺序面向池壁放入水中。记录 2 min 内寻找平台的时间 (逃避潜伏期)。如果大鼠在 2 min 内找到平台, 记录其实际逃避潜伏期; 如果在 2 min 内仍未找到平台, 由实验者将其引上平台并停留 10 s, 逃避潜伏期记录为 2 min, 测量大鼠获取经验 (学习) 的能力。②空间搜索试验: 定位航行试验结束后撤除平台, 然后任选 E, S, W, N 中一个入水点将大鼠放入水中, 测其 2 min 内跨原平台及其他 3 个象限相应平台位置的次数和大鼠在水迷宫外停留的时间, 评价大鼠保存经验 (记忆) 能力。

2.2.2 免疫组织化学分析 iNOS 表达 行为学实验结束后, 大鼠经 10% 水合氯醛 ip 麻醉, 开胸暴露心脏, 直视下将穿刺针头经左心室刺入升主动脉。先用生理盐水 100 mL 灌注, 剪开右心耳放血, 再灌注含 4% 多聚甲醛缓冲液 500 mL (以肝脏颜色变白为准), 开颅取左海马。放入 30% 蔗糖多聚甲醛溶液中固定, 至脑组织下沉后作冠状连续冰冻切片, 厚 5 μm。染色步骤按免疫组化试剂盒说明进行, 每组 8 张切片, 每张切片任取 5 个视野, 用图象分析仪测定海马 CA1 区、CA3 区单位面积 iNOS 阳性细胞数, 取平均值。

2.3 统计学处理 用 SPSS17.0 软件进行数据统计分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料采用 χ^2 检

验,对计数资料进行成组设计 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 复智胶囊对 VD 大鼠行为学的影响

3.1.1 定位航行试验 见表 1,与假手术组比较,模型组逃避潜伏期增加($P < 0.01$);与模型组比较,复智胶囊组、安理申组逃避潜伏期减少($P < 0.01$);与假手术组和安理申组比较,复智胶囊组逃避潜伏期无显著性差异。

3.1.2 空间探索试验 见表 1,结果显示,撤除平台后,4 组大鼠在 2 min 内跨越平台及其他 3 个象限相应平台位置次数为:在原平台象限,假手术组、复智胶囊组、安理申组大鼠跨越相应平台次数多于其他 3 个象限($P < 0.01$),而模型组原平台象限与另外 3 个象限的跨越次数无显著性差异;将 4 组大鼠在原平台象限跨越相应平台次数做两两比较,复智胶囊组明显高于模型组($P < 0.01$),与安理申组和假手术组无显著性差异。

表 1 复智胶囊连续给药 4 周对 VD 大鼠行为学的影响($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	逃避潜伏期/s	原平台(E)/次	右侧平台(S)/次	对侧平台(N)/次	左侧平台(W)/次
假手术	-	20.50 ± 17.80 ²⁾	6.25 ± 1.7 ²⁾	2.20 ± 1.57	1.10 ± 1.10	0.90 ± 1.19
模型	-	44.65 ± 35.23	2.22 ± 1.84	2.28 ± 1.75	3.00 ± 1.48	1.69 ± 1.45
复智胶囊	3.0	21.65 ± 19.63 ¹⁾	5.73 ± 2.13 ¹⁾	1.14 ± 1.19	0.71 ± 0.81	1.22 ± 1.25
安理申	5×10^{-5}	21.43 ± 24.01 ¹⁾	5.05 ± 1.34 ¹⁾	1.15 ± 1.24	0.68 ± 0.75	1.39 ± 1.22

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 复智胶囊对 VD 大鼠 iNOS 表达的影响 如图 1 所示,为各组大鼠海马区 iNOS 阳性细胞数分布状况,与假手术组相比,模型组大鼠脑组织 iNOS 阳性细胞数明显升高,复智胶囊组和安理申组明显降低模型大鼠脑组织 iNOS 阳性细胞数,复智胶囊组与安理申组比较无显著差异;复智胶囊组和安理申组分别与模型组比较差异非常显著($P < 0.01$)。

4 讨论

有关 VD 造模方法的报道较多,如永久性结扎双侧颈总动脉法、双侧颈总动脉反复结扎法、Pulsinelli 4 血管闭塞法,经预实验研究,双侧颈总动脉永久性结扎法是近年来较常用的一种慢性低灌注 VD 模型大鼠制备方法,优点为制作简单,创伤小,重现性好,死亡率低^[5]。因此,本实验采用此法制备 VD 大鼠模型。

目前研究认为,在脑缺血再灌注过程中,NO 产生在缺血最初几小时内具有有益作用,对脑细胞起保护作用,而在再灌注期产生的 NO 则具有毒性作用^[6-8]。NO 复杂的双重作用与其自身复杂的生物及理化性质有关,并受周围环境氧化还原状态的影响,而其合成酶 NOS 的不同类型是决定其不同作用的关键因素。NOS 可分为 Ca^{2+} 依赖性的原生型(cNOS)与非 Ca^{2+} 依赖性的诱导型(iNOS)两大类。缺血早期 Ca^{2+} 内流,激活 Ca^{2+} 依赖性 cNOS,产生的 NO 能维持脑血流,抑制血小板聚集和黏附等;随着缺血持续和再灌注进行,受损脑组织内有大量的中性粒细胞和巨嗜细胞浸润以及受损细胞产生的细胞因子都是 iNOS 的诱导激活剂,此时产生大量的 NO 具有细胞毒性作用,在脑组织可通过坏死与凋亡 2 种途径介导细胞死亡,加重脑缺血损伤的神经毒性^[9]。可见,iNOS 在生理情况下无活性,在病理过程中则起重要作用。本实验结果显示,模型组大鼠海马区 iNOS 多呈强阳性反应,提示脑缺血再灌注明

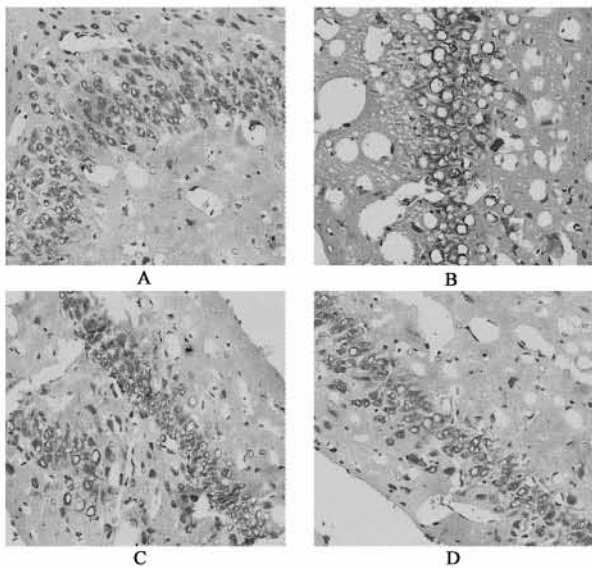


图 1 VD 大鼠脑组织海马区 iNOS 的病理形态学改变(HE, $\times 200$)

A. 假手术组; B. 模型组; C. 复智胶囊 $3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;
D. 安理申 $5 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

显诱导了 iNOS 表达的增强,这种 iNOS 表达的增加及由此产生的大量具有神经毒性作用的 NO 在迟发性神经元死亡以及缺血性脑损害后的痴呆形成中发挥了一定作用^[10]。而生理状态下的血管内皮细胞不表达 iNOS,所以假手术组大鼠海马区 iNOS 多无阳性反应。

VD 属中医学“健忘”“呆病”“文痴”“癡病”等病证范畴,其病位在脑,与肝肾心脾等脏密切相关,肝肾亏虚为本,痰瘀凝结为标,为本虚标实之病证。针对本病主要病机。课题组经多年临床筛选具有补肾化痰、豁痰开窍等功效药物,研制成复智胶囊。复智胶囊主要有制首乌、熟地黄、山萸肉、黄芪、石菖蒲、远志、川芎、桃仁、葛根等组成,方中制首乌、熟地黄、山萸肉补肾填髓为君;石菖蒲、远志祛痰、醒神,川芎、桃仁、葛根搜剔络脉之瘀毒为臣,具有标本兼治之效;黄芪、茯苓、葛根 3 药既可以益气健脾,又能升发清阳之气,可引诸药直达脑髓而为使药。现代药理研究:地黄可通过影响激素水平、影响酶活性和抗氧化来延缓衰老过程^[11]。石菖蒲能减轻和逆转氧自由基的损伤,增强学习记忆能力,防止脑萎缩^[12]。石菖蒲挥发油有抑制大鼠神经细胞凋亡的作用^[13],可降低小鼠脑组织兴奋性氨基酸的含量,对痴呆大鼠学习记忆具有显著改善作用^[13-14];川芎嗪可通过上调脑缺血再灌注诱导的 Bel-2 蛋白表达,下调 Fas-L 蛋白表达,抑制细胞凋亡^[15]。本实验结果表明,复智胶囊组 and 安理申组均可改善 VD 大鼠的学习记忆能力,而且复智胶囊组 and 安理申组大鼠海马区 iNOS 的反应性均较模型组减弱,提示复智胶囊可通过抑制 iNOS 表达,降低 iNOS 活性,调节 NO 的合成与释放来保护脑组织,减轻脑功能损害,此作用与该方的补肾化痰、豁痰开窍功效有关,这对防止 VD 进一步发展和改善学习记忆功能有积极作用。

综上所述,复智胶囊对实验性 VD 模型大鼠具有明显治疗作用,其治疗 VD 的机制之一是通过抑制 iNOS 表达,降低 iNOS 活性,调节 NO 的合成与释放来保护脑组织,减轻脑功能损害,保护大脑神经细胞。

[参考文献]

[1] 王维治,罗祖明. 神经病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:253.

[2] 黄芳华. 中药新药申报资料中长期毒性的常见问题[J]. 中国新药杂志,2004,13(7):661.

[3] 孙莉,吴江,王守春. 慢性前脑缺血大鼠学习、记忆功能的研究[J]. 中风与神经疾病杂志,2002,19(1):20.

[4] Morris R G, Garrud P, Rawlins J N, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions[J]. Nature,1982,297(5868):681.

[5] Cao Y J, Shibata T, Rainov N G. Liposome-mediated transfer of the Bcl-2 gene results in neuroprotection after in vivo transient focal cerebral ischemia in an animal model[J]. Gene Ther,2002,9(6):415.

[6] Faraci F M, Brian J E. Nitric oxide and the cerebral circulation[J]. Stroke,1994,25(3):692.

[7] Kraus G E, Bucholz R D, Yoon K W, et al. Cerebrospinal fluid endothelin-1 and endothelin-3 levels in normal and neurosurgical patients: A clinical study and literature review[J]. Surg Neurol,1991,35:20.

[8] Zhang F, White J G, Iadecola C. Nitric oxide donors increase blood flow and reduced brain damage in focal ischemia; Evidence that nitric oxide is beneficial in the early stage of cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab,1994,14(2):217.

[9] 刘辉. 一氧化氮、一氧化氮合酶与脑缺血损伤[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册,1999,19(2):121.

[10] Iadecola C, Zhang F, Xu X H. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorate cerebral ischemic damage[J]. Am J Physiol, 1995, 268:286.

[11] 曾艳,贾正平,张汝学. 地黄化学成分及药理研究进展[J]. 中成药,2006,28(4):609.

[12] 方永奇,匡忠生,谢宇辉,等. 石菖蒲对缺血再灌注脑损伤大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2002,11(17):1647.

[13] 景玉宏,冯慎远,汤晓琴. 石菖蒲对学习记忆的影响及突触机制[J]. 中国中医基础医学杂志,2002,8(6):38.

[14] 唐洪梅,席萍,吴敏,等. 石菖蒲对小鼠脑组织氨基酸类神经递质的影响[J]. 中药新药与临床药理,2004,15(5):310.

[15] 曲友直,高国栋,赵振伟,等. 川芎嗪对局灶性脑缺血再灌注后 Bel-2 和 Fas-L 表达的影响[J]. 中国临床康复,2004,8(16):3082.

[责任编辑 聂淑琴]