

天智颗粒对慢性脑缺血大鼠神经元 特异性烯醇化酶表达的影响

付国惠, 张保朝*, 陈烈冉

(河南省南阳市中心医院神经内科, 河南 南阳 473009)

[摘要] 目的: 研究天智颗粒对慢性脑缺血模型大鼠学习记忆能力和神经元特异性烯醇化酶(NSE)表达的影响。方法: 采用双侧颈总动脉结扎方法建立慢性脑缺血模型, 造模后 60 d, 采用三等分 Y 型电迷宫测定大鼠学习记忆能力, 剔除不符合标准的动物。用天智颗粒($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 治疗 30d 后采用三等分 Y 型电迷宫和免疫组化方法, 观察比较各组大鼠行为学和 NSE 表达的差异。结果: 治疗 30d 后, 与模型组相比, 治疗组学习记忆能力显著增加($P < 0.01$), 假手术组和对照组大鼠皮质神经元无明显 NSE 表达, 模型组 NSE 表达明显, 天智颗粒治疗组 NSE 表达较模型组减弱, $P < 0.01$ 。结论: 天智颗粒可以减弱慢性脑缺血诱发的 NSE 表达, 这是天智颗粒治疗血管性痴呆和慢性脑缺血的一种可能机制。

[关键词] 慢性脑缺血; 血管性痴呆; 神经元特异性烯醇化酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)08-0071-03

天智颗粒是治疗血管性痴呆和慢性脑缺血的中成药, 在临床实践中显示出良好的效果^[1], 但其作用机制尚不完全清楚。神经元特异性烯醇化酶(NSE)是反映神经元受损的重要标志物, 既往的研究多局限在大脑的急性损伤方面。本实验通过建立大鼠慢

性脑缺血模型, 研究 NSE 的表达及天智颗粒对其表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性 SD 大鼠, 14~ 15 月龄, 体质量 500 ~ 600 g, 由郑州大学实验动物中心提供。NSE 一抗、SP 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。天智颗粒组方: 天麻 10 g, 钩藤 12 g(后下), 石决明 18 g(先煎), 栀子 9 g, 黄芩

9 g, 川牛膝 12 g, 杜仲 9 g, 益母草 9 g, 桑寄生 9 g, 首乌藤 9 g, 茯神 9 g。

1.2 动物模型的制作 参照 Ni^[2] 等的方法制作慢性脑缺血动物模型。大鼠术前禁食 12 h, 禁水 4 h 后, 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100 g⁻¹) ip 麻醉, 保证手术期间有自主呼吸。仰卧固定, 颈前部去毛消毒后正中切开, 分离出双侧颈总动脉。双重丝线结扎后剪断血管, 间断缝合皮肤。术后动物继续常规饲养。假手术组除不结扎双侧颈总动脉外, 余处理同模型组和治疗组大鼠。

1.3 分组和给药方法 实验动物随机分为假手术组、正常对照组、模型组和天智治疗组, 术后 60d 对大鼠进行 ig 处理: 治疗组用天智颗粒按 5 g·kg⁻¹ 的比例溶解于 5 mL 蒸馏水中灌胃, 模型组和假手术组用同体积的蒸馏水代替, 1 次/d, 共 30 d。最终各组大鼠均入组 12 只。

1.4 免疫组化染色

1.4.1 灌注和切片 用 10% 水合氯醛 (3 mL·kg⁻¹) ip 麻醉动物, 暴露心脏, 先约 500 mL 生理盐水 (37℃) 经升主动脉灌注冲洗, 然后灌注 4% 多聚甲醛溶液 (4℃, pH 7.14) 500 mL。取出脑组织块, 切取视交叉到小脑前的冠状位切片, 其中包含海马, 经 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 后石蜡包埋, 作 4~6 μm 厚切片备用。

1.4.2 免疫组化染色步骤 石蜡切片, 常规脱蜡、水化。3% H₂O₂ 封闭, 抗原热修复 20 min, 滴加正常羊血清封闭 20 min, 倾去, 勿洗。滴加稀释一抗 (稀释浓度均为 1:100) 4℃ 过夜, 滴加生物素化工作液 30 min, 滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液 30 min, 以上每步骤后均用 PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。DAB 显色: 镜下控制反应时间, NSE 阳性细胞均为胞浆内出现棕黄色颗粒 (以胞浆出现为主, 强阳性时胞核也出现棕黄色颗粒)。自来水充分冲洗, 苏木精复染, 盐酸酒精分化, 封片。

1.4.3 定量分析计数方法 在皮质区, 选择 3 个相邻视野, 在 200 倍光镜下随机查 100 个神经元中的阳性细胞数, 结果取 3 个视野的平均值。

1.5 学习记忆测试方法 大鼠学习记忆用三等分 Y 型迷宫箱进行测试。大鼠学习记忆成绩分别以其测试达到连续 10 次中有 9 次 (9/10) 正确反应时所需的电击次数表示。达 9/10 正确反应时所需电击次数多少表示大鼠认知功能的优劣。

1.6 统计学处理 实验数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组均数比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 大鼠行为学习记忆测试结果 对照组和假手术组比行为记忆测试差异无统计学意义, 归为一组讨论。模型组和对照组相比, 其行为记忆测试结果明显下降 (*P* < 0.01), 说明模型制作是成功的。天智颗粒治疗组大鼠与模型组相比其行为记忆测试有所好转 (*P* < 0.01), 但与对照组相比其行为记忆测试结果仍有统计学差别 (*P* < 0.01), 说明治疗组行为学虽有所好转但仍未达正常。结果见表 1。

2.2 大鼠前脑皮质区域 NSE 阳性神经元计数 光学显微镜下观察, 正常对照组和假手术组皮质区神经元无明显 NSE 表达, 见图 1; 模型组皮质神经元 NSE 阳性计数明显增多, 见图 2; 天智颗粒治疗组 NSE 阳性神经元较模型组显著减少, 染色较浅, 但仍较对照组和假手术组为多, 见图 3。结果数据见表 1。

表 1 大鼠行为学习记忆测试结果和前脑皮质区域 NSE 阳性神经元计数 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	电击次数	NSE 细胞数
正常对照组	-	7.15 ± 0.23	3.10 ± 0.42
假手术组	-	7.66 ± 0.72	3.24 ± 0.38
模型组	-	15.23 ± 0.65 ²⁾	40.75 ± 0.55 ²⁾
天智颗粒组	5	10.86 ± 0.79 ^{1,2)}	18.38 ± 0.82 ^{1,2)}

注: 与模型组比较¹⁾ *P* < 0.01, 与假手术组比较²⁾ *P* < 0.01

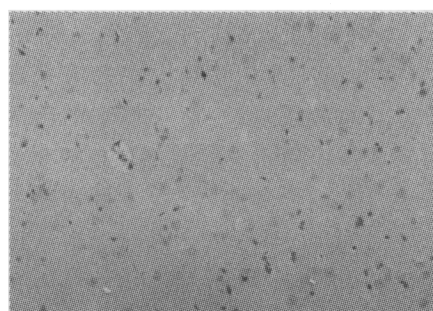


图 1 正常对照组皮质神经元无明显 NSE 表达 (×200)

3 讨论

神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 普遍存在于生物体内的糖酵解代谢中, 催化 α 磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸, 烯醇化酶同工酶均为胞浆二聚体酶, 由免疫性质不同的 αβγ 3 种亚基组成。现已发现 5 种烯醇化酶同工酶 αα, ββ, γγ, αβ 和 αγ, 均存在于细

胞浆中,只有 $\gamma\gamma$ 型特异性地存在于神经元和神经内

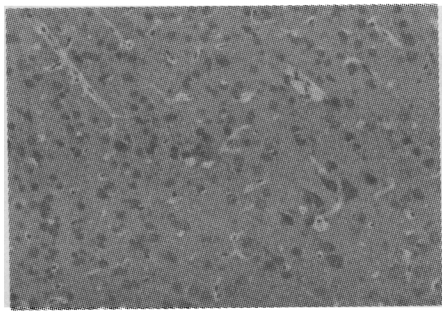


图 2 模型组皮质神经元 NSE 表达明显,染色较深($\times 200$)

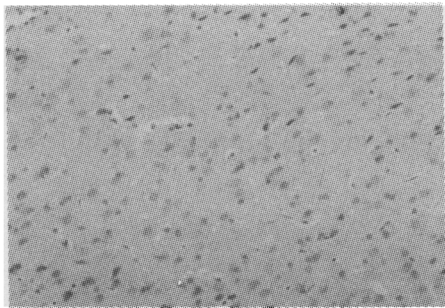


图 3 天智颗粒治疗组皮质神经元有零星 NSE 表达,但较模型组已明显减弱($\times 200$)

分泌细胞,被命名为神经元特异性烯醇化酶,其含量由高到低依次为脑、脊髓、周围神经节^[3],是参与神经元糖酵解代谢通路的重要酶。

既往多数研究发现:急性脑损伤如脑梗死、癫痫持续状态后,血清和脑脊液 NSE 呈一过性或双高峰样增高表达,反映了神经元经历的原发和继发的如脑水肿等引起的神经元代谢通路变化的过程,是神经元受损的较敏感蛋白标志物^[4]。Tsuchiya 等证实大鼠持久性双侧颈总动脉结扎后 2.5 h 局部(包括皮层、海马和其他 15 个区域)脑血流量减少了 25%~87%,并且 1 周后仍显著降低^[5]。Tanaka 等研究发现术后 6 周额叶皮层 rCBF 较对照组减低 49%^[6]。

由此可见模型造成的脑血流灌注不足的结果是确切的。本实验的结果也证明了这一点:在模型建立后 90d,模型组标本 NSE 仍有中等程度的阳性表达,而对照组则无明显表达,反映了该模型脑组织缺血发生的持续性。

天智颗粒可以减弱慢性缺血诱发的 NSE 表达,反映了神经元在缺血状态下代谢通路变化得到一定程度的调整,这可能是天智颗粒治疗血管性痴呆和慢性脑缺血的一种可能机制,但天智颗粒中何种成分起重要作用尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 杜贵友,朱新成,赵建军,等. 天智颗粒治疗老年血管性痴呆临床观察[J]. 中国中药杂志 2003, 28(1): 73-77.
- [2] Ni J, Ohta H, Matsumoto K, et al. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats [J]. Brain Res, 1994, 653: 231-236.
- [3] Barone FC, Clark RK, Price WJ, et al. Neuron specific enolase increases in cerebral and systemic circulation following focal ischemia [J]. Brain Res, 1993, 623: 77.
- [4] Missler U, Wieamann M, Friedrich C, et al. S-100 protein and neuron specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke [J]. Stroke, 1997, 28: 1956-1960.
- [5] Tsuchiya M, Sako K, Yura S, et al. Local cerebral glucose utilization following acute and chronic bilateral carotid artery ligation in Wistar rats: Relation to changes in local cerebral blood flow [J]. Exp Brain Res, 1993, 95(1): 1-7.
- [6] Tanaka K, Ogawa N, Masato A, et al. Relationship between cholinergic dysfunction and discrimination learning disabilities in Wistar rats following chronic cerebral hypoperfusion [J]. Brain Research, 1996, 729(1): 55-65.