

姜黄醇提物对血管性痴呆模型大鼠的保护作用研究

刘光先*(攀枝花市中西医结合医院,四川 攀枝花 617000)

中图分类号 R285;R97 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)07-0596-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.07.07

摘要 目的:研究姜黄醇提物对血管性痴呆模型大鼠的保护作用。方法:线栓法复制大鼠血管性痴呆模型,进行神经功能缺失评分。60只SD大鼠均分为假手术(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、尼莫地平(80 mg/kg)组与姜黄醇提物高、中、低剂量(200、100、50 mg/kg)组。灌胃给药,于术前48 h开始给药,每8 h 1次,连续7次。穿梭箱实验测定大鼠主动逃避(AAR)次数、被动逃避(PAR)电击时间;水迷宫实验测定大鼠寻台潜伏期;酶联免疫吸附法测定一氧化氮(NO)、过氧化脂酶(LPO)的含量。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺失评分升高、AAR次数减少、PAR电击时间延长、寻台潜伏期延长,脑皮质NO、LPO含量增加,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,姜黄醇提物高、中剂量组大鼠神经功能缺失评分降低、AAR次数增加、PAR电击时间缩短,寻台潜伏期缩短,脑皮质NO、LPO含量减少,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:姜黄醇提物对血管性痴呆模型大鼠有一定保护作用。

关键词 姜黄醇提物;血管性痴呆;行为学;一氧化氮;过氧化脂酶

Protective Effect of *Curcuma longa* Alcohol Extract on Vascular Dementia Model Rats

LIU Guang-xian (Panzhuhua Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Sichuan Panzhuhua 617000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of *Curcuma longa* extract on vascular dementia rats. METHODS: The vascular dementia model was induced by suture method, and neurological deficits score was conducted. 60 SD rats were divided into sham operation group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), nimodipine group (80 mg/kg) and *C. longa* alcohol extract high-dose, middle-dose and low-dose groups (200, 100, 50 mg/kg). They were given relevant medicines intragastrically 48 h before operation every 8 h for consecutive 7 times. The number of active avoidance (AAR) and the time of passive avoidance (PAR) were determined by shuttle box test; the latency of seeking platform (SPL) in rats was determined by water maze test. The contents of NO and LPO were detected by ELISA. RESULTS: Compared with sham operation group, neurological deficits score of model group was increased; the number of AAR was decreased while the time of PAR and SPL were prolonged; the contents of NO and LPO in pallium of rats were increased; there was statistical significance ($P<0.01$). Compared with model group, neurological deficits scores of *C. longa* alcohol extract high-dose and middle-dose groups were decreased; the number of AAR was increased while the time of PAR and SPL were shortened; the contents NO and LPO in pallium of rats were decreased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$). CONCLUSIONS: *C. longa* alcohol extract can protect against vascular dementia model rat to some extent.

KEYWORDS *Curcuma longa* alcohol extract; Vascular dementia; Praxiology; NO; LPO

脑卒中(Stroke)俗称“中风”,是一种急性脑血液循环障碍性疾病,指患有脑血管疾病的患者,因各种诱发因素引起脑内动脉狭窄,闭塞或破裂,而造成急性脑血液循环障碍。临床上表现为一过性或永久性脑功能障碍的症状和体征。其特点是起病突然,病程起伏,其中脑血管缺血性现象是血管性痴呆的主要致病因素。由于脑卒中发病率与日俱增,被当今医学界列为重点研究对象,并被认为是唯一可以预防的痴呆类型。因此,积极开展血管性痴呆的基础与临床研究意义重大。笔者以局灶性缺血再灌注方法复制与人类发病机制相类似的血管性痴呆大鼠模型,研究姜黄醇提物对其行为学及酶学的影响,以为的临床用药提供实验基础。

1 材料

1.1 仪器

ZS001型水迷宫及视频跟踪分析系统(北京众实迪创科技

发展有限责任公司);DCS-2型大鼠穿梭程序自动控制仪(上海欣曼科教设备有限公司)。

1.2 药材

姜黄为市售,经笔者鉴定为真品。

1.3 药品与试剂

尼莫地平片(上海信谊嘉华药业有限公司,批号:120105);一氧化氮(NO)、过氧化脂酶(LPO)测试盒(南京建成生物工程研究所)。

1.4 动物

清洁级SD大鼠60只,♀♂兼用,体质量280~350 g,由重庆医科大学动物实验中心提供[动物使用许可证号:SCXK(渝)2009-0002]。

2 方法

2.1 姜黄醇提物的制备

取姜黄50 g,加入75%乙醇300 ml,浸泡45 h,60℃恒温加热2 h后减压抽滤,得滤液,用旋转蒸发器真空浓缩得浓缩

*主任中药师。研究方向:中药制剂的研发和临床用药分析。

E-mail: pzhlgx9285@163.com

液(每1 ml含50 mg生药材),贮藏,备用。

2.2 模型的复制

参考文献^[1],术前大鼠禁食12 h,自由饮水。ip水合氯醛(350 mg/kg)麻醉大鼠,暴露大鼠左侧颈动脉鞘,将4-0号外科尼龙单线(头端经砂纸磨平滑后,覆以0.01%多聚左旋赖氨酸)经颈外动脉插入颈内动脉,过颈动脉分叉处继续进线约18~20 mm,稍感阻力时停止,说明线栓已经到手术部位,随后分离颈外动脉并结扎其残端固定线栓,栓塞2 h后即再灌注24 h,缝合伤口。假手术大鼠仅作分离左侧颈动脉,而不进行栓塞。术后大鼠切口严格以络合碘消毒,sc青霉素(4万U/只)抗炎。手术期间以红外线恒温灯维持大鼠体温在(37±0.5)℃。

2.3 神经功能缺失评分

术后48 h,大鼠苏醒后进行神经功能缺失评分^[2]:0分,无明显神经损伤症状;1分,不能完全伸展对侧前爪;2分,行走时对侧旋转;3分,行走时对侧倾倒;4分,不能自行行走,意识丧失。1~3分者为有效模型。

2.4 分组与给药

60只大鼠随机均分为6组,即假手术(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、尼莫地平(80 mg/kg)组与姜黄醇提取物高、中、低剂量(200、100、50 mg/kg)组,于术前48 h ig给药,每8 h 1次,连续7次。

2.5 穿梭箱实验^[3]

穿梭箱为一封闭的长方形盒子(30 cm×10 cm×20 cm),顶部有蜂鸣器,底部平行排列铜栅,间隔0.5 cm,铜栅可以通电。初始设定电刺激(1 mA)时间为15 s,蜂鸣时间为5 s,间隔时间为15 s。将大鼠放入穿梭箱适应3 min,给予蜂鸣刺激5 s,然后给予电刺激。主动逃避(AAR)后,相应的蜂鸣声结束,被动逃避(PAR)时相应的电击结束。间歇15 s,反复循环直到设定20次。记录PAR、AAR次数以及被电击时间。训练4 d后,第5天正式测试,电击强度不变,以在蜂鸣5 s内完成穿梭的时间为AAR,在电击下完成穿梭的时间为PAR时间。记录AAR次数、PAR电击时间。

2.6 水迷宫实验^[4]

水迷宫实验在完成穿梭箱实验后进行。水迷宫为一圆形水池,水池内放入奶粉使之成为乳白色,水温恒定(24±1)℃。平台位于水下2 cm,将每只大鼠头部染黑,第1天于象限边1/2弧度处将大鼠头朝池壁入水,120 s未找到平台者,将其引至平台;第2~4天为训练,每天上下午各训练4次,每次选择不同的入水点入水;第5天开始正式测试,撤去平台,任意将大鼠从最后一次训练时的方位入水,电脑记录大鼠第1次跨越平台的时间,即为寻台潜伏期(超过120 s以120 s计)。

2.7 生化指标的测定

行为学实验结束后,ip3.5%水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血于冰台上快速断头取脑组织,分离脑皮质和海马,称质量。冰生理盐水中研磨匀浆脑皮质,静置,4℃下以离心半径8 cm,3 000 r/min离心10 min,取上清液,制备10%的脑皮质生

理盐水匀浆,-20℃贮藏,采用酶联免疫吸附(ELISA)法分别测定NO、LPO的含量。

2.8 统计学方法

采用SPSS16.0统计软件分析数据,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,半定量数据统计方法统计神经功能缺失评分;多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 姜黄醇提取物对模型大鼠神经功能缺失评分的影响

与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺失评分升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,姜黄醇提取物高、中剂量组大鼠神经功能缺失评分降低,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。姜黄醇提取物对模型大鼠神经功能缺失评分的影响见表1。

表1 姜黄醇提取物对模型大鼠神经功能缺失评分的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of *C. longa* alcohol extract on neurological deficits score of model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量,mg/kg	神经功能缺失评分
假手术组	10		0.18±0.21
模型组	10		2.73±0.62*
姜黄醇提取物高剂量组	10	200	1.57±0.54**
姜黄醇提取物中剂量组	10	100	2.06±0.47*
姜黄醇提取物低剂量组	10	50	2.45±0.42
尼莫地平组	10	80	1.69±0.50**

与假手术组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$
vs.sham operation group: * $P < 0.01$;vs.model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.2 姜黄醇提取物对模型大鼠穿梭箱实验结果

与假手术组比较,模型组大鼠AAR次数减少,PAR电击时间延长,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,姜黄醇提取物高、中剂量组大鼠AAR次数增加,PAR电击时间缩短,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。穿梭箱实验结果见表2。

表2 穿梭箱实验结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Results of shuttle box test ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量,mg/kg	AAR,次	PAR,s
假手术组	10		6.12±1.04	85.18±6.31
模型组	10		3.17±0.65*	117.83±5.64*
姜黄醇提取物高剂量组	10	200	5.67±0.48**	79.67±4.84**
姜黄醇提取物中剂量组	10	100	5.02±0.39*	90.56±5.47*
姜黄醇提取物低剂量组	10	50	4.34±0.37	105.35±5.72
尼莫地平组	10	80	5.41±0.52**	84.62±5.05**

与假手术组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$
vs.sham operation group: * $P < 0.01$;vs.model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.3 水迷宫实验结果

与假手术组比较,模型组大鼠寻台潜伏期延长,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,姜黄醇提取物高、中剂量组大鼠寻台潜伏期缩短,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。水迷宫实验结果见表3。

表3 水迷宫实验结果($\bar{x} \pm s$)Tab 3 Results of water maze test($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量,mg/kg	寻台潜伏期,s
假手术组	10		12.46±3.17
模型组	10		39.64±2.51*
姜黄醇提取物高剂量组	10	200	18.59±3.23**
姜黄醇提取物中剂量组	10	100	27.16±4.08*
姜黄醇提取物低剂量组	10	50	32.52±4.85
尼莫地平组	10	80	20.63±3.09**

与假手术组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

vs.sham operation group: * $P < 0.01$; vs.model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.4 姜黄醇提取物对模型大鼠NO、LPO含量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠NO、LPO含量增加($P < 0.01$),差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,姜黄醇提取物高、中剂量组的NO、LPO含量减少,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。姜黄醇提取物对模型大鼠NO、LPO含量的影响见表4。

表4 姜黄醇提取物对模型大鼠NO、LPO含量的影响($\bar{x} \pm s$)Tab 4 Effects of *C. longa* alcohol extract on the contents of NO and LPO in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量,mg/kg	NO, $\mu\text{mol/L}$	LPO, mg/L
假手术组	10		26.92±1.02	1 695.42±66.27
模型组	10		31.48±1.43*	1 892.61±67.04*
姜黄醇提取物高剂量组	10	200	27.35±0.93**	1 730.44±58.53**
姜黄醇提取物中剂量组	10	100	28.54±0.92**	1 783.74±69.18*
姜黄醇提取物低剂量组	10	50	30.41±1.65	1 805.35±108.47
尼莫地平组	10	80	27.09±1.07**	1 746.38±60.29**

与假手术组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

vs.sham operation group: * $P < 0.01$; vs.model group: ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

4 讨论

对于复制血管性痴呆大鼠模型,现有许多方法,如开颅电凝法^[5-6]、微栓子栓塞法^[7]、光化学法^[8]、线栓法^[1]等。由于线栓法的缺血部位恒定,可进行再灌注,模拟了人类永久性、短暂性、局灶性脑缺血的不同状态;能对缺血及再通时间进行准确控制,便于分析神经元的缺血敏感性和耐受性;手术难度相对较小,大鼠死亡率和术后并发症发生率低,因此笔者选择了线栓法。研究表明,复制模型后大鼠神经功能缺失评分明显升高,穿梭箱实验中大鼠AAR次数减少、PAR电击时间延长,水迷宫实验中大鼠寻台潜伏期延长,提示模型复制成功。

穿梭箱实验是通过条件刺激,测试大鼠的主动回避反应,主要反映大鼠的非陈述记忆能力情况,从而评定大鼠的注意力、记忆力和执行能力有无下降,可用于学习及记忆保持能力的测定。本研究结果表明,在复制模型前分别给予200、100、50 mg/kg姜黄醇提取物后,大鼠的AAR次数增加、PAR电击时间缩短,其中在200、100 mg/kg剂量下与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),提示姜黄醇提取物可提高模型大鼠主动回避能力。

水迷宫实验是英国心理学家Morris于20世纪80年代初

(1981)设计并应用于脑学习记忆机制研究的一种实验手段,其在痴呆研究中的应用非常普遍,主要反映大鼠的空间学习能力。本研究结果表明,在复制模型前分别给予200、100、50 mg/kg姜黄醇提取物后,大鼠的寻台潜伏期缩短,其中在200、100 mg/kg姜黄醇提取物下与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

NO作为一种自由基本质的气体,是以精氨酸为底物,在一氧化氮合酶(NOS)催化下产生的具有神经毒性作用。LPO是体内细胞膜性结构中的多价不饱和脂肪酸受到氧自由基的作用而生成的过氧化脂质,其聚集在体表的细胞膜上的同时也侵犯体内各脏器,使机体发生多种病变^[9]。本研究结果表明,在复制模型前分别给予200、100、50 mg/kg姜黄醇提取物后,大鼠NO、LPO含量明显减少,其中在200、100 mg/kg剂量下与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。提示姜黄醇提取物可提高模型大鼠酶活力。

综上,姜黄醇提取物在一定剂量下可改善血管性痴呆模型大鼠的行为学及酶学变化,但还需要后期更详实的数据支持。

参考文献

- [1] Koizumi J, Min Z, Imanaka T, *et al.* Temperature-dependent plasmid integration into and excision from the chromosome of *Bacillus stearothermophilus*[J]. *J Gen Microbiol*, 1986, 132(7): 1 951.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84.
- [3] 高翠英,崔秀玉. BALB/c和ICR小鼠的学习记忆能力等行为学研究[J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(5): 372.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修. *药理实验方法学*[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 826.
- [5] Tamura A, Graham DI, McCulloch J, *et al.* Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1981, 1(1): 53.
- [6] Chauveau F, Moucharrarie S, Wiart M, *et al.* In vivo MRI assessment of permanent middle cerebral artery occlusion by electrocoagulation: pitfalls of procedure[J]. *Exp Transl Stroke Med*, 2010, 2(1): 4.
- [7] 郑冲,吴刚. 局灶性脑缺血动物模型制作方法的概述[J]. *中国卒中杂志*, 2008, 3(8): 603.
- [8] Chen F, Suzuki Y, Nagai N, *et al.* Rodent stroke induced by photochemical occlusion of proximal middle cerebral artery: evolution monitored with MR imaging and histopathology[J]. *Eur J Radiol*, 2007, 63(1): 68.
- [9] Fan LW, Pang Y, Lin S, *et al.* Minocycline attenuates lipopolysaccharide-induced white matter injury in the neonatal rat brain[J]. *Neuroscience*, 2005, 133(1): 159.

(收稿日期:2013-06-05 修回日期:2013-07-10)