

复智胶囊对血管性痴呆大鼠炎症因子、 胆碱能系统的时效性影响

王保奇¹, 程传浩^{1*}, 马云枝²

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 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 (vascular dementia, VD) 大鼠学习记忆及不同时段海马胆碱乙酰转移酶 (choline acetyl transferase, CHAT) 表达, 乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AchE) 活性, 转化生长因子 α (transformation growth factor, TNF- α), 白细胞介素 6 (interleukin, IL-6) 的影响。方法: 健康 II 级 Wistar 雄性大鼠 110 只, 采用 4 血管闭塞法建立急性缺血再灌注 VD 模型。将造模成功的 60 只动物按体质量排序, 按随机数字表法随机分为模型对照组及治疗组, 每组 30 只动物, 假手术组动物 10 只。治疗组每天给复智胶囊 $4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$ 。模型对照组、假手术组每天生理盐水 ig 。安理申对照组每天给予安理申 (加 0.5% 羧甲基纤维素液研磨配制) $0.05 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ ig}$ 。在第 3, 7, 28 天, 3 个时段随机从治疗组、模型组各抽取 10 只检验其主动回避反应 (active avoid reaction, AAR) 习得率、血清 TNF- α , IL-6 含量及海马 CHAT 表达、AchE 活性。结果: 缺血再灌注 3 d 即可形成海马胆碱能神经元的不可逆性损伤, 复智胶囊在早期可以减轻该损伤过程, 但在疗程内对已经造成的胆碱能神经损伤却无显著的改善作用。海马 AchE 含量在 3 d 时显著升高, 此后保持在低水平状态, 复智胶囊治疗后第 7, 28 天时出现下降并接近假手术组。复智胶囊显著降低 IL-6 在缺血再灌注早期的表达。TNF- α 在炎症反应的早期和晚期均有异常表达; 复智胶囊治疗后较模型组同时时间点显著下降。结论: 复智胶囊能确切改善 VD 大鼠的学习记忆能力; 其机制与减轻缺血炎性反应对神经元的危害、上调海马胆碱能系统低水平状态有关。

[关键词] 复智胶囊; 血管性痴呆; 炎症因子; 胆碱能系统

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0176-04

Effect of Fuzhi Capsule on Inflammation Factors and Acetylcholine System in Rats with Vascular Dementia

WANG Bao-qi¹, CHENG Chuan-hao^{1*}, MA Yun-zhi²

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. The first Affiliated Hospital of Henan University of the Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Fuzhi capsule on the ability of learning and memory and the hippocampus Ach E activity and CHAT content and the content of IL-6, TNF- α in serum in rats with vascular dementia. **Method:** The rat model was established by blocking bilateral common carotid arteries permanently, and the model rats were randomly classified into two groups, i. e. Fuzhi Capsule group ($4.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig) and model group. Then (3 d, 7 d and 28 d after treatment) active avoid reaction (AAR) rate, hippocampus Ach E activity and CHAT content and the content of IL-6, TNF- α in serum were observed. Such factors were detected as hippocampus Ach E activity and CHAT content in serum after treatment. **Result:** Cholinergic neurons in the hippocampus were damaged irreversibly after 3 d of ischemia-reperfusion. The Fuzhi Capsule could reduce the damage process in early

[收稿日期] 20101015(005)

[基金项目] 河南省科技攻关项目 (0224630073)

[第一作者] 王保奇, 博士, 副教授, 主要从事中西医结合防治心脑血管疾病研究, E-mail: wangbqi@126.com

[通讯作者] *程传浩, 博士, 讲师, 主要从事中西医结合防治神经内科疾病临床与研究工作, Tel: 15838269075

stage but did not have significant improvement on the damaged cholinergic nerve in the course of treatment. The hippocampus Ach E content was increased significantly after 3 d, then at a low level. Then Fuzhi Capsule increased it in 7 d and 28 d by comparison with the sham operated group, decreased the expression of IL-6 in early ischemia-reperfusion obviously. The expression of TNF- α were abnormal in the early and late inflammation stage. Then treatment of Fuzhi Capsule decreased it obviously comparison with that of the sham operated group. **Conclusion:** Fuzhi Capsule can improve the ability of learning and memory. This indicates that Fuzhi capsule may mitigate the injury of inflammation and regulate the low level of acetylcholine in hippocampus.

[**Key words**] Fuzhi Capsule; vascular dementia; inflammatory factor; acetylcholine system

随着世界范围老龄化进程的加速,痴呆患病率逐年增加,已成为致老年人智力残疾的严重社会和精神卫生问题。血管性痴呆(vascular dementia, VD)是我国痴呆的主要类型,现有患者约400万人,探讨VD发病机制,寻找有效疗法,是当今医学研究的重要课题。本实验采用4血管闭塞(vascular occlusion 4-VO)法复制急性缺血再灌注VD模型,观察复智胶囊对不同时段学习记忆能力、血清转化生长因子 α (transformation growth factor, TNF- α)、白细胞介素6(interleukin, IL-6)含量及海马胆碱乙酰转移酶(choline acetyl transferase, CHAT)表达、乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE)活性的影响,探讨该药对急性缺血VD大鼠的作用机制,为该药的临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物 健康II级Wistar雄性大鼠110只,14月龄,体质量290~410g,由郑州大学实验动物中心提供,动物合格证号医动字第410116号。

1.2 药物与试剂 复智胶囊(制首乌、熟地黄、山萸肉、黄芪、葛根、川芎、桃仁、石菖蒲、远志)。由河南中医学院一附医院制剂室提供,批号040812;安理申,苏州卫材制药有限公司产品,批号J20040014。AchE试剂盒、考马斯亮蓝蛋白试剂盒,由南京建成生物工程研究所提供;CHAT试剂盒、SABC免疫组化染色试剂盒、DAB显色试剂盒均由武汉博士德生物工程有限公司提供,TNF- α 、IL-6试剂盒由解放军总医院科技开发中心放免所提供。

1.3 仪器 穿梭箱,ZH-DSX2型,淮北正华生物仪器设备有限公司产品,参数设置:电源为220V/50Hz,刺激方式为声音、电刺(40V),计时为秒。放免 γ 测量仪,SN-684型,上海原子核研究所日环仪器厂产品。光栅分光光度计,722型,山东高密仪器厂产品。HPLAS-1000计算机图象分析系统,武汉千屏

公司产品。

2 方法

2.1 模型的建立、分组与给药 大鼠适应性喂养7d后,再经穿梭箱训练7d,主动回避反应(AAR)习得率大于或等于80%者入选。造模方法参照文献[1-2]方法,采用血管闭塞法建立急性缺血再灌注VD模型。假手术组除不烧灼双侧椎动脉、不夹闭双侧颈总动脉外,其余处理与造模方法相同。将造模成功的60只动物按体质量排序,按随机数字表法随机分为模型对照组及治疗组,每组30只动物。假手术组动物10只。治疗组每天给复智胶囊 $4.5\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{ig}$,相当于成人每日剂量的30倍,连续给药4周。模型对照组、假手术组每天生理盐水 1g 。

2.2 检测指标

2.2.1 学习记忆能力 采用穿梭箱主动回避反应系统,各组大鼠疗程结束后,隔夜禁食,正常饮水,在采取标本前(药物治疗结束8h后)均进行测试。该系统以灯光为条件刺激,足底电击为非条件刺激。如大鼠在灯光刺激后即能完成穿梭动作称主动回避反应(AAR),而经电刺激后才能完成穿梭动作称被动回避反应(PAR)。大鼠的学习记忆能力以完成AAR的次数与测试总次数(20次)的比值即AAR习得率代表。大鼠在模型制作前均经穿梭箱训练7d, AAR习得率大于或等于80%者入选。

2.2.2 血清IL-6, TNF- α 含量及海马组织AchE, CHAT活性 模型对照组和治疗组分别于第3天、第7天、第4周随机各抽取10只,假手术组第4周时采取标本,标本包括腹主动脉血清、海马组织匀浆及切片。血清IL-6, TNF- α 含量的测定采用全自动 γ 计数器,以放射免疫法测定;海马组织AchE活性变化采用比色法测定;海马组织CHAT活性测定采用免疫组化方法进行染色,用HPLAS-1000计算机图象分析系统,每组取12张切片,于400倍镜下采集

海马内 3 个视野图像,从目标面积、目标面积比率进行分析,判定 CHAT 活性的变化。

2.3 统计学方法 采用 SAS 6.0 统计分析软件处理,计量资料所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验,前后比较采用配对 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,并用 Tukey 检验进行两两比较。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 复智胶囊对各组大鼠学习记忆能力的影响

假手术组各时间点相比无显著差异。模型对照组大鼠从造模第 3 天始,AAR 习得率便低于假手术组,第 7 天、第 28 天时继续降低,与假手术组各时间点对比,差别有统计学意义($P < 0.01$);复智胶囊治疗后各时间点 AAR 习得率均较模型对照组同时点增高,差别有统计学意义(P 值分别为 $P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 复智胶囊对 VD 大鼠学习记忆影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	AAR 习得率		
		3 d	7 d	28 d
模型对照	-	61.24 ± 5.47	58.77 ± 7.61	41.63 ± 8.42
复智胶囊	4.5	78.38 ± 3.31 ¹⁾	82.26 ± 5.51 ²⁾	88.21 ± 7.23 ²⁾
假手术	-	87.43 ± 6.44 ²⁾	87.21 ± 6.75 ²⁾	89.33 ± 7.10 ²⁾

注:与模型对照组同时点相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~6 同)。

3.2 复智胶囊对各组大鼠血清 IL-6 含量的影响

假手术组各时间点相比无显著差异。模型对照组大鼠的血清 IL-6 含量 3 d 最高,7 d、21 d 逐渐下降;均高于同时点假手术组(3 d, $P < 0.01$;7 d, $P < 0.05$;28 d, $P > 0.05$)。治疗组第 3 d 大鼠血清 IL-6 含量较模型对照组同时点降低,差别有统计学意义($P < 0.05$);但第 7、28 天相比,差别无统计学意义。治疗组第 28 天与假手术组相比,差别无统计学意义。见表 2。

表 2 复智胶囊对 VD 大鼠血清 IL-6 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
ng·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-6		
		3 d	7 d	28 d
模型对照	-	115.70 ± 10.77	89.00 ± 8.441	60.60 ± 4.64
复智胶囊	4.5	100.10 ± 6.19 ¹⁾	90.20 ± 5.07 ²⁾	55.28 ± 1.67 ²⁾
假手术	-	48.80 ± 3.47 ²⁾	48.55 ± 3.47 ²⁾	46.60 ± 3.47 ²⁾

3.3 复智胶囊对各组大鼠血清 TNF-α 含量的影响

假手术组各时间点相比无显著差异。模型对照组大鼠的血清 TNF-α 含量 7 d 最高,28 d 最低;与同时相假手术组相比,均高于假手术组(3 d, $P < 0.01$;7 d, $P < 0.01$;28 d, $P > 0.05$)。治疗组各时间点 TNF-α 含量较模型对照组降低,差别有统计学意义($P < 0.05$)。治疗组第 28 d 时 TNF-α 含量与假手术组相比,差别无统计学意义。见表 3。

表 3 复智胶囊对 VD 大鼠血清 TNF-α 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
μg·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TNF-α		
		3 d	7 d	28 d
模型对照	-	3.50 ± 0.08	4.37 ± 0.25	2.06 ± 0.23
复智胶囊	4.5	3.00 ± 0.27 ¹⁾	2.90 ± 0.35 ²⁾	1.45 ± 0.09 ²⁾
假手术	-	1.51 ± 0.11 ²⁾	1.50 ± 0.10 ²⁾	1.49 ± 0.10 ²⁾

3.4 复智胶囊对各组大鼠 AchE 的变化

假手术组各时间点相比无显著差异。与假手术组比较,模型对照组造模后第 3 天 AchE 含量升高($P < 0.01$),第 7 天时下降,持续至第 28 天,低于假手术组($P < 0.01$)。治疗组第 3 天时 AchE 含量较假手术组升高,差别有统计学意义,第 7 天及第 28 天时下降接近假手术组,差别无统计学意义($P > 0.05$);治疗组与模型对照组各时间点对比除第 28 天有升高外($P < 0.05$),其余时间均无显著差异。见表 4。

表 4 各组大鼠海马 AchE 的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$) mmol·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	AchE		
		3 d	7 d	28 d
模型对照	-	0.63 ± 0.16 ⁴⁾	0.26 ± 0.17 ⁴⁾	0.23 ± 0.12 ³⁾
复智胶囊	4.5	0.65 ± 0.15 ¹⁾	0.31 ± 0.16 ²⁾	0.33 ± 0.15 ²⁾
假手术	-	0.35 ± 0.03 ²⁾	0.35 ± 0.01 ²⁾	0.35 ± 0.02 ²⁾

注:与假手术组同时点相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 5~6 同)。

3.5 复智胶囊对 VD 大鼠海马 CHAT 目标面积的影响

假手术组各时间点相比无显著差异。模型对照组及治疗组各时间点海马 CHAT 目标面积较假手术组同时点均减少,差别有统计学意义($P < 0.01$);治疗组与模型对照组相比,各时间点均有增高,差别有统计学意义($P < 0.01$)。见表 5。

3.6 复智胶囊对 VD 大鼠海马 CHAT 目标面积比率的影响

假手术组各时间点相比无显著差异。模型对照组及治疗组海马各时相 CHAT 目标面积比率与假手术组相比均减少,差别有统计学意义($P <$

表5 对 VD 大鼠海马 CHAT 目标面积的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	CHAT 目标面积		
		3 d	7 d	28 d
模型对照	-	0.032 ± 0.016 ⁴⁾	0.032 ± 0.016 ⁴⁾	0.030 ± 0.016 ⁴⁾
复智胶囊	4.5	0.161 ± 0.009 ²⁾	0.162 ± 0.009 ²⁾	0.164 ± 0.009 ²⁾
假手术	-	0.269 ± 0.001	0.271 ± 0.015	0.274 ± 0.023

0.01);治疗组较模型对照组各时间点均有增高,且差异极显著($P < 0.01$)。见表6。

表6 对 VD 大鼠海马 CHAT 目标面积比率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	CHAT 面积比		
		3 d	7 d	28 d
模型对照	-	2.30 ± 1.03 ⁴⁾	3.21 ± 1.13 ⁴⁾	3.53 ± 1.24 ⁴⁾
复智胶囊	4.5	27.20 ± 3.63 ²⁾	28.80 ± 5.79 ²⁾	29.30 ± 4.27 ²⁾
假手术	-	34.95 ± 4.01	35.80 ± 3.68	35.70 ± 3.97

4 讨论

VD 属中医学“中风后痴呆”范畴。中医学理论认为年迈之人脏腑渐虚,髓海渐衰,虚气留滞,水津失布,痰瘀内结互生,败坏脑髓,神机失统,从而致使 VD 发生。其病位在脑,以肾精亏虚为本,痰瘀阻滞为标。因此,补肾填精益髓、豁痰化瘀开窍是其主要治法。

现代医学研究表明,胆碱能系统参与 VD 发生。VD 时中枢胆碱能系统受损,认知损害机制涉及胆碱能递质及其受体等改变。临床实验研究已证明,胆碱能治疗策略对 VD 有效。本实验表明,缺血再灌注 3 d 即可形成海马胆碱能神经元的不可逆性损伤,复智胶囊在早期可以减轻该损伤过程,但在疗程内对已经造成的胆碱能神经损伤却无显著的改善作用。海马 AchE 含量在 3 d 时显著升高,第 7 天、28 天一直保持在低水平状态,其原因可能与胆碱能神经在短期缺血再灌注的情况下被破坏而使 AchE 大量释放出胞体有关。复智胶囊治疗后直至第 7 d、28 d 时出现下降并接近假手术组,同时高于模型对照组同时间点含量。由于 AchE 常代表胆碱能系统活性,推测复智胶囊在疗程中后期可起到提高胆碱能神经元活性的作用。

大量证据显示,中枢神经系统可对缺血产生完

整的炎症反应。抑制缺血后炎症反应是缺血性损伤的主要治疗目标之一^[3]。IL-6 被视为与中枢神经系统缺血相关的重要炎症分子,缺血性脑血管病急性期患者脑脊液及血浆 IL-6 水平能预示梗塞范围大小和神经功能恢复情况^[4]。本实验进行的急性缺血再灌注实验表明 IL-6 参与早期缺血再灌注后的炎症损伤,此后炎症反应逐渐减弱,但 IL-6 在后期仍有表达,对缺血起损伤修复作用。复智胶囊可以显著降低 IL-6 在缺血再灌注早期的表达,具有减轻炎症损伤的作用。TNF- α 参与机体免疫应答和炎症反应,过度的 TNF- α 则可导致多种病理改变。本研究表明 TNF- α 参与在炎症反应的早期和晚期均有异常表达;复智胶囊治疗后较模型对照组同时间点显著降低,显示出该药抑制 TNF- α 在缺血再灌注过程中的表达、减轻炎症损伤的作用。

本实验显示:复智胶囊能确切改善急性缺血再灌注 VD 大鼠的学习记忆能力;复智胶囊可显著提高急性缺血再灌注 VD 大鼠海马乙酰胆碱(CHAT)目标面积及其比率,减少胆碱能神经元的损伤。复智胶囊可提高急性缺血再灌注 VD 大鼠海马 AchE 活性,上调海马胆碱能神经系统低水平状态,达到改善学习记忆能力的作用。阻断急性缺血再灌注 VD 大鼠血清 TNF- α 、IL-6 的过度表达,减轻细胞的炎症反应及代谢毒素对神经元的危害,改善缺损的神经功能,减缓病变脑组织的凋亡,从而达到治疗 VD 的作用。

[参考文献]

- [1] 王蕊,杨秦飞,唐一鹏,等.大鼠拟“血管性痴呆”模型的改进[J].中国病理生理杂志,2000,16(10):914.
- [2] 蔺心敬,李吕力,王铁建.血管性痴呆大鼠模型的制备与评价[J].中国比较医学杂志,2006,16(12):733.
- [3] Guo Q, Xie J, Du H. Par-4 induces cholinergic hypoactivity by suppressing CHAT protein synthesis and inhibiting NGF-inducibility of CHAT activity [J]. Brain Res, 2000, 874(2):221.
- [4] Clark W M, Rinker L G, Lessov N S, et al. Time course of IL-6 expression in experimental CNS ischemia [J]. Neurol Res, 1999, 21(3):287.

[责任编辑 聂淑琴]