

重要^[9]。III-C 分布于肺间质, IV-C 分布于基底膜和肺间质。而胶原蛋白是由 3 条不同或相同的肽链构成的三螺旋结构, 富含脯氨酸、羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸, 因此测定肺组织羟脯氨酸含量可以反映肺组织胶原蛋白及细胞外基质的含量^[10]。HA 是间质中的一种主要的糖胺聚糖, 也是细胞外基质的一种主要成分。肺泡间质中 HA 积累提示 HA 很可能在肺纤维化早期肺炎阶段的肺间质水肿中起重要作用。也有人认为早期的 HA 积聚是增生的炎性细胞和成纤维细胞必需的基质, 因而有助于纤维组织的形成^[11]。实验研究表明在应用博来霉素后肺内间质性胶原的含量是增高的, 肺纤维化大鼠血清中 III-C, IV-C, LN, HA 明显升高, 说明肺内细胞外基质的合成明显增加, 而且还有炎症存在。肺纤维化大鼠给予复方鳖甲片后细胞外基质各成分的含量可明显降低, 中、低剂量效果较为明显, 这可能是因为高剂量的药物 ig 时吸收度不好而不能发挥较好的疗效。本研究提示复方鳖甲片通过影响细胞外基质的合成起到治疗肺纤维化的作用。

References

- [1] Donald N C, David M B. A matrix for new ideas in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27 (2): 122-124.
- [2] Piguet P F. Inflammation in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(7): 1037.
- [3] Chen B Y, Jiang L, Hou X M. Lipid peroxidation precedes TNF and PDGF release in alveolar macrophage of the experimental pulmonary fibrosis rats [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2000, 16(11): 1228-1230.
- [4] Yang Z H, Zhu M X, Gong Y F, et al. Study on the application of the method of determination of hydroxyproline in rat lung [J]. *Bull Acad Mil Med Sci* (军事医学科学院院刊), 1995, 19(1): 27-29.
- [5] Wang B Y, Li Y S, Huang G S, et al. *The Technology of Pathology* (病理学技术) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000.
- [6] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120(4): 893-899.
- [7] Zhang D W, Wang J F, Niu J Z, et al. Experimental study on effects of compound Biejia formula on HRCT images in the rat model of pulmonary fibrosis [J]. *J Beijing Univ Tradit Chin Med* (北京中医药大学学报), 2003, 26(5): 26-30.
- [8] Pardo A, Barrios R, Maldonado V, et al. Gelatinases A and B are up-regulated in rat lungs by subacute hyperoxia: pathogenetic implications [J]. *Am J Pathol*, 1998, 153(3): 833-844.
- [9] Michael P K, John A B, Douglas A, et al. IFN- γ -inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis [J]. *J Immunol*, 1999, 163 (10): 5686-5692.
- [10] Miman N, Kristensen M S, Bentsen K. Hyaluronan and procollagen type III aminoterminal peptide in serum and broncho-alveolar lavage fluid from patients with pulmonary fibrosis [J]. *APMIS*, 1995, 103(10): 749-754.
- [11] Bjardahlen A, Onnervik P O, Westergren G, et al. Myofibroblast accumulation correlates with the formation of fibrotic tissue in a rat air pouch model [J]. *J Rheumatol*, 2002, 29 (8): 1698-1707.
- [1] Donald N C, David M B. A matrix for new ideas in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 27

御风胶囊对脑缺血-再灌注损伤大鼠的预防性神经保护作用

赵 瑛, 张 季, 金 成*

(哈尔滨商业大学, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: 目的 探讨御风胶囊对脑缺血-再灌注损伤的神经保护作用及其机制。方法 实验分为模型组、假手术组、御风胶囊高、低剂量组和阳性药对照组。线栓法制备大鼠脑缺血-再灌注模型, 分别观察脑缺血 2 h 再灌注 1 h 及 24 h 神经细胞凋亡、凋亡相关基因 p53、bcl-2、C-fos 表达及脑组织丙二醛 (MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性变化。结果 御风胶囊能显著抑制脑缺血-再灌注所致的神经细胞凋亡、抑制脑缺血-再灌注后 p53 的表达并诱导 bcl-2 表达, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$); 显著抑制脑缺血-再灌注后 MDA 的产生, 提高 SOD 活性 ($P < 0.05$); 并对 CAT 活性呈现一定的保护作用。结论 御风胶囊对缺血-再灌注脑组织具有一定的神经保护作用, 其机制与其抑制脑缺血-再灌注后神经细胞凋亡, 调节凋亡相关基因表达及抗脂质过氧化有关。

关键词: 御风胶囊; 缺血-再灌注; 脑; 凋亡; 凋亡相关基因; 脂质过氧化

中图分类号: R 286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)05-0548-04

Neural protection of Yufeng Capsule on cerebral ischemia-reperfusion damage in rats

ZHAO Ying, ZHANG Ji, JIN Cheng

(Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Key words: Yufeng Capsule; ischemia-reperfusion; cerebrum; apoptosis; related gene of apoptosis; lipid peroxidation

收稿日期: 2003-09-05

作者简介: 赵 瑛(1960—), 女, 吉林怀德人, 现为哈尔滨商业大学药学院教授, 医学博士, 主要研究方向为中医药防治心脑血管疾病。

Tel: (0451) 82195000

御风胶囊是由黄芪、丹参、天麻等药物组成的中药复方制剂,具有益气活血,祛痰通络之功效,临床用于中风先兆的治疗。已有研究表明,御风胶囊能降低缺血-再灌注大鼠脑组织含水量,保护脑ATP酶活性^[1]。为进一步探讨御风胶囊神经保护作用及其机制,本实验以脑神经细胞凋亡为指标,探讨御风胶囊的神经保护作用;并以凋亡相关基因p53, bcl-2, C-fos表达及脑组织MDA含量, SOD, CAT活性等为指标,探讨其神经保护作用机制。

1 材料

1.1 药物:御风胶囊,黑龙江中医药大学附属二院制剂室提供,每粒0.4 g(含生药1.32 g,黄芪甲苷含量 ≥ 0.06 mg);尼莫地平,天津市中央制药厂生产,批号970402。

1.2 动物:雄性Wistar大鼠,体重250~300 g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供。

1.3 主要试剂:C-fos, p53, bcl-2免疫组化染色试剂盒,购自北方中山生物技术有限公司,均为美国Zymeo公司产品;SOD, CAT, MDA测定试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所。

1.4 主要仪器:轮转切片机,美国AO公司;Olympus电光源摄影显微镜,日本;连续变倍体视显微镜,北京泰克仪器有限公司。

2 方法

2.1 动物模型制备:Wistar大鼠,体重250~300 g,采用线栓法^[2]建立大鼠脑缺血-再灌注损伤模型。线栓插入深度17~18 mm。抽出线栓,形成再灌注。手术结束后监测脑电图,动物麻醉清醒后,检测缺血对侧肢体抵抗力,如缺血侧脑电呈明显抑制状态并出现肢体抵抗力降低或绕圈行走或行走时向一侧倾倒,则表明模型制备成功。

2.2 分组及给药:Wistar大鼠,体重250~300 g,随机分为:模型组,假手术组,御风胶囊高、低剂量组和阳性药对照组,每组7只。造模后模型组、御风胶囊高、低剂量组和阳性药对照组又分两个时间窗处理,即缺血2 h再灌注1 h和缺血2 h再灌注24 h。各给药组按不同给药剂量每日ig 1次,连续7 d;假手术组和模型组ig同体积生理盐水。末次ig后1 h,按2.1项方法造成脑缺血-再灌注损伤模型,观察御风胶囊对脑神经细胞凋亡、凋亡相关基因表达、脑组织MDA含量、SOD、CAT活性的影响。

2.3 脑神经细胞凋亡检测:采用原位末端标记技术检测脑神经细胞凋亡。按2.1项方法制备脑缺血-再灌注损伤模型,分别于缺血2 h再灌注1 h和缺血

2 h再灌注24 h后,开胸暴露心脏,自心脏至升主动脉灌注预冷的4%多聚甲醛,开颅取脑,取病变脑组织,立即放入4%多聚甲醛中固定24 h后取出,石蜡切片厚5 μ m,裱于用防脱片剂处理过的载玻片上,45 $^{\circ}$ C温箱内烤片24 h。切片常规脱蜡至水。原位末端标记染色按试剂盒说明书进行。成色反应后常规脱水、二甲苯透明、封片。光镜下观察。结果判断:细胞核染成棕色的为凋亡阳性细胞。根据凋亡阳性细胞的有无、多少及染色的深浅分4级:无凋亡阳性细胞(-);有少量凋亡阳性细胞,染色较浅(+);有较多凋亡阳性细胞,且染色较深(++);神经细胞大量凋亡,细胞核染成深棕色(+++)。

2.4 脑组织C-fos, p53, bcl-2基因表达检测:采用免疫组织化学方法检测。按2.3项方法取材、固定、制片。免疫组化染色按试剂盒说明书进行。每批染色均设阴性对照(以PBS液代替第一抗体)和阳性对照。光镜下分析实验结果。结果判断:细胞浆内有棕色颗粒者为阳性细胞。根据细胞内棕色颗粒的多少和染色深浅分为:阴性(-);弱阳性(+);阳性(++);强阳性(+++)。

2.5 脑组织MDA含量、SOD、CAT活性测定:按2.1项方法制备脑缺血-再灌注损伤模型,分别于缺血2 h再灌注1 h和缺血2 h再灌注24 h后断头处死大鼠,冰浴下取左脑,用预冷生理盐水冲表面,吸干水份,置液氮保存。于测定前取出,加入冷生理盐水冰浴制备脑组织匀浆。脑组织MDA含量采用比色法测定。SOD活性采用黄嘌呤氧化酶法测定。CAT活性测定采用分光光度法。

2.6 脑组织蛋白含量测定:采用Lowry法测定,以小牛血清蛋白为标准蛋白。

2.7 统计分析:计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验;等级资料采用 H 检验。

3 结果

3.1 对脑缺血-再灌注后细胞凋亡的影响:假手术组脑神经细胞,形态规则,密度均匀,未见凋亡细胞(-);脑缺血再灌注1 h,模型组可见部分细胞凋亡(+++)或(+),与假手术组比较,差异显著($P < 0.05$);御风胶囊组和尼莫地平组亦见少量凋亡细胞(+),与模型组比较,差异不显著;脑缺血再灌注24 h,模型组可见大量凋亡细胞,细胞核染成深棕色(+++);御风胶囊组仅见少量凋亡细胞,而且染色较浅(+);与模型组比较差异显著($P < 0.05$);尼莫地平组也可见部分凋亡细胞(+)或(++),但染色较浅;与模型组比较差异显著($P < 0.05$)。

3.2 对缺血-再灌注脑组织凋亡相关基因 p53、bcl-2 及 C-fos 表达的影响: 结果显示, 假手术组脑组织 p53、C-fos 蛋白呈弱阳性 (+) 表达, 染色较浅, 胞浆染成浅棕色; 脑缺血再灌注 1 h: 模型组 p53 呈阳性 (++) 表达, C-fos 蛋白呈强阳性 (+++) 表达, 胞浆内深棕色颗粒, 与假手术组比较差异显著 ($P < 0.05$); 御风胶囊和尼莫地平对再灌注 1 h C-fos 表达无明显影响, 可轻度抑制 p53 表达, 与模型组比较差异不显著 ($P > 0.05$)。脑缺血-再灌注 24 h: 模型组 p53、C-fos 蛋白均呈强阳性 (+++) 表达, 与假手术组比较差异显著 ($P < 0.05$); 御风胶囊和尼莫地平组 p53 蛋白呈阳性 (++) 或弱阳性 (+) 表达, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$); 御风胶囊和尼莫地平对 C-fos 蛋白的表达无明显影响。假手术组脑组织无 bcl-2 蛋白表达; 脑缺血-再灌注 1 h: 模型组 bcl-2 呈阴性 (-) 或弱阳性 (+) 表达, 与假手术组比较差异不显著 ($P > 0.05$); 御风胶囊和尼莫地平对其无明显影响。脑缺血再灌注 24 h: 模型组 bcl-2 蛋白呈弱阳性 (+) 或阴性 (-) 表达, 但与假手术组比较差异不显著 ($P > 0.05$); 御风胶囊组呈阳性 (++) 表达, 与假手术组比较差异显著 ($P < 0.05$)。

表 1 御风胶囊对缺血-再灌注大鼠脑组织 MDA 含量、SOD 及 CAT 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 1 Effects of Yufeng Capsule on MDA content, activity of SOD and CAT in brain tissue of rat with cerebral ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

组别	再灌注时间/h	剂量/(g · kg ⁻¹)	MDA 含量/(nmol · mL ⁻¹)	SOD 活性/(U · mg ⁻¹)	CAT 活性/(U · mg ⁻¹)
假手术	-	-	283.0 ± 55.4	78.2 ± 11.1	10.49 ± 2.19
模型	1	-	371.9 ± 78.4*	63.2 ± 14.3*	5.50 ± 1.56***
	24	-	389.5 ± 71.8**	67.9 ± 12.0	7.15 ± 2.44**
御风胶囊	1	0.31	316.0 ± 99.7	72.5 ± 13.6	7.07 ± 1.10**△
	1	1.24	289.8 ± 75.9△	86.3 ± 10.9△	6.98 ± 2.05*
	24	0.31	301.8 ± 69.6	79.4 ± 12.7	7.82 ± 2.25*
	24	1.24	291.9 ± 66.7△	81.8 ± 11.5△	8.11 ± 1.84
尼莫地平	1	0.0095	347.4 ± 85.9	78.5 ± 14.1	8.24 ± 1.76△
	24	0.0095	327.6 ± 70.7	69.7 ± 11.9	7.65 ± 2.42

与假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: △ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs Sham group; △ $P < 0.05$ vs model group

死灶的转化。因此, 对凋亡机制的干预可能成为缺血性脑血管病防治的新途径^[4]。本研究表明御风胶囊对脑缺血-再灌注所致细胞凋亡有明显抑制作用。结果提示, 御风胶囊可能通过阻止缺血-再灌注后脑细胞的凋亡, 保护缺血半暗带, 以利于其向正常组织转化。

有关脑缺血再灌注时神经细胞凋亡的确切机制, 目前还不十分清楚。有研究表明, 细胞凋亡受一系列基因控制。其中 p53 基因、C-fos 基因的过度表达与脑缺血再灌注后神经细胞凋亡有密切关系^[5,6]。

3.3 对脑组织 MDA 含量、SOD 及 CAT 活性的影响: 见表 1。脑缺血-再灌注后脑组织 MDA 含量较假手术组明显增加 ($P < 0.05, 0.01$); SOD 活性明显下降, 其中再灌注后 1 h 组间比较差异显著 ($P < 0.05$)。CAT 活性明显降低, 再灌注 1, 24 h, 组间比较差异均显著 ($P < 0.01, 0.001$)。御风胶囊高剂量能明显降低缺血-再灌注脑组织 MDA 含量 ($P < 0.05$)、提高 SOD 活性 ($P < 0.05$); 御风胶囊低剂量及尼莫地平对再灌注后 1 h CAT 活性有一定保护作用, 与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$), 但御风胶囊组 CAT 活性仍明显低于假手术组 ($P < 0.05$)。

4 讨论

临床缺血性脑血管疾病 60% 以上是由于大脑中动脉 (MCA) 闭塞所致, 因此, 选择恰当的大脑中动脉闭塞 (MCAO) 动物模型, 是系统研究局灶性脑缺血病理生理机制和防治措施的基本条件。制作 MCAO 动物模型方法很多^[3], 本研究采用大鼠线栓法制作 MCAO 模型。研究结果进一步证实, 该造模方法重复性好, 成功率高, 梗塞部位恒定。

细胞凋亡与脑缺血-再灌注损伤的关系备受关注。有研究表明, 缺血半暗带区神经元的选择性缺失与凋亡有关, 亦即细胞凋亡参与了缺血半暗带向梗

死灶的转化。有研究表明 p53 在凋亡连锁反应中是第一位的决定因素。而 bcl-2 基因是脑缺血后能抑制神经原凋亡的基因之一。bcl-2 基因及其蛋白质可以抑制多种细胞凋亡以及多种因素如自由基和膜过氧化物等诱发的神经细胞坏死^[7,8]。本研究亦发现, 假手术组脑 p53、C-fos 呈弱表达, bcl-2 基因表达呈阴性。缺血 2 h 再灌注 1 h, p53 呈阳性表达, C-fos 呈强阳性表达; 再灌注 24 h, p53 和 C-fos 均呈强阳性表达, 与文献报道一致。御风胶囊能抑制脑缺血再灌注后 p53 的表达并诱导 bcl-2 基因表达。这一结果提示,

该药可能通过调节脑缺血-再灌注后凋亡相关基因的表达而抑制凋亡过程。本研究结果显示, 缺血再灌注 1 h 和 24 h, 脑组织 MDA 含量均明显增加。御风胶囊能显著抑制 MDA 的产生。说明本药可通过某种机制抑制 MDA 产生或加速其清除。研究结果还显示缺血-再灌注脑组织 SOD、CAT 活性明显降低。说明缺血-再灌注后机体清除自由基的酶防御系统功能大大减弱。这将使由自由基引发的脂质过氧化损伤进一步加重。御风胶囊可显著提高缺血再灌注后脑 SOD 活性, 并对 CAT 活性呈现一定的保护作用。说明御风胶囊抑制 MDA 的产生可能是通过这一作用实现的。另外, 已有报道, 黄酮类、酚类化合物有抗氧化作用, 御风胶囊组成药物中所含有的黄酮类、酚类成分是否通过非酶防御系统参与其抗氧化作用还有待进一步研究。总之, 御风胶囊可通过干预脑缺血-再灌注病理生理过程的多个环节而实现其脑保护作用。

References

- [1] Zhao Y, Sun Z R, Wang W. Study on the protection of Yufeng Capsule on activity of ATPase in brain tissue of rat with ischemia-reperfusion [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 24(8): 609-611.
- [2] Liu K D, Su Z Q, Li Y P, *et al*. Improvement on the experimental animal model of focal cerebral ischemia-reperfusion and its evaluation [J]. *J Apoplexy Nerv Dis* (中风与神经疾病杂志), 1997, 14(2): 87-89.
- [3] Shao S Q, Lin J, Zheng C M. Progress of making on ischemic model of middle cerebral artery [J]. *J Apoplexy Nerv Dis* (中风与神经疾病杂志), 1995, 12(3): 185-188.
- [4] Wei G, Zhang J T. Ischemic brain injury and programmed cell death [J]. *Prog Physiol Sci* (生理科学进展), 1998, 29(1): 45-48.
- [5] Grumrina R C, Thomas A L, Morgan P F. Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1994, 14(6): 887-891.
- [6] Nowak T S J, Ikeda J, Nakjima T. 70kDa heat shock protein and C-fos gene expression after transient ischemia [J]. *Stroke*, 1990, 21(11 Suppl): 107-111.
- [7] Linik M D, Zahos P, Geschwind M D, *et al*. Expression of bcl-2 from a defective herpes complex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 1995, 26(9): 1670.
- [8] Martinou J, Dubois-dauphin M, Staple J, *et al*. Overexpression of bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring death and experimental ischemia [J]. *Neuron*, 1994, 13(4): 1017.

苦参醇提取液镇静催眠作用的实验研究

王绪平^{1,2}, 陈庆梅¹, 郑筱祥^{1*}

(1. 浙江大学 生物医学工程学系, 浙江 杭州 310027; 2. 浙江省中医药研究院, 浙江 杭州 310007)

苦参为豆科多年生落叶亚灌木植物苦参 *Sophora flavescens* Ait 的根, 性味苦寒, 归心、肝、脾、肾、大肠、小肠诸经。具有清热燥湿除烦之功效。其主要有效成分为苦参碱、氧化苦参碱等, 研究表明苦参碱有类似安定等作用^[1]。本实验采用抖笼换能器法、翻正反射法、海马脑片技术等观察苦参的镇静催眠作用, 为扩大苦参的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物: 健康 ICR 小鼠 (18±2) g, SD 大鼠 (200±20) g, 雌雄兼用, 由浙江省中医药研究院动物房提供, 浙动字医第 22-9601009 号。

1.2 药品与试剂: 苦参醇提取液 (含 0.4% 苦参碱) 由浙江省中医药研究院中药所提供; 苦参碱 (纯度>95%) 为中国药品生物制品检定所产品, 批

号 0805-200005; 戊巴比妥钠由佛山市化工实验厂出品, 批号 860901; 复方枣仁胶囊由北京伏尔特药业有限公司出品, 批号 20020509; 青霉素钠由江西东风药业股份有限公司出品, 批号 030504-3。

2 方法

2.1 苦参醇提取液对正常小鼠自主活动的影响: 雄性小鼠 40 只, 随机分 4 组, 每组 10 只, 空白组, 苦参醇提取液高、低剂量 (5, 2.5 g 生药/kg) 组, 复方枣仁胶囊组 (0.2 g/kg)。各组动物均按 0.5 mL/20 g ig 给药, 给药 30 min 后采用抖笼换能器法记录小鼠活动, 记录小鼠总活动强度 ($A_{\text{test}}/A_{\text{base}} \times 100\%$), 每只小鼠开始实验时, 先进笼适应 2 min, 随后记录 20 s 曲线作为基线 (A_{base}), 以后的每次实验记录段均为 20 s。记录各组小鼠的活动强度

* 收稿日期: 2003-09-18

作者简介: 王绪平 (1972—), 女, 浙江省杭州市人, 助理研究员, 浙江大学 2001 级硕士生, 浙江省心脑血管和神经系统药物评价与中药开发研究重点实验室成员, 主要研究方向为中药药理。Tel: (0571) 88082214 E-mail: wxp@hz.cn