

本文引用:任晨斌,伍大华,张发友,李红梅.滋肾活血方对血管性痴呆大鼠学习记忆能力和海马形态学的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(10):1082-1085.

滋肾活血方对血管性痴呆大鼠学习记忆能力和 海马形态学的影响

任晨斌,伍大华*,张发友,李红梅
(湖南省中医药研究院附属医院,湖南 长沙 410006)

〔摘要〕目的 探讨滋肾活血方对血管性痴呆(vascular dementia,VD)大鼠行为学和海马病理形态学的影响。方法 采用改良的双侧颈总动脉结扎法(2-VO法)制作VD大鼠模型,用滋肾活血方干预。给药4周后,用水迷宫检测行为学;HE染色观察海马病理形态学的改变。结果 与模型组相比,滋肾活血组逃避潜伏期缩短($P<0.05$),跨越平台次数增多($P<0.05$),HE染色示海马损伤明显减轻。结论 滋肾活血方可以改善VD大鼠的学习记忆能力,减轻海马组织损伤,对VD大鼠有一定的治疗作用。

〔关键词〕 血管性痴呆;滋肾活血方;逃避潜伏期;海马组织

〔中图分类号〕R285.5;R749.1+3

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.010.008

Influence of Zishen Huoxue Decoction on Learning and Memory Ability and Morphology of Hippocampus in Rats with Vascular Dementia

REN Chenbin, WU Dahua, ZHANG Fayou, LI Hongmei

(The Affiliated Hospital of Hunan Institute of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

〔Abstract〕 Objective To explore the influence of Zishen Huoxue decoction on learning and memory ability and morphology of hippocampus in rats with vascular dementia (VD) rats. **Methods** The VD model rats were established by improved 2-VO method, and the rats were intervened by Zishen Huoxue decoction. After 4 weeks later, the changes of behavior were observed through water maze test, the hippocampal pathologic changes of rats were observed by HE staining. **Results** Compared with the model group, the escape latency of the Zishen Huoxue group reduced ($P<0.05$), the number of crossing platform increased ($P<0.05$), and the damage of hippocampal nerve cell relieved obviously. **Conclusion** Zishen Huoxue decoction could improve the learning and memory ability and reduce the pathological damage in hippocampal tissue of VD rats.

〔Keywords〕 vascular dementia; Zishen Huoxue decoction; escape latency; hippocampus tissues

血管性痴呆(vascular dementia,VD)是一组由脑血管疾病导致的智能及认知功能障碍综合征,多在60岁以后发病^[1]。近年来,由于世界人口老龄化及脑血管病发病率的不断攀升,VD的发病迅速上升,对社会造成了极大危害^[2]。据国外资料报道,VD是迄今为止唯一可防治的痴呆性疾病^[3]。因此现代医学

对VD开展了广泛而深入的研究,但目前尚无一种理论能圆满解释其真正的发病机制。本研究采用改良2-VO法建立VD大鼠模型,通过行为学和海马病理学变化的研究,探讨滋肾活血方对VD大鼠的治疗作用,为指导临床应用和开发新药提供理论和实验依据。

〔收稿日期〕2017-02-19

〔基金项目〕湖南省中医药管理局重点项目(201528)。

〔作者简介〕任晨斌,男,在读硕士研究生,研究方向:中西医结合神经内科。

〔通讯作者〕*伍大华,女,教授,硕士研究生导师,E-mail:893049352@qq.com。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 100 只, 体质量 220~250 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 许可证号: SYXK(湘)2015-0008。大鼠在恒温、恒湿条件下自由摄食和饮水。

1.2 药品及仪器

滋肾活血方(由枸杞、制首乌、葛根、桑椹子、丹参、五味子、益智仁、石菖蒲、郁金、远志、全蝎、山楂组成)由湖南省中医药研究院提供。奥拉西坦胶囊, 由石药集团欧意药业有限公司生产, 批号: 059160250。MT-200 Morris 水迷宫: 成都泰盟科技有限公司; Motic 6.0 数码医学图像分析系统: 麦克奥迪实业集团有限公司; 手术剪、镊: 张家港市锦丰锦鹿刀剪厂。

1.3 动物造模

采用改良 2-VO 法制作 VD 大鼠模型^[4]。大鼠术前 12 h 禁食, 4 h 禁水。造模大鼠腹腔麻醉, 固定于板上, 钝性分离左侧颈总动脉后以外科线双重结扎。7 d 后进行相同操作, 结扎右侧颈总动脉。术后 3 d 腹腔注射青霉素钠 50 万 U/kg。假手术组: 仅分离颈总动脉但不结扎, 余操作相同。

1.4 模型成功的判断

术后 7 d 行水迷宫测试, 以正常组大鼠逃避潜伏期(escape latency, EL)的平均值为参考值, 计算每只造模大鼠逃避潜伏期与参考值之差占该鼠逃避潜伏期的比值, 若该值>20%为痴呆鼠^[5]。剔除大鼠游泳姿势不良以及未明显痴呆的大鼠。

1.5 动物分组及干预

100 只大鼠造模前先采用随机数字表法选出 14 只作为正常组, 14 只作为假手术组, 其余 74 只大鼠造模。造模期间假手术组大鼠死亡 2 只, 72 只造模大鼠死亡 14 只, 经水迷宫筛选出血管性痴呆大鼠 36 只进行后续实验。将造模成功大鼠按随机数字表法分为模型组、滋肾活血组、奥拉西坦组, 每组 12 只。每组大鼠按 9 mL/(kg·d) 剂量灌胃相应药物。其中正常组、假手术组、模型组给予蒸馏水, 滋肾活血组给予滋肾活血方 17.8 g/(kg·d)(相当于临床等效剂量), 奥拉西坦组给予奥拉西坦液 216 mg/(kg·d)(相当于临床等效剂量)。药物剂量参照文献^[6]计算

而得。采用灌胃法, 每天 1 次, 连续干预 4 周。

1.6 一般情况观察

实验期间每天观察大鼠的进食量、活动量、精神状态、毛发光泽、反应能力等一般情况。

1.7 行为学的测试

Morris 水迷宫的测试内容主要包括定位航行实验和空间探索实验两部分。以大鼠的逃避潜伏期和 120 s 内穿越平台位置的次数作为行为学检测的指标^[7]。(1) 给药 4 周后, 进行水迷宫训练。将大鼠头面向池壁, 分别从四个象限标定的入水点放入。如果大鼠在 120 s 内爬上平台, 并在平台上停留时间超过 3 s, 则认为大鼠找到平台, 这段时间即为 EL。若大鼠在规定时间内未能找到平台, 则将其引导至平台, 并允许其在平台上停留 10 s 强化记忆。连续 5 d, 记录各组大鼠的 EL。(2) 第 6 天, 撤除平台, 进行空间探索实验。将大鼠面向池壁随机放入任意一个入水点, 记录大鼠 120 s 内穿越平台位置的次数。

1.8 HE 染色观察海马形态学

水迷宫测试结束, 大鼠处死后将静脉滴注的针头自左心室穿入至升主动脉, 同时剪破右心耳。大鼠先用生理盐水快速灌注至流出液体清亮, 然后用 4% 多聚甲醛先快后慢灌注至肢体完全硬化。大鼠处死后取脑, 用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 冠状切片, HE 染色, 光镜下观察。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据。计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。符合方差齐性和正态分布用单因素方差分析组间差异, 组间多重比较选用 LSD 检验。不符合方差分析条件的数据, 用 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察

造模前各组大鼠的皮毛致密, 富有光泽, 活动灵活而有力, 外观上无明显差别。造模后模型组大鼠精神萎靡, 皮毛部分脱落, 脏乱而少光泽, 眼睑下垂, 反应迟钝, 喜卧少动, 饮水和进食减少, 部分大鼠出现互相撕咬等情况。随着时间延长, 模型组大鼠未见明显改善。正常组、假手术组与造模前无明显差别。滋肾活血组和奥拉西坦组大鼠造模后与模型组相似, 但随着干预的时间延长, 外观、活动、反应与进食较

模型组改善。

2.2 行为学检查结果

定位航行实验结果见表1。从时间上看,随着训练天数的增加,各组大鼠平台逃避潜伏期均逐渐缩短。各组大鼠第1天逃避潜伏期无明显差异($P>0.05$)。单因素方差分析显示第2天到第5天,模型组、滋肾活血组、奥拉西坦组潜伏期延长,与假手术

组比较差异有统计学意义($P<0.05$);第3天到第5天结果显示,与模型组相比,滋肾活血组与奥拉西坦组潜伏期缩短($P<0.05$)。

空间探索实验结果见表2。模型组与正常组比较,跨越平台位置次数减少($P<0.05$)。奥拉西坦组、滋肾活血组与模型组相比,跨越平台位置次数增多($P<0.05$)。

表1 各组大鼠 Morris 水迷宫定位航行实验 EL 比较

组别	n	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
正常组	12	69.16±32.84	45.47±14.02	37.93±14.55	21.55±7.74	11.88±5.01
假手术组	12	70.84±29.18	48.68±21.20	39.16±13.69	24.16±4.85	14.29±5.44
模型组	12	87.34±17.09	80.27±16.16 ^{☆*}	74.94±11.27 ^{**}	55.81±5.92 ^{**}	42.73±9.57 ^{**}
滋肾活血组	12	86.72±13.21	75.71±17.35 ^{☆*}	57.81±14.01 ^{**▲}	44.43±10.13 ^{**▲}	26.60±3.43 ^{**▲}
奥拉西坦组	12	77.64±18.22	71.69±21.62 ^{☆*}	56.41±13.45 ^{**▲}	41.14±9.64 ^{**▲}	25.48±5.53 ^{**▲}
F 值		0.803	4.647	7.757	19.80	23.89
P 值		0.535	0.006	0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较,☆ $P<0.05$;与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,▲ $P<0.05$ 。

表2 各组大鼠 Morris 水迷宫跨越平台次数比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	跨越原平台次数/次
正常组	12	12.17±1.72
假手术组	12	11.50±2.43
模型组	12	4.67±1.75 ^{**}
滋肾活血组	12	7.67±1.03 ^{**▲}
奥拉西坦组	12	8.33±1.21 ^{**▲}
F 值		19.28
P 值		0.000

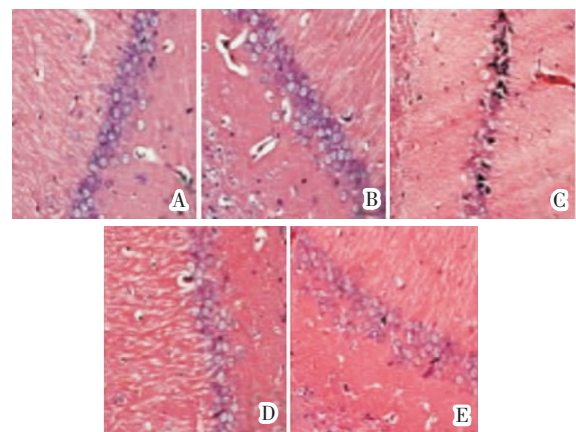
注:与正常组比较,☆ $P<0.05$;与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,▲ $P<0.05$ 。

2.3 HE 染色结果

正常组:大鼠海马 CA1 区锥体细胞呈圆形或椭圆形,核大,核仁明显清晰,细胞排列致密整齐,结构完整。假手术组:与正常组基本一致。模型组:局灶性锥体细胞消失,层次减少,排列较紊乱,有的细胞旁有空染区,出现核固缩、胞质浓染、胞体变小。滋肾活血组:大鼠海马组织 CA1 区锥体细胞排列尚整齐,层次较模型组清晰,数目亦较模型组增多。奥拉西坦组:大鼠海马组织 CA1 区锥体细胞排列较模型组整齐,层次较清晰。见图1。

3 讨论

VD 可归属于中医学“呆病”“善忘”等范畴。李伟茜等^[8]认为 VD 病位在脑,灵机记忆皆出于脑,脑为髓海,精髓是脑生理活动的物质基础。不少医家



A: 正常组; B: 假手术组; C: 模型组; D: 滋肾活血组; E: 奥拉西坦组

图1 滋肾活血组对大鼠海马形态学的变化(HE×400)

均认为肾精亏虚是 VD 发病的病理基础^[9],《辨证奇闻》中指出:“补脑必须添精,而添精必须滋肾。”故补肾益精填髓是其基本治疗法则。《灵枢·调经论》“血并于上,气并于下,乱而善忘”;《医林改错》“凡有瘀血也令人善忘”等阐述,说明瘀血可以导致痴呆。国医大师刘祖贻认为:VD 病位在脑,属本虚标实之证。以正气亏虚为本,瘀痰浊毒为标。肾阴亏虚,瘀血阻络为其常见病机。刘老在中医药理论指导下,结合自己多年临床经验,运用滋肾活血方治疗 VD,疗效显著。

滋肾活血方由制首乌、枸杞、桑椹子等药物组成。制首乌滋阴补血之中,有化阳之功,但无阴凝之

弊,可获阴阳双补之效;枸杞子具有滋补肝肾,益精明目之功,两者共为君药。桑椹子“滋肝肾,充血液”;益智仁,鼓舞肾气以生精,可使化源得滋,脑髓得充,共为臣药。丹参有活血祛瘀之功效;葛根活血化瘀;远志宁心安神,祛痰开窍;石菖蒲“开心孔,补五脏,通九窍”;全蝎有搜风通络、活血通窍之功;五味子温而不燥,可滋肾涩精,六药共为佐药。郁金为入血分之气药,可助药上行,直达病所;山楂性味平和,具有消食健胃顾护脾胃的作用,共为使药。诸药配合,共奏滋阴补肾、活血通窍、益智健脑之效。

改良 2-VO 法制造的 VD 大鼠模型实质是慢性低灌注引起脑缺血缺氧,最终导致神经细胞功能下降、学习记忆功能障碍,较好地模拟了人因动脉粥样硬化、动脉管腔狭窄等因素导致的 VD^[10],且改良 2-VO 建立的模型大鼠具有死亡率低、操作简单、可重复性强的特点^[11]。本实验的动物存活率高达 80%,且苏醒后对其活动和摄食的影响也比较少。在水迷宫实验中,模型组与正常组相比,潜伏期延长,跨越平台次数减少,说明此模型有学习和记忆障碍,是较理想的 VD 模型。

脑部缺血缺氧,激发脑内神经元细胞凋亡,最终的表现结果为学习记忆行为上的障碍。学习和记忆是大脑最基本亦是最重要的神经功能之一。VD 的早期核心症状是记忆障碍。水迷宫测试结果显示:正常组与假手术组无差异($P>0.05$),说明假手术组的操作对实验结果无明显影响。与模型组相比,滋肾活血组 EL 缩短($P<0.05$),跨越平台次数增多($P<0.05$),说明滋肾活血方可以改善 VD 大鼠的学习和记忆能力。

许多学者认为海马是学习、记忆等高级神经活动的重要部位。海马损伤的动物记忆力明显下降,而引起 VD 的重要原因之一便是海马损伤^[12]。海马 CA1 区是海马结构中学习与记忆关系最为密切的功能区,对缺氧缺血很敏感。本研究结果发现,给予

滋肾活血方治疗后,VD 大鼠的海马 CA1 区神经元形态较模型组好转。说明滋肾活血方可能通过改善 VD 大鼠的缺氧缺血症状从而减轻海马损伤。

综上所述,滋肾活血方可能通过改善大鼠慢性脑缺血缺氧症状,减轻海马损伤,从而提高其学习和记忆能力。

参考文献:

- [1] 贾建平.神经病学[M].北京:人民卫生出版社,2013:209.
- [2] 伍大华,姚 婷,蒋军林,等.滋肾活血法治疗血管性痴呆肾阴虚血瘀证的临床研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2015,13(12):1732-1734.
- [3] Gorelick PB. Status of risk factors for dementia associated with stroke[J]. Stroke, 1997,28(2):459-463.
- [4] Huang XW, Li H, Qin DL, et al. The model of VD rats was established by the method of ligation bilateral common carotid artery at two times[J]. Chin J Gerontol, 2010, 30(14): 2006-2007.
- [5] Zhao XL, Fang XB, Li DP. Establishing vascular dementia model in rats[J]. J Chin Med Univ, 2002, 31(3): 166-167,176.
- [6] 贺石林,王 键,王净净.中医科研设计与统计学[M].第 2 版.长沙:湖南科技出版社,2001:48-49.
- [7] Wang F, Geng X, Tao HY, et al. The restoration after repetitive transcranial magnetic stimulation treatment on cognitive ability of vascular dementia rats and its impacts on synaptic plasticity in hippocampal CA1 area[J]. J Mol Neurosci, 2010,41(1):145-155.
- [8] 李伟茜,唐 农,王晋平等.血管性痴呆的中医病因病机研究进展[J].大众科技,2015,17(187):105-107.
- [9] 韦艳艳,陆 晖.中医分型论治血管性痴呆的临床研究进展[J].中医临床研究,2016,8(29):137-140.
- [10] 马婧怡,张万鑫,陈 虹,等.改良方法制备的血管性痴呆模型大鼠的学习记忆能力表现[J].中国药理学与毒理学杂志,2014,28(3):421-424.
- [11] 代永霞,马素好,马记平.独活干预血管性痴呆模型大鼠自由基和免疫炎性损伤的实验研究[J].科技展望,2015(12):205-206.
- [12] 柳振华,张 弛,张 芳,等.脑力苏对血管性痴呆小鼠海马细胞增殖及凋亡表达的影响[J].现代临床医学,2011,37(2):98-100.

(本文编辑 杨 璞)