

参芎化瘀胶囊对全脑缺血再灌注大鼠脑 组织超微结构及学习记忆功能的影响

赵雅宁, 李建民^{*}, 安朝旺, 李淑杏, 陈长香
(华北煤炭医学院, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的: 探讨参芎化瘀胶囊对脑缺血再灌注损伤的治疗作用及机制。方法: 48 只雄性 SD 大鼠随机分成假手术组、模型组、参芎化瘀胶囊高、低剂量组。改良的 Pulsinelli 4 血管阻断(4-VO)法制作全脑缺血模型。术后 1d 应用电镜和光镜观察海马区脑组织形态变化, 术后 3~7 d 水迷宫法测试动物学习记忆功能。结果: 与假手术组比较, 模型组中海马神经元内细胞器、轴索及毛细血管等超微结构明显受损伤、动物搜索安全岛潜伏期延长($P < 0.05$); 与模型组比较, 参芎化瘀胶囊组中大鼠脑组织结构损伤程度减轻、搜索安全岛潜伏期缩短($P < 0.05$); 上述变化在高剂量参芎化瘀胶囊组更为明显。结论: 参芎化瘀胶囊对脑缺血再灌注损伤有很好的治疗作用, 其机制与减轻脑损伤后脑组织超微结构损害有关。

[关键词] 脑缺血再灌注; 超微结构; 学习; 记忆; 参芎化瘀胶囊

[中图分类号] R 285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0138-04

Effect of Shenxiong Huayu Capsule on Ultrastructure of Brain Tissue and Learning-memory Function After Global Cerebral Ischemia Perfusion in Rats

ZHAO Ya-ning, LI Jian-min^{*}, AN Chao-wang, LI Shu-xing, CHENG Chang-xiang
(Northern China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

[Abstract] Objective: To investigate the therapeutic effects of Shenxiong Huayu Capsule on cerebral ischemia reperfusion and its underlying mechanism in rats. **Method:** Male Sprague-Dawley rats ($n = 48$) were divided randomly into four groups: sham group, model group, low dose of Shenxiong Huayu Capsule treatment group and high dose of Shenxiong Huayu Capsule treatment group. Global cerebral ischemia model was formed by improved four-vessel occlusion as described in the Pulsinelli's method. Changes in cerebral tissue morphology in hippocampal region were observed with light and electron microscopes 1d after operation. Learning and memory function (Morris water maze) were performed daily from 3d to 7d after injury. **Result:** Compared with the sham group, the neurons, axons and capillaries in the models were damaged, and the latency to find the platform was prolonged($P < 0.05$). Compared with the model group, the damage of brain tissue in the Capsule treated rats was decreased, latency to find the platform were shortened ($P < 0.05$). The above mentioned improvements were more significant in high dose of Shenxiong Huayu Capsule group. **Conclusion:** Shenxiong Huayu Capsule has good therapeutic effect on global ischemia-reperfusion injury and the mechanism is related to the attenuating of cerebral ultrastructure damage.

[Key words] cerebral ischemia-reperfusion; ultrastructure; learning; memory; Shenxiong Huayu Capsule

[收稿日期] 20100119(010)

[基金项目] 河北省科技厅课题(09276103D-3)

[作者简介] 赵雅宁, 硕士研究生, 讲师, 研究方向: 脑损伤与脑保护。

[通讯作者] * 李建民, Tel: (0315) 3725385

参芎化瘀胶囊 (Shenxiong Huayu Capsule) 具有养血益气、化瘀通络、疗伤定痛等功效。该研究在大鼠全脑缺血再灌注损伤模型上,应用不同剂量参芎化瘀胶囊进行干预,观察其对脑组织超微结构及学习记忆功能的影响,为临床应用提供理论基础。

1 材料

1.1 药物 参芎化瘀胶囊主要由人参、地鳖虫、川芎、乳香(制)、没药(制)、全蝎、紫河车、龙血竭、五味子、石菖蒲、郁金、桑椹子等多种中药组成的复方制剂,由华北煤炭医学院研制,批号 Z20051586。

1.2 动物 雄性 SD 大鼠,体重 250 ~300 g,购自中国医学科学院实验动物研究所,实验动物使用许可证编号 SCXK(京) 2005-0013。

1.3 仪器 透射电镜 H-7650 型,日本日立公司;水迷宫,淮北正华生物仪器设备有限公司;图像采集及图像分析系统,美国 Bio-Rad 生物仪器设备有限公司。

2 方法

2.1 动物分组和模型制作 48 只雄性 SD 大鼠随机分成假手术组、模型组、参芎化瘀胶囊高、低剂量组,各组动物 12 只,其中 5 只大鼠用于水迷宫检测。

采用改良的 Pulsineli 4 血管阻断(4-VO)法^[1-2]制作 SD 大鼠全脑缺血模型:动物常规麻醉,颈正中切口,分离双侧颈总动脉,在其下置线备用。枕后部正中切开,暴露双侧第一颈椎横突翼孔,直视下热凝其下通过的椎动脉,电凝每次时间约 2 ~4 s,使翼小孔后双侧椎动脉永久闭塞。术后大鼠缝皮回笼,24 h 以无创性微动脉夹夹闭双侧颈总动脉,缺血 30 min 后松开动脉夹,实行再灌注。缺血及再灌注期间用红外线测温仪监测耳内鼓膜温度,并使之维持在(37 ±0.2) 。假手术组分离暴露血管,但不电凝椎动脉、不夹闭颈总动脉。参芎化瘀胶囊于术前 7 d 每日 ig 1 次(低剂量 2.4 g·kg⁻¹,高剂量 4.8 g·kg⁻¹),连续给药 14 d,其余操作同模型组。

2.2 病理组织学检测 HE 染色:各组取 5 只动物,按规定时间以 0.4% 戊巴比妥钠麻醉动物,开胸、暴露心脏,4% 多聚甲醛行心脏灌流,断头取脑,在视交叉后 1 ~6 mm 处冠状面切开,取中间块入 4% 多聚甲醛固定液固定,石蜡包埋,切片(片厚 5 μm)。切片常规脱蜡至水,HE 染色。电镜:各组取 2 只动物,按规定时间动物常规麻醉,混合固定液(2.5% 戊二醛和 2% 多聚甲醛的磷酸缓冲液)心脏灌流,取海马,切成 1 mm ×1 mm ×1 mm 组织块,立即以 4% 戊二醛固定,

0.1 mol·L⁻¹ 二甲砷酸缓冲液冲洗两遍,再经 1% 四氧化锇固定,缓冲液冲洗,逐级丙酮脱水,环氧树脂浸透,包埋,超薄切片,醋酸铀枸橼酸铅双重染色。透射电镜观察脑组织超微结构的变化。

2.3 学习和记忆功能检测 伤后第 3 天按照 Smith 等^[3]的方法,采用 Morris 水迷宫进行检测,测至第 7 天,上午、下午各 1 次。隐藏平台获得实验:记录大鼠搜索安全岛潜伏期时间(单位: s)。空间探索试验:撤走平台,记录动物 60 s 内经过原平台位置次数。取检测记录的总均值。

2.4 统计学处理 应用 SPSS 统计分析软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行重复设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 病理检测结果 光镜:假手术组动物海马 CA1 区神经元结构完整,排列整齐致密,未见变性坏死的神经元;缺血再灌注组可见海马 CA1 区变性坏死神经元,表现为细胞间隙加大,细胞核浓缩、深染,溶解、消失,神经元密度均明显减少($P < 0.05$);参芎化瘀胶囊组海马 CA1 区存活神经元较缺血组明显增多,神经元大部分结构完整,神经元密度均明显增加,上述变化在高剂量组中更为明显($P < 0.05$,表 1)。

表 1 各组海马 CA1 区的神经元密度、
穿越原平台位置次数比较($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	神经元密度 个/切片	穿越原平台 位置次数
假手术	—	25.33 ± 4.27	8.20 ± 1.52
模型	—	7.15 ± 2.90 ¹⁾	2.58 ± 1.32 ¹⁾
参芎化瘀胶囊	2.4	12.93 ± 3.17 ²⁾	4.67 ± 1.11 ²⁾
	4.8	18.74 ± 4.21 ³⁾	6.08 ± 1.15 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与低剂量参芎化瘀胶囊组比较³⁾ $P < 0.05$ (下同)。

电镜:假手术对照组:神经元内可见正常细胞器,包括高尔基体、粗面内质网、多聚核糖体、线粒体、溶酶体等。神经细胞轴索、微管正常。轴索结构排列正常。血管内皮细胞结构正常。模型组:神经细胞不同程度固缩,胞质、胞核电子密度增高,核膜凹陷,高尔基体扩张呈大泡状,多聚核糖体解聚,高度肿胀、线粒体嵴断裂或空泡化,双膜结构模糊或外膜破裂、消失,细胞器稀疏。轴索排列紊乱、肿胀,髓鞘泡鼓、内折及分层,轴索变性、断裂等。血管内皮细胞肿胀,基膜松散、模糊甚至分离。参芎化瘀胶囊组:神经元的粗面内质网、多聚核糖体、线粒体基本

正常,轴突内微管、微丝保存良好;毛细血管内皮细胞轻度肿胀,基膜基本完整(图 1)。

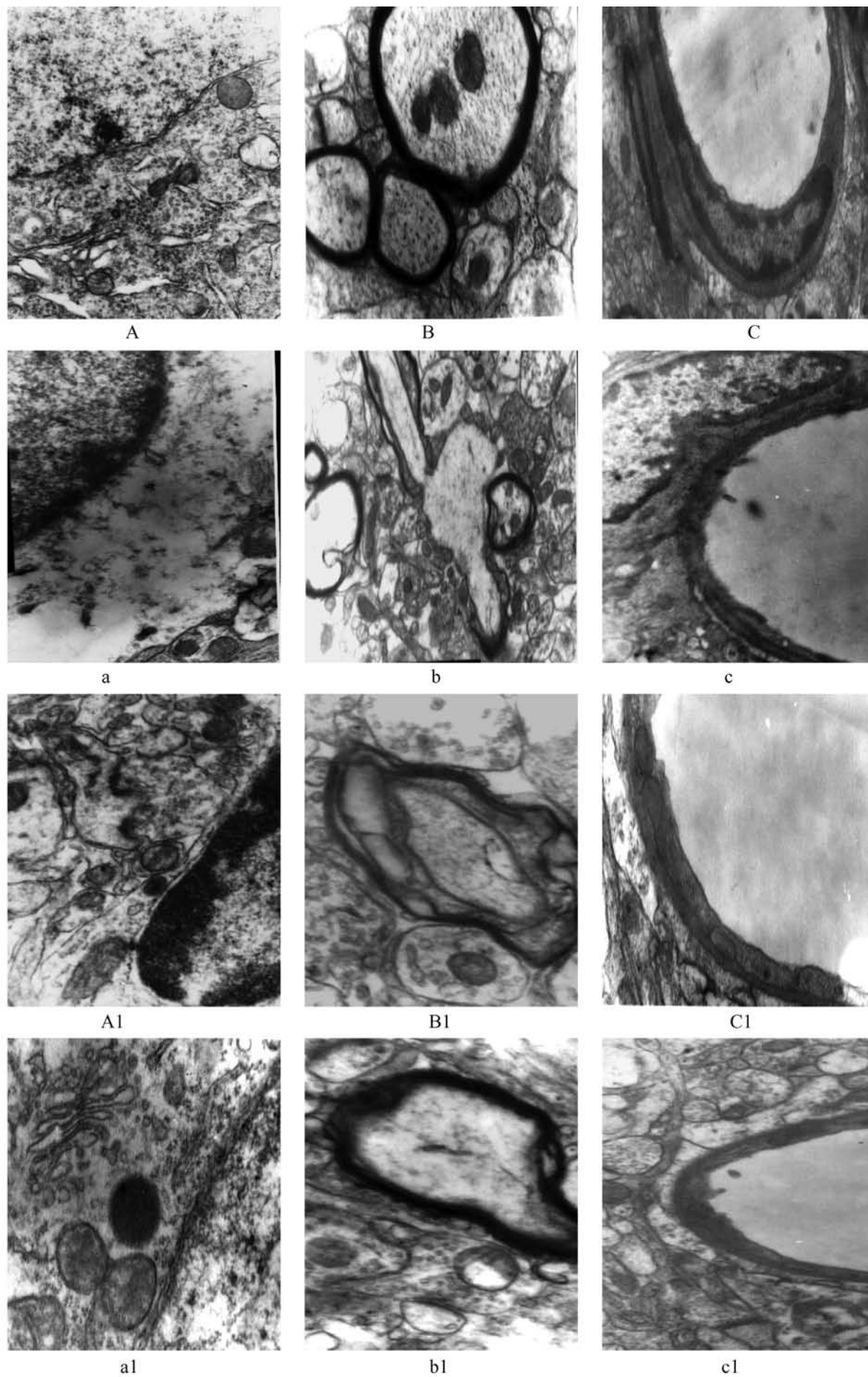


图 1 海马脑组织超微结构 ($\times 20\ 000$)

A, B, C. 假手术组神经元细胞器超微结构、神经细胞轴索结构、毛细血管内皮细胞结构正常。a, b, c. 模型组神经细胞核固缩,电子密度增高,核膜凹陷,细胞器稀疏;轴索髓鞘分层断裂;血管内皮模糊、分离。A1, B1, C1. $2.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 参芎化瘀胶囊组神经细胞核仍有固缩,电子密度增高,可见散在细胞器;轴索髓鞘泡鼓、分层无断裂;血管内皮松散。a1, b1, c1. $4.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 参芎化瘀胶囊组神经元细胞器超微结构、神经细胞轴索结构、毛细血管内皮细胞结构大致正常。

3.2 参芎化瘀胶囊对学习记忆功能的影响 经 Morris 水迷宫测试,与假手术组比较,模型组大鼠搜索安全岛潜伏期为明显延长、经过原平台位置次数减少

($P < 0.05$);参芎化瘀胶囊可缩短伤后 4 ~7 d 大鼠搜索安全岛潜伏期时间($P < 0.05$)、增加经过原平台位置次数($P < 0.05$),见表 1 ~2。

表 2 各组大鼠伤后 3 ~7 d 水迷宫搜索安全岛潜伏期 (均 ± s, n = 5)

组别	剂量 / g · kg ⁻¹	d ₃	d ₄	d ₅	d ₆	d ₇
对照	-	49.5 ± 7.5	32.7 ± 6.3	25.8 ± 6.5	24.8 ± 5.5	24.5 ± 5.2
模型	-	119.8 ± 25.0 ¹⁾	105.6 ± 24.5 ¹⁾	98.5 ± 21.8 ¹⁾	92.0 ± 19.5 ¹⁾	94.1 ± 18.9 ¹⁾
参芎化瘀胶囊	2.4	94.8 ± 22.8	65.20 ± 19.0 ²⁾	62.0 ± 16.7 ²⁾	59.5 ± 15.6 ²⁾	59.0 ± 14.9 ²⁾
	4.8	81.5 ± 20.7 ²⁾	55.4 ± 18.49 ³⁾	40.0 ± 12.3 ³⁾	32.2 ± 11.0 ³⁾	33.0 ± 10.8 ³⁾

4 讨论

该实验结果显示: 与模型组比较, 参芎化瘀胶囊组中海马组织超微结构包括神经元胞体、线粒体、轴索等都有很大程度的改善; 结合学习功能评分的综合效果来看, 参芎化瘀胶囊对缺血性脑卒中起到了良好的治疗效果。

中医认为缺血性脑卒中属“脑络瘀阻, 气血不行”, 益气活血为治疗中风根本法则。参芎化瘀胶囊具有养血益气、化瘀通络、疗伤定通等功效。近年来, 从分子生物学手段不断探索中药的药理作用。研究发现, 川芎和郁金提纯的生物碱川芎^[4]具有抑制白细胞浸润, 减轻缺血脑组织炎症反应; 由人参中提取的人参皂苷活性成分, 具有改善微循环, 抗自由基, 阻止钙离子内流和抑制炎症反应等多种作用^[5]。胡霞敏等^[6]测定缺血脑组织中与凋亡相关基因 Caspase-3, Bcl-2 的蛋白表达, 认为这与人参皂苷 Rg1 减弱 Caspase-3 表达, 增强 Bcl-2 表达有关。另外, 全蝎、地鳖虫与人参构成中成药通心络的重要成份, 全蝎与乳香还作为中成药脑心通的成分, 醒脑静里含有郁金, 益肾降浊汤里含有石菖蒲等, 以上这些中成药或者汤剂都对脑血管疾病起到很好的治疗和预防作用。参芎化瘀胶囊含有上述的各种中药单体, 我们推测其可能从多环节、多层面、多机制途径发挥对保护脑组织形态结构的保护作用, 从而改善

脑缺血再灌注损伤引发的认知功能障碍。作者从伤后脑组织超微结构和学习记忆功能变化角度阐述参芎化瘀胶囊的神经保护作用, 为参芎化瘀胶囊治疗缺血性脑病后的功能恢复提供药理学基础。

[参考文献]

- [1] Pulsineli W A, Brieley J B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat [J]. Stroke, 1979, 10 (3) : 267.
- [2] 徐叔云, 卞如镰, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1065.
- [3] Smith D H, Okiyama K, Thomas M J, et al. Evaluation of memory dysfunction following experimental brain injury using the Morris water maze [J]. Neurotrauma, 1991, 8 (4) : 259.
- [4] 钟瑜, 张众, 杨国汗. 川芎 对脑缺血再灌注损伤后细胞间黏附作用的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2003, 1 (5) : 257.
- [5] 吴晓燕. 人参总皂甙对大鼠缺血再灌注后神经元凋亡的保护及作用机制的研究 [J]. 神经疾病与精神卫生, 2005, 5 (5) : 347.
- [6] 胡霞敏, 严常开, 胡先敏. 人参皂苷 Rg₁ 对大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11 (2) : 192.

[责任编辑 聂淑琴]