

丹参对颞叶缺血大鼠空间认知障碍的改善和对血小板源性生长因子表达的影响

姜树军 吴卫平 张小澍 匡培根 匡培梓 隋南 杨炯炯 胡家芬

【摘要】 目的 探讨丹参对颞叶缺血性损害大鼠空间认知能力的改善作用及对血小板源性生长因子(PDGF)表达的影响。方法 采用光化学技术导致大鼠左侧颞叶皮层缺血,术前 30 分钟及术后第 3 天分别给丹参组大鼠腹腔注射丹参 10 g/kg,用 Morris 迷宫及图像自动监视系统监测大鼠行为。然后取脑进行梗死体积测定及 PDGF-A 免疫组化分析。结果 丹参使颞叶缺血大鼠在 Morris 迷宫中搜索目标的反应时和行程显著缩短,使用正常认知策略增多,由随机式过度到趋向和直线式策略的进程加快,颞叶梗死体积缩小,PDGF-A 表达减少。结论 丹参可以明显改善颞叶缺血性损害大鼠的空间认知障碍,其机制与丹参减小颞叶梗死体积和下调 PDGF-A 表达有关。

【关键词】 丹参 脑缺血 认知障碍 血小板源生长因子

Effects of radix salviae miltiorrhizae on improving spatial cognition of rats with left temporal ischemia and expression of platelet-derived growth factor JIANG Shujun*, WU Weiping, ZHANG Xiaoshu, et al.

* The Laboratory of Neurotransmitter, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853

【Abstract】 Objective To investigate effects of radix salviae miltiorrhizae (RSM) on spatial cognition of the rats with left temporal ischemia and the expression of platelet-derived growth factor (PDGF). **Methods** Selective left temporal ischemia of the rats was induced by the photochemistry method and the RSM group of rats was treated 30 minutes before and 3 days after the operation. Morris water maze and a Morris maze experimental assistant system were used to monitor the behavior of the treated rats. Then the rat brains were analysed by HE and immunochemistry of PDGF-A. **Results** RSM reduced the reaction time and distance of this kind of spatial learning test of the ischemia rats and made the ischemia rats use normal strategies more often and change the strategies faster. Moreover, RSM reduced the size of the infarction and down-regulated the expression of PDGF-A. **Conclusion** RSM could improve the spatial learning ability of the rats with temporal ischemia, which would be based on reducing the infarction and down-regulation of PDGF-A expression.

【Key words】 Salvia miltiorrhizae Cerebral ischemia Cognition disorders Platelet-derived growth factor

丹参除可以减轻脑水肿、抑制血栓形成外,还可以明显改善大鼠脑缺血后单胺类神经介质的紊乱,调节神经肽及兴奋性氨基酸的含量,清除自由基,降低 NO 含量,下调 c-fos 基因表达,使热休克蛋白 70(HSP70)表达增多及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)样免疫反应增强等^[1-5]。但丹参对行为障碍的改善作用尚缺乏系统的研究。我们以前的工作初

步显示,丹参可以改善颞叶缺血大鼠在 Y 型迷宫和跳台实验中的记忆能力^[6]。在本实验中,我们采用先进的 Morris 迷宫进一步研究丹参对单侧颞叶皮层缺血性损害大鼠空间认知障碍的改善作用。脑缺血时血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)在缺血灶局部表达明显增多^[7]。因此,我们同时观察了丹参对颞叶缺血局部 PDGF 表达的影响。

本课题为国家自然科学基金(No.39570257)、中国科学院留学回国择优基金及军队九五 M125 项目基金资助

作者单位:100853 北京,中国人民解放军总医院神经介质实验室(姜树军、吴卫平、匡培根);中国人民解放军 261 医院神经内科(张小澍);中国科学院心理研究所(匡培梓、隋南、杨炯炯、胡家芬)

材料和方法

1. 实验动物及分组:成年雄性 Wistar 大白鼠(北京医科大学动物中心提供),实验起始体重(200 ± 20) g,共 27 只,随机分为 3 组,单纯缺血组

($n = 10$)、丹参组 ($n = 7$)、假手术组 ($n = 10$)。实验期间摄食饮水自由,全部行为训练都在 10:00 ~ 17:00 时之间完成。行为实验结束后,取脑进行梗死体积测定及 PDGF 免疫组化分析。

2. 动物模型的制备:采用立体定向光化学诱导脑缺血技术。将大鼠麻醉后,固定在立体定位仪上,从尾静脉注射玫瑰红(RB, 20 mg/kg),切开头皮,确定颞叶位置,用光导纤维引导冷光,定向照射与左侧颞叶相应的裸露颅骨 20 分钟,造成局灶性颞叶缺血^[8]。术前 30 分钟给丹参组大鼠腹腔注射丹参(10 g/kg,北京第四制药厂生产),单纯缺血组则注射同等剂量的生理盐水。术后第 3 天给丹参组大鼠追加注射同等剂量的药物。假手术组大鼠仅进行了麻醉和手术切口,术后局部抗感染。

3. 行为实验:各组大鼠从术后第 4 天开始 Morris 迷宫实验,连续 5 天。实验分为两个阶段:预训练(1 天)及训练(4 天),大鼠共接受训练 24 次,每天 6 次,每次间隔 15 分钟。图像自动监视系统自动追踪大鼠游泳轨迹,并记录反应时(s)、行程(cm)、搜索策略。反应时、行程以 3 次训练成绩为 1 个组次取平均值,训练 4 天,共 8 个组次。实验数据采用 SPSS 软件包进行方差分析和 χ^2 检验。本实验中各组大鼠的平均反应时和搜索行程在第 5 ~ 8 组次时已十分接近,因此,在图 1 和图 2 中各数据仅标至第 5 组次。

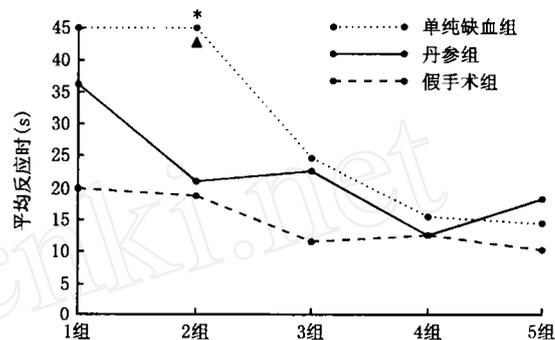
4. 大鼠颞叶梗死体积测定及免疫组化分析:行为实验结束后,麻醉、灌注、取脑固定、脱水,从视交叉开始行 30 μm 厚连续冠状切片。切片分 2 组:一组行 PDGF-A(中山公司)免疫组化染色,相邻一组行 HE 染色。

结 果

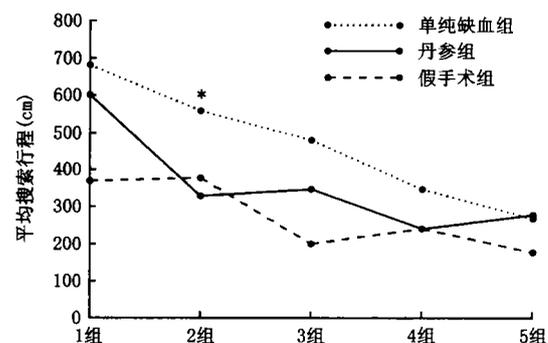
一、行为实验结果

1. 反应时的比较:如图 1 所示,单纯缺血组、丹参组及假手术组大鼠各组内的组次间平均反应时差异均具有极显著意义(F 值分别为 7.53、3.67、7.70, P 均 < 0.001),各组大鼠的反应时均随学习组次的增加而缩短,在第 5 组次时三组的反应时已十分接近。组间比较发现,各组大鼠在第 2 组次平均反应时的差异具有显著性意义($F = 3.67, P < 0.05$)。进一步两两比较可见,在这一组次单纯缺血组与假手术组、丹参组大鼠相比,差异分别具有显著性意义,而丹参组和假手术组之间没有明显差别。

2. 行程的比较:如图 2 所示,单纯缺血组、丹参组和假手术组大鼠内组次间平均搜索行程的差异具有显著性意义(F 值分别为 6.51、3.67、5.52, P 均 < 0.001),总的趋势是,随着学习组次的增加,搜索行程逐渐缩短,至第 5 组次时各组的行程已十分接近。各组在不同时间点进行比较时发现,大鼠在第 2 组次搜索行程的差异具有显著性意义($F = 6.02, P < 0.001$),进一步两两比较可见,单纯缺血组与假手术组、丹参组大鼠相比,差异均具有显著性意义,而丹参组和假手术组大鼠间没有明显差别。



与丹参组比较, * $P < 0.05$; 与假手术组比较, $\blacktriangle P < 0.05$
图 1 各组大鼠在第 1 ~ 5 组次平均反应时的变化



与丹参组比较, * $P < 0.05$
图 2 各组大鼠在第 1 ~ 5 组次平均搜索行程的变化

3. 搜索策略的比较:实验统计了不同组大鼠第 1 ~ 8 组次所使用各种搜索策略的比例,不同搜索策略在不同组内的百分比,以及各组在不同组次时搜索策略的变化(图 3)。结果表明,丹参组大鼠较多地使用了趋向式和直线式策略,单纯缺血组大鼠则以随机式策略为主($\chi^2 = 15.74, P < 0.01$)。进一步分析发现,丹参组和假手术组大鼠在第 3、4 组次时趋向式策略已较多,第 5、6 组次时单纯缺血组大鼠的搜索方式由随机式为主变为以趋向式为主,而

假手术组大鼠则以趋向和直线式居多,两者差异具有极显著意义($P < 0.001$),第 7、8 组次时各组大鼠的直线式策略均增多,组间没有明显差别。

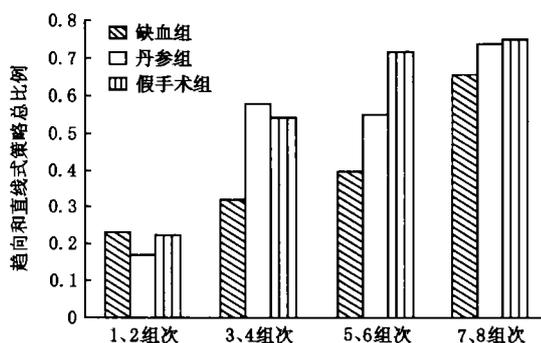


图 3 各组大鼠在第 1~8 组次趋向和直线式策略的变化

二、梗死体积

每组取 4 只鼠脑,通过系列 HE 染色切片,发现单纯缺血组和丹参组左侧颞叶皮层存在梗死灶,梗死灶中心点位于视交叉后(4.8 ± 0.5) mm。但丹参治疗组梗死体积较单纯缺血组显著缩小($P < 0.01$)。

三、PDGF-A 免疫组化分析

PDGF-A 免疫组化检测发现,在缺血脑组织中 PDGF-A 表达,其中单纯缺血组 PDGF-A 表达最多,丹参治疗组居中,假手术组基本无 PDGF-A 表达(图 4~7)。

讨 论

行为实验表明,与单纯缺血组相比,丹参组大鼠在 Morris 迷宫中搜索目标的反应时和行程显著缩短,丹参组大鼠较多地使用了正常的认知策略,由随机式过度到边缘式策略的进程也较快。表明丹参可以改善颞叶缺血大鼠的空间认知功能障碍,丹参显著缩小颞叶皮层梗死体积是丹参改善空间认知功能障碍的病理证据。

PDGF 由 A、B 两条肽链以不同方式组合而成,它能促进成纤维细胞、成骨细胞、平滑肌细胞和胶质

细胞有丝分裂。它还能作用于血管内皮细胞和神经细胞,引起增殖、趋化、肌动蛋白重组和钙流动等一系列细胞反应^[9]。平滑肌细胞、激活的成纤维细胞、滋养层细胞、激活的单核/巨噬细胞、动脉内皮细胞、神经细胞、胶质细胞以及肿瘤细胞均能表达 PDGF^[7]。

当中枢神经系统发生创伤、中风、脑膜炎、脑脓肿等病变时,脑内 PDGF 表达水平增加。在缺血脑组织中 PDGF 表达水平升高的意义不完全明了,但至少它与梗死灶内血管再生和胶质增生有关,另外,它也可能与神经轴索再生有关^[7]。本实验假手术组无 PDGF-A 表达,而单纯缺血组大鼠梗死灶及附近 PDGF-A 表达显著增多,丹参组 PDGF-A 表达与单纯缺血组相比显著减少,可能是因为经丹参治疗,颞叶缺血减轻,颞叶所受应激损害相对减少所致。

(本文图 4~7 见插图第 21 页)

参 考 文 献

- 1 Kuang PG, Wu WP, Liu JX, et al. The effect of Radix Salviae Miltiorrhizae on substance P in cerebral ischemia—animal experiment. *J Trad Chin Med*, 1991, 11: 123-127.
- 2 吴卫平,李振洲,匡培根. 脑缺血再灌注后脑组织 c-fos 基因表达及丹参的影响. *中国神经免疫学及神经病学杂志*, 1995, 2: 1-3.
- 3 陶沂,匡培根. 缺血再灌注时脑组织中 NO 含量的变化及腺苷的影响. *卒中与神经疾病*, 1995, 2: 115-118.
- 4 匡培根,吴卫平,刘军,等. 局灶性脑缺血再灌注时丹参对热休克蛋白 70 的影响—免疫细胞化学及病理学研究. *卒中与神经疾病*, 1996, 3: 61-63.
- 5 刘军,吴卫平,匡培根. 丹参脑缺血再灌注的神经保护作用—成纤维细胞生长因子上调. *中国神经免疫学及神经病学杂志*, 1996, 3: 225-229.
- 6 姜树军,吴卫平,匡培根,等. 丹参对颞叶梗死大鼠学习记忆能力影响的研究. *心理学报*, 1997, 29 增刊: 75-77.
- 7 Krupinski J, Issa R, Bujny T, et al. A putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans. *Stroke*, 1997, 28: 564-573.
- 8 向敬,匡培根. 选择性白鼠感觉运动区梗死模型建立与缺血损伤定量分析技术. *中华医学杂志*, 1994, 26: 417-422.
- 9 Silberstein FC, De Simone R, Levi G, et al. Cytokine-regulated expression of platelet-derived growth factor gene and protein in cultured human astrocytes. *J Neurochem*, 1996, 66: 1409-1417.

(收稿:1998-12-07 修回:1999-05-24)

(本文编辑:包雅琳)