

• 实验研究 •

黄芪注射液对慢性脑缺血性脑神经损伤的保护作用

程芳, 鄢宇梅[#], 盛艳梅*, 马跃, 张彪, 谢兴亮

成都医学院, 四川 成都 610500

摘要: **目的** 考察黄芪注射液对慢性脑缺血大鼠的影响及体外对缺血神经细胞的保护作用。**方法** 采用永久性结扎双侧颈总动脉建立慢性脑缺血大鼠模型, 将造模成功大鼠随机分为4组: 模型组、假手术组、黄芪注射液组、尼莫地平阳性药物组, 每组10只, 各组于术后3d给药治疗, 1次/d, 连续60d。给药结束用开场实验和Morris水迷宫实验评价各组大鼠焦虑情绪与学习记忆能力, HE染色观察海马区细胞形态变化。采用连二亚硫酸钠法诱导PC12细胞建立缺糖缺氧/复糖复氧(OGD/R)损伤模型, 通过MTT法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 评价黄芪注射液对体外缺血神经细胞的影响。**结果** 旷场实验中, 与模型组相比, 黄芪注射液组大鼠第1~3天的站立次数显著减少($P < 0.05, 0.01$), 第3天的运动距离明显缩短($P < 0.05$); 水迷宫实验中, 与模型组相比, 黄芪注射液组大鼠定位航行实验第2天开始平均逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05, 0.01$), 空间探索实验的穿越平台次数显著增多($P < 0.01$); HE染色结果显示: 模型组大鼠海马较多锥体细胞固缩深染且细胞形状不规则, 黄芪注射液能有效改善海马区神经元细胞损伤。与对照组相比, 模型组PC12细胞存活率显著降低($P < 0.01$); 与模型组相比, 40、200 mg/mL的黄芪注射液均可显著提高OGD/R PC12细胞的存活率($P < 0.01$); 与模型组相比, 200 mg/mL黄芪注射液可显著降低PC12细胞凋亡率($P < 0.01$)。**结论** 黄芪注射液能在一定程度上缓解慢性脑缺血模型大鼠的认知功能障碍, 同时体外促进缺血PC12细胞存活, 其作用机制可能与调控细胞凋亡有关。

关键词: 黄芪注射液; 慢性脑缺血; 学习记忆能力; 细胞凋亡; PC12细胞; 缺糖缺氧/复糖复氧

中图分类号: R971 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)12-2457-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.12.001

Protective effect of Astragalus Injection on chronic ischemic cerebral nerve injury

CHENG Fang, YAN Yu-mei, SHENG Yan-mei, MA Yue, ZHANG Biao, XIE Xing-liang

Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Astragalus Injection on chronic cerebral ischemia rats and ischemic nerve cells *in vitro*. **Methods** *In vivo* experiment: Chronic cerebral ischemia rat model was established by permanent ligation of bilateral common carotid arteries. The rats were randomly divided into 4 groups: model group, sham operation group, Astragalus Injection group, and positive drug group, with 10 rats in each group. Each group was given medicine 3 days after operation, once daily for consecutive 60 days. After administration, the anxiety and learning and memory ability were evaluated by the opening experiment and Morris water maze test, and the morphological changes of cells in the hippocampus were observed by HE staining. *In vitro* experiment: PC12 cells were induced by sodium disulfite method to establish glucose deficiency hypoxia/glucose reoxygenation (OGD/R) injury model, cell viability was detected by MTT assay, cell apoptosis rate was detected by flow cytometry, and the effect of astragalus injection on ischemic nerve cells *in vitro* was evaluated. **Results** In the opening experiment, compared with the model group, the standing times of rats in the astragalus injection group were significantly reduced from day 1 to day 3 ($P < 0.05, 0.01$), and the movement distance on day 3 was significantly shortened ($P < 0.05$). In the water maze test, compared with the model group, the average escape latency of rats in Astragalus Injection group was significantly shortened from second day of positioning navigation test ($P < 0.05, 0.01$), and the number of times of crossing platform in space exploration test was significantly increased ($P < 0.01$). The results of HE staining showed that there were many pyramidal cells pyknosis and deep staining in the hippocampus of the model group, and

收稿日期: 2021-06-28

基金项目: 四川省科技厅项目(20ZDYF2365); 四川省大学生创新创业项目(202013705043)

作者简介: 程芳, 主要研究方向为中药药效与毒理。E-mail: 1439010973@qq.com

鄢宇梅, 主要研究方向为中药药效与毒理。E-mail: 3014915524@qq.com

*通信作者: 盛艳梅, 博士, 主要研究方向为中药药效与毒理。E-mail: 467131233@qq.com

[#]共同第一作者: 鄢宇梅

the shape of the cells was irregular. Astragalus Injection group could effectively improve the damage of neurons in the hippocampus. Compared with the control group, the survival rate of PC12 cells in model group was statistically significant decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, 40 mg/mL and 200 mg/mL Astragalus Injection could significantly improve the survival rate of PC12 cells ($P < 0.01$). Compared with model group, 200 mg/mL Astragalus Injection could significantly reduce the apoptosis rate of PC12 cells ($P < 0.01$). **Conclusion** Astragalus Injection can alleviate the cognitive impairment of rats with chronic cerebral ischemia to a certain extent, and promote the survival of PC12 cells after ischemia in vitro, and its mechanism may be related to the regulation of cell apoptosis.

Key words: Astragalus Injection; chronic cerebral ischemia; learning memory function; apoptosis; PC12 cells; OGD/R

随着世界人口老龄化速度的不断加快,阿尔茨海默病、血管性痴呆和皮层下动脉硬化性脑病等脑血管疾病逐渐进入人类生活并带给家庭巨大痛苦。研究发现,这些疾病之间关联密切,都有着共同的病理基础——慢性脑低灌注,即慢性脑缺血,它是指由各种原因引起脑组织供血量减少,脑偿还能降低,低于机体大脑的正常生理需要,从而导致的脑功能障碍^[1],以认知功能障碍为早期临床表现,具体表现为学习能力下降,记忆力的减退并伴有焦虑等情感障碍的发生^[2-3]。

但是多年以来,人类对于脑缺血的研究重心大多放在急性脑缺血上,缺乏对长期脑组织血流量减少所引起脑部功能损伤及相关预防治疗研究。因此,进一步探究慢性脑缺血的病理基础,找到对其治疗有效的药物,对当今世界缺血性脑血管疾病的治疗都具有重要意义。

本研究选用以黄芪提取物制成的注射剂黄芪注射液作为研究对象,一方面是基于相关文献报道黄芪注射液对缺血性脑血管疾病具有较好的治疗作用,能显著改善神经功能障碍,提高脑血流量等,对老年缺血性脑血管疾病尤为适宜^[4-5],如黄立武^[6]在研究黄芪注射液对慢性脑缺血患者认知功能障碍影响时发现,黄芪注射液可通过改善患者脑部血流量、降低血液黏度,从而改善患者的认知功能障碍。另一方面,中医证候的多中心临床研究结果表明,气虚和血瘀是造成脑缺血发病的主要因素,其中气虚为两者之重。黄芪作为中药补气重点药物^[7],用于治疗慢性脑缺血符合中医辨证理论:气行利于血液循环,气旺利于血液再生。与此同时,大量药理研究资料显示黄芪注射液具有抗氧化、抗炎等多种生物活性,并可通过改善缺血脑组织血脑屏障的通透性,而减轻脑缺血所导致的脑水肿^[8-10]。因此,本实验拟通过构建大鼠永久性双侧颈总动脉结扎损伤的体内模型和 PC12 细胞缺糖缺氧/复糖复氧 (oxygen-glucose deprivation and reintroduction,

OGD/R) 的体外模型,共同考察黄芪注射液对慢性脑缺血神经损伤的保护作用及可能机制,为临床黄芪注射液治疗该病提供实验参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级,体质量 250~300 g 健康雄性 SD 大鼠,饲养于成都医学院动物实验中心,动物许可证号为 SCXK (川) 2020-030,适应性饲养 7 d 后进行实验。

1.2 实验细胞

大鼠肾上腺嗜铬瘤细胞株 (PC12 细胞) 购自中国科学院昆明动物研究所。

1.3 药物与试剂

黄芪注射液 (黑龙江珍宝岛药业股份有限公司, 10 mL, 批号 A03190612144); 水合氯醛 (成都市科龙化工试剂厂, 批号 190420); 尼莫地平片 (亚宝药业集团, 批号 190604); 注射用青霉素 (江西省科达动物药业有限公司, 批号 20190102); 四甲基偶氮唑盐 (赛国生物科技, 批号 EZ6789D144)、二甲基亚砜 (成都市科隆化学品有限公司, 批号 2020090701)。

1.4 主要仪器

OFT-100 大小鼠开场活动实验系统 (成都泰盟软件有限公司); TM073-1612-05-002-002 Morris 水迷宫 (成都泰盟软件有限公司); Varioskan Flash 酶标仪 (赛默飞世尔科技公司); JW-2018H 离心机 (安徽嘉文仪器装备有限公司); OLYMPUSIX71 倒置荧光显微镜 (赛默飞世尔科技公司); 二氧化碳细胞培养箱 (赛默飞世尔科技公司); 1300 系列 A2 生物安全柜 (赛默飞世尔科技公司)。

1.5 体内慢性脑缺血大鼠实验

1.5.1 慢性脑缺血大鼠模型复制 采用永久双侧颈总动脉结扎方法制作慢性脑缺血大鼠模型^[11]。术前禁食 12 h, 禁水 4 h。用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 成功麻醉大鼠, 取仰卧位固定并保持其呼吸顺畅。暴露大鼠颈部皮肤, 备皮并碘伏消毒, 沿颈

部正中位置剪开2~3 cm切口,暴露并分离左侧颈总动脉。4号丝线结扎左侧颈总动脉远心端和近心端,10 min后,按上述步骤结扎右侧颈总动脉。假手术组的手术过程相同,仅分离两侧颈总动脉,但不结扎。术后各组大鼠im 20万单位/kg的青霉素连续3 d,以防感染。

1.5.2 分组与给药 将术后清醒出现左侧肢体偏瘫、提尾悬空向左侧转圈、眼裂变小等症状的手术成功大鼠随机分为假手术组、模型组,黄芪注射液组、阳性药物(尼莫地平)组,每组各10只。阳性药物组ig 尼莫地平19 mg/kg,黄芪注射液组ip 黄芪注射液0.5 mL/kg,1次/d,连续给药60 d,假手术组和模型组仅ip等量的生理盐水。黄芪注射液成人给药剂量为2~8 mL/d,取中间值5 mL/d;尼莫地平片成人给药剂量为90~360 mg/d,取中间值180 mg/d;按成人体质量以60 kg计,依据人与大鼠体表面积换算系数得到2组给药剂量。

1.5.3 行为学评估 给药结束,采用旷场实验、Morris水迷宫实验评估各组大鼠自发行为状态。旷场实验参考文献报道方法^[12],将大鼠放入测试箱中央的格子,打开摄像头并开始计时。每只大鼠实验时间5 min,第1分钟为适应时间,不进行计数,第2分钟开始记录大鼠在4 min内站立次数和运动距离,连续测试3 d。站立次数越多、运动距离越大,代表大鼠情绪越焦虑^[13]。Morris水迷宫实验在开场实验完成后进行:迷宫外参照物保持固定;实验前将大鼠头部染成红色以便监视器分辨。(1)定位航行实验:Morris水迷宫分为I、II、III、IV 4个象限,水温控制在21~23℃;水中加入钛白粉,使其呈白色不透明状,干扰大鼠视线,在第3象限中心放一平台,平台低于水面1 cm。测试时长5 d,每只大鼠每天分别从4个象限面向池壁放入,记录大鼠在各象限寻找平台的时间,大鼠找到平台5 s后终止记录,最长记录时间为120 s;在120 s内找不到平台的,引导至平台停留20 s,逃避潜伏期记为120 s;(2)空间探索实验:在第6天时,撤除平台,选择原先平台象限的对侧为入水点,将大鼠面向池壁放入水中,记录120 s内大鼠穿越原来平台次数。

1.5.4 脑组织苏木精-伊红(HE)染色 动物处死后立即取出大脑,用10%中性甲醛溶液固定,脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、HE染色^[14]。光学显微镜下观察脑组织结构变化并拍摄图片。

1.6 体外神经细胞损伤模型实验

1.6.1 OGD/R模型的建立及分组给药 前期实验结果表明,PC12细胞在5 mmol/L连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)联合无糖培养基孵育19 h,复糖复氧孵育16 h即可模拟慢性脑缺血状态,故本研究OGD/R模型的建立及分组给药如下。

分为7个实验组:对照组、模型组和黄芪注射液(5个不同浓度剂量)组。对照组:100 μL 完全培养基+20 μL PBS,模型组:100 μL 5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 无糖培养基+20 μL PBS;黄芪注射液各剂量组:100 μL 5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 无糖培养基+20 μL 相应药液(终浓度为2、4、20、40、200 mg/mL),各组细胞置37℃、5% CO_2 培养箱培养19 h。弃去原培养基后,将除模型组、黄芪注射液各剂量组的5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 无糖培养基换为完全培养基,复糖复氧16 h。

1.6.2 MTT法检测细胞活力 细胞接种于96孔培养板,每孔加入5 mg/mL的MTT 20 μL ,37℃孵育4 h,弃上清培养液,每孔加150 μL DMSO,震荡10 min以完全溶解结晶。以DMSO为空白调零,测定各孔490 nm波长下的吸光度(A),并计算各组细胞存活率、损伤抑制率。

$$\text{细胞存活率} = \text{处理组 A 值} / \text{对照组 A 值}$$

$$\text{细胞损伤抑制率} = (\text{黄芪注射液组 A 值} - \text{模型组 A 值}) / (\text{对照组 A 值} - \text{模型组 A 值})$$

1.6.3 AnnexinV-FITC/PI 检测黄芪注射液对细胞凋亡的影响取对数生长期的PC12细胞消化、离心、重悬,计数,以 1.4×10^5 个/mL细胞数量接种于12孔培养板。待细胞生长24 h后,去掉完全培养基,将其分为对照组、模型组、治疗组。对照组每孔加完全培养基1.5 mL,再加入PBS磷酸缓冲液300 μL ;模型组加入无糖DMEM培养基配制的5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 1.5 mL,再加入PBS磷酸缓冲液300 μL ;治疗组加入无糖DMEM培养基配制的5 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 1.5 mL,再加入200 mg/mL黄芪注射液300 μL (预防给药);置37℃、5% CO_2 培养箱培养19 h,弃去原培养基,对照组和模型组分别加入1.5 mL完全培养基和300 μL PBS,治疗组加入1.5 mL完全培养基与300 μL 黄芪注射液(治疗给药),复氧16 h。

复氧结束,用0.25%胰酶消化,800 r/min离心5 min收集细胞,吸除上清,PBS洗涤2次。避光条件下,加入500 μL Binding Buffer使细胞悬浮,

加入 5 μL Annexin V-FITC 溶液混匀后, 再加 5 μL PI 溶液, 混匀。室温反应 5~15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.7 统计学分析

实验所得的计量数据采用 SPSS 21.0 软件进行分析, 两组间均值比较用 *t* 检验, 多组均值比较用单因素方差分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 黄芪注射液对慢性脑缺血大鼠旷场行为的影响

2.1.1 站立次数 测试期间, 与假手术组相比, 模型组大鼠站立次数均显著增多 ($P < 0.01$), 提示脑缺血大鼠焦虑情绪明显; 与模型组相比, 黄芪注射液组的站立次数明显减少 ($P < 0.05, 0.01$), 提示该药物可较好的改善脑缺血大鼠的焦虑情绪, 见表 1。

2.1.2 运动距离 测试期间, 与假手术组相比, 模型组大鼠运动距离均明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 尼莫地平组在测试第 2、3 天的运动距离显著缩短 ($P < 0.01$), 黄芪注射液可明显缩短脑缺血大鼠第 3 天的运动距离 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.2 黄芪注射液对慢性脑缺血大鼠 Morris 水迷宫的影响

2.2.1 定向航行实验潜伏期 与假手术组相比, 模型组大鼠在实验第 2~5 天的逃避潜伏期均明显延长 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 黄芪注射液组大鼠在实验第 2~5 天的逃避潜伏期均明显缩短 ($P < 0.05, 0.01$), 见表 3。与模型组相比, 黄芪注射液能明显缩短脑缺血大鼠寻找平台的运动距离, 见图 1。

表 1 各组大鼠旷场实验站立次数 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Standing times of rats in each group in the opening experiment ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	站立次数/次		
		第1天	第2天	第3天
假手术	—	10.00 ± 6.97	4.75 ± 3.69	3.88 ± 2.90
模型	—	27.17 ± 8.98**	21.00 ± 8.30**	19.67 ± 8.09**
黄芪注射液	0.5 mL·kg ⁻¹	14.38 ± 8.34▲▲	11.25 ± 7.45▲	7.00 ± 5.21▲▲
尼莫地平	19 mg·kg ⁻¹	18.33 ± 10.44	9.56 ± 5.15▲▲	5.22 ± 3.56▲▲

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

** $P < 0.01$ vs sham-operated group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs model group

表 2 各组大鼠旷场实验运动距离 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Movement distance of rats in each group in the opening experiment ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	运动距离/mm		
		第1天	第2天	第3天
假手术	—	729.21 ± 335.39	604.41 ± 285.61	678.41 ± 272.85
模型	—	1 370.11 ± 423.58**	1 396.78 ± 274.98**	1 530.58 ± 327.93**
黄芪注射液	0.5 mL·kg ⁻¹	1 238.55 ± 344.05	1 239.92 ± 319.95	1 164.16 ± 341.68▲
尼莫地平	19 mg·kg ⁻¹	1 232.54 ± 229.97	881.14 ± 211.37▲▲	856.98 ± 368.84▲▲

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

** $P < 0.01$ vs sham-operated group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs model group

表 3 各组大鼠逃避潜伏期时间 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Escape latency time of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	逃避潜伏期时间/s				
		第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
假手术	—	55.33 ± 24.34	37.12 ± 20.22	23.54 ± 18.52	14.58 ± 8.85	11.25 ± 9.18
模型	—	71.33 ± 21.44	67.90 ± 12.31**	51.55 ± 15.66**	48.61 ± 8.77**	44.27 ± 19.51**
黄芪注射液	0.5 mL·kg ⁻¹	68.33 ± 20.35	42.58 ± 16.17▲▲	23.00 ± 9.05▲▲	25.75 ± 14.96▲▲	19.83 ± 16.67▲
尼莫地平	19 mg·kg ⁻¹	70.11 ± 18.50	54.85 ± 22.85	39.55 ± 21.94	40.40 ± 15.07▲	19.85 ± 15.42▲

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

** $P < 0.01$ vs sham-operated group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs model group

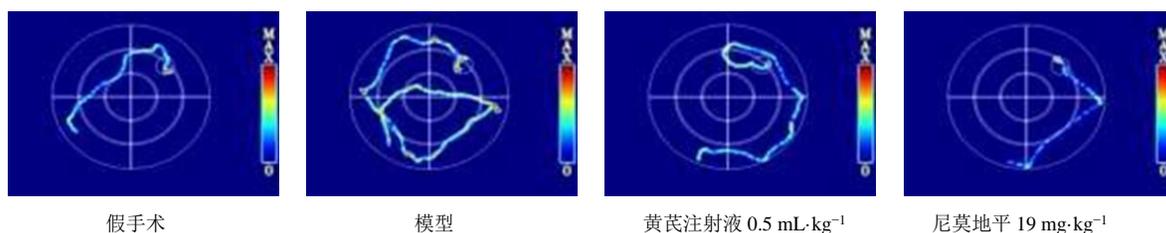


图 1 各组大鼠寻找平台轨迹图

Fig. 1 Tracking chart of searching platform of rats in each group

2.2.2 空间探索穿越平台次数 如表 4 所示, 与假手术组相比, 模型组大鼠穿越平台次数明显减少 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 黄芪注射液可明显增加模型大鼠的穿越平台次数 ($P < 0.01$)。由图 2 也可看出与模型组相比, 黄芪注射液组对目标象限的探索更频繁。

2.3 脑组织 HE 染色结果

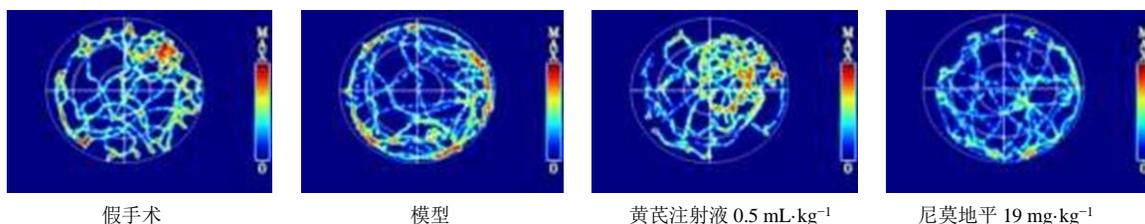
显微镜下观察各组大鼠海马 HE 染色结果见图 3, 假手术组大鼠海马区锥体细胞表现正常。模型组大鼠大量锥体细胞形态异常, 深染固缩, 且细胞排列不规则。与模型组相比, 黄芪注射液能有效改善

表 4 各组大鼠穿越平台次数 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Times of rats crossing the platform in each group

($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	穿越平台次数/次
假手术	—	8.00 ± 1.80
模型	—	4.29 ± 1.30**
黄芪注射液	0.5 mL·kg ⁻¹	6.50 ± 1.61▲▲
尼莫地平	19 mg·kg ⁻¹	6.33 ± 1.52▲

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs sham-operated group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs model group

图中小圆圈所示为目标象限内平台所在位置

The small circle in the figure shows the position of the platform in the target quadrant

图 2 各组大鼠空间探索实验游泳轨迹图

Fig. 2 Swimming trajectories of rats in each group in space exploration experiment

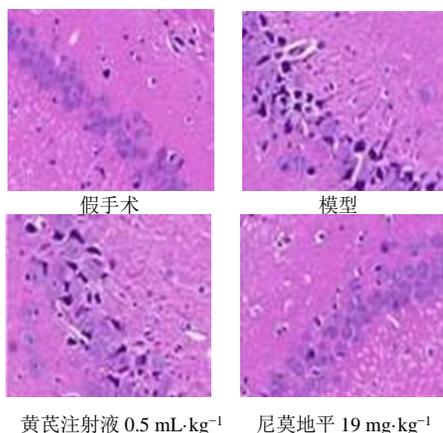


图 3 各组大鼠脑组织海马区病理学变化 (×40)

Fig. 3 Pathological changes in hippocampus of each group (×40)

海马区神经元细胞损伤。尼莫地平组海马锥体细胞排列规则, 细胞形态正常。

2.4 黄芪注射液对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞存活率的影响

MTT 检测结果显示, 与对照组相比, 模型组 PC12 细胞存活率显著降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 40、200 mg/mL 黄芪注射液均可有效改善缺糖缺氧状态下 PC12 细胞存活率 ($P < 0.01$), 提示在一定浓度范围内, 黄芪注射液浓度与保护作用有较好的相关性, 见表 5。

2.5 黄芪注射液对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响

基于黄芪注射液促进 OGD/R 损伤 PC12 细胞

表 5 黄芪注射液对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞存活率的影响

Table 5 Effect of Astragalus Injection on the survival rate of OGD/R induced PC12 cells

组别	剂量/(mg·mL ⁻¹)	A 值	存活率/%	损伤抑制率/%
对照	—	0.51±0.03	100.06±6.02	—
模型	—	0.30±0.02 ^{▲▲}	59.26±3.72 ^{▲▲}	—
黄芪注射液	2	0.30±0.01	58.93±1.79	0.97
	4	0.31±0.01	61.30±1.13	4.85
	20	0.32±0.01	62.15±1.62	7.28
	40	0.33±0.02 ^{###}	65.12±3.11 ^{###}	14.56
	200	0.35±0.02 ^{###}	68.44±3.48 ^{###}	22.33

与对照组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{###} $P < 0.01$

^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{###} $P < 0.01$ vs model group

存活的实验结果,选择 200 mg/mL 黄芪注射液进行凋亡检测。与对照组相比,缺氧/复氧处理后 PC12 细胞的凋亡率明显增高 ($P < 0.01$)。与模型组相比,黄芪注射液能显著降低 PC12 细胞的凋亡率,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 6。

表 6 黄芪注射液对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响

Table 6 Effect of Astragalus Injection on OGD/R induced apoptosis of PC12 cells

组别	剂量/(mg·mL ⁻¹)	细胞凋亡率/%
对照	—	1.982±0.022
模型	—	12.820±0.363 ^{▲▲}
黄芪注射液	200	6.219±0.157 ^{###}

与对照组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{###} $P < 0.01$

^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{###} $P < 0.01$ vs model group

3 讨论

研究表明,情绪障碍与认知功能障碍是慢性脑低灌注的主要临床表现^[15-16],而海马区组织结构密切参与情绪、学习记忆能力的调控^[17]。脑组织缺血缺氧,海马区感知最为敏感,以海马 CA1 区为代表的锥体细胞极易缺血缺氧影响^[18]。因此,抵抗海马神经元损伤,改善慢性脑缺血所导致的情绪与认知功能障碍对该病治疗显得尤为重要。

为了准确评价慢性脑缺血对情绪障碍及学习记忆功能衰退的影响,本实验采用开场实验和 Morris 水迷宫实验评价大鼠焦虑情绪与空间学习记忆能力^[19-20]。本研究结果显示,脑缺血模型大鼠较假手术组运动距离远、站立次数多,表明慢性脑低灌注致大鼠焦虑情绪水平升高。空间学习记忆能力也显著降低,表现为与假手术组相比逃避潜伏期明显延长、穿平台次数显著减少;与 HE 染色模型组大量海马 CA1 区锥体细胞深染固缩受损结果一致;

以上结果提示双侧颈总动脉结扎法可成功复制慢性脑缺血患者的临床表现。而经连续 60 d 黄芪注射液干预治疗后,脑缺血大鼠焦虑情绪与空间记忆力均明显改善,提示黄芪注射液对慢性脑缺血诱导的情绪与认知功能障碍有良好的治疗作用。

PC12 细胞作为大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤克隆的细胞株,细胞膜上存有多种受体,包括 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体、胆碱能 M 和 N 受体等,具有神经内分泌细胞的一般特征,且该细胞纯化程度高、生长繁殖快、培养周期短、使用方便、条件易控制,所以可广泛应用于神经生理和神经药理学研究^[21-23]。本研究进一步探索黄芪注射液对体外 OGD/R 损伤 PC12 细胞存活的影响发现,黄芪注射液可显著抑制 PC12 细胞缺氧缺糖损伤,不同程度地提高受损 PC12 细胞的存活率,并在一定范围之内具有剂量依赖性,该结果进一步确证黄芪注射液对慢性脑缺血神经元损伤具有保护作用。文献报道,长期缺血缺氧将引起脑组织不同程度的神经元变性坏死。而进展性痴呆的发展过程中,细胞凋亡为神经元脱失的主要形式^[24],认知功能障碍的发生发展又与海马区神经元凋亡密切相关^[25]。为进一步探索黄芪注射液对慢性脑缺血的保护机制,本研究采用流式检测细胞凋亡发现,OGD/R 损伤模型组 PC12 细胞的凋亡率显著升高,经 200 mg/mL 黄芪注射液干预治疗后,细胞凋亡率可显著降低。

综上所述,本研究认为黄芪注射液能有效改善慢性脑缺血导致的焦虑情绪障碍与认知功能衰退,其作用机制可能与黄芪注射液通过抗细胞凋亡抵抗海马区神经元损伤有关,但调控细胞凋亡的确切机制还有待进一步研究。综上,黄芪注射液能在一定程度上缓解慢性脑缺血模型大鼠的认知功能障

碍,同时促进体外缺血PC12细胞存活,其作用机制可能与调控细胞凋亡有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 梁辉,孔敏.慢性脑缺血的认识现状与展望[J].中华老年心脑血管病杂志,2017,19(7):673-675.
- [2] 郑力锋.黄芪注射液对慢性脑缺血大鼠脑白质损伤保护作用的研究[D].广州:暨南大学,2008.
- [3] 张娟,殷博凯,郭艳芹,等.GABAB受体在治疗脑缺血后焦虑的作用[J].生命的化学,2019,39(6):1127-1132.
- [4] 黄立武,员晋锋,吴燕,等.黄芪注射液改善慢性脑缺血患者认知功能障碍的效应[J].中国临床康复,2006,10(43):34-36.
- [5] 黄立武,雷伟南.不同剂量黄芪合丹参注射液对脑梗死恢复期患者胰岛素抵抗的影响[J].中国临床康复,2005(33):90-92.
- [6] 黄立武.黄芪注射液治疗老年脑梗死患者直立调节障碍的疗效观察[J].河北中医,1999,21(3):131-132.
- [7] 王志芬,关鑫,陈秀珍.丹红黄芪针并用治疗心脑血管病48例疗效观察[J].实用中医内科杂志,2007,21(5):70.
- [8] 王凯,雷露,曹金一,等.中药红花和黄芪对脑缺血损伤保护作用的研究进展[J].中国医药导报,2020,17(3):22-25.
- [9] 鲁晓平,毛宇,张艳.各中药及有效成分对新生儿缺氧缺血性脑病保护作用研究进展[J].内蒙古民族大学学报:自然科学版,2018,33(6):532-536.
- [10] 曹洋,蔺艳,肖业伟,等.黄芪注射液对蟾蜍和小鼠中枢、神经-肌接头和肌疲劳的影响[J].泸州医学院学报,2006,29(4):316-319.
- [11] Cechetti F, Worm P V, Pereira L O, et al. The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate [J]. *Revista Brasileira Pesquisas Med E Biol*, 2010, 43(12): 1178-1183.
- [12] Wang Z Q, Fan J, Wang J, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induces long-lasting cognitive deficits accompanied by long-term hippocampal silent synapses increase in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 301: 243-252.
- [13] 何婧,黄燕,杜果,等.慢性脑低灌注致模型大鼠学习记忆受损及海马 α -突触核蛋白变化[J].中国组织工程研究,2018,22(20):3230-3236.
- [14] 胡大敏,李佶操,唐绍微,等.益气活血药抗气虚血瘀型脑缺血大鼠的最佳配比优选[J].时珍国医国药,2019,30(6):1295-1298.
- [15] 穆浩月,鞠奕,赵性泉.慢性脑缺血病理生理机制与临床表现的研究进展[J].中国医学前沿杂志:电子版,2021,13(4):21-25.
- [16] 林田.中医药治疗血管性痴呆研究进展[J].内蒙古中医药,2013,32(23):115-117.
- [17] 王晓先,李飞,张硕,等.二甲双胍调节自噬改善大鼠局灶性脑缺血后焦虑样行为[J].中国生化药物杂志,2015,35(8):62-65.
- [18] 宿宝贵,许鹿希.大鼠海马结构在学习记忆活动时的细胞形态学可塑性研究[J].解剖学杂志,1999,22(2):141-145.
- [19] 肖敏,郭莲军,罗攀.巴氯芬改善慢性脑缺血大鼠情感障碍的作用及其机制[J].医药导报,2020,39(5):599-603.
- [20] Fowler S W, Chiang A C, Savjani R R, et al. Genetic modulation of soluble A β rescues cognitive and synaptic impairment in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2014, 34(23): 7871-7885.
- [21] 孙蓉,衣银萍,吕丽莉,等.麝香酮对连二亚硫酸钠造成PC12细胞缺氧损伤的保护作用[J].中药药理与临床,2008,24(1):15-17.
- [22] Seki S, Aoki M, Hosokawa T, et al. Bisphenol-A suppresses neurite extension due to inhibition of phosphorylation of mitogen-activated protein kinase in PC12 cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2011, 194(1): 23-30.
- [23] Nakajima K, Niisato N, Marunaka Y. Quercetin stimulates NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells via activation of Na(+)/K(+)/2Cl(-) cotransporter [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 28(1): 147-156.
- [24] 徐钧,储照虎.慢性脑缺血与阿尔茨海默病[J].医学综述,2012,18(20):3432-3434.
- [25] Cai Z, Pang Y, Xiao F, et al. Chronic ischemia preferentially causes white matter injury in the neonatal rat brain [J]. *Brain Res*, 2001, 898(1): 126-135.

[责任编辑 高源]