

益气熄风胶囊对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用

刘光丽¹, 杨利娟², 王 张^{1*}, 宋 佳², 孙位军¹, 沙 薇^{2*}, 陈 璐¹, 宋文杰¹

1. 成都中医药大学, 四川 成都 611137

2. 西藏天晟泰丰药业有限公司, 西藏 拉萨 850000

摘 要: **目的** 研究益气熄风胶囊防治大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的作用以及其作用机制。**方法** 将SD大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平片(30 mg/kg)组和益气熄风胶囊0.771 8、1.543 5、3.087 0、6.174 0 g/kg组, 每个组再分为脑梗死率检测、病理学研究2个亚组。益气熄风胶囊于造模前ig给药, 1次/d, 连续7 d; 假手术组和模型组给予生理盐水, 给药体积均为10 mL/kg。于第7天给药后30 min制造大鼠中动脉闭塞(MCAO)模型。大鼠中动脉阻断3 h后, 进行再灌注。假手术组仅在动脉处备线处理, 待给予生理盐水后去线即可。缺血再灌注后24 h后TTC染色法测定脑梗死体积, 计算脑梗死率。缺血再灌注24 h时计算脑指数和脑含水量。各组大鼠在脑缺血再灌注后3、24 h进行神经功能评分。采用苏木素、伊红进行染色, 光镜下观察各组大鼠脑组织的病理形态。采用甲苯胺蓝尼氏染色法检测尼氏小体表达情况, 观察脑组织尼氏小体数量; 采用免疫组化染色SP法测定iNOS蛋白的平均吸光度值, 观察大鼠脑组织iNOS蛋白表达情况。**结果** 益气熄风胶囊1.543 5、3.087 0 g/kg对局灶性脑缺血再灌注引起大鼠脑梗死率增大有明显降低作用($P<0.05$), 而益气熄风胶囊0.771 8、6.174 0 g/kg组大鼠脑梗死率无明显变化。益气熄风胶囊0.771 8、1.543 5、3.087 0、6.174 0 g/kg组大鼠脑指数和脑含水量无明显变化。造模后3 h益气熄风胶囊0.771 8、3.087 0、6.174 0 g/kg神经行为学评分明显增加($P<0.05$ 、 0.01), 对局灶性脑缺血再灌注而引起大鼠神经功能损伤症状有改善作用, 而益气熄风胶囊1.543 5 g/kg的作用不明显。与模型组比较, 益气熄风胶囊1.543 5 g/kg组大鼠脑组织的灰质病变、白质病变、脑膜、室管膜病变均明显减轻($P<0.01$), 尼氏染色计数平均吸光度值显著增加($P<0.01$), 脑组织中iNOS蛋白表达水平有降低的趋势, 但是不具有统计学意义。**结论** 益气熄风胶囊对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有明确的保护作用, 其作用机制可能与脑组织病理病变减轻和尼氏小体数量增加有关。

关键词: 益气熄风胶囊; 脑缺血再灌注损伤; 脑梗死率; 尼氏小体; iNOS蛋白表达

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)09-1620-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.09.004

Protective effect of Yiqi Xifeng Capsules on focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats

LIU Gang-li¹, YANG Li-juan², WANG Zhang¹, SONG Jia², SUN Wei-jun¹, SHA Wei², CHEN Lu¹, SONG Wen-jie¹

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Tibet Tiansheng Taifeng Pharmaceutical Co. Ltd, Lhasa, 850000, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Yiqi Xifeng Capsules on cerebral ischemia reperfusion injury in rats and its mechanisms. **Methods** SD rats were randomly divided into Sham group, model group, Nimodipine Tablets (30 mg/kg) group, and Yiqi Xifeng Capsules 0.771 8, 1.543 5, 3.087 0, and 6.174 0 g/kg groups, and each group was further divided into two subgroups for cerebral infarction rate detection and pathology. Yiqi Xifeng Capsules was ig administered before the model preparation, 1 time/d, continuous treatment for 7 d. Sham group and the model group were given normal saline, and the volume of administration was 10 mL/kg. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) models were prepared at 30 min after 7 d of administration. The middle cerebral artery was blocked for 3 h after reperfusion. In Sham group, the line was prepared only in the artery, and after normal saline was given, the line would be removed. After ischemia reperfusion for 24 h, the volume of cerebral infarction was measured by TTC staining, and the cerebral infarction rate was calculated. The brain index and brain water content were calculated at 24 h after ischemia reperfusion. Neurological function scores were measured at 3 and 24 h after cerebral ischemia reperfusion in rats. Hematoxylin and

收稿日期: 2017-05-06

作者简介: 刘光丽(1991—), 女, 云南人, 硕士研究生, 研究方向: 中药理论与应用研究。Tel: 13709075521 E-mail: hbbdxhz@163.com

*通信作者 王 张(1980—), 男, 重庆人, 副研究员, 博士后, 硕士生导师, 研究方向: 民族药理学。Tel: (028)61800074 E-mail: wzcqcd@163.com

沙 薇(1981—), 女, 博士。E-mail: wei.sha@hntfjt.com

eosin were used to stain, and the pathological morphology of rat brain tissue was observed under light microscope. Nissl body expression was determined by toluidine blue Nissl staining method, and numbers of Nissl bodies were observed. The average absorbance of iNOS protein was determined by immunohistochemical staining and SP method, and the expression of iNOS protein in brain tissue of rats was observed. **Results** Yiqi Xifeng Capsules (1.543 5 and 3.087 0 g/kg) could significantly reduce the cerebral infarction rate of focal cerebral ischemia reperfusion injury in rat ($P < 0.05$), while 0.771 8 and 6.174 0 g/kg had no significant effect. There was no significant change in brain index and brain water content in rats treated by Yiqi Xifeng Capsule (0.771 8, 1.543 5, 3.087 0, and 6.174 0 g/kg). After model for 3 h, neurobehavioral scores of Yiqi Xifeng Capsules (0.771 8, 3.087 0 and 6.174 0 g/kg) group were increased significantly ($P < 0.05$, 0.01), and focal cerebral ischemia reperfusion in rats caused by nerve function damage symptoms were improved, while Yiqi Xifeng Capsules 1.543 5 g/kg group had no obvious effect. Compared with model group, the pathological changes of gray matter, white matter, meninges and ependymal lesions in the brain tissue of rats in Yiqi Xifeng Capsules (1.543 5 g/kg) group were significantly alleviated ($P < 0.01$), the average absorbance value of Nissl staining were significantly increased ($P < 0.01$), and expression level of iNOS protein in brain tissue tended to decrease, but it was not statistically significant. **Conclusion** Yiqi Xifeng Capsules have definite protective effect on focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats, which may be related to the decrease of pathological changes of brain tissue and the increase of Nissl bodies number.

Key words: Yiqi Xifeng Capsules; focal cerebral ischemia reperfusion injury; cerebral infarction rate; Nissl body; iNOS protein expression

缺血性中风是脑血管疾病中的多发病和重大恶性疾病,具有病死率高、致残率高、复发率高、合并症多、治愈率低的特点。随着我国人口老龄化趋势日益加速和人民生活水平改善,缺血性中风发病率不断上升,并且患者呈年轻化趋势。因此缺血性中风已引起医学界的关注,成为临床研究热门课题。缺血性中风的基本病因归纳为气虚血瘀,气虚为本,血瘀为标,病机为气虚血瘀致痹阻脑络,经脉失养。治疗应标本兼治,采用益气活血法治疗缺血性中风。益气熄风胶囊由黄芪、天麻等中药组成,经提取、精制加工制得,其内容物为棕褐色细粉,味微腥、苦、咸,用于缺血性中风恢复期之气虚血瘀症,症见半身不遂、口眼歪斜、言语不利、偏身麻木、口角流涎、气短、乏力、出汗。该药已经获得国家食品药品监督管理总局颁发的药物临床试验批件(批件号为2014L01206)。本研究以益气熄风胶囊为研究对象,通过建立大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型,从大鼠神经行为学、脑梗死率、脑指数、脑含水量、脑组织病理学和诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)蛋白表达方面探究益气熄风胶囊对缺血性中风的神经保护作用及其有效剂量范围,为后期开展益气熄风胶囊的药效物质基础及药动学等研究提供参考和依据。

1 材料

SD大鼠,SPF级,雄性,260只,体质量180~220 g,由成都达硕生物科技有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(川)2015-030,生产批号为0032321、0032795、0032735、0000194、0023826、0032505、0018781、0018982、0018597、2019050、

2018500。

益气熄风胶囊,由西藏天晟泰丰药业有限公司提供,批号为20160531,每粒装0.49 g胶囊内容物(细粉),每克细粉含4.2 g生药(原生药材);尼莫地平片,由拜耳医药保健有限公司生产,规格30 mg/片,批号BJ17436。

红四氮唑(分析纯,批号20130305,上海灵锦精细化工有限公司)、iNOS兔多克隆抗体[批号ab15323,英国abcam-艾博抗(上海)贸易有限公司]、生物素化山羊抗兔IgG(H+L)(批号13152A11,北京中山金桥生物有限公司)、辣根酶标记链霉素卵蛋白素(HRP/A-V)(批号13152A11,北京中衫金桥生物有限公司)。

徕卡RM2016转轮式切片机(德国徕卡仪器有限公司)、TSJ-II型全自动封闭式组织脱水机(常州市中威电子仪器有限公司)、PHY-III型病理组织漂烘仪(常州市中威医疗仪器有限公司)、BA200 Digital数码三目摄像显微摄像系统(麦克奥迪实业集团有限公司)、Image-Pro Plus 6.0图像分析系统(美国Media Cybernetics公司)、BMJ-III型包埋机(常州郊区中威电子仪器厂)。

2 方法

2.1 药物剂量设置及动物分组

益气熄风胶囊的临床服用方法暂定为3粒/次,3次/d,根据规格0.49 g细粉/粒,每克细粉相当于4.2 g生药,故成人每天用量为0.308 7 g生药/kg,即大鼠等效剂量为1.544 g生药/kg(为成人用量的5倍)。尼莫地平片成人用量为每天6 mg/kg,即大鼠的等效剂量为30 mg/kg(为成人用量的5倍)。

将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平片 (30 mg/kg) 组和益气熄风胶囊 0.771 8、1.543 5、3.087 0、6.174 0 g/kg 组, 每个组再分为脑梗死率检测、病理学研究 2 个亚组。

2.2 给药与造模

取益气熄风胶囊细粉, 用生理盐水配制成 24.12、48.23、96.47、192.94 mg 细粉/mL 的混悬液, 于造模前 ig 给药, 1 次/d, 连续 7 d; 假手术组和模型组给予生理盐水, 给药体积均为 10 mL/kg。于第 7 天给药后 30 min 制造大脑中动脉闭塞 (MCAO) 模型^[1-2]: 将大鼠麻醉后仰卧位固定, 分离右侧颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA) 和颈内动脉 (ICA), 于分叉处结扎 ECA。沿 ICA 往内约 4 mm 处分离翼腭动脉, 于 ICA 近分叉处结扎; 在距颈外动脉和颈内动脉分叉 3 mm 处剪一小口, 将拴线插入颈外动脉, 经颈内动脉, 插入长度为 20 mm 左右。大脑中动脉阻断 3 h 后, 进行再灌注。假手术组仅在动脉处备线处理, 待给予生理盐水后去线即可。

2.3 脑梗死率检测

缺血再灌注后 24 h 麻醉大鼠, 断头取全脑, TTC 染色法测定脑梗死体积, 计算脑梗死率。

脑梗死率 = 梗死部分体积 / 全脑体积

2.4 脑指数和脑含水量

缺血再灌注 24 h 时称大鼠体质量后麻醉, 断头取脑, 称定湿质量, 计算脑指数, 该值可反映血脑屏障损伤情况。将脑组织于 80 °C 干燥箱中烘烤 48 h 至恒定质量, 精确称量干质量, 计算脑含水量。

脑指数 = 脑质量 / 大鼠体质量

脑含水量 = (湿质量 - 干质量) / 湿质量

2.5 神经行为学

各组大鼠在脑缺血再灌注后 3、24 h 参考 Longa^[1]和 Bederson^[3]5 分制法进行神经功能评分, 分值越高, 说明行为障碍越严重。评分标准见表 1。

表 1 神经功能缺失体征评分标准表
Table 1 Neurological deficit score criteria

症状	分值
无神经损伤症状	0 分
不能完全伸展左侧前爪	1 分
向左侧转圈	2 分
向左侧倾倒	3 分
不能自发行走, 意识丧失	4 分

2.6 脑组织病理学和 iNOS 蛋白表达 (免疫组化法)

取脑组织, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定。石蜡切片经过脱蜡、透明、梯度酒精依次脱水后, 用苏木素、伊红进行染色, 光镜下观察各组大鼠脑组织的病理形态, 病理评分分级标准为: 小灶性灰、白质细胞或间质轻度水肿, 小灶性细胞溶解; 灶性少许细胞增生 (增生细胞主要为胶质细胞); 脑实质内轻度血管周水肿; 轻度血管充血、出血; 轻度脑膜或室管膜水肿、充血、出血。符合其中 1 项者, 即判定为 “+”, 记 1 分; 多灶性灰、白质细胞或间质水肿, 细胞溶解; 脑实质内血管中度充血、出血; 中度血管周水肿; 脑膜或室管膜水肿、充血、出血较重。符合其中 1 项者, 即判定为 “++”, 记 2 分; 弥漫性灰、白质细胞或间质水肿, 大片细胞溶解; 脑实质内血管重度充血、出血、血管周水肿; 脑膜或室管膜水肿、充血、出血明显加重。符合其中 1 项者, 即判定为 “+++”, 记 3 分。

采用甲苯胺蓝尼氏染色法检测尼氏小体表达情况, 采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统观察脑组织尼氏小体数量; 采用免疫组化染色 SP 法测定 iNOS 蛋白的平均吸光度值, 观察大鼠脑组织 iNOS 蛋白表达情况。

2.7 统计方法

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用 SPSS 21.0 for windows 软件提供的单因素方差分析 (ONE-WAY ANOVA) 进行两组数据之间的均数差异的显著性检验。神经行为学采用 2 个独立样本的非参数检验中的 Mann-Whitney 检验法进行组间的差异性比较。

3 结果

3.1 脑梗死率

益气熄风胶囊 1.543 5、3.087 0 g/kg 对局灶性脑缺血再灌注引起大鼠脑梗死率增大有明显降低作用 ($P < 0.05$), 而益气熄风胶囊 0.771 8、6.174 0 g/kg 组大鼠脑梗死率无明显变化, 见表 2、图 1。

3.2 脑指数

益气熄风胶囊 0.771 8、1.543 5、3.087 0、6.174 0 g/kg 组大鼠脑指数均无明显变化, 表明局灶性脑缺血再灌注对大鼠脑指数无影响, 见表 2。

3.3 脑含水量

益气熄风胶囊 0.771 8、1.543 5、3.087 0、6.174 0 g/kg 组大鼠脑含水量无明显变化, 表明益气熄风胶囊对局灶性脑缺血再灌注引起的大鼠脑水肿无改善作用, 见表 2。

表 2 益气熄风胶囊对脑梗死率、脑指数和脑含水量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Yiqi Zhifeng Capsules on cerebral infarction rate, brain index, and brain water content ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	脑梗死率/%	脑指数/%	脑含水量/%
假手术	—	0.00±0.00	0.48±0.04	1.13±0.13
模型	—	11.10±6.78*	0.53±0.06	1.27±0.09*
尼莫地平	0.030	3.50±2.19 [#]	0.52±0.05	1.24±0.09
益气熄风胶囊	0.771 8	9.58±7.80	0.55±0.06	1.36±0.12
	1.543 5	3.15±2.51 [#]	0.50±0.05	1.22±0.10
	3.087 0	3.55±4.44 [#]	0.50±0.04	1.19±0.11
	6.174 0	7.90±7.01	0.51±0.09	1.28±0.16

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs Sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group

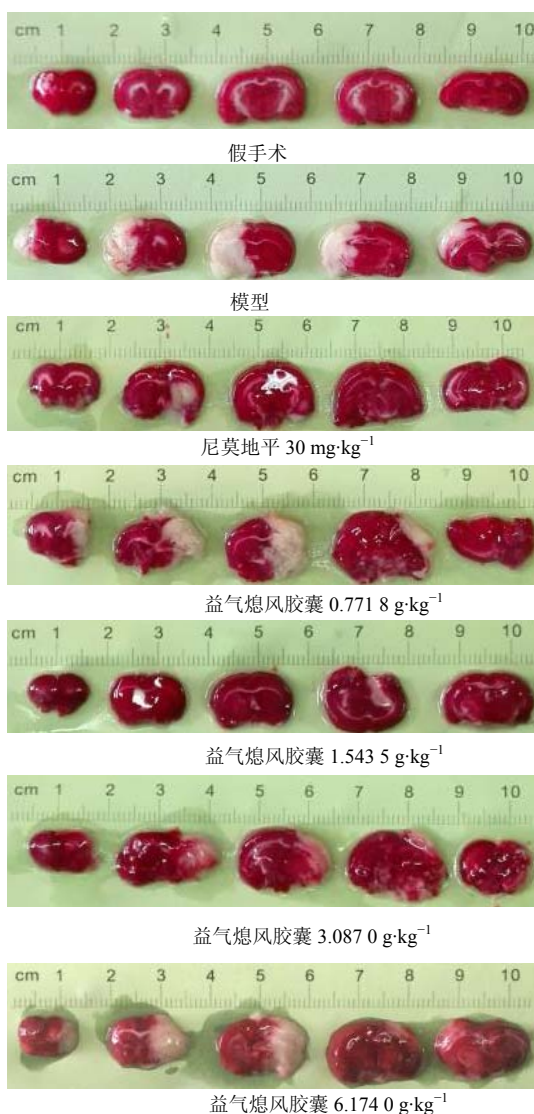


图 1 益气熄风胶囊对 MCAO 大鼠脑梗死形态的影响
Fig. 1 Effect of Yiqi Xifeng Capsule on morphology of cerebral infarction in MCAO rats

3.4 神经行为学

造模后 3 h, 益气熄风胶囊 0.771 8、3.087 0、6.174 0 g/kg 神经行为学评分明显增加 ($P < 0.05$ 、0.01), 对局灶性脑缺血再灌注而引起大鼠神经功能损伤症状有改善作用, 而益气熄风胶囊 1.543 5 g/kg 的作用不明显。造模后 24 h, 因局灶性脑缺血再灌注而引起的大鼠神经功能损伤症状出现恢复的迹象, 见表 3。

3.5 脑组织病理学

结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织出现不同程度的水肿, 神经细胞胞浆淡染, 透光度增强, 胞浆呈空泡状, 细胞核浓缩, 偶见有细胞核碎裂、溶解。大鼠脑组织的灰质病变、白质病变、脑膜、室管膜病变均明显加重。

与模型组比较, 尼莫地平 (30 mg/kg) 组、益气熄风胶囊 1.543 5 g/kg 组大鼠脑组织的灰质病变、白质病变、脑膜、室管膜病变均明显减轻 ($P < 0.05$ 、0.01)。表明益气熄风胶囊 1.543 5 g/kg 有改善大鼠因局灶性脑缺血再灌注而引起的脑组织灰质、白质、脑膜、室管膜病变加重的作用, 见表 4、图 2。

3.6 大鼠脑组织神经元尼氏小体数

与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织尼氏染色计数平均吸光度值显著减小 ($P < 0.01$), 提示大鼠局灶性脑缺血再灌注模型造模成功。

与模型组比较, 尼莫地平 (30 mg/kg) 和益气熄风胶囊 1.543 5 g/kg 对局灶性脑缺血再灌注引起大鼠脑组织尼氏染色计数平均吸光度值显著增加 ($P < 0.01$), 具有较好的改善作用, 见表 5、图 3。

表 3 益气熄风胶囊对 MCAO 大鼠神经行为学的影响 ($n=10$)Table 3 Effect of Yiqi Zhifeng Capsules on neurobehavior of MCAO rats ($n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	神经行为学评分/分											
		造模后 3 h						造模后 24 h					
		-	+	++	+++	++++	<i>P</i> 值	-	+	++	+++	++++	<i>P</i> 值
假手术	—	10	0	0	0	0	0.000 027	10	0	0	0	0	0.146 793
模型	—	0	2	8	0	0	1.000 0**	8	1	1	0	0	1.000 0
尼莫地平	0.030 0	3	4	3	0	0	0.018 34 [#]	9	1	0	0	0	0.503 216
益气熄风	0.771 8	2	5	3	0	0	0.021 802 [#]	7	2	0	1	0	0.653 773
胶囊	1.543 5	1	4	5	0	0	0.148 286	8	2	0	0	0	0.913 627
	3.087 0	4	4	2	0	0	0.005 098 ^{##}	8	0	2	0	0	0.913 627
	6.174 0	3	4	3	0	0	0.018 34 [#]	6	3	1	0	0	0.398 615

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 group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

表 4 益气熄风胶囊对 MCAO 大鼠脑组织病理变化的影响

Table 4 Effect of Yiqi Zhifeng Capsules on pathological changes of brain tissue in MCAO rats

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	<i>n</i> /只	灰质病变					白质病变					脑膜及室管膜病变				
			-	++	+++	++++	<i>P</i> 值	-	++	+++	++++	<i>P</i> 值	-	++	+++	++++	<i>P</i> 值
假手术	—	7	7	0	0	0	0.000 666	7	0	0	0	0.000 593	7	0	0	0	0.002 25
模型	—	7	0	4	3	0	1.000 0*	0	5	2	0	1.000 0**	1	5	1	0	1.000 0**
尼莫地平	0.030 0	8	7	1	0	0	0.001 154 [#]	5	3	0	0	0.008 489 ^{##}	6	2	0	0	0.019 861 [#]
益气熄风胶囊	1.543 5	8	7	0	1	0	0.005 097 ^{**}	6	1	1	0	0.015 418 [#]	7	1	0	0	0.006 17 ^{##}

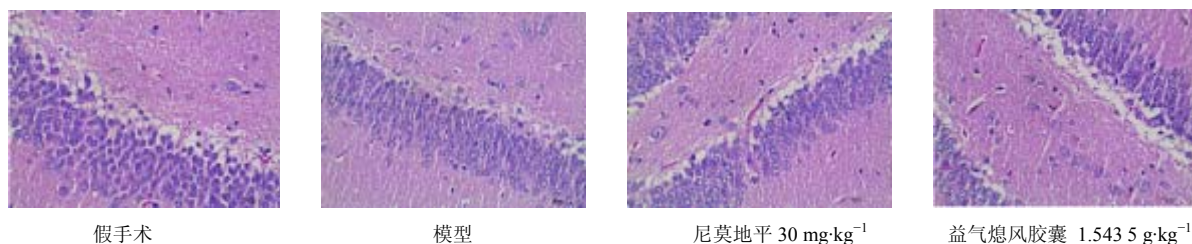
与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{**} $P<0.01$ vs Sham group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

图 2 益气熄风胶囊对 MCAO 大鼠脑组织病理变化的影响 (HE 染色)

Fig. 2 Effect of Yiqi Zhifeng Capsules on pathological changes of brain tissue in MCAO rats (HE staining)

表 5 益气熄风胶囊对 MCAO 大鼠脑组织尼氏小体染色平均吸光度值的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 5 Effect of Yiqi Zhifeng Capsules on the average absorption of Nissl body in brain tissue of MCAO rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i> /只	剂量/(g·kg ⁻¹)	吸光度值
假手术	7	—	123.71 ± 4.46
模型	7	—	84.29 ± 10.87**
尼莫地平	8	0.030 0	120.63 ± 7.37 ^{##}
益气熄风胶囊	8	1.543 5	119.13 ± 19.89 ^{##}

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ^{##} $P<0.01$ ^{**} $P<0.01$ vs Sham group; ^{##} $P<0.01$ vs model group

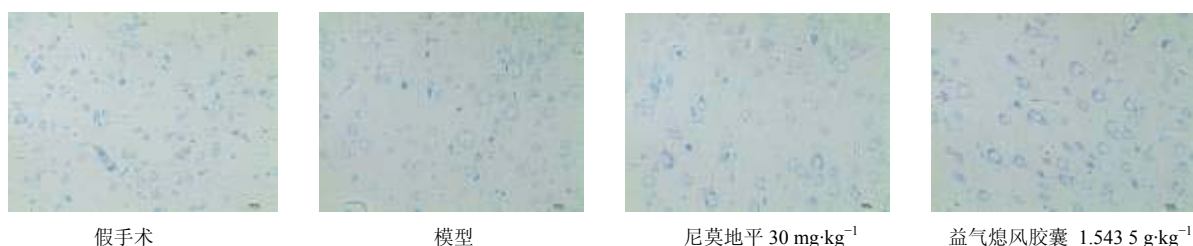


图 3 益气熄风胶囊对 MCAO 大鼠脑组织病理变化的影响 (尼氏染色)

Fig. 3 Effect of Yiqi Zhifeng Capsules on pathological changes of brain tissue in MCAO rats (Nissl's staining)

3.7 脑组织 iNOS 蛋白表达

与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织中 iNOS 蛋白表达量明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 益气熄风胶囊 1.543 5 g/kg 组大鼠脑组织中 iNOS 蛋

白表达水平有降低的趋势, 但是不具有统计学意义。表明益气熄风胶囊 1.543 5 g/kg 对局灶性脑缺血再灌注引起大鼠脑组织中 iNOS 蛋白表达量升高无明显抑制作用, 见图 4、表 6。

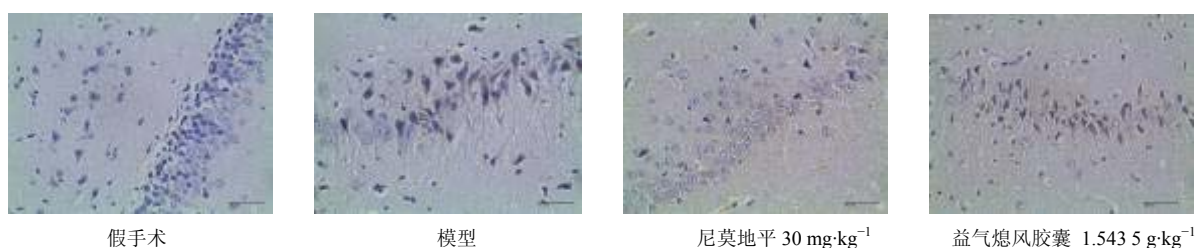


图 4 益气熄风胶囊对 MCAO 大鼠脑组织 iNOS 表达的影响 (免疫组化染色)

Fig. 4 Effect of Yiqi Zhifeng Capsules on iNOS expression in brain tissue of MCAO rats (IHC staining)

表 6 益气熄风胶囊对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 iNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Effect of Yiqi Zhifeng Capsules on iNOS expression in brain tissue of MCAO rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n/只	剂量/ (g·kg ⁻¹)	iNOS 蛋白表达量
假手术	7	—	0.200 6 ± 0.010 3
模型	7	—	0.217 7 ± 0.009 9**
尼莫地平	8	0.030 0	0.207 2 ± 0.010 0 [#]
益气熄风胶囊	8	1.543 5	0.208 3 ± 0.007 3

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

** $P < 0.01$ vs Sham group; [#] $P < 0.05$ vs model group

4 讨论

益气熄风胶囊由黄芪、天麻等数味药典收载药材经提取精制加工制得的胶囊剂, 具有纤溶、抗凝、溶栓、改善血流变、保护脑神经等作用, 能起到益气活血、熄风通络之功效, 用于治疗缺血性中风恢复期之气虚血瘀症, 症见半身不遂、口眼歪斜、言语不利、偏身麻木、口角流涎、气短、乏力、出汗。通过相关药效试验研究表明: 益气熄风胶囊在抗脑缺血, 抑制血小板的聚集和黏附, 抗血栓等方面具

有明确的药理活性, 可为本品临床治疗缺血性脑中风恢复期相关病症提供试验依据。

本研究共设置益气熄风胶囊 0.771 8、1.543 5、3.087 0、6.174 0 g/kg 4 个剂量组, 通过建立局灶性脑缺血再灌注模型大鼠来探索益气熄风胶囊治疗缺血性脑中风最佳治疗剂量, 结果表明益气熄风胶囊对因局灶性脑缺血再灌注而引起大鼠神经功能损伤及脑梗死面积增大均有保护作用, 其中益气熄风胶囊 1.543 5、3.087 0 g/kg 治疗效果显著, 可初步视为有效剂量, 而 0.771 8、6.174 0 g/kg 的作用相对不明显。有效剂量的探索不仅可为临床用药提供参考, 也为进一步深入开展益气熄风胶囊提供依据。

脑缺血再灌注损伤最明显的变化是神经元损伤和脑水肿, 尼氏小体是在于神经细胞中的嗜碱性的颗粒群, 分散在神经胞质的内部, 是神经细胞功能活性的形态指标。轴突的切断、过分的刺激、高龄会导致尼氏小体逐渐地消失^[4], 致使神经细胞功能活性受损。已有研究表明, 尼氏小体是对缺血、缺氧损害敏感的细胞器^[5]。脑组织的白质、灰质分别存在于大脑内部 神经纤维及细胞体聚集的地方, 神经细胞的损伤会引起脑白质和灰质病变。因此本课

题通过脑组织病理学研究大鼠脑组织的灰质病变、白质病变、脑膜、室管膜病变情况及大鼠脑组织神经元尼氏小体数量、免疫组化法观察大鼠脑组织中iNOS蛋白表达,对益气熄风胶囊作用机制进行探索。研究结果显示,益气熄风胶囊对造模后大鼠脑组织神经细胞受到损伤且白质、灰质脑膜及室管膜均发生明显病变和尼氏小体数目明显减少均有改善作用,表明益气熄风胶囊对脑缺血后神经元的损伤有保护作用,其作用机制可能与神经细胞凋亡有关。

从大鼠脑组织iNOS蛋白表达研究中,造模后模型组大鼠脑组织iNOS平均吸光度值增大,而iNOS的一氧化氮合酶有神经毒性作用,是在细胞受到刺激而被激活后才发挥功效。脑缺血再灌注后iNOS被激活,导致NO大量的产生。NO具有神经毒性作用,能引起神经细胞损伤或死亡。NO的作用与自由基密切相关,并可互相转化,并且导致大鼠脊髓损伤^[6]。在本课题研究结果显示,与模型组比较,益气熄风胶囊 1.543 5 g/kg组大鼠脑组织中iNOS平均吸光度值无显著差异。但模型组大鼠脑组织中iNOS平均吸光度值为 $0.217 7 \pm 0.009 9$,而益气熄风胶囊 1.543 5 g/kg组脑组织中iNOS平均吸光度值为 $0.208 3 \pm 0.007 3$ 。表明益气熄风胶囊确实能够降低脑缺血后大鼠脑组织中iNOS蛋白的表达,与模型组比较,

大鼠脑组织中iNOS平均吸光度值无显著差异,也说明进一步深入研究益气熄风胶囊量时效关系探索最佳用药剂量和用药周期是十分必要的。

参考文献

- [1] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [2] 王 张, 张 艺, 赵启鹏, 等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型的动态变化 [J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(3): 116-120.
- [3] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [4] Wasilewska B, Najdzion J, Sztayn S. The neuronal structure of the globus pallidus in the rabbit-Nissl and Golgi studies [J]. *Folia Morphol (Warsz)*, 2002, 61(4): 251-256.
- [5] 陈胜利, 李长清, 胡长林, 等. 高压氧治疗对实验性大鼠脑梗死后皮层神经元内尼氏小体的影响 [J]. *重庆医学*, 2007, 36(13): 1249-1250.
- [6] Mohammadi M T, Shid-Moosavi S M, Dehghani G A. Contribution of nitric oxide synthase (NOS) in blood-brain barrier disruption during acute focal cerebral ischemia in normal rat [J]. *Pathophysiology*, 2012, 19(1): 13-20.