DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.17.002
第26卷第17期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 17
2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

文章编号:1000-5404(2004)17-1515-03

论著

血管性痴呆大鼠海马IL-1β、TNF-α含量变化及大蒜素干预的研究

王景周,高 东,高 唱,姚国恩,周红杰,张莉莉,杨清武,王 琳 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

提 要:目的 观察血管性痴呆(vascular dementia, VD)大鼠海马区炎性细胞因子IL-1β、TNF-α含量变化与认知功能变化的相关性;观察大蒜素对炎性细胞因子IL-1β、TNF-α含量的影响。方法 采用Pulsinelli 4血管阻断(4-vascular occlusion, 4VO)改良法建立大鼠动物模型;Wistar大鼠随机分为对照组(n=10)、4VO组、大蒜素组;后两组又分为3 d、1周、4周、2个月(n=10) 4个时相点;大鼠学习记忆能力测试采用微机控制的穿梭箱主动回避反应系统;IL-1β采用双抗体夹心ELISA法;TNF-α测定采用放射免疫分析法。结果 ①4VO组大鼠主动回避反应(active avoidance response, AAR)习得率显著降低;大蒜素治疗后AAR习得率较4VO组显著增高;②4VO组大鼠海马区IL-1β、TNF-α含量于造模后3 d、1周非常显著增高(P<0.01),大蒜素组显著低于4VO组(P<0.05)。结论 血管性痴呆大鼠认知功能改变与大鼠海马区炎性机制改变有关;大蒜素可抑制炎性细胞因子IL-1β、TNF-α的产生,改善大鼠认知功能。

关键词:血管性痴呆;白细胞介素-1β;肿瘤坏死因子-α;大蒜素
中图法分类号:R392.11;R749.16 文献标识码:A

Changes of interleukin-1β and TNF-α in the hippocampus and the interventional effect of garlicin on vascular dementia in rats

WANG Jing-zhou, GAO Dong, GAO Chang, YAO Guo-en, ZHOU Hong-jie, ZHANG Li-li, YANG Qing-wu, WANG Lin
(Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To observe the relationship between content changes of interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α) in hippocampus and cognitive lesion in vascular dementia (VD) rats and the interventional effect of garlicin on the contents of IL-1β and TNF-α. **Methods** Rat model was established by Pulsinelli's 4-vessel occlusion (4VO) technique. Wistar rats were randomly divided into control group (n=10), 4VO group, and garlicin treatment group. Four time points were set in 4VO group and garlicin treatment group (3 d, 1 week, 4 weeks, and 2 months) (n=10). Learning-memory ability of rats was tested by the shuttle-box-system controlled by computer. IL-1β was detected by ELISA, and TNF-α by radioimmunoassay (RIA) technique. **Results** Rate of active avoidance reactivity (AAR) in 4VO group was significantly decreased, but markedly improved in garlicin treatment group. Contents of IL-1β and TNF-α in the hippocampus of rats in 4VO group were increased markedly at 3 d and 1 week after modeling (P<0.01), but were lower in garlicin treatment group (P<0.05). **Conclusion** Changes of cognitive functions of VD rats are associated with the changes of IL-1β and TNF-α in the rat hippocampus. Treatment with garlicin may inhibit the excretion of IL-1β and TNF-α, resulting in amelioration of cognitive functions of rats.

Key words: vascular dementia; interleukin-1β; tumor necrosis factor-α; garlicin

随着人类进入21世纪,人口老龄化现象更加突出,老年期痴呆成为一个严重的社会问题。在我国,血管性痴呆(vascular dementia, VD)是老年期痴呆的主要类型之一[1]。VD是指由于各种脑血管疾病引起的脑功能障碍而产生的获得性智能损害综合征,其确切的发生机制至今仍不明确。本实验采用Pulsinelli 4血管阻断(4VO)改良法建立血管性痴呆动物模型,观察大鼠海马区炎性因子白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量变化,旨在探讨炎性机制与VD发病的相关性;并采用大蒜素干预治疗,观察大蒜素对VD大鼠海马区炎性因子IL-1β、TNF-α含量及认知功能的影响,为VD的临床治疗寻找新的有效药物。

基金项目:重庆市科委科研基金资助项目(5657)
Supported by the Funds of Sci &Tech Committee of Chongqing (5657)
作者简介:王景周(1953-),男,河北省隆尧县人,硕士,主任医师,教授,主要从事急性脑血管病和血管性痴呆方面的研究,发表论文54篇。电话:(023)68757363
收稿日期:2004-01-16;修回日期:2004-07-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 动物与分组

健康 Wistar 大鼠 90 只，月龄 12～15 个月，体质量 298～410 g，雄雌不拘。由第三军医大学野战外科研究所实验动物中心提供。经穿梭箱训练筛选后，随机分为对照组（Control，n＝10）、4 血管阻断组（4-vascular occlusion，4VO）及大蒜素组，后两组又分为 3 d、1 周、4 周、2 个月 4 个时相点，每时相点 10 只。

参考文献[2]剂量，大蒜素组给予大蒜素注射液 0.5 mg/100 g，股静脉注射，造型成功即刻及每日 1 次，共 10 d。

1.2 方法

1.2.1 Pulsinelli 4VO 改良模型复制 参照文献[3]方法，10% 水合氯醛（0.5 ml/100 g，腹腔注射）麻醉。大鼠取颈前部正中切口，钝性分离双侧颈总动脉，缝合颈部皮肤。然后取颈背部正中切口，沿第一颈椎翼小孔烧灼双侧椎动脉，阻断血供。24 h 后再以微动脉夹反复夹闭双侧颈总动脉，每次 5 min，间隔 1 h，重复 3 次。对照组除不烧灼双侧椎动脉，不夹闭双侧颈总动脉外，其余处理同 4VO 各组。

1.2.2 大鼠学习记忆能力测试 采用微机控制的穿梭箱主动回避反应系统。该系统以灯光为条件刺激，足底电击为非条件刺激。如大鼠在灯光刺激后即能完成穿梭动作称主动回避反应（AAR），而经电刺激后才能完成穿梭动作称被动回避反应（passive avoidance response，PAR）。大鼠的学习记忆能力以完成 AAR 的次数与测试总次数（20 次）的比值即 AAR 习得率代表。大鼠在模型制作前均经穿梭箱训练 7 d，AAR 习得率大于或等于 80% 者入选。4VO 各组大鼠在测定指标前，进行穿梭箱测试。

1.2.3 脑匀浆的制备和海马 IL-1β、TNF-α 含量测试 ①脑匀浆的制备：于实验不同时相点处死动物，迅速断头取脑，取海马，称重，匀浆，4 ℃ 3 000 r/min 离心，取上清，加入抑肽酶 500 μl，－30 ℃保存。②IL-1β 测定：采用双抗体夹心 ELISA 法，试剂盒由第二军医大学提供。操作严格按照说明书进行。③TNF-α 测定：采用放射免疫分析法测定，试剂盒由北京东亚免疫技术研究所提供。操作严格按照说明书进行。

1.3 统计学分析

各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠穿梭箱成绩的变化

4VO 组大鼠于造型 3 d 始 AAR 习得率即显著低于对照组，以 4 周、2 个月降低最为显著（$P<0.01$）。大蒜素治疗后不同时相点 AAR 习得率均较 4VO 组同时相点显著增高（$P<0.05$），见表 1。

表 1 4VO 组及大蒜素组大鼠 AAR 习得率变化[($\bar{x}\pm s$)%]

Tab 1 Changes of the acquisition rate of active avoidance response of rats in 4VO group and garlicin treatment group [($\bar{x}\pm s$)%]

Group	4VO	Garlicin
Control	90.33±7.19	90.33±7.19
3 d	70.33±6.67 *	79.45±5.36 *△
1 week	69.67±6.94 *	80.14±6.53 *△
4 week	43.67±9.35 **	66.75±6.22 **△
2 month	45.00±9.82 **	65.97±8.38 **△

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control；△：$P<0.05$，*vs* 4VO

2.2 各组大鼠海马 IL-1β、TNF-α 含量变化

4VO 组大鼠海马区 IL-1β、TNF-α 含量于造模后 3 d、1 周非常显著增高（$P<0.01$），于 4 周、2 个月时逐渐接近对照组（$P>0.05$）。大蒜素组 3 d、1 周时均显著低于 4VO 组同时相点（$P<0.05$），见表 2。

表 2 4VO 组和大蒜素组大鼠海马区 IL-1β、TNF-α 含量变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Content changes of IL-1β and TNF-α in the hippocampus of rats in 4VO group and control group ($\bar{x}\pm s$)

Group	IL-1β (pg/ml)		TNF-α (ng/ml)	
	4VO	Garlicin	4VO	Garlicin
Control	128.87±6.88	128.87±6.88	110.45±23.83	110.45±23.83
3 d	180.11±9.45 **	159.43±7.12 *△	217.39±51.45 **	170.20±37.25 **△△
1 week	176.47±12.6 **	144.55±11.69 *△	194.28±39.35 **	143.75±33.43 *△△
4 week	132.76±5.56	129.45±7.82	106.96±19.70	118.54±29.35
2 month	127.07±8.37	133.32±4.30	102.05±35.66	117.59±41.40

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，*vs* control；△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$，*vs* 4VO

3 讨论

血管性痴呆的确切发病机制至今尚不明了。炎性机制在缺血性脑血管病发病机制中的地位受到重视[4]。炎症是指活体组织对损伤因子所发生的防御反应，基本病理变化包括局部组织的变性、渗出和增生，病理生理过程包括酶的活化、介质的释放、液体的外渗、细胞迁移、组织的破坏和修复等。脑梗死是导致 VD 最常见的疾病之一。目前许多研究证实，多种细胞因子作为启动因素引起缺血性脑损伤，脑缺血时不仅缺血脑组织血管内有大量白细胞聚集和粘附，而且梗死区及其周围亦有大量白细胞浸润。白细胞到达缺血区是多步骤过程。炎性因子如 IL-1β、TNF-α 是促使白细胞在微血管中大量聚集、粘附的重要因子[5～8]。有人认为 VD 与脑梗死的危险因素基本类似。所以炎性机制可能在 VD 的发病机制中起重要作用。为了探讨炎性机制在海马损伤中的地位，本实验测定海马区 IL-1β、TNF-α 含量变化。结果证实 4VO 组大鼠海马区 IL-1β、TNF-α 含量于造模后 3 d、1 周均不同程度地显著增高（$P<0.01$），于 4 周、2 个月时逐渐接近对照组（$P>0.05$）。同时，4VO 组大鼠 AAR 习得率显著降低，提示 4VO 大鼠海马区炎性因子 IL-1β、TNF-α 含量变化与大鼠认知功能损害的病生机制有内在的联系。

已知与人类认知功能关系最为密切的大脑结构为

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

海马、杏仁体及额、颞叶皮层等。本实验采用 Pulsinelli 4VO 改良模型对大鼠进行反复全脑缺血再灌注, 造成了脑内缺血敏感区(如海马)神经元的严重损害。电脑控制的穿梭箱双向主动回避反应实验系统属经典的联合学习条件反射, 其应用较为广泛。本实验在造型前对大鼠进行穿梭箱训练 7 d, 并对实验大鼠进行筛选, AAR 习得率大于或等于 80%者才进入下一步实验。发现 4VO 组大鼠 3 d AAR 习得率显著低于对照组($P<0.01$); 而后逐渐加重, 4 周及 2 个月达基本稳定状态。而大蒜素组各时相点 AAR 习得率均显著高于 4VO 组同一时相点, 以 4 周、2 个月两时相点增高为明显。提示早期应用大蒜素治疗显著改善了大鼠学习、记忆功能。

大蒜素又称蒜辣素, 化学名为二烯丙基二硫醚, 是大蒜挥发油的主要成分之一[9]。具有抗菌、抗病毒、降血脂、抗肿瘤、提高机体免疫功能、解毒、抗自由基、防止动脉硬化和血小板聚集, 防止血栓形成等功效。大蒜素用于急性脑梗死的治疗, 取得了较好的疗效。其机制可能与清除自由基, 改变白细胞粘着, 增加脑血流量, 从而起到保护脑细胞的作用。大蒜素有调节机体免疫机能, 抑制 IL-2 生成的作用, 从而起到抑制脑细胞凋亡的作用[10,11]。本实验表明, 大蒜素治疗后 3 d、1 周大鼠海马区 IL-1β、TNF-α 显著低于 4VO 组同一时相点。同时, 大鼠 AAR 比率显著增高。表明应用大蒜素治疗后抑制了 VD 大鼠海马区炎性因子的产生, 减轻了脑组织细胞损伤。从而减轻了大鼠认知功能损害。有关大蒜素治疗 VD 的研究尚少, 其确切机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Fratiglioni L, De-Ronchi D, Aguero-Torres H. Worldwide prevalence and incidence of dementia[J]. Drugs Aging, 1999, 15(5): 365—375.

[2] 杜金行, 靳洪涛, 史载祥, 等. 大蒜素对脑局灶缺血大鼠血浆中血小板颗粒膜蛋白-140 和血管性血友病因子水平的影响[J]. 中国中医急症, 2002, 11(6): 476—477.

[3] 贾健民, 贾健平, 刘多三, 等. Wistar Rat 全脑反复缺血再灌流动物模型及行为学研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 1992, 9(2): 71—73.

[4] Castellanos M, Castiuo T, Garcia M M, *et al*. Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions: a potential therapeutic target[J]. Stroke, 2002, 33(4): 982—987.

[5] Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, *et al*. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats Stroke[J]. 1995, 26(4): 676—681.

[6] Holmin S, Mathiesen T. Intracerebral administration of interleukin-1β and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema[J]. J Neurosurg, 2000, 92(1): 108—120.

[7] Yang G Y, Zhao Y J, Davidson B L, *et al*. Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in the mouse brain reduces ischemic brain injury[J]. Brain Res, 1997, 751(2): 181—188.

[8] Rothwell N J, Relton J K. Involvement of interleukin-1 and lipocortin-1 in ischemic brain damage[J]. Cerebrovasc Brain Metab Rev, 1993, 5(3): 178—198.

[9] 马风英, 王文英. 大蒜素的药理学研究进展[J]. 中草药, 1997, 28(11): 697—698.

[10] 毛建生, 史载祥, 庄逢源, 等. 大蒜素对急性脑梗塞患者外周血白细胞变形性的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(7): 395—397.

[11] Mayer S A, Lignelli A, Fink M E, *et al*. Perilesional blood flow and edema formation in acute intracerebral hemorrhage: a SPECT study[J]. Stroke, 1998, 29(9): 1791—1798.

(编辑　栾　嘉)

欢迎订阅《解放军药学学报》

《解放军药学学报》是中国人民解放军总后勤部卫生部主管, 总后勤部卫生部药品仪器检验所主办的国家级药学学术性期刊, 被列为中国核心期刊, 国家统计源期刊, 对国内外公开发行。国内统一刊号为 CN 11-4227/R; 国际统一刊号 ISSN 1008-9926; 国内邮发报刊代号 82-974; 国际发行代号 1554BM; 广告许可证号: 京丰工商广字第 0024 号。该刊学术性强, 发行范围广, 各医疗卫生单位、医药院校、科研单位及各医药信息情报研究所、站, 国家和医药单位图书馆均有收藏。现已被《中文生物医学期刊引文数据库》(CMCC)等多家大型期刊引文数据库收载, 并入编《中国学术期刊(光盘版)》(CAJ-CD)和中国学术期刊网(http://www.CNKI.net)。

本刊为双月刊, 逢双月 20 日出版。大 16 开本, 80 页, 电子排版, 彩色封面、插页, 塑料压膜, 进口胶版纸印刷。国内每期(册)定价 12.00 元, 全年 72.00 元, 邮费 7.20 元, 共 79.00 元。

地　址: 北京市丰台西路 17 号总后勤部卫生部药品仪器检验所《解放军药学学报》编辑部

邮　编: 100071　　电　话: (010)66949020, 66949021

传　真: (010)63858411　　E-mail: jfjn2004@163.com

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net