

# 双根清脑颗粒对血管性痴呆模型大鼠行为学及血清超氧化物歧化酶、丙二醛、一氧化氮、一氧化氮合酶的影响

李辉, 吴颢昕\*, 岳晓杰, 郑鸿燕

(南京中医药大学基础医学院脑病研究所, 南京 210046)

[摘要] 目的: 观察双根清脑颗粒对血管性痴呆(VD)模型大鼠行为学, 血清中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)的影响, 探讨其干预VD的机制。方法: 采用栓子注入法制成VD大鼠模型, 给予双根清脑颗粒及脑复康 ig 15 d, Morris 水迷宫测定大鼠学习记忆能力, 检测血清中的 SOD, NOS 活性及 MDA, NO 的含量。结果: 与模型组比较, 双根清脑颗粒组大鼠逃避潜伏期和首次穿越平台的时间明显缩短( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 中、低剂量组及脑复康组 SOD 活性升高, MDA 含量降低 ( $P < 0.05$ ), 各用药组 SOD /MDA 的比值均升高( $P < 0.01$ )。各用药组血清 NO 含量降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 中、低剂量显著降低 NOS 活性( $P < 0.01$ )。结论: 双根清脑颗粒可显著改善 VD 模型大鼠的学习记忆能力, 提高血清 SOD 活力、降低血清 MDA, NO 的含量及 NOS 活性。

[关键词] 双根清脑颗粒; 血管性痴呆; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)07-0134-04

## Effects of Shuanggen Qingnao Granules on Animal Behavior and Superoxide Dismutase, Malondialdehyde, Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthase in Serum of the Rat Model of Vascular Dementia

LI Hui, WU Hao-xin\*, YUE Xiao-jie, ZHENG Hong-yan

(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

**[Abstract] Objective:** The purpose of this research is to explore the effects that Shuanggen Qingnao Granules towards vascular dementia(VD) by observing animal behavior and superoxide dismutase, malondialdehyde, nitric oxide and nitric oxide synthase levels in serum of VD rat model. **Method:** Vascular dementia (VD) rat models was made by injecting the same kinds of thrombotic emboli to the catheter of the external carotid artery. Morris water maze test is used for measuring the learning and memory ability. The photochemical reaction for contents of SOD in serum and MDA as well as NOS activity and nitratase method for NO levels were used. **Result:** The time for the rats taken Shuanggen Qingnao Granules to escape the latent period and to cross the platform for the first time was significantly shortened( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). SOD activity increased in medium and low-dose rehabilitation groups. And the MDA content decreased. The ratio of SOD and MDA (SOD/MDA) in the treated groups has all elevated( $P < 0.01$ ). Besides, the NO contents in the treated groups decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). And the NOS activity in the medium and low-dose groups increased( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Shuanggen Qingnao Granules can significantly improve the learning and memory ability of the rats with VD. It can also increase SOD activity. Meanwhile, it de-

[收稿日期] 20100128(002)

[基金项目] 江苏省自然科学基金资助项目(BK2007243)

[作者简介] 李辉, 硕士研究生, 中医师, 方向: 中医治则治法研究, 主要从事中医药对脑血管疾病的研究。E-mail: lihuaqing2007@sina.com. Tel: (025) 5811575

[通讯作者] \* 吴颢昕, 副教授, 博士, 研究方向: 中医脑病的治则与治法研究 Tel: (025) 5811575, E-mail: wuhaoxin@sohu.com

creases MDA and NO contents as well as NOS activity.

**[Key words]** Shuanggen Qingnao Granules; vascular dementia; superoxide dismutase; malondialdehyde; nitric oxide; nitric oxide synthase

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 是指由缺血性或出血性中风或缺血缺氧性脑损害导致的以智能或认知损害为特征的一个综合征<sup>[1]</sup>。主要以记忆、认知功能缺损为主,可伴有语言、运动、视空间技能及人格障碍等,是老年人多发病和疑难病。我们在临床运用具有清毒活血化痰功效的双根清脑煎剂治疗急性的 VD 取得了较好的治疗效果<sup>[2]</sup>。在临床研究基础之上,研制了双根清脑颗粒,并通过动物实验观察该方对 VD 模型大鼠行为学及血清中超氧化物歧化酶 (SOD)、一氧化氮合酶 (NOS)、丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO) 的影响,现将实验结果报告如下。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠 90 只,体重 250 ~ 300 g。由南京中医药大学实验动物中心提供,合格证号为 SCXK(沪) 2007-0005。

**1.2 药物与试剂** 双根清脑颗粒 (SG) 制备:由板蓝根、葛根、郁金、凌霄花、薏苡仁等组成,南京中医药大学海洋药物研究中心提供。脑复康片剂 (NFK),每片 0.4 g,批号 090101,南京金陵药业股份有限公司利民制药厂生产。SOD 试剂盒,批号 20090630;MDA 试剂盒,批号 20090619;NO 总测定试剂盒,批号 20090619;NOS 试剂盒,批号 20090630;均由南京建成生物工程研究所生产。

**1.3 仪器** Morris 水迷宫:淮北正华生物仪器设备有限公司提供;80-2 沉淀离心机:上海手术器械厂;紫外-可见分光光度计 UV-1100 SPECTYOPHOTO:上海美谱达仪器有限公司;精密分析电子天平:上海天平仪器厂;恒温水浴箱:上海跃进医疗器械厂。实验于南京中医药大学脑病研究所的动物实验室进行,室温 22 ~ 25 。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** 90 只大鼠适应性饲养 1 周,以 Morris 水迷宫实验筛选学习记忆良好的大鼠 70 只,随机分为 7 组,即双根清脑颗粒高剂量组 (36 g · kg<sup>-1</sup>),中剂量组 (12 g · kg<sup>-1</sup>),低剂量组 (4 g · kg<sup>-1</sup>),脑复康组 (0.108 g · kg<sup>-1</sup>),模型组,假手术组,正常组,每组 10 只。将双根清脑颗粒按高、中、低剂量分别配成含药量为 3, 1, 0.33 g · mL<sup>-1</sup> 的不同

溶液,脑复康配成 0.036 g · mL<sup>-1</sup> 的溶液。各组 ig 给药容积均为 1.2 mL/100 g,模型组和假手术组均用等量生理盐水 ig,各组大鼠每日 1 次,连续 15 d 为 1 个疗程。

**2.2 动物模型制作** 采用梅氏方法造模<sup>[3]</sup>,无菌状态下同种 SD 大鼠左心室内采血,37 温箱内干燥,研碎后 200 μm 筛孔过筛制成栓子,用时按栓子 1 mg 加生理盐水 0.3 mL 配制,摇匀成混悬液。0.4% 戊巴比妥钠 ip 麻醉大鼠 (40 mg · kg<sup>-1</sup>),颈正中切开皮肤,钝性分离右侧颈总动脉和颈外动脉,结扎颈外动脉远端,微动脉夹暂时夹闭颈总动脉,于颈外动脉远端切一小口,将连接注射器的中空细管逆行插至颈总动脉分叉处,在靠近已插入的细管处 1 ~ 0 缝线结扎,松开动脉夹,开放颈总动脉,注入混悬液 0.5 mL,使栓子通过颈内动脉进入颅内各动脉分支,堵塞微血管或大、中、小血管,造成多发性脑梗死,结扎颈外动脉近端,逐层缝合肌肉和皮肤,局部碘伏消毒。假手术对照组中空细管插到颈总动脉分叉处,注入 0.5 mL 生理盐水,余同模型组。正常组不作任何手术。

**2.3 学习记忆能力的测定** 造模后第 10 天开始进行 Morris 水迷宫行为学测试。Morris 水迷宫水池直径 150 cm,站台 (直径 × 高度): 12 cm × 30 cm,水池高度: 60 cm,分 4 个不同项限且有导航标,配备定时录制视频,平台及池底均为黑色。房间四周有隔音、隔光窗帘。测试时,将平台放于第 3 象限正中距池壁 20 cm 处,加水至平台高度后加入高于平台 1 cm 的牛奶液,温度 (24 ± 0.5) ,实验室温度保持 25 。训练期间环境安静,迷宫外参照物保持不变。

**2.3.1 定位航行试验** 测量大鼠对学习记忆的获取能力。实验历时 4 d,受试动物每日分别从 1, 2 两个象限入水点将大鼠头向池壁放入水中,依次进行训练,记录其逃避潜伏期 (从入水到找到安全平台后停留 5 s 为止的时间)。据相关文献研究雄性大鼠的空间学习记忆能力相对稳定<sup>[4]</sup>,在经过训练后如果 60 s 内找不到平台则在其后的时间找到平台的机率将低于 90%,因此采用了张爱林氏<sup>[5]</sup>的检测方法,即测试最初 2 d 为保证实验动物皆有可能找到

平台,将逃避潜伏期最长设为 90 s,超过 90 s 者以 90 s 计。后 2 d 的测试中将逃避潜伏期最长设为 60 s,超过 60 s 者以 60 s 计。利用上海移数信息科技有限公司的动物行为分析系统和 Morris 水迷宫视频分析系统进行图象和数据分析。

**2.3.2 空间搜索试验** 测量大鼠对平台空间位置记忆的保持能力。在实验第 5 日撤去平台,由第 1 象限入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录其首次穿越平台时间,超过 60 s 以 60 s 计。

**2.4 大鼠血清 SOD, MDA, NOS, NO 的测定** 各实验组大鼠于术后第 15 天治疗结束后以戊巴比妥钠按  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip 麻醉,左心室内取血 5 mL,置于肝素处理过的试管中,  $4 \times 2500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min,取上清液待测。检测步骤严格按试剂盒说明书操作。

**2.5 统计学方法** 所有计量资料均用  $\bar{x} \pm s$  表示,

$P < 0.05$  为差异有显著性,行为学数据采用重复测量设计的方差分析;生化指标采用单因素方差分析后进行多组间两两比较,由 spss16.0 软件完成。

### 3 结果

**3.1 实验动物数量分析** 参加实验大鼠 70 只,67 只进入统计。双根清脑颗粒组高剂量组有 1 只 Morris 水迷宫行为学测试时死亡,脑复康组有两只 ig 时死亡。

**3.2 双根清脑颗粒对 VD 大鼠学习记忆能力的影响** 重复测量设计的方差分析结果表明,各组间具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。定位航行试验中,模型组逃避潜伏期在第 2, 3, 4 日明显延长 ( $P < 0.05$ ),双根清脑颗粒各组逃避潜伏期明显减少 ( $P < 0.05$ )。空间搜索试验中,模型组首次穿越平台的时间明显增加 ( $P < 0.01$ );各用药组首次穿越平台的时间皆减少 ( $P < 0.05$ ),其中以低剂量组用时最少 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 双根清脑颗粒对 VD 模型大鼠定位航行和空间搜索时间的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | n  | 剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 逃避潜伏期        |                           |                           |                           | 首次穿越时间                    |
|-----|----|--------------------------------------|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|     |    |                                      | 第 1 d        | 第 2 d                     | 第 3 d                     | 第 4 d                     |                           |
| 正常  | 10 | —                                    | 57.2 ± 26.1  | 48.1 ± 29.8 <sup>1)</sup> | 42.4 ± 31.1 <sup>1)</sup> | 27.4 ± 16.1 <sup>1)</sup> | 10.8 ± 5.7 <sup>1)</sup>  |
| 假手术 | 10 | —                                    | 58.3 ± 27.8  | 50.7 ± 20.9 <sup>1)</sup> | 43.5 ± 20 <sup>1)</sup>   | 28.5 ± 15.3 <sup>1)</sup> | 7.3 ± 3.8 <sup>2)</sup>   |
| 模型  | 10 | —                                    | 75.1 ± 31.78 | 63.4 ± 24.7 <sup>3)</sup> | 54.2 ± 26.1 <sup>3)</sup> | 47.2 ± 18 <sup>3)</sup>   | 26.5 ± 16.7 <sup>3)</sup> |
| SG  | 9  | 36                                   | 71.6 ± 30.1  | 60.5 ± 32.7               | 43.9 ± 30.2 <sup>1)</sup> | 25.7 ± 14.6 <sup>1)</sup> | 12.8 ± 6.7 <sup>1)</sup>  |
|     |    | 12                                   | 57.5 ± 34.4  | 52.9 ± 27.6 <sup>1)</sup> | 42.7 ± 28.3 <sup>1)</sup> | 22.5 ± 12.4 <sup>1)</sup> | 11.8 ± 10.7 <sup>1)</sup> |
|     |    | 4                                    | 69.31 ± 19.6 | 56.7 ± 26.4               | 48.1 ± 26.9 <sup>1)</sup> | 29 ± 18.1 <sup>1)</sup>   | 7.1 ± 11.3 <sup>2)</sup>  |
| NFK | 8  | 0.432                                | 80.1 ± 25.6  | 60.53 ± 5.7               | 53.6 ± 32.7               | 37.3 ± 22.1               | 11 ± 10.1 <sup>1)</sup>   |

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与假手术组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ;与脑复康组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ (下同)

**3.3 双根清脑颗粒对 SOD, MDA 的影响** 实验结果显示,模型组大鼠血清 SOD 活性显著降低 ( $P < 0.01$ ),而 MDA 含量增高 ( $P < 0.05$ );双根清脑颗粒中、低剂量组血清 SOD 活性显著增高 ( $P <$

$0.05$ ),而 MDA 含量降低 ( $P < 0.05$ );双根清脑颗粒高剂量组无统计学意义 ( $P > 0.05$ );各用药组 SOD /MDA 的比值明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 双根清脑颗粒对 VD 模型大鼠血清 SOD 活性、MDA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | n  | 剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | SOD / $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ | MDA / $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ | SOD / MDA           |
|-----|----|--------------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------|
| 正常  | 10 | —                                    | 119.23 ± 14.62 <sup>2)</sup>          | 3.12 ± 2.56 <sup>1)</sup>                | 38.22 <sup>2)</sup> |
| 假手术 | 10 | —                                    | 116.79 ± 5.39 <sup>2)</sup>           | 3.36 ± 1.56 <sup>1)</sup>                | 34.76 <sup>2)</sup> |
| 模型  | 10 | —                                    | 92.35 ± 15.84 <sup>4)</sup>           | 5.53 ± 2.4 <sup>3)</sup>                 | 16.7 <sup>4)</sup>  |
| SG  | 9  | 36                                   | 100.30 ± 25                           | 4.64 ± 2.25                              | 21.62 <sup>1)</sup> |
|     |    | 12                                   | 114.39 ± 7.5 <sup>1)</sup>            | 3.34 ± 1.52 <sup>1)</sup>                | 34.25 <sup>2)</sup> |
|     |    | 4                                    | 110.92 ± 10.72 <sup>1)</sup>          | 3.56 ± 2.99 <sup>1)</sup>                | 31.16 <sup>2)</sup> |
| NFK | 8  | 0.432                                | 105.24 ± 8.9 <sup>1)</sup>            | 3.77 ± 1.55 <sup>1)</sup>                | 27.92 <sup>2)</sup> |

**3.4 双根清脑颗粒对 NO, NOS 的影响** 实验结果显示,模型组血清 NO 含量、NOS 活性明显升高 ( $P <$

$0.05$ );双根清脑颗粒高、中、低剂量组及脑复康组血清 NO 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),中、低剂

量组血清 NOS 活性明显降低 ( $P < 0.05$ ), 但高剂量组血清 NOS 活性无变化。与脑复康组相比, 双根清脑颗粒中、低剂量组血清 NOS 活性明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 双根清脑颗粒对 VD 模型大鼠血清 NO 含量、NOS 活性的影响 (均 ± s)

| 组别  | n  | 剂量 / g·kg <sup>-1</sup> | NO / μmol·L <sup>-1</sup>   | NOS / U                     |
|-----|----|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 正常  | 10 | —                       | 77.86 ±19.07 <sup>1)</sup>  | 23.89 ±6.83                 |
| 假手术 | 10 | —                       | 81.58 ±21.33 <sup>1)</sup>  | 25.88 ±7.08 <sup>1)</sup>   |
| 模型  | 10 | —                       | 100.37 ±23.58 <sup>3)</sup> | 35.7 ±13.51 <sup>3)</sup>   |
| SG  | 9  | 36                      | 79.55 ±18.59 <sup>1)</sup>  | 30.13 ±6.24                 |
|     | 10 | 12                      | 66.71 ±17.47 <sup>2)</sup>  | 23.88 ±7.08 <sup>1,4)</sup> |
|     | 10 | 4                       | 70.56 ±14.79 <sup>2)</sup>  | 25.61 ±8.46 <sup>1,4)</sup> |
| NFK | 8  | 0.432                   | 76.46 ±22.49 <sup>2)</sup>  | 32.14 ±5.45                 |

#### 4 讨论

Morris 水迷宫是英国心理学家 Morris 于 20 世纪 80 年代初设计并应用于检测实验动物学习记忆水平的重要工具。本次实验结果表明 VD 模型大鼠的逃避潜伏期与首次穿越平台的时间明显延长, 表明模型组大鼠学习记忆能力下降, 与模型组相比双根清脑颗粒组大鼠的逃避潜伏期与首次穿越平台的时间明显缩短, 充分说明双根清脑颗粒具有改善 VD 模型大鼠的学习记忆能力。

MDA 是脂质过氧化物的分解产物, 其含量反映了组织细胞损伤的程度, VD 发生后脑缺血缺氧, 引起细胞膜及细胞器发生脂质过氧化, 释放大量的自由基, 而导致 SOD 降低, 产生大量的 MDA, 从而对机体造成损伤。本次实验结果表明, VD 模型大鼠血清中 SOD 活性降低、MDA 含量显著升高, 双根清脑颗粒组血清(中、低剂量组)中 SOD 活性增高, MDA 含量降低。欧阳颀<sup>[6]</sup>认为 SOD /MDA 的比值才是反映生物体抗脂质过氧化潜在能力的一项重要指标, 双根清脑颗粒不同剂量组血清 SOD /MDA 的比值明显升高, 表明本方具有较强的抗氧化作用。

NO 是一种血管、神经活性物质, 在中枢神经系统中起信使和递质样作用, 且与学习和记忆有关, 但脑内 NO 的过量释放对神经元有毒性作用<sup>[7]</sup> NOS 是 NO 生物合成的关键因素, 其活性可间接反应 NO 的代谢状况。罗增刚<sup>[8]</sup>研究发现, VD 患者血浆 NO 含量、NOS 活性明显增强, 认为 NO 过量产生可能是老年 VD 患者记忆功能障碍的主要原因之一。本实验

结果亦表明 VD 模型大鼠血清中 NO 含量增高、NOS 活性增强, 与罗氏的研究结果一致。双根清脑颗粒组大鼠血清中的 NO 含量与 NOS 的活性均显著降低。双根清脑颗粒高剂量组对 NOS 的活性无影响可能与药量过大, 过于苦寒有关, 具体机理有待进一步研究。

双根清脑颗粒由板蓝根、葛根、郁金、凌霄花、薏苡仁等组成, 具有清毒活血化瘀之效。实验结果表明, 双根清脑颗粒中、低剂量组可提高 VD 模型大鼠血清中的 SOD 活性, 降低 MDA, NO 含量及 NOS 活性, 表明其有较好的清毒效果, 可能是其改善 VD 模型大鼠学习记忆能力的机制之一。双根清脑颗粒高剂量组虽然对血清 SOD, MDA 影响不明显, 但仍能升高 SOD/MDA 的比值, 亦反映其较强的抗脂质过氧化的能力。实验结果也表明双根清脑颗粒对 VD 模型急性期的治疗优于脑复康。

#### [参考文献]

[1] 田金洲, 韩明向, 涂晋文, 等. 血管性痴呆诊断、辨证及疗效评定标准(研究用) [J]. 中国老年杂志, 2002, 22 (5): 329.

[2] 于艳秋, 吴颖昕. 清毒活血化瘀方治疗急性血管性痴呆临床疗效观察 [J]. 中国基层医药, 2006, 13 (9): 1469.

[3] 梅建勋, 张云岭, 张伯礼. 多发梗塞性痴呆大鼠模型改进与应用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20 (3): 113.

[4] 范小兰, 王玮, 赵小贞. 年龄、性别因素对大鼠 Morris 水迷宫测试成绩的影响 [J]. 福建医科大学学报, 2003, 37(1): 53.

[5] 张爱林, 徐秋萍, 孙建宁, 等. 多发性脑梗死痴呆大鼠行为学和生化学改变及 CO-GBE 的保护作用 [J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(6): 531.

[6] 欧阳颀, 李忠仁, 穆艳云, 等. 针刺对大鼠学习记忆的促进作用与其抗氧化作用的关系 [J]. 南京中医药大学学报, 2002, 18 (2): 110.

[7] Eliasson M J, Huang Z, Ferrante R J, et al. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage [J]. Neurosci, 1999, 19(14): 5910.

[8] 罗增刚, 周文泉, 高普, 等. 仙龙胶囊治疗血管性痴呆的临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(8): 565.

[责任编辑 聂淑琴]