

灯盏细辛药效物质基础 3,5-二咖啡酰奎宁酸对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤的保护作用

李春雨*, 孟宪丽*, 王 张, 田会萍, 邱一行, 杨丽娟, 朱丽娜, 张 艺**

成都中医药大学 民族医药学院, 四川 成都 611137

摘要: **目的** 研究 3,5-二咖啡酰奎宁酸对大鼠实验性局灶性脑缺血-再灌注损伤模型的保护作用。**方法** 采用线栓法阻塞大鼠脑中动脉(MCAO)制备局灶性脑缺血-再灌注损伤模型, 观察 3,5-二咖啡酰奎宁酸对模型大鼠状态、神经行为学的影响, 以及对脑梗死比率及血清中丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、一氧化氮(NO)和一氧化氮合酶(NOs)的影响。**结果** 3,5-二咖啡酰奎宁酸剂 9.13、18.25 mg/kg 时均能明显降低模型大鼠脑梗死的比率($P<0.05$), 降低血清中 MDA 水平($P<0.01$), 增强 T-SOD、CAT、GSH-Px 的活性($P<0.05$)。**结论** 3,5-二咖啡酰奎宁酸对脑缺血-再灌注损伤有较好的保护作用, 其作用机制可能与抗自由基生成有关。

关键词: 3,5-二咖啡酰奎宁酸; 灯盏细辛; 脑缺血-再灌注损伤; 抗自由基

中图分类号: R282.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)06-0473-04

Protection of 3,5-dicaffeoylquinic acid as material basis for efficacy from *Erigerontis Herba* on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

LI Chun-yu, MENG Xian-li, WANG Zhang, TIAN Hui-ping, QIU Yi-hang, YANG Li-juan, ZHU Li-na, ZHANG Yi

College of Ethnomedicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract Objective To research the protection of 3,5-dicaffeoylquinic acid on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods:** Rat model of focal cerebral ischemia-reperfusion injury was created by the middle cerebral artery occlusion (MCAO) by modified suture method. The effect of 3,5-dicaffeoylquinic acid on model rats was investigated for the neuroethology, the rate of cerebral infarction area, the content or activity of malondialdehyde (MDA), total superoxide dismutase (T-SOD), glutathione peroxidase (GSH-px), catalase (CAT), nitrogen oxide (NO), and nitric oxide synthase (NOs) in serum, using Nimodipine as the positive control drug. **Results:** 3,5-Dicaffeoylquinic acid with the doses of 9.13 and 18.25 mg/kg could obviously increase the rate of the cerebral infarction area in MCAO rats ($P<0.05$) as well as MDA level ($P<0.01$) while increase the activity of T-SOD, CAT, and GSH-Px in serum ($P<0.05$). **Conclusion:** 3,5-Dicaffeoylquinic acid, exerts a better effect on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats and its mechanism may be related to the generation of anti-free radical.

Key words: 3,5-dicaffeoylquinic acid; *Erigerontis Herba*; cerebral ischemia-reperfusion injury; anti-free radical

脑缺血是临床常见病、多发病, 具有发生率、致残率、死亡率及复发率高等特点。灯盏细辛为菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz. 的干燥全草, 为云南民间苗族、彝族等少数民族习用草药, 具有散寒解表、祛风除湿、活络止痛

的功效, 临床上广泛用于治疗脑梗死、缺血性心脏病等心脑血管疾病。咖啡酰类化合物为灯盏细辛中的一大类活性物质, 具有抗炎、肝细胞保护、抑制血小板聚集等作用^[1], 但少见 3,5-二咖啡酰奎宁酸对脑缺血影响的研究。本实验旨在探讨 3,5-二咖啡

收稿日期: 2011-10-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672602; 81102895); 四川省中医药管理局学术和技术带头人专项(2007XS21); 四川省教育厅自然科学重点项目(07ZA024)

作者简介: 李春雨(1985—), 男, 博士, 研究方向为中药和民族药药效与毒理研究。Tel: (022)84845247 E-mail: wd2526@163.com

*同为第一作者

**通讯作者 张 艺, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为中药和民族药药效物质基础研究。Tel: (028)87714869 E-mail: 9006zmy@sina.com

酰奎宁酸的脑保护作用, 为其临床上治疗脑缺血和新药开发研究提供药理学依据。

1 材料与仪器

1.1 药品与试剂

3,5-二咖啡酰奎宁酸, 由成都普思生物科技有限公司提供, 批号 PS08041001-01, HPLC 检测质量分数 >98%; 尼莫地平片, 天津中央药业有限公司生产, 批号 090609; 红四氮唑 (TTC), 上海灵锦精细化工有限公司生产, 批号 20080501; 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT)、一氧化氮 (NO) 和一氧化氮合酶 (NOs) 测试盒均为南京建成生物工程研究所产品。

1.2 动物

SD 大鼠, 普通级, 雄性, 体质量 (300±50) g, 由成都中医药大学实验动物中心提供, 生产许可证号: SCXK (川) 2008-11。

1.3 仪器

Varioskan Flash 全波长多功能读数仪, Thermo 公司。

2 方法

2.1 脑缺血-再灌注损伤模型制备

参照文献[2-4], 以线栓法阻塞大鼠脑中动脉 (MCAO) 致局灶性脑缺血-再灌注损伤模型, 脑中动脉阻断 2 h 后进行再灌注, 假手术组仅在动物的动脉处备线处理。

2.2 分组与给药

120 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平片阳性对照组、3,5-二咖啡酰奎宁酸低剂量和高剂量组, 保证按时间点处死动物时每组至少有 10 只动物。造模前 3 d 假手术组和模型组大鼠 ig 给予蒸馏水 10 mL/(kg·d), 尼莫地平组 ig 尼莫地平 20 mg/(kg·d), 3,5-二咖啡酰奎宁酸低剂量、高剂量

组分别 ig 3,5-二咖啡酰奎宁酸 9.13、18.25 mg/kg, 连续给药 3 d, 造模结束后再连续给药 2 d, 每天给药 1 次。

2.3 检测指标

2.3.1 状态评分 评分标准: 活泼, 0 分; 一般, 1 分; 精神不振, 2 分; 精神萎靡, 3 分; 瘫痪, 4 分。评分时间点: 大鼠脑缺血前 2 h 和缺血后 24、48 h。分值越高, 说明大鼠状态越差。

2.3.2 神经行为学观察 参考 Longa 等^[5]和 Bederson 等^[6]的 5 分制法, 在大鼠脑缺血 2 h 和缺血后 24、48 h 时, 对大鼠神经行为学进行评分, 分值越高, 说明大鼠神经行为障碍越严重。

2.3.3 脑梗死比率 将成功给药及脑缺血后存活时间达到 48 h 的大鼠处死, 取全脑进行 TTC 染色, 计算脑指数和脑梗死比率。

脑指数 = 全脑质量 (g) / 处死时动物体质量 (g)

脑梗死比率 = 脑梗死部分质量 (g) / 全脑质量 (g)

2.3.4 血液生化指标 测定血清中 SOD、MDA、GSH-Px、CAT、NO 和 NOs 的活性或水平。

2.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 18.0 软件提供的单因素方差分析或非参数检验进行数据分析。

3 结果

3.1 对状态评分的影响

与模型组比较, 3,5-二咖啡酰奎宁酸对脑缺血-再灌注损伤模型大鼠的状态无明显的改善作用。结果见表 1。

3.2 对神经行为学的影响

与模型组比较, 3,5-二咖啡酰奎宁酸组脑缺血-再灌注损伤模型大鼠神经行为学症状无明显改善作用。结果见表 1。

3.3 对大鼠脑梗死率的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠脑梗死率明显增

表 1 3,5-二咖啡酰奎宁酸对脑缺血-再灌注损伤模型大鼠状态评分和神经行为学评分的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of 3,5-O-dicaffeoylquinic acid on the status score and neurological behavioral score of ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	动物/只	状态评分			神经行为学评分		
			脑缺血 2 h	脑缺血 24 h	脑缺血 48 h	脑缺血 2 h	脑缺血 24 h	脑缺血 48 h
假手术	—	10	0	0	0	0	0	0
模型	—	19	0	0.74±0.81	0.47±0.51	0	0.68±0.75	0.53±0.70
3,5-二咖啡酰奎宁酸	9.13	11	0	1.09±0.94	1.09±0.70	0	0.09±0.30	0.64±0.92
	18.25	10	0	0.70±0.82	0.60±0.70	0	0.30±0.48	0.40±0.70
尼莫地平	20.00	10	0	0.30±0.48	0.20±0.42	0	0.10±0.32	0.00±0.00

高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 3,5-二咖啡酰奎宁酸低、高剂量均能明显降低脑梗死率 ($P<0.05$ 、 0.01), 表明 3,5-二咖啡酰奎宁酸对脑缺血-再灌注损伤有改善作用。结果见表 2。

3.4 对血液生化指标的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠血中 MDA 水平

有升高的趋势, NOs 活性有降低的趋势, 但差异不显著; 而 T-SOD、GSH-Px 活性明显降低 ($P<0.05$)。与模型组比较, 3,5-二咖啡酰奎宁酸低、高剂量均能明显降低 MDA 水平 ($P<0.01$), 提高 T-SOD、GSH-Px、CAT、NOs 活性 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 3。

表 2 3,5-二咖啡酰奎宁酸对脑缺血-再灌注损伤模型大鼠脑梗死率和脑指数的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effects of 3,5-dicaffeoylquininate on cerebral infarction ratio of suture-induced ischemia- reperfusion injury ($\bar{x}\pm s$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	脑梗死率/%	脑指数/%
假手术	—	10	0**	0.55±0.03
模型	—	19	7.56±5.58	0.56±0.07
3,5-二咖啡酰奎宁酸	9.13	11	3.98±1.47*	0.54±0.07
	18.25	10	2.79±2.13**	0.54±0.04
尼莫地平	20.00	10	3.80±3.70*	0.53±0.05

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 下表同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; following table is same

表 3 3,5-二咖啡酰基奎宁酸对脑缺血-再灌注损伤模型大鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effects of 3,5-dicaffeoylquininate on biochemical index in serum of rats with ischemia- reperfusion injury ($\bar{x}\pm s$)

组 别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	动物/只	MDA/ (nmol·mL ⁻¹)	T-SOD/ (U·mL ⁻¹)	GSH-Px/ (U·mL ⁻¹)	CAT/ (U·mL ⁻¹)	NOs/ (U·mL ⁻¹)	NO/ (μmol·mL ⁻¹)
假手术	—	10	3.35±0.87	1.41±0.05*	470.18±130.65*	0.92±1.11	28.03±14.45	38.89±33.70
模型	—	19	3.62±0.75	1.26±0.16	380.82±137.81	1.52±4.37	26.76±3.57	74.49±72.74
3,5-二咖啡酰 奎宁酸	9.13	11	2.20±0.70**	1.44±0.20**	332.66±48.25	4.81±1.75**	33.34±5.92*	87.78±61.20
	18.25	10	2.37±0.37**	1.16±0.03	398.39±52.32*	6.00±3.72**	32.40±5.66	38.67±18.83
尼莫地平	20.00	10	3.39±0.71	1.35±0.07*	442.52±68.16*	2.01±3.46	28.12±3.17	86.90±79.01

4 讨论

脑缺血是引起脑血管疾病的主要原因之一。临床实践和动物实验均已证实脑缺血达一定时间后进行再灌注, 反而加重损伤^[4]。研究表明, 许多因素参与脑缺血-再灌注损伤, 如自由基产生、血流减少、代谢率降低、钙超载、兴奋性氨基酸的释放等。氧自由基损伤是脑缺血损伤的主要发病机制之一, 也是脑血管疾病致死、致残的主要病理因素^[7]。缺血再灌注时, 氧自由基产生增加, 自由基对中枢神经系统的侵害主要包括: (1) 自由基攻击脑组织中的不饱和脂肪酸, 导致脂质过氧化; (2) 膜受体损伤直接影响脑细胞功能, (3) 膜脂质过氧化引起细胞外 Ca²⁺内流, 激活磷脂酶和蛋白激酶, 诱导细胞凋亡的发生, (4) 刺激兴奋性氨基酸如谷氨酸、天冬氨酸的释放, 引发细胞损害^[8]。自由基还可攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化作用,

并形成脂质过氧化物如 MDA, 进一步引起细胞代谢及功能障碍, 加重细胞毒性脑梗死, 甚至死亡。

本实验结果提示, 3,5-二咖啡酰基奎宁酸 9.13、18.25 mg/kg 对线栓法阻塞大脑中动脉致大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤均有较好的保护作用, 其作用机制可能与抗自由基生成有关; 能显著降低模型动物的脑梗死率, 并能提高血清中自由基代谢酶 T-SOD、CAT 及 GSH-PX 活力, 降低血清中 MDA 水平。

参考文献

- [1] 张卫东, Ha Thi Bang Tam, 陈万生, 等. 灯盏花中新的酚酸类化合物的结构及活性研究 [J]. 药学报, 2001, 36(5): 360-363.
- [2] Tamura A, Graham D I, Me Culluch J, *et al.* Focal cerebral ischemia in the rat: 1 Description of technique and early neuropathological consequences following middle

- cerebral artery occlusion [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1981, 1(1): 53-60.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1060.
- [4] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 297.
- [5] 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.
- [6] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [7] 张丽蕊, 杨嘉萍, 周爱民. 补阳还五汤抗脑缺血损伤的实验研究 [J]. 河北中医药学报, 2005, 20(4): 25-28.
- [8] 罗跃娥, 杨 卓. 脑缺血/再灌注损伤中蛋白激酶 C 及抑制剂的作用研究概述 [J]. 天津中医学院学报, 2004, 23(3): 167-168.

SFDA 批准上市的中药品种情况 (9 月 20 日~9 月 28 日)

产品名称	批准文号	注册分类	规 格	生产单位	批准日期
益母草颗粒	国药准字 Z20113076	—	3 g/袋 (无蔗糖)	成都第一制药有限公司	2011-09-28
如意珍宝胶囊	国药准字 Z20110031	9	0.4 g/粒	西藏自治区藏药厂	2011-09-23
缬草提取物胶囊	国药准字 Z20110032	—	0.32 g/粒	武汉联合药业有限责任公司	2011-09-23
肾苓颗粒	国药准字 Z20110033	—	2.5 g/袋	四川禾正制药有限责任公司	2011-09-23
一清颗粒	国药准字 Z20113070	11	7.5 g/袋 (无蔗糖)	北京亚东生物制药有限公司	2011-09-20
护肝片	国药准字 Z20113071	11	0.36 g/片	江西药都仁和制药有限公司	2011-09-20
乳块消颗粒	国药准字 Z20113073	—	5 g/袋 (无蔗糖)	北京亚东生物制药有限公司	2011-09-20
逍遥颗粒	国药准字 Z20113074	—	5 g/袋 (无糖型)	重庆希尔安药业有限公司	2011-09-20
复方丹参片	国药准字 Z20113069	—	0.29 g/片	广州中一药业有限公司	2011-09-20
穿心莲片	国药准字 Z20113068	—	0.34 g/片	南宁市维威制药有限公司	2011-09-20
血塞通颗粒	国药准字 Z20113072	—	1.5 g/袋 (含三七总皂 苷 50 mg, 无蔗糖)	云南金泰得三七产业股份有限公司	2011-09-20