

五羟色胺含量在丹参改善颞叶缺血大鼠记忆障碍中的变化

姜树军¹, 吴卫平¹, 匡培根¹, 匡培梓², 管林初², 隋南², 杨炯炯², 胡家芬², 张小澍³

(1. 解放军总医院神经介质实验室, 北京 100853; 2. 中国科学院心理研究室, 北京 100101;
3. 解放军 261 医院神经内科, 北京 100094)

摘要:目的 探讨五羟色胺(5-HT)含量在丹参改善单侧颞叶缺血性损害大鼠空间记忆障碍中的变化。方法 采用立体定向光化学技术选择性地导致大鼠左侧颞叶皮层缺血,术前30 min及术后第3天分别给丹参组大鼠腹腔注射丹参10 g/kg体重,用Morris水迷宫及图像自动监视系统监测大鼠行为。然后取脑组织进行病理观察及5-HT免疫组化分析。结果 经丹参治疗,颞叶缺血性损害大鼠的空间记忆障碍得到显著改善,颞叶缺血性损害显著减轻,缺血灶内5-HT表达明显减少。结论 在丹参改善单侧颞叶缺血大鼠空间记忆障碍中,5-HT起一定作用。

关键词: 色胺类; 丹参; 脑缺血; 记忆障碍

中图分类号: R 743.31

文献标识码: A

文章编号: 1009-0126(2000)02-0120-04

The change of 5-HT during improvement of spatial memory by radix salviae miltiorrhizae in rats with ischemia of left temporal lobe

JIANG Shu-jun, WU Wei-ping, KUANG Pei-gen *et al*

(The Laboratory of Neurotransmitter, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, Chian)

Abstract: Objective To study the effects of radix saiviae miltiorrhizae(RSM) on spatial memory of rats with ischemia of left temporal lobe and the expression of 5-HT. **Methods** Selective ischemia of left temporal lobe of rats was induced by the photochemistry method and RSM group was treated with RSM 10 g/kg iv 30 minutes before and 3 days after the operation. Morris water maze and Morris Maze Experimental Assistant System were used to monitor the behavior. Then the rat brains were observed pathologically by HE stain and immunonistochemistry of 5-HT. **Results** RSM significantly improved the spatial memory of rats with ischemia of left temporal lobe, reduced the ischemic damage and down-regulated the expression of 5-HT in ischemic focus. **Conclusion** RSM could improve spatial memery ability of rats with ischemia of temporal lobe. The down-regulation of the expression of 5-HT probably is related to the neuroprotective mechanism.

Key words: tryptamines; saivia miltiorrhiza; cerebral ischemia; memory disorders

丹参是传统中草药,药源充足,成本低,能治疗多种疾病。我们在脑缺血和(或)缺血再灌注动物模型上发现,丹参能降低脑水肿;降低脑精氨酸加压素浓度;降低一氧化氮(NO)兴奋性毒性;清除氧自由基;抑制脂质过氧化;下调 e-fos、内皮素1(ET₁)、一氧化氮合酶(NOS)基因表达;增加热休克蛋白(HSP70)和bFGF表达。

为了观察丹参对大鼠脑颞叶缺血性记忆障碍的影响,我们曾在水迷宫和跳台实验中,初步观察到丹参能够改善大鼠脑颞叶缺血性损害后的记忆障碍^[1]。此次,我们又用先进的Morris水迷宫进一步研究了丹参是否对颞叶缺血性损害大鼠空间记忆障碍有改善作用,并着重观察了颞叶缺血损伤和5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)表达的变化。5-HT与学习、记忆有关^[2]。我们在实验过程曾发现,在缺血侧脑组织中5-HT含量降低^[3]。后来国外学者又发现,在局部脑缺血灶内5-HT释放明显增多,并加重脑缺血性损害^[4]。因此,我们观察了颞叶缺血局

收稿日期: 2000-02-04

基金项目: 本课题为军队医药卫生“九五”课题资助项目(96M125)

作者简介: 姜树军,男,1962年7月生,博士,主治医师,现在海军总

部 5-HT 的表达及丹参的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 成年雄性 Wistar 大鼠(北京医科大学动物中心提供), 实验起始体重(200 ± 20) g, 共 36 只, 随机分为 3 组, 单纯缺血组、丹参组及假手术组, 每组 12 只。让动物适应实验环境 2 d, 然后进行行为实验 5 d, 实验期间摄食、饮水自由, 全部行为实验均在 10:00 am~ 5:00 pm 之间进行。行为实验结束后, 立即取脑进行病理检查及 5-HT 免疫组化分析。

1.2 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 体重), 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 min, 造成局灶性颞叶缺血^[5]。术前 30 min 给丹参组大鼠腹腔注射丹参(10 g/kg 体重, 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。

1.3 Morris 水迷宫行为实验 行为实验具体过程我们将另文报道。

1.4 取脑固定 行为实验结束后, 即在实验开始后的第 8 天, 将每组大鼠依然用 10% 水合氯醛经腹腔麻醉(0.3 g/kg 体重), 开胸暴露心脏, 夹闭腹主动脉。经主动脉, 用生理盐水 20 ml 迅速冲洗干净脑部血液, 再缓慢灌注 4% 多聚甲醛 40 ml, 对大鼠脑进行内固定。然后迅速取脑, 置于 4% 多聚甲醛中, 在 4℃ 下保存不超过 3 个月。

1.5 HE 染色 每组取 6 只鼠脑, 梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 在石蜡切片机上从视交叉后 2 mm 开始切片, 片厚 5 μm, 每隔 50 μm 取 1 片, 共取 80 片。HE 染色后, 在光镜下观察脑组织病理学改变。每只鼠脑取缺血灶中心的 5 张切片, 在光镜下(10 目镜 × 10 物镜) 数出每张切片缺血灶内缺血神经细胞数, 计算出每组 6 只鼠脑的缺血神经细胞数平均值及标准差。然后组与组之间进行比较。

1.6 免疫组化分析 每组取 6 只鼠脑, 20% 蔗糖脱水, 在冰冻切片机上经梗死部位行 30 μm 厚连续冠状切片。取每只鼠脑相同层面切片行 5-HT 免疫组化染色, 5-HT 抗体和试剂盒(包括抗血清、二抗和三抗)均为美国 Santa Cruz 公司产品, 二胺基联苯胺(DAB)-镍呈色液, 是在 0.05 mU/L tris-HCl(pH7.4) 中加入 0.05% DAB(中山公司)、2.5% 硫酸镍胺和

0.01% 过氧化氢配制而成。具体步骤:(1) 在室温下将拟染切片放入 1% TritonX-100 中孵育 20 min;(2) 每张切片加入 1:4000 的 5-HT 单克隆抗体 200 μl 和抗血清 50 μl, 在 4℃ 下孵育 48 h;(3) 每张切片加入二抗 200 μl, 在 4℃ 下孵育 24 h;(4) 每张切片加入三抗 200 μl, 在 4℃ 下孵育 12 h;(5) 室温下每片用二胺基联苯胺(DAB)-镍呈色液 1000 μl 呈色 5 min;(6) 1% 明胶贴片, 在空气中干燥, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, DPX 封片。在以上各步骤转换间均用 PBS 漂洗(5 min × 3 次)。

取每只鼠脑缺血灶的 5 张 5-HT 免疫组化切片, 在光镜下(10 目镜 × 10 物镜) 数出免疫染色阳性细胞数, 计算出每组 6 只大鼠的免疫染色阳性细胞平均值及标准差, 然后组与组之间进行比较。

2 实验结果

2.1 行为实验结果 关于行为实验的详细结果我们将在另文报道。简言之, 单纯颞叶缺血损害大鼠的空间记忆能力降低。丹参组颞叶缺血性损害大鼠的空间记忆功能障碍得到显著改善。而且丹参的改善作用在第 2 天即可出现。

2.2 颞叶缺血损害比较 行为实验结束后, 在显微镜下观察鼠脑系列 HE 染色切片发现, 大鼠的缺血灶位于左侧(光照侧) 皮层 TeAud 区及相邻 Str18 区部分, 缺血灶中心层面位于视交叉后(4.8 ± 0.5) mm。缺血灶局限于颞叶皮层, 同侧海马未受任何损伤。右侧(非光照侧) 相应区域皮层放射状分布着神经元和神经胶质细胞, 高倍镜下可见神经元大而圆、透明, 有 1~2 个明显的核仁。而左侧(光照侧) 皮层缺血灶中有大量缺血细胞, 形状不规则, 核固缩深染, 胞浆嗜伊红。

单纯颞叶缺血大鼠的缺血神经元密度最高, 缺血神经元数量最多, 为(1109 ± 177) 个; 而丹参治疗组缺血神经元密度下降, 缺血神经元数量减少, 为(256 ± 57) 个; 假手术组大鼠颞叶相应部位几乎无缺血损害(0~2 个)。两实验组比较, 差异有显著性意义($P < 0.01$)。表明丹参对颞叶皮层缺血有改善作用(图 1)。

2.3 5-HT 免疫组化分析 行为实验结束后, 大鼠脑 5-HT 免疫组化检测发现, 5-HT 免疫阳性细胞在细胞浆内表达, 呈黑色。各组颞叶缺血灶同一层面切片的 5-HT 免疫阳性细胞数有显著差异。单纯缺血组 5-HT 免疫阳性细胞表达最多, 为(39 ± 6) 个, 丹参组免疫阳性细胞数减少, 为(17 ± 5) 个; 假手术组和单纯缺血组右侧相应部位几乎无 5-HT 免疫阳性

细胞表达(1~ 3个), 两实验组比较, 差异有显著性

意义($P < 0.01$)。见图2~ 3。

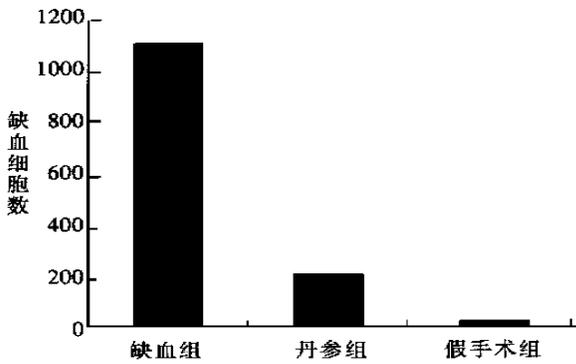


图1 各组缺血的细胞数比较

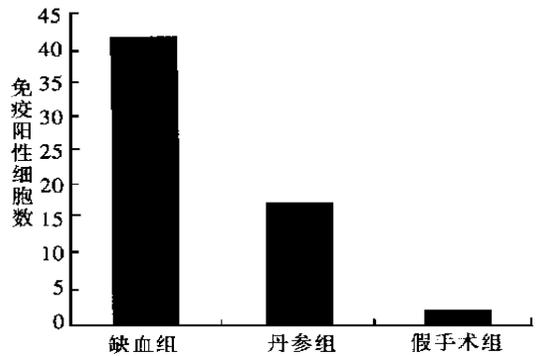


图2 5-HT免疫阳性细胞数比较

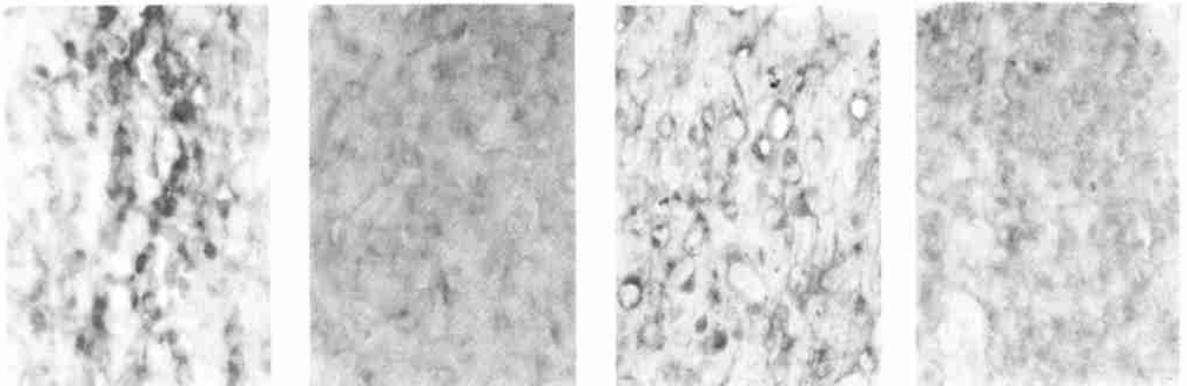


图3 颞叶皮层5-HT免疫阳性细胞比较(20× 10)。单纯缺血组免疫阳性细胞表达最多,丹参组免疫阳性细胞数减少,假手术组和单纯缺血组右侧颞叶中基本无5-HT免疫阳性细胞表达

3 讨论

脑血管病是中老年人的常见病, 发病率、致死率及致残率高。颞叶缺血性损害会导致患者记忆力严重降低, 给患者本人带来不幸, 并给家庭和社会造成负担。基础实验及临床试验均证明, 丹参是治疗缺血性脑血管病的有效药物。丹参是否能改善颞叶缺血性损害患者的记忆障碍? 为此我们设计了这一实验。

我们的行为实验结果显示^[1], 单纯颞叶缺血损害大鼠的空间认知能力降低。而丹参组颞叶缺血性损害大鼠的空间认知功能障碍得到显著改善。丹参的改善作用在第2天即可出现, 且其作用时间长。组织学结果显示, 单纯颞叶缺血损害大鼠的光照侧TeAud区及相邻部分Str18区皮层内, 缺血神经元数量最多。丹参能够显著减轻颞叶缺血损害程度。这是丹参改善颞叶缺血损害大鼠记忆障碍的病理学证

据。大鼠脑5-HT免疫组化检测发现, 各组颞叶缺血灶5-HT免疫阳性细胞数有显著差异。单纯颞叶缺血损害大鼠颞叶缺血区内的5-HT免疫阳性细胞表达最多, 丹参组相应颞叶缺血区内免疫阳性细胞数显著减少, 说明丹参降低了缺血区内5-HT的表达。

5-HT是一种发现较早的神经递质, 认为5-HT可导致脑动脉收缩。当在离体动脉条上加上5-HT后, 脑动脉条发生收缩^[6,7]。中枢神经系统发生卒中、创伤、冷损伤以及脑缺血后, 均有5-HT释放^[8]。而且此时脑血管对5-HT的敏感性显著增强^[9]。研究5-HT在热休克导致大鼠脑损害中的作用时发现, 脑内5-HT能系统完好的大鼠发生热休克后, 脑内5-HT释放增加, 颅内动脉收缩, 颅内压升高, 脑内灌注压下降, 脑神经元损害增加。而脑内5-HT能系统预先被破坏的大鼠发生热休克后, 热休克导致的脑内5-HT释放量、颅内压升高程度、脑内灌注压下降程度及脑神经元损害程度均有所减低^[4]。同样, 用5-

HT₂ 型受体阻断剂预先阻断 5-HT₂ 受体后, 热休克导致的大鼠脑血管周围水肿、神经元和胶质细胞肿胀、轴突肿胀及突触损害明显减轻^[10]。此外, 5-HT 耗竭后, 热休克大鼠的存活时间较 5-HT 能系统完好者显著延长^[4]。可能的机制是 5-HT 降低了脑血流量, 引起神经元缺血性损害。脑内 5-HT 能张力升高后, 甚至能引起多发性皮层梗死^[11]。提示 5-HT 能加重脑缺血性损害。在本实验中的缺血对照组缺血灶内 5-HT 表达增多, 而丹参可降低缺血脑区 5-HT 表达, 提示丹参可通过对 5-HT 的影响减轻神经元缺血性损害。

另外, 我们推测, 单纯颞叶缺血损害大鼠颞叶缺血区内 5-HT 释放增多, 破坏了颞叶中与学习、记忆有关的神经递质系统的完整性^[5], 可能是单纯颞叶缺血损害大鼠空间记忆能力严重降低的机制之一。而丹参组大鼠颞叶 5-HT 表达明显减少, 说明相对保持了颞叶中与学习、记忆有关的神经递质系统的完整性, 大鼠的空间记忆功能障碍因而得到显著改善。

总之, 丹参降低颞叶缺血区内 5-HT 表达, 同我们以前发现的丹参减轻脑水肿、清除自由基、降低 NO 含量、调节兴奋性氨基酸释放、下调 *e-fos* 基因表达以及使 HSP70 和 bFGF 在缺血再灌注期表达增多等神经保护作用, 可能都是丹参减轻颞叶缺血性损害程度、改善颞叶缺血损害大鼠记忆障碍的机制。

参 考 文 献

1 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〔J〕. 心理学报, 1997, 29(增刊): 75-77.
- 2 周绍慈, 翁恩琪, 封茂滋. 神经生理学概述〔M〕. 上海: 华东师范大学出版社, 1994. 242-262.
- 3 匡培根, 周新富, 徐波. 脑缺血时脑单胺类神经介质的动态变化〔J〕. 中国神经精神疾病杂志, 1983, 9(5): 287-290.
- 4 Kao TY, Lin MT. Brain serotonin depletion attenuates heatstroke-induced cerebral ischemia and cell death in rats〔J〕. J Appl Physiol, 1996, 80: 680-684.
- 5 向敬, 匡培根. 选择性白鼠感觉运动区梗塞模型建立与缺血损伤定量分析技术〔J〕. 中华医学杂志, 1994, 26: 417-422.
- 6 Edvinsson L, Hardebo JE. Characterization of serotonin-receptors in intracranial and extracranial vessels. Acta Physiol Scand, 1976, 97: 523-526.
- 7 Urquilla PR, Marco EJ, Liuch S. Pharmacological receptors of the cerebral arteries of the goat〔J〕. Blood Vessels, 1975, 12: 53-67.
- 8 Welch KMA, Meyer JS, Teraura T *et al.* Ischemic anoxia and cerebral serotonin levels〔J〕. J Neurol Sci, 1972, 16: 85-92.
- 9 Utkan T, Sarioglu Y, Kaya T *et al.* Effect of deferoxamine and sympathectomy on vasospasm following subarachnoid hemorrhage〔J〕. Pharmacology, 1996, 52: 353-361.
- 10 Shama HS, Westman J, Nyberg F *et al.* Role of serotonin and prostaglandins in brain edema induced by heat stress. An experimental study in the young rat〔J〕. Acta Neurochir, 1994, 60(Suppl): 65-70.
- 11 Molaie M. Serotonin syndrome presenting with migrainelike stroke〔J〕. Headache, 1997, 37: 519-521.

(上接第 134 页)

- 4 EPILOG Investigators. Platelet glycoprotein II b/ IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization〔J〕. N Eng J Med, 1997, 336: 1689-1696.
- 5 RESTORE Investigators. Effect of platelet glycoprotein II b/ IIIa blockage with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty〔J〕. Circulation, 1997, 96: 1445-1453.
- 6 PRISM Study Investigators. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina〔J〕. N Eng J Med, 1998, 338: 1498-1505.
- 7 PRISM-PLUS Study Investigators. Inhibition of the platelet glycoprotein II b/ IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q myocardial infarction〔J〕. N Eng J Med, 1998, 338: 1488-1497.

- 8 IMPACT-II Investigators. Randomised placebo-controlled trial of effect of eptifibatid on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT-II〔J〕. Lancet, 1997, 349: 1422-1428.
- 9 Theroux P, Kouss S, Roy L *et al.* On behalf of the Investigators. Platelet membrane receptor glycoprotein II b/ IIIa antagonism in unstable angina: The Canadian Lamifiban Study〔J〕. Circulation, 1996, 94: 899-905.
- 10 PARAGON Investigators. An international randomised, controlled clinical trial of lamifiban. A platelet glycoprotein II b/ IIIa inhibitor, or heparin or both in unstable angina〔J〕. Circulation, 1988, 97: 2386-2395.
- 11 浦权, 郁知非. 药源性血液病〔M〕. 北京: 人民卫生出版社, 1987. 214-217.