

脑安软胶囊改善急性脑梗死大鼠行为及抑制海马神经元 NMDA 诱发电流增大的保护作用

付四海 范柳 张旭静 王桂清

(上海市脑血管病防治研究所 上海 201318)

提 要 目的:探讨脑安软胶囊改善急性脑梗塞大鼠行为学的作用及其可能机制。方法:采用高频电凝手术阻断大鼠大脑中动脉建立急性脑梗塞大鼠模型, Beder 法检查大鼠行为;并应用全细胞膜片钳技术研究其对缺氧诱发海马神经元 N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDA)电流增大的影响。结果:急性脑梗死大鼠脑组织梗死面积为 $27.96 \pm 3.95\%$, 并伴有行为明显受损;20mg/kg、40mg/kg 或 80mg/kg 脑安软胶囊治疗能明显减小脑组织梗死面积, 分别为 $12.38 \pm 10.61\%$ 、 $13.39 \pm 7.65\%$ 和 $10.49 \pm 8.89\%$ 。脑安软胶囊呈剂量依赖性地改善大鼠急性脑梗死所致的大鼠行为障碍, 快速抑制海马神经元缺氧后 NMDA 诱发的电流增大。结论:脑安软胶囊对大鼠中动脉阻断所致的脑组织损伤具有明显的保护作用, 它可明显改善脑组织损伤所致的行为学障碍, 抑制缺氧诱导的 NMDA 受体活化。

关键词 脑安软胶囊;脑梗死;N-甲基-D-天冬氨酸受体;全细胞膜片钳

在脑缺血引起脑损伤的过程中, 神经元谷氨酸受体的激活特别是 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体的激活是脑组织损伤的重要机制。NMDA 受体的激活介导海马 CA1 的损伤是脑血管疾病行为学功能障碍的重要原因之一, 应用 NMDA 抑制剂可保护脑组织缺血区损伤和改善急性脑梗塞所致的行为学障碍^[1,2]。脑安软胶囊是以补阳还五汤为基础, 结合现代制药工艺而创制的新药。文献报道它具有明显改善脑血管功能和降低卒中发病和死亡率的作用^[3]。但其在降低卒中发病的同时, 能否有效促进急性脑梗塞后行为康复尚不十分清楚。本实验通过大鼠中动脉高频电凝手术建立急性脑梗死的大鼠模型, 在探讨脑安软胶囊对急性脑梗死大鼠脑组织损伤的保护作用基础上, 进一步观察其对行为学的影响;采用膜片钳技术记录体外培养海马神经元 NMDA 诱发电流, 研究脑安软胶囊对缺氧海马神经元胞体上 NMDA 诱发电流的影响, 试图从细胞水平阐述脑安软胶囊改善急性脑组织损伤的可能机制。

1 资料与方法

1.1 试验药物 脑安软胶囊:脑安软胶囊由川芎 30g、当归 30g、人参各 10g 等经 CO₂ 超临界萃取制备, 由上海祥鹤制药厂提供, 批号为 020425。

1.2 动物 清洁级 2 月龄体重为 200~300g 的雄性 Wistar 大鼠由中国科学院上海实验动物中心提供。所有大鼠在自由饮水和进食的条件下分笼饲养, 室温维持在 18~20℃。

1.3 仪器 膜片钳放大器 (Patch/ Whole Cell Clamp Amplifier, CEZ2300, Japan); 信号放大器与模数转换仪 (Digidata 1320A, 16-bit Acquisition System, Axon Instrument); 分析软件是 Axon 公司 pClamp8.0 和 Clampfit8.0 产品。

1.4 方法 大鼠用水合氯醛 400mg/kg ip 麻醉。按 Tamura 方法将实验大鼠侧卧固定于手术台上, 沿右侧外耳孔和右眼外眦部连线的中点, 于中点处垂直此连线切开皮肤 2cm 左右, 在手术显微镜下沿颞肌中线依次切断颞肌和咬肌, 分离肌并暴露颞弓和大部分的鳞状骨后, 在颞骨和鳞状骨前联合的前下方约 2mm 处钻孔约 3~5mm 直径的小骨窗, 找到并用细针分离大脑中动脉, 用高频电刀电凝烧灼喙端内 1mm 至大脑下静脉之间的一段大脑中动脉。

大鼠随机分为正常对照组、正常给药组和实验模型组, 实验模型组大鼠手术清醒后 (约手术后 4h) 立即进行行为检查, 将

手术成功的急性脑梗死大鼠又随机分为等容量精制油溶剂组, 脑安软胶囊 20mg/kg、40mg/kg 和 80mg/kg 共 4 组, 每组 10~11 只。正常给药组每天给予 80mg/kg 脑安软胶囊, 正常对照组不做任何处理。

1.4.1 行为检查 术后 4h 立即进行行为检查, 对模型成功大鼠分别灌胃给予脑安软胶囊 (20mg/kg/d、40mg/kg/d 或 80mg/kg/d) 或等容量的溶剂, 24h 给药一次, 共两次, 第二次给药后 24h, 观察大鼠行为活动并进行行为评分。行为检查评分标准参照参考文献^[4]:提起鼠尾, 使其离地约 1/3m 高, 观察前肢情况。正常大鼠两前肢对称向地伸开; 如果有肩部内旋、前肢内收现象发生者, 根据其严重程度, 最高评为 4 分, 正常评为 0 分。将动物置于平滑地板上, 分别推其左、右肩向对侧移动, 此时检查动物抵抗推动时的阻力, 正常大鼠两侧推动的阻力明显对称。如一侧阻力下降者, 可根据下降程度评 1~3 分, 正常评为 0 分。观察两前肢肌力。将动物两前肢置于一金属网上, 然后轻提起大鼠, 检查两前肢肌力。正常左右对称, 如有一侧前肢肌力下降者, 根据下降程度评为 1~3 分, 正常评为 0 分。根据上述行为检查的情况, 积分值为 0~10 分。积分越高说明动物行为障碍越严重。

1.4.2 病理学检查 大鼠第二次行为检查后, 断头, 取脑, 固定包埋, 进行 Nissle 染色和苏木素染色。在光学显微镜下进行病理学检查, 并通过透射式扫描仪对脑病理切片扫描, 计算脑损伤部分占全脑切片截面积的百分比。

1.4.3 建立海马神经元缺氧模型 体外培养大鼠海马神经元 7~10d, 置于不含血清的无糖 DMEM 培养液, 超净工作台内通以 95% N₂ + 5% CO₂ 约 20min 以排除培养液内所溶解的氧气, 迅速将生长有海马神经元的盖玻片从培养皿内取出, 放入另一盛有上述处理过的培养液的培养皿置于缺氧装置中 (一个密闭的铝盒子, 留有一个通 N₂ 的小孔) 中, 通以 95% N₂ + 5% CO₂ 5min 后, 再取出盖玻片放入盛有正常 B27 无血清培养液的培养皿中, 将其置于 CO₂ 培养箱中再继续培养 3d。观察 0.5% 脑安软胶囊作用于正常培养海马神经元和缺氧处理的海马神经元后, NMDA 诱发电流的变化及脑安软胶囊对 NMDA 电流的影响。

1.4.4 全细胞膜片钳记录 采用常规高阻抗封接的全细胞记录方式^[5], 封接电阻大于 5G Ω , 细胞静息膜电位低于 -50mV 不作进一步记录。膜片钳放大器记录细胞的电信号, 采集的信号

经放大器与模数转换器经 10 KHz 滤波,输入相连的计算机。采样频率为 2~3 KHz,进行信号记录的监测、存储及电极记录以及分析处理。记录电极采用软质中性无芯玻璃管,外径 1.6 mm,内径 1.3 mm,电极内液(mmol/L): KCl 140, HEPES 10, EGTA 10, MgCl 2, Na₂-ATP 2, GTP 0.3,用 NaOH 调节 pH 至 7.2~7.3。

1.5 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并进行 t 检验,以双侧 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。脑安软胶囊对 NMDA 诱发电流(INMDA)抑制率按照抑制率=(实验组 INMDA 峰值-对照组 INMDA 峰值)/对照组 INMDA 峰值 $\times 100\%$ 来计算。

2 结果

2.1 对大鼠大脑中动脉阻断后脑损伤面积的影响 大鼠大脑中动脉阻断 52 小时可导致大鼠脑组织梗死,不同剂量脑安软胶囊均能减小脑损伤百分比;而正常对照组和正常给药组大鼠未见有脑组织损伤。

表 1 对大鼠大脑中动脉阻断后脑损伤面积的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	鼠数(只)	脑组织损伤面积(%)
溶剂		10	27.96 \pm 3.95
脑安	20	10	12.38 \pm 10.61 *
脑安	40	10	13.39 \pm 7.65 *
脑安	80	11	10.49 \pm 8.89 **

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 对大鼠大脑中动脉阻断后行为的影响 大鼠大脑中动脉阻断后其行为明显受损,给药前各组动物模型行为评分无显著差异,给予脑安软胶囊治疗 48h,给药组大鼠行为障碍呈剂量依赖性改善(表 2)。实验期间,正常对照组和正常给药组大鼠行为未见异常。

表 2 各组大鼠给药前及给药后行为检查积分值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	鼠数(只)	行为评分	
			药前	药后
溶剂		10	9.48 \pm 0.81	9.50 \pm 0.76
脑安	20	10	9.55 \pm 0.77	7.80 \pm 0.92 **
脑安	40	10	9.56 \pm 0.73	7.10 \pm 0.88 **
脑安	80	11	9.47 \pm 0.86	6.55 \pm 0.93 **

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs before drug treatment

2.3 脑安软胶囊对缺氧海马神经元 NMDA 诱发电流的影响 当钳制电压(Vh)为-60mV 时,细胞外单独给予 0.5% 脑安软胶囊后,在正常培养的海马神经元上未记录到任何诱发电流。细胞外给予 100 μ mol/L NMDA,在正常培养 10d 左右的海马神经元上可诱发出较大的内向电流(INMDA = -453.785 \pm 65.372 pA, n = 10), INMDA 迅速达到顶峰。经缺氧处理的海马神经元, NMDA 诱发电流明显增大(INMDA = -760.634 \pm 87.425 pA, n = 10, $P < 0.05$)。当细胞外同时给予 NMDA (100 μ mol/L) 和 0.5% 脑安软胶囊时,正常培养的海马神经元 INMDA 峰值无明显变化,而经缺氧处理的海马神经元 INMDA 峰值在 0.5% 脑安软胶囊存在时被抑制,电流迅速下降,峰值抑制率为 33.648 \pm 5.251 % ($p < 0.05$, n = 10)。结果见图 1。脑安软胶囊抑制缺氧诱导的 NMDA 受体过度激活是可逆的,当萃取液被冲洗后,其抑制作用迅速消失(见图 2)。

3 讨论

脑安软胶囊具有改善脑供血,抗血小板聚集和抗血栓形成

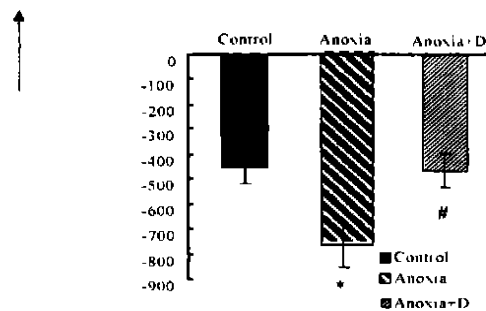


图 1 脑安软胶囊对正常海马神经元和缺氧海马神经元 NMDA 诱发电流的作用

NMDA: extracellular application of 100 μ mol/L NMDA; NMDA + D: extracellular coapplication of 100 μ mol/L NMDA and 0.5% Naoan capsule; control: normally cultured hippocampal neurons; anoxia: normal hippocampal neurons subjected to anoxia. * $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs anoxia cells.

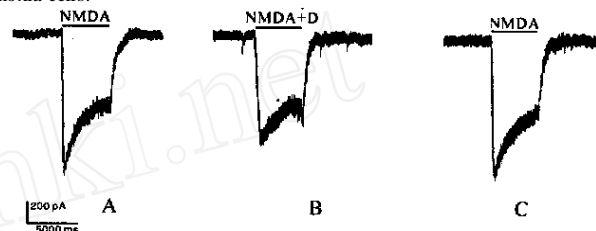


图 2 脑安软胶囊对缺氧处理后海马神经元 NMDA 诱发电流峰值的影响

A: extracellular application 100 μ mol/L NMDA for 5s. B: extracellular coapplication of 0.5% Naoan capsule and NMDA for 5s. C: Extract liquid was washed out, then sole application NMDA for 5s. Holding potential: -60mV. Intervals between drug application were at least 4 min.

等作用,可在人群中防治脑卒中的发生^[3,6]。我所对脑血管疾病高危人群 3 年的干预发现,脑安干预卒中发生率明显下降,降低幅度达 51.8%;干预组患者脑血管功能明显改善^[7],提示脑安软胶囊具有明显改善脑血管功能和降低卒中发病和死亡率的作用。本研究进一步发现,脑安软胶囊不仅可明显抑制大鼠急性脑梗塞造成的脑缺血所致的脑部病理损害,还能显著改善急性脑梗塞大鼠的行为障碍,提示脑安软胶囊除了能抑制急性脑组织损伤以外,可能还具有促进急性脑组织损伤神经功能康复的作用。

在脑缺血引起神经功能损伤的机制研究中,Heurteaux 等^[8]研究表明,大鼠缺血 1 周后, NMDA 受体表达增加,海马 NMDA 受体 mRNA 在前脑缺血 20min 再灌注 1h 后开始增加,7d 达高峰。利用短暂缺氧缺糖模拟体内缺血过程可造成海马区锥体细胞的电位改变,缺氧可诱导大鼠海马脑片 NMDA 受体电流增大^[9]。此外,还有研究报道 NMDA 受体的激活可导致神经元胞内 Ca²⁺ 大量内流,此过程是脑卒中神经损伤的重要机制。已知 NMDA 受体是直接与阳离子通道相偶联的一种受体,海马神经元膜上 NMDA 受体过度激活或 NMDA 受体数量增加都可表现为 NMDA 诱发电流增大^[10]。本研究发现缺氧处理的体外培养海马神经元 NMDA 诱发电流比正常培养的海马神经元 NMDA 诱发电流增大,此结果与国外学者报道一致。Choi 等人认为 NMDA 受体过度活化是导致脑血管疾病所致神经功能损害的重要因素^[11]。NMDA 受体阻断剂能明显抑制脑梗死大鼠神经元的死亡^[12,13]。因此,作用 NMDA 受体已经成为治疗

急性脑卒中患者的新靶点。本研究发现脑安软胶囊对缺氧所致的 NMDA 电流异常增大具有明显的抑制作用,抑制缺氧所致 NMDA 受体的过度激活可能是其改善急性脑梗塞大鼠行为障碍的重要机理。此外,本实验还发现脑安软胶囊对过度激活的 NMDA 受体的抑制作用是可逆的,当脑安软胶囊被冲洗后,可恢复缺氧诱导的 NMDA 电流增大,提示脑安软胶囊使 NMDA 受体功能保持在正常的状态依赖于脑安软胶囊中有效成分的存在。但脑安软胶囊所含成份较多、作用复杂,究竟是由哪种或哪些有效成分介导产生此作用,尚需进一步探索。

参考文献

- 1 Olney JW, Labruyere J, Wang G, et al. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science*, 1991;254 1515 ~ 1518
- 2 Brian S, Meldrum. Glutamate as a neurotransmitter in brain: review of Physiology and Pathology. *J Nutrition*, 2000;130 1007S ~ 1015S
- 3 王桂清,曹奕丰,沈凤英,等.上海市南汇县卒中干预效果的历史对照评价. *临床神经病学杂志*, 2002;15(4) 200 ~ 203
- 4 Beder JB, Pitts LH, Tsuji M. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of neurological examination. *Stroke*, 1986;17 472
- 5 Shi LJ, He HY, Liu LA, et al. Rapid nongenomic effect of corticosterone on neuronal nicotinic acetylcholine receptor in PC12 cells. *Arch*

Biochem Biophys, 2001;394(2) 145 ~ 50

- 6 张旭静,范柳,王素春,等. 脑安胶囊的不同制剂对大鼠血小板聚集的影响. *医药导报*, 2003;22(2) 77 ~ 79
- 7 Huang JY, Wang GQ, Shen FY, et al. A cohort study on cerebral vascular hemodynamics accumulative score and risks of stroke. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2003;24(2) 89 ~ 93
- 8 Heuteaux C, Lauritzen I, Widmann C, et al. Glutamate-induced over-expression of NMDA receptor messenger RNAs and protein triggered by activation of AMPA/kinate receptors in rat hippocampus following fore-brain ischemia. *Brain Res*, 1994;659(1 ~ 2) 67 ~ 74
- 9 Robert F, Bert L, Stoppini L. Blockade of NMDA-receptors or calcium channels attenuates the ischaemia-evoked efflux of glutamate and phosphoethanolamine and depression of neuronal activity in rat organotypic hippocampal slice cultures. *C R Biol*, 2002;325(4) 495 ~ 504
- 10 Vornov JJ, Coyle JT. Glutamate neurotoxicity and the inhibition of protein synthesis in the hippocampal slice. *J Neurochem*, 1991;56 996 ~ 1006
- 11 Choi W. Excitotoxic cell death. *J Neurobio*, 1992;(123) 1261 ~ 1276
- 12 Block F. Global ischemia and behavioral deficits. *Prog Neurobiol*, 1999;(58) 279 ~ 295
- 13 Zoppo G, Wagner S, Tagaya M. Trends and future developments in the pharmacological treatment of acute ischemic stroke. *Drugs*, 1997;(54) 9 ~ 38

Effect of Naoan soft capsule (脑安软胶囊) on the brain injury in acute cerebral infarction rats and inhibit the NMDA-evoked currents in cultured hippocampal neurons

Fu Sihai, Fan Liu, Zhang Xujing, Wang Guiqing

(Shanghai Institute of Cerebral Vascular Disease Prevention and Cure, Shanghai 201318)

Objective: To investigate the effect of Naoan soft capsule on preventing brain injury in acute cerebral infarction rats and its possible mechanisms. **Methods:** To observe the behaviours of cerebral ischemia rats before and after Naoan capsule treatment and to examine sections of cerebral pathological issues. Furthermore, whole-cell patch-clamp recording was used to assess the effect of extract liquid of Naoan capsule on the NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) current of cultured hippocampal neurons. **Results:** Naoan capsule treatment (20mg/kg, 40mg/kg or 80mg/kg) markedly prevented the damage of brain tissue and improved the actions of acute cerebral infarction rats, which is from 27.96 ± 3.95% to 12.38 ± 10.61%, 13.39 ± 7.65% and 10.49 ± 8.89% respectively. Peak amplitude of NMDA-evoked currents increased significantly in cultured hippocampal neurons subjected to anoxia in vitro, which is inhibited by Naoan capsule. The effect of Naoan capsule is reversible. **Conclusion:** These results suggest that Naoan capsule protects the brain tissue from being damaged induced by acute infarction, and the beneficial effect of Naoan capsule may relate to the inhibition of the over-activated NMDA receptor activity.

Key words Naoan soft capsule(脑安软胶囊); cerebral infarction; NMDA receptor; whole-cell patch clamp

冰七滴丸对大鼠急性心肌缺血保护作用的研究

韩燕全 龙子江 洪燕 王桐生

(安徽中医学院 合肥 230038)

提要 目的:探讨冰七滴丸对急性实验性心肌缺血大鼠的影响。方法:结扎冠状动脉前降支造成大鼠心肌缺血模型,进行心电图监测、血清酶学和组织染色检查等指标测定来确定心肌缺血范围和损伤程度,并观察冰七滴丸对其影响。结果:模型组大鼠心电图波形明显改变,大鼠血清中 CK 和 LDH 值显著高于正常组,NO 含量显著低于正常组,组织染色学检查可见明显心肌缺血损