

• 药理与临床 •

5种中药复方对局灶性脑缺血大鼠的影响及作用机制比较

朱青^{1,2}, 张启春^{1,2}, 赵越^{1,2}, 殷书梅³, 文红梅¹, 卞慧敏^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046

2. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏 南京 210046

3. 江苏南星药业有限责任公司, 江苏 南京 210029

摘要: **目的** 比较通塞脉片、通心络胶囊、步长脑心通胶囊、复方血栓通胶囊、血塞通胶囊对局灶性脑缺血大鼠模型治疗作用的差异。**方法** 采用大脑中动脉电凝法建立大鼠局灶性脑缺血模型, 每天2次ig给予通塞脉片(0.239 g/kg)、通心络胶囊(0.281 g/kg)、步长脑心通胶囊(0.432 g/kg)、复方血栓通胶囊(0.405 g/kg)、血塞通胶囊(0.027 g/kg)治疗, 连续给药3 d, 观察5种药物对脑缺血大鼠行为学评分、脑梗死面积、血浆中血管紧张素I、II(AngI、AngII)及血清中C反应蛋白(CRP)及脑组织中核因子- κ B(NF- κ B)表达的影响。**结果** 5种中成药均可降低模型大鼠脑梗死面积, 抑制NF- κ B的表达, 其中血塞通胶囊组大鼠行为学评分显著降低, 通塞脉片组、通心络胶囊组、步长脑心通胶囊组和复方血栓通胶囊组大鼠血清IL-6的量显著降低, 血塞通胶囊和步长脑心通胶囊组CRP的量显著降低, 通塞脉片组大鼠血浆AngII的量显著降低($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** 5种中成药均可不同程度地抑制炎症因子的释放, 降低模型大鼠NF- κ B的表达, 从而改善脑缺血, 另外通塞脉片还能通过降低AngII水平缓解缺血症状。

关键词: 通塞脉片; 通心络胶囊; 步长脑心通胶囊; 复方血栓通胶囊; 血塞通胶囊; 脑缺血

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1149-05

Effects of five Chinese patent medicines on focal cerebral ischemia of rats and comparison on their mechanisms

ZHU Qing^{1,2}, ZHANG Qi-chun^{1,2}, ZHAO Yue^{1,2}, YIN Shu-mei³, WEN Hong-mei¹, BIAN Hui-min^{1,2}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210046, China

3. Jiangsu Nanxing Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210029, China

Abstract: **Objective** To compare the difference of therapeutical effect with Tongsaimai Tablet, Tongxinluo Capsula, Buchang Naointong Capsula, Fufang Xueshuantong Capsula and Xuesaitong Capsula on focal cerebral ischemia of rats. **Methods** The focal cerebral ischemia of rats was made by electric coagulation with middle cerebral artery (MCA). The score of ethology, the area of cerebral infarction, AngI, AngII in plasma, C-reactive protein (CRP) in serum, and NF- κ B expression were examined to observe the effect of these five Chinese patent medicines by ig administration of Tongsaimai Tablet (0.239 g/kg), Tongxinluo Capsula (0.281 g/kg), Buchang Naointong Capsula (0.432 g/kg), Fufang Xueshuantong Capsula (0.405 g/kg), and Xuesaitong Capsula (0.027 g/kg) twice a day for 3 d. **Results** Every group of the five Chinese patent medicines could significantly reduce the area of cerebral infarction and the expression of NF- κ B. The score of ethology was more lower with Xuesaitong Capsula. The content of IL-6 in plasma was cut down greatly by Tongxinluo Capsula, Buchang Naointong Capsula, Xuesaitong Capsula, and Tongsaimai Tablet. The content of CRP in serum was reduced with Xuesaitong Capsula and Buchang Naointong Capsula. The content of AngII in plasma was degraded by Tongsaimai Tablet ($P<0.05$, 0.01). **Conclusion** Every Chinese patent medicine can inhibit the release of inflammatory factor at varying degrees. These five Chinese patent medicines can degrade the expression of NF- κ B so as to ameliorate cerebral ischemia, and Tongsaimai Tablet can cut down the content of AngII in plasma to lessen the symptom of cerebral ischemia.

Key words: Tongsaimai Tablet; Tongxinluo Capsula; Buchang Naointong Capsula; Fufang Xueshuantong Capsula; Xuesaitong Capsula; focal cerebral ischemia

收稿日期: 2010-09-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30873401)

作者简介: 朱青(1985—), 女, 江苏南通人, 硕士研究生, 主要从事中药心血管药理研究。E-mail: shiyuejuliang@126.com

*通讯作者 卞慧敏 Tel: (025)86798398 E-mail: huiminbian@sina.com

用于治疗心脑血管疾病的中成药作用缓和、不良反应少、适宜长期服用,因此日益受到人们的青睐。目前临床常用的抗脑缺血的中成药主要有通塞脉片、通心络胶囊、步长脑心通胶囊、复方血栓通胶囊、血塞通胶囊等^[1-3]。但有关这几种药物的疗效和作用机制差别的研究未见报道。因此,本实验对这5种中成药的抗脑缺血作用进行了比较研究,并探讨了作用机制,为临床选择用药提供依据。

1 材料

1.1 动物

SD大鼠,清洁级,雄性,体质量200~350 g,由上海斯莱克动物有限公司提供,实验动物许可证:SCXY(沪)2007-0005,实验动物使用许可证:SYXK(苏)2007-0030。

1.2 药物及试剂

尼莫地平,亚宝药业集团股份有限公司生产,批号090712;通塞脉片,江苏南星药业有限责任公司提供,批号090701;通心络胶囊,石家庄以岭药业有限公司产品,批号090818;步长脑心通胶囊,咸阳步长制药有限公司生产,批号090718;复方血栓通胶囊,广东众生药业股份有限公司生产,批号090721;血塞通胶囊,云南省玉溪市维和制药有限公司,批号20081051。血浆血管紧张素I(AngI)、血管紧张素II(AngII)放免试剂盒、白细胞介素-6(IL-6)放免试剂盒,北京华英生物技术研究所产品;C-反应蛋白(CRP)免疫放射试剂盒,北京华英生物技术研究所产品;核因子- κ B(NF- κ B)免疫组化所用的一抗、二抗均购自北京博奥森技术有限公司。

1.3 仪器

电热恒温水箱,北京东霞科学仪器厂;1411治疗仪,上海医疗器械高技术公司。

2 方法

2.1 大鼠局灶性脑缺血模型的制备

采用大脑中动脉电凝法制备大鼠局灶性脑缺血模型,参照Lundy等^[4]的方法略做改动。用10%水合氯醛(3 mL/kg)将大鼠麻醉后,侧卧位固定,暴露大脑中动脉,用双极电凝器烧灼,制备模型。

2.2 分组与给药

将大鼠随机分为8组,即假手术组(等容积水)、模型组(等容积水)、尼莫地平(0.022 g/kg)组、通塞脉片(0.239 g/kg)组、通心络(0.281 g/kg)组、步长脑心通胶囊(0.432 g/kg)组、复方血栓通胶囊

(0.405 g/kg)组、血塞通胶囊(0.027 g/kg)组,各药物剂量均相当于人临床用药剂量。除模型组为11只大鼠外,其他组均为10只。分别于脑缺血手术后ig给药,每日2次,连续给药3 d。

2.3 检测指标

2.3.1 神经功能缺损评分 参考Bederson等^[5]的方法,在手术后4、72 h对动物进行行为学评分,计算均值,等级分数越高,表明动物的行为缺陷越严重。分级标准:0级,动物提尾悬空时,两前肢均伸向地板方向且无其他行为缺陷;1级,动物提尾悬空时,手术对侧前肢表现为腕肘屈曲、肩内旋、肘外展、紧贴胸壁;2级,将动物置于光滑地面上,推手术侧肩向对侧移动时阻力降低;3级,动物自由行走时,向手术对侧环转或转圈。

2.3.2 脑梗死面积测定 大鼠术后72 h,水合氯醛麻醉,颈总动脉取血,断头取脑,参考Lundy等^[4]的方法,脑切片TTC染色,拍照,根据质量求面积法,求出梗死区面积占半球面积的百分比,即为梗死率。

2.3.3 AngI、AngII、IL-6、CRP检测 术后72 h颈总动脉取血1 mL,注入含有10 μ L 0.3 mol/L EDTA- Na_2 、10 μ L 0.34 mol/L 8-羟基喹啉、5 μ L 0.32 mol/L 二巯基喹啉的冰冷的抗凝管中,放射免疫法检测血浆中AngI、AngII水平。另一部分血液制备血清,放免法检测血清中炎症因子IL-6、CRP的量。

2.3.4 脑组织炎症因子NF- κ B表达的检测 参照陈燕启等^[6]的方法测定大鼠脑组织NF- κ B的表达。以细胞内出现颗粒物质颜色的深浅程度表示阳性表达的强弱,随机选6个光学视野观察。根据信号表达强弱分为4级:“—”表示阴性,计0.5分(<5%未被染色);“+”表示弱阳性,计1分(5%~15%呈浅棕色);“++”表示中等阳性,计1.5分(15%~30%呈深棕色);“+++”为强阳性,计2分(>30%呈棕褐色)。计数同一组标本中阳性表达的评分。

2.4 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5统计软件包进行组间方差分析,多组间两两比较采用 q 检验,方差不齐采用 q' 检验。

3 结果

3.1 对脑缺血大鼠行为学评分和梗死率的影响

造模后,各组大鼠出现明显的行为学障碍。给药4 h后,各给药组大鼠行为学表现均有缓解的趋势;给药72 h后,血塞通组大鼠的行为学障碍得到

明显改善, 且与模型组相比差异显著 ($P<0.05$)。各给药组均可明显降低模型大鼠的脑梗死率, 差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 1。

表 1 5 种中药复方对脑缺血大鼠行为学评分和梗死率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of five Chinese patent medicines on score of ethology and infarction rate in cerebral ischemia of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物/只	剂量/(g·kg ⁻¹)	行为学评分		梗死率/%
			4 h	72 h	
假手术	10	—	0	0	0
模型	11	—	2.09±1.04**	2.64±0.81**	15.49±7.03**
尼莫地平	10	0.022	1.60±0.97**	2.40±0.97**	6.76±5.09***
通心络	10	0.281	1.30±0.95**	2.30±1.16**	3.12±3.30***
步长脑心通	10	0.432	1.70±0.95**	2.00±1.05**	3.92±2.15***
复方血栓通	10	0.405	2.10±1.20**	2.50±0.85**	8.00±6.51***
血塞通	10	0.027	1.40±1.17**	1.60±0.97***▲	5.21±2.42***
通塞脉	10	0.239	1.80±1.03**	2.20±1.03**	4.81±3.65***

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ *** $P<0.01$; 与复方血栓通组比较: ▲ $P<0.05$

** $P<0.01$ vs Sham group; # $P<0.05$ *** $P<0.01$ vs model group; ▲ $P<0.05$ vs Fufang Xueshuangtong group

3.2 对脑缺血大鼠血清 IL-6、CRP 和血浆 AngI、AngII 的影响

模型组大鼠血清中 CRP、IL-6 的量明显升高, 与假手术组比较差异显著 ($P<0.01$), AngI、AngII 的量略有升高, 但与假手术组比较差异无显著性。除血塞通胶囊组和尼莫地平组外, 其他给药组大鼠的 IL-6 水平均降低, 接近假手术组水平。步长脑心

通胶囊和血塞通胶囊能显著降低缺血大鼠血清中 CRP 的量, 且与模型组比较有极显著差异, 与其他给药组比较也有显著性差异。尼莫地平组大鼠 CRP 和 IL-6 的量均无明显改变。仅通塞脉片能明显降低大鼠 AngII 的量, 与模型组、尼莫地平、通心络胶囊和复方血栓通胶囊组比较差异均有显著性 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 2。

表 2 5 种中药复方对脑缺血大鼠血清 IL-6、CRP 和血浆 AngI、AngII 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of five Chinese patent medicines on IL-6 and CRP in serum, and AngI and AngII in plasma in cerebral ischemia of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物/只	剂量/(g·kg ⁻¹)	CRP/(mg·mL ⁻¹)	IL-6/(ng·mL ⁻¹)	AngI/(ng·mL ⁻¹)	AngII/(pg·mL ⁻¹)
假手术	10	—	1.22±0.57	126.07±51.59	165.03±13.51	200.93±72.98
模型	11	—	2.55±0.68**	225.90±82.47**	175.26±20.55	214.22±51.14
尼莫地平	10	0.022	2.42±0.29**	168.18±63.99	173.00±26.45	218.62±57.00
通心络	10	0.281	1.91±0.48***△△	156.24±45.66#	158.56±23.44	199.25±24.56
步长脑心通	10	0.432	1.33±0.41***△△△◇	134.08±52.06###	155.27±24.85	187.97±22.74
复方血栓通	10	0.405	1.98±0.66*☆	149.97±46.64#	168.66±13.53	216.51±35.33
血塞通	10	0.027	1.50±0.70***△△	169.93±53.99	168.53±19.62	213.74±91.11
通塞脉	10	0.239	2.18±0.46***☆☆	152.51±50.52#	168.65±28.06	170.54±23.03#△△▲

与假手术组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: # $P<0.05$ ### $P<0.01$; 与尼莫地平组比较: △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$; 与通心络组比较:

◇ $P<0.05$ ◇◇ $P<0.01$; 与步长脑心通组比较: ☆ $P<0.05$ ☆☆ $P<0.01$; 与血塞通组比较: * $P<0.05$; 与复方血栓通组比较: ▲ $P<0.05$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs Sham group; # $P<0.05$ ### $P<0.01$ vs model group; △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$ vs Nimodipine group; ◇ $P<0.05$ ◇◇ $P<0.01$

vs Tongxinluo group; ☆ $P<0.05$ ☆☆ $P<0.01$ vs Buchang Naoxintong group; * $P<0.05$ vs Xuesaitong group; ▲ $P<0.05$ vs Fufang Xueshuangtong group

3.3 对脑缺血大鼠脑组织中 NF-κB 表达的影响

模型组大鼠脑组织中 NF-κB 表达增加, 与假手术组比较差异有显著性。各给药组均可减少模型大

鼠的 NF-κB 表达, 与模型组比较差异有显著性, 其中通心络胶囊的作用明显, 且与复方血栓通胶囊比较差异有显著性 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见图 1。

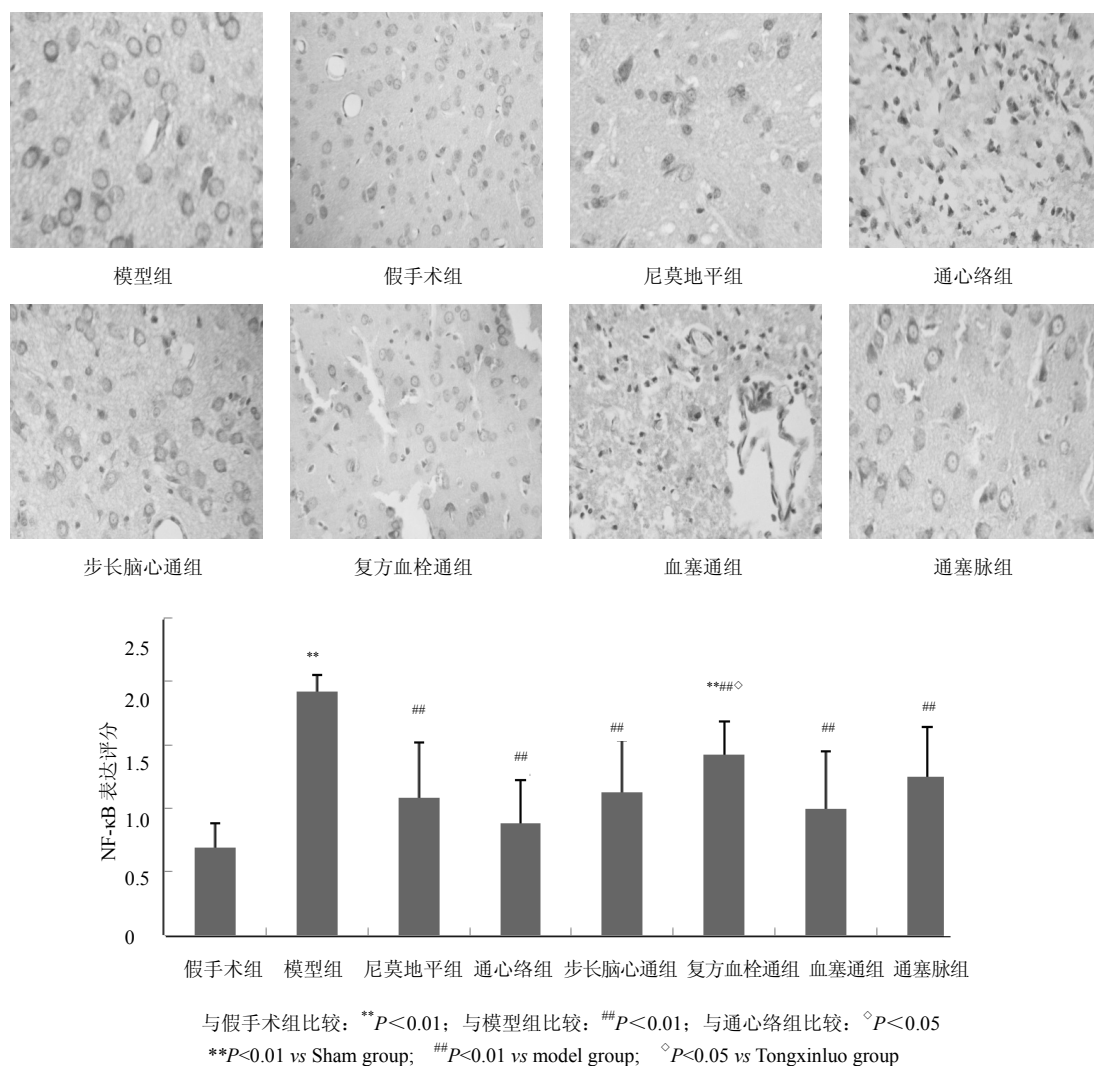


图1 5种中药复方对脑缺血大鼠NF-κB表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effects of five Chinese patent medicines on NF-κB expression in cerebral ischemia of rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

在初次脑梗死的病例中, 大脑中动脉主干分布区梗死占 82.20%, 因此局灶性脑缺血模型的制备常采用大脑中动脉阻塞法。该模型模拟的病理过程与临床脑卒中很接近, 因此本实验采用电凝一侧大脑中动脉的方法造成局灶性脑缺血模型。大鼠大脑中动脉造模成功后脑梗死面积一般在 10%~18%, 本实验结果显示造模成功后大鼠脑梗死面积为 15.49%, 与文献报道一致^[7]。本实验结果显示, 大鼠大脑中动脉模型复制 72 h 后, 仍可见行为学障碍, 梗死损伤明显; 5 种中药复方均可不同程度地缩小梗死面积, 其中血塞通胶囊还可改善模型大鼠的行为学障碍, 减轻脑缺血造成的病理损伤。

炎症反应在缺血性脑血管病的形成中起关键作用, CRP 是重要的炎症标记物, 参与了缺血性脑血

管病发生、发展过程中的内皮系统炎症过程。动脉粥样硬化中的脂质、巨噬细胞的浸润、粥样斑块的破裂都能促使细胞因子如 IL-6 的释放, 从而诱导肝细胞产生 CRP^[8]。反之, CRP 亦可以促进相关炎症因子 IL-6 的表达, 诱导炎性细胞的黏附与聚集, 导致局部微循环血流动力学障碍^[9]。在本研究中, 步长脑心通胶囊能通过减少缺血大鼠的 CRP 和 IL-6 的释放, 减轻脑缺血的炎症反应, 从而缓解缺血的发生; 血塞通胶囊主要通过抑制 CRP 的释放而改善脑缺血; 其余中成药均可减少模型大鼠血清中 IL-6 的量, 抑制 IL-6 的释放, 对抗脑缺血。而尼莫地平未明显改变 CRP 和 IL-6 的水平, 其改善脑缺血的机制可能与调节炎症因子的释放无关。

NF-κB 是一种能够与免疫球蛋白 κ 轻链基因的增强子序列特异性结合的炎症转录因子, 处于各种

细胞因子网络调节的中心环节,其活性调控非常复杂。脑缺血后 NF- κ B 大量增加,在垂死的神经元中持续活化,通过许多潜在途径诱导细胞死亡。NF- κ B 还可诱导 IL-6 的表达,从而造成恶性循环,对脑缺血组织产生损害^[10-11]。抑制脑缺血后 NF- κ B 的过度表达有可能减轻脑损伤,Xu 等^[12]用重组腺病毒表达 I κ B 特异地抑制 NF- κ B 活化,明显减少 MCAO 大鼠的缺血性脑损伤。本实验结果表明,NF- κ B 在假手术大鼠脑组织中呈弱阳性表达或不表达,而在模型组大鼠中呈强阳性表达;各给药组 NF- κ B 表达均下降,可见 5 种中药复方均可通过抑制 NF- κ B 的表达,减少 IL-6 等炎性因子的分泌,保护脑组织。

血浆肾素-血管紧张素-醛固酮系统的活性过度增强是心脑血管疾病尤其是高血压形成与维持的一个重要原因,而 AngII 是最重要的成分。AngII 主要来源于血浆,由血管紧张素原经肾素水解后变为 AngI,AngI 再经转换酶作用,水解为 AngII^[13]。AngII 能直接作用于血管壁,引起血管收缩,促进平滑肌细胞增殖及血管重构。本实验室在以往的研究中发现,通塞脉片能降低动脉粥样硬化大鼠血浆中的 AngII 水平^[14],因此在本实验中又观察了 AngII 的变化。结果发现通塞脉片降低脑缺血大鼠血浆中 AngII 的量,提示其还可能通过抑制血管紧张素转换酶的活性,减少 AngII 的生成,从而减轻脑血管的损害。

综上所述,5 种中药复方均可降低脑缺血大鼠 NF- κ B 的表达,其中步长脑心通胶囊能通过降低缺血大鼠的 CRP 和 IL-6 的释放,减缓脑缺血的发生;血塞通主要通过抑制 CRP 的释放改善脑缺血;其余各药均可减少脑缺血大鼠血浆中 IL-6 的量,对抗脑缺血;通塞脉片还能通过降低 AngII 改善脑缺血。

参考文献

- [1] 刘宪平. 注射用血塞通治疗急性脑梗死的疗效观察 [J]. 中草药, 2003, 34(6): 550-551.
- [2] 蓝涛华, 谭红梅, 吴伟康, 等. 通络单味药与复方通心络的通络效果比较研究 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1842-1847.
- [3] Jia Z H. Opening up a way of evaluating evidence-based medicine in traditional Chinese medicine [J]. *Chin Herb Med*, 2009, 1(1): 71-72.
- [4] Lundy E F, Solik B S, Frank R S, *et al*. Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils [J]. *J Pharmacol Methods*, 1986, 16(3): 201-214.
- [5] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, *et al*. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurological examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [6] 陈燕启, 刘德红, 杨光田. 大鼠急性全脑缺血再灌注时 NF- κ B 表达及意义 [J]. 医学临床研究, 2004, 21(7): 772-775.
- [7] Zealong E, Weistein P R, Calson S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion of the model and development of a neurological examination [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] 余献丹, 郑阿迈. C-反应蛋白在急性脑梗死中的意义 [J]. 江西医药, 2004, 39(5): 329-331.
- [9] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease [J]. *Nat Med*, 2003, 9(13): 653-660.
- [10] 李 军, 娄季宇, 张 磊. 雌激素对大鼠脑缺血再灌注损伤脑组织 NF- κ B 表达和细胞凋亡的影响 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2007, 10(3): 100-102.
- [11] 韩永鹏, 安 芸. 丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(5): 388-390.
- [12] Xu L, Zhan Y. Recombinant adenoviral expression of dominant negative I kappaB alpha protect s brain from cerebral ischemic injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 299(1): 14-17.
- [13] 陈 康, 窦京涛, 潘长玉. 血管紧张素 II 炎症反应和 2 型糖尿病 [J]. 国际内科学杂志, 2008, 35(12): 699-704.
- [14] 杨雨薇, 胡 晨, 卞慧敏. 通塞脉片对大鼠实验性动脉粥样硬化模型血管内皮细胞的影响 [J]. 中成药, 2010, 32(3): 371-374.