

天麻素对脑外伤大鼠认知功能的影响及机制研究*

孙新亭¹ 孙晓静²

摘要

目的:观察天麻素对脑外伤大鼠认知功能的影响,并探索其作用机制。

方法:70只SD大鼠随机分为正常对照组(n=10)、假手术组(n=20)、自然恢复组(n=20)和天麻治疗组(n=20)。采用控制性皮质撞击的方法制作大鼠脑外伤模型。手术大鼠在术后第1、2、3、4周进行行为学评价并利用RT-PCR技术对海马区的脑源性营养因子(BDNF)和突触素(Syn I)的mRNA表达情况进行检测。使用SPSS 16.0对实验数据进行统计分析。

结果:天麻治疗组第3、4周逃避潜伏期同自然恢复组相比差异有显著性($P < 0.05$)。两组游泳时间百分比在第4周时差异有显著性($P < 0.05$)。BDNF mRNA:造模后第2、3、4周自然恢复组同天麻治疗组相比差异有显著性($P < 0.05$)。Syn I mRNA:自然恢复组第1、2周时同天麻治疗组相比差异无显著性($P > 0.05$),第3、4周时两者差异存在显著性($P < 0.05$)。

结论:天麻素能够影响脑外伤大鼠海马区的神经重塑,从而改善脑外伤大鼠的认知功能。

关键词 天麻素;脑外伤;认知功能

中图分类号:R651.1,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2014)-06-0517-04

The influence of gastrodin on cognitive disorder of rats with traumatic brain injury and underlying mechanisms: a pilot study/SUN Xinting, SUN Xiaojing/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29 (6): 517—520

Abstract

Objective: To observe the effectiveness of gastrodin on cognitive disorder of rats with traumatic brain injury (TBI) and explore the underlying mechanisms.

Method: Seventy SD rats were randomized into normal group (n=10), sham operated group (n=20), untreated group (n=20) and gastrodin group (n=20). Controlled cortical impact(CCI) device was utilized to establish TBI model. The cognitive functions of rats in every group were evaluated at the 1st, 2nd, 3rd, 4th week time points post operation. The rats were sampled to test the expressions of brain derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and synaptophysin I (Syn I) mRNA in hippocampus with RT-PCR technique. The collected data were analyzed with SPSS 16.0.

Result: There were significant differences between untreated group and gastrodin group in escape latency at the 3rd, 4th week time points post operation ($P < 0.05$). The swimming time percentage in untreated group was significantly lower at the 4th week post operation than that in gastrodin group ($P < 0.05$). The expressions of BDNF mRNA in gastrodin group were significantly higher at the 2nd, 3rd, 4th week time points than that in untreated group ($P < 0.05$). The expressions of Syn I mRNA in untreated group and gastrodin group were similar at 1st, 2rd week time points($P > 0.05$) but significantly different at the 3rd, 4th week time points($P < 0.05$).

Conclusion: Gastrodin may affect the neuroplasticity in hippocampus to improve the cognitive disorders of TBI rats.

Author's address China Rehabilitation Research Center, Fengtai District, Beijing City, 100068

Key word gastrodin; traumatic brain injury; cognitive disorder

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.06.004

*基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(2012CZ-28)

1 中国康复研究中心北京博爱医院,首都医科大学康复医学院,北京市丰台区角门北路10号,100068; 2 首都医科大学康复医学院
作者简介:孙新亭,男,主治医师; 收稿日期:2013-07-22

创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)也称为脑外伤。其发生率、致残率高,给患者及家庭造成极大的痛苦和经济负担,也给社会带来沉重的负担。据美国2010年调查数据表明,每年有235000人因为脑外伤住院,110万人因脑外伤于急诊就诊,5万人因脑外伤死亡,目前美国有320万人因脑外伤留下残疾^[1],约占美国人口总数的1.1%^[2]。我国目前尚没有全国范围的脑外伤流行病学调查数据,但是考虑我国的人口数量和国情,脑外伤的发病率应远高于美国等发达国家。认知障碍是TBI常见的后遗症,其发生不仅仅局限于重度TBI患者,也见于轻度到中度的TBI患者^[3-4]。这些障碍往往长期存在,严重影响患者的康复治疗和生活以及工作能力的提高^[5-6]。目前针对TBI所致认知障碍的治疗尚没有特异性的药物。临床所用都是针对各种认知有影响的神经递质系统的药物,例如:多奈哌齐^[7]、金刚烷胺^[8]、美金刚^[9]等。这些药物临床应用取得了一定疗效。但是TBI患者的认知障碍往往需要长期服药,此类药物不良反应较多或价格昂贵,不利于长期使用。因此寻找一种不良反应小、价格低廉的药物是目前治疗TBI所致认知障碍的最佳选择。

天麻素(gastrodin)为中药天麻中最主要的药物活性成分,研究证实其能改善多种原因引起的认知损害^[10-12]。虽然天麻应用于TBI后综合征的治疗较多^[13],但是其对TBI认知障碍的影响研究较少。本研究拟观察天麻素对TBI大鼠认知功能的影响,并从神经重塑角度对其可能的作用机制进行探讨,为天麻素此方面的临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康SD雄性大鼠,12周龄,体重(180±20)g,由中国军事医学科学院实验动物中心提供。实验动物单笼饲养,自由饮水和摄食。饲养温度24—25℃,相对湿度7%左右,光照明暗比为13:11。上述大鼠共70只,随机分为正常组(n=10),假手术组(n=20),自然恢复组(n=20),天麻治疗组(n=20)。正常组不予任何干预,假手术组仅暴露硬脑膜,自然恢复组和天麻治疗组进行控制性皮质撞击

(controlled cortical impact, CCI),打击参数为:①打击速度:3.5m/s;②打击深度:1.5mm;③停留时间:400ms。天麻治疗组大鼠在造模后每只鼠平均每日饮5ml含60μg/ml天麻素的蒸馏水,自然恢复组、假手术组和正常对照组每日仅饮用蒸馏水,持续4周。

1.2 行为学评价

水迷宫是一个直径为120cm、高50cm的圆形水池,分为4个象限,水池中水温控制在20—22℃。将直径为12cm的圆形平台固定在某一象限,平台面低于水面1cm。试验前先将大鼠放入水中适应环境。定位航行试验:分别以四个象限的某一固定点为起点,平台为终点,将大鼠面向池壁放入水池中,记录大鼠由起点游至终点的时间,即逃避潜伏期,试验允许最大逃避潜伏期为60s。各组大鼠于建模后1、2、3、4周进行试验,每次均在固定时间进行,并保持实验环境不变。空间探索试验:撤去平台,将大鼠于水池中任意一点放入水中游泳,时间为120s,记录120s内大鼠在原平台所处象限的游泳时间,并计算原平台象限游泳时间占总时间的百分比。

1.3 实时PCR测定

大鼠海马中突触素 I (synaptophysin- I, Syn I) 和脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的mRNA的表达水平:大鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠溶液(3ml/100mg体重)麻醉,迅速剪开颅骨,取出海马组织,液氮保存。将海马组织匀浆,加入Trizol提取总mRNA,并用RT试剂盒进行逆转录合成cDNA, -20℃保存。将cDNA产物进行实时PCR(RT-PCK)循环。

Syn I 序列为:

上游CAGGGTCAAGGCCCGCCAGTC,

下游CACATCCTGGCTGGGTTTCTG;

BDNF:

上游AGACGAAGCCAAACCTAAGGAA,

下游CATTCTTAAAGTTCAGGCATGTTCTT;

β-actin序列为:

上游5'-CCT CTG AAC CCT AAG GCC AA-3,

下游5'-AGC CTG GAT GGC TAC GTA CA-3。

常规PCR扩增:取2μl cDNA进行常规PCR扩增,反应体系:cDNA 2μl,引物2μl, H₂O 16μl, SYBR Premix Ex Taq 20μl。BDNF反应条件:

95℃ 10s 预变性;95℃ 6s,60℃ 30s 共 35 个循环。扩增片段长度分别为 89bp 和 92bp。Syn I 反应条件:95℃ 10s 预变性;95℃ 6s,56℃ 20s,72℃ 25s,共 35 个循环。质粒的重组与克隆:采用 T 载体克隆方案,将纯化的 PCR 产物与 PMD18-T 载体(TaKaR 公司)连接,然后转化至 E.coli top10 感受态细胞,PCR 扩增鉴定阳性克隆,挑取重组成功的菌落进行培养,用高纯度质粒小提中量试剂盒(Tiangen 公司)提取重组质粒。荧光定量 RT-PCR:用紫外分光光度计测量提取质粒的浓度,根据《分子克隆实验指南》中的公式将质量单位转换为分子数,用无菌去离子水将以上重组质粒稀释成 $2.0 \times 10^8 \text{g}/\mu\text{l}$ 、 $2.0 \times 10^9 \text{g}/\mu\text{l}$ 、 $2.0 \times 10^{10} \text{g}/\mu\text{l}$ 、 $2.0 \times 10^{11} \text{g}/\mu\text{l}$ 、 $2.0 \times 10^{12} \text{g}/\mu\text{l}$ 的梯度浓度,它们将作为荧光定量 RT-PCR 检测相应基因的阳性标准模板。阳性标准和样品 cDNA 一同进行荧光定量 PCR 检测。20 μl 反应体系中包括 cDNA 1 μl 或阳性定量标准模板 1 μl ,引物 1 μl 、ddH₂O 8ml、Sybr 10 μl 。在 MJ Opticon II 荧光定量 PCR 检测系统上进行扩增。BDNF 反应条件:95℃ 10s 预变性;95℃ 6s,60℃ 30s 共 35 个循环。Syn I 反应条件:95℃ 10s 预变性;95℃ 6s,56℃ 20s,72℃ 25s,共 35 个循环。每个循环结束时系统都会检测相应的荧光信号,反应全部结束后自动给出由定量标准模板建立的标准曲线。

1.4 统计学分析

使用 SPSS 16.0 软件,定位航行试验和空间探索试验组间数据比较采用方差分析,RT-PCR 试验组间数据比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 行为学表现

逃避潜伏期:假手术组各时间点和正常组比较差异无显著性;自然恢复组各时间点同正常组比较显著增加;天麻治疗组 1、2、3 周较正常组显著增加,4 周时差异无显著性;天麻治疗组 3、4 周同自然恢复组相比差异有显著性。见表 1。

游泳时间百分比:假手术组各时间点和正常组比较无显著性差异;自然恢复组各时间点较正常组显著提高;天麻治疗组 1、2、3 周较正常组明显降低,4 周时无明显差异;自然恢复组同天麻治疗组 4 周时

差异有显著性。见表 2。

2.2 RT-PCR 结果

脑源性神经营养因子(BDNF mRNA):假手术组在各个时间点同正常组相比无明显差异;自然恢复组在造模后第 1、2、3 周时表达较正常组显著升高,第 4 周时同正常组无差异;天麻治疗组造模后各个时间点表达较正常组显著升高;在造模后第 2、3、4 周自然恢复组同天麻治疗组相比有显著性差异。见表 3。

突触素(Syn I mRNA):假手术组各个时间点同正常组比较无差异;自然恢复组和天麻治疗组各个时间点同正常组比较有显著差异;自然恢复组第 1、2 周时同天麻治疗组相比无显著性差异,第 3、4 周

表 1 各组大鼠逃避潜伏期 ($\bar{x} \pm s, s$)

时间点	假手术组 (n=20)	自然恢复组 (n=20)	天麻治疗组 (n=20)	正常对照组 (n=10)
第 1 周	39.35±3.46	50.94±3.15 ^①	48.47±4.32 ^①	
第 2 周	38.86±3.54	48.53±4.35 ^①	45.63±3.45 ^①	36.05±4.53
第 3 周	41.46±2.47	47.25±2.48 ^①	40.94±3.86 ^{①②}	
第 4 周	40.25±2.78	46.34±4.31 ^①	38.28±4.56 ^②	

同正常组相比:①P < 0.05;同自然恢复组相比:②P < 0.05

表 2 各组大鼠的游泳时间百分比 ($\bar{x} \pm s$)

时间点	假手术组 (n=20)	自然恢复组 (n=20)	天麻治疗组 (n=20)	正常对照组 (n=10)
第 1 周	49.43±6.46	30.58±5.22 ^①	31.57±4.76 ^①	
第 2 周	50.39±5.54	35.45±3.89 ^①	36.16±4.62 ^①	53.23±5.46
第 3 周	52.34±4.63	40.35±5.67 ^①	46.27±5.23 ^{①②}	
第 4 周	55.32±6.32	43.18±5.29 ^①	51.23±4.45 ^②	

同正常组相比:①P < 0.05;同自然恢复组相比:②P < 0.05

表 3 各组大鼠各时间点 BDNF-mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

时间点	假手术组 (n=20)	自然恢复组 (n=20)	天麻治疗组 (n=20)	正常对照组 (n=10)
第 1 周	2.18±0.56	3.89±0.46 ^①	3.91±0.31 ^①	
第 2 周	2.32±0.38	4.73±0.72 ^①	5.03±0.78 ^①	2.08±0.43
第 3 周	2.25±0.37	3.54±0.64 ^①	5.87±0.84 ^{①②}	
第 4 周	2.13±0.36	2.32±0.68	5.72±0.89 ^{①②}	

同正常组相比:①P < 0.05;同自然恢复组相比:②P < 0.05

表 4 各组大鼠各时间点 Syn I mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

时间点	假手术组 (n=20)	自然恢复组 (n=20)	天麻治疗组 (n=20)	正常对照组 (n=10)
第 1 周	5.12±2.34	3.02±0.63 ^①	3.29±0.45 ^①	
第 2 周	5.11±2.39	3.23±0.52 ^①	3.43±0.66 ^①	5.15±0.65
第 3 周	5.05±1.73	3.54±0.94 ^①	4.57±0.53 ^{①②}	
第 4 周	5.13±2.35	3.72±0.78	4.82±0.76 ^②	

同正常组相比:①P < 0.05;同自然恢复组相比:②P < 0.05

时两者存在显著差异。见表 4。

3 讨论

认知损害在脑外伤患者中较为常见,文献报道即使影像学无明显异常的脑外伤患者也可能存在不同程度的认知障碍^[14]。认知障碍对脑外伤患者日后的康复治疗及生存质量影响较大,因此是目前的研究热点。目前针对脑外伤引起的认知障碍还没有特殊的治疗药物,临床上常常使用治疗痴呆患者的药物,例如安理申、美金刚等。以往的报道表明天麻素对脑外伤后综合征有明显的疗效^[13],但一直没有针对脑外伤患者认知障碍疗效的观察,更没有对其机制进行过研究。

天麻又称赤箭,为一种名贵中药材,天麻素是其主要有效成分。中医学认为天麻有平肝熄风,镇静安眠的功效。现代药理学证实它具有抗惊厥,保护心脑血管、神经细胞,改善认知功能的作用。研究发现,天麻能改善东莨菪碱引起的大鼠记忆力减退,长期口服天麻素能够改善 SPMP8 大鼠的记忆功能^[13]。Hsieh 等^[15]研究发现,天麻素有助于记忆的巩固和信息提取,但是对信息获取的能力没有明显改善,其机制同吡拉西坦不同,即可能不是通过乙酰胆碱系统,而是通过其他途径实现的。动物实验证明,天麻素灌胃给药吸收良好,其脑组织中的浓度甚至超过静脉给药^[16]。大鼠天麻素给药后其在脑组织中的浓度普遍高于血浆浓度,其中最高的是小脑,其次为额叶皮质、海马和丘脑^[17]。一般来说海马为认知功能的关键区域,因此本研究选取了海马作为主要观察区域,以和神经重塑有关的 BDNF 和 Syn I 作为观察指标,对其作用机制进行考察。BDNF 是一类分泌性蛋白,它对神经系统可塑性的影响与突触活动密切相关^[18]。Syn I 是突触囊泡蛋白的一种,存在于神经突触内, Syn I 能调节神经递质的释放,且在突触可塑性(尤其是短时程突触可塑性)的发生过程中具有不容忽视的作用^[19],另外 Syn I 的数量直接反映了突触的数量,很多实验中通过 Syn I 的定量研究来间接反映突触的数量以及功能。

本研究行为学实验结果提示脑外伤大鼠在伤后认知功能受损,但是这种损害能够在一定程度上自我修复,这种修复往往伴随着海马区域的神经功能重塑,表现为 BDNF 及 Syn I 表达的增高。天麻治疗组大鼠的恢复过程提示脑外伤大鼠使用天麻素一段时间后,其认知功能恢复的速度及程度都有显著

的增加,甚至在试验终点时达到或接近正常水平。而这种行为学上的变化趋势同样表现在其神经重塑指标上。值得注意的是,天麻素的使用时间对认知障碍的恢复非常重要。在使用天麻素 2 周后自然恢复组和天麻治疗组大鼠的行为学改变没有显著差异,但是在第 3、4 周时天麻治疗组大鼠的认知功能恢复呈现一个快速提高的趋势,而自然恢复组大鼠进步缓慢,似乎达到一个平台期。这恰恰说明了天麻素对认知功能的改善更多的是通过影响恢复期的神经重塑实现。

本研究初步证实了天麻素对脑外伤大鼠认知功能障碍恢复有促进作用,并且这种作用同影响海马区的神经重塑有关。需要进行进一步的临床试验来验证其对脑外伤患者认知障碍的治疗效果。

参考文献

- [1] Corrigan JD, Selassie AW, Orman JA. The epidemiology of traumatic brain injury[J]. J Head Trauma Rehabil,2010,25(2): 72—80.
- [2] Zaloshnja E, Miller T, Langlois JA, et al. Prevalence of long-term disability from traumatic brain injury in the civilian population of the United States, 2005[J]. J Head Trauma Rehabil,2008,23(6):394—400.
- [3] Skandsen T, Finnanger TG, Andersson S, et al. Cognitive impairment 3 months after moderate and severe traumatic brain injury: a prospective follow-up study[J]. Arch Phys Med Rehabil,2010,91(12):1904—1913.
- [4] Newcombe VF, Menon DK. Cognitive deficits and mild traumatic brain injury[J]. BMJ,2013,346:f1522.
- [5] Dean PJ, Sterr A. Long-term effects of mild traumatic brain injury on cognitive performance[J]. Front Hum Neurosci, 2013,7:30.
- [6] Horneman G, Emanuelson I. Cognitive outcome in children and young adults who sustained severe and moderate traumatic brain injury 10 years earlier[J]. Brain Inj,2009,23(11): 907—914.
- [7] Ballesteros J, Guemes I, Ibarra N, et al. The effectiveness of donepezil for cognitive rehabilitation after traumatic brain injury: a systematic review[J]. J Head Trauma Rehabil,2008, 23(3):171—180.
- [8] Kraus MF, Smith GS, Butters M, et al. Effects of the dopaminergic agent and NMDA receptor antagonist amantadine on cognitive function, cerebral glucose metabolism and D2

(下转第 527 页)