

中风脑得平冲剂对卒中型自发性高血压大鼠出血性中风海马兴奋性氨基酸和神经元的影响*

蒋玉凤 朱陵群 黄启福 邹丽琰 李伯光 严 京

内容提要 **目的:**观察中风脑得平冲剂对出血性中风的保护作用。**方法:**采用卒中型自发性高血压大鼠(SHRsp),检测海马区兴奋性氨基酸(EAA)含量以及CA₁区神经元的病理改变。**结果:**中风脑得平冲剂可明显降低SHRsp出血性中风海马区谷氨酸(Glu)和天门冬氨酸(Asp)的含量($P < 0.05 \sim 0.01$);海马CA₁区神经元损伤程度轻;光镜显示神经元密度显著增加($P < 0.01$);超微结构显示脑组织水肿、变性和坏死均得到明显改善。**结论:**中风脑得平冲剂对SHRsp出血性中风神经元有保护作用,可能与降低EAA的含量有关。

关键词 中风脑得平冲剂 卒中型自发性高血压大鼠 海马 兴奋性氨基酸 形态学

Effect of Zhongfeng Naodeping Granule on Hippocampal Excitatory Amino Acid and Neuron of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats with Hemorrhagic Apoplexy Jiang Yufeng, Zhu Lingqun, Huang Qifu, et al
Department of Pathology, Beijing University of TCM, Beijing (100029)

Objective: To observe the effects of Zhongfeng Naodeping Granule (ZFNDPG) on hemorrhagic apoplexy. **Methods:** The stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRsp) were used to study effects of ZFNDPG on hemorrhage apoplexy. Excitatory amino acid (EAA) concentration in hippocampus sector, neuronal density and ultrastructural changes in hippocampal CA₁ sector were measured. **Results:** In pathological model group glutamate (Glu) and aspartate (Asp) concentration elevated obviously. With the ZFNDPG treating SHRsp of hemorrhagic apoplexy, Glu and Asp concentration in hippocampal sector could be markedly inhibited, compared with model group, $P < 0.05 \sim 0.01$. Neuronal morphology was observed; neurone injury was mild and neuronal density increased in hippocampal CA₁ sector of treatment group, compared with model group, $P < 0.01$. Electron microscopy showed: edema, degeneration and necrosis caused by hemorrhagic apoplexy were improved after the ZFNDPG treatment. **Conclusions:** Effects of protecting neurone for SHRsp on hemorrhagic apoplexy might be associated with that ZFNDPG inhibited concentration of EAA.

Key words Zhongfeng Naodeping Granule, stroke-prone spontaneously hypertensive rats, hippocampus, excitatory amino acid, morphology

出血性中风多由高血压病引起,出血形成的脑内血肿不仅对受损部位造成持续性损伤,而且对周围组织的压迫导致缺血性损害^(1,2),很多研究认为在海马结构中,CA₁区的选择性易损是由于兴奋性氨基酸(excitatory amino acid, EAA)增高产生“兴奋性神经毒”作用的结果⁽³⁾。本研究采用类似人类的卒中型自发性高血压大鼠(SHRsp)出血性中风动物模型,观察中风脑得平冲剂对其海马区EAA含量的影响,旨在探讨该方对神经元的保护作用。

材料与方法

1 动物 6周龄雄性SHRsp 25只,同龄雄性正常血压的Wistar-Kyoto(WKY)对照大鼠10只(中国医学科学院阜外心血管病医院动物科提供)。分笼饲养,每笼5只,室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度 $50 \pm 10\%$,光照明暗各12h。

2 药物 中风脑得平冲剂由稀莪草、制大黄、桃仁、蒲黄等组成,吉林省敦化市制药厂产,批号920822。

3 分组及给药 先将SHRsp和WKY大鼠编号、称重、测血压(RBP-1型大鼠尾压心率测定仪,北京中

*八五国家科技攻关资助项目(No.85-919-02-01)
北京中医药大学病理教研室(北京 100029)

日友好医院临床医学研究所生产), 然后饲喂特制鼠料(标准鼠料中加 5% NaCl), 自由饮水, 血压及体重每周各测 1 次。当大鼠达 10 周龄, SHRsp 动脉血压超过 30kPa, 并伴不同程度中风有神经症状⁽²⁾时, 随机将 SHRsp 分成对照组和治疗组, WKY 大鼠作为正常对照组(正常组)。治疗组(13 只)每日给予中风脑得平冲剂 0.2g/100g 体重, 溶于 1ml 水灌胃。对照组(12 只)和正常组(10 只), 每日灌胃 1ml 自来水。

4 方法 3 组大鼠持续饲药或水 1 周后(11 周龄时), 将各组存活大鼠断头处死, 迅速取脑, 在冰盘上分离脑组织, 作以下指标检测。

4.1 氨基酸含量的测定 取海马组织, 称湿重, 加 4% 磺基水杨酸 3ml 在低温下匀浆, 20000r 离心 15min, 取上清液, 在日立 L-8500 型氨基酸自动分析仪上测定游离氨基酸即 EAA(Glu 和 Asp)以及抑制性氨基酸(inhibitory amino acid, IAA)、 γ -氨基丁酸(GABA)和甘氨酸(Gly)的含量。

附表 各组大鼠海马区氨基酸含量测定结果比较 ($\mu\text{mol/g pro}$, $\bar{x} \pm s_x$)

组别	鼠数	EAA		IAA	
		Glu	Asp	GABA	Gly
正常	10	7.46 ± 0.52	1.46 ± 0.11	1.91 ± 0.25	0.85 ± 0.11
对照	7	$9.13 \pm 0.80^{**}$	$2.03 \pm 0.08^{**}$	$2.26 \pm 0.22^*$	$0.92 \pm 0.05^*$
治疗	6	$8.13 \pm 0.33^{\Delta}$	$1.70 \pm 0.12^{\Delta\Delta}$	2.05 ± 0.11	$0.78 \pm 0.02^{\Delta\Delta}$

注:与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2 各组大鼠光镜形态学及神经元密度计数 光镜下见正常组大鼠 CA₁ 区神经元多层排列, 形态结构正常, 神经纤维走行清晰。对照组大鼠 CA₁ 区神经元复层排列有明显缺失, 许多细胞深染并伴有核固缩, 有的细胞干涸, 轮廓不清或空泡变性, 神经纤维走行不清

4.2 神经元密度计数 脑冠状切面, 20% 福尔马林固定, 经常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜下观察海马 CA₁ 区神经元病理改变, 用显微测微尺测量并计数神经元密度⁽¹⁾。

4.3 神经元超微结构检查 取海马 CA₁ 区组织 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 大小, 2.5% 戊二醛固定, 经铁酸处理后常规脱水, Epon 812 树脂包埋, 超薄切片, 醋酸双氧铀染色, 日立 H-600 型透射电镜观察。

统计学处理采用 t 检验。

结 果

1 各组大鼠氨基酸含量的比较 见附表。对照组 EAA 中 Glu 及 Asp 的含量显著高于正常组大鼠($P < 0.01$), 治疗组 Glu 及 Asp 的含量亦低于对照组($P < 0.05 \sim 0.01$)。同时对照组的 IAA 中 GABA 和 Gly 含量均高于正常组($P < 0.05$), 而治疗组与对照组比 GABA、Gly 的含量亦有不同程度的降低。

楚或消失。计数 CA₁ 区神经元(个/mm), 对照组(10 只, 161.0 ± 6.6)明显低于正常组(10 只, 236.0 ± 2.90 , $P < 0.01$); 治疗组大鼠 CA₁ 区神经元接近正常形态, 神经纤维走行清晰可见, 细胞计数(10 只, 207.0 ± 4.4)比对照组显著提高($P < 0.01$)。

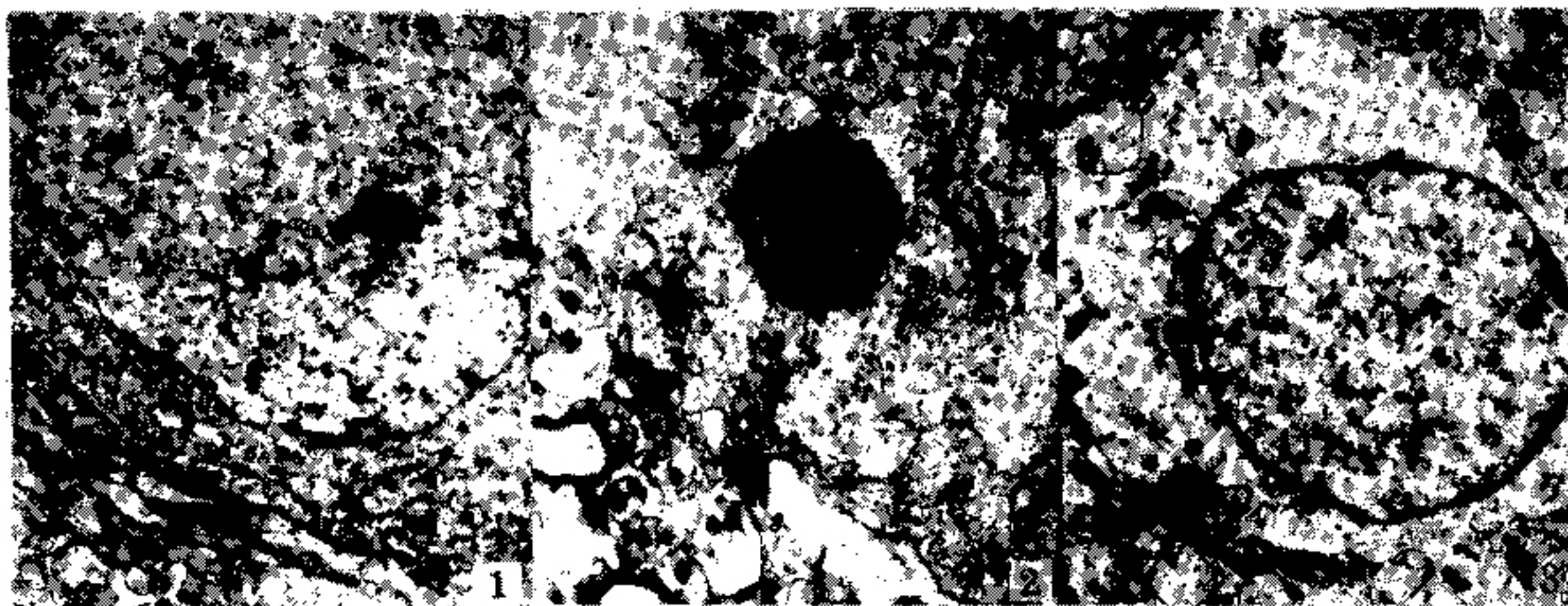


图 1 正常组大鼠神经细胞核膜完整, 核染色质分布均匀, 核仁明显, 细胞器正常; TEM $\times 5000$ 图 2 对照组大鼠神经细胞核固缩, 细胞器肿胀, 呈囊泡状扩张; TEM $\times 8000$ 图 3 治疗组大鼠神经细胞核及细胞器接近正常; TEM $\times 8000$

3 各组大鼠超微结构改变 正常组大鼠神经元形态正常,核膜完整,核染色质分布均匀,核仁明显,细胞器正常,细胞内外未见水肿(图 1)。对照组大鼠的微血管周水肿明显,神经元内外亦有明显水肿,表现为细胞器肿胀、空泡变性或扩张成不规则的腔隙或消失,有的细胞核内发生液化,或核染色质凝聚呈块状分布,甚至核浓染呈固缩(图 2)。治疗组大鼠脑水肿明显减轻,细胞器和细胞核接近正常(图 3)。

讨 论

SHRsp 是目前国际公认的较理想的高血压、脑卒中动物模型,高盐饮食可加速血压的发展和卒中的发生,我室以往的实验证实^[2],临床表现和脑部病理改变类似人类,且多为出血性卒中。随着人类脑血管病发病率的升高,可以想象,由此引起的痴呆和瘫痪等后遗症,必将给社会和家庭带来严重的负担,因此救治卒中患者,减少后遗症,研究神经元的保护剂显得更为重要。

Kirino^[1]在 1982 年观察了缺血再灌注不同时间的海马区病理改变后指出,海马 CA₁ 区细胞慢性广泛的神经脱失在缺血 3 天以后,虽比其他亚区神经元改变出现较晚,但病理损伤重。鉴于海马是脑缺血缺氧选择性易损区,且海马与学习、记忆有密切关系,那么出血性中风颅内血肿引起的继发性损伤,很可能导致海马神经元损伤,出现脑血管病性痴呆。为此,人们越来越认识到超早期(最好是 6h 内)的准确诊断,抢救治疗尤为重要,最理想的是能迅速透过血脑屏障的神经保护剂。

有文献报道,神经递质与脑缺血关系密切,局部脑缺血时兴奋性氨基酸含量增高。Rong Huang^[4]等在神经组织培养研究中发现,缺血脑组织 Glu 含量增加是以合成增加为主,Petito^[6]等也有类似结论。因此,脑组织缺血时 Glu 动态失衡,合成增多,分解减少,或细胞内向外释放过多,是导致 Glu 浓度增高的主要原因。高浓度的 EAA 对神经元有很强的神经毒性作用^[6],主要是通过激活 NMDA 受体引起神经元过度兴奋,导致 ATP 大量耗竭;此外通过激活 NMDA 受体,改变了细胞内渗透压及 Ca²⁺ 超载,致使神经元肿胀和迟发性坏死^[7]。

中风脑得平冲剂具有破血逐瘀、通络之功效,临床上用于脑出血患者疗效较好。我室在实验性兔脑血肿的研究中发现,该方可消除血肿,改善神经细胞的功能^[8]。本实验给予高盐饮食,在 SHRsp 10 周龄,血压

30kPa(225mmHg)以上,并出现不同程度神经症状^[2]时,给予中风脑得平冲剂治疗,观察出血性中风时海马神经元的形态变化,探讨神经元的病理改变是否与 EAA 增高有关。结果发现,对照组海马区 Glu 和 Asp 的含量明显升高;CA₁ 区神经元计数显著减少;光镜下 CA₁ 区神经元变性坏死明显;超微结构显示神经细胞,胶质细胞及血管水肿,细胞器肿胀导致结构不清或消失,细胞核染色质浓缩,这些形态改变均表明了 EAA 浓度升高与脑细胞损伤的一致性,说明 EAA 的毒性作用也参与了出血性中风的继发性损伤的病理过程。因此减少 Glu 和 Asp 的合成和释放,阻止 EAA 的毒性,是研究出血性中风病治疗机制的重要途径之一。应用中风脑得平冲剂治疗,发现可抑制 Glu 和 Asp 的含量,而且抑制性氨基酸 GABA 和 Gly 的升高也有不同程度的降低。病理形态学检查,可显著提高 CA₁ 区神经元数目,脑组织水肿减轻,神经元形态接近正常。这些研究资料支持 EAA 含量与病理形态变化有着平行的关系,从而表明中风脑得平冲剂治疗出血性中风的作用机制,可能是通过调节 EAA 的含量起到保护海马神经元的作用,至于具体作用何环节尚待深入研究。

参 考 文 献

1. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1982;239:57—69.
2. 蒋玉凤,黄启福,邹丽琰,等.清开灵注射液对 SHRsp 出血性中风病作用的研究. *北京中医药大学学报* 1997;20(2):34—37.
3. 许长庆,李麟仙,王子灿.兴奋性氨基酸、Ca²⁺ 在短暂性脑缺血后海马 DND 发生机制中的作用. *中国病理生理杂志* 1993;9(2):215—218.
4. Rong Huang, Leif H. Effect of anoxia on glutamate formation from glutamine in cultured neurons; dependence on neuronal subtype. *Brain Res* 1994;660:129—137.
5. Petito CK, Chung MC, Verkhovsky LM, et al. Brain glutamine synthetase increases following cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 1992;569:275—280.
6. Butcher SP, Bullock R, Graham DI, et al. Correlation between amino acids release and neuropathologic outcome in rat brain following middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1990;21:1727—1738.
7. Meyer FB. Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury. *Brain Res* 1989;14:227—243.
8. 李克玲,黄启福,朱陵群,等.中风脑得平冲剂对实验性兔脑血肿的作用. *北京中医药大学学报* 1996;19(4):22—24.

(收稿:1997-11-12 修回:1998-02-20)