

脑卒中后大鼠海马形态学演变趋势及中药的干预作用研究*

王 戈 唐启盛[△] 李小黎 赵瑞珍 李冬梅

(北京中医药大学第三附属医院 北京 100029)

摘要 目的 观察脑卒中后大鼠海马的形态学演变趋势及颞脑解郁方对其的干预作用。方法 雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、假手术组、MCI 组、中药组、西药组、PSD 组和 VD 组。采用同种系微栓子体外注入法制备 MCI 模型, PSD 组术后 7 d 予 21 d 慢性不可预知的温和应激加孤养复制 PSD 模型, VD 组术后 28 d 经水迷宫筛选后进入实验。假手术组、中药组及西药组分别予蒸馏水、颞脑解郁方、尼莫地平干预给药 4 周。于第 1、2、4 周光镜下分析海马的形态学结构变化。结果 MCI 组海马锥体细胞数量显著减少, 细胞排列不整齐。PSD 组及 VD 组锥体细胞数量显著减少, 胞体不同程度缩小、核固缩、核碎裂、核溶解, 细胞排列不整齐, 且呈进行性发展。中药组锥体细胞缺失较少, 细胞排列整齐, 核仁明显, 西药组细胞变性有所改善, 部分细胞核固缩, 不如中药组改善明显。结论 颞脑解郁方可能通过益肾调气的主治功效改善 Papez 回路的病理改变, 阻断病情的进一步发展。

关键词 脑卒中 海马 形态学 演变趋势 颞脑解郁方

中图分类号 Q95-3, R743 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 17-3239-05

Hippocampus Morphological Evolution Trend and Interventional Effects of Chinese Medicinal in Rats with Post Stroke*

WANG Ge, TANG Qi-sheng[△], LI Xiao-li, ZHAO Rui-zhen, LI Dong-mei

(Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the Hippocampus morphological evolution trend and Yinao Jieyu Formula side of their intervention effects after stroke in rats. **Methods:** Male Wistar rats were randomly divided into normal group, sham operation group of MCI Group, the Chinese Medicines, western medicine group, the PSD group VD group. The same germ-line micro-emboli in vitro injection was prepared by MCI model; the PSD group after 7 d to 21 d of chronic unpredictable mild stress plus solitary housed and PSD model; the VD group after 28 d after water maze screening to enter the experimental. Sham group, the Chinese medicine group and WM group were given distilled water. Yinao Jieyu Formula nimodipine intervention administered four weeks. 1, 2 and 4 weeks under the light microscope analysis of morphological structural changes in the hippocampus. **Results** Hippocampal pyramidal cells in MCI group reduce the irregular arrangement of cells. The number of pyramidal cells in PSD group and VD group reduced significantly, and soma has different level reduced, pyknosis, karyorrhexis and karyolysis. Pyramidal cells arranged irregularly, and got worse. Chinese medicine group showed that pyramidal cell loss less, and arranged regularly, nucleolus can be seen clearly. Degeneration of pyramidal cells in western medicine group improved, pyknosis in some of pyramidal cells, and not as good as Chinese medicine group. **Conclusions** Yinao Jieyu Formula i Papez loop pathological change and block the progress of the disease by reinforcing kidney and regulating gas primary.

Key words: Stroke; Hippocampus; Morphological; Evolution trend; Yinaojieyu Formula

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3, R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 17-3239-05

前言

脑卒中因其高死亡率和致残率严重威胁人类的健康, 在中国, 脑卒中的死亡率占据血管性疾病的首位^[1], 带来了巨大的经济负担^[2]。脑卒中 80% 以上的类型为缺血性脑卒中^[3], 多发性脑梗塞 (Multiple cerebral infarction, MCI) 又占有较高的比例^[4], 卒中后抑郁 (post-stroke depression, PSD) 和血管性痴呆 (Vascular dementia, VaD) 是脑卒中后普遍和严重的并发症。

脑卒中后病理表现为脑血管损伤后的相关神经解剖核团

功能及结构的改变, 主要包括海马、丘脑、杏仁核、乳头体等解剖结构, 这些脑区多数属于 Papez 情感回路, 其中海马是环路和边缘系统的研究重点^[5], 目前对 Papez 回路与 MCI 的相关性研究较多, 而与 PSD 及 VD 的相关性研究较少, 割裂了这个回路的之间的联系。本实验采用同种系微栓子体外注入法制备 MCI、PSD 及 VD 模型, 观察大鼠海马的形态学演变趋势, 以探讨益肾调气中药对其的干预机制。

1 材料与方法

* 基金项目 国家自然科学基金资助项目 (30973740, 81173231) 国家中医药管理局中医药行业专项 (20080709) 北京中医药大学创新团队 (2011-CXTD-26) 北京中医药大学自主选题项目 (2011-JYBZZ-JS126)

作者简介 王戈 (1982-), 女, 博士研究生, 研究方向 中医药防治脑病的研究, E-mail: wanggeyx@163.com

△ 通讯作者 唐启盛, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 电话 010-64286498, E-mail: tangqisheng@263.net

(收稿日期 2012-03-15 接受日期 2012-04-10)

1.1 实验动物和试剂

二级雄性 Wistar 大鼠, 体重(220±20) g, 清洁级, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号 SCXK (京) 2006-0009。颞脑解郁方 (北京中医药大学中药鉴定教研室鉴定), 尼莫地平片 (拜耳医药保健有限公司, 批号: 国药准字 H20003010)。电热恒温鼓风干燥箱 (上海一恒科技有限公司)、半自动切片机 (德国 Leitz)、摊片机 (德国 Leitz)、万能显微镜 (美国 Polyvar)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 动物分组及给药 动物购入后预养 1 周, 1 周后 Open-field 行为评分, 评分相近大鼠随机分为正常组、假手术组、MCI 组、中药组、西药组、PSD 组、VD 组, 每组各 24 只。正常组常规饲养, 假手术、MCI 组予灌胃双蒸水, 中药组予灌胃颞脑解郁方 (浓度 0.62 g/mL, 4℃冰箱贮存, 灌胃前加热), 西药组予灌胃尼莫地平 (9.45 mg/(kg·d), 灌胃前溶于蒸馏水中混匀)。根据体重变化每周调整灌胃用量。

1.2.2 模型制备 结扎颈外动脉的近心端, 缝合。24h 后观察造模是否成功。假手术组: 由颈外动脉注入等体积的生理盐水。PSD 组参照导师唐后盛教授^[8]方法复制 PSD 模型。在建立 MCI 模型的基础上, 大鼠恢复 1 周后孤养, 开始进行 21 天不可预知慢性应激刺激, 共包括 7 种刺激 (24 h 禁食、24 h 禁水、通宵照明、4℃冰水游泳、45℃热烘刺激 5 min、夹尾 1 min、高速水平振荡 (160 次/min) 30 min, 每种刺激重复 3 次, 每日 1 次, 无规律轮流进行。

1.2.3 HE 染色取材 各组大鼠分别在 1、2、4 周完成行为学测试后, 予 10% 的水合氯醛 (400 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 打开胸腔经左心室插管到主动脉, 剪开右心耳, 先用预温的 37℃ 的生理盐水约 200 mL 快速冲洗至流出液为淡红色, 再以预冷的 4% 多聚甲醛灌注固定 30 min, 速度先快后慢, 当大鼠出现四肢及颈项部僵硬, 立即断头取脑, 放入盛有相同灌注液的瓶中固定 3 天后, 70%、80%、90%、95%、100% 乙醇常规梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 冠状切片, 片厚 6 μm。

1.2.4 HE 染色实验步骤 石蜡切片二甲苯脱蜡 2 次, 每次 10 分钟; 100%、95%、90%、80%、70% 乙醇依次脱水, 每次 10 分钟; 入蒸馏水冲洗 2 次; 苏木素染色 30 分钟; 1% 盐酸乙醇分化数秒; 再次蒸馏水冲洗; 伊红染色 10 秒钟, 镜下观察颜色变化; 再依次 70%、80%、90%、95%、100% * 2 乙醇脱水, 每次脱水时间为 10 分钟; 二甲苯透明 2 次, 每次 10 分钟; 树胶封片。光学显微镜下观察。

2 结果

正常组: 海马 CA1 区神经元数量较多, 锥体细胞排列整齐、密集, 细胞膜完整, 核仁清晰, 未见神经元坏死和神经元丢失 (见图 1)。

MCI 组: 模型组损伤侧脑组织可见点片状局部缺血性改变, 出现坏死区, 坏死区细胞丢失严重, 细胞结构不清楚, 呈筛状, 可见格子细胞及增生的胶质细胞, 细胞胞体缩小、出现核固缩及核溶解, 血管扩张充血。海马 CA1 区锥体细胞丢失, 数量显著减少, 细胞排列不整齐, 可见增生的胶质细胞 (见图 2、3、4)。第 2 周胶质细胞增生明显 (图 5)。第 4 周海马区锥体细胞缺失情况有所恢复 (见图 6)。

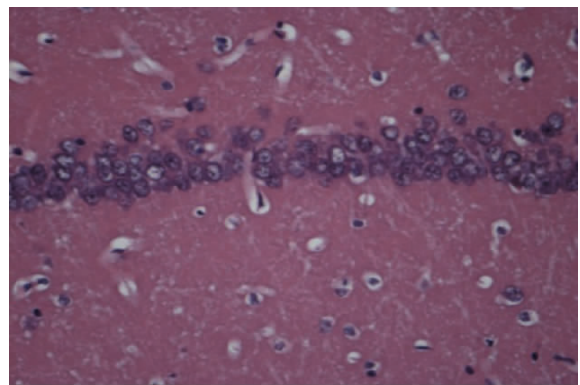


图 1 正常组海马 400×

Fig.1 Normal hippocampus 400×

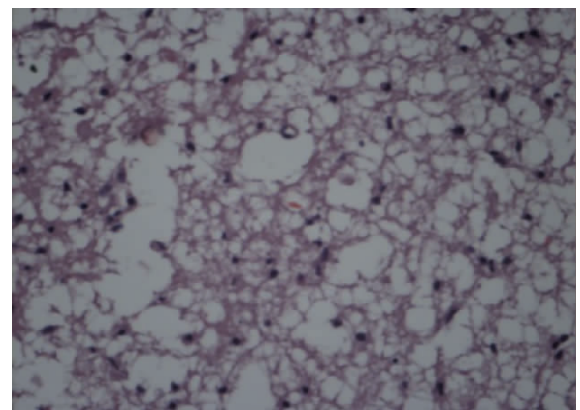


图 2 MCI 组 1 周海马 10×

Fig.2 MCI hippocampus of 1w 10×

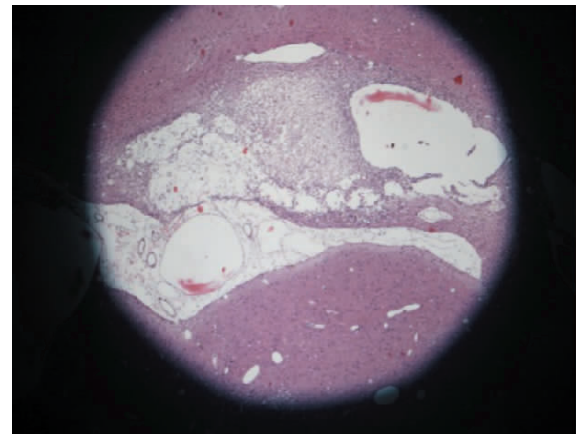


图 3 MCI 组 1 周海马 400×

Fig.3 MCI hippocampus of 1w 400×

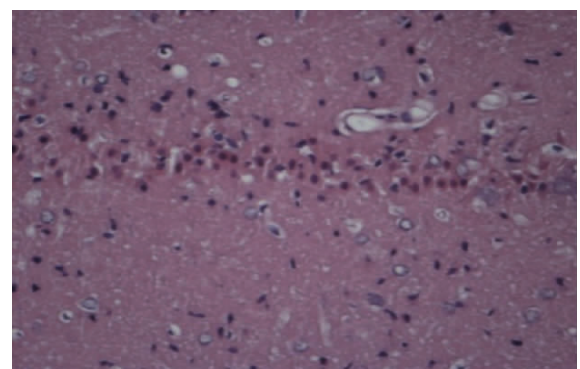


图 4 MCI 组 1 周海马 400×

Fig.4 MCI hippocampus of 1w 400×

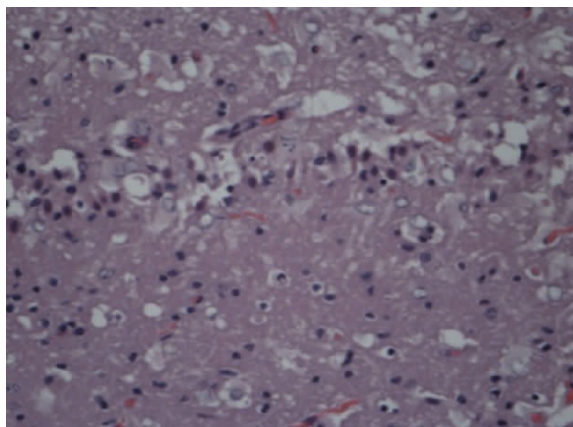


图 5 MCI 组 2 周海马 400×

Fig.5 MCI hippocampus of 2w 400×

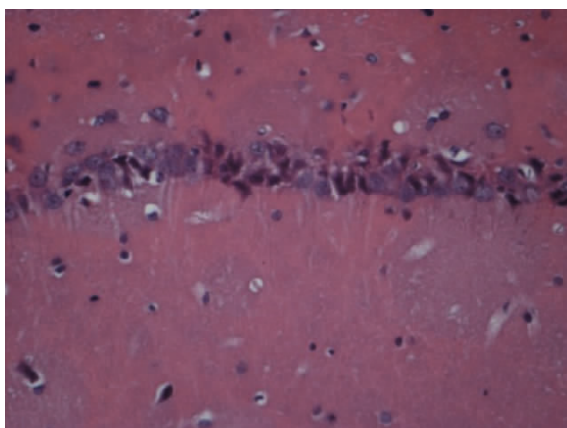


图.6 MCI 组 4 周海马 400×

Fig.6 MCI hippocampus of 2w 400×

PSD 组 损伤侧脑组织海马 CA1 区锥体细胞丢失,细胞胞体不同程度缩小、核固缩、核碎裂、核溶解,数量显著减少,细胞排列不整齐,第 4 周海马区神经细胞缺失和变性比第 1 周严重(见图 7、8、9)。

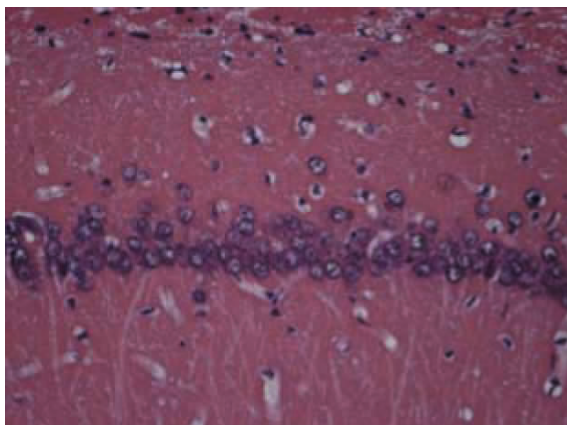


图 7 PSD 组 1 周海马 400×

Fig.7 PSD hippocampus of 1w 400×

VD 组:损伤侧脑组织海马 CA1 区锥体细胞有所丢失,细胞数量减少,排列不整齐 细胞胞体不同程度缩小、出现胞核溶解和核固缩现象,细胞空泡样变。第 4 周海马区神经细胞缺失

和变性比第 1 周神经细胞变性加重。但细胞变性程度较同时间段 PSD 组大鼠减轻(见图 10、11、12)。

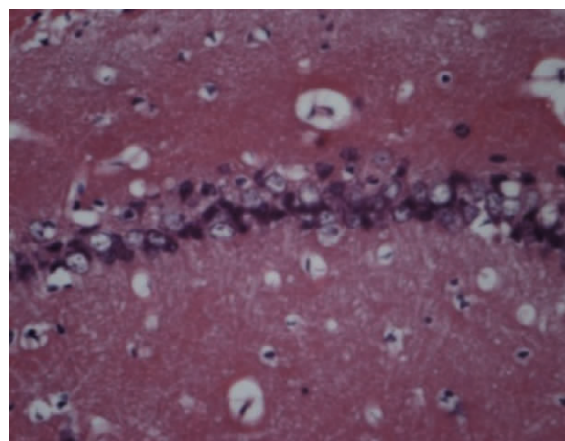


图 8 PSD 组 2 周海马 400×

Fig.8 PSD hippocampus of 2w 400×

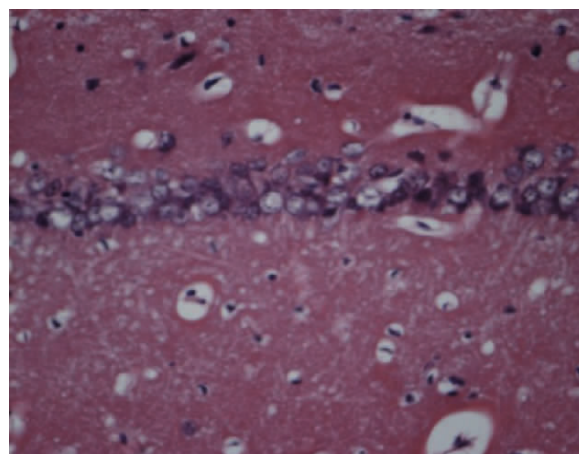


图 9 PSD 组 4 周海马 400×

Fig.9 PSD hippocampus of 4w 400×

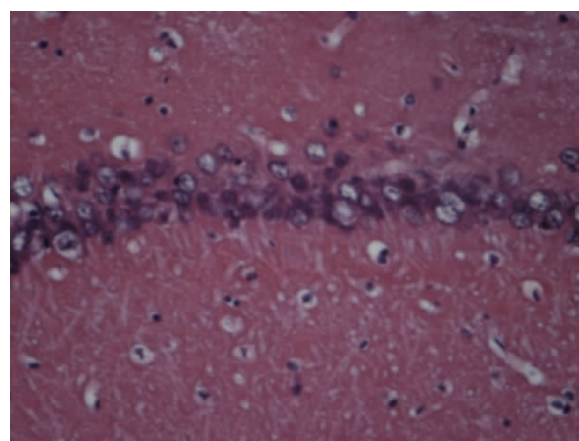


图 10 VD 组 1 周海马 400×

Fig.10 VD hippocampus of 1w 400×

中药组 第 4 周损伤侧海马 CA1 区锥体细胞缺失较少,细胞排列整齐,核仁明显,西药组细胞变性有所改善,有部分细胞核固缩,不如中药组改善明显(见图 13、14)。而 PSD 组和 VD 组 4 周时细胞变性无改善,且呈进行性发展。

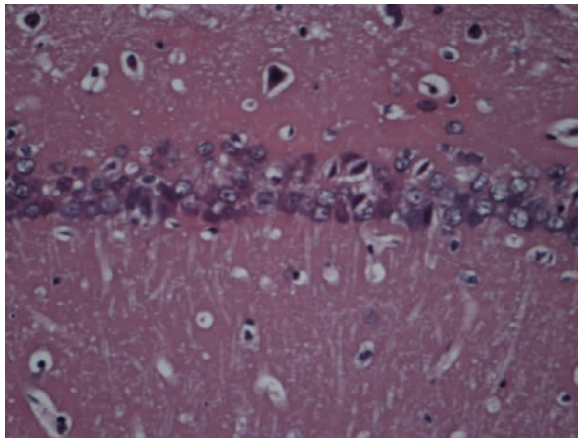


图 11 VD 组 2 周海马 400×

Fig.11 VD hippocampus of 2w 400×

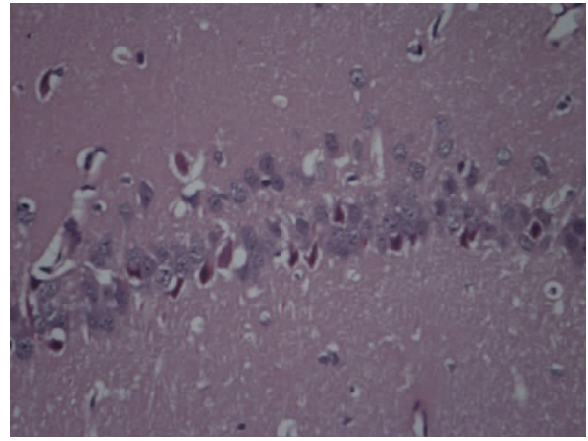


图 14 西药组 4 周海马 400×

Fig.14 W M group hippocampus of 4w 400×

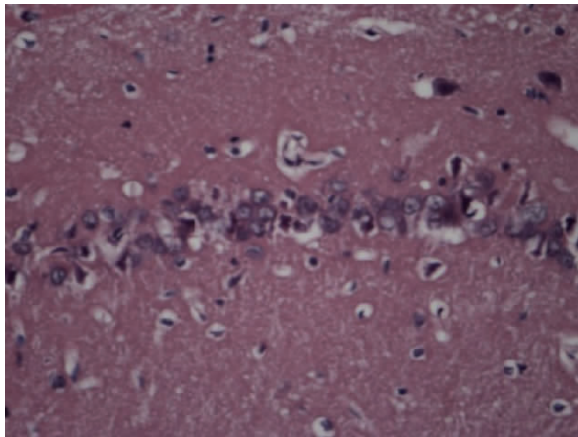


图 12 VD 组 4 周海马 400×

Fig.12 VD hippocampus of 4w 400×

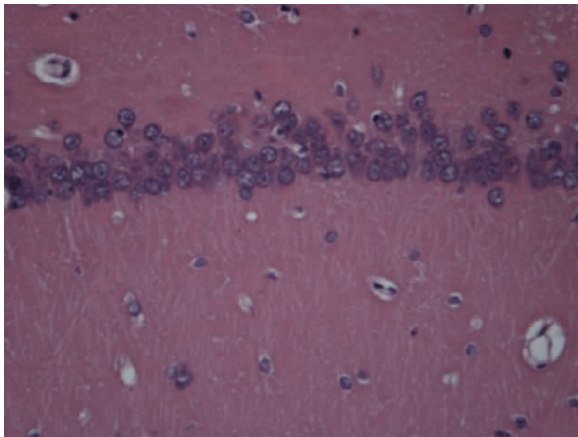


图 13 中药组 4 周海马 400×

Fig.13 Chinese medicine group hippocampus of 4w 400×

3 讨论

Papez 回路, 由美国神经解剖学家 James Papez 于 1937 年提出。海马→乳头体→丘脑前核→杏仁核复合体→扣带回→海马旁回→海马的封闭环路即 Papez 环。因其位于大脑的深部, 血液供应相对较差, 侧枝循环少, 对缺血缺氧又极为敏感, 决定了其在脑血管病损害中较易发生继发性损害。学习、记忆及情绪的形成是以脑神经元形态和结构完整为基础的。脑卒中后病

理表现为脑血管损伤后的相关神经解剖核团功能及结构的改变。主要包括海马^[10]、杏仁核^[10]、下丘脑^[11-12]等解剖结构。海马及其周围结构很小的损害, 都可引起明显的记忆障碍。

许多研究发现 MCI 大鼠光镜下海马可见锥体细胞数量减少、形态结构发生改变^[13]; 电镜下发现海马神经细胞核萎缩, 核膜清晰, 核异染色质呈簇, 细胞浆、细胞器减少或消失^[14]。在动物实验中, 海马取材相对简便, 且结构特殊易准确定位, 其细胞排列规整, 容易对比研究。因此本次实验选用 Papez 回路中海马进行微观形态结构观测。脑卒中模型大鼠早期出现的认知功能受损、思维迟滞、注意力下降、睡眠障碍等精神症状组群, 据其特征可归属于阈下抑郁和早期痴呆的范畴, 有向 PSD 及 VD 转化的趋势。

目前对脑卒中后精神症状组群的中医研究文献尚未见到相关报道。中医认为脑血管病后脏腑虚衰, 肾虚精亏, 气机不畅最终形成虚实夹杂之肾虚肝郁证^[15], 以情绪低落、悲观失望、注意力不集中、记忆力下降及睡眠障碍等为主要表现, 属本虚标实证, 肾精亏虚为本, 气机壅滞为标。以益肾调气法为则组成中药复方颐脑解郁方, 由刺五加、郁金等组成。方中刺五加为五加科植物, 味辛, 微苦, 性温, 入心、脾、肾经, 具有扶正固本、补肾健脾、益智安神等功效。通过动物实验和人体试验发现, 刺五加有抗疲劳作用^[16]。现代药理发现大剂量刺五加提取液可改善脑供血^[17]。全方具有补益肝肾, 调气解郁安神之功效。前期研究发现, PSD 大鼠模型存在前皮质及海马区神经元损伤^[18,19], 益肾调气法可改善拟 VD 大鼠学习记忆水平^[20]。本实验结果表明, 颐脑解郁方可改善左侧海马 CA1 区锥体细胞缺失情况, 减轻细胞变性程度, 提示颐脑解郁方可能通过益肾调气的主治功效改善 Papez 回路的病理改变, 进而改善模型大鼠的症状, 阻断其演变成 PSD 及 VD 的过程, 从而达到“既病防变”的目的, 这可能是颐脑解郁方对脑卒中后向 PSD 及 VD 演变起到早期干预作用的环节。但是, PSD 及 VD 早期阈下抑郁及血管性认知障碍刚刚开始出现时患者精神行为变化的基础与临床研究均相当匮乏, 这将是今后研究的主要方向。

参考文献(References)

- [1] He J, Gu D, Wu X, et al. Major causes of death among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2005, 353(11):1124-1134

- [2] Wang YL, Wu D, Liao X, et al. Burden of stroke in China [J]. Int J Stroke, 2007, 2(3):211-213
- [3] Lavados PM, Sacks C, Prina L, et al. Incidence, 30-day case-fatality rate, and prognosis of stroke in Iquique, Chile: a 2-year community-based prospective study (PISCIS project)[J]. Lancet, 2005, 365(9478): 2206-2215
- [4] 张永葆. 多发性脑梗塞 84 例 CT 与临床分析 [J]. 蚌埠医学院学报, 1999, 24(1):53
Zhang Yong-bao. Multiple cerebral infarction in 84 cases of CT and clinical analysis [J]. Journal of Bengbu Medical College, 1999, 24(1): 53
- [5] 蒋文华. 神经解剖学[M].上海: 第 1 版. 复旦大学出版社, 2002
Jiang Wen-hua. Population size neuroanatomy [M]. Shanghai: Fudan University Press, 1st Edition, 2002
- [6] Kaneko D, Nakamura N, Ogawa T. Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli: Development of a new experimental model [J]. Stroke, 1985, 16:76-84
- [7] 陈俊抛, 田时雨, 于微微, 等. 多发性脑梗塞痴呆动物模型的研究[J]. 中华神经精神科杂志, 1994, 27(5):311-312
Chen Jun-pao, Tian Shi-yu, Yu Wei-wei, et al. Dementia animal model of multiple cerebral infarction[J]. Chinese Journal of Psychiatry, 1994, 27(5):311-312
- [8] 唐启盛, 罗斌, 司银楚, 等. 脑出血后抑郁状态动物模型的建立[J]. 北京中医药大学学报, 2006, 1(29):16-19
Tang Qi-sheng, Luo Bin, Si Yin-chu, et al. Cerebral hemorrhage after the animal model of depression [J]. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2006, 29(1):16-19
- [9] 赵宪林, 方秀斌, 李东培. 大鼠血管性痴呆模型制作[J]. 中国医科大学学报, 2002, 31(3):166-167, 176
Zhao Xian-lin, Fang Xiu-bin, Li Dong-pei. Vascular dementia model making[J]. Journal of China Medical University, 2002, 31(3):166-167, 176
- [10] 陈宇, 徐坚民, 冯敢生. 脑梗死后抑郁症患者海马及杏仁核体积的 MRI 研究[J]. 放射学实践, 2009, 24(6):603-606
Chen Yu, Xu Jian-min, Feng Gan-sheng. After cerebral infarction in patients with depression in the hippocampus and amygdala volume MRI study[J]. Radiology Practice, 2009, 24(6):603-606
- [11] 侯秀娟, 唐启盛, 李小黎. 脑缺血后抑郁模型大鼠下丘脑酪氨酸羟化酶的表达及中药干预作用[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(8):1692-1694
Hou Xiu-juan, Tang Qi-sheng, Li Xiao-li. After cerebral ischemia model of depression in the expression of tyrosine hydroxylase in the rat hypothalamus and Chinese medicine intervention[J]. Chinese Medicine, 2008, 26(8):1692-1694
- [12] Lanna ME, Madeira DM, Alves G, et al. Vascular dementia by thalamic strategic infarct[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2008, 66(2B):412-414
- [13] 车光升, 周丽楠, 张晖, 等. 多发性脑梗塞性大鼠模型制作及其意义 [J]. 中国公共卫生, 2007, 23(5):617-618
Che Guang-sheng, Zhou Li-nan, Zhang Hui, et al. Multiple cerebral infarction rat model of production and its significance [J]. China Public Health, 2007, 23(5):617-618
- [14] 白文, 张云岭, 韩振蕴, 等. 急性多发脑梗塞大鼠海马皮层 MARCKS 蛋白的表达与活性的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(1): 134-138
Bai Wen, Zhang Yun-ling, Han Zhen-yun, et al. Multiple acute cerebral infarction in rat hippocampal cortex MARCKS protein expression and activity changes [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2005, 21(1):134-138
- [15] 谢利军, 唐启盛, 常立果. 从肾虚肝郁探讨抑郁症的治疗[J]. 吉林中医药, 2007, 27(1):15-16
Xie Li-jun, Tang Qi-sheng, Chang Li-guo. Investigate the treatment of depression from the kidney liver depression [J]. Jilin Traditional Chinese Medicine, 2007, 27(1):15-16
- [16] 潘翔, 徐峰. 刺五加抗疲劳功能实验研究的进展[J]. 实验动物科学与管理, 2005, 22(2):39-43
Pan Xiang, Xu Feng. Acanthopanax anti-fatigue function of the experimental study[J]. Laboratory Animal Science and Management, 2005, 22(2):39-43
- [17] 张伟, 刘宝珠, 裴月湖. 刺五加药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2002, 19(2):143-146
Zhang Wei, Liu Bao-zhu, Pei Yue-hu. Acanthopanax pharmacological effects [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2002, 19(2):143-146
- [18] 王娣, 唐启盛, 侯秀娟. 脑缺血后抑郁大鼠皮层及海马 IP3 表达及中药的干预作用[J]. 山西中药, 2009, 25(2):39-41
Wang Di, Tang Qi-sheng, Hou Xiu-juan. Depression cortex and hippocampus IP3 expression and traditional Chinese medicine interventions in cerebral ischemia [J]. Shaanxi Chinese Medicine, 2009, 25(2): 39-41
- [19] 李侠, 唐启盛, 侯秀娟, 等. 脑卒中后抑郁模型大鼠脑单胺递质变化及中药颞颥解郁方的干预作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(47): 49-51
Li Xia, Tang Qi-sheng, Hou Xiu-juan, et al. Depression after stroke model of rat brain monoaminergic neurotransmitters in traditional Chinese medicine Yinao stagnation party intervention [J]. Chinese Clinical Rehabilitation, 2006, 10(47):49-51
- [20] 侯秀娟, 唐启盛, 司银楚. 脑卒中后抑郁模型大鼠学习记忆的 Morris 水迷宫测定[J]. 中国临床康复, 2005, 9(12):3-7
Hou Xiu-juan, Tang Qi-sheng, Si Yin-chu. The Morris water maze learning and memory in rat model of depression after stroke determination[J]. Chinese Clinical Rehabilitation, 2005, 9(12):3-7