

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2013.02.004

·专题·

参龙汤对脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力及海马神经肽表达的影响

雷永红^{1a}, 陈利平^{1b}, 王发渭^{1b}, 孙志高^{1b}, 许成勇^{1b}

[摘要] 目的 观察参龙汤对脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力及大鼠血浆神经肽(NPY)水平和海马 NPY 表达的影响。方法 50 只大鼠随机分为:假手术组,模型组,吡拉西坦组,参龙汤大、小剂量组,每组各 10 只。利用双侧颈总动脉结扎方法制备慢性脑缺血再灌注大鼠模型,造模后药物处理 28 d,采用 Morris 水迷宫实验观察大鼠逃避潜伏期时间以及跨越平台次数,采用竞争酶联免疫分析法测定血浆 NPY 含量,采用免疫组化方法观察大鼠海马 NPY 表达的变化。结果 与假手术组相比,模型组大鼠逃避潜伏期时间明显延长,跨越平台次数明显减少($P<0.01$);与模型组相比,参龙汤大剂量组大鼠逃避潜伏期时间缩短,跨越平台次数增加($P<0.05$)。与假手术组相比,模型组大鼠血浆 NPY 含量明显升高,海马区 NPY 蛋白阳性细胞数明显升高($P<0.01$);与模型组相比,治疗后参龙汤大剂量组和吡拉西坦组大鼠血浆 NPY 含量减低,海马区 NPY 蛋白阳性细胞数减低($P<0.05$)。结论 240 g/L 参龙汤能改善脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力,其作用机理可能与降低大鼠血浆 NPY 含量、减少海马 NPY 蛋白表达有关。

[关键词] 参龙汤;缺血/再灌注;学习;记忆;神经肽

Effect of Shenlongtang Decoction on Learning and Memory Ability and Expression of Neuropeptide Y in Hippocampus of Rats with Cerebral Ischemia/Reperfusion LEI Yong-hong, CHEN Li-ping, WANG Fa-wei, et al. Hainan Branch of PLA General Hospital, Sanya 572004, Hainan, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Shenlongtang decoction (SLT) on the learning and memory ability and serum level of neuropeptide Y (NPY) and expression of NPY in hippocampus of rats with cerebral ischemia/reperfusion. **Methods** 50 rats were randomly divided into 5 groups: control group with sham operation; model group with cerebral ischemia/reperfusion; pisacetam group as positive control; and SLT groups (low and high dosages). The rats' model was established with two-vessel occlusion. After modeling, the rats were administrating with SLT or pisacetam for 28 d. Learning and memory ability was tested with Morris water maze, the level of NPY was detected with radioimmunoassay, and the number of positive cells of NPY in hippocampus was detected. **Results** Compared with the control group, the latency time increased significantly and frequency of searching submerged platform decreased significantly in the model group ($P<0.01$); and compared with the model group, the latency time decreased significantly and frequency of searching submerged platform increased significantly in SLT high dosage group ($P<0.05$). Compared with the control group, the serum levels of NPY increased significantly in the model group, and the number of positive cell of NPY in hippocampus area significantly increased ($P<0.01$); and compared with the model group, the serum levels of NPY decreased significantly, and the number of positive cell of NPY in hippocampus area significantly decreased in the SLT high dosage group and pisacetam group ($P<0.05$). **Conclusion** SLT could improve the learning and memory function. The mechanism may be related to regulate the serum level and expression of NPY in hippocampus area of rats with cerebral ischemia/reperfusion.

Key words: Shenlongtang decoction; ischemia/reperfusion; learning; memory; neuropeptide Y

[中图分类号] R743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2013)02-0110-04

[本文著录格式] 雷永红, 陈利平, 王发渭, 等. 参龙汤对脑缺血再灌注大鼠学习记忆能力及海马神经肽表达的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2013, 19(2): 110-113.

随着社会经济的发展、人们生活水平的提高、生活方式的改变,以及人口老龄化进程的加剧,缺血性脑血管病的发生率不断升高。有关对缺血性脑血管病导致的学习、记忆损害的保护作用及其神经生物学机制研究一直是神经科学的研究热点^[1]。缺血性脑血管

病为中老年人常见病、多发病,严重威胁人类生命健康,致残率高,病理机制复杂^[2]。

目前研究认为,缺血性神经元损伤的病理较为复杂,主要过程包括神经细胞的自身损伤机制和脑缺血性损伤级联反应^[3]。缺血性脑血管病是由各种原因引

基金项目:北京市科委科技计划研发攻关基金(No. Z111107067311022)。

作者单位:1.解放军总医院海南分院, a:病案管理科; b:中医针灸科,海南三亚市 572004。作者简介:雷永红(1967-),女,汉族,河北曲阳县人,主管技师,主要研究方向:住院管理、认知功能研究。通讯作者:陈利平(1964-),男,汉族,湖北仙桃市人,医学博士,主任医师,研究生导师,主要研究方向:心、脑血管系统疾病的中医治疗。

起的慢性脑血流减少,促使脑组织发生病理及生化改变,引起能量代谢障碍、葡萄糖利用减少、蛋白质合成异常、神经递质改变、胆碱受体缺失、脑白质损害和神经元缺失等,这些构成了慢性脑缺血导致功能障碍的病理生理学基础^[4]。

神经肽(neuropeptide Y, NPY)是一种生物活性多肽,作为神经递质广泛分布于中枢神经系统,其作用与学习、记忆、惊厥、疼痛、焦虑、抑郁、摄食等有关^[5]。由于缺血性脑血管病的发病机制复杂,目前临床大多从某一环节或某一途径治疗,采用胆碱酶抑制剂、脑循环改善剂、钙离子拮抗剂、兴奋性氨基酸受体拮抗剂等。近年来,越来越多的学者将目光转向中医药。中医药对缺血性脑血管病的治疗有着独特的优势和较好的疗效^[6]。既往研究报道,参龙汤具有补肾益气活血的作用,能提高脑缺血大鼠的学习记忆能力,增强脑缺血大鼠海马区血管内皮生长因子表达^[7]。本研究采用慢性脑缺血动物模型,观察参龙汤对脑缺血大鼠学习记忆能力以及对血浆 NPY 水平和海马 NPY 表达的影响,为临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠,鼠龄 3 个月,体重 180~220 g,雌雄各半,由解放军总医院医学动物实验中心提供,许可证编号:SCXK(京)2009-0015。

1.2 药品、试剂及实验仪器

1.2.1 药品 ①参龙汤:解放军总医院中医科提供处方,制剂室制备;②吡拉西坦:石家庄中诺药业有限公司,批号:09075103。

1.2.2 试剂 NPY 放射免疫试剂盒:由解放军总医院东亚免疫技术研究所生产;NPY 多克隆抗体:北京博奥森生物技术有限公司,批号:990901W;二抗显色试剂盒:EnVision Detection Kit 基因科技(上海)有限公司,批号:No. GK500705。

1.2.3 实验仪器 ①全自动真空脱水机(LEICA ASP300)、组织包埋机(LEICA EG1140H)、石蜡切片机(LEICA RM2135)、展片机(LEICA H11210):德国 LEICA 公司;②光学显微镜:日本 Olympus BX60 系统显微镜;③酶标仪: THERMO MultiskanMK3(美国)。

1.3 模型制备与分组

根据文献^[8]制备慢性脑缺血再灌注模型。大鼠禁食 12 h,禁水 6 h,10%水合氯醛(30 mg/100g)腹腔麻

醉,备皮消毒、剪开颈部皮肤,找到双侧颈总动脉,0 号丝线结扎。伤口撒头孢唑啉钠粉末 0.25 g 后逐层缝合,放回笼中饲养。假手术组仅分离颈总动脉,不做任何处理。造模后大鼠分为:假手术组,模型组,参龙汤小剂量组、大剂量组,吡拉西坦组,每组大鼠 10 只。

排除有明显肢体障碍大鼠,最后纳入统计:假手术组 10 只,模型组 8 只,参龙汤大剂量组 8 只、小剂量组 9 只,吡拉西坦组 8 只。

术后 3 d 开始给药,参照陈奇方法^[9]给药,根据参龙汤和吡拉西坦的临床口服量,按体重换算出大鼠对应于人的等效量,确定小剂量组、大剂量组和吡拉西坦组分别含生药 80 g/L、240 g/L、90 g/L。大鼠灌胃量为 1 ml/d,假手术组、模型组生理盐水灌胃,连续 28 d。

1.4 Morris 水迷宫实验

给药 28 d 后进行水迷宫实验。在暗室中放置一直径 1.3 m、深 0.5 m 圆形水池,池壁为黑色,标明 A、B、C、D 四个象限,在任一象限放置一个直径 10 cm,高 30 cm 安全平台,水面没过平台约 2 cm,水中注入适量墨汁,以目视看不到平台为宜,水温控制在 26 ℃左右;大鼠训练 2 d,开始实验 5 d,记录大鼠寻找到安全平台时间,即逃避潜伏期时间作为学习成绩;第 6 天撤去平台,选第二象限入水点将大鼠面向池壁放入水中,记录 90 s 内大鼠跨越原平台次数,作为大鼠记忆成绩。

1.5 血清 NPY 含量测定及免疫组化

水迷宫实验结束后,10%水合氯醛(30 mg/100 g)腹腔注射麻醉取血,血液在冰浴试管中静置 30 min,4 ℃、3000 r/min 离心 10 min,分离血清,保存在-70 ℃冰箱中,按说明进行 NPY 含量测定。大鼠腹腔注射麻醉取血后断头取脑,参照大鼠脑立体定位图谱^[10],取海马组织,脱水、包埋,置于 APES 防脱玻片上。60 ℃烤片 4 h,常规脱蜡、脱水、浸洗;3% H₂O₂ 10 min, PBS 浸洗 2 min,共 3 次;浸入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液。微波热修复后,滴加一抗 NPY 多克隆抗体(1:200),假手术组加 0.01 mol/L PBS 代替一抗,4 ℃冰箱孵育过夜,室温复温 30 min 后 PBS 浸洗 5 min,共 3 次后滴加非生物素二抗,湿盒中室温 30 min, PBS 浸洗 5 min,共 3 次, DAB 显色,光镜下控制时间,脱水、透明、封片。采用 Image Pro plus 5.1 图像分析系统测定每张照片的阳性细胞。

1.6 统计学分析

所有数据均采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析, 进行正态性检验, 多个样本均数比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 学习记忆能力

与假手术组相比, 模型组大鼠的逃避潜伏期时间明显延长, 跨越平台次数明显减少($P < 0.01$)。与模型组相比, 参龙汤大剂量组大鼠的逃避潜伏期时间缩短, 跨越平台次数增加($P < 0.05$); 而吡拉西坦组仅穿越平台次数增加($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 治疗后各组大鼠水迷宫学习记忆能力结果

分组	n	逃逸潜伏期(s)	穿越平台次数
假手术组	10	28.43±13.26	6.46±1.83
模型组	8	58.24±18.52 ^a	2.87±1.13 ^a
参龙汤大剂量组	8	38.77±15.64 ^b	5.23±1.62 ^b
参龙汤小剂量组	9	46.56±17.48	4.12±1.46
吡拉西坦组	8	42.48±16.92	4.78±1.52 ^b

注: a: 与假手术组相比较, $P < 0.01$, b: 与模型组相比较, $P < 0.05$ 。

2.2 血浆 NPY 含量

与假手术组相比, 模型组大鼠血浆 NPY 含量明显升高($P < 0.01$)。与模型组相比, 治疗后参龙汤大剂量组和吡拉西坦组大鼠血浆 NPY 含量减低($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 海马 NPY 阳性细胞数

海马区 NPY 免疫组化蛋白阳性表达呈黄色或棕黄色染色、深浅不一, 主要位于细胞质中, 胞核不染色。模型组大鼠海马区 NPY 阳性细胞数明显高于假手术组($P < 0.01$); 与模型组相比, 治疗后参龙汤大剂量组和吡拉西坦组大鼠海马区 NPY 阳性细胞数减低($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 治疗后各组大鼠血浆 NPY 含量和海马 NPY 阳性细胞数

分组	n	血浆 NPY 含量 (pg/ml)	海马 NPY 阳性细胞数
假手术组	10	62.46±14.23	14.27±3.29
模型组	8	132.23±21.15 ^a	23.26±4.36 ^a
参龙汤大剂量组	8	82.47±20.28 ^b	18.48±3.57 ^b
参龙汤小剂量组	9	107.8±19.72	20.23±4.12
吡拉西坦组	8	88.12±22.35 ^b	17.63±3.52 ^b

注: a: 与假手术组比较, $P < 0.01$, b: 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

缺血性脑血管病导致神经功能损伤的重要机制之一是缺血后引起的脑组织神经元损伤^[1]。本实验结果显示, 模型组大鼠逃避潜伏期时间较假手术组明显延长, 跨越平台次数明显减少, 说明造模成功。参龙汤治疗后, 脑缺血大鼠逃避潜伏期时间较模型组缩短, 跨越平台次数增加, 说明参龙汤可以改善脑缺血大鼠学习记忆的能力。

海马是大脑边缘系统的重要组成部分, 海马中的递质包括单胺类神经递质、胆碱能神经递质和氨基酸类神经递质, 其合成过程和含量变化都与学习记忆有关。各种神经递质参与情绪、学习、记忆、行为、免疫调节等, 在学习和记忆功能以及调节神经内分泌和自主神经活动中起着重要作用, 是参与调节情感、认知行为重要的边缘系统结构^[12]。

NPY 是生物活性多肽的一种神经递质, 广泛分布于中枢及周围神经组织、心血管系统等部位, 在人脑中主要分布于基底节边缘系统、杏仁核区、海马回区、下丘脑及感觉运动皮质的运动区等部位^[13]。NPY 除参与机体众多生理功能的调节过程外, 还与许多脑血管系统疾病的病理过程有密切关系。它除自身具有缩血管作用之外, 还能通过加强去甲肾上腺素和 5-羟色胺的缩血管效应, 导致血管的痉挛。研究显示, 机体在应激等状态下, NPY 水平显著升高, 且与扩血管物质的表达水平呈负相关, 提示 NPY 可以通过抑制舒血管物质的分泌达到抑制血管舒张的作用。

脑缺血缺氧后, 反射性地兴奋交感-儿茶酚胺系统, 使交感神经末梢释放的 NPY 与肾上腺素增加, 加剧脑部血管的收缩, 增加神经元的缺血缺氧损伤程度^[14]。本实验研究结果显示, 与假手术组相比, 模型组大鼠血浆 NPY 的含量明显升高, 脑组织海马区 NPY 表达明显增加; 与模型组相比, 参龙汤大剂量组和吡拉西坦组大鼠血浆 NPY 的含量降低, 海马区 NPY 表达减少, 提示参龙汤能降低脑缺血大鼠血浆 NPY 的含量, 减少海马 NPY 的表达, 通过调节脑血管的舒缩状态发挥其对脑缺血大鼠海马神经元缺血损伤的保护作用。

缺血性脑血管病的发生伴随年龄的增长而逐年增加。中医认为, 缺血性脑血管病的发生与脾肾亏虚、气虚血瘀痰阻有关。参龙汤是由本科研制的治疗缺血性脑血管病的有效方剂, 由生晒参、制首乌、淫羊藿、干地龙、石菖蒲、川芎、远志等药物组成。其中

人参加大补元气、安神益智，为君药。臣药制首乌补血养肝、益精固髓；淫羊藿温肾壮阳，两者配伍针对肾精不足的基本病机。佐以地龙、川芎活血行气通络，去除脑络之瘀阻。石菖蒲、远志开窍宁心安神。全方共奏补肾填精、益气活血、安神增智的功效。前期临床研究证实，参龙汤对于脑缺血及血管性痴呆具有较好的疗效^[15-17]。

综上所述，参龙汤可以改善脑缺血大鼠学习记忆能力。其作用机理之一可能为：参龙汤能降低脑缺血大鼠血浆NPY的含量，减少海马NPY的表达，通过调节脑血管的舒缩状态发挥其对脑缺血大鼠海马神经元缺血损伤的保护作用，其作用与剂量有关。

【参考文献】

- [1] 郭晓燕,梅元武. 脑缺血耐受机制的研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2012, 7(6): 451-454.
- [2] 李小玲,张在强,龙洁. 脑缺血细胞凋亡的分子生物学机制[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2008, 8(4): 247-250.
- [3] 王丽,耿荣,杨明. 缺血性脑损伤的脑保护剂研究进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2009, 17(11): 1018-1020.
- [4] Dirnagl U. Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond [J]. Ann N Y Acad Sci, 2012, 1268: 21-25.
- [5] Decressac M, Barker RA. Neuropeptide Y and its role in CNS disease and repair [J]. Exp Neurol, 2012, 238(2): 265-272.
- [6] 姜楠. 中医药对脑梗死相关危险因素作用机制的研究现状[J]. 河南中医, 2012, 32(12): 1713-1715.
- [7] 陈利平,赵桂景,王发渭,等. 参龙汤对脑缺血大鼠血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国中医急症, 2012, 21(10): 1587-1589.
- [8] 吴培要,王静,谢丽芬,等. 线栓大鼠大脑中动脉缺血模型制作方法的改进[J]. 贵阳医学院学报, 2009, 34 (1): 108-110.
- [9] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2006: 1167- 1170.
- [10] Paxinos C, Watson C. 诸葛启钊, 译. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2005: 43-51.
- [11] 韩济生. 神经科学[M]. 3版. 北京:北京大学医学出版社, 2009: 299-303.
- [12] 刘姜冰,石静萍,赵薛旭,等. 托吡酯对急性脑缺血后大鼠脑皮层氨基酸类神经递质含量的影响及神经保护作用[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(5): 692-695.
- [13] Malva JO, Xapelli S, Baptista S, et al. Multifaces of neuropeptide Y in the brain—neuroprotection, neurogenesis and neuroinflammation [J]. Neuropeptides, 2012, 46(6): 299-308.
- [14] Huang W, Wu XP, Ding Y, et al. Influence of electroacupuncture of "Shuigou" (GV 26) on hippocampal CGRP and NPY contents in cerebral ischemia rats [J]. Zhen Ci Yan Jiu, 2009, 34 (1): 13-15.
- [15] Chen LP, Wang FW, Zuo F. Clinical research on comprehensive treatment of senile vascular dementia [J]. J Trad Chin Med, 2011, 31(3): 33-35.
- [16] 许成勇,张岗,黄泉智,等. 参龙健脑胶囊对脑缺血大鼠模型海马 CGRP 表达的影响 [J]. 中国中医急症, 2011, 20(9): 1428-1429.
- [17] 吴培要,王静,谢丽芬,等. 线栓大鼠大脑中动脉缺血模型制作方法的改进[J]. 贵阳医学院学报, 2009, 34(1): 108-110.

(收稿日期:2013-02-01)