

脾虚大鼠模型脑内胆囊收缩素 P 物质、 血管活性肠肽变化及归脾汤的影响

钱会南*, 沈丽波, 胡雪琴, 吴海霞
(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 探讨脾藏意理论。方法: 采用苦降泻下、饮食失节加劳倦过度法建立脾虚大鼠模型, 以免疫组化方法检测下丘脑腹侧核、海马 CA1 区、前额叶皮层胆囊收缩素(CCK) P 物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)变化。结果: 模型组在上述脑区 CCK SP 免疫阳性反应物显著降低, 治疗组 CCK SP 免疫阳性反应物显著增加; 模型组 VIP 免疫阳性反应物在海马 CA1 区、前额叶皮层显著减少; 治疗组则明显增加。结论: 脾虚模型脑内对学习记忆有促进作用的神经肽 CCK SP、VIP 有变化, 归脾汤对上述脑区的 CCK SP、VIP 变化有调节作用。

[关键词] 脾虚模型; 胆囊收缩素; P 物质; 血管活性肠肽

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)05-0029-03

脾虚证是临床最常见的病证之一。脾虚证的实验研究涉及脾与消化吸收功能、免疫功能、内分泌及生殖功能、微量元素及血液流变学变化, 以及脾主运化、主肌肉、主统血等功能与脾阴虚、脾阳虚实质诸方面^[1]。但对脾藏意主思, 脾虚之精神萎靡、健忘机制的实验研究甚少。本研究探讨脾虚大鼠模型脑内与学习记忆密切相关的神经肽 P 物质(SP)、血管活性肠肽(VIP)、胆囊收缩素(CCK)的变化, 以及归脾汤对上述有关神经肽的影响, 为阐述脾藏意理论提供客观实验数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组 清洁级雄性 Wistar 大鼠, 体重 160g ± 10g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。适应性饲养 1 周后, 50 只大鼠随机分成正常组、模型组、治疗组 A 方对照组及 B 方对照组, 每组各 10 只。

1.2 实验药物配制 造模药物由大黄、厚朴、枳实按 2:1:1 组成。治疗方为归脾汤原方(白术、茯苓、黄芪、龙眼肉、酸枣仁、人参、木香、甘草、当归、远志); 对照 A 方为柴胡疏肝散原方(陈皮、柴胡、川芎、香附、枳壳、芍药、甘草); 对照 B 方为天王补心丹原

方^[2](酸枣仁、柏子仁、当归、天冬、麦冬、生地、人参、丹参、玄参、茯苓、五味子、远志、桔梗)。药材由金象大药房提供。以上方药分别常规煎煮、过滤, 常规浓缩为 1g/mL 药液, 冰箱储存备用。

1.3 实验动物处理 采用苦降泻下、饮食失节加劳倦过度法造模^[3]。造模组每日灌胃造模药 2mL·只⁻¹·d⁻¹, 隔日禁食, 自由饮水, 每日于 25℃水中游泳力竭^[4]。治疗组(造模处理加胃饲归脾汤); A 方对照组(造模处理加胃饲柴胡疏肝散); B 方对照组(造模处理加胃饲天王补心丹)。每日上午对除正常组外的 4 个组胃饲造模药, 正常组予等量生理盐水; 下午予治疗组 A 方对照组及 B 方对照组分别胃饲相应中药, 2mL·只⁻¹·d⁻¹。上述处理连续 6 周。并同时观察大鼠活动状态、排便、进食量、体重等。

1.4 仪器 TS-100 脱色摇床(北京); OLYMPUS 光学显微镜(日本); OLYMPUS 自动显微镜照相系统(日本); DH3600AB 电热恒温培养箱(天津); BDS1 电热三用水浴箱(北京); DHG9075A 电热恒温鼓风干燥箱(上海); Leitz 切片机(德国)。

1.5 主要试剂 CCK 免疫组化试剂盒(CCK1 抗, 多克隆兔抗)由上海第二军医大学神经解剖教研室提供。SP 免疫组化试剂盒(SP1 抗, 多克隆兔抗)与 VIP 免疫组化试剂盒(VIP1 抗, 多克隆兔抗)均由博士德生物公司提供; 正常羊血清 H₂O₂ 2 抗(生物素标记的 IgG) 3 抗(ABC 复合物) PBS、枸橼酸钠 3-3 二氨

[收稿日期] 2005-07-07

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(No: 30171188)

[通讯作者] 钱会南, Tel: (010) 64286312; E-mail: qhnan20042001@ yahoo. com. cn

基联苯胺(DAB)购自北京中山生物公司;多聚甲醛购自北京鼎国生物公司。蛋白酶K Sigma 公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

1.6 标本的采集与制备 大鼠经 10% 水合氯醛(0.4mL/100g 体重)麻醉后,打开胸腔,暴露心脏,经左心室插管至升主动脉,灌注预冷的生理盐水,然后灌注预冷的 4% 多聚甲醛溶液;取脑,蒸馏水漂洗,置 4% 多聚甲醛溶液后固定 45min;常规石蜡包埋。切片机冠状连续切片,片厚 6 μ m,常温保存备用。

1.7 免疫组化操作步骤 常规切片脱蜡至水;甲醇配 1% H₂O₂,室温孵育 30min;0.01M PBS 3 次 \times 5min;0.01M 枸橼酸缓冲液热修复;0.01M PBS 3 次 \times 5min;蛋白酶 K 消化 30min(37 $^{\circ}$ C);0.01M PBS 3 次 \times 5min;滴加正常羊血清 30min(37 $^{\circ}$ C);滴加 1 抗(浓度 1:80);(阴性对照组滴加正常羊血清代替 1 抗);0.01M PBS 3 次 \times 5min;滴加 2 抗,2h(37 $^{\circ}$ C);0.01M PBS 3 次 \times 5min;滴加 3 抗 2h(37 $^{\circ}$ C);0.01M PBS 3 次 \times 5min;DAB 显色;常规脱水、二甲苯透明;树胶封片。(除分别加用 CCK1 抗 SP1 抗 VIP1 抗外,CCK、SP、VIP 免疫组化其余操作步骤相同。)

1.8 光镜观察及图像处理 利用 Olympus 显微镜和真彩色病理图像分析系统 4.0 版进行图象采集和处理,测量海马 CA1 区、前额叶皮层、下丘脑腹内侧核 CCK SP、VIP 免疫阳性反应物的平均光密度,每组切片的每个部位测 5 个视野。

1.9 统计学处理 用 SPSS10.0 软件对 5 个组的数据进行统计,所有数据用平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果

2.1 各组大鼠脑内胆囊收缩素(CCK)检测结果 CCK 免疫阳性反应物呈棕黄色。模型组下丘脑腹侧核、海马 CA1 区和前额叶皮层平均光密度较低,与正常组相比,差异极显著($P < 0.01$);治疗组在下丘脑腹侧核、海马 CA1 区和前额叶皮层平均光密度较高,与正常组相比无显著差异;A 方对照组与正常组相比,差异极显著($P < 0.01$);B 方对照组与正常组相比,差异显著($P < 0.05$)。与模型组相比,治疗组下丘脑腹侧核、海马 CA1 区和前额叶皮层平均光密度较高,差异极显著($P < 0.01$);A 方对照组与 B 方对照组与模型组相比无显著差异。(见表 1)

2.2 各组大鼠脑内 P 物质(SP)检测结果 SP 免疫阳性反应物呈棕黄色。模型组下丘脑腹侧核、海马

CA1 区和前额叶皮层平均光密度较低,与正常组相比,差异极显著($P < 0.01$);治疗组在下丘脑腹侧核、海马 CA1 区和前额叶皮层平均光密度较高,与正常组相比无显著差异;A 方对照组与 B 方对照组与正常组相比,差异极显著($P < 0.01$)。与模型组相比,治疗组下丘脑腹侧核、海马 CA1 区和前额叶皮层平均光密度较高,差异极显著($P < 0.01$);A 方对照组与 B 方对照组与模型组相比无显著差异。(见表 2)

表 1 各组大鼠脑内 CCK 免疫阳性反应物
平均光密度比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	平均光密度		
	下丘脑腹侧核	海马 CA1 区	前额叶皮层
正常组	34.72 \pm 5.42	26.08 \pm 6.30	41.34 \pm 2.44
模型组	10.33 \pm 5.42 ²⁾	6.81 \pm 2.05 ²⁾	5.09 \pm 1.85 ²⁾
归脾汤组	29.30 \pm 6.27 ⁴⁾	20.45 \pm 6.48 ⁴⁾	38.45 \pm 3.07 ⁴⁾
A 方对照组	11.13 \pm 5.8 ²⁾	7.70 \pm 4.37 ²⁾	6.33 \pm 2.27 ²⁾
B 方对照组	12.85 \pm 2.63 ²⁾	6.60 \pm 1.93 ²⁾	6.15 \pm 2.81 ²⁾

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$;⁴⁾ $P < 0.01$;(下同)

表 2 各组大鼠脑内 SP 免疫阳性反应物
平均光密度比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	平均光密度		
	下丘脑腹侧核	海马 CA1 区	前额叶皮层
正常组	36.78 \pm 4.29	16.20 \pm 2.63	28.98 \pm 5.76
模型组	15.08 \pm 6.10 ²⁾	5.06 \pm 2.63 ²⁾	12.29 \pm 1.66 ²⁾
治疗组	33.46 \pm 8.05 ⁴⁾	16.25 \pm 2.55 ⁴⁾	24.20 \pm 5.16 ⁴⁾
A 方对照组	17.28 \pm 4.32 ²⁾	6.95 \pm 3.52 ²⁾	13.05 \pm 3.73 ²⁾
B 方对照组	16.06 \pm 5.17 ²⁾	7.07 \pm 2.48 ²⁾	12.58 \pm 4.72 ²⁾

2.3 各组大鼠脑内血管活性肠肽(VIP)检测结果 见表 3。

表 3 各组大鼠脑内 VIP 免疫阳性反应物
平均光密度比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	平均光密度		
	下丘脑腹侧核	海马 CA1 区	前额叶皮层
正常组	26.63 \pm 5.83	29.54 \pm 4.03	35.98 \pm 7.83
模型组	27.49 \pm 4.31	12.61 \pm 1.93 ²⁾	10.27 \pm 5.64 ²⁾
治疗组	25.82 \pm 4.62	26.09 \pm 5.29 ⁴⁾	34.65 \pm 5.80 ⁴⁾
A 方对照组	31.78 \pm 4.49	12.75 \pm 5.22 ²⁾	14.50 \pm 3.33 ²⁾
B 方对照组	20.72 \pm 5.18	23.78 \pm 6.35 ⁴⁾	34.574 \pm 7.65 ⁴⁾

VIP 免疫阳性反应物呈棕黄色,模型组海马 CA1 区、前额叶皮层 VIP 免疫阳性反应物平均光密度与正常组相比,差异极显著($P < 0.01$);治疗组海马

CA1 区、前额叶皮层 VIP 免疫阳性反应物平均光密度与正常组相比无显著差异; B 方对照组海马 CA1 区、前额叶皮层平均光密度与正常组相比, 无显著差异。但在下丘脑腹侧核模型组、治疗组、A 方对照组、B 方对照组平均光密度与正常组相比均无显著差异。与模型组相比, 治疗组海马、前额叶皮层免疫阳性反应物平均光密度较高, 差异极显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

苦降泻下、饮食失节加劳倦过度法是较有代表性的脾虚造模要素, 本实验采用制备大鼠脾虚模型的方法属于多因素造模, 是目前应用较广泛的脾虚模型。参照大鼠脾气虚证模型评估标准及评定标准^[3~5], 结合本实验研究模型组状态和体征变化, 参照上述评估评定标准, 成功建立脾虚模型。

近年来神经肽 CCK、SP、VIP 在学习记忆中的作用逐渐引起关注。CCK 在中枢起神经递质或调质的作用, 动物脑内补充外源性的 CCK 可以改善动物的学习记忆能力, 诱导海马长时程增强 (LTP) 的产生^[6]。皮下注射 CCK₈ 可防止大鼠电休克造成的实验性遗忘症^[7]。大鼠海马 CA3 区注射 CCK₈ 后, 动物学习记忆能力明显提高, 大鼠达到学习标准所需的学习次数明显减少, 但若注射 CCK- β 受体阻断剂 L-365 后再注射 CCK₈ 则大鼠学习成绩明显减弱。本实验研究发现 CCK 在脾虚大鼠海马 CA1 区、前额叶皮层和下丘脑腹侧的免疫阳性反应物减少, 推测脾虚模型学习记忆能力的下降与脑内 CCK 的改变有关。治疗组大鼠的海马 CA1 区、前额叶皮层和下丘脑腹侧的免疫阳性反应物均明显升高, 提示归脾汤可能是通过脑内 CCK 的调节而对脾虚大鼠学习记忆能力有改善作用^[8]。腹腔内注射 SP 可促进学习功能的保持^[9]。将 SP 直接注射到基底核能促进并加强记忆。本实验研究发现 SP 在脾虚大鼠海马 CA1 区、前额叶皮层和下丘脑腹侧的免疫阳性反应物均减少, 提示脾虚模型学习记忆能力的下降与脑内 SP 的改变有关。治疗组大鼠上述脑区阳性反应物明显升高, 提示归脾汤对脾虚大鼠学习记忆能力

的改善作用与其对脑内 SP 的调节影响有关。VIP 对东莨菪碱诱导的空间识别障碍有改善作用, 转基因小鼠脑内 VIP 水平较低学习发生障碍^[10]。本实验研究发现 VIP 在脾虚大鼠海马 CA1 区、前额叶皮层的免疫阳性反应物减少, 推测脾虚模型学习记忆能力的下降与脑内 VIP 的改变有关。治疗组大鼠上述脑区免疫阳性反应物均明显升高, 提示归脾汤对脾虚大鼠学习记忆能力的改善作用与其对脑内 VIP 的调节有关。B 方对照组海马 CA1 区、前额叶皮层免疫阳性反应物也明显增高, 推测王补天心丹改善学习记忆的作用可能与归脾汤作用有相似之处。

[参考文献]

- [1] 钱会南. 论脾虚证现代研究的特点与存在问题及对策[J]. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(12): 63-64.
- [2] 段富津. 方剂学[M]. 上海: 科学技术出版社, 1995. 126, 178, 163, 130.
- [3] 陈小野. 脾气虚证动物模型初步规范化的造模方法和思路[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 1: 3-5.
- [4] 陈小野, 周永生, 樊雅莉, 等. 脾气虚动物模型规范化的初步研究[J]. 中国医药学报, 2001, 16(4): 52-58.
- [5] 钱会南, 沈丽波, 胡雪琴. 中医脾虚动物模型的实验研究思考[J]. 中国药物与临床, 2003, 3(3): 183-184.
- [6] Itoh S, Takashima A, Igano K, et al. Memory effect of caerulein and its analogs in active and passive avoidance response in rats[J]. Peptides, 1989, 10(4): 843-852.
- [7] 陶尚敏, 徐璐, 唐明. 外源性胆囊收缩素对大鼠学习记忆的影响及相关机制的研究[J]. 中国行为医学科学, 2000, 9(6): 404-405.
- [8] Pellemounter MA, Schlesinger K, Wehner J, et al. Nigral 5-HT and substance P-induced enhancement of passive avoidance retention[J]. Behav Brain Res, 1988, 29(1-2): 159-72.
- [9] Huston JP, Hasenohrl RU. The role of neuropeptides in learning: focus on the neurokinin substance P[J]. Behav Brain Res, 1995, 66(1-2): 117-127.
- [10] Yamaguchi Y, Kobavashi H. Effects of vasoactive intestinal peptide(VIP) on scopolamine-induced amnesia in the rat[J]. Neuropeptides, 1994, 26: 153-157.