

[文章编号] 1000-4718(2012)02-0263-06

# 黄芪多糖对缺血脑损伤大鼠海马神经递质及 c-fos mRNA 表达的影响\*

颜玲<sup>△</sup>, 黄德斌

(湖北民族学院医学院, 湖北恩施 445000)

**[摘要]** 目的: 观察黄芪多糖(astragalan, AG)对缺血性脑损伤大鼠海马乙酰胆碱(ACh)、去甲肾上腺素(NE)、5-羟色胺(5-HT)及 c-fos mRNA 表达的影响。方法: 取 Wistar 雄性大鼠 100 只, 随机分成假手术组(sham-operated group, SOG)、模型组(model group, MG)、低剂量黄芪多糖治疗组(low-dose astragalan treatment group, L-AGTG)、高剂量黄芪多糖治疗组(high-dose astragalan treatment group, H-AGTG), 每组 10 只。所有 MG 和 AGTG 组颈部切开阻断右侧大脑中动脉, 造成缺血性脑损伤后, AGTG 组腹腔注射 AG(5 mg·kg<sup>-1</sup> 和 15 mg·kg<sup>-1</sup>)。于 1 d、3 d 和 7 d 分别脑血流再灌注, 随即评分神经功能缺损情况后取材, 测定海马匀浆中 ACh、NE 和 5-HT 的含量, 采用 RT-PCR 法半定量分析大鼠海马 c-fos 的 mRNA 水平。结果: AG 能减轻脑缺血引起的海马损伤。L-AGTG 7 d 和 H-AGTG 3 d、7 d 海马匀浆 ACh、5-HT 和 NE 的含量均显著高于 MG 而低于 SOG ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 且呈现剂量递增趋势; SOG 的 c-fos mRNA 表达低于 MG ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 提示脑缺血因素造成了 c-fos 基因表达增强, 加速了下游基因表达, 有利于神经细胞的保护; H-AGTG 3 d、7 d c-fos mRNA 表达均高于 MG ( $P < 0.05$ ), 提示黄芪多糖具有上调 c-fos mRNA 表达的作用。结论: 黄芪多糖能减轻脑缺血再灌注引起的神经细胞损伤, 改善海马神经功能, 其作用机制与提高海马 ACh、NE、5-HT 含量和促进 c-fos 基因表达有关。

[关键词] 黄芪多糖; 海马; 神经递质; c-Fos

[中图分类号] R322.81; R971

[文献标志码] A doi: 10.3969/j.issn.1000-4718.2012.02.014

## Effects of astragalan on neurotransmitters and expression of c-fos mRNA in hippocampus after ischemic brain injury in rats

YAN Ling, HUANG De-bin

(Medical College of Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China. E-mail: hdb66910@163.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To explore the effects of astragalan (AG) on the neurotransmitters acetylcholine (ACh), norepinephrine (NE) and 5-hydroxytryptamine (5-HT), and the expression of c-fos mRNA in hippocampus after ischemic brain injury in rats. **METHODS:** Male Wistar rats (180~220 g) were randomly divided into 10 groups ( $n = 10$ ): sham-operated group (SOG), 3 model groups (MG 1 d, 3 d, 7 d) and 3 low- or high-dose AG treatment groups (L/H-AGTG 1 d, 3 d, 7 d), respectively. The middle cerebral artery of the rats in MG group and AGTG group were blocked by operation to induced brain injury. The cerebral blood vessels of the animals were blocked on day 1, day 2 and day 7, respectively, after the L/H-AGTG were treated with AG (5 mg/kg and 15 mg/kg, ip). The content of ACh, 5-HT and NE was determined using their respective ELISA kits, and the expression of c-fos mRNA in the hippocampus homogenate was semiquantitative analyzed by RT-PCR after neurologic impairment (NIP) was scored. **RESULTS:** AG attenuated the injury in hippocampus by cerebral ischemia in a dose-dependent manner. The content of ACh, 5-HT and NE in L-AGTG 7 d, H-AGTG 3 d and 7 d groups was significantly higher than that in MG group, but was lower in SOG group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The mRNA expression of c-fos in SOG group was lower than that in MG group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), indicating that reinforcement expression of c-fos mRNA by cerebral ischemia and the expression of downstream genes may be beneficial for protecting the neurons. The mRNA expression of c-fos in H-AGTG 3 d/7 d groups

[收稿日期] 2011-08-01

[修回日期] 2011-11-16

\* [基金项目] 湖北省自然科学基金资助项目 (No. 2008ABA197)

△通讯作者 Tel: 0718-8437479; E-mail: hdb66910@163.com

was higher than that in MG group ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** AG attenuates the damage of neurons and improves the functions of hippocampus under the condition of cerebral ischemia/reperfusion by increasing the content of ACh, NA and 5-HT, and the mRNA expression of c-fos in hippocampus.

**[KEY WORDS]** Astragalan; Hippocampus; Neurotransmitters; c-Fos

现有资料表明,老年性痴呆(Alzheimer disease, AD)的发病机制主要与神经递质紊乱、自由基损伤、神经元凋亡等密切相关<sup>[1]</sup>。中枢神经系统(central nervous system, CNS)神经元轴突的生长是嘌呤敏感机制予以调控的一个基因表达程序<sup>[2]</sup>。这种特征性的基因表达程序对于已经成熟的中枢神经细胞来说,可被再次激活而诱导轴突生长与延伸<sup>[3]</sup>。有研究表明,海马组织在缺血后,其c-fos mRNA的表达明显增加<sup>[2]</sup>。这间接说明,至少c-Fos蛋白是促进神经结构重塑并刺激神经生长的重要因素。黄芪多糖(astragalan, AG)是从黄芪(*Astragalus mongholicus*)中提取的活性化合物,目前对于黄芪多糖的研究主要集中在调节免疫、抗氧化和延缓衰老的研究<sup>[1]</sup>,但未发现黄芪多糖对于海马神经递质和c-fos mRNA表达的研究。本研究采用大鼠大脑中动脉缺血再灌注的模型,探讨AG在缺血性脑损伤后,海马单胺类神经递质及c-fos mRNA表达的影响。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

**1.1 动物及分组** 经过行为学实验筛选合格的封闭群Wistar雄性大鼠100只(体重180~220g),购于重庆医科大学实验动物中心(医动字4110302)。将大鼠随机分成假手术组(sham-operated group, SOG)、模型组(model group, MG)、低剂量黄芪多糖治疗组(low-dose astragalan treatment group, L-AGTG)和高剂量黄芪多糖治疗组(high-dose astragalan treatment group, H-AGTG),每组10只。

### 1.2 器材及药品

黄芪多糖(Sigma); 氯化-2,3-三苯基四氮唑(TTC, Sigma); 水合氯醛; 乙酰胆碱(acetylcholine, ACh) ELISA检测试剂盒; 去甲肾上腺素/5-羟色胺[norepinephrine (NE)/5-hydroxytryptamine(5-HT)] ELISA检测试剂盒(96T, 上海江莱生物科技有限公司);  $\beta$ -actin引物和c-fos引物; MK3型酶标仪; 立体显微镜; 单道可调加样枪; 多普勒血流探测仪; 全自动生化分析仪; 牙科钻; MG96G型PCR仪由杭州朗基科学仪器有限公司提供; LG2020D型凝胶成像分析系统、JY300+型

电泳仪以及JY-SCZ2型电泳槽由北京君意东方电泳设备有限公司提供; A1301026型低温离心机; DQ300型Hoefel核酸蛋白荧光定量分析仪。

### 2 方法

**2.1 动物处理**<sup>[4]</sup> 各组动物麻醉后(10%水合氯醛 $300\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip),仰卧位固定,于右腹股沟处切开暴露股动脉并插管备用。于颈正中纵行切开约1~1.5 cm,逐层分离,分别暴露右侧颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉。于插管的股动脉采血(作对照分析)后, MG、L-AGTG和H-AGTG组结扎并切断颈外动脉及其分支,彻底止血,随后沿颈内动脉根部结扎其颅外分支(翼腭动脉),应用文献<sup>[4-5]</sup>线栓法,由右颈外-颈内动脉插入丝线(5-0,头端粘有硅胶,连续而光滑,直径0.21~0.27 mm),制造右大脑中动脉阻塞再灌注模型<sup>[4]</sup>。随后,沿着颈外动脉残端插入同样黑色尼龙丝线,沿颈外动脉与颈总动脉分叉处,轻轻向颈内动脉推进至颈内动脉颅内分叉处[进线长度约(1.7±0.2) cm],此时流入大脑中动脉的血流可被阻断。在MG、L-AGTG和H-AGTG组缺血2 h后,轻轻拔退栓线至颈总动脉,按文献<sup>[4-5]</sup>要求,缺血性脑损伤组选择的再灌注时点分别为1 d、3 d和7 d。L-AGTG和H-AGTG缺血2 h后分别每天2次ip AG  $5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $15\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以生理盐水稀释成2 mL),直至处死取材。MG缺血2 h后分别每天2次注射等容量生理盐水(ip)。SOG任何血管均不予以结扎、剪断、插管和阻塞再灌注,只是假手术。各组动物室温均保持在25℃左右,维持正常肛温为(37.0±0.5)℃。

**2.2 神经功能缺损评分(neurologic impairment score, NIPS)** 各组大鼠均按文献<sup>[2,4]</sup>所拟NIPS法在造模前和处死取材前进行评分,即:0分:无神经功能缺失;1分:脑缺血的右侧前肢出现屈曲;2分:自由活动时不向对侧转圈,手推脑缺血的右侧肩部时,其肌抵抗力降低;3分:自由活动时向对侧转圈,手推脑缺血的右侧肩部时,其肌抵抗力降低。

**2.3 取材方法** 参考文献<sup>[6]</sup>,最后1次腹腔注射药物后,所有大鼠禁食12 h断头取血,将头迅速置于冰块上开颅取脑,将取出的脑组织置于垫有冰盘的滤

纸上,以生理盐水冲洗3~5次,待脑组织血液清洗干净后,小心剥去大脑皮层,暴露并剥离出完整海马,左右两侧切开分离,左侧海马组织作为对照切片。左右两侧以生理盐水冲洗干净,用LKB III型超薄切片机从前端开始连续海马各区冠状切片各3张(5~8 μm),立即放入10%甲醛中,在恒温37℃状态下,避光进行Bielschowsky嗜银染色,30 min后观察切片。每张片每个部位取10个视野,在光学显微镜下观察神经元情况。剩下海马组织分别迅速放入5 mL的清洁塑料离心管,存冰箱中备用(-85℃),分别检测海马匀浆ACh、5-HT、NE的含量以及海马内c-fos mRNA表达。

**2.4 海马单胺类神经递质测定** 严格按ACh、5-HT和NE的ELISA检测试剂盒说明进行。

**2.5 海马组织总RNA提取与鉴定** 参考文献<sup>[7]</sup>,用RT-PCR法半定量分析海马c-fos mRNA水平(用Trizol试剂提取海马组织总RNA)。首先吸取60~80 mg海马组织,加入Trizol 1 mL,用匀浆器匀浆至液态。将匀浆置入1.5 mL离心管中,于25℃静置3 min后,4 000 r/min(4℃,离心力12 000 × g)离心10 min,吸取上清液放入新的离心管,去除不溶组织沉淀。向上清液中加入氯仿200 μL,颠倒混匀15 s,于25℃静置3 min,按上述操作继续离心15 min。小心吸取上清液,加入到另一离心管中,加入异丙醇500 μL,摇匀。于25℃静置10 min后,按上述操作继续离心10 min,去除上清液,以1 mL 75%乙醇洗涤RNA沉淀,混匀后,以4℃离心力7 500 × g离心5 min,去除上清液,于25℃干燥,沉淀RNA 5~10 min,用DEPC(二乙基焦磷酸胺)处理过的50 μL无菌水溶解RNA,55℃水浴助溶10 min。取5 μL进行琼脂糖甲醛变性胶电泳鉴定,再取5 μL加入DEPC处理的45 μL无菌水,用核酸蛋白荧光定量分析仪测定RNA含量,余下的RNA液存于-85℃冰箱备用。

**2.6 c-fos mRNA的扩增** 反转录在20 μL反应体积中进行。按文献<sup>[8]</sup>用AMV反转录酶0.5 μL(1 × 10<sup>7</sup> U/L),dNTP 2 μL(10 mmol/L),RNasin 0.7 μL(3 × 10<sup>7</sup> U/L),于42℃和95℃中分别变性45 min和5 min。PCR反应体系于50 μL中进行。其方法为:c-fos mRNA于94℃、62℃、72℃和55℃中分别延伸45 s、45 s、1 min以及5 min。β-actin mRNA于94℃、58℃、72℃和55℃中分别延伸1 min、1 min、1 min以及5 min,共循环30次。β-actin的PCR产物长度为200 bp,上游引物5'-TCG AAT GGC TCC

TAC ATT-3',下游引物5'-AGG TCA ACC AGA ACG GCA-3'。c-fos的PCR产物长度为400 bp,上游引物5'-ACG GCA CTT TAT ATT GAC-3',下游引物为5'-TCC GGC TAT TAA AAT GAT-3'。

**3 结果分析、图像与统计学处理**

取PCR产物20 μL与缓冲液均匀混合后,在100V恒压下于琼脂糖凝胶中(浓度1.5%)电泳40 min后,将凝胶置于凝胶图像分析仪(JY04S-3D)上予以分析和拍照,并对胶片灰度扫描,半定量分析目的条带灰度值与β-actin条带灰度值的比值。数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,测得的数据用SPSS 10.0统计软件处理。用单因素方差分析比较组间差异,两两比较用LSD法。神经功能评分用非参数秩和检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

**结 果**

**1 AG对脑缺血再灌注大鼠NIPS的影响**

结果显示,各组随时间延长,其NIPS显著降低。L-AGTG和H-AGTG NIPS减少明显强于MG,H-AGTG又强于L-AGTG(P<0.05或P<0.01),呈明显的剂量依赖性,见图1。

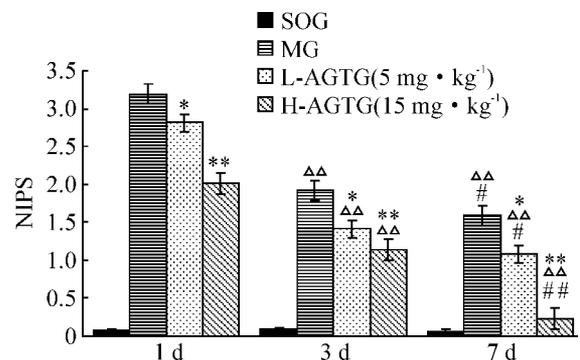


Figure 1. Effects of AG on NIPS after cerebral ischemia reperfusion in rats.  $\bar{x} \pm s$ , n = 10. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs MG at the same time;  $\Delta\Delta$  P < 0.01 vs 1 d in the same group; # P < 0.05, ## P < 0.01 vs 3 d in the same group.

图1 AG对脑缺血再灌注大鼠NIPS的影响

**2 脑缺血再灌注大鼠7 d海马病理观察**

MG、L-AGTG和H-AGTG各时段除右侧海马CA1区有明显改变外,其它各区与左侧非缺血海马相应各区相似,改变不明显,正常神经元数量为(150 ± 23)/mm<sup>2</sup>,无显著差异(P>0.05)。SOG左右两侧海马CA1区未发现明显的病理改变,神经原纤维排列有序、稀疏,无神经纤维缠结(NFT),海马锥体神经元呈锥形,外形规则,细胞膜完整,可见有较大的顶树突,细胞核多为圆形或椭圆形,核染色质均匀清

晰,正常神经元数量为(148 ± 21) /mm<sup>2</sup>; MG 右侧海马 CA1 区神经原纤维密集、排列紊乱,部分融合,凝集成宽带状,银染加深,部分可见大量 NFT,锥体细胞胞浆轻度肿胀,细胞核固缩,核染色质浓缩,核膜不清,正常神经元数量为(87 ± 41) /mm<sup>2</sup>; L - AGTG 7 d 右侧海马 CA1 区神经原纤维排列部分紊乱,部分密集,可见少许 NFT,正常神经元数量为(109 ± 34) /mm<sup>2</sup>明显多于 MG 而少于 SOG ( P < 0.05 或 P <

0.01); H - AGTG 7 d 右侧海马 CA1 区神经原纤维病变较 MG 明显减轻,神经原纤维排列有序,密集程度明显缓解,未见 NFT,正常神经元数量为(127 ± 28) /mm<sup>2</sup>,明显多于 MG 和 L - AGTG 7 d 而少于 SOG( P < 0.05 或 P < 0.01)。表明 AG 对缺血区海马 CA1 区神经元病理改变具有部分逆转作用,而且呈现明显的剂量依赖性,见图 2。

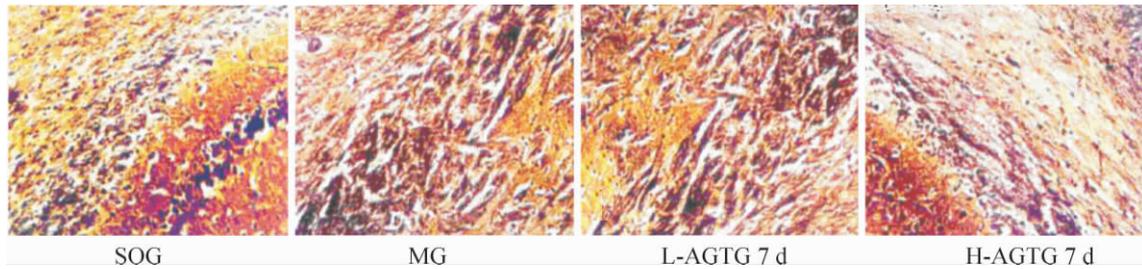


Figure 2. The sections of hippocampus CA1 region( Bielschowsky silver staining ,×400) .

图2 海马 CA1 区切片

### 3 AG 对脑缺血再灌注大鼠海马 ACh、5 - HT 和 NE 的影响

脑缺血再灌注后,各组右侧海马组织 ACh、5 - HT 和 NE 含量有显著差异。其中, MG 海马匀浆 ACh 和 5 - HT 含量明显低于 SOG( P < 0.01),表明海马 ACh 和 5 - HT 能神经功能降低, AG 能显著增加海马 ACh 和 5 - HT 含量,且 L - AGTG 弱于 H - AGTG( P < 0.05),呈现明显的剂量依赖趋势;结果还

显示 L - AGTG 7 d 和 H - AGTG 7 d 海马 ACh 和 5 - HT 含量与 SOG 相当( P > 0.05),表明 AG 虽能加速海马匀浆 ACh 和 5 - HT 含量的增加,但不能超过正常水平;脑缺血再灌注后, MG 1 d、3 d 海马 NE 含量显著低于 SOG( P < 0.01),而后逐渐恢复至正常水平,与 SOG 相当( P > 0.05),且其恢复过程 L - AGTG 和 H - AGTG 相当( P > 0.05),见表 1。

表1 AG 对脑缺血再灌注大鼠海马 ACh、5 - HT 和 NE 的影响

Table 1. Effects of AG on ACh 5 - HT and NE content in rat hippocampus after cerebral ischemia reperfusion(  $\bar{x} \pm s$  )

Group	n	ACh( $\mu\text{g/g}$ )	NE( $\text{ng/g}$ )	5 - HT( $\text{ng/g}$ )
SOG	10	176.12 ± 21.47	81.78 ± 9.24	97.64 ± 12.73
MG	1 d	98.09 ± 17.43**	44.23 ± 8.34**	51.57 ± 15.32**
	3 d	119.06 ± 21.13**#	57.17 ± 9.73**#	62.63 ± 11.74**
	7 d	137.34 ± 18.06**##	78.41 ± 11.73##▲	73.21 ± 15.86**##
L - AGTG ( 5 mg · kg <sup>-1</sup> )	1 d	103.76 ± 25.72**	51.97 ± 10.46**	57.63 ± 18.91**
	3 d	137.12 ± 18.43**##	63.63 ± 14.74**	76.42 ± 21.34**##
	7 d	165.53 ± 20.65**##▲△△	85.73 ± 18.42**	89.65 ± 11.54**##△
H - AGTG ( 15 mg · kg <sup>-1</sup> )	1 d	107.27 ± 15.98**	46.68 ± 12.85**	67.82 ± 9.53**
	3 d	154.89 ± 19.72*##△△	64.09 ± 14.68**##	92.56 ± 8.95**##△△○
	7 d	183.71 ± 22.48**##△△	83.23 ± 16.73**##▲	103.74 ± 13.46**##△△○

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs SOG; # P < 0.05, ## P < 0.01 vs 1d in the same group; ▲▲ P < 0.01 vs 3 d in the same group; △ P < 0.05, △△ P < 0.01 vs MG at the same time; ○ P < 0.05 vs L - AGTG at the same time.

### 4 脑缺血再灌注大鼠海马 $\beta$ - actin 与 c - fos mRNA 电泳结果

各泳道排列为从左至右依次是 SOG、MG - 7d、L - AGTG 7 d、H - AGTG 7 d 及 DNA marker。海

马 RNA 甲醛琼脂糖变性胶电泳为 3 条带,即 28S、18S 和 5S,前两条荧光信号较强,后一条带荧光信号较弱。RNA 的 A<sub>250</sub> 和 A<sub>270</sub> 比值为 0.926,提示 RNA 的纯度可靠,见图 3。 $\beta$  - actin 与 c - fos mRNA 电泳条

带结果表明 L-AGTG 7 d 与 H-AGTG 7 d 荧光信号显著强于 SOG 和 MG,而且 H-AGTG 7 d 强于 L-AGTG 7 d。提示 AG 能显著促进  $\beta$ -actin 与 c-fos mRNA 的表达,见图 4、5。

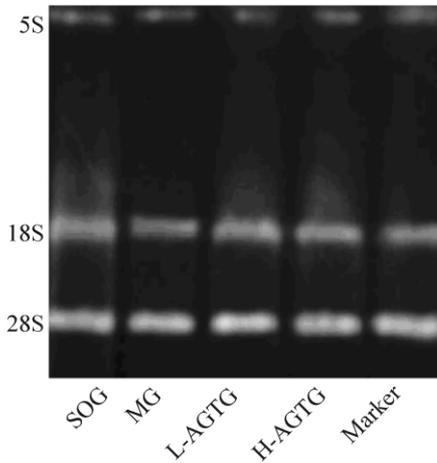


Figure 3. Hippocampus RNA in 1 d.

图 3 各组 1 d 的海马 RNA 条带

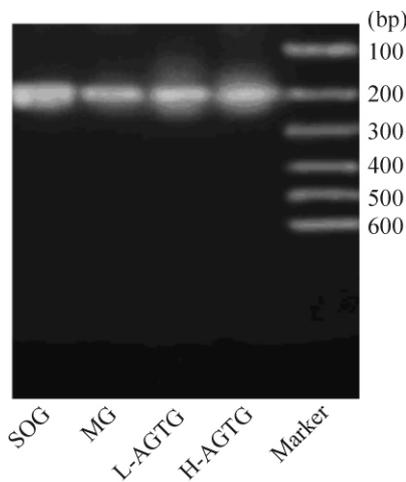


Figure 4. RT-PCR results of hippocampus  $\beta$ -actin in 7 d.

图 4 各组 7 d 的海马  $\beta$ -actin 条带

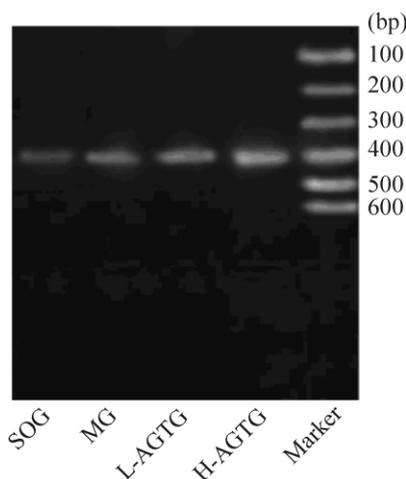


Figure 5. RT-PCR results of hippocampus c-fos mRNA in 7 d.

图 5 各组 7 d 的海马 c-fos mRNA 条带

### 5 大鼠海马内 c-fos mRNA 表达的半定量 RT-PCR 测定

MG 脑缺血再灌注后,随着时间的推移,海马 c-fos 灰度值/ $\beta$ -actin 灰度值逐渐增加;H-AGTG 海马 c-fos 灰度值/ $\beta$ -actin 灰度值增加显著强于 MG ( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 AG 对脑缺血再灌注大鼠海马 c-fos mRNA 表达的影响

Table 2. Effects of AG on c-fos mRNA expression of hippocampus after cerebral ischemia reperfusion in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	c-fos / $\beta$ -actin	
SOG	10	0.23 $\pm$ 0.09	
MG	1 d	10	0.28 $\pm$ 0.12
	3 d	8	0.32 $\pm$ 0.11
	7 d	9	0.48 $\pm$ 0.14 <sup><math>\Delta\Delta</math></sup> <sup><math>\blacktriangle</math></sup>
L-AGTG (5 mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup> )	1 d	10	0.24 $\pm$ 0.08
	3 d	8	0.41 $\pm$ 0.13 <sup><math>\Delta\Delta</math></sup>
	7 d	9	0.53 $\pm$ 0.13 <sup><math>\Delta\Delta</math></sup> <sup><math>\blacktriangle</math></sup>
H-AGTG (15 mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup> )	1 d	8	0.25 $\pm$ 0.16
	3 d	9	0.47 $\pm$ 0.10 <sup>*</sup> <sup><math>\Delta\Delta</math></sup>
	7 d	8	0.61 $\pm$ 0.14 <sup><math>\Delta\Delta</math></sup> <sup><math>\blacktriangle</math></sup>

\*  $P < 0.05$  vs MG at the same time;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs 1 d in the same group;  $\blacktriangle P < 0.05$ ;  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  vs 3 d in the same group.

### 讨 论

黄芪多糖是从黄芪中提取的活性化合物,具有调节免疫、保护脑组织、促进损伤神经恢复、抗氧化、降低血糖、延缓衰老和促进代谢等多种作用<sup>[9-10]</sup>。但没有黄芪多糖改善脑神经功能的相关报道,特别是没有对海马 ACh、NE、5-HT 以及 c-fos mRNA 表达的深入报道。本研究发现,黄芪多糖能呈剂量依赖性地减少损伤神经功能评分,改善脑功能状态,部分逆转海马神经元病理改变。

研究证实,海马神经递质 ACh、NE、5-HT 和多巴胺(DA)等的生理功能是增强机体适应力和敏感性,保持觉醒和警觉状态,确保人体学习力与注意力,促进神经信号传递。脑缺血首先导致脑急性能量代谢障碍,使得神经细胞内外离子平衡失调,细胞内积聚大量钠钙,导致细胞水肿,甚至破裂<sup>[11]</sup>。其中,海马神经元对缺血缺氧性损害极其敏感,特别是 CA1 区<sup>[12]</sup>。而海马又是学习记忆的高级中枢,海马的相关神经递质含量直接反映学习记忆力<sup>[13]</sup>。脑缺血后,海马的相应神经递质合成、储存障碍,导致与学习记忆相关的神经递质减少,影响学习记忆力<sup>[12]</sup>。本研究证实,脑缺血后,海马匀浆与学习记忆有关的

ACh 和 5-HT 含量明显降低,表明海马 ACh 和 5-HT 能神经功能降低。当使用黄芪多糖治疗后,海马 ACh 和 5-HT 含量显著增加,显著高于模型组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),且呈现明显的剂量依赖趋势。这些结果提示,黄芪多糖改善脑功能状态至少与增加海马神经元 ACh、NE、5-HT 含量密切相关<sup>[11]</sup>。其增加这些神经递质含量的机制,结合黄芪多糖对海马神经元病理改变研究的结果,认为有可能是通过部分逆转海马神经元病理改变或通过某种途径促进海马神经元的神经递质合成。

当脑缺血损伤消除后,受到损伤的神经元就会逐渐修复,其修复再生过程必然伴随相关物质的表达<sup>[11]</sup>。相关研究报道,对记忆力具有双向影响作用的 *c-fos* mRNA 在一定范围内的表达,能改善学习记忆力<sup>[14]</sup>。*c-fos* 早期在脑中参与神经元信号的整合、转导、分析与凋亡,与学习记忆及认知功能相关<sup>[13]</sup>。其中低水平的 *c-fos* 表达,可能直接参与了神经元的分化、生长、学习记忆以及神经突触的可塑性变化等多种生理过程<sup>[8,10]</sup>。其机制是 *c-fos* 基因影响转录和翻译控制下游靶基因转录而合成新的蛋白质,影响学习记忆编码,从而有利于学习记忆<sup>[13]</sup>。有研究报道,单纯脑缺血再灌注,海马 CA1 区 *c-fos* 原癌基因产物 Fos 有较高的表达,能促进损伤神经元的再生与重塑,加速缺血损伤后神经元的修复<sup>[14]</sup>。这些表明,诱导脑内 *c-fos* 基因的表达,都能增强人脑的学习记忆能力<sup>[9]</sup>。本研究发现,使用黄芪多糖治疗大鼠的海马 CA1 区神经原纤维病变较模型组明显减轻,神经原纤维随剂量增加和时间推移逐渐排列有序,密集程度明显缓解,NFT 最后消失,正常神经元数量明显多于模型组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。表明 AG 呈剂量依赖趋势地部分逆转海马神经元病理改变。研究还证实,假手术组海马的 *c-fos* mRNA 表达显著低于模型组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )表明脑缺血因素导致海马 *c-fos* mRNA 表达的增强,通过促进下游基因的表达而保护神经细胞。黄芪多糖治疗组海马 *c-fos* mRNA 表达均高于模型组( $P < 0.05$ ),提示黄芪多糖可上调 *c-fos* mRNA 的表达。由此可以推论,黄芪多糖减少大鼠脑损伤神经功能评分,可能是通过上调 *c-fos* mRNA 的表达,控制下游靶基因转录而合成新的蛋白质,重现学习记忆编码,从而减轻海马神经元的凋亡,加速神经元的分化、生长,促进神经元的再生与重塑,增强神经元信号的整合、转导与分析,最终有利于改善学习记忆及认知功能<sup>[13]</sup>。这种上调 *c-fos* mRNA 表达的机制,我们将

进一步研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] 焦俊霞,高维娟,钱涛,等. 黄芪有效成分对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 Cyt-c、Cco 表达的影响[J]. 中国药理学通报 2011 27(2):211-215.
- [2] 张雅丽,高维娟,闫凤霞,等. 黄芪注射液抑制缺氧缺糖后复氧复糖大鼠海马神经细胞凋亡的研究[J]. 中国老年学杂志 2009 29(7):793-796.
- [3] 靳榕,蒋新颖,马行,等.  $\gamma$ -氨基丁酸受体在大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤中的作用[J]. 药理学报, 2007 42(8):838-842.
- [4] 李花,邓常清,陈北阳,等. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注后 Caspase 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2006 22(2):189-193.
- [5] 黄德斌,董志. 尼莫地平对缺血性脑损伤大鼠神经细胞黏附分子表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2008 24(5):640-643.
- [6] Bracha HS, Garcia-Rill E, Mrak RE, et al. Postmortem locus coeruleus neuron count in three American veterans with probable or possible war-related PTSD[J]. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 2005 17(4):503-509.
- [7] Ning X, Liu Q, Zhao H. Nimodipine for treatment of perifocal edema following aspiration and drainage in patients with cerebral hemorrhage[J]. Neural Regener Res 2007, 2(5):310-313.
- [8] 叶冬青,高维娟,钱涛,等. 黄芪注射液抑制缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 JNK3 的表达[J]. 中国药理学通报 2010 26(1):77-82.
- [9] 汤飏,李树清,李凡,等. 缺血后适应对树突海马 CA1 区神经元 Akt 信号转导调控的机制研究[J]. 中国病理生理杂志 2011 27(3):560-565.
- [10] Junttila MR, Li SP, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival[J]. FASEB J, 2008, 22(4):954-965.
- [11] Sayeed I, Parvez S, Wali B, et al. Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism for better neuroprotective effects of allopregnanolone over progesterone[J]. Brain Res, 2009, 1263:165-173.
- [12] 焦俊霞,高维娟,李玉明,等. 黄芪注射液对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志 2011 27(5):905-910.
- [13] 李慢,韩芳,石玉秀. 细胞色素 C 氧化酶在 PTSD 大鼠蓝斑神经元过表达[J]. 解剖科学进展 2010, 16(2):140-142.
- [14] Ding J, Han F, Shi Y. Single-prolonged stress induces apoptosis in the amygdala in a rat model of post-traumatic stress disorder[J]. J Psychiatr Res 2010 44(1):48-55.