【论　著】

参芎化瘀胶囊对脑缺血大鼠神经功能影响*

刘海娟，赵雅宁，李建民，马素慧，陈长香

摘　要：目的　探讨参芎化瘀胶囊对脑缺血神经功能损伤的影响。**方法**　40 只雄性 SD 大鼠分成假手术组、模型组、参芎化瘀胶囊高、低剂量组，采用改良的 Pulsineli 4 血管阻断（4-VO）法制作全脑缺血模型，脑缺血 48 h，苏木精－伊红（HE）染色观察海马区神经细胞形态变化，原位缺口末端标记（TUNEL）法检测凋亡细胞，八臂迷宫法测试动物学习记忆功能，转棒法测试动物综合运动功能。**结果**　与假手术组比较，模型组凋亡神经细胞数量（33.45 ± 3.48）增多，动物进入迷宫总错误次数（8.94 ± 3.78）、重复错误次数（7.32 ± 2.80）、工作记忆错误次数（3.48 ± 1.26）增多，综合运动评分（79.1 ± 24.5）降低；与模型组比较，参芎化瘀胶囊组凋亡神经细胞数量（17.47 ± 1.84）减少，动物进入迷宫总错误次数（3.00 ± 1.80）、重复错误次数（2.10 ± 0.85）降低，综合运动功能评分（208.9 ± 32.5）提高。**结论**　参芎化瘀胶囊可抑制全脑缺血大鼠神经细胞凋亡，改善脑缺血后神经功能损伤。

关键词：脑缺血；凋亡；神经功能

中图分类号：R 741　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-0580（2011）04-0447-03

Effect of Shenxionghuayu capsule on neurological function after global cerebral ischemia/reperfusion in rats

LIU Hai-juan, ZHAO Ya-ning, LI Jian-min, et al. *Department of Rehabilitation, Northern China Coal Medical College (Tangshan 063000, China)*

Abstract: **Objective**　To investigate the effects of Shenxionghuayu capsule on neurological function after global cerebral ischemia/reperfusion. **Methods**　Male Sprague-Dawley rats ($n = 40$) were divided randomly into four groups: sham, model, low and high dose of Shenxionghuayu capsule treatment group. Global cerebral ischemia model was established by improved four-vessel occlusion of Pulsinelli´s method. Forty-eight hours after the operation, morphological changes in hippocampal region were observed by hetatoxylin eosin (HE) staining. The quantity of apoptotic cells was measured by terminal deoxynucleotidyl transfernase medicated nick end labeling (TUNEL) method. Learning and memory function (eight-arm maze) and behavioral tests (roding method) were conducted. **Results**　Compared with the sham group, the numbers of neural apoptotic cells increased (33.45 ± 3.48) in model group. The total error times (8.94 ± 3.78), the repeat error times (7.32 ± 2.80), and the reference memory error times (3.48 ± 1.26) increased. The general movement ability (79.1 ± 24.5) decreased in model group. Compared with the model group, the number of neural apoptotic cells decreased (17.47 ± 1.84); the total error time (3.00 ± 1.80) and the repeat error time (2.10 ± 0.85) decreased and the general movement ability (208.9 ± 32.5) increased in Shenxionghuayu capsule group. **Conclusion**　Shenxionghuayu capsule can dramatically improve neural function after cerebral ischemia/reperfusion injury, which may be related to the suppression of neuronal apoptosis in rats.

Key words: cerebral ischemia; apoptosis; neurological function

缺血性脑病是严重危害人类健康三大疾病之一，不但致死率较高，同时可造成不同程度的认知、记忆、语言及运动等脑功能损害。参芎化瘀胶囊是由人参、地鳖虫、川芎、乳香（制）、没药（制）、全蝎、紫河车、龙血竭、五味子、石菖蒲、郁金、桑葚子等多种成分组成的复方制剂。目前研究显示川芎、黄芪等单味药对脑梗死有一定的疗效[1-2]，但复方制剂参芎化瘀胶囊对脑缺血的治疗作用尚处在初步探索阶段。本研究采用全脑缺血模型，观察参芎化瘀胶囊对脑缺血后神经细胞凋亡及神经功能的影响，为临床应用提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　*实验材料*　参芎化瘀胶囊（华北煤炭医学院研制，批号：Z20051586）。

1.2　*实验动物*　雄性 SD 大鼠 40 只［中国医学科学院实验动物研究所，实验动物使用许可证编号：SCXK（京）2005－0013］，体质量 250～300 g，1～2 个月月龄。

1.3　*仪器与试剂*　图像采集及图像分析系统（美国 Bio-Rad 生物仪器设备公司）；八臂迷宫（淮北正华生物仪器设备有限公司）；原位缺口末端标记（TUNEL）试剂盒（美国 Santa Cruz 公司）。

1.4　*实验方法*　40 只雄性 SD 大鼠随机分成假手术组、模型组、参芎化瘀胶囊高、低剂量组，每组各 10 只。采用改良的 Pulsineli 4 血管阻断（4-VO）法[3-4]制作 SD 大鼠全脑缺血模型：动物常规麻醉，颈正中切口，分离双侧颈总动脉，在其下置线备用。枕后部正中切开，暴露双侧第 1 颈椎横突翼孔，直视下热凝其下通过的椎动脉，电凝每次时间约 2～4 s，使翼小孔后双侧椎动脉永久闭塞。术后大鼠缝皮回笼，24 h 后以无创性微动脉夹夹闭双侧颈总动脉，缺血 30 min 后松开动脉夹，实行再灌注。缺血及再灌注期间用红外线测温仪监测耳内鼓膜温度，并使之维持在（37 ± 0.2）℃。假手术组分离暴露血管，但不电凝椎动脉、不夹闭颈总动脉。参芎化瘀胶囊于术前 7 d 每日经胃灌注给药 1 次（低剂量 2.4 g/kg，高剂量 4.8 g/kg），连续给药 7 d，第 7 d 常规麻醉后制作脑缺血再灌注模型，术后继续给药 2 d。

1.5　*病理组织学检测*　0.4 % 戊巴比妥钠麻醉动物，开胸、暴露心，4% 多聚甲醛行心灌流，断头取脑，在视交叉后 1 和 6 mm处冠状面切开，取中间块入 4 % 多聚甲醛固定液固定，石蜡包埋，切片（片厚 5 μm），苏木精－伊红（HE）染色。

1.6　*原位细胞凋亡检测（TUNEL 法）*　标本多聚甲醛固定，经过脱水、透明、浸蜡、包埋、切片，按 TUNEL 检测试剂盒进行

* **基金项目**：河北省科技厅课题基金（2009276103D－3）
作者单位：华北煤炭医学院康复医学系，河北 唐山 063000
作者简介：刘海娟（1964－），女，河北唐山人，副教授，研究生，主要从事脑损伤与保护研究。
通讯作者：李建民，E-mail: lijianmints@sina.com

操作,增敏二氨基联苯胺显色,苏木精复染。阳性率的定量分析:每个标本取 4 张切片,每张切片在海马区随机选取 4 个视野,在 200 倍光镜下应用目镜网格测试系统,计数阳性细胞,取均值。

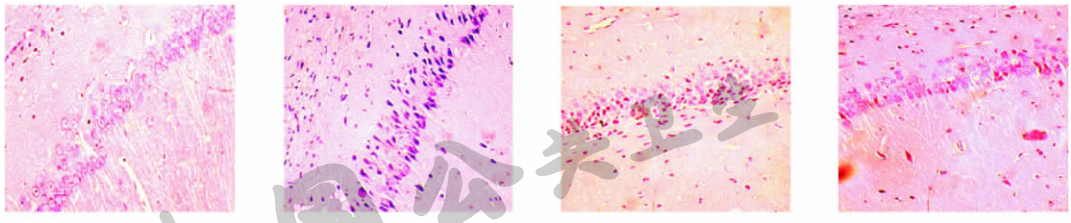
1.7 学习记忆功能检测 应用八臂迷宫学习和记忆行为功能测试[5],每只动物上下午测试 3 次,每次间隔至少 30 min,取均值。将大鼠放入迷宫内,记数大鼠 5 min 内搜索放置在八臂中的 4 个臂内(1、3、5、7 号臂)食物饵的规律:(1)总错误次数,即大鼠进入无饵的臂(包括已吃完和未放饵的臂)的次数;(2)工作记忆错误次数,指大鼠再次进入开始放有饵的臂;(3)参考记忆错误次数,指大鼠第 1 次进入未放饵的臂。

1.8 综合运动评分 应用转棒仪检测大鼠左右肢体的协调能力、平衡能力、体力与耐力等综合能力[6]。主要方法:记录大鼠在加速转动,最高转数为 300 r/min 情况下,大鼠掉落的时间,或记录当大鼠四肢抱住转棒,不能走动达 2 圈的时间,单位时间为秒(s),共测定 3 次,每次间隔至少 15 min。分值越低,神经功能损伤越重。

1.9 统计分析 应用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析,组间比较采用方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

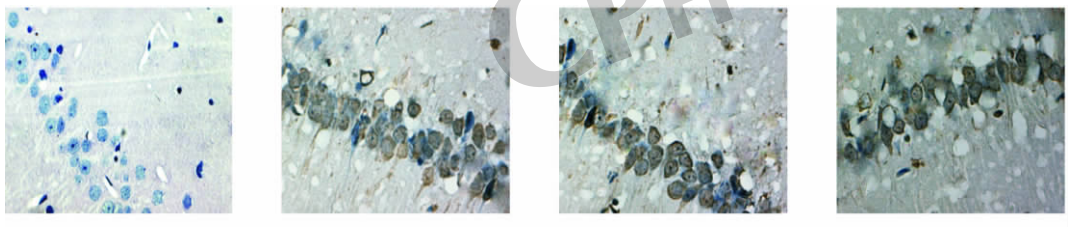
2.1 病理检测结果(图 1) 假手术组动物海马区神经元结构完整,排列整齐致密,未见变性坏死的神经元(图 1A);模型组海马区神经元大部分变性坏死,细胞间隙加大,细胞核浓缩、深染,溶解、消失(图 1B);参芎化瘀胶囊组海马区存活的神经元较缺血组明显增多;上述变化在高剂量组中更为明显(图 1C、图 1D)。



A:假手术组 B:模型组 C:低剂量参芎化瘀胶囊 D:高剂量参芎化瘀胶囊

图 1 海马区神经细胞形态变化(HE 染色,×200)

2.2 海马区神经细胞凋亡变化(图 2) 模型组中 TUNEL 阳性细胞(33.45 ± 3.48)与假手术组(3.17 ± 2.00)比较明显增多($P<0.05$);与模型组比较,低剂量参芎化瘀胶囊组 TUNEL 阳性细胞(22.58 ± 2.27)减少,高剂量组更为明显(17.47 ± 1.84)($P<0.05$)。



A:假手术组 B:模型组 C:低剂量参芎化瘀胶囊 D:高剂量参芎化瘀胶囊

图 2 大鼠海马区凋亡神经细胞(TUNEL 法,×400)

2.3 学习记忆功能及综合运动测试结果(表 1) 八臂迷宫结果显示,与假手术组比较,模型组动物连续 6 次测试总错误次数和重复错误次数增加($P<0.05$),与模型组比较,参芎化瘀胶囊组能明显减少总错误次数和重复错误次数($P<0.05$),但对工作记忆错误次数无影响($P>0.05$)。综合运动功能评定结果显示,与假手术组比较,模型组中动物四肢的肌力下降,大鼠攀爬能力、平衡能力和本体感觉能力均下降,体力与耐受力受损。综合运动能力评分模型组大鼠明显低于假手术组,参芎化瘀胶囊组明显高于模型组($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠学习记忆和综合运动功能测试结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组 别	剂量(mg/kg)	总错误次数	重复错误次数	工作记忆错误次数	综合运动能力评分
假手术组		2.84 ± 1.32	2.77 ± 1.06	1.28 ± 0.46	278.6 ± 32.7
模型组		8.94 ± 3.78[a]	7.32 ± 2.80[a]	3.48 ± 1.26[a]	79.1 ± 24.5
参芎化瘀胶囊组	2.4	5.85 ± 2.54[ab]	4.30 ± 1.62[ab]	3.32 ± 1.45	130.0 ± 30.8
	4.8	3.00 ± 1.80[bc]	2.10 ± 0.85[abc]	3.25 ± 1.68	208.9 ± 32.5[abc]

注:与假手术组比较,a $P<0.05$;与模型组比较,b $P<0.05$;与低剂量参芎化瘀胶囊组比较,c $P<0.05$。

3 讨 论

缺血性脑卒中可造成神经细胞凋亡[7],而神经细胞凋亡带来的直接后果是造成神经功能缺失。研究认为脑卒中后神经功能的恢复很大程度依赖治疗窗内恢复或存进神经元的存活。王峰等[8]发现胰岛素样生长因子 1 可通过调控凋亡蛋白 Bax 和 bcl-2 表达,降低神经细胞凋亡而改善糖尿病脑缺血大鼠神经功能缺陷。赵雅宁等[9]应用氧自由基清除剂可抑制脑损伤海马区神经细胞凋亡,动物的认知功能情况得到改善。本研究发现,参芎化瘀胶囊组中大鼠海马区神经细胞凋亡数量呈剂量依赖式减少,同时动物学习记忆功能和综合运动功能均有明显改善,说明方剂参芎化瘀胶囊可抑制缺血后神经细胞的损伤,促进缺血后神经功能的恢复。药理学研究显示,川芎、人参皂甙等中药可改善脑缺后血微循环障碍,抗自由基,阻止钙离子内流和抑制炎症等,对脑梗塞有一定疗

中国公共卫生 CPH

效[1-2]。胡霞敏等[10]通过动物实验证实人参皂甙 Rgl 减弱半胱天冬酶 -3 表达,增强 bcl-2 表达。另外,全蝎、地鳖虫与人参构成中成药通心络的重要成份,均可对脑血管疾病起到很好的治疗和预防作用[11]。参芎化瘀胶囊含有人参、地鳖虫、川芎、郁金、桑葚子等多种成分,本研究认为参芎化瘀胶囊可通过多环节、多层面、多机制途径抑制脑缺血后神经细胞凋亡,最终促进脑功能恢复。

参考文献

〔1〕 李建民,赵雅宁,陈长香,等. 川芎嗪联合缺血预处理对沙鼠前脑缺血后学习记忆功能及 HSP70 表达的影响[J]. 第四军医大学学报,2009,30(18):1707-1709.

〔2〕 吴晓燕. 人参总皂甙对大鼠缺血再灌注后神经元凋亡的保护及作用机制的研究[J]. 神经疾病与精神卫生,2005,5(5):347-350.

〔3〕 Pulsineli WA,Brieley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. Stroke,1979,10(3):267-272.

〔4〕 徐叔云,卞如镰,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:1065-1066.

〔5〕 Li JM,Sasaki H,Kotaro,et al. Learning behavior of transient ischemia loaded gerbils examined by newly developed 4-pellet taking test[J]. Neuroscience Research,2001,112(7):26-28.

〔6〕 高俊玲,田艳霞,张文丽,等. Edaravone 对大鼠弥漫性脑创伤神经运动功能及脑组织超微结构的影响[J]. 第四军医大学学报,2009,30(7):610-612.

〔7〕 邢雪松,吕威力,张国斌,等. bFGF 对脑缺血大鼠脑组织 HSP70 mRNA 表达影响[J]. 中国公共卫生,2008,24(10):1227-1228.

〔8〕 王峰,兰希发,王海军,等. 胰岛素样生长因子 1 对糖尿病大鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(33):6469-6473.

〔9〕 赵雅宁,高俊玲,饶颖真,等. 依达拉奉对脑创伤大鼠学习记忆的影响[J]. 中国公共卫生,2010,26(6):753-754.

〔10〕 胡霞敏,严常开,胡先敏. 人参皂甙 Rgl 对大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2006,11(2):192-195.

〔11〕 陈懿,王国佐,葛金文. 脑泰方提取物对局灶性脑缺血大鼠血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2009,24(2):205-208.

收稿日期: 2010-08-13　　(郑新编辑　郭薇校对)

中国公共卫生 CPH

【实验研究】

牛磺酸对锌中毒小鼠免疫功能影响*

胡敏,徐群英

摘　要: **目的**　了解牛磺酸对锌中毒小鼠免疫因子及 T 淋巴细胞增殖功能影响。**方法**　以不同浓度牛磺酸作用于锌中毒模型小鼠后,计算脏器指数,噻唑蓝(MTT)比色法测定 T 淋巴细胞增殖功能,酶联免疫吸附(ELISA)法测定白细胞介素 -2(IL-2)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)浓度。**结果**　锌中毒模型组 TNF-α、IL-2 浓度分别为(9.02 ± 1.34)、(1.411 ± 0.082) pg/mL,T 淋巴细胞增殖活性为(0.056 1 ± 0.006),明显低于空白对照组($P < 0.05$),低剂量(200 mg/kg)牛磺酸组 TNF-α、IL-2 分别为(15.92 ± 2.32)、(1.928 ± 0.103) pg/mL,T 淋巴细胞增殖活性为(0.120 1 ± 0.012),明显高于锌中毒模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论**　牛磺酸可提高锌中毒小鼠外周血 TNF-α、IL-2 水平及促进 T 淋巴细胞增殖,对锌中毒小鼠免疫功能损伤有一定保护作用。

关键词: 牛磺酸; 锌中毒; 肿瘤坏死因子-α; 白细胞介素-2; 淋巴细胞转化

中图分类号: R 114　　**文献标志码**: A　　**文章编号**: 1001-0580(2011)04-0449-02

Effect of taurine on immune function in mice with zinc poisoning

HU Min,XU Qun-ying. *Department of Nutrition and Food Hygiene,Public Health School,Medical College,Nanchang University*(*Nanchang* 330006,*China*)

Abstract: **Objective**　To study the effect of taurine on immune function and T-lymphocyte proliferation in mice with zinc poisoning. **Methods**　The mice of zinc poisoning model were randomly fed with different dose of taurine. The organ index was calculated. The lymphocyte proliferation was examined with methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The production of interleukin-2(IL-2) and tumor necrosis factor-α(TNF-α) in cells were measured with enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA). **Results**　The concentrations of TNF-α,IL-2 of the zinc poisoning control group were 9.02 ± 1.34, 1.411 ± 0.082 and the proliferation power of T-lymphocytes of the zinc poisoning model group was 0.0561 ± 0.006,all of which were significantly lower than those of the control group($P < 0.05$ for all). The concentrations of TNF-α,IL-2 of zinc poisoning group with low dose taurine(200mg/kg) were 15.92 ± 2.32,1.928 ± 0.103 and the proliferation power was 0.1201 ± 0.012,significantly higher than those of zinc poisoning control group($P < 0.01$). **Conclusion**　Taurine could increase concentrations of TNF-α,IL-2 and promote proliferation power of T-lymphocyte in mice with zinc poisoning. Taurine has protective effect on immune function impairment in mice with zinc poisoning.

Key words: taurine; zinc poisoning; tumor necrosis factor-α; interleukin-2; lymphocyte transformation

锌属于维持正常生命活动不可缺少的必需微量元素之一,参与许多辅酶的构成,在生长、智力发育和维持机体免疫功能等方面具有重要作用。随着各种锌制剂广泛用于农业和畜牧业生产,造成锌对水土的污染[1],以及人们盲目补充锌元素,补锌的药物、保健品、食品也越来越多。但是过量摄入锌元素,也会导致机体一系列代谢紊乱,造成不良后果。本实

* **基金项目**: 江西省教育厅资助项目(GJJ09118)

作者单位: 南昌大学医学院公共卫生学院营养与食品卫生学教研室,江西 南昌 330006

作者简介: 胡敏(1977-)女,江西人,讲师,硕士,主要从事营养与食品卫生学研究工作。