

化浊解毒活血通络法对脑缺血再灌注损伤小鼠行为学及海马神经细胞形态学的影响

赵见文 田军彪* 李佃贵 张颜伟 杨丽静 刘学飞

河北医科大学中医院, 河北省石家庄市中山路, 050011

基金项目: 国家中医药管理局重点研究室第一批建设项目(ZD200821-10);

河北省中医药管理局 2010 年度中医药类科研计划课题(2010020)

* 通讯作者: jbt1965@sina.com, 13102823699

[摘要] 目的 探讨化浊解毒活血通络法对脑缺血再灌注损伤的作用机制。方法 将 50 只昆明小鼠随机分为假手术组、模型组、中药高剂量组、中药低剂量组、尼莫地平组, 每组 10 只。采用线栓法制造小鼠右侧大脑中动脉缺血再灌注模型。手术造模成功后假手术组、模型组灌服生理盐水 20ml/(kg·d), 尼莫地平组灌服尼莫地平液 19.6g/(kg·d), 中药高剂量组、中药低剂量组分别给予化浊解毒活血通络中药 19.6g/(kg·d) 及 9.8g/(kg·d) 灌服。均每日 1 次, 14 天后进行行为学测试, 并通过光镜观察小鼠海马 CA1 区的病理形态学改变。结果 与模型组相比, 中药高剂量组能提高脑缺血再灌注损伤小鼠的学习和记忆成绩, 改善小鼠海马 CA1 区的神经细胞形态学表现, 并且优于尼莫地平组和中药低剂量组($P < 0.05$)。结论 化浊解毒活血通络法对脑缺血再灌注损伤小鼠的行为学能力及海马 CA1 区的神经细胞具有保护作用, 这可能是该法对抗脑缺血再灌注损伤的机制之一。

[关键词] 化浊解毒活血通络法; 脑缺血再灌注损伤; 浊毒; 行为学; 海马 CA1 区

Effect of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo Method on Behavioral and Morphological Changes of Nerve Cells in Hippocampal of Mice with Cerebral Ischemia Reperfusion Injury

ZHAO Jianwen, TIAN Junbiao, LI Dianguai, ZHANG Yanwei, YANG Lijing, LIU Xuefei

(TCM Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011)

ABSTRACT **Objective** To explore the mechanism of Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo method (method to dissolve turbidity, remove toxic substance, activate blood, and remove obstruction in meridian) on cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI) model mice. **Methods** Fifty Kunming mice were randomized into sham-operated group, model group, Chinese medicine high-dose group, Chinese medicine low-dose group, and Nimodipine group, with 10 in each. Except the sham-operated group, the other 4 groups were made CIRI models of right middle cerebral artery with a thread embolism method. After successful modeling, physiological saline 20ml/(kg·d) was given to the sham-operated group and model group, Nimodipine solution 19.6g/(kg·d) was given to the Nimodipine group, and Chinese medicine Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo decoction high-dose 19.6g/(kg·d) and low-dose 9.8g/(kg·d) were given respectively to the Chinese medicine groups through intragastric feeding, once a day. Fourteen days later, the behavioral changes and the pathomorphological change in the hippocampal CA1 region were observed. **Results** Compared with the model group, high-dose decoction could improve the learning and memory ability and the morphologic manifestation of nerve cells in the hippocampal CA1 region of mice and the effect was superior to the low-dose group and Nimodipine group($P < 0.05$). **Conclusion** Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo method functions to protect the behavioral ability and nerve cells in hippocampal CA1 region of mice with CIRI, which might be one of the mechanisms of the method on CIRI.

Key Words Huazhuo Jiedu Huoxue Tongluo method (method to dissolve turbidity, remove toxic substance, activate blood, and remove obstruction in meridian); cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI); turbidity toxin; behavior; hippocampal CA1 region

脑缺血再灌注损伤是指因脑缺血致脑组织坏死前, 闭塞的脑血管再通后缺血性损伤却进一步加重的现象^[1]。化浊解毒活血通络法是在浊毒理论^[2-3]指导下, 根据脑缺血再灌注损伤的病理基础所创立的中医治疗体系, 应用于缺血性脑血管病的各期治疗。本研究从行为学及神经病理学的角度观察运用化浊解毒活血通络中药对脑缺血再灌注损伤的作用

效果, 从而证实脑系疾患与浊毒致病理论之间存在相关性, 也为研究化浊解毒活血通络法对抗脑缺血再灌注损伤的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

成年健康雄性昆明小鼠 50 只, 体重 38~40g, SPF 级, 由河北医科大学实验动物中心提供, 实验

动物许可证号:SCXK(冀)2008-1-003,采用随机数字表法分为假手术组、模型组、尼莫地平组、中药高剂量组、中药低剂量组,每组10只。

1.2 实验药物及仪器

根据化浊解毒活血通络法所拟定的中药处方主要药物组成及剂量(成年人用量)为石菖蒲15g、黄连6g、郁金15g、川芎9g、地龙15g、丹参15g、赤芍15g、当归9g、茯苓15g、泽泻6g等,方中各药材均购买于北京同仁堂股份有限公司。对照组药物为尼莫地平片,规格为30mg/片,由拜耳医药保健有限公司生产。实验仪器主要有电子天平(瑞士METTER AE100型)、倒置相差显微镜(日本Olympus BX51T-PHD-J11)、小鼠跳台仪(中国医学科学院药物研究所提供)、切片机(德国Leica RM2015)、Image-Pro Plus多功能真彩色细胞图象分析管理系统(美国Media Cybernetics公司)等。

1.3 动物模型制备

小鼠术前隔夜禁食12h,自由饮水。在室温约24℃~25℃的无菌环境下行手术造模。我们采用改良线栓法^[4]制成小鼠右侧大脑中动脉栓塞缺血模型(MCAO)。主要操作步骤包括:①用10%水合氯醛以350mg/kg剂量腹腔注射麻醉,固定,备皮,消毒。②在前颈部正中做一纵形切口,剥离皮下组织,暴露颈部血管。分别剥离右侧的颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA)等。③电凝剪断ECA的主要分支甲状腺上动脉和枕动脉,游离ECA,迅速用动脉夹分别在CCA近心端和ICA远心端阻断血流,在距CCA与ICA分叉处约3mm双线结扎ECA并剪断,在断端的近心端置一丝线。④将ECA的断端稍向下牵伸,在ECA断端剪一切口,将制备好的尼龙线栓从切口处缓缓送入ECA,去除ICA远心端的动脉夹,随后使尼龙线栓沿ICA管腔插入颅内至大脑中动脉(MCA)的起始部,总入线深度为8mm左右,用力收紧结扎止血线,并移去CCA近心端的动脉夹。⑤线栓插入成功后,缝合皮下组织和皮肤,局部轻滴适量庆大霉素注射液以预防感染。⑥右侧MCA闭塞缺血2h后,再次麻醉小鼠拔出线栓约5mm实现再灌注,线栓头留置于ECA断端内,去掉尼龙线栓的残留部分,缝合伤口。⑦假手术组麻醉及手术过程基本同上,但不插入线栓。

1.4 给药方法

模型小鼠于术后第2天开始给药。假手术组、

模型组给予生理盐水以20ml/(kg·d)灌服。中药高、低剂量组分别以上述中药19.6g/(kg·d)、9.8g/(kg·d)灌服。尼莫地平组灌服尼莫地平液19.6g/(kg·d),均每日1次,连续应用14天。

1.5 行为学检测方法

各组小鼠于术后14天进行有关行为学的跳台实验。跳台仪的底板有多根铜栅组成,可通过电压为36V的交流电,箱壁由黑色塑料板围成,铜栅的一角放置一个橡胶圆台作为安全区,小鼠可停留在圆台上回避电击。训练前先将小鼠放入箱中自由活动3min熟悉环境,然后接通铜栅电源,持续5min,记录小鼠受到电刺激后首次找到安全区所需要的时间和5min内受到电击的总次数即错误次数,作为学习测试成绩。24h后再次将小鼠放入箱中自由活动3min,然后将其放上橡胶圆台,接通铜栅电源,持续5min,记录小鼠首次跳下圆台的潜伏期和5min内受电击的总次数即错误次数,作为记忆测试成绩。

1.6 海马CA1区神经细胞形态学观察

跳台实验结束后用苯巴比妥钠腹腔麻醉,依次以温生理盐水、40g/L多聚甲醛进行左心室灌注,然后迅速断头取脑,中性甲醛溶液固定24h。取视交叉到乳头体后部之间的脑组织,进行常规脱水,浸蜡,透明,包埋及冠状切片,厚度约6μm,HE染色,光镜下观察病理形态学变化。

1.7 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件处理,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 小鼠跳台实验结果

表1示,与假手术组比较,模型组小鼠的反应时间延长、潜伏期缩短、错误次数增多,其差异具有统计学意义($P < 0.05$),提示模型组小鼠的学习能力和记忆能力均较假手术组明显下降。与模型组比较,中药高剂量组、中药低剂量组、尼莫地平组的反应时间均明显缩短、潜伏期明显延长、错误次数减少($P < 0.05$),提示化浊解毒活血通络法同尼莫地平液一样均能够明显改善脑缺血再灌注损伤小鼠的行为学成绩,提高学习能力和记忆能力。中药高剂量组分别与尼莫地平组、中药低剂量组比较,其反应时间缩短、潜伏期延长、错误次数减少($P < 0.05$),提示中药高剂量组对脑缺血再灌注损伤小鼠行为学成绩的改善优于尼莫地平组与中药低剂量组。

表 1 各组小鼠 14d 后跳台实验成绩比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	学习成绩		记忆成绩	
		反应时间(s)	错误次数(次/min)	潜伏期(s)	错误次数(次/min)
假手术组	10	15.81±8.40	1.54±1.03	247.70±43.35	1.59±1.21
模型组	10	0.83±13.95*	8.52±2.80*	72.86±25.52*	8.52±2.03*
尼莫地平组	10	51.78±20.02▲△	5.10±2.38▲△	124.48±38.21▲△	5.01±1.96▲△
中药低剂量组	10	40.10±10.33▲△	4.95±1.51▲△	141.30±38.45▲△	4.88±1.70▲△
中药高剂量组	10	28.50±11.20▲	3.27±1.59▲	181.10±37.72▲	3.23±1.33▲

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,▲ $P<0.05$;与高剂量组比较,△ $P<0.05$

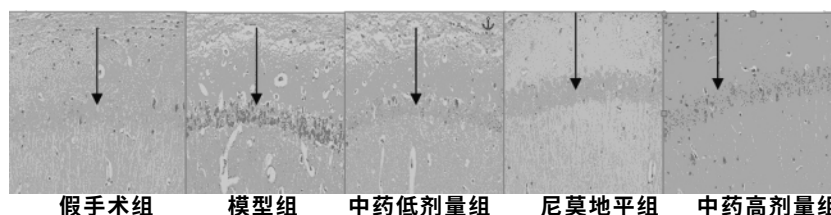


图 1 各组小鼠海马 CA1 区神经细胞形态学表现(HE×400)

2.2 光镜下海马 CA1 区神经细胞形态学表现

图 1 示,假手术组小鼠海马 CA1 区锥体细胞呈复层排列,致密整齐,形态正常,结构完整,胞质丰富,核圆而大,呈均匀蓝色,核仁清晰,未见变性坏死细胞。模型组小鼠海马 CA1 区锥体细胞排列疏松,缺乏层次,周边紊乱而有间隙,且形态不规则,胞质肿胀,核固缩变小,色淡或消失。中药低剂量组及尼莫地平组海马 CA1 区正常锥体细胞较模型组增多,排列较整齐,形态较正常,可见少量神经元脱失,核固缩不明显。中药高剂量组细胞排列及形态结构等均非常接近假手术组,无明显差异。

3 讨论

急性缺血性脑损伤后,梗死中心区的神经元死亡以不可逆的坏死为主。而梗死的周边半暗带区,其病理过程十分复杂,涉及神经元凋亡、炎症反应、钙超载、自由基生成、能量代谢障碍等多个方面,它们的发生往往是脑血管再通后梗死灶扩大的关键,也是血液再灌注后神经元迟发性死亡的主要机制。因此选用合适有效的途径干预脑缺血的上述病理生理改变,能够有效地终止神经元的继发性损伤,增加细胞组织的存活能力,促进神经功能的恢复。目前临床上治疗缺血性脑损伤的主要方法包括溶栓、抗凝、降纤、扩血管、高压氧、介入治疗等。近年来随着“浊毒”概念的提出^[5-6],在其理论指导下开展浊毒致病理论与脑系疾病相关性的研究也相继受到关注。

中医学对浊毒的认识在历代医学文献中均有散

在论述,如“两泻其血脉,浊气乃辟。”(《灵枢·忧悲》)、“虽有大风苛毒,弗之能害。”(《素问·生气通天论》)、“清邪居上,浊邪居下。”(《金匱要略·脏腑经络先后病脉证》)、“温毒咽痛喉肿,……。”(《温病条辨》)等等。浊,乃不清污秽之意。早在东汉年间的刘熙在他的《释名·释言语》中就将其释为“读也,汁滓演读。”有医家认为“浊为害清之邪气”。也有医家认为浊邪即为湿邪,乃重浊黏腻之意。毒,最初是指本草。在古代又泛指毒物、毒害等。《金匱要略心典》提出邪盛谓毒的观点,认为“毒,邪气蕴结不解之谓。”另外也有医家有时用它来描述药性或特指某些病因病证等^[7]。本课题组提出,将浊毒并称,提出浊毒理论。认为浊毒是损害机体气血运行的致病因素,也是脏腑功能失常产生的病理产物。其中浊与毒各有内外之分,我们所讨论一般是指内之浊毒。其中浊与湿当为同类,为湿之极,是脾运失健的病理产物,比湿更具有重浊缠绵胶塞黏腻等特性。浊邪蕴结难解,日久成毒,浊毒并蓄,耗伤气血,败坏脏腑。浊与毒性质相同,病理过程相互助生,难以界分,协以为虐。

脑缺血再灌注损伤的病理过程虽然复杂,但其主要病理机制为脑络受损,血行不利。脑络受损或结滞、或弛缓、或破溢,可影响血液正常运行,血不利则为水,水邪既生,蓄积增多,淀为水浊,久浊不散,蕴酿成毒。浊毒凝滞脉络,阻滞气机则血涩为瘀。浊瘀相互兼加,互为因果。因此在该研究的治疗中我们针对脑缺血再灌注损伤的机制采用化浊解毒活

血通络之法,选用临床常用的化浊解毒活血通络中药制定本研究的协定处方,方中石菖蒲、黄连辟秽化浊,郁金活血兼有清心开窍之功,三药合而为君。地龙、川芎通达脑络气血之瘀滞,丹参、赤芍凉血活血,当归养血活血,诸药共担臣药之职。茯苓健脾渗湿,使痰浊无以生成。泽泻渗湿泄热,使浊毒之邪从下而出,为方中之佐。川芎上行头目兼有引经之用,为方中之使。该方切中脑缺血再灌注损伤之病机,共奏化浊解毒、活血通络之功。本研究表明化浊解毒活血通络法能够提高小鼠的学习记忆能力,改善脑络损伤所导致的行为学障碍。海马是脑缺血缺氧时最容易受损的部位之一^[8],因此我们还选用海马CA1区作为观察研究的对象,研究结果表明小鼠海马CA1区神经细胞形态学的优劣表现与各组小鼠的行为学成绩高低呈正相关,这与现代医学对海马CA1区功能的认识相一致。化浊解毒活血通络法能够从一定程度上抑制海马CA1区神经细胞的迟发性坏死,改善海马CA1区的神经细胞形态学表现,对脑缺血再灌注损伤小鼠的受损神经细胞有明显修复作用。

综上所述,化浊解毒活血通络法对脑缺血再灌注损伤有比较明显的神经保护作用,也从一定程度

上佐证了浊毒致病理论与脑系疾病之间存在相关性。化浊解毒活血通络中药对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用机制可能是多元性的,还需要进一步探索,以便为化浊解毒活血通络法在临床的广泛应用提供有力证据。

参考文献

- [1]甘照儒,桑栋楠.脑缺血再灌注损伤级联反应研究进展[J].医学综述,2009,15(1):43-45.
- [2]李佃贵,李海滨,裴林,等.慢性萎缩性胃炎从浊毒论治[J].四川中医,2004,22(1):17.
- [3]吴深涛.糖尿病病机的后变要素——浊毒[J].上海中医药大学学报,2004,18(1):24.
- [4]许金秀,杨牧,周红.大鼠永久性大脑中动脉阻塞模型的建立[J].四川动物,2010,29(3):461-465.
- [5]王正品,李佃贵,杜艳茹,等.浊毒致病论与现代中医病因学[J].中医杂志,2010,51(1):11-13.
- [6]赵进喜,庞博.中医学“浊”的涵义及其临床意义[J].中医杂志,2009,50(7):581-584.
- [7]许筱颖,郭霞珍.浊毒致病理论初探[J].辽宁中医杂志,2007,34(1):28-29.
- [8]曹仁存.反复性脑缺血与神经元选择性易损性[J].国外医学脑血管疾病分册,1995,3(6):293-296.

(收稿日期:2010-11-24;修回日期:2011-05-18)

[编辑:行之]

(上接第1491页)

脏病变程度较单纯病毒组重,死亡率也较高^[7]。TLRs介导反应是复杂的、交叉的,目前国内外研究显示流感病毒与TLR-3亦相关,本实验仅对TLR-7进行观察,未对TLR-3进行观察,通路之间的相互影响尚未弄清与阐明,需进一步研究证实。

参考文献

- [1]林棉,缪英年,吴志光,等.岭南流感的证型特点及治法研究[J].中国中医急症,2007,16(12):1493-1493,1500.
- [2]Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults[J]. Cell, 1996,86(6):973-983.
- [3]Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors[J]. Annu Rev Immunol, 2003,21:335-376.
- [4]Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(15): 5598-5603.
- [5]Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, et al. Innate antiviral

responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA[J]. Science, 2004,303(5663):1529-1531.

- [6]Wang JP, Bowen GN, Padden C, et al. Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus[J]. Blood, 2008,112(5):2028-2034.
- [7]赖鹏华,林培政,王晓萍,等.小鼠流感病毒性肺炎湿热证造模方法探讨[C].第三届中医药现代化国际科技大会·中医药防治重大传染病的研究论文集.成都:四川科学技术出版社,2010:354-358.
- [8]Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, et al. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus[J]. J Biol Chem, 2005, 280(7): 5571-5580.
- [9]Doyle S, Vaidya S, O'Connell R, et al. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program[J]. Immunity, 2002, 17(3):251-263.

(收稿日期:2010-12-14;修回日期:2011-05-17)

[编辑:行之]