

①

## 脑心通胶囊对血管性痴呆大鼠 CGRP 的影响

刘石梅<sup>1</sup>, 苏南湘<sup>2</sup>, 何明大<sup>2</sup>, 王 哲<sup>2</sup>

(1. 佛山市顺德区伍仲佩纪念医院老年科, 佛山 528333; 2. 中南大学湘雅二医院中医科, 长沙 410011)

**[摘要]** 目的:探讨脑心通胶囊对血管性痴呆(vascular dementia, VD)大鼠学习记忆障碍的作用及对降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)的影响。方法:采用大脑中动脉梗塞法制成VD模型,将造模成功的大鼠随机分为脑心通组(以下简称中药组)、西药组和模型组,另设假手术组和正常组,进行相关治疗后以Morris水迷宫进行行为学检测,定量测定其学习记忆成绩;用Nissl染色观察其细胞形态的变化;用免疫组织化学法检测CGRP表达水平的变化。结果:中药复方脑心通胶囊可以改善VD大鼠学习记忆能力,防止海马CA1区锥体细胞死亡,同时能增加海马区域CGRP阳性细胞数和降低其灰度值。其大鼠海马CA1区内的CGRP免疫阳性细胞数明显多于模型组( $P < 0.05$ )。结论:脑心通胶囊能提高海马CGRP阳性神经元数目,对VD大鼠海马神经元起保护作用,这可能是其改善VD大鼠学习记忆能力的部分作用机制。

**[关键词]** 降钙素基因相关肽; 血管性痴呆; Morris水迷宫; 脑心通胶囊

**[中图分类号]** R742 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2007)05-0899-05

## Effect of Naoxintong capsules on calcitonin gene-related peptide of vascular dementia in rats

LIU Shi-mei<sup>1</sup>, SU Nan-xiang<sup>2</sup>, HE Ming-da<sup>2</sup>, Wang Zhe<sup>2</sup>

(1. Department of Geriatrics, Wuzhongpei Memorial Hospital, Shunde District, Fushan 528333; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the effect of Naoxintong capsules on learning and dysmnesy and calcitonin gene-related peptide (CGRP) about vascular dementia (VD) in rats. **Methods** The model of vascular dementia rats were built by middle cerebral artery occlusion (MCAO), and then the rats were randomly divided into a Naoxintong group (that was traditional Chinese medicine group, TCM group), a Western medicine group, a model group, a sham operation group, and a normal group. After corresponding treatment, the rats' behaviors were detected by Morris water maze experiment to obtain their performance record of learning and memory. The changes of cell morphology were detected by Nissl stain. The expression of CGRP in the hippocampus was measured with immunohistochemical staining. **Results** The masculine cells about CGRP of the TCM group were more than those of the model one ( $P < 0.05$ ). Naoxintong capsules improved the ability of learning and memory in vascular dementia rats, prevented the pyramidal cells on CA1 field in hippocampus from deceasing, increased the number of masculine cells about CGRP, and deceased the gray scale value. **Conclusion** Naoxintong capsules can raise the number of masculine nerve cells of CGRP, protect the pyramidal cells of VD rats, and lessen their learning and dysmnesy, which may be part of the mechanism of improving learning and memory capacity of VD model in rats.

**Key words:** calcitonin gene-related peptide; vascular dementia; morris water maze experiment; naoxintong capsule

[J Cent South Univ (Med Sci), 2007,32(5):0899-05]

①收稿日期 (Date of reception) 2006-09-25

作者简介 (Biography) 刘石梅 (1979-), 女, 湖南娄底人, 硕士, 主要从事中西医结合神经内科疾病研究。

通讯作者 (Corresponding author) 刘石梅, E-mail: lshimei1217@126.com

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是指各种脑血管疾病引起的脑功能障碍而产生的获得性智能损害综合征,主要与缺血性脑血管病有关<sup>[1-2]</sup>。近年来免疫组织化学技术的发展进一步证实脑血管受某些肽能神经的支配。本实验采用大脑中动脉梗塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)法制成VD大鼠模型,观察脑心通胶囊对模型大鼠学习记忆及海马降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)表达的改变,旨在探讨该复方对VD的干预机制。

## 1 材料与方法

1.1 动物选择与分组 雌雄兼半健康SD大白鼠50只,体质量200~220g,由中南大学湘雅二医院动物实验中心供给,合格证号为SYXK(湘)-2004-0013。组间鼠龄、性别、体质量无统计学差异,实验条件下自然饮食,适应环境1周后进行实验。

1.2 主要试剂与药物 多聚甲醛(天津市化学试剂研究所);胶冻剂(美国Thermo Shandon);Triton液(德国SeaSkyBio公司);SABC即用型免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);兔抗CGRP多克隆抗体(美国SeroTec);DAB显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司);苏木素(美国Sigma公司);脑心通胶囊(咸阳步长制药有限公司),由黄芪、牛膝、丹参、桃仁、红花、乳香等16味中药组成,批号:050103,湘雅二医院制剂科配制(配成生药浓度为0.05kg/L的混悬液,药物配制后置4℃冰箱保存备用,用前摇匀);喜德镇批号:030317(用前用双蒸水经超声细胞粉碎机制成浓度为0.0625g/L的混悬液,药物配制后置4℃冰箱保存备用,用前摇匀)。

1.3 动物模型制备及给药方法 采用改良线栓法<sup>[3]</sup>制成近似人类学习记忆障碍的血管性痴呆大鼠模型。造模成功的标志是术后动物出现同侧Horner's征及动物麻醉清醒后出现以左前肢为主的偏瘫。将造模成功的大鼠随机分成中药组、西药组和模型组。另设正常组大鼠不作任何手术处理,假手术组只结扎颈内动脉及颈外动脉,每组10只。中药组给予脑心通灌胃0.5g/(kg·d),西药组给予喜德镇灌胃0.625mg/(kg·d),模型

组、假手术组和正常组均给予蒸馏水1mL/100g灌胃。术后第1天即用药,每日灌胃1次,连续28d。

1.4 学习记忆测试 给药28d后,用Morris水迷宫训练,该训练包括隐匿平台搜索实验和探索实验。动物熟悉平台2次后,每只动物每天上下午各训练1次,连续训练3d,分别得到潜伏期数据和探索实验数据,该数据反映动物的学习与记忆能力。为排除感觉或运动功能障碍对空间学习记忆的影响,最后进行可见平台实验。

1.5 Nissl染色及免疫组织化学检测 Morris水迷宫测试结束后,每组按常规灌注5只做海马组织冠状连续冰冻切片,厚15μm。每只大鼠选3张有海马CA1区的切片用10%的甲苯胺蓝进行Nissl染色,观察其细胞形态的变化;每只大鼠选5张有海马CA1区的切片做免疫组织化学检测,CGRP一抗抗体稀释度为1:448,操作步骤按免疫组化试剂盒说明书进行,阳性反应产物应呈黄色颗粒,沉淀于抗原所在部位,用PBS代替一抗作为阴性对照。每张切片在400倍光镜下选位置大致相同的海马视野,共25个视野。采用阳性细胞计数法,计数其中每个视野的CGRP阳性细胞数,取均值作为各组的阳性细胞数。运用MIAS-300全自动图像分析仪灰度调节后,按设定程序自动测出阳性神经元终末灰度值。

1.6 统计学处理 所得数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;各组间比较采用单因素方差分析,两两比较用LSD-*t*检验,用SPSS11.0统计软件进行处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 行为学测试 Morris水迷宫实验结果见表1,在隐匿平台搜索实验中,模型组的逃避潜伏期最长,明显长于正常组( $P < 0.05$ );而中药组的逃避潜伏期短于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );在探索实验中,模型组的动物存在明显记忆障碍,每分钟穿越隐匿平台位置平均次数最少,并且常有朝向错误,与正常组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );中药组的平均探索次数明显多于模型组,两者比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。可见平台实验中,各组动物的逃避潜伏期

没有明显的组间差异 ( $P > 0.05$ )。

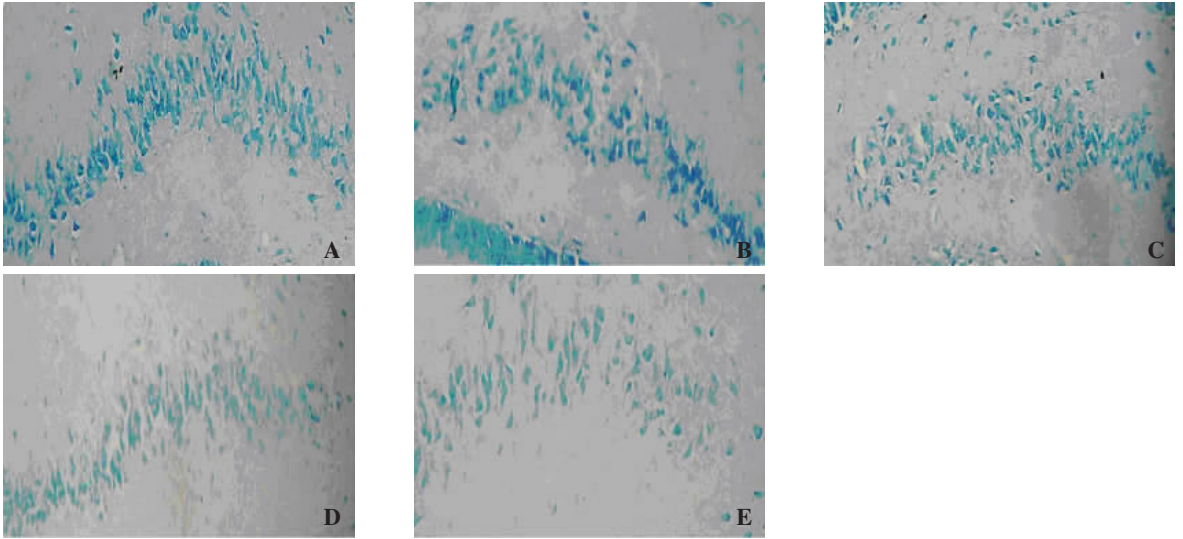
**2.2 Nissl 染色** Nissl 染色后,正常组和假手术组大鼠的海马锥体细胞胞浆内尼氏体丰富,细胞排列整齐;模型组大鼠海马锥体细胞胞浆内尼氏体减少或缺如,核固缩深染;两治疗组大鼠海马锥体细胞中尼氏体较丰富,有少数细胞核固缩深染;表明中药复方脑心通胶囊能减少锥体细胞死亡,减轻缺血对海马的损伤(图1)。

**表 1** Morris 水迷宫实验结果( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

**Table 1** Experimental results of Morris water maze ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

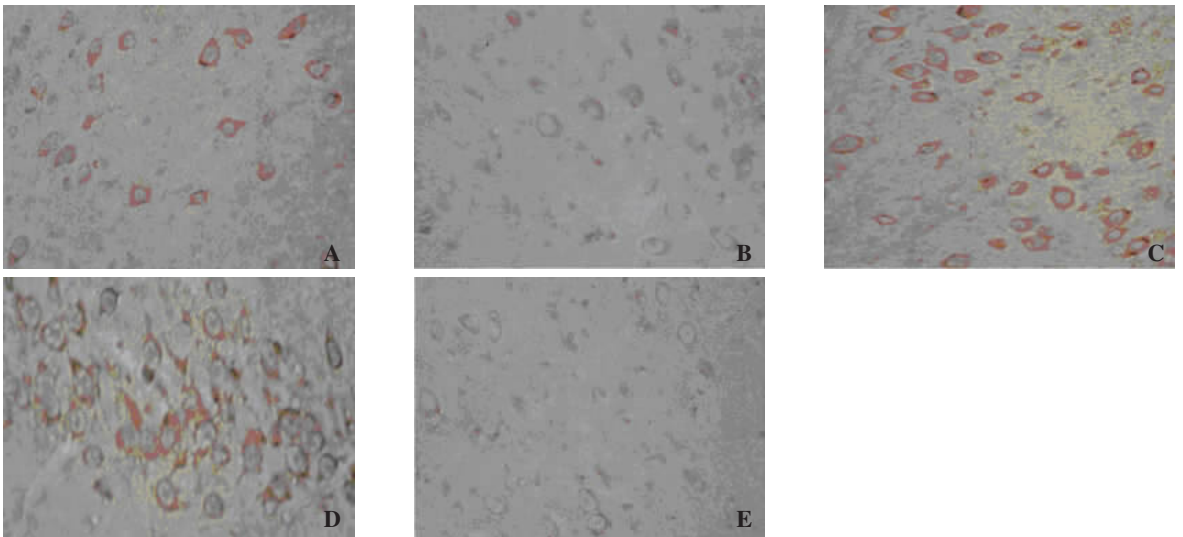
组别	隐匿平台搜索实验(s)	探索实验(次/min)	可见平台实验(s)
正常组	7.73 ± 3.45▲	16.24 ± 5.41▲	11.43 ± 5.46
假手术组	8.79 ± 4.06▲	14.86 ± 3.97▲	11.23 ± 2.43
中药组	17.06 ± 7.10*▲	8.70 ± 1.27*▲	12.98 ± 5.57
西药组	20.56 ± 8.98*▲	8.84 ± 2.50*▲	10.16 ± 6.74
模型组	29.05 ± 13.75*	4.55 ± 0.89*	12.01 ± 4.26

与正常组比较,\*  $P < 0.05$ ;与模型组比较,▲  $P < 0.05$



**图 1** 海马 CA1 区锥体细胞 Nissl 染色图( $\times 200$ ) A: 正常组;B: 假手术组;C: 中药组;D: 西药组;E: 模型组

**Fig. 1** Nissl staining of pyramidal cells on CA1 field ( $\times 200$ ) A: Normal group; B: Sham operation group; C: TCM group; D: Western medicine group; E: Model group



**图 2** 海马 CA1 区锥体细胞 CGRP 免疫组织化学染色(SABC,  $\times 400$ ) A: 正常组 CGRP 阳性表达;B: 假手术组 CGRP 阳性表达;C: 西药组 CGRP 阳性表达;D: 中药组 CGRP 阳性表达;E: 模型组 CGRP 阳性表达

**Fig. 2** Immunohistochemistry staining of CGRP about pyramidal cells on CA1 field in hippocampus (SABC,  $\times 400$ ) A: Positive expression of CGRP in normal group; B: Positive expression of CGRP in sham operation group; C: Positive expression of CGRP in western medicine group; D: Positive expression of CGRP in TCM group; E: Positive expression of CGRP in model group

2.3 免疫组织化学检测 在光镜下,CGRP 蛋白反应产物呈黄色颗粒状,位于细胞膜和细胞浆内,细胞核为阴性;阳性细胞主要集中分布于 CA1 区锥体细胞层,故以此部位做阳性细胞计数及图像分析。从图 2 可以看出,模型组大鼠海马 CA1 区内有少量 CGRP 免疫阳性细胞表达,与正常组相比,有显著差异( $P < 0.05$ )。而两治疗组大鼠海马 CA1 区内的 CGRP 免疫阳性细胞明显多于模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );两治疗组之间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(表 2)。模型组海马 CA1 区域内的灰度值最大,与其余四组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。而中药组与模型组比较,灰度值明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。由上可以看出脑心通胶囊能增强 VD 大鼠海马 CA1 区 CGRP 的表达。

表 2 各组大鼠海马区域 CGRP 免疫反应比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of immune reaction about hippocamp sector with CGRP in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	阳性细胞数	灰度值
正常组	5	14.23 ± 0.55▲	67.76 ± 7.13▲
假手术组	5	12.87 ± 0.64▲	67.55 ± 6.32▲
模型组	5	5.28 ± 1.06*	76.98 ± 3.93*
中药组	5	20.99 ± 1.08*▲	39.87 ± 0.86*▲
西药组	5	23.99 ± 3.86*▲	37.58 ± 8.04*▲

与正常组比较,\*  $P < 0.05$ ;与模型组比较,▲  $P < 0.05$

### 3 讨 论

血管性痴呆是老年期痴呆的一种重要类型,脑缺血造成海马损伤引起学习记忆能力下降是发生 VD 的重要原因。而海马是缺血损伤最敏感脑区,直接参与信息贮存和回忆,是脑内参与记忆贮存功能的重要部分,为 VD 研究中涉及最多的脑区之一,其 CA1 区在学习记忆中起重要作用<sup>[4-5]</sup>。赵建新等关于血管性痴呆的实验发现,小鼠海马结构的病理改变与学习记忆功能密切相关,并认为海马 CA1 区锥体细胞的迟发性死亡可能是缺血性脑血管病导致痴呆的主要原因<sup>[6]</sup>,即使短暂的脑缺血也可造成锥体细胞延迟性神经元死亡<sup>[7]</sup>。因此本实验通过对海马 CA1 区锥体细胞进行 Nissl 染色,发现该区中药组的尼氏体较模型组丰富,有少数细胞核固缩深染,表明脑心通胶囊可以保护缺血对 CA1 区锥体细胞的损伤。Morris 水迷宫实验表明该复方可以改善 VD 大鼠的学习记忆能力。

CGRP 是由 37 个氨基酸残基组成的,参与神经系统功能作用的内源性活性物质,是一种强烈舒血管作用的神肽,对血管有不同程度的扩张

作用,尤其是对心脑血管的作用更为显著。它可逆转血管痉挛,改善血液循环,广泛分布于中枢和外周神经系统,具有多种生理调节功能,在神经损伤修复时呈现特征性表达的变化。研究发现<sup>[8]</sup>,CGRP 可促进海马神经细胞的生长发育,而且对大鼠海马区域缺氧损伤具有明显的保护作用,延缓缺氧导致的突触功能不可逆损伤的发生。本研究发现中药组海马 CA1 区域内 CGRP 免疫阳性细胞表达明显多于模型组,而灰度值明显低于模型组,这可能与脑心通胶囊能促进 VD 大鼠海马内 CGRP 表达有关,CGRP 能扩张血管,逆转血管痉挛,改善血液循环,保护缺氧损伤的大鼠海马区域,延缓缺氧导致的突触功能不可逆损伤的发生。

VD 属于中医学“善忘”、“文痴”、“呆病”等范畴,病位在脑,病机主要为气血亏虚、肝肾不足或气滞血瘀而导致气血不能荣养脑窍,进而髓海失聪所致。本实验证明,中药组和西药组都可改善大鼠学习记忆能力。喜德镇化学名为甲磺酸双氢麦角毒碱片,为改善脑循环和脑代谢的药物,临床上可用于轻中度血管性痴呆。脑心通胶囊由黄芪、牛膝、丹参、桃仁、红花、乳香等 16 味中药组成,共奏益气活血、化瘀通络之效。现代药理表明,黄芪有扩张血管作用;动物实验结果表明,黄芪对动物缺氧现象有不同程度的对抗作用,能改善脑部微循环<sup>[9]</sup>,丹参可扩张血管,改善微循环<sup>[10-11]</sup>,对脑缺血性损伤具有很好的保护作用<sup>[12-13]</sup>,川芎能扩张小血管,减小脑血管阻力,增加脑血流量,改善微循环<sup>[14]</sup>,葛根也能扩张血管,增加脑血流量<sup>[15]</sup>。

上述实验结果表明,脑心通胶囊可使拟血管性痴呆大鼠的学习记忆能力得以提高,其机制可能与该复方能使海马脑组织内 CA1 区 CGRP 表达增强,发挥 CGRP 对 VD 大鼠海马神经元的保护作用,从而减轻 VD 大鼠学习记忆障碍有关。

#### 参考文献:

- [1] 黄红莉,陈保健,周昊.血管性痴呆[J].基础医学与临床,1998,18(5):26-30.  
HUANG Hong-li, CHEN Bao-jian, ZHOU-Hao. Vascular dementia[J]. Basic Med Sci Clin,1998,18(5):26-30.
- [2] 邓医宇,曾红科,田代实,等.诱导型一氧化氮合酶在血管性痴呆大鼠海马中的表达[J].中华急诊医学杂志,2004,13(9):606-609.  
DENG Yi-yu, ZENG Hong-ke, TIAN Dai-shi, et al. The

- expression of induction-type nitricoxide synthase in hippocamp of vascular dementia rats [ J ]. Chin J Emerg Med, 2004, 13 ( 9 ): 606-609.
- [ 3 ] 尹军祥,田金洲,黄启福,等. MCAO 拟血管性痴呆大鼠模型的建立 [ J ]. 中国病理生理杂志, 2003, 19 ( 8 ): 1144-1147.
- YIN Jun-xiang, TIAN Jin-zhou, HUANG Qi-fu, et al. The model of vascular dementia rats was built by MCAO [ J ]. Chin J Pathophysiol, 2003, 19 ( 8 ): 1144-1147.
- [ 4 ] Mani P B, Lohr J B, Jeste D V. Hippocampal pyramidal cells and aging in the human: a quantitative study of neuronal loss in sectors CA1 to CA4 [ J ]. Exp Neurol, 1986, 94 ( 1 ): 29-40.
- [ 5 ] 张雪朝,贺志光,吕明庄,等. 血管性痴呆大鼠记忆障碍与海马 Bcl-2 蛋白表达的研究 [ J ]. 中国病理生理杂志, 2002, 18 ( 10 ): 1295, 1312.
- ZHANG Xue-zhao, HE Zhi-guang, LÜ Ming-zhuang, et al. The research on dysmnesis of vascular dementia rats and protein expression of hippocamp about Bcl-2 [ J ]. Chin J Pathophysiol, 2002, 18 ( 10 ): 1295, 1312.
- [ 6 ] 赵建新,田元祥,李国明,等. 脑缺血再灌注拟血管性痴呆小鼠皮层及海马细胞病理形态学动态观察 [ J ]. 中风与神经疾病杂志, 2000, 17 ( 4 ): 200-202.
- ZHAO Jian-xin, TIAN Yuan-xiang, LI Guo-ming, et al. The dynamic observation of stratum corticale and cells pathomorphology about hippocamp of vascular dementia mice when the brain tissues were cerebral ischemia and reperfusion [ J ]. J Apoplexy Nervous Dis, 2000, 17 ( 4 ): 200-202
- [ 7 ] Abe K, Aoki M, Kawagoe J, et al. Ischemic delayed neuronal death: A mitochondrial hypothesis [ J ]. Stroke, 1995, 26 ( 8 ): 1478-1489.
- [ 8 ] Deruz B J, Fertig K C, Filiano A J, et al. Hypothermic reperfusion after cardiac arrest augments brain-derived neurotrophic factor activation [ J ]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22 ( 7 ): 8436-851.
- [ 9 ] 洪新和,吴爱群,由振东,等. 丹参对新生期大鼠缺氧缺血性脑损伤神经肽 Y136 和降钙素基因相关肽的影响 [ J ]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22 ( 8 ): 607-609.
- HONG Xin-he, WU Ai-qun, YOU Zhen-dong, et al. The effect on neuropeptide Y136 and Calcitonin gene-related peptide about danshen root when the rats had hypoxia and ischemic brain injured at new life stage [ J ]. Chin J Integ Trad West Med, 2002, 22 ( 8 ): 607-609.
- [ 10 ] 张辉,薛贵平,邢立强,等. 脑挫裂伤的形态学变化及丹参治疗作用的观察 [ J ]. 神经解剖学杂志, 2002, 18 ( 2 ): 143-146.
- ZHANG Hui, XUE Gui-ping, XING Li-qiang, et al. The morphology change of contusion and laceration of brain and the observation of therapeutical effect about danshen root [ J ]. Chin J Neuroanat, 2002, 18 ( 2 ): 143-146.
- [ 11 ] 陈建常,王乐农,史振满. 肢体缺血再灌注致肺损伤及丹参的保护作用 [ J ]. 中国急救医学, 2001, 21 ( 1 ): 8-9.
- CHEN Jian-chang, WANG Le-nong, SHI Zhen-man. The research on injury of lungs due to ischemia and reperfusion of limbs and the protection of danshen [ J ]. Chin J Crit Care Med, 2001, 21 ( 1 ): 8-9
- [ 12 ] Mattson M P, Kumar K N, Wang H, et al. Endogenous neuroprotection factors and traumatic brain injury: mechanisms of action and implications therapy [ J ]. J Neurotrauma, 1994, 11 ( 1 ): 3-33.
- [ 13 ] Cuevas P, Carceller F, Gamenez Gallego G, et al. Intravenous fibroblast growth factor penetrates the blood-brain barrier and protects hippocampal neurons against ischemia-reperfusion injury [ J ]. Surg Neurol, 1998, 49 ( 1 ): 77-84.
- [ 14 ] 邵国富,包仕尧,苏海洪,等. 脑缺血和再灌注时脑组织的改变及药物的影响 [ J ]. 中华神经精神科杂志, 1992, 25 ( 16 ): 347-350.
- XING Guo-fu, BAO Shi-rao, SU Hai-hong, et al. The change and pharmacal influence when brain tissue was cerebral ischemia and reperfusion [ J ]. Chin J Psychiatry, 1992, 25 ( 16 ): 347-350.
- [ 15 ] 黄兆宏. 葛根素对牛内皮细胞的作用 [ J ]. 老年医学, 1992, 12 ( 6 ): 350.
- HUANG Zhao-hong. The effect on puerarin of endothelial cell of cattle [ J ]. Geriatrics, 1992, 12 ( 6 ): 350.

( 本文编辑 彭敏宁 )