

芎麻滴丸对血管性认知障碍大鼠社交行为的影响

刘琳, 孙竺, 王冬雪, 杨寓迪, 赵瑛* (哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076)

摘要: 目的 观察双侧颈总动脉结扎致血管性认知障碍大鼠社交行为的变化, 探讨芎麻滴丸对其干预作用。方法 采用永久性结扎双侧颈总动脉法制备血管性认知障碍模型。实验大鼠随机分为假手术组(生理盐水 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), 模型组(生理盐水 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), 芎麻滴丸高剂量组(生药 $1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 芎麻滴丸低剂量组(生药 $0.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。模型制备第 28, 42 天采用 Morris 水迷宫对大鼠的学习记忆能力进行测试; 模型制备第 7, 14, 28, 42 天用社交行为仪检测大鼠社交能力的变化。**结果** 模型制备第 7, 14 天大鼠社交行为无明显变化, 模型制备第 28 天和第 42 天, 模型组大鼠持续接触时间减少($P<0.05$); 模型制备第 42 天, 模型组大鼠接触次数减少, 逃避潜伏期显著增加, 穿越平台次数显著减少($P<0.01$)。与模型组大鼠相比, 模型制备第 28 天, 芎麻滴丸高剂量组大鼠接触次数显著增加($P<0.05$); 芎麻滴丸高、低剂量组大鼠持续接触时间显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 模型制备第 42 天, 芎麻滴丸低剂量组大鼠接触次数和持续接触时间增加($P<0.05$), 芎麻滴丸高、低剂量组大鼠逃避潜伏期显著减少($P<0.01$)。**结论** 模型制备第 42 天大鼠出现学习记忆障碍; 模型组大鼠第 28 天大鼠开始出现社交行为障碍, 经芎麻滴丸干预后, 接触时间和接触次数增加, 即可认为其有效缓解由双侧颈总动脉结扎造成的社交能力障碍, 且低剂量效果优于高剂量。

关键词: 双侧颈总动脉结扎; 社交行为; 芎麻滴丸; 血管认知性障碍

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)02-0182-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.02.011

引用本文: 刘琳, 孙竺, 王冬雪, 等. 芎麻滴丸对血管性认知障碍大鼠社交行为的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(2): 182-185.

Effect of Xiongma Dropping Pills on Social Behavior of Rats with Vascular Cognitive Impairment

LIU Lin, SUN Zhu, WANG Dongxue, YANG Yudi, ZHAO Ying* (College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the changes of social behavior of rats with vascular cognitive impairment induced by bilateral common carotid artery occlusion and to explore the intervention effect of Xiongma Dropping pills. **METHODS** The model of vascular cognitive impairment was established by permanent ligation of bilateral common carotid arteries. The rats were randomly divided into sham-operation group(saline $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), model group (saline $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), Xiongma Dropping pills high-dose group(crude drug $1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and low-dose group(crude drug $0.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Morris water maze was used to test the learning and memory of the rats in the 28th day and the 42th day. Social behavior was used in 7th, 14th, 28th, 42th day after operation to observe the social skills of rats. **RESULTS** There was no significant difference in social behavior between the 7th and 14th day after model preparation. On the 28th day and the 42th day, the duration of continuous contact in the model group decreased($P<0.05$). On the 42nd day, in model group, the number of contacts decreased, the escape latency increased, and the times of crossing platforms also decreased. Compared with the model group, on 28th day of model preparation, the number of contacts in the Xiongma Dropping high dose group was significantly increased ($P<0.05$), the continuous contact time of the Xiongma Dropping pills high and low group was significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The number of contact and continuous contact time of rats in the low dose group increased($P<0.05$), and the escape latency of rats in high and low dose group decreased significantly on 42nd day after operation. **CONCLUSION** On the 28th day of bilateral common carotid artery ligation in rats, social behavior disorder begin to appear, and the learning and memory impairment occur on the 42nd day after model preparation. After the intervene of Xiongma Dropping pills, the contact time and the number of contacts has been increased, it can be considered effective relieving on social barriers caused by bilateral carotid artery ligation, and the low dose effect is better than the high dose.

KEYWORDS: bilateral common carotid artery ligation; social behavior; Xiongma Dropping pills; vascular cognitive impairment

基金项目: 哈尔滨商业大学认知障碍中医药干预策略和药物发现研究团队资助(2016TD009)

作者简介: 刘琳, 女, 副教授 Tel: 15004658705 E-mail: liulinyx@163.com *通信作者: 赵瑛, 女, 教授 Tel: 13936678930 E-mail: zhaoy0204@163.com

血管性认知障碍(vascular cognitive impairment, VCI)的概念最早由 Hachinski 和 Bowler 提出^[1],并在 2006 年由美国国立神经疾病与卒中研究院-加拿大卒中网建立了统一标准^[2]。根据中国 VCI 诊治指南,VCI 是指由脑血管病危险因素(如高血压、糖尿病和高脂血症等)、显性(如脑梗死和脑出血等)或非显性脑血管病(如脑白质疏松和慢性脑缺血)引起的从轻度认知障碍到痴呆的一大类综合征^[3]。对 VCI 的发病过程进行干预可有效地预防并控制血管性痴呆的发生^[4-5]。资料显示双侧颈总动脉结扎(2-vessel occlusion, 2-VO)会引起动物慢性脑缺血,进而引起脑组织受损等一系列症状,可引起认知性障碍,并最终导致血管性痴呆^[6]。发生认知障碍后造成的行为学改变可分为 2 种,一种是以认知功能的障碍为核心症状,另一种是以非认知功能障碍的边缘症状,包括幻觉、妄想、焦虑、抑郁等行为-心理症状^[7-8]。

芎麻滴丸方源于《医宗金鉴》中的芎麻汤,是经中药现代提取工艺提取有效成分,经大孔树脂纯化后滴制而成的中药复方现代制剂^[9]。已有研究显示芎麻滴丸对血管性认知障碍及血管性痴呆有确切疗效^[10]。因此,本研究通过观察大鼠在发生认知障碍直至痴呆这一过程中的社交行为变化,找到大鼠社交行为明显改变的时间点,并通过芎麻滴丸进行干预治疗,观察药物对大鼠社交行为的改善作用。

1 材料

1.1 动物

成年健康 SD 大鼠(10~12 周龄)80 只,♂,体质量为 300~350 g。由长春市亿斯实验动物技术有限公司提供,合格证号:20158236;许可证号:SCXK(吉)-2011-0004。

1.2 药品及试剂

芎麻滴丸成型前液体(哈尔滨商业大学药学院实验室制备,川芎总酚酸和天麻总苷含量 $\geq 37.77\%$)。浓缩制成相当于生药 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。戊巴比妥钠(Merck 公司,批号:P11011)。

1.3 仪器

ZH 型大鼠社交行为仪、ZH-PT 型动物实验跑台(淮北正华生物仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

80 只成年健康♂ SD 大鼠采用随机分层的方

法分为假手术组(生理盐水 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),模型组(生理盐水 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),芎麻滴丸高剂量组(相当于生药量 $1.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、芎麻滴丸低剂量组(相当于生药量 $0.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组 20 只,于模型建立前 3 d 开始灌胃给药,每天灌胃 2 次。

2.2 模型的建立

采用永久性 2-VO 的方法制作脑缺血大鼠模型^[11]。动物适应性饲养 1 周后,大鼠术前 12 h 禁食、4 h 禁水。用 3%的戊巴比妥钠($45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉,仰卧固定,颈前部去毛消毒后沿颈正中切开,分离暴露左、右侧颈总动脉,套以“0”号丝线双重结扎,假手术组大鼠只分离暴露颈总动脉不结扎,逐层缝合。术毕,肌肉每天注射青霉素 8 万。

模型建立 42 d 后,模型组大鼠的死亡率为 38.75%。

2.3 大鼠社交行为的测定

检测环境要求安静,光线较暗,在规格为 $100\text{ cm}\times 100\text{ cm}\times 100\text{ cm}$ 旷场箱内进行。于术后第 7, 14, 28, 42 天,测试大鼠社交行为。实验前 2 d 所有大鼠被单独放在旷场箱内,每天 2 次,每次 5 min,连续 2 d,以减轻对新环境的焦虑。实验前 1 h 隔离被测鼠,以激发出被测鼠更多的社交行为。观察时间为 5 min。2 只鼠距离 $<50\text{ mm}$,且持续保持此距离 $>1\text{ s}$,即判定为 2 只鼠进行社交。观察并记录社交次数和持续接触时间。

2.4 Morris 水迷宫测试

采用 Morris 水迷宫对大鼠的学习记忆能力进行测试,测试前训练 5 d。适应性训练:正式训练前,平台移除,将大鼠放入池中适应环境,避免应激反应。定位航行实验:每天相同时间点进行实验,将大鼠随机从不同象限(目标象限除外)面壁置入水池内,记录 120 s 内寻找平台的时间(逃避潜伏期)。空间探索实验:将平台移除,记录大鼠穿越平台次数,每次训练完成后,将大鼠取出擦干,以防止低体温造成的应激。测试过程中保持室内灯光、物品等空间参照物摆放位置不变,排除干扰因素对实验结果的影响。可视平台实验可用来排除视力异常大鼠。

2.5 统计学处理方法

应用 SPSS 17.0 统计软件中的方差分析进行数据资料处理,各组间两两比较采用 LSD 检验。结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 2-VO 对大鼠社交行为的影响

实验结果显示,与假手术组比较,在模型建立第 28 天,模型组大鼠接触次数无显著性差异,但持续接触时间却显著减少($P<0.05$);在模型建立第 42 天,模型组大鼠接触次数明显减少($P<0.01$),持续接触时间缩短($P<0.05$)。与模型组相比,造模第 28 天,芎麻滴丸高剂量组大鼠接触次数显著增加($P<0.05$),芎麻滴丸高、低剂量组持续接触时间显著增加($P<0.05$ 或 <0.01);造模第 42 天,芎麻滴丸低剂量组大鼠接触次数增多和持续接触时间增加($P<0.05$ 或 <0.01)。结果见表 1~2。

表 1 各组大鼠接触次数的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Comparison of the number of contacts of rats in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	n	接触次数/次			
		第 7 天	第 14 天	第 28 天	第 42 天
假手术组	13	8.67±3.12	8.54±5.87	10.42±3.65	11.00±3.63
模型组	9	8.78±3.46	7.78±2.33	6.86±4.81	4.67±1.94 ¹⁾
芎麻滴丸					
高剂量组	13	8.30±2.58	10.45±7.78	12.20±3.49 ²⁾	6.70±2.16
低剂量组	9	9.89±7.70	9.11±2.85	9.00±3.42	9.33±6.32 ³⁾

注:与假手术组相比, ¹⁾ $P<0.01$;与模型组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with sham group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

表 2 各组大鼠持续接触时间的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Comparison of the sustained contact time of rats in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	n	持续接触时间/s			
		第 7 天	第 14 天	第 28 天	第 42 天
假手术组	13	47.27±20.37	44.46±27.66	42.99±18.98	52.25±14.23
模型组	9	48.72±21.24	29.23±12.68	14.22±3.93 ¹⁾	18.41±9.11 ¹⁾
芎麻滴丸					
高剂量组	13	56.36±36.84	43.05±49.59	40.75±28.20 ²⁾	28.79±14.74
低剂量组	9	49.06±49.04	39.36±19.96	58.60±23.27 ³⁾	49.70±28.50 ²⁾

注:与假手术组相比, ¹⁾ $P<0.05$;与模型组相比, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with sham group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

3.2 Morris 水迷宫学习记忆测试结果

模型建立第 28 天大鼠学习记忆成绩无明显变化;与假手术组相比,在模型建立第 42 天,模型组大鼠逃避潜伏期显著增加($P<0.01$),大鼠穿越平台次数显著减少($P<0.01$);与模型组相比,芎麻滴丸高、低剂量组大鼠逃避潜伏期显著减少($P<0.01$)。可视平台实验结果表明,受试大鼠均能登上平台,排除了因 2-VO 造成的全脑低灌注状态引起的视神经缺血性损伤对实验结果造成的影响,结果见表 3。

表 3 各组大鼠训练期间的逃避潜伏期测试结果($\bar{x}\pm s$)

Tab. 3 Results of the escaped latency of rats during training period($\bar{x}\pm s$)

组别	n	逃避潜伏期/s		第 42 天穿越平台次数
		第 28 天	第 42 天	
假手术组	13	27.75±18.41	11.70±9.60	7.22±1.99
模型组	9	38.96±29.11	42.96±14.50 ¹⁾	3.67±1.07 ¹⁾
芎麻滴丸高剂量组	13	39.38±29.11	20.50±16.55 ²⁾	5.00±2.06
芎麻滴丸低剂量组	9	25.22±30.50	14.00±8.03 ²⁾	5.60±2.88

注:与假手术组相比, ¹⁾ $P<0.01$;与模型组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with sham group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$ 。

4 讨论

随着世界人口老龄化现象的不断加剧,阿尔茨海默病和痴呆已经成为严重的社会问题^[12]。研究表明,大鼠 2-VO 产生的慢性脑缺血是研究血管性认知功能损害及评估痴呆治疗药物的有效模型^[11],故本研究采用 2-VO 建立血管性认知障碍模型。大鼠结扎双侧颈总动脉后椎动脉不能迅速有效代偿,造成大鼠脑缺血严重,导致大鼠死亡率高;在操作过程中由于误碰迷走神经,也加大了大鼠的死亡率;此外由于术后感染等因素的影响,42 d 后模型组大鼠成活率仅为 38.75%。

血管性认知障碍的临床特征之一是社会交往障碍^[13],主要表现为不愿主动与人交往,经常回避他人目光,喜欢独自活动等。鼠是社会性动物,出现社交互动的频率较高,常见的社交互动如紧跟同伴保持同步、鼻-鼻嗅探、推挤爬行和给同伴理毛等。非社交行为包括自我理毛和区域探测等^[14]。本实验以鼠接触次数和接触时间作为测定指标。结果发现,在模型建立第 28 天,模型组大鼠接触次数未发生明显改变,仅仅是相遇即刻便分开,故交流、社交时间减少,但接触次数与假手术组比较并没有显著性差异。而到造模第 42 天,模型组的 2 只鼠都趋向于独自待在角落,不愿走动,故接触次数、持续接触时间均显著减少,即随着时间的推移,大鼠社交能力呈下降趋势。有研究发现^[15],2-VO 后 42 d 可造成血管性认知障碍,本研究结果与之相吻合,而 2-VO 大鼠的社交行为与认知损害之间的关系笔者也将在以后的研究中进行探讨。

芎麻滴丸由川芎、天麻 2 味中药组成^[16],原方为治疗偏头痛的经典方剂,是经中药现代化提取工艺提取精制而成的中药复方现代制剂。川芎为伞形科植物川芎的干燥根茎,其味辛、性温,

阿魏酸为其有效成分之一^[17]。酚酸类化合物有显著的抗氧化、抗自由基、抑制低密度脂蛋白的氧化及预防心血管疾病的作用,还具有抗肿瘤、抗炎和抗血小板凝聚等功能^[18]。川芎可改善循环障碍,抑制血小板聚集,降低血液黏稠度,尤其对动脉硬化所致的脑缺血、缺氧状况有所改善^[19]。天麻素是天麻中的一种活性成分,具有镇痛、抗惊厥、抑制血栓形成、保护脑组织等作用,进入人体后,能够增强脑组织内胆碱酯酶的活性,清除脑组织内的超氧化物,促进脑细胞的修复^[20]。笔者所在课题组以往采用 2-VO 方法建立 VCI 大鼠模型,采用穿梭箱实验检测各组大鼠学习记忆能力。通过芎麻滴丸高剂量组(相当于生药 1.75 g·kg⁻¹)、中剂量组(相当于生药 1.5 g·kg⁻¹)、低剂量组(相当于生药 0.75 g·kg⁻¹)进行干预治疗,发现中、低剂量组治疗效果显著^[21]。在基本明确芎麻滴丸治疗作用的同时,改变药物剂量为芎麻滴丸高剂量组(相当于生药 1.5 g·kg⁻¹)、中剂量组(相当于生药 0.75 g·kg⁻¹)、低剂量组(相当于生药 0.375 g·kg⁻¹)进行干预治疗,发现芎麻滴丸高、中剂量组能够改善海马组织的病理情况^[22]。因此,选用以上 2 种剂量对大鼠认知功能障碍进行干预治疗。

造模第 28, 42 天,药物干预大鼠的社交行为得到了显著改善,大鼠不再待在角落不动,活动增加,社交机会增多,更愿意进行交流与社交。水迷宫的实验结果也表明芎麻滴丸低剂量组效果要优于高剂量组,这可能与中药中有效成分种类较多有关,随着药物含量的增加,其他有效成分也在逐渐增加,其中 2 种对改善认知障碍作用效果较好的天麻素及阿魏酸在含量较低时,有效含量能够达到最大的释放,故其治疗效果要优于高剂量组,所以最终确定低剂量组(相当于生药 0.75 g·kg⁻¹)为最佳药物剂量。

REFERENCES

- [1] BOWLER J V, HACHINSKI V. Vascular cognitive impairment: a new approach to vascular dementia [J]. *Baillieres Clin Neurol*, 1995, 4(2): 357-376.
- [2] HACHINSKI V, IADECOLA C, PETERSEN R C, et al. National institute of neurological disorders and stroke-canadian stroke network vascular cognitive impairment harmonization standards [J]. *Stroke*, 2006(37): 2220-2241.
- [3] 中华医学会神经病学分会痴呆与认知障碍学组写作组. 血管性认知障碍诊治指南[J]. *中华神经科杂志*, 2011, 44(2): 142-147.
- [4] WU C S, WANG S C, GAU S S, et al. Association of stroke with the receptor-binding profiles of antipsychotics: a case-crossover study [J]. *Biol Psychiatry*, 2013, 73(5): 414-421.
- [5] WU Z F, GAO X P, LI G W. A comparison of modified bilateral common carotid arteries ligation method with standard method in establishing rats chronic cerebral hypoperfusion models [J]. *Chin J Rehabil Med*, 2012, 27(3): 206-210.
- [6] WANG X P, GUO D J, CHENG Y, et al. Research on learning and memory ability of vascular dementia rats using Morris water maze [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊)*, 2013, 31(1): 99-100.
- [7] SHI Y N, FANG L X, YANG L L, et al. Independent relationship between mild cognitive impairment and depression [J]. *Mod Pre Med(现代预防医学)*, 2017, 44(11): 2014-2017.
- [8] LIU J, ZHAO J X, DUAN S R, et al. Advances in mild cognitive impairment [J]. *Pro Mod Biomed(现代生物医学进展)*, 2017, 17(11): 2170-2173.
- [9] ZHAO Y, TENG H J, ZU Y, et al. Effects of Xiongma drop pills on spatial learning and memory ability in rats with vascular dementia [J]. *J Pract Med(实用医学杂志)*, 2009, 25(5): 708-710.
- [10] TIAN Y, LIU L, ZHAO Y. Dynamic study of protective effect of Xiongma dripping pills on oxidative stress damage caused by cerebral ischemia with different durations [J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2016, 25(15): 1751-1757.
- [11] LI J, YAO G, WU J. Overview about animal model studies of vascular dementia [J]. *China Med Herald(中国医药导报)*, 2014, 11(14): 157-160.
- [12] NIU Y L, WAN C X, ZHOU B, et al. Aerobic exercise relieved vascular cognitive impairment via NF-κB/miR-503/BDNF pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(3): 753-761.
- [13] KHAN M B, HODA M N, VAIBHAV K, et al. Remote ischemic postconditioning: harnessing endogenous protection in a murine model of vascular cognitive impairment [J]. *Transl Stroke Res*, 2015, 6(1): 69-77.
- [14] MIAO M S, YAN X L, GUO L, et al. Effect of Rabdosia rubescens total flavonoids on focal cerebral ischemia reperfusion model of rats [J]. *Saudi Pharm J*, 2017, 25(4): 607-614.
- [15] 刘琳, 盖祥云, 周游, 等. 芎麻滴丸对血管性认知障碍过程中细胞凋亡及 caspase-3、Fas 蛋白的影响[J]. *中成药*, 2015, 37(11): 2505-2507.
- [16] 王学颖, 余丹. 脑缺血性疾病治疗进展[J]. *中华临床医师杂志*, 2013, 7(15): 7112-7114.
- [17] MA T C, JIA Y, LUO J, et al. Simultaneous determination of eight active components in Chuanxiong Rhizoma from different areas by UPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2012, 29(10): 902-906.
- [18] YANG M, CLAZHORKE A M, CRAWLEY J N. Postnatal lesion evidence against a primary role for the corpus callosum in mouse sociability [J]. *Eur J Neurosci*, 2013, 29(8): 1663-1677.
- [19] DU J C, XIE X F, XIONG L, et al. Research progress of chemical constituents and pharmacological activities of essential oil of Ligusticum chuanxiong [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2016, 41(23): 4328-4333.
- [20] 孙中吉, 王辉. 天麻素注射液的药理作用和临床应用[J]. *时珍国医国药*, 2012, 19(4): 1011-1013.
- [21] 李新贵. 高效液相色谱测定川芎配方颗粒中阿魏酸的含量[J]. *儿童药学杂志*, 2017, 23(6): 49-51.
- [22] YING Z, LIN L, DAN L, et al. The dynamic study in astrocytes and cytokines in a rat model of vascular dementia by Xiongma dropping pill [C]. *The 3rd International Association of Neurorestoratology Annual Conference*, 2010, 4(1): 1-4.

收稿日期: 2018-01-23

(本文责编: 李艳芳)