

宽叶缬草对血管性痴呆小鼠学习记忆及海马区神经元病理学改变的影响

严洁, 潘庆敏, 刘伟

(湖北十堰市太和医院, 郟阳医学院附属医院 442000)

关键词 宽叶缬草; 血管性痴呆; 学习; 记忆; 海马; 病理学

摘要 目的: 观察宽叶缬草对血管性痴呆模型小鼠学习记忆及海马区神经元病理学改变的影响。方法: 采用反复夹闭双侧颈总动脉结合腹腔注射硝普钠的方法复制小鼠拟血管性痴呆的模型。健康昆明小鼠 54 只, 随机分为 3 组: 假手术组、血管性痴呆模型组、宽叶缬草组。分别于术后 7、15、30 d 跳台实验检测其痴呆程度, 透射电镜、HE 和 Nissl 染色对海马区神经元病理学改变进行观察。结果: 宽叶缬草组跳台实验潜伏期明显短于模型组 ($P < 0.01$), 受电击总时间少于模型组 ($P < 0.01$), 宽叶缬草组海马 CA1 区神经元数量明显多于模型组 ($P < 0.01$), 模型组可见神经元脱失、部分神经细胞核固缩并有胶质细胞增生等病理学改变。结论: 宽叶缬草能明显减轻血管性痴呆小鼠海马 CA1 区神经元损伤, 改善脑缺血引起的学习记忆障碍。

Effect of Valeriana Officinalis Var Latifolia Miq on Study and Memory Ability and Pathomorphology Change of Hippocampal Neuron in Vascular Dementia Model Mice YAN Jie, PAN Qing-Ming, LIU Wei Taihe Hospital Affiliated to Yunyang Medical College, Shiyan 442000, China

KEY WORDS VOL; vascular dementia; study; memory; hippocampus; pathomorphology

ABSTRACT **Aim**: To observe the effect of Valeriana Officinalis Var Latifolia Miq (VOL) on study and memory ability and pathomorphology change of hippocampal region in vascular dementia model mice. **Methods**: Vascular dementia model in mice was established by clamping of the both common carotid artery repeatedly. Forty Kunming healthy mice were divided into 4 groups randomly, sham-operation group, model group and VOL group. On the 7th, 15th, 30th after operation, grade of dementia was evaluated by Step-down avoidance test, pathomorphology change of hippocampal neuron was observed by electron microscope and hematoxylin-eosin (HE), Nissl staining. **Results**: Laten period in VOL group was shorter than that in model mice ($P < 0.01$). The quantities of neuron in VOL group in hippocampus CA₁ were more than that in model group ($P < 0.01$). The loss of neuron, karyopyknosis in partial neurons and proliferation of glial cells in hippocampal CA₁ were found in vascular dementia mice which relived markedly in VOL group. **Conclusion**: VOL can obviously improve pathomorphology change of hippocampal CA₁ neuron and the ameliorate study and memory ability in vascular dementia mice.

随着人口老龄化, 血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 的发病率逐年增高。对血管性痴呆的治疗, 目前尚在探索中。宽叶缬草 (valeriana officinalis var latifolia, VOL) 是败酱科缬草属的变种, 广泛分布于华中、西南等地, 可以作为缬草的代用品, 其化学成分主要有缬草三酯、挥发油、黄酮等。近年来研究表明 VOL 具有解除平滑肌痉挛、扩张冠状动脉、调脂及抗动脉粥样硬化等作用^[1], 但 VOL 对血管性痴呆的作用目前尚未报

道。因此, 本研究用双侧颈总动脉反复夹闭再灌注同时腹腔注射硝普钠降压法, 模拟急性脑血管疾病建立 VD 小鼠模型, 灌服 VOL 后, 观察海马 CA1 区神经元的病理学改变, 以探求 VOL 对血管性痴呆的作用, 为 VOL 的进一步开发提供理论依据。

材料与方法

实验动物 成年昆明小白鼠 54 只, 体重 40 ~ 50

[文章编号] 1008-0678(2005)01-004-03 [中图分类号] R749.1⁺³ [文献标识码] A
[作者简介] 严洁, 女(1965-), 硕士, 副主任医师, 老年病科副主任, 主要从事老年脑血管疾病临床工作。

g 随机分为3组:假手术组($n = 18$);模型组($n = 18$);阳性药(VOL)组($n = 18$)。

实验药品及用量 VOL根采自湖北省神农架林区,并经生药鉴定,浸泡、蒸馏、过滤后再加适量蒸馏水配制成浓度 $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液^[2],分装灭菌,4℃贮存备用,硝普钠(50 mg/支)由北京制药工业研究所实验药厂生产。VOL每次 $500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,术后2 h开始灌胃,每天1次,直至术后30 d。

VD模型的建立 采用反复夹闭双侧颈总动脉结合腹腔注射硝普钠的方法复制小鼠拟血管性痴呆的模型^[3]。将大鼠用10%的水合氯醛($350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,腹腔注射)麻醉后,仰卧固定在手术台上,常规消毒,颈正中切口,分离双侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)。模型组、VOL组在夹闭双侧CCA之前,腹腔注射硝普钠($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,用无菌蒸馏水溶解)随即用无创动脉夹夹闭双侧CCA,夹闭10 min,再通10 min,再夹闭10 min,再通,然后缝合伤口,放回笼中保温饲养。假手术组的麻醉及手术过程与模型组相同,但不阻断CCA、不注射硝普钠。在全部造模过程中保持动物肛温在37℃左右,以防止低温对脑缺血损伤的保护作用。

行为学测试 采用跳台实验^[4](step-down avoidance test)进行检测。被动回避反应箱,底板设有铜栅,可通交流电,电压40 V。铜栅的一角放置一个橡胶圆台作

为安全区,动物可停留在圆台上回避电击。造模后每组随机取6只第29天进行学习训练。训练前先将动物放入箱中自由活动3 min,熟悉环境,然后接通铜栅电源,持续5 min,记录动物首次找到安全区所需时间(潜伏期)及受电击总时间,作为学习测试成绩。24 h后重复上述实验,作为记忆测试成绩。

形态学观察 分别于术后7、15、30 d 每组随机取6只,参照文献^[5]方法用水合氯醛($350 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,腹腔注射)麻醉后,用4%多聚甲醛灌流液心脏灌流固定脑组织,取一侧脑组织冠状切取海马段(1 mm)数块,放入2.5%戊二醛中固定,做透射电镜观察海马区神经元超微结构。另一侧脑组织用上述固定液后固定。取视交叉至乳头体组织,常规石蜡包埋,冠状切片,厚度 $8 \mu\text{m}$,每隔2张取1张,HE、Nissl染色。光学显微镜下观察海马CA1神经元形态变化。细胞计数方法,采用计数 $1 \text{ mm}^2 (\times 50)$ 海马CA1区中段正常细胞数,取细胞数的均值。

结 果

行为学测试 模型组的学习记忆成绩:潜伏期延长,电击总时间增加,与假手术组相比学习、记忆明显下降。VOL组的学习成绩和记忆成绩均高于模型组($P < 0.05$)结果见表1。

表1 30 d 各组小鼠跳台实验的学习和记忆成绩比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	学习成绩		记忆成绩	
		潜伏期(min)	电击总时间(min)	潜伏期(min)	电击总时间(min)
假手术组	6	1.40 ± 0.28	0.68 ± 0.42	1.2 ± 0.331	0.73 ± 0.40
模型组	6	$2.91 \pm 0.31^\Delta$	$2.11 \pm 0.34^\Delta$	$3.04 \pm 0.45^\Delta$	$3.42 \pm 0.63^\Delta$
VOL组	6	$1.45 \pm 0.40^*$	$1.12 \pm 0.29^*$	$1.43 \pm 0.31^*$	$1.36 \pm 0.38^*$

注:与假手术组比较 $^\Delta P < 0.01$;与模型组比较 $^* P < 0.01$

光镜 假手术组7、15、30 d,镜下海马锥体细胞2~3层,排列紧密,细胞核圆而大,核仁清晰,Nissl染色示胞质内尼氏体丰富,神经纤维密集,排列整齐。模型组,术后7 d,镜下海马CA1区锥体细胞层次减少,排列稀疏,胞质内尼氏体消失,神经纤维排列紊乱。术后15 d,镜下海马CA1区锥体细胞排列进一步稀疏,脱失现象明显。术后30 d,镜下海马CA1区细胞几乎完全脱失,CA2、CA3区细胞也严重脱失,仅见少量残存的不规则细胞,胶质细胞大量增生。VOL组术后7、15、30 d CA1区细胞线清晰,细胞排列紧密。Nissl染色显示胞质内尼氏体丰富。CA1区细胞形态明显优于模型组。CA1区细胞计数结果见表2。

电镜 术后30 d假手术组可见细胞核膜完整,细胞器结构正常,线粒体结构清晰,突触结构完整正常,

突触小泡均匀、多见(图1)。模型组可见细胞核变性,核固缩或崩解,线粒体肿胀,嵴的双层膜结构不清、断裂、萎缩,重者出现空泡变性,正常线粒体少见(图2)。VOL组可明显减少细胞核变性及线粒体等细胞器的异常变化(图3)。

表2 各组海马CA1区细胞计数的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	细胞数(个/mm ²)
假手术组	18	210 ± 6.45
模型组	18	$86 \pm 0.98^\Delta$
VOL组	18	$167 \pm 2.23^*$

注:与假手术组比较 $^\Delta P < 0.01$;与模型组比较 $^* P < 0.05$

讨 论

近年来研究表明,反复脑缺血造成多部位损害是

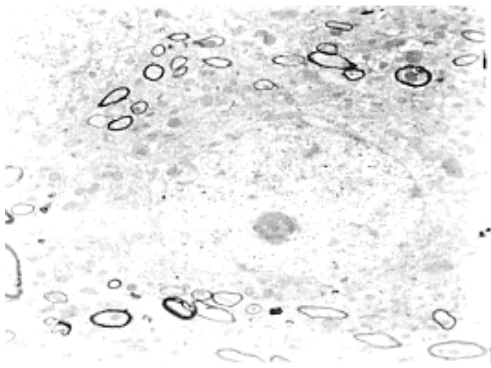


图1 假手术组 细胞核膜完整 细胞器结构正常 (4 000 × 15)

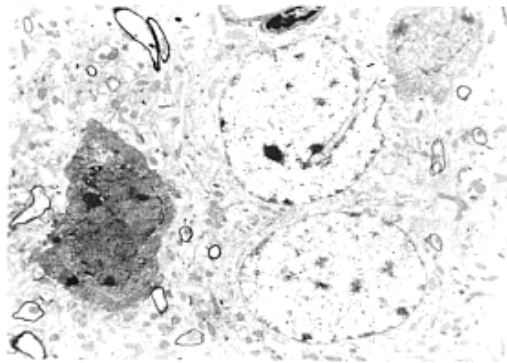


图2 模型组 细胞核变性 核固缩或崩解 (4 000 × 15)

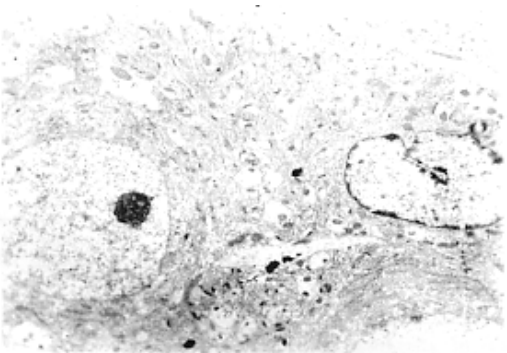


图3 VOL组 细胞核膜完整 细胞器结构基本正常 (4 000 × 15)

VD发病的主要原因。海马是与学习记忆等高级神经活动有关的重要核团和参与空间定位的重要中枢,与学习记忆密切相关。而海马又是缺血后选择性易损区之一^[6],因此认为海马缺血性损害可能是血管性痴呆的病理形态基础之一。

本研究对脑缺血再灌注拟血管性痴呆小鼠模型分7、15、30 d 3个时段进行了海马病理形态学观察,结果表明不同时段模型组小鼠海马细胞形态学改变与假手术组明显不同。7 d时海马CA1区可见核变性、崩解,线粒体肿胀、空泡样变性,正常突触减少。15及30 d海马CA1区锥体细胞进一步脱失,仅见少量残存的不

规则细胞,CA2、CA3区细胞也严重脱失,胶质细胞大量增生,形成结节海马硬化。对各组小鼠的行为学变化观察显示,模型组术后30 d的学习记忆成绩较假手术明显下降,可见模型鼠的病理表现与行为学变化是一致的。提示海马锥体细胞的变性、坏死及脱失是缺血性脑血管病致痴呆的病理学基础。

VOL组对VD模型鼠病理变化的影响结果表明:VOL组可明显改善上述病变,其海马CA1区神经元退变及胶质细胞增生少见,排列基本规则,线粒体及突触基本恢复正常,这有利于神经元传导功能的恢复及突触传递和联接的重建,以保证学习记忆活动的正常。VOL有效地阻止了反复脑缺血造成的海马神经元损伤,保留正常突触,改善VD小鼠学习记忆障碍。其作用途径可能为:VOL可以对抗动脉粥样硬化的内皮细胞损伤,抑制平滑肌细胞的增殖,具有抗氧化作用^[7];促进前列环素(PGI₂)的分泌,抑制血清素A₂(TXA₂)的产生,扩张基底动脉,改善脑血液循环^[2],从而减轻神经元坏死,除此之外,VOL还可抑制海马神经细胞c-fos、c-jun的表达^[8],调节GABA的受体^[9],保护神经元。本实验结果提示VOL可以应用于缺血性脑血管病致痴呆的防治,有必要对VOL进行深入的研究,为VOL的进一步开发利用提供详实的理论依据。

参考文献

- [1] 阮世兰,于龙顺,裴宁,宽叶缬草对平滑肌和心血管的药理研究[J].中草药,1982,13:23-24
- [2] 罗国君,席刚明,范华燕,宽叶缬草治疗兔蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的实验研究[J].江苏中医,2002,23:39-41
- [3] 王蕊,杨秦飞,唐一鹏,等.大鼠拟血管性痴呆模型的建立及中药9602防治作用初探[J].北京中医药大学学报,2000,23:30-32
- [4] 张均田,斋藤洋.十二种化学药品破坏小鼠被动回避性行为一跳台试验和避暗试验的作用的比较观察[J].药理学报,1986,21:12-19
- [5] 杨天祝.经心脏灌注固定动物组织的技术研究[J].河北医学院学报,1992,13:83-84
- [6] 贾健平,贾健民.鼠脑缺血再灌流动物模型和病理学研究进展[J].中风与神经疾病杂志,1992,9:62-64
- [7] 尹红,薛存宽,叶建明,等.缬草提取抗心肌缺血再灌注损伤的实验研究[J].微循环学杂志,2002,10:12-14
- [8] Wang Yunfu, Yan Jie, Huang Chaofen, et al. Experiment study of effect of Valeriana officinalis var latifolia on expression of C-Fos, C-Jun in hippocampus zone after focal cerebral ischemia[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2003, 7: 838-839
- [9] Yuan CS, Mehendale S, Xiao Y, et al. the gamma-aminobutyric acidergic effects of valerian and valerenic acid on rat brainstem neuronal activity[J]. Anesth Analg, 2004, 98: 353-358