

丹参酮 A 预防慢性缺氧大鼠认知功能障碍的电生理机制

魏 敏^{1,2} 闫志强³ 董明清¹ 刘曼玲¹ 罗 颖¹ 杨江河³ 李志超^{1△}

(1 第四军医大学病理学与病理生理学教研室 陕西 西安 710032 2 新疆军区克州军分区卫生所 新疆 阿图什 845350 ;

3 兰州军区乌鲁木齐总医院神经外科 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的 探讨丹参酮 A(T A)预防慢性缺氧大鼠认知功能障碍的电生理机制。方法 将 18 只雄性 SD 大鼠(200-250 g)随机分为对照组、模型组(Model 组)、T A(10mg/kg·d)治疗组(T A 组)。复制慢性缺氧大鼠认知功能障碍模型,并给予相应治疗,在脑片水平运用膜片钳技术检测海马 CA1 区的 LTP 变化,并检测海马 CA1 区锥体细胞的兴奋性变化。结果 (1) 给予高频强直刺激(HFS)后各组兴奋性突出后电位(eEPSP)斜率均显著增加,即均可诱发 LTP 并持续 1h 以上,但模型组 LTP 较对照组显著减弱($P<0.05$)。T A 治疗组 LTP 较模型组明显增强($P<0.05$)。(2) 慢性缺氧使海马 CA1 锥体细胞放电所需的刺激电流幅度显著增加、阈电位升高、兴奋性降低,同样刺激强度条件下动作电位数量减少,T A 干预可明显减轻慢性缺氧对海马 CA1 锥体细胞的上述抑制。结论 T A 可能是通过维持海马 CA1 锥体细胞的兴奋性、维持海马的突出可塑性减轻慢性缺氧对认知功能的损害。

关键词 慢性缺氧;丹参酮 A;认知功能障碍;电生理

中图分类号 R742.1 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2012)11-2057-04

The Electrophysiological Mechanism of Tanshinone A Preventing Chronic Hypobaric Hypoxia -Induced Cognitive Deficits

WEI Min^{1,2}, YAN Zhi-qiang³, DONG Ming-qing¹, LIU Man-ling¹, LUO Ying¹, YANG Jiang-he³, LI Zhi-chao^{1△}

(1 Department of pathobiology and Pathophysiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China;

2 Infirmary of Kezilesu Military Subregion in Xinjiang, Atushi 845350, China;

3 Department of neurosurgery, Urumchi Hospital of Lanzhou Military region, Urumchi 830000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the electrophysiological mechanism of Tanshinone A(T A) preventing cognitive deficits induced by chronic hypobaric hypoxia. **Methods:** Eighteen male Sprague-Dawley rats (200-250 g) were randomly divided into three groups (n=6): Control group, Model group and T A group. Hippocampal CA1 LTP was detected by patch-clamp recordings in rat brain slices. Excitability of Hippocampal CA1 pyramidal neurons was measured by whole-cell patch-clamp recordings. **Results:** The LTP of hippocampal CA1 was inhibited by chronic hypobaric hypoxia, and T A can maintain the LTP. The decrease of excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons caused by chronic hypobaric hypoxia was markedly improved by T A. **Conclusions:** T A can prevent cognitive deficits caused by chronic hypobaric hypoxia via maintaining the excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons.

Key words: Hypobaric hypoxia; Tanshinone A; Cognitive deficits; Electrophysiology

Chinese Library Classification(CLC): R742.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)11-2057-04

前言

慢性缺氧对人体各个脏器均有慢性损伤,甚至可造成器官的不可逆损伤,诱发多种疾病。脑是人体对氧需求最大的器官之一,对缺氧尤其敏感,是慢性缺氧损伤的主要靶器官之一,持续处于缺氧环境下可出现思维反应迟缓、记忆力减退、睡眠障碍等多种临床表现,严重者可出现脑水肿等急重症危及生命。丹参是一种被广泛使用的传统中药,已被单独或联合其他药物广泛应用于临床,治疗多种疾病。丹参酮是丹参中含有的—组松香烷双萜脂溶性化合物,其中丹参酮 T A(Tanshinone A,

T A)具有丹参的大部分功效,且在丹参中含量最高。目前已明确 T A 在中枢神经系统不但可抗氧化、抗炎,而且还具有抗肿瘤、保护血脑屏障等多种作用^[1-3]。李林等科研工作者研究发现 T A 可改善缺血等多种模型所致的认知功能障碍^[4,5]。T A 可改善淀粉样蛋白 β 肽 1-40 所致的海马神经病理学变化^[6],减轻淀粉样蛋白 β 肽 1-40 导致的体外培养的皮肤神经元损害^[7]。另外 T A 还可减轻缺血缺氧导致的脑损伤^[8]。本课题组通过实验研究亦发现 T A 对慢性缺氧引起的认知功能障碍有预防作用,但该预防作用的机制尚有待进一步研究。基于上述原因,我们设计如下实验探索 T A 预防慢性缺氧大鼠认知功能障碍的电生理机制,利用我课题组自行设的可模拟高原低氧环境的低压氧仓复制慢性缺氧性大鼠认知功能障碍模型,采用膜片钳实验技术研究 T A 对海马 CA1 区 LTP 及海马 CA1 区锥体细胞兴奋型的影响。

1 材料方法

作者简介 魏敏(1982-),女,硕士研究生,药剂师,主要从事呼吸循环及认知功能等方面的病理生理研究,电话 (029)84774551,

E-mail weiminzyq@163.com

△通讯作者 李志超,电话 (029)84774548,

E-mail lizhc@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2012-01-03 接受日期 2012-01-30)

1.1 材料及仪器

T A(购自西安怡乐生物制品有限公司,纯度>98.0%), 1440 模拟数字信号转换系统(Molecular Devices Corporation, 美国), Axopatch-700B 信号放大器 (Molecular Devices Corporation, 美国), 红外相差显微镜(Olympus, 日本), Master-8 脉冲发生器(A.M.P.I, 以色列), 可模拟高原低氧环境的密闭缺氧仓为我实验室自行设计制造, 其余氯化钠等常规实验室耗材均为国产分析纯。

1.2 实验动物

雄性健康 SD 大鼠 (购自解放军第四军医大学校直实验动物中心), 共 18 只, 体重 200~250 g, 将其随机等分为: 正常对照组(Control group)、模型组(Model group)、T A(10mg/kg·d) 治疗组(T A group)。每日开始缺氧前给药, 给药方式为腹腔注射(1 次/日), 对照组及模型组给予等剂量生理盐水, 治疗组给予 T A(10mg/kg·d)。实验持续 28 天, 完成最后一次缺氧后, 立即麻醉大鼠, 断头处死后, 快速取含海马的脑组织, 震动切片机切脑片并进行膜片钳电生理记录。

1.3 慢性缺氧大鼠认知功能障碍模型的复制

平置圆桶状缺氧舱为我科参照文献自行设计制造^[9,10], 内径 0.45m, 长 0.80m, 舱门有观察窗用于随时观察舱内情况。舱顶设置与真空泵相连的出气口及带有调节装置的进气阀, 并安装压力表监测舱内压力。舱内置钠石灰用于吸收二氧化碳。将大鼠置于密闭缺氧仓, 关紧舱门后立即开启真空泵, 缓慢调节进气阀, 使密闭缺氧仓内气压缓慢下降, 直至气压降至目标气压(380mmHg), 维持此气压 8 小时, 然后逐渐调大进气口, 使密闭缺氧仓内气压缓慢上升, 直至达到正常大气压。相同方法饲养对照组大鼠, 每日亦在密闭缺氧仓内饲养 8 小时, 同法开启真空泵, 但将进气孔调至最大, 使舱内气压维持在正常大气压水平。

1.4 海马脑片制备及电生理记录

采用异氟烷吸入麻醉方法麻醉大鼠, 迅速断头并取脑, 浸入预充 5% CO₂、95% O₂ 混合气的冰浴人工脑脊液中, 人工脑脊液配方(mmol/L): KCl (2.5), glucose (11), MgCl₂ (1.2), CaCl₂ (2.4), NaHCO₃ (26), NaH₂PO₄ (1.2), and NaCl (126), 滴定 pH 值至 7.35-7.45 范围内。在冰水混合人工脑脊液中, 利用震动切片机将含海马的脑组织切成 400μm 厚度的脑片, 挑选海马结构清楚的脑片, 将其置入预充 5% CO₂、95% O₂ 混合气的人工脑脊液中, 34℃ 孵育 1 h, 以恢复脑片状态。将脑片移至记录浴槽, 用氧饱和的人工脑脊液持续灌流(2 ml/min), 开启浴槽加热系统, 使脑片温度维持在 34℃, 进行电生理记录。

1.5 海马长时程增强(LTP)记录

参照文献行海马 LTP 记录^[10,11]。选择双极间距约 300μm 的刺激电极, 用 3mol/L 的 NaCl 溶液作为记录电极内液。通过刺激电极给予突触前纤维方波测试脉冲刺激, 刺激频率为 0.05Hz, 方波波宽为 100μs, 将刺激强度设定为能诱发出最大兴奋性突出后电位(fEPSP)的 50% 的电流强度。高频强直刺激(HFS)参数为: 强度同方波、波宽 100μs、时程 1s、频率 100Hz。借助倒置显微镜, 在可视条件下将记录电极刺入 CA1 锥体细胞层记录 fEPSP, 刺激电极刺入海马的 Schaffer 侧支纤维处。给予测试脉冲, 待基线稳定后, 先记录正常 fEPSP, 约 30min, 然后

顺次给予间隔 20s 的两次 HFS 刺激。HFS 刺激后继续给予刺激前的测试脉冲刺激并记录 fEPSP 1h 以上。将斜率作为评价 fEPSP 强度的指标, 并将刺激前的 fEPSP 斜率设为 100%, 用其标准化刺激后的 fEPSP 斜率, 结果以 $\bar{x} \pm SD\%$ 形式表示。

1.6 利用膜片钳技术测试海马 CA1 区锥体细胞的兴奋性

参照文献测试海马 CA1 区锥体细胞的兴奋性^[10,12]。电极内液成份(mmol/L): 葡萄糖酸钾 (125), CaCl₂ (1), NaCl (10), EGTA (10), MgCl₂ (2), HEPES (10), GTP (0.3), ATP (2) (渗透压 285-295, pH 7.3)。记录电极电阻约 3-5MΩ。借助倒置显微镜及红外相差显微镜, 在可视条件下定位海马 CA1 区并钳制细胞。具体过程为: 选定条件较好的目标细胞, 将电极浸入液面, 然后利用软件自动补偿液接电位, 调整电极位置使电极压住细胞并将其压出一凹陷, 适当给电极施加负压以利于形成高阻封接, 自动补偿电极电容, 给予脉冲式负压小心吸破所钳细胞膜, 形成全细胞模式, 自动补偿膜电容。让细胞休息数分钟使其恢复状态, 然后进行电生理记录。调至电流钳模式, 给予去极化的方波脉冲刺激, 时程 60ms, 记录细胞电压反应, 并观察动作电位产生情况, 计算海马 CA1 锥体细胞的阈电位, 本实验中将阈电位定义为斜率达到动作电位上升支最大斜率 1/30 处的膜电压^[13]。

1.7 统计学处理

用 spss 软件进行统计学分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示结果。LTP 组间比较采用 two-way ANOVA 进行统计学分析, 阈电位组间比较用 one-way ANOVA 进行统计学分析。如 $P < 0.05$, 则认为有显著差异。

2 实验结果

2.1 T A 对海马 CA1 区 LTP 的影响

在 HFS 刺激诱导下, 各组 fEPSP 斜率较刺激前均增加并持续 1h 以上, 即均可诱发 LTP, 但模型组刺激后 fEPSP 斜率增加水平显著降低 ($P < 0.05$), T A 治疗后 fEPSP 斜率增加水平较模型组明显升高 ($P < 0.05$), 接近正常对照组水平 (Fig. 1)。提示: T A 可显著改善慢性缺氧导致的大鼠海马 CA1 区 LTP 抑制。

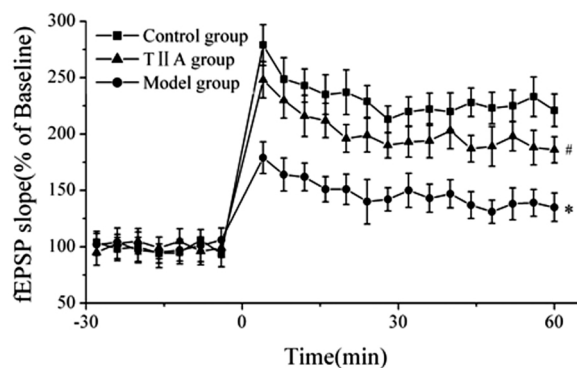


图 1 T A 减轻慢性缺氧导致的海马 CA1 区 LTP 抑制

Fig. 1 T A improves the hippocampal LTP inhibition in rats caused by hypobaric hypoxia

Note: # $P < 0.05$ T A group compared with model group; * $P < 0.05$ Model group compared with control group

2.2 T A 对海马 CA1 区锥体细胞兴奋性的影响

由 fig.2 可见给予同样的阶梯状脉冲,缺氧组 CA1 区锥体细胞放电所需的刺激电流幅度较对照组显著增加、产生的动作

电位数量较对照组明显减少,T A 干预后缺氧的上述作用显著减轻。

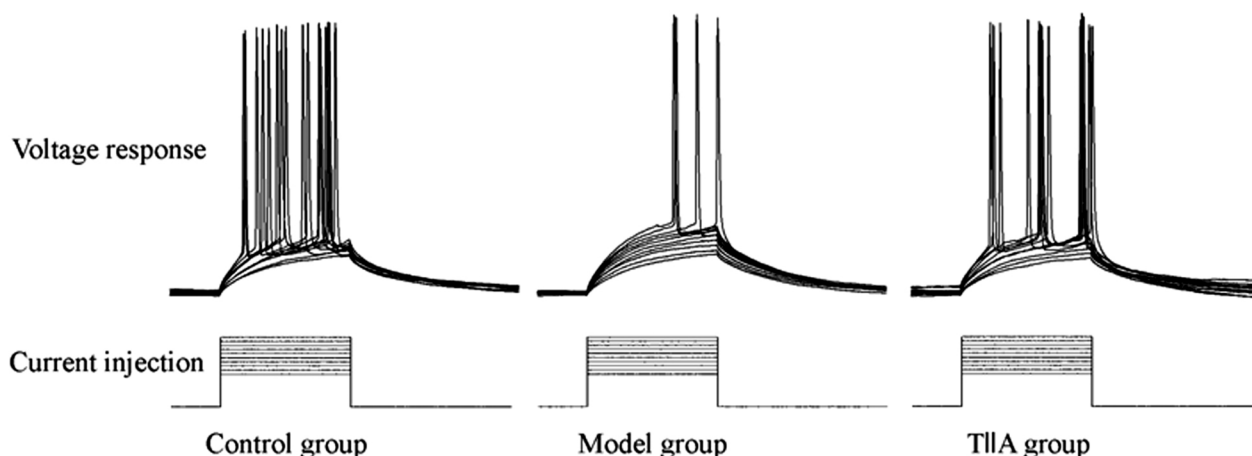


图 2 T A 减轻慢性缺氧导致的海马 CA1 区锥体细胞兴奋性降低

Fig. 2 T A maintains the excitability of hippocampal pyramidal neurons in rats.

2.3 T A 可减轻慢性缺氧对海马 CA1 锥体神经元阈电位的影响

如 Tab.1 所示,慢性缺氧可导致海马 CA1 锥体神经元阈电

位升高 ($P<0.05$),T A 干预可显著减轻慢性缺氧的对细胞上述作用($P<0.05$),使细胞阈电位恢复至接近正常水平。

表 1 T A 可减轻慢性缺氧对海马 CA1 锥体神经元阈电位的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 T A prevents the increasing of the threshold potential of neuron caused by hypoxia ($\bar{x} \pm s$)

Group	Control group	Model group	T A group
Threshold potential	-47.9 ± 3.62	$-41.4 \pm 2.98^*$	$-46.2 \pm 3.11^{\#}$

Note : $\#P<0.05$ T A group compared with Model group; $*P<0.05$ Model group compared with control group

3 讨论

随着人类文明的进步,人们在高海拔地区的活动的逐年渐增多,相应地高原病的发病人数也越来越多。近年来,高原缺氧的生物学效应已经得到相关科研工作者的广泛重视。慢性缺氧导致的认知功能障碍是高原缺氧的主要生物学效应之一,发病机理复杂,现有手段预防、治疗效果均不理想,寻找有效防治慢性缺氧性认知功能障碍的新途径已经被医学科研工作者提上日程。本课题组在这方面做了一些工作,通过实验研究发现 T A 对慢性缺氧引起的认知功能障碍有预防作用,但该预防作用的机制尚有待进一步研究。本实验拟采用膜片钳实验技术研究 T A 对海马 CA1 区 LTP 及海马 CA1 区锥体细胞兴奋型的影响,以期揭示 T A 改善慢性缺氧导致的认知功能障碍的电生理机制。

既往研究已证实人或动物的认知功能和海马关系极为密切,海马损伤会严重影响认知功能^[14-16]。孙正启等人研究证实海马的损伤也是慢性缺氧性认知功能障碍的主要原因之一^[17],故本实验从海马 CA1 区电生理改变入手研究 T A 对慢性缺氧性认知功能障碍的预防作用。海马 CA1 区 LTP 具有三大特点:特异性、时程长及可加性,同时 LTP 可反映海马的突触可塑性,提示大脑的信息存储和海马 CA1 区 LTP 密切相关,所以 LTP 已成为电生理方面研究学习、记忆的金标准^[18,19]。本研究

中,海马 CA1 区 LTP 被慢性缺氧显著抑制,提示其突触可塑性受到损害,T A 干预可显著减轻慢性缺氧的上述损害,从电生理水平进一步证实了 T A 可预防慢性缺氧性认知功能障碍。

兴奋性是反映神经元对外界刺激产生反应的能力,是神经元的基本特性之一。阈电位是指刚刚能大量激活钠通道进而引起动作电位的最小膜电位,是评价神经元兴奋性的主要指标之一。本实验中慢性缺氧使海马 CA1 锥体细胞放电所需的刺激电流幅度显著增加、阈电位升高、兴奋性降低,同样刺激强度条件下动作电位数量减少,T A 干预可明显减轻慢性缺氧对海马 CA1 锥体细胞的上述影响。以往研究已证实海马神经元兴奋性改变可严重影响认知功能,海马神经元兴奋性降低导致学习、记忆功能减退^[13,20]。结合本实验结果可得出结论:T A 改善慢性缺氧性认知功能障碍的电生理机制可能是通过维持海马 CA1 锥体细胞的兴奋性来实现的。

综上所述,T A 可显著改善慢性缺氧性认知功能障碍,维持海马 CA1 锥体细胞的兴奋性及其突出可塑性可能是其作用的电生理机制。

参考文献(References)

- [1] Jang SI, Jeong SI, Kim KJ, et al. Tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* inhibits inducible nitric oxide synthase expression and production of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in activated RAW264.7 cells[J]. *Planta Med*, 2003, 69(11):1057-1059

- [2] Li YI, Elmer G, Leboeuf RC. Tanshinone IIA reduces macrophage death induced by hydrogen peroxide by upregulating glutathione peroxidase[J]. Life Sci, 2008, 83(15-16):557-562
- [3] Kapoor S. Tanshinone IIA: a potent, natural anti-carcinogenic agent for the management of systemic malignancies [J]. Chin J Integr Med, 2009, 15(2):153-153
- [4] 李林, 陈姿亦, 茹立强, 等. 丹参酮对血管性痴呆模型大鼠学习记忆障碍的改善作用[J]. 东南大学学报·医学版, 2009, 28(5): 388-391
Li Lin, Chen Zi-yi, Ru Li-qiang, et al. Effectiveness of Tanshinone on learning and memory impairment of vascular dementia model rats [J]. Journal of Southeast Univ: Medical Sci Ed, 2009, 28 (5): 388-391 (In Chinese)
- [5] 李林, 夏保芦, 茹立强. 丹参酮对两种学习记忆功能障碍模型大鼠治疗作用的实验研究[J]. 华中科技大学学报·医学版, 2008, 37(6): 819-822
Li Lin, Xia Bao-lu, Ru Li-qiang. Curative Effectiveness of Tanshinone in the Treatment of Model Rats with Two Kinds of Learning and Memory Impairment [J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology(Health Sciences), 2008, 37(6): 819-822 (In Chinese)
- [6] Li LX, Dai JP, Ru LQ, et al. Effects of tanshinone on neuropathological changes induced by amyloid beta-peptide (1-40) injection in rat hippocampus[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(7):861-868
- [7] Liu T, Jin H, Sun QR, et al. The neuroprotective effects of tanshinone IIA on beta-amyloid-induced toxicity in rat cortical neurons [J]. Neuropharmacology, 2010, 59(7-8):595-604
- [8] Xia WJ, Yang M, Fok TF, et al. Partial neuroprotective effect of pretreatment with tanshinone IIA on neonatal hypoxia-ischemia brain damage[J]. Pediatr Res, 2005, 58(4):784-790
- [9] 隋建峰, 熊雄, 熊鹰. 模拟高原缺氧条件下大鼠记忆行为变化及其突触机制[J]. 中国行为医学科学, 2002, 11(2): 125-126
Sui Jian-feng, Xiong Xiong, Xiong Ying. Changes of memory behavior and its synaptic mechanism in rats exposed to simulated high altitude [J]. Chinese Journal of Behavioral Medical Science, 2002, 11 (2): 125-126 (In Chinese)
- [10] 闫志强, 徐英, 李华, 等. 姜黄素预防高原缺氧大鼠认知功能障碍的电生理机制[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(22): 4229-4231
Yan Zhi-qiang, Xu Ying, Li Hua, et al. The Electrophysiology Mechanism of Curcumin Prevent Hypobaric Hypoxia -Induced Cognitive Deficits [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(22): 4229-4231 (In Chinese)
- [11] Yamamoto Y, Shioda N, Han F, et al. Nobiletin improves brain ischemia-induced learning and memory deficits through stimulation of CaMK and CREB phosphorylation [J]. Brain research, 2009, 630 (1295):218-229
- [12] Yang RH, Hou XH, Xu XN, et al. Sleep deprivation impairs spatial learning and modifies the hippocampal theta rhythm in rats [J]. Neuroscience, 2011, 173(1):116-123
- [13] Yang RH, Hu SJ, Wang Y, et al. Paradoxical sleep deprivation impairs spatial learning and affects membrane excitability and mitochondrial protein in the hippocampus [J]. Brain research, 2008, 629 (1230):224-232
- [14] 段瑞生, 刘娜, 王维平, 等. 戊四氮诱导癫痫大鼠的认知功能测定与海马超微结构观察[J]. 江苏医药, 2009, 35(3):332-334
Duan Rui-sheng, Liu Na, Wang Wei-ping, et al. Cognitive ability and ultra-microstructure in rats hippocampus after pentetrazol induced seizure[J]. Jiangsu Medical Journal, 2009, 35(3): 332-334 (In Chinese)
- [15] 叶冰, 黄华品, 车春晖, 等. 癫痫复杂部分性发作患者认知功能与海马质子磁共振波谱改变相关性分析 [J]. 中华神经医学杂志, 2010, 9(2):158-161
Ye Bing, Huang Hua-pin, Che Chun-hui, et al. Correlation analysis of cognitive function and changes in proton magnetic resonance spectroscopy of the hippocampus in patients with complex partial seizures[J]. Chinese Journal of Neuromedicine, 2010, 9(2):158-161 (In Chinese)
- [16] 贾丽景, 王维平, 刘瑞春, 等. 慢性癫痫大鼠认知功能及海马胞外信号调节激酶 1 / 2 的变化 [J]. 中国全科医学, 2009, 12 (24): 2216-2219
Jia Li-ring, Wang Wei-ping, Liu Rui-chun, et al. Impaired Spatial Learning Related with Seizures and Levels of ERK1/2 in Hippocampus of Pentetrazol - kindled Rats [J]. Chinese General Practice, 2009, 12(24): 2216-2219 (In Chinese)
- [17] 孙正启, 王唯析, 康龙丽, 等. 模拟高原低氧对大鼠学习记忆行为和海马 GABA 表达的影响 [J]. 现代预防医学, 2009, 36(21): 4133-4135
Sun Zheng-qi, Wang Wei-xi, Kang Long-li, et al. The influence of simulated high-altitude hypobaric hypoxia on learning memory behaviors and expression of gaba neurons in hippocampus of rats [J]. Modern Preventive Medicine, 2009, 36(21): 4133-4135 (In Chinese)
- [18] Hai J, Wan JF, Qi L, et al. Cognitive dysfunction induced by chronic cerebral hypoperfusion in a rat model associated with arteriovenous malformations [J]. Brain research, 2009, 627(1):80-88
- [19] Xu B, Li XX, He GR, et al. Luteolin promotes long-term potentiation and improves cognitive functions in chronic cerebral hypoperfused rats[J]. European Journal of Pharmacology, 2010, 627(1):99-105
- [20] Bliss TVP, Collingridge G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus [J]. Nature, 1993, 361 (6407): 31-39