

康欣胶囊及其拆方对肾虚血瘀型 大鼠神经细胞的保护作用

蔡晶¹ 杜建¹ 刘锡斐² 陈旭征¹

(1. 福建中医学院, 福州市五四路 282 号, 350003; 2. 南京军区南京总医院神经内科)

[摘要] **目的** 探讨康欣胶囊全方及其补肾、健脾、养血活血 3 组拆方对肾虚血瘀型血管性痴呆 (VD) 大鼠神经细胞的影响。 **方法** 采用双侧椎动脉永久性封闭和摘除单侧性器官建立肾虚血瘀型 VD 模型大鼠, 分别给予康欣胶囊全方 (全方组)、康欣胶囊补肾方 (补肾组)、康欣胶囊健脾方 (健脾组)、康欣胶囊养血活血方 (养血活血组)、阳性对照药喜得镇 (西药组) 和蒸馏水 (模型组)。 **结果** 全方组大鼠空间探索能力显著优于其他组 ($P < 0.01$); 全方组海马神经细胞器及细胞核固缩情况轻于其他各组; 全方组能增加海马乙酰胆碱含量 ($P < 0.01$), 提高 VD 大鼠海马酪氨酸激酶 A、核转录因子、原癌基因 C-fos、神经生长因子受体的表达 ($P < 0.01$), 降低胶质纤维酸性蛋白的表达 ($P < 0.05$)。 **结论** 康欣胶囊全方对肾虚血瘀型血管性痴呆大鼠神经细胞具有保护作用。 **[关键词]** 康欣胶囊; 肾虚血瘀; 血管性痴呆; 酪氨酸激酶 A; 核转录因子; C-fos; 神经生长因子受体; 胶质纤维酸性蛋白

Effect of Kangxin Capsule and Its Different Compositions on Nerve Cells of Rats with Kidney Deficiency and Blood Stasis

CAI Jing¹, DU Jian¹, LIU Xi-fei², et al.

(1. Fujian College of Chinese Medicine, Fuzhou 350003; 2. General Hospital of Nanjing Military)

ABSTRACT **Objective** To study Kangxin Capsule and its kidney-supplementing, spleen-fortifying and blood-nourishing-quickening compositions on nerve cells of vascular dementia (VD) rats with kidney deficiency and blood stasis. **Methods** Hibilateral vertebral arteries were permanently blocked and unilateral genital was extirpated to establish VD rat models with kidney deficiency and blood stasis. Hydergine, distilled water, Kangxin Capsule and its kidney-supplementing, spleen-fortifying and blood-nourishing-quickening compositions were given to rat models respectively. **Results** Kangxin Capsule could improve spatial exploration ability of rats, relieve pycnosis of nerve cells in hippocampus, increase the content of acetylcholine, up-regulate the expression of tyrosine kinase A, nuclear transcription factor- κ B, C-fos and Nerve growth factor receptor and down-regulate the expression of glial fibrillary acidic protein significantly as compared with other groups ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** Kangxin Capsule has a protective effect on nerve cells of VD rats with kidney deficiency and blood stasis.

Key Words Kangxin Capsule; Kidney deficiency and blood stasis; Vascular dementia; Tyrosine kinase A; Nuclear transcription factor- κ B; C-fos; Nerve growth factor; Glial fibrillary acidic protein

血管性痴呆 (VD) 是由多次卒中或长期慢性脑缺血所致的大脑皮层获得性高级功能进行性精神衰退性疾病^[1]。学习记忆障碍是血管性痴呆的一个重要表现。而脑内神经递质或调质功能的变化不仅是造成学习记忆障碍的主要原因, 也与行为、心理、情绪等方面的异常有关^[2]。本研究将从肾虚血瘀血管性痴呆大鼠的乙酰胆碱 (ACh)、神经元超微结构以及酪氨酸激酶 A (TrkA)、原癌基因 C-fos、神经生长因子受体 (NGFR)、胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 等的变化, 探讨康欣胶囊全方及其拆方对肾虚血瘀型 VD 模型大鼠神经细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处理

6 月龄 SD 大鼠 (购自中科院上海实验动物中心)

雌雄各半, 体重 250~300g, 分为模型组、全方组、健脾组、补肾组、养血活血组及西药组。模型组即造模后未给药 (给蒸馏水), 其余为造模给药组, 分别给康欣胶囊全方及其补肾、健脾、养血活血 3 组拆方、喜得镇混悬液 1ml/100g 体重灌胃, 每天 1 次, 共 30 天。

1.2 药物

康欣胶囊全方及其拆方中药购自千方药业并由福建中医药研究院植化室代煎 (为使各处方制备方法一致, 康欣胶囊全方也应用煎剂), 全方由枸杞子 6g、制何首乌 6g、淫羊藿 6g、女贞子 6g、当归 8g、菟丝子 12g、黄芪 9g、黄精 (制) 12g、丹参 6g、山楂 9g、酸枣仁 6g、菊花 12g、地骨皮 6g 组成; 补肾方由枸杞子 6g、制何首乌 6g、淫羊藿 6g 组成; 健脾方由黄芪 9g、灵芝 9g 组成 (原方中没有灵芝, 考虑原方中健脾药味少而增加); 养血活血方由当归 8g、丹参 6g、山楂 9g 组成。各组药物浓度相当于 2.43g 生药/kg 体重, 相当于正常人常用剂量。喜得镇由瑞士山得士药厂与天津华津制药厂合作生产, 批号:

(91) 卫药准字 X-156 号, 1mg/片, 混悬液浓度为 0.027mg 成药/ml, 相当于人常用剂量。

1.3 主要仪器

CR21 型低温高速离心机: 日本日立公司生产; 电热恒温水浴箱: 北京医疗设备厂生产; MDF-U 50V 超低温冰箱: 日本日立公司生产; AB204-N 电子分析天平: 梅特勒—托利多仪器有限公司生产; DH-50 小动物呼吸机: 浙江大学医学仪器厂生产。

1.4 造模方法

为电热烧灼器(上海医疗器械八厂生产, 932 型)封闭法, 参考 Pulsinelli^[3]、张志君^[4]、蔡晶^[5]等造模方法改良。具体步骤: 盐酸氯氨酮注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司) 0.3mg 首剂, 腹腔注射麻醉, 麻醉不够时, 再以 0.1~0.2mg 追加。将大鼠俯卧并固定于手术台上, 颈项皮肤常规消毒。颈项背正中切开, 蚊式钳钝剥离左边颈部肌肉及肌膜, 至左边颈椎横突部位, 暴露椎动脉, 电热烧灼器预热 15 秒烧灼并阻断左侧椎动脉, 同法烧灼并阻断右侧椎动脉, 造成永久性封闭。分层缝合肌肉及皮肤, 硫酸庆大霉素注射剂涂于皮肤切口以防感染。然后行大鼠去势手术, 具体步骤如下: (1) 将雌性大鼠仰卧并固定于手术台上, 下腹部分层正中切开 2cm, 暴露左侧输卵管及卵巢, 剥离沿子宫角输卵管部位, 结扎并剪除输卵管及卵巢, 常规止血。(2) 将雄性大鼠仰卧并固定于手术板上, 腹部及阴囊皮肤常规消毒, 切开左侧阴囊皮肤, 并剥离睾丸外层包膜, 于精索部位用缝合线结扎并切除睾丸及附睾, 常规止血。缝合皮肤用庆大霉素涂于皮肤以防感染。手术过程室温控制在 $(25.0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ 。

1.5 行为学检测

水迷宫行为检测: (1) 大鼠游泳能力测定, (2) 定位航行试验(place test), (3) 空间探索试验(spatial probe test)。旷场试验: 计数大鼠在 20×20 格的旷场中自由跨越的格子数, 以多者为佳。垂直下行试验: 即用直径 22mm 的螺旋纹钢 1m 长直立, 让大鼠从顶端爬行至地面, 正常大鼠能沿着螺旋纹缓慢旋转下行至地面, VD 大鼠则不能旋转下行, 而是垂直下行。

1.6 标本制备

盐酸氯氨酮 0.4mg/只腹腔注射麻醉后, 眼球采血 4ml 加肝素 0.025ml 抗凝混匀, 4°C 保存立即送福建医学科学研究所检测血中的神经递质。迅速开颅取全脑, 剥离海马、下丘脑、枕部皮质各半边, 入 10% 多聚甲醛固定, 送福建中医药研究院病理室行苏木伊红染色和免疫组织化学染色, 另外一半的海马、下丘脑、枕部皮质分别迅速分离, 电子天平(Meliter Toledo, 型号

AB204-N) 称重, 立即加入 2% 高氯酸预冷 1ml 匀浆, 立即送福建医学科学研究所检测脑组织的神经递质(采用 HPLC-电化学法^[6]), 并随机取各组 1 只大鼠的海马、下丘脑、枕部皮质脑组织各 1 块, 大小约 $1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 1\text{mm}$, 送福建医科大学电镜室包埋切片。

1.7 免疫组化染色步骤

按试剂盒说明书操作, 具体如下: 切片脱蜡入水, 3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶, pH 6.0 柠檬酸缓冲液高温高压抗原修复, 正常羊血清封闭液 40 min 室温 20 分钟, 1:100 稀释的兔抗大鼠一抗 50 min, 4°C 湿盒过夜, Biotin-羊抗兔二抗 IgG 40 min 室温 30 分钟, SABC 40 min 室温 30 分钟, DAB 50 min 显色, 显微镜下观察, 控制反应时间约 15 分钟, 苏木素轻度复染, 脱水透明, 中性树脂胶封片。试剂购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.8 阳性细胞计数

在 NIKON ECLIPSE ME600 型光镜(20×10 倍)下观察, 每组取 5 张切片随机取 15 个视野, 用数码像机统一在 45 毫秒曝光时间完成照像。在 ACDSee 软件下, 计算海马、下丘脑、枕部皮质区的所有阳性细胞数, 计数染色深度达到足以区分细胞周界者。

1.9 统计学方法

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 记录, 运用 SPSS 11.00 统计软件包进行单因素方差比较及组间比较 t 检验, 检验水平 α 为 0.05。

2 结果

2.1 电镜观察情况

模型组海马部分神经细胞胞浆内线粒体水肿, 基质电子密度变浅, 嵴减少; 枕部皮质、下丘脑神经元胞浆突起水肿, 甚至见少量细胞坏死。全方组海马、下丘脑结构较好, 神经元其余结构大致正常; 枕部皮质见少量凋亡神经元。健脾组海马、下丘脑、枕部皮质线粒体肿胀, 见少量凋亡细胞余基本正常。补肾组下丘脑神经元突起结构正常; 海马、枕部皮质表现线粒体水肿部分胞质突起水肿, 枕部皮质见少量凋亡神经元。养血活血组海马结构较好, 少量线粒体水肿, 下丘脑、枕部皮质线粒体和周围胞质水肿, 枕部皮质的神经元核染色质细块状散在分布。西药组海马、下丘脑、枕部皮质少数线粒体水肿, 余基本正常。

2.2 行为学检测结果

表 1 示, 各组大鼠的游泳能力相当, 不影响行为学的测定。在定向航行中, 全方组的逃避潜伏期最短, 与模型组、养血活血组比较差异有显著性意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 全方组的空间探索次数最多, 较模型组、补肾组、养血活血组、西药组显著为多 ($P < 0.01$)。可

见, 全方组大鼠的学习能力最强, 记忆能力最佳。表 2 示, 在旷场分析试验和垂直下行分析中, 各组大鼠均见有不同程度通过试验箱间隔时行动缓慢或停滞不动的现象, 也有不同程度的直线下行的现象, 其中以全方组垂直下行试验、旋转下行能力均数较其他组强, 但各组之间差异无显著性意义。

2.3 神经递质的检测结果

表 3 示, 海马部位乙酰胆碱的含量以全方组为最

表 1 各组大鼠游泳、定向航行、空间探索能力比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	游泳能力(cm)	逃避潜伏期(秒)	空间探索(次)
模型组	9	843.13±154.63	44.0000±20.0386△△	1.5556±1.23603△△
全方组	10	898.40±221.09	30.7000±22.1530**	3.4000±1.07497**
补肾组	9	892.00±248.24	31.8148±23.2461**	2.2222±0.97183**△△
健脾组	10	875.58±224.02	31.2833±21.3058**	3.1000±1.66333**
养血活血组	10	832.18±328.36	36.8814±22.2882*△	1.9000±1.10050*△△
西药组	9	861.76±114.42	33.9630±21.2620*	2.2222±0.97183**△△

与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与全方组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

表 2 各组大鼠旷场分析试验、旋转及垂直下行能力比较

组别	鼠数	旷场分析 (格数, $\bar{x} \pm s$)	旋转下行(次)	垂直下行(次)
模型组	9	12.35±7.73424	2	7
全方组	10	15.72±5.46438	6	4
补肾组	9	13.37±7.63916	3	6
健脾组	10	13.75±7.88653	3	7
养血活血组	10	13.21±7.22326	4	6
西药组	9	13.26±5.76235	3	6

表 3 各组大鼠海马部位神经递质含量分析结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	乙酰胆碱(mg/L)	五羟色胺($\mu\text{g/L}$)	多巴胺($\mu\text{g/L}$)
模型组	5	208.40±15.31△△	0.93±0.17	0.93±0.32
全方组	5	307.38±99.41**	0.73±0.33	0.83±0.14
补肾组	5	285.42±29.79**	0.76±0.25	0.94±0.53
健脾组	5	266.90±48.00*△	0.88±0.10	0.81±0.16
养血活血组	5	235.08±44.62△	0.75±0.32	0.86±0.19
西药组	5	280.98±48.95**	0.65±0.25	0.88±0.46

与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与全方组比较, △ $P < 0.05$

表 4 各组大鼠免疫组化神经相关因子阳性细胞表达分析结果比较(个/ mm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	GFAP	NF- κB	C-fos	NGFR	TrkA
模型组	9	14.27±5.39	17.13±6.64	15.13±5.82	7.73±4.08	17.80±5.17
全方组	10	10.53±3.18*	29.07±11.19**	20.93±5.92**	17.47±7.14**	20.60±8.33
补肾组	9	10.40±3.52*	21.60±9.30	20.53±8.54**	10.07±3.84*	19.40±8.86
健脾组	10	12.13±5.24	21.67±6.34	15.20±4.78	11.13±5.91*	17.40±4.56
养血活血组	10	13.87±6.42	20.33±6.51	16.47±5.73	11.87±4.69*	11.93±5.92
西药组	9	10.07±4.86	26.20±10.44*	15.93±4.22	15.73±4.01**	18.80±10.35

与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

高, 较模型组差异有显著性意义($P < 0.01$)。各给药组较模型组虽有增高, 但较全方组仍为低, 尤其是健脾组和养血活血组, 较全方组显著降低($P < 0.05$)。而五羟色胺和多巴胺各组之间差异无显著性意义。

2.4 免疫组化染色结果分析

表 4 示, 各给药组 GFAP 的表达均低于模型组, 尤其全方组与补肾组显著低于模型组($P < 0.05$)。各给药组核转录因子(NF- κB)表达均高于模型组, 其中全方组和西药组差异有显著性意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。全方组和补肾组 C-fos 蛋白表达显著高于模型组($P < 0.01$), 但其他各组与模型组比较差异无显著性意义。在 NGFR 的表达上, 各给药组均显著高于模型组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。而在 TrkA 蛋白的表达上, 各组差异均无显著性意义。

3 讨论

Ach 是一种与学习记忆有关的重要的神经递质, 它的合成增加会改善 VD 大鼠的学习、记忆能力。本研究发现, 全方组海马部位乙酰胆碱的含量较模型组显著增高($P < 0.01$)。星形胶质细胞是神经组织内分布较广, 数量最多的胶质细胞。胶质细胞的异常是引起神经系统障碍的主要原因, 也是药物对神经系统作用的靶细胞之一^[7]。近期的研究发现, 星形胶质细胞在病理条件下可促进神经元溃变、缺血, 通过 ET 受体诱导星形胶质细胞释放谷氨酸, 加重神经元退行性变^[8]。试验证明, 各给药组 GFAP 的表达均低于模型组, 尤其全方组与补肾组显著低于模型组($P < 0.05$)。在正常情况下, 细胞内的核转录因子 NF- κB 与抑制因子 NF- κB 结合成复合物, 当细胞受到自由基作用, 在氧化应急状态下, NF- κB 从复合体中解离并向核内移动, 与位于核内的基因序列上特异性调控区结合, 从而激活受调控的基因表达, 因此, 测定 NF- κB 在细胞中的变化可反映出细胞在自由基作用下的氧化程度。Li CF 等^[9]发现大鼠局灶性缺血模型中, NF- κB 的活性在缺血后第 4 天和第 7 天明显增加, 提示 NF- κB 参与了缺血后的损伤过程。在本研究中, 各给药组 NF- κB 表达均高于模型组, 其中全方组和西药组差异有显著性意义($P < 0.01$)。

或 $P < 0.05$)。C-fos 参与了神经细胞的生长、分化、神经功能可塑性变化以及学习记忆等过程,被认为是在细胞对外界刺激-转录偶联的信息传递过程中起着核内“第三信使”的重要作用^[10]。全方组和补肾组 C-fos 蛋白表达显著高于模型组($P < 0.01$)。NGFR 是肿瘤坏死因子(TNF)家族成员之一,是神经系统中最重要生物活性物质之一的神经生长因子 NGF 发挥作用的前提,对神经元的存活、生长发育、分化、再生和功能维持具有重要调节作用^[11]。在 NGFR 的表达上,各给药组均显著高于模型组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

中医学认为,痴呆的发生与肾虚、血瘀关系密切。脑为髓之海,而肾主骨生髓,若肾虚不能生髓,髓减脑空,灵性记忆失用而致痴呆。脑为清灵之府,“脑髓纯者则灵,杂者钝”,“血瘀者清窍被蒙,而致痴呆”。故前人有“凡心有瘀血者,令人善忘”之说。肾虚、血瘀可相互转化,相关并病。康欣胶囊以补肾健脾、养血活血为立法,方中女贞子、菟丝子、枸杞子、何首乌、黄精补肾填精,淫羊藿温肾壮阳,取阴阳双补之意;黄芪健脾益气,补后天以养先天;当归养血活血,既祛瘀血,又令诸补益药滋而不腻。佐以丹参、牡丹皮、酸枣仁、菊花、山楂等药,既能活血化瘀、养血安神、清肝明目,又可制约药物的温燥之性。因此,诸药配合,补中有通,标本兼治,共奏补益脾肾、益智健脑、活血开窍之功,使杂钝之脑海回复“纯者灵”的状态。

康欣胶囊全方组及某些拆方组能增加神经元的保护因子,减少缺血损伤诱导的星形胶质细胞活化,防止加重神经元退行性变,减缓神经细胞的凋亡速率,防止缺血性神经细胞氧化、凋亡,从而提高大鼠的行为和记忆能力,可能具有防治血管性痴呆的作用。

参考文献

- [1] 陈志萍, 甘枚. 血管性痴呆的治疗进展. 医学综述, 2003, 9(1): 44, 45.
 - [2] O'Brien MD. How does cerebrovascular disease cause dementia? Dementia, 1994, 5(3~4): 133~136.
 - [3] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. Stroke, 1979, 10(3): 267~272.
 - [4] 张志君, 刘正清, 马志健, 等. 卵巢切除后脑缺血再灌海马 CA1 区 ET-3 的表达. 湖南医科大学学报, 2003, 28(4): 371~374.
 - [5] 蔡晶, 杜建. 光化学反应法建立拟血管性痴呆大鼠模型的改进. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2005, 12(5): 292~295.
 - [6] 田津斌, 方明. 高效液相色谱-电化学检测法测定大鼠脊髓灌流液单胺类递质及其代谢产物. 分析实验室, 1998, 17(1): 86~89.
 - [7] 王国卿, 杜景卫, 夏作理. 星形胶质细胞生物学功能和活化. 泰山医学院学报, 2005, 26(2): 184~186.
 - [8] 张敬敬, 李树清. 脑缺血时星形胶质细胞与谷氨酸的相互作用. 国外医学脑血管疾病分册, 2004, 12(11): 870~873.
 - [9] Li CF, Ha TZ, Liu LP, et al. Adenosine prevents activation of transcription factor NF- κ B and enhances activator protein-1 binding activity in ischemic rat heart. Surgery, 2000, 127(2): 161~169.
 - [10] Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. Neuron, 1990, 4(4): 477~485.
 - [11] Azar C, Scavarda NJ, Reynolds CP, et al. Multiple defects of the nerve growth factor receptor in human neuroblastomas. Prog Clin Biol Res, 1991, 366: 219~226.
- (收稿日期: 2006-03-20; 修回日期: 2006-04-15)

全国首届中西医结合防治心脑血管、肾脏、肿瘤疾病高级论坛 通 知

由中国人体健康科技促进会、中国人体健康科技促进会医药科技专业委员会、世界中医药杂志社联合主办, 北京华盛国际医药信息交流中心承办的海峡两岸四地“全国首届中西医结合防治心脑血管、肾脏、肿瘤疾病高级论坛”将于 2007 年 8 月 24 日在江西庐山举办。

1. 会议与研讨会内容: (1) 中医、中西医结合治疗心脑血管病临床研究和治疗经验、新疗法、实验研究; (2) 名老中医临床经验总结; (3) 针灸推拿等非药物疗法治疗心脑血管病的体会; (4) 老年痴呆症、顽固性失眠、血管性头痛的论治精神及特色疗法; (5) 中医与中西医结合治疗肾脏病的新疗法和进展; (6) 多血液进化方法的最新进展; (7) 肾脏病治疗规范; (8) 中医药、中西医结合治疗肿瘤基础及临床研究; (9) 肿瘤的分子靶向治疗、微创介入治疗、激光光动力治疗、热疗、放疗、化疗等现代医疗技术与中医药的结合研究; (10) 肿瘤止痛研究; 抗肿瘤创新性理论研究; (11) 抗肿瘤中药研究与开发; (12) 晚期肿瘤患者生存质量与养生方法研究; (13) 中医、西医联合抗肿瘤的理论及临床探讨。

2. 征文截止日期: 2007 年 6 月 30 日, 欢迎计算机软盘或电子邮件投稿。录用文章刊登在《世界中医药》杂志 2007 年增刊上, 并发邀请函参加会议, 入选论文将安排在大会交流, 参加会议者颁发证书并授予国家级继续教育学分。

3. 会议地点: 九江市庐山疗养院(江西省庐山中路 7 号, 电话: 0792-8296256, 传真: 0792-8282609)。住宿费: 80~140 元/床/天。

3. 会议日程: 8 月 24 日报到, 8 月 25 日开幕式及大会演讲, 8 月 26 日大会交流、分组交流, 8 月 27 日参观。

4. 注册费用: 会务费 780 元/人; 资料费、论文证书、会议合影(照片)、餐费、参观交通费等 380 元, 不含进山门票。

5. 联系地址: 北京市朝阳区小营路 49 号富嘉园 A1 座 302 室世界中医药杂志社, 邮编: 100101, 电话: 010-58239055, 传真: 010-58239066, E-mail: wfcm2006zzs@163.com, 联系人: 焰爱晖。欢迎投稿和参加会议。