

· 博士之窗 ·

# 化呆醒神汤对大鼠血管性痴呆模型 SS、AVP 含量及 SSmRNA 表达的影响

张 力<sup>△</sup> 王洪图

**内容提要** 目的:为了探讨化呆醒神汤治疗血管性痴呆的作用机制。方法:采用反复缺血再灌注方法复制血管性痴呆(VD)动物模型,以具有调理脾胃、消痰化瘀功效的化呆醒神汤进行治疗,并以喜得镇作为阳性对照。结果:VD大鼠海马和皮层内脑内生长抑素(SS)、精氨酸加压素(AVP)含量均显著减少,额叶皮质内SSmRNA表达强度明显下降,化呆醒神汤对VD大鼠海马内SS、AVP含量及额叶皮质内SSmRNA表达强度有明显的上调作用,且对SS含量及SSmRNA表达强度的上调作用优于对照组。结论:化呆醒神汤通过提高前体mRNA的合成能力并增加AVP含量,增加神经营养作用,促进受损神经元功能的恢复,从而改善VD大鼠的智能障碍。

**关键词** 化呆醒神汤 血管性痴呆 神经肽 原位杂交

**Effect of Huadai Xingshen Decoction on Cerebral Somatostatin, Arginine Vasopressin and Somatostatin mRNA Expression in Vascular Dementia Rat Model** ZHANG Li, WANG Hong-tu *Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100029)*

**Objective:** To study the mechanism of Huadai Xingshen Decoction (HDXSD) in treating vascular dementia (VD). **Methods:** Rat model of VD was established by repeated ischemia/reperfusion and treated with HDXSD. Hydergine was taken for positive control. The content of somatostatin (SS), arginine vasopressin (AVP) and SS mRNA expression model rat's cortex and hippocampus were observed. **Results:** The SS and AVP contents of cortex and hippocampus in model rats were decreased significantly, and the SSmRNA expression in cortex of frontal lobe reduced, too. HDXSD showed an up-regulation on the above-mentioned parameters, and the effect on SS cortex and SS mRNA expression was higher than that of hydergine. **Conclusion:** HDXSD improves intellectual impairment of VD rats by increasing the synthetic ability of SSmRNA and content of AVP, which in turn improve the neurotrophic effect and promote the restoring function of injured neuron.

**Key words** Huadai Xingshen Decoction, vascular dementia, neuropeptide, in situ hybridization

化呆醒神汤是以《内经》“五脏藏神”理论为指导,具有调理脾胃、消痰化瘀功效的临床治疗血管性痴呆经验方。为了进一步探讨其作用机制,为临床使用中医药治疗血管性痴呆提供可靠的实验依据,我们运用血管性痴呆动物模型观察了化呆醒神汤对其脑内生长抑素(somatostatin, SS)、精氨酸加压素(arginine vasopressin, AVP)含量及SS mRNA表达的影响。

## 材料与方 法

1 动物 二级 Wistar 雄性大鼠,体重 200 ~

250g,由解放军 309 医院实验动物中心提供。

2 药物 本实验所用化呆醒神汤由草果、知母、大黄、川芎、半夏等组成,经鉴定后使用。按临床用药剂量取组成药物各 80g 置于 1000ml 的烧杯中,加入 70% 乙醇 500ml 浸泡 7 天,将药渣滤掉,利用乙醇自动回收装置将乙醇回收,已不含乙醇的中药用脱脂棉及滤纸过滤,药液提取浓缩到 80ml,生药含量为 1g/ml,置 4℃ 冰箱保存备用。喜得镇(hydergine)为阳性对照药,系瑞士山德士药厂与天津华津制药厂合作产品,每片 1mg,用前用双蒸水配成混悬液(0.32mg/ml),置 4℃ 冰箱保存备用,用前摇匀。

## 3 方法

3.1 改良后大鼠血管性痴呆模型的建立 参照

北京中医药大学(北京 100029)

<sup>△</sup>博士研究生,现在中国医药科技出版社(北京 100088)

文献<sup>[1,2]</sup>方法并加以改良,以 10% 水合氯醛(0.3ml/100g 体重)给大鼠腹腔注射进行麻醉,腹卧位固定于手术板上,无菌经背部颈后正中切口,暴露第一颈椎横突双侧翼小孔,直视下电凝,永久性闭塞双侧椎动脉;然后使动物仰卧位固定于手术板上,颈正中切口,分离双侧颈总动脉,其下放置丝线并外置备用。在动物清醒状态下,藉外置丝线提起已游离的双侧颈总动脉,用无损伤微动脉夹夹闭双侧颈总动脉 3 次,每次 5min,间隔 1h,最后松开微动脉夹保持再灌注状态,缝合肌肉、皮肤,术后肌肉注射青霉素 40 万 u/只以预防感染,放回笼中观察饲养。假手术组除不电凝椎动脉,不夹闭颈总动脉外,其他处理方法相同。

3.2 分组及给药方法 假手术组(9 只),蒸馏水灌胃,每天 5ml/kg 体重。将造模大鼠随机分为模型组(12 只),蒸馏水灌胃,每天 5ml/kg 体重;中药组(12 只),化呆醒神汤灌胃,每天 5g/kg 体重;西药组(9 只),喜得镇混悬液灌胃,每天 0.32mg/kg 体重。术后当天即用药,连续给药 30 天后,进行行为学试验,并进行相应的指标测定。

#### 4 观察指标和测定方法

4.1 脑内神经肽含量的测定 大鼠断头后立即取全脑,置沸生理盐水中煮 5min,取出。用滤纸吸干附着的液体后,分离海马、皮层,分别称重后加入 1mol/L HCl 1ml,充分匀浆后倒入塑料指形管中,室温放置 100min,再加入 1mol/L NaOH 1ml,4℃ 离心(4 000r/min,10min)取上清液,置 -70℃ 冰箱保存。海马、大脑皮层内 SS、AVP 含量测定采用放免法,试剂盒为美国 Peninsula 公司产品,按照药盒说明书操作。

4.2 前额叶皮层内 SS mRNA 的表达 大鼠经 10% 水合氯醛(0.4ml/100g)麻醉后,立即打开胸腔,暴露心脏,经左心室插管至升主动脉,首先灌注 150ml 预冷的灭菌生理盐水,然后灌注预冷的 250ml 4% 多聚甲醛溶液,约 30min。取脑,置 4℃ 固定液中固定 6~12h,然后浸入 4℃ 20% 蔗糖溶液中。保存至组织块下沉后,取前额叶皮层,液氮骤冷,于 -20℃ 在 LEICA-CM 1900 型恒冷箱切片机中冠状切片,片厚 30μm,切

片再入相应固定液中固定 4~6h。地高辛标记生长抑素原位杂交试剂盒由上海第二军医大学提供,按照试剂盒说明书操作。

4.3 图像分析 每只大鼠取相同断面的 3 张切片,每张切片选取 3 个视场,采用 CMIAS8 真彩色病理图像分析系统进行分析,统计每个视场中阳性反应的目标数和平均光密度。

5 统计学方法 结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,用两样本均数的 *t* 检验比较组间差异的显著性。

### 结 果

1 各组大鼠海马、大脑皮层内 SS、AVP 的含量变化 见表 1。与假手术组比较,模型组 SS、AVP 含量均显著降低(均  $P < 0.01$ );与模型组比较,中药组、西药组 SS 含量均显著增多( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),两治疗组比较,中药组 SS 含量较多,经统计学分析差异有显著性( $P < 0.05$ );中药组、西药组 AVP 含量均显著增多( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),两治疗组比较,中药组大脑皮层内 AVP 含量略高于西药组,但经统计学分析差异无显著性( $P > 0.05$ ),西药组海马内 AVP 含量较多,经统计学分析差异有显著性( $P < 0.05$ )。

2 各组大鼠前额叶皮层 SS mRNA 表达及定量分析 见表 2。地高辛标记的 SS cRNA 探针与其互补的 mRNA 杂交,经碱性磷酸酶显色后阳性神经细胞呈蓝紫色。前额叶皮质 II~III 层均含有大量 SS mRNA 阳性细胞,呈圆形或卵圆形,胞浆着色,胞核一般不着色。两种对照试验结果均为阴性,说明本方法有特异性。各组大鼠前额叶皮层 SS mRNA 表达定量分析结果表明,与假手术组比较,模型组 SS mRNA 阳性神经元数量显著减少( $P < 0.01$ );与模型组比较,中药组、西药组 SS mRNA 阳性神经元数量均显著增多( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),两治疗组比较,中药组 SS mRNA 阳性神经元数量较多( $P < 0.05$ )。与假手术组比较,模型组 SS mRNA 神经元光密度显著下降( $P < 0.05$ );与模型组比较,中药组、西药组 SS mRNA 神经元光密度均显著增高(均  $P < 0.05$ ),中药组高于西药组,但经统计学分析差异无显著性( $P > 0.05$ )。

表 1 各组大鼠海马、大脑皮层内 SS、AVP 含量比较 (pg/mg,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	海马		大脑皮层	
		SS	AVP	SS	AVP
假手术	9	163.21 ± 21.23	5.97 ± 0.32	167.33 ± 17.12	5.47 ± 0.76
模型	12	111.14 ± 12.31*	2.79 ± 0.17*	106.27 ± 19.23*	1.32 ± 0.13*
中药	12	160.23 ± 18.92 <sup>△△</sup>	4.03 ± 0.72 <sup>△△</sup>	163.27 ± 21.31 <sup>△△</sup>	4.98 ± 0.37 <sup>△</sup>
西药	9	139.27 ± 12.12 <sup>△</sup>	5.64 ± 0.16 <sup>△△</sup>	146.23 ± 16.21 <sup>△</sup>	4.51 ± 0.19 <sup>△</sup>

注:与假手术组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup> $P < 0.01$ ;与西药组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$

表2 各组大鼠前额叶皮层 SS mRNA 阳性神经元数目及平均光密度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	神经元数目(个/视区)	平均光密度(OD值)
假手术	9	13.19±1.23	170.13±21.17
模型	12	3.17±1.18**	123.45±11.70*
中药	12	10.12±1.27 <sup>△△</sup> ▲	160.15±9.71 <sup>△</sup>
西药	9	7.83±1.02 <sup>△</sup>	147.16±12.31 <sup>△</sup>

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup> $P < 0.01$ ;与西药组比较,▲ $P < 0.05$

## 讨 论

化呆醒神汤是以草果知母汤为基础方化裁,由草果、知母、大黄、川芎、半夏等药物组成的临床治疗血管性痴呆的经验方。方中以草果温太阴独盛之寒,知母泻阳明独盛之热,两者调理脾胃气机,大黄泻下逐瘀,川芎行气活血,半夏燥湿化痰,全方共奏调理脾胃、消痰逐瘀之功,使脾胃气机通畅、痰浊瘀血消散,脾胃的中枢枢转功能正常,则其他脏腑气机得以调整,从而达到治疗血管性痴呆的目的。为了对本方的作用机理进行深入的探讨,我们选择了 AVP 和 SS 这两种与学习记忆密切相关的神经肽作为研究对象。

神经肽(neuropeptides)是具有生物活性的多肽,广泛分布于脑内。AVP 细胞集中于下丘脑的视上核和室旁核,SS 则广泛分布于中枢神经系统,在下丘脑含量最高,大脑皮层、边缘系统含量也相当丰富。神经肽在血管性痴呆发病过程中的作用日益受到人们的关注。近年研究表明,AVP 在大鼠中枢神经系统中影响学习行为,还可能有促进记忆的巩固和回忆过程的作用,可延缓大鼠主动回避反应的消退,增强被动回避反应的巩固和再现<sup>(3-5)</sup>。本实验研究结果表明,与假手术组比较,模型组海马、皮层内 AVP 含量均显著降低,说明脑内 AVP 含量降低与动物学习记忆障碍有关。与模型组比较,中药组和西药组海马、皮层内 AVP 含量均明显增加,中药组皮层内 AVP 含量略大于西药组,西药组海马内 AVP 含量明显高于中药组,说明两药物对皮层的 AVP 作用相当,而西药对海马的 AVP 作用优于中药。

SS 是含有 14 个氨基酸残基的环状多肽,广泛分布于中枢神经和周围神经系统,也存在于许多外周器官,特别是胃肠道和胰腺内。SS 作为一种神经递质或

调质参与学习记忆过程,有关研究资料表明,在多发性脑梗塞性痴呆、Alzheimer 病和 Parkinson 病痴呆等疾病中,脑脊液和血浆中 SS 含量明显降低,且痴呆程度越重,血浆中 SS 含量越低<sup>(6)</sup>。本实验研究采取的大鼠反复脑缺血再灌注致 VD 模型,用放免法检测皮层、海马中 SS 含量,结果表明脑内 SS 含量降低可能与动物学习记忆障碍有关,中药组皮层、海马内 SS 含量均明显高于西药组。以原位杂交组化法检测对前额叶皮层 SS mRNA 表达的影响,模型组 SS mRNA 表达强度明显下降,皮层内 SS 减少很可能并不是由于 SS 的消耗增加,而是由于其合成能力,即其前体 mRNA 基因表达降低所致。中药组、西药组 SS mRNA 表达强度均显著增强,且中药对前额叶皮层 SS mRNA 表达强度的上调作用优于西药。模型组神经元的正常功能受到损害,而两组药物对神经元功能有上调作用,增加的 SS 可以产生神经营养作用,促进受损神经元功能的恢复。

由此可见,通过增加海马和皮层内 AVP、SS 含量是化呆醒神汤治疗血管性痴呆的可能机制,但尚待进一步深入研究。

## 参 考 文 献

1. Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanaesthetized rat. *Stroke* 1979;10:267—271.
2. 贾健民,贾健平,张 昱,等. Wistar 大鼠全脑反复缺血再灌流动物模型及行为学研究. *中风与神经疾病杂志* 1992;9(2):71—73.
3. Koob GF, Dantzer R, Bluthé RM, et al. Central injections of arginine vasopressin prolong extinction of active avoidance. *Peptides* 1986;7:213—218.
4. Liu RY, Lin C, Du YC. Facilitation of arginine vasopressin analogs on learning and memory in rats. *Acta Pharmacol Sci* 1990;11:97—100.
5. Mei ZT, Duan SH. Central sites for the facilitating facts of arginine vasopressin (AVP) on learning process in rats. *Chin J Physiol Sci* 1991;7:99—103.
6. Molins A, Catalan R, Sahuquillo J, et al. Somatostatin cerebrospinal fluid levels in dementia. *J Neurol* 1991;238:168—171.

(收稿 2001-01-21 修回 2001-04-24)

1. 河南医科大学第一附属医院泌尿外科(郑州 450052);2. 上海第一人民医院泌尿外科

<sup>△</sup>博士研究生  
万方数据