

智脑胶囊对血管性痴呆模型大鼠学习记忆及脑组织 Ca^{2+} 含量的影响

杨文明*, 王时光, 鲍远程, 杨兴涛, 张 波, 汪美霞, 董 婷
(安徽中医学院第一附属医院, 安徽 合肥 230031)

[摘要] 目的: 探讨智脑胶囊对血管性痴呆大鼠学习记忆及脑组织 Ca^{2+} 含量的影响。方法: 反复夹闭双侧颈总动脉 (CCA) 结合腹腔注射硝普钠降低血压制备血管性痴呆大鼠模型, 检测大鼠学习记忆能力及脑组织中 Ca^{2+} 含量。结果: 血管性痴呆模型组大鼠学习记忆明显障碍, 脑组织中 Ca^{2+} 浓度明显升高。与模型组相比, 智脑胶囊 3 剂量组、尼莫地平组及脑复康组能够明显减少血管性痴呆模型大鼠脑组织中 Ca^{2+} 含量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。智脑胶囊高剂量与智脑胶囊低、中剂量组比较能明显降低模型大鼠脑组织 Ca^{2+} 含量, 且有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 智脑胶囊可改善实验性血管性痴呆大鼠学习记忆能力, 其机制与降低模型大鼠脑组织 Ca^{2+} 含量有关。

[关键词] 血管性痴呆; 智脑胶囊; 学习记忆; 钙离子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)12-0034-04

The Effect of Zhinao Capsule on Learning-memory Ability and the Content of Ca^{2+} in Brain Tissue of Rats with Vascular Dementia

YANG Wen-ming*, WANG Shi-guang, BAO Yuan-cheng, YANG Xing-tao, ZHANG Bo, WANG Mei-xia, DONG Ting
(1st Affiliated Hospital of Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Zhinao Capsule on behavior and the content of Ca^{2+} in brain tissue of rats with vascular dementia. **Methods:** After intraperitoneal injection of low dose of sodium nitroprusside, animal models of vascular dementia were established by clamping common carotid arteries repeatedly. Their learning and memory ability and the content of Ca^{2+} in brain tissue of rats were detected. **Results:** The learning and memory ability had been reduced obviously in the model group of rats with vascular dementia, and the content of Ca^{2+} in brain tissue had been increased. Compared with model group, three kinds of Zhinao Capsule treated group, nimodipine treated group and piracetam treated group could significantly decrease the content of Ca^{2+} in brain tissue of rats with vascular dementia ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The content of Ca^{2+} in brain tissue of rats with vascular dementia could decrease more in high dose of Zhinao capsule treated group than in other two groups ($P < 0.05$). **Conclusions:** Zhinao Capsule could improve the learning and memory in rats with vascular dementia, which may be related to decreasing the content of Ca^{2+} in brain tissue of rats.

[Key words] vascular dementia; Zhinao Capsule; learning-memory ability; Ca^{2+}

[收稿日期] 2007-05-08

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金(99JLZC138); 安徽省人才开发基金(20032026); 安徽省优秀青年科技基金(科金 200203)

[通讯作者] * 杨文明, Tel: (0551) 2838522; E-mail: yangwenming8810@sina.com

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是由一系列脑血管因素(缺血或出血及急慢性缺氧性脑血管病)导致脑组织损害而引起的获得性智能损害综合征,以记忆、认知功能缺损为主。患病率在0.9%~3.0%之间,约占所有痴呆的10%~50%,约25%的脑血管患者伴有不同程度的智能障碍^[1]。目前,VD已成为老年医学领域中研究的重要课题。智脑胶囊由党参、黄精、川芎、石菖蒲等药组成。本文采用反复夹闭双侧颈总动脉结合腹腔注射硝普钠降低血压来制备血管性痴呆大鼠模型,观察了智脑胶囊对模型大鼠行为学指标及脑组织Ca²⁺含量的影响,探讨该方治疗VD的作用机制。

1 实验材料

1.1 动物 雄性健康Wistar大鼠,清洁级,体重350g左右,(10~12)月龄,由安徽全椒实验动物中心提供。

1.2 药物 智脑胶囊(由党参、黄精、川芎、石菖蒲等药组成,每粒含生药量0.5g,4粒/d,日服3次),由安徽中医学院第一附属医院药剂科提供。硝普钠,北京双鹤现代医药技术有限公司,批号:040706。尼莫地平片,山西亚宝药业集团有限公司,批号:040418。脑复康,南京白敬宇制药有限责任公司,批号:050408。

1.3 主要试剂 考马斯亮兰试剂盒、Ca²⁺试剂盒,均由南京建成生物工程研究所提供,批号分别为:20050828,20050830。

1.4 主要仪器 DMS-2 Morris水迷宫,中国医学科学院药物研究所;UV-755B型紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;FSH-2型组织捣碎匀浆机,金坛市金城国盛实验仪器厂;800离心机,金坛荣华仪器制造有限公司;TGL-16G冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;FA2004型电子天平,上海天平仪器厂生产。

2 实验方法

2.1 血管性痴呆大鼠的造模方法^[2] 用10%水合氯醛(350mg·kg⁻¹)ip麻醉,保证手术期间有自主呼吸。待翻正反射消失后,仰卧固定在手术台上,常规消毒,颈正中切口,分离出双侧颈总动脉(CCA),套“4”号丝线扣备用。拉紧丝扣,在夹闭双侧CCA之前,ip硝普钠(2.5mg·kg⁻¹),随即夹闭双侧CCA,10min后,再通10min,再夹闭10min,再通后缝合伤口,放回笼中保温饲养。假手术组动物仅行颈前切

开,不阻断CCA,不注射硝普钠。术中大鼠肛温保持在36.5℃~37.5℃。正常对照组不作任何处理。造模术后3d,随机选取存活的模型大鼠10只与正常组、假手术组进行学习记忆成绩比较,并随机取2只模型大鼠做病理形态学观察判断造模是否成功。

2.2 试验分组与给药 选择造模成功存活的大鼠随机分为模型组、脑复康组(0.6g·kg⁻¹)、尼莫地平组(0.04g·kg⁻¹)、智脑胶囊12.5、25和50g·kg⁻¹组(分别称为智脑低、中、高3组),另外加上正常对照组、假手术组,共8组,每组10只。造模后第4d开始灌胃给药,正常对照组、假手术组、模型组予等容积生理盐水,每日1次,连续灌胃15d。

2.3 检测指标及方法

2.3.1 学习记忆指标(水迷路法) 水迷宫由圆形水池、无色平台和记录系统3部分组成。水池直径(120×50×30)cm;水池内壁涂成乳白色,水温保持在22℃~26℃;水池放在1间小屋的中央。池壁上随意挂两个物体作为近距离视觉暗示,室内的门、窗、柜组、摄像头等构成远距离视觉暗示。水池内放入1kg奶粉,使水浑浊;平台由透明的有机玻璃做成,圆形,(5×28)cm,没于水下2cm,上面有几个小孔以提供一个大鼠容易站稳的表面。水迷宫测试包括连续5d的定位航行试验(place test)和一次空间探索试验(spatial probe test)。

2.3.2 定位航行试验(place navigation) 试验前1d将大鼠放入水池中(不放入平台)自由游泳2min,使其熟悉迷宫内的环境。试验历时5d,每天分上、下午两个时间段,每个时间段测试4次,每天共8次。测试开始时,将平台放在近端的象限中点,平台隐藏于水面下1cm,沿水池的4个象限中部的池壁将大鼠面向池壁轻巧地放入水池,自动摄像系统记录大鼠寻找平台的时间(逃避潜伏期)和游泳途径(过程),电脑自动记录上述数据;设定120s为最长逃避潜伏期,120s后自动停止记录。如果大鼠在120s内找到平台,记录其实际逃避潜伏期;如果在120s未找到平台,由实验者将其引上平台并停留10s,逃避潜伏期记为120s。

2.3.3 空间探索试验 第6d撤除平台,让大鼠自原平台对侧象限盆壁的中点入水自由游泳120s,记录其游泳轨迹,测量平均游泳距离和跨平台次数。

2.3.4 实验性VD模型大鼠脑组织中Ca²⁺含量测定 用药15d后,动物断头处死,冰盘上快速剖取

脑组织,准确称量左侧皮层脑组织 1 g,按组织重量体积比为 1:9 加预冷的生理盐水制成 10% 的组织匀浆,4℃ 3 000 r·min⁻¹,离心 10 min,取上清液,用考马斯亮兰试剂盒测定组织蛋白含量,再分别采用甲基

百里香酚蓝结合比色分析法测定 Ca²⁺ 含量。

3 实验结果

3.1 智脑胶囊对实验性 VD 模型大鼠定位航行试验逃避潜伏期的影响 结果见表 1, 2。

表 1 智脑胶囊对实验性 VD 模型大鼠定位航行试验逃避潜伏期的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	逃避潜伏期(s)					
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
正常组	—	57.43 ± 5.82	46.21 ± 7.73 ¹⁾	41.24 ± 12.26 ¹⁾	31.42 ± 8.36 ²⁾	23.21 ± 24.43 ²⁾	18.12 ± 25.15 ²⁾
手术组	—	58.12 ± 5.45	47.12 ± 6.35 ¹⁾	41.27 ± 9.65 ¹⁾	33.24 ± 9.63 ²⁾	23.34 ± 9.67 ²⁾	21.13 ± 6.76 ²⁾
模型组	—	58.24 ± 6.15	57.26 ± 4.47	53.62 ± 10.13	52.52 ± 7.24	51.46 ± 9.35	50.53 ± 10.15
脑复康组	0.6	58.13 ± 6.41	54.32 ± 8.67	43.31 ± 9.45	39.21 ± 9.34 ¹⁾	36.56 ± 7.53 ¹⁾	30.42 ± 4.46 ¹⁾
尼莫地平组	0.04	59.02 ± 6.36	53.27 ± 8.57	44.32 ± 9.71 ¹⁾	38.35 ± 9.18 ¹⁾	36.42 ± 7.45 ¹⁾	29.15 ± 4.83 ¹⁾
智脑低组	12.5	57.93 ± 7.05	54.51 ± 8.38	48.16 ± 8.81	47.24 ± 7.68	45.68 ± 8.71	42.31 ± 4.56
智脑中组	25.0	58.27 ± 6.31	53.56 ± 6.07	40.24 ± 5.72 ^{1,3)}	34.56 ± 6.36 ^{1,3)}	28.14 ± 6.52 ^{1,3)}	25.42 ± 5.61 ^{1,3)}
智脑高组	50.0	58.42 ± 6.26	52.54 ± 4.59	40.72 ± 8.56 ^{1,3)}	33.34 ± 7.24 ^{1,3)}	28.56 ± 6.52 ^{1,3)}	24.37 ± 4.68 ^{1,3)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ (下同)

表 2 智脑胶囊对实验性 VD 模型大鼠定位航行试验第 6 天的平均游泳距离及跨平台次数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	平均游泳距离 (cm)	跨平台次数(次)
正常组	—	602.41 ± 375.62 ²⁾	7.12 ± 2.23 ²⁾
假手术组	—	604.37 ± 414.52 ²⁾	7.25 ± 5.57 ²⁾
模型组	—	969.13 ± 463.18	2.31 ± 1.12
脑复康组	0.6	761.43 ± 467.42 ¹⁾	4.87 ± 1.78 ¹⁾
尼莫地平组	0.04	765.57 ± 478.23 ¹⁾	4.79 ± 1.53 ¹⁾
智脑低组	12.5	823.45 ± 435.26 ¹⁾	2.43 ± 1.15
智脑中组	25.0	735.46 ± 375.31 ^{2,3)}	5.49 ± 1.59 ^{2,3)}
智脑高组	50.0	732.31 ± 383.52 ^{2,3)}	5.56 ± 1.97 ^{2,3)}

表 1 可见:随着训练次数的增加,各组大鼠平均逃避潜伏期均有所减少;但模型组变化不明显。与正常组比较,假手术组大鼠潜伏期时间两组间无显著性差异,提示手术对本实验结果无影响。与正常组比较,模型组大鼠潜伏期时间显著延长,以训练后第 3~6 天最为显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),显示模型组大鼠存在记忆能力下降。与模型组相比,智脑胶囊高、中剂量组、脑复康组、尼莫地平组潜伏期时间随训练时间的后延而缩短,以第 3 天以后更为明显($P < 0.05$),而智脑胶囊低剂量组潜伏期时间虽有缩短,但与模型组比较无显著性差异($P > 0.05$);智脑胶囊高、中剂量组、脑复康组、尼莫地平组均能减少模型大鼠潜伏期时间($P < 0.05$);智脑胶囊高、中剂量组与脑复康组比较,在潜伏期、平均游泳距离减

少方面无显著性差异($P > 0.05$),智脑胶囊高、中剂量组潜伏期时间、平均游泳距离减少与智脑胶囊低剂量组比较有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 可见:在第 6 天撤除安全平台的空间探索实验中,正常组与假手术组在平均游泳距离和跨平台次数指标间比较无统计学差异,表明手术对本实验结果无影响。与模型组比较,脑复康组、尼莫地平组、智脑胶囊 3 剂量组均可减少模型组大鼠平均游泳距离,增加跨平台次数,除智脑胶囊低剂量组跨平台次数无统计学差异外,余均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);智脑胶囊高、中剂量组与智脑胶囊低剂量组比较亦有统计学意义($P < 0.05$);但脑复康组、尼莫地平组、智脑胶囊高、中剂量组 3 组之间比较无统计学意义($P > 0.05$)。

3.2 智脑胶囊对实验性 VD 模型大鼠脑组织 Ca²⁺ 含量测定 结果见表 3。与正常组相比,假手术组 VD 模型大鼠脑组织 Ca²⁺ 含量两组间无显著性差异,提示手术对本实验结果无影响;正常组相比,模型组大鼠脑组织 Ca²⁺ 浓度明显升高($P < 0.01$),提示模型大鼠由于反复缺血再灌注使脑组织 Ca²⁺ 含量显著增多。智脑胶囊 3 剂量组能够明显减少 VD 模型大鼠脑组织中 Ca²⁺ 含量,脑复康组、尼莫地平组也有明显降低模型大鼠脑组织 Ca²⁺ 含量的作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。智脑胶囊高剂量组与尼莫地平组药效相当。

表 3 智脑胶囊对 VD 模型大鼠脑组织 Ca^{2+} 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Ca^{2+} (mmol/gprot)
正常组	—	$0.14 \pm 0.04^{2)}$
假手术组	—	$0.16 \pm 0.08^{2)}$
模型组	—	0.38 ± 0.10
脑复康组	0.6	$0.23 \pm 0.13^{1)}$
尼莫地平组	0.04	$0.16 \pm 0.05^{2)}$
智脑低组	12.5	$0.25 \pm 0.1^{1,4)}$
智脑中组	25	$0.22 \pm 0.04^{2,4)}$
智脑高组	50	$0.17 \pm 0.04^{2,3)}$

注:与尼莫地平组比较⁴⁾ $P < 0.05$

4 讨论

血管性痴呆的发病机制与多种因素有关,其中脑细胞内钙超载是其发病的重要机制。当脑组织缺氧时大量 Ca^{2+} 聚集于线粒体,干扰氧化磷酸化过程,引起能量代谢障碍。胞膜泵功能进一步降低,胞浆及线粒体内钙积聚更甚;加重线粒体结构功能损害,从而使能量生成减少,这一“恶性循环”更加重线粒体损害;脑缺血期就存在的磷脂酶对膜脂质的失控性的降解以及再灌注后的自动氧化产生过量自由基参与的膜脂质过氧化过程^[4],进一步使细胞膜的流动性、通透性均发生变化,并最终引起细胞死亡; Ca^{2+} 激活的中性蛋白酶活性增加,使神经细胞骨架破坏,影响轴浆正常运输; Ca^{2+} 超载破坏了 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性,增加了膜对其他离子的通透性,使缺血脑组织中电解质平衡紊乱更加严重,导致渗透压升高,产生细胞毒性脑水肿^[5]:脑缺血时,脑血管平滑肌、内皮细胞均有明显的 Ca^{2+} 内流增加,前者可致血管收缩、痉挛,形成微血栓,进一步加重脑缺血,尤其是对梗死灶周围缺血半暗带内的侧支循环;后者可致内皮细胞收缩,内皮间隙扩大,血脑屏障开放,产生血管源性脑水肿^[6];脑缺血后,脑内大量释放兴奋性氨基酸(EAAs),可激活 NMDA 受体,使其调控 Ca^{2+} 通道开放,胞外 Ca^{2+} 大量内流。此外,脑缺血后在缺血易损海马 CA_1 区的 NMDA 大量释放,通过 NMDA 受体介导引起细胞钙通道开放,大量钙进入细胞内,可以引起活性氧自由基产生和 NO 产生^[7],而活性氧自由基又可引起细胞膜对 Ca^{2+} 的进出调控紊乱,加重钙超载,形成恶性循环^[8]。同时脑钙水平变化与认知功能障碍有密切关系。在动物实验中

发现,海马、皮层、间脑轴突体内游离钙浓度升高,海马脑区轴突体内游离钙超载极为显著,认为“钙堆积”很可能是记忆障碍的物质基础^[9]。 Ca^{2+} 超载被认为是神经元细胞死亡的最后途径。

本实验模型组与正常组和假手术组相比,模型大鼠脑组织内 Ca^{2+} 浓度明显升高,说明缺血再灌注后,神经细胞内钙离子内流过多,存在明显钙超载。智脑胶囊各剂量组能显著降低模型大鼠脑组织 Ca^{2+} 浓度。智脑胶囊高剂量组可抑制缺血再灌注脑损伤后脑组织中 Ca^{2+} 浓度升高,减轻神经细胞内 Ca^{2+} 负荷,效果优于智脑胶囊低、中剂量组,与尼莫地平组药效相当。显示出智脑胶囊通过阻止过多的 Ca^{2+} 流入细胞内,同时促进胞内 Ca^{2+} 外排,使 Ca^{2+} 浓度降低,从而达到改善了 VD 模型大鼠学习与记忆成绩,进而改善智能的目的。

[参考文献]

- [1] Desmond DW, Moroney JT, Paik MC, et al. Frequency and clinical determinants of dementia after ischemic stroke[J]. Neurology, 2000, 54(5): 1124-1131.
- [2] 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):914-916.
- [3] 叶翠飞,张丽,艾厚喜,等.两种水迷宫实验对拟痴呆模型动物学习记忆功能测试的比较[J].中国行为医学科学,2004,13(3):252-253.
- [4] White BC, Grossman LI, Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theoretical perspective on membrane damage and repair[J]. Neurology, 1993, 43(9): 1656-1665.
- [5] 周小青,刘旺华,李花,等.丹龙醒脑片对血管性痴呆大鼠学习记忆及脑组织脂质过氧化和钙超载的影响[J].湖南中医学院学报,2002,22(3):1-7.
- [6] Hall ED. Cerebral ischemia, free radicals and antioxidant protection[J]. Biochem Soc Trans, 1993, 21(2): 334-339.
- [7] Beckman JS, Ye Yz, Chen J. The interactions of nitric oxide with oxygen radicals and scavengers in cerebral ischemic injury[J]. Adv Neurol, 1996, 71(1): 339-350.
- [8] Kristian T, Siesjo BK. Calcium in ischemic cell death[J]. Stroke, 1998, 29(3): 705-718.
- [9] 王良斌,张维宁,杜红燕,等.衰老性记忆障碍与各脑区突触体内钙水平变化的对比分析[J].中国老年学杂志,1997,17(1):29-31.