

· 实验研究 ·

# 脑心通胶囊对血管性痴呆大鼠乙酰胆碱能神经的影响\*

孙康哲 曾建国<sup>▲</sup>

**摘要** 目的:研究脑心通胶囊对VD大鼠认知功能障碍的改善作用及对胆碱能神经环路的保护作用。方法:取48只SPF级SD雄性大鼠,采用改进的双侧颈总动脉反复缺血—再灌注(2VO)方法制备VD模型,并随机分为4组:VD模型组、假手术(Sham)组、脑心通胶囊治疗组、多奈哌齐阳性对照组,每组12只。采取Y迷宫法检查各组大鼠空间记忆能力;采用HE染色法进行组织病理学检查,电镜下观察大鼠海马CA1区的中段细胞水平和形态;应用免疫组化法检查大鼠胆碱乙酰转移酶(ChAT)的表达程度。结果:Y迷宫数据表明脑心通胶囊治疗组大鼠自发交替率明显比VD模型组高( $P<0.05$ );组织病理学检查方面,脑心通胶囊治疗组大鼠海马CA1区的中段细胞数量显著比VD模型组高( $P<0.05$ );脑心通治疗组大鼠海马区ChAT阳性细胞数明显多于VD模型组( $P<0.05$ )。结论:脑心通胶囊对VD大鼠胆碱能神经环路中ChAT蛋白水平的表达起促进作用,能帮助其恢复空间记忆能力。

**关键词** 脑心通胶囊;血管性痴呆;乙酰胆碱能;胆碱乙酰转移酶

血管性痴呆(vascular dementia,VD)是一种以组织学损伤和进行性智力减退为特征的脑损伤,常由缺血缺氧性或出血性脑血管病变引发<sup>[1]</sup>。据统计,全世界有3600万VD患者,并在将来相当长的一段时间内极可能呈显著增长趋势<sup>[2]</sup>。血管性因素逐渐成为老龄化人口中引发痴呆病变的高发因素,VD逐渐成为继阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)后的第二种常见老年痴呆症<sup>[3-4]</sup>。VD是一种可治疗的老年性痴呆,只要早期预防和干预可以就大大降低残障的发生率,因此针对VD的研究具有重要的意义。

中药胶囊及颗粒剂具有服用简单、吸收好、携带方便等优点,被临床广泛使用。目前,常用于治疗VD的中成药有脑心通胶囊、养血清脑颗粒、银杏叶片、脑复康胶囊、通心络胶囊等<sup>[5]</sup>。脑心通胶囊组方源于清代王清任《医林改错·卷下·瘫痿论》的补阳还五汤,在此基础上加虫类药和活血化瘀药共16味中药组成<sup>[6]</sup>。大量临床数据证实,脑心通胶囊对VD等疾病具有良好的治疗作用<sup>[7]</sup>。本实验采用双侧颈总动脉反复缺血—再灌注(2VO)方法建立VD大鼠模型,用脑心通胶囊干预治疗,探讨其对VD大鼠认知功能障碍的改善

作用以及对胆碱能神经环路的保护作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与分组** 健康SPF级雄性SD大鼠48只(实验动物许可证号:SCXKG2017-0002;质量合格证号:0017985),由广西医科大学实验动物中心提供,体重范围250~300 g,饲养条件为室温(25±1)°C,湿度(50±10)%,明暗周期12 h,自由饮水和摄食。采用简单随机化分组法(计算机产生随机数字)分为假手术(Sham)组、VD模型组、脑心通胶囊治疗组、多奈哌齐阳性对照组,每组12只。Y迷宫实验每组使用6只,病理切片观察每组使用3只,免疫组化每组使用3只。

**1.2 实验试剂与仪器** 脑心通胶囊(陕西步长制药有限公司,国药准字Z20025001,批号:170520);胆碱乙酰转移酶(ChAT)一抗(上海雅吉生物科技发展公司,批号:170430);多奈哌齐(卫材中国药业有限公司,国药准字H 20050978,批号:1702080);水合氯醛(陕西圣瑞医药科技有限公司,批号:170325);Y迷宫由广西医科大学第二附属医院自制;INTELSINT TP 300封闭式组织脱水机;Thermo Scientific HistoStar组织包埋机;SLEE CUT 4062手动轮转式切片;上海精密仪器有限公司TEC 2500病理组织漂烘仪;Leica TCSSP 8共聚焦显微镜等。

\*基金项目 长沙市中心医院内科研重点项目(No.201402)  
 ▲通讯作者 曾建国,男,主任药师。主要从事医院药学研究。E-mail:zengjg28@163.com  
 •作者单位 南华大学附属长沙市中心医院(湖南长沙410000)

### 1.3 实验方法

1.3.1 造模与给药 VD大鼠模型采用改良双侧颈总动脉反复缺血-再灌注(2VO)法<sup>[6]</sup>。主要方法如下:取健康雄性SD大鼠48只,适应性饲养7天,术前禁食禁水8 h,根据体重(350 mg/kg)使用3.5%水合氯醛腹腔注射麻醉。除Sham组外,其余各组采取2.5 mg/kg硝普钠腹腔注射,随即使用无创动脉夹夹闭双侧颈总动脉,夹闭10 min后松开10 min,反复操作5次,取出动脉夹及丝线,消毒皮肤,保温饲养。为防止低温对缺血性脑损伤的保护,整个造模过程中维持动物肛温在37 °C左右。

各组大鼠造模后次日灌胃给药,根据各组大鼠体重按剂量给药,脑心通胶囊治疗组(350 mg/kg)灌胃1次/d,多奈哌齐对照组(5 mg/kg)灌胃1次/d,Sham组和VD模型组用等容量生理盐水灌胃,持续27 d。

1.3.2 空间记忆能力测试 采用Y迷宫实验法在术后27 d进行。每组取6只大鼠从A臂置入,使其在ABC三个臂中自由活动8 min,记下大鼠在ABC三个臂的穿梭次数(经过中心臂后且进入不同于上一次进入的臂,如ABC、ACB或CAB)。用选择性穿梭的次数与总穿梭次数的比值(即自发交替率)来评估大鼠的空间记忆能力,比值越大,表明大鼠的空间记忆能力越好<sup>[9]</sup>。

1.3.3 病理切片观察 每组取3只大鼠使用苏木精-伊红(HE)染色法制作大鼠脑组织的病理切片<sup>[10]</sup>。连续给药27 d后,大鼠经麻醉后固定于自制的手术木板上,置于解剖盘中,开胸暴露并游离出心脏,切开右心房,经左心室插入灌流针并固定,分别用25 mL磷酸盐缓冲液(PBS)和4%多聚甲醛灌流心脏。取脑后用4%多聚甲醛固定,1 d后用自动脱水机脱水,采用石蜡包埋后切片,选出海马部位用HE法染色,置于光镜下观察CA1区形态学变化。

1.3.4 免疫组化法 每组取3只大鼠根据体重(350 mg/kg)用水合氯醛腹腔注射麻醉,在心脏部位插入管道方向为左心室向升主动脉,先用150 mL 0.9%生理盐水冲洗,随后灌入300 mL 4%多聚甲醛在30 min内完成;取脑并将脑组织固定在4%多聚甲醛中10 h,随后用30%的蔗糖-PBS溶液和20%的蔗糖-多聚甲醛溶液处理直至下沉。选取视交叉后缘处脑组织,进行包埋、切片处理,然后用免疫组化法染色。在电镜下观测各组大鼠海马CA1区ChAT蛋白的表达情况。

1.4 统计学分析 采用SPSS 19.0统计软件进行数

据分析,实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组均数间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 空间记忆功能测试结果 结果表明,VD模型组大鼠空间记忆能力显著低于Sham组( $P < 0.05$ )。多奈哌齐阳性对照组、脑心通胶囊治疗组空间记忆能力显著高于VD模型组( $P < 0.05$ )。各分组间大鼠在迷宫总进臂数量差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),说明各组大鼠常规移动不受手术和口服药物的影响。见表1。

表1 各组大鼠空间记忆能力情况

组别	数量	自发交替率(%, $\bar{x} \pm s$ )	进臂次数总和
VD模型组	6	55.43±18.63 <sup>*</sup>	24
Sham组	6	68.89±6.55	29
多奈哌齐阳性对照组	6	65.24±12.22 <sup>#</sup>	28
脑心通胶囊治疗组	6	65.09±4.65 <sup>#</sup>	27

注:与Sham组相比,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与VD模型组相比,<sup>#</sup> $P < 0.05$

2.2 HE染色的一般形态学观察 结果表明,Sham组海马CA1区呈现结构清晰、分布均匀的多层排列的锥体细胞,神经细胞外形为圆形或椭圆形,颜色较淡,染色均匀为淡蓝色或蓝色;VD模型组海马CA1区显示排列稀疏、紊乱的锥体细胞,神经元细胞数量较少,呈固缩状或显示为极淡蓝色或蓝色消失,细胞间质成分呈颗粒状分布,细胞内有空腔,细胞间隙增大;和VD模型组相比,多奈哌齐阳性对照组、脑心通胶囊治疗组呈规则外形形态,细胞间隙比VD模型组小,空腔现象比VD模型组少。见图1。

大鼠海马CA1区HE染色中段细胞计数结果表明,与Sham组对比,VD模型组明显下降( $P < 0.05$ ),而脑心通胶囊治疗组及多奈哌齐阳性对照组较VD模型组增多( $P < 0.05$ )。见表2。

2.3 免疫组化结果 结果表明,与Sham组对比,VD模型组ChAT阳性细胞数明显下降( $P < 0.01$ ),而脑心通胶囊治疗组及多奈哌齐阳性对照组大鼠海马CA1区ChAT阳性细胞数较VD模型组增多( $P < 0.05$ )。见图2、表3。

## 3 讨论

反复脑缺血-再灌注损伤是导致VD的病理生理学基础,本次研究制备VD大鼠模型采用的是经改良

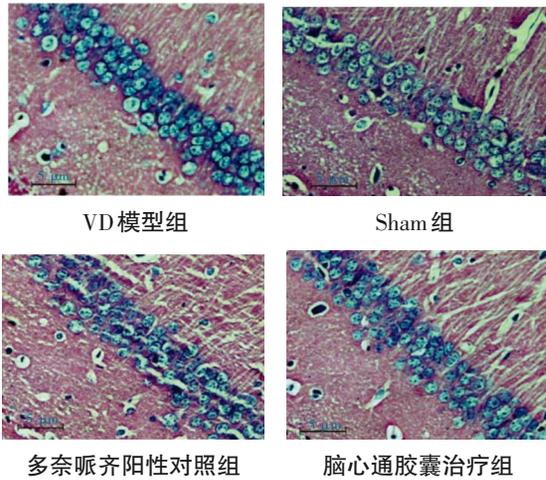


图1 各组大鼠海马CA1区HE染色情况(×100)

表2 各组大鼠海马CA1区HE染色中段细胞数( $\bar{x} \pm s$ )

组别	数量(只)	细胞数(个)
VD模型组	3	7.83±4.22*
Sham组	3	24.16±2.73
多奈哌齐阳性对照组	3	23.12±3.57 <sup>#</sup>
脑心通胶囊治疗组	3	22.22±3.44 <sup>#</sup>

注:与Sham组相比,\*P<0.05;与VD模型组相比,<sup>#</sup>P<0.05

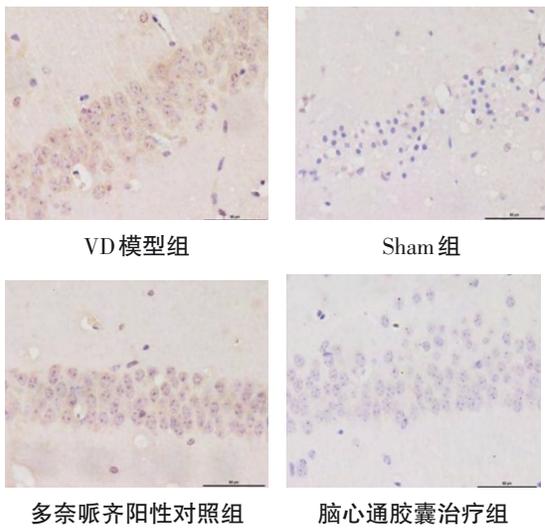


图2 各组大鼠海马CA1区免疫组化法染色情况(×400)

表3 各组大鼠海马CA1区ChAT阳性细胞数( $\bar{x} \pm s$ )

组别	数量(只)	细胞数(个)
VD模型组	3	276.33±181.22*
Sham组	3	774.16±112.78
多奈哌齐阳性对照组	3	516.12±53.57 <sup>#</sup>
脑心通胶囊治疗组	3	552.22±53.44 <sup>#</sup>

注:与Sham组相比,\*P<0.01;与VD模型组相比,<sup>#</sup>P<0.05

的两侧颈总动脉反复缺血-再灌注(2VO)法。术后大鼠均出现明显的认知功能障碍,HE染色提示,VD模型组大鼠海马CA1区中段细胞数显著下降,神经元受损,同时免疫组化结果说明造模大鼠中枢胆碱能神经环路中ChAT蛋白显著降低。

在对VD病理机制的研究中,乙酰胆碱能系统对大脑的认知学习功能起到重要作用。神经系统中最重要神经递质便是在胆碱乙酰转移酶(ChAT)的作用下由乙酰辅酶A和胆碱合成的乙酰胆碱(Ach),其主要作用是传递神经冲动。乙酰胆碱能环路主要由Ach、乙酰胆碱酯酶、ChAT三部分组成,其总体状况直接决定着痴呆的病发、严重程度和病程<sup>[11-12]</sup>。相关研究表明<sup>[13]</sup>,海马CA1区损伤的严重程度决定着VD学习、记忆等相关功能的损害。胆碱能神经环路的活性主要由乙酰胆碱酯酶(AChE)、乙酰胆碱受体(AChR)、胆碱乙酰基转移酶(ChAT)、囊泡乙酰胆碱转运体(VAChT)等物质决定。ChAT由于稳定性高且仅存在于胆碱能神经元内而被广泛认为是胆碱能神经元活性状态的最佳标志物<sup>[14-15]</sup>。

脑心通胶囊在临床上被广泛用于治疗心脑血管疾病,是基于古方补阳还五汤增加了虫类药、活血化瘀药制成的复方中药制剂<sup>[16]</sup>。据报道,脑心通胶囊有可增强大脑血氧供应,保护脑细胞,对VD患者学习、认知功能、判断和思维能力起到改善作用<sup>[17-20]</sup>。从组织病理学和免疫组化结果来看,脑心通胶囊治疗组大鼠海马CA1区的中段细胞水平和ChAT阳性细胞数显著高于VD模型组,鉴于ChAT被广泛认为是胆碱能神经元活性状态的最佳标志物,因此判断脑心通胶囊有上调胆碱能神经环路的功能。

本研究采用长效的中枢乙酰胆碱酯酶抑制剂(AchEI)多奈哌齐作为阳性药。其主要通过选择性抑制乙酰胆碱的降解,增大神经元突触间隙乙酰胆碱的浓度,使VD症状得到改善。大量实验结果证实,多奈哌齐可明显改善VD患者在认知、智能以及日常生活能力的状态,且很少产生不良的外周反应<sup>[21-23]</sup>。通过本研究发现,脑心通胶囊在改善大鼠空间记忆能力及调节大鼠胆碱能神经环路ChAT蛋白的表达方面效果相当。

本研究结果表明,脑心通胶囊在VD大鼠胆碱能神经环路ChAT蛋白的表达方面有调控作用,能有效改善其他记忆能力。但是,本次研究仍存在不足之处,如未对其他胆碱能神经蛋白进行考察,没有从基

因层面明确脑心通胶囊对 ChAT 基因启动子的调控作用,可在以后的研究中逐步完善。

### 参考文献

[1] 彭晓燕,万婷,张丽丹,等.血管性痴呆大鼠模型的研究概述[J].中华中医药学刊,2018,36(3):311-314.  
 [2] 崔晓,东红.血管性痴呆的中西医治疗进展[J].湖南中医杂志,2014,30(12):166-167.  
 [3] 赵霄潇,李慧生,王宏宇.血管性痴呆相关危险因素研究进展[J].心血管病学进展,2018,39(3):328-331.  
 [4] 翁映虹,黄坚红,黄德弘.中药治疗血管性痴呆临床研究进展[J].山东中医杂志,2019,38(1):101-104.  
 [5] 鲁艳萍,杨东东.中医药治疗血管性痴呆的研究新进展[J].中西医结合心血管病电子杂志,2017,5(13):15,18.  
 [6] 李伟霞,张书琦,赵艺丹,等.脑心通胶囊化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J].中国中药杂志,2018,43(10):1998-2005.  
 [7] 李敏,胡波,熊光润.脑心通治疗血管性痴呆效果的 Meta 分析[J].中国循证心血管医学杂志,2012,4(1):6-12.  
 [8] LIU DD, YUAN X, CHU SF, et al. CZ-7, a new derivative of Claulansine F, ameliorates 2VO-induced vascular dementia in rats through a Nrf2-mediated antioxidant responses[J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(4):425-440.  
 [9] 李静,白玉,张鹏.脱氢表雄酮对血管性痴呆小鼠学习和记忆能力的改善作用[J].中国病理生理杂志,2018,34(10):1905-1909.  
 [10] 王朝军,董莉,谷培云.冰冻切片苏木精-伊红染色进行性快速染色法研究[J].中国药物与临床,2017,17(3):437-438.  
 [11] YOUNG-BERNIERM, KAMILY, TREMBLAYF, et al. Associations between a neurophysiological marker of central cholinergic activity and cognitive functions in young and older adults [J]. Behavioral and Brain Functions, 2012, 8:17  
 [12] AIZAWA S, YAMAMURO Y. Involvement of histone acetylation in the

regulation of choline acetyltransferase gene in NG108-15 neuronal cells [J]. Neurochemistry International, 2010, 56(4):627-633.  
 [13] 张鹏,余天平,张雄,等.姜黄素对慢性脑缺血大鼠脑组织海马 CA1 区损伤的修复作用及其机制[J].中国生物制品学杂志,2011,24(10):1193-1196.  
 [14] WALLIN A, SJÖGREN M, BLENNOW K, et al. Decreased cerebrospinal fluid acetylcholinesterase in patients with subcortical ischemic vascular dementia [J]. Dement Geriatr Cogn Disord, 2003, 16(4):200-7.  
 [15] MUTH K, SCHÖNMEYER R, MATURA S, et al. Mild cognitive impairment in the elderly is associated with volume loss of the cholinergic basal forebrain region [J]. Biological Psychiatry, 2010, 67(6):588-591.  
 [16] YATOMIY, TANAKAR, SHIMADAY, et al. Type 2 diabetes reduces the proliferation and survival of oligodendrocyte progenitor cells in ischemic white matter lesions [J]. Neuroscience, 2015, 289:214-223.  
 [17] 张友太.脑心通胶囊治疗血管性痴呆[J].辽宁中医药大学学报,2012,14(6):174-175.  
 [18] 李敏,胡波,熊光润.脑心通治疗血管性痴呆效果的 Meta 分析[J].中国循证心血管医学杂志,2012,4(1):6-12.  
 [19] 宋智.步长脑心通胶囊治疗血管性痴呆的疗效分析[J].当代医学,2014,20(30):137-138.  
 [20] 郭清军,施雨.脑心通胶囊治疗血管性痴呆的疗效及对患者氧化应激指标影响的临床观察[J].中国药房,2013,24(3):262-264.  
 [21] 赵静,苟云久,彭小兰,等.多奈哌齐治疗老年血管性痴呆的系统评价[J].实用中西医结合临床,2015,11(2):1280-1289.  
 [22] 曲晓霞.多奈哌齐治疗血管性痴呆的疗效及剂量相关性的荟萃分析[D].济南:山东大学,2012.  
 [23] 马卓,陈月,冯婉玉.多奈哌齐治疗血管性痴呆临床疗效的系统评价[J].中国新药杂志,2013,22(5):569-576.

(收稿日期:2022-02-07)

(本文编辑:金冠羽)

(上接第 21 页)

[10] 孟静岩,马佐英.“脾主运化”理论与应用[M].北京:中国医药科技出版社,2017:190-193.  
 [11] 孙健.人体经络穴位使用全书 解开藏在人体里的健康密码[M].北京:中医古籍出版社,2016:302.  
 [12] 大医堂.赤龙搅海:五脏平安的保健大法[J].中华养生保健,2013,13(9):67-68.  
 [13] 米方林.口腔医学[M].第 2 版.南京:江苏凤凰科学技术出版社,2018:172-174.  
 [14] 龚居中.福寿丹书[M].广诗,点校.北京:中医古籍出版社,1994:91.  
 [15] 杨克新.超值白金版 健身气功全书[M].天津:天津科学技术出版社,2014:21.  
 [16] 李岳.浅谈健身气功·六字诀[J].赤峰学院学报(自然科学版),2014,30(8):114-115.  
 [17] 项汉平.传统体育与康复[M].武汉:湖北人民出版社,2016:

38, 123.  
 [18] 韩长兵.牙齿与五脏六腑相关的理论及应用研究[D].沈阳:辽宁中医药大学,2016.  
 [19] 王士贞,刘蓬.中华医学百科全书 中医学 中医耳鼻喉口腔科学[M].北京:中国协和医科大学出版社,2016:176.  
 [20] 张磊,朱人求.从养生学角度看朱子的静坐[J].南昌大学学报(人文社会科学版),2021,52(3):23-31.  
 [21] 牛林敬.图解瑜伽健康宝典[M].上海:上海科学技术文献出版社,2011:75-76.  
 [22] 沈金鳌.杂病源流犀烛[M].李占永,李晓林,校注.北京:中国中医药出版社,1994:366-372.

(收稿日期:2022-02-18)

(本文编辑:黄明愉)