

血三七水煎液对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用

王金翠¹, 胡雄彬², 唐甜甜², 韩萌², 刘新义^{2*}

1. 桑植县民族中医院 药剂科, 湖南 桑植 427100

2. 中南大学湘雅二医院 临床药学研究所, 湖南 长沙 410011

摘要: **目的** 研究血三七 *Polygonum amplexicaule* D. Don var. *sinense* Forb.et Hemsl.ex Stew.水煎液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用,并探讨其机制。**方法** 180只雄性SD大鼠随机分为脑缺血再灌注(模型)组,假手术组,银杏叶提取物(0.2 g/kg)组,血三七水煎液高、中、低剂量(0.3、0.2、0.1 g/kg)组,给药组术前连续ig 14 d,于末次给药60 min后行手术,采用结扎颈外动脉建立大鼠脑中动脉局灶性脑缺血再灌注损伤模型,观察血三七水煎液组对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能、脑梗死组织质量比、脑含水量、脑组织中生化指标的影响。**结果** 与模型组比较,血三七水煎液高、中剂量组,银杏叶提取物组均可明显改善神经功能障碍,明显降低脑梗死组织质量比、减低脑组织中含水量,升高大鼠脑组织中SOD活性,降低MDA、NO的量($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 血三七水煎液对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用,其作用机制可能与抗自由基和抑制NO生成有关。

关键词: 血三七水煎液; 脑缺血再灌注损伤; 自由基; NO

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)03-0227-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.03.003

Protection of *Polygonum amplexicaule* var. *sinense* water decoction on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

WANG Jin-cui¹, HU Xiong-bin², TANG Tian-tian², HAN Meng², LIU Xin-yi²

1. Department of Pharmacy, Sangzhi County National Hospital of Chinese Medicine, Sangzhi 427100, China

2. Institution of Clinical Pharmacy, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China

Abstract: **Objective** To observe the protective effect of *Polygonum amplexicaule* var. *sinense* water decoction (PAWD) on focal cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury in rats, and to explore its mechanisms. **Methods** SD male rats (120 rats) were randomly divided into I/R, Sham, *Ginkgo biloba* extract (GBE, 0.2 g/kg), high-, mid-, and low-dose (0.3, 0.2, and 0.1 g/kg) PAWD groups. The animals were ig administered with drugs for 14 d. The operation was performed to induce the middle cerebral artery occlusion model in rats with the method of intraluminal thread at 60 min after the last administration via ligation of external carotid artery. After ischemia for 2 h and reperfusion for 24 h in each model rat, the influences of PAWD on nerve function, tissue weight rate of cerebral infarction, water contents in brain, and biochemical indicators in brain were determined. **Results** Compared with I/R group, high-, mid-dose PAWD, and GBE could obviously improve the neurological dysfunction of rats, reduce the brain water contents, decrease tissue weight rate of cerebral infarction, increase the activities of SOD, and reduce MDA and NO contents ($P < 0.05$ or 0.01). **Conclusion** PAWD has protective effect on cerebral I/R injury, and the mechanism may be related to attenuating free radical and NO.

Key words: *Polygonum amplexicaule* var. *sinense* water decoction; cerebral ischemia-reperfusion injury; free radical; NO

血三七又名寥子七、散血丹,为蓼科植物中华抱茎蓼 *Polygonum amplexicaule* D. Don var. *sinense* Forb.et Hemsl.ex Stew.的根茎,主要分布于湖北、陕西、四川和云南等地^[1]。血三七味涩、微苦、性平,

具有清热解毒、活血止痛之功效,土家族和苗族常用来治疗跌打损伤、外伤的止血等疾病^[2]。近年来临床研究结果发现,血三七能有效治疗脑动脉粥样硬化,后来从该植物中分离出4个黄酮类,6个酚

收稿日期: 2013-10-20

基金项目: 湖南省中医药管理局课题(2013139)

作者简介: 王金翠(1979—),女,本科,主管中药师,主要从事医院药学和民族药物研究。Tel: 13319646120 E-mail: 763394130@qq.com

*通信作者 刘新义,博士,主要从事新制剂开发和民族药物研究。Tel: (0731)85292093 E-mail: liuxinyi128@126.com

酸类, 1 个木脂素和 1 个甾体化合物, 体外抗氧化活性评价结果表明, 这些化合物除没食子酸甲酯外均具有良好的抗氧化活性^[3-4]。文献报道, 血三七水煎液 (*Polygonum amplexicaule* var. *sinense* water decoction, PAWD) 具有明显的抗脑血栓、抑制血小板聚集^[5]。在此基础上, 本实验研究了血三七水煎液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用, 并探讨其可能的机制, 为其临床应用于缺血性脑血管疾病提供依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

血三七药材采自湖北省恩施土家族苗族自治州利川市, 经中南大学湘雅药学院生药教研室鉴定为蓼科植物中华抱茎蓼 *Polygonum amplexicaule* D. Don var. *sinense* Forb. et Hemsl. ex Stew. 的根茎; 银杏叶提取物购自湖南长沙惠瑞生物科技有限公司, 银杏黄酮 $\geq 30\%$, 批号 201210; 戊巴比妥钠为德国进口分装, 规格 5 g, 质量分数 $>98\%$; 超氧化物歧化酶 (SOD, 批号 20130614)、丙二醛 (MDA, 批号 20130518)、NO (批号 20130311) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器

BIOPAC 多导生理记录仪 (普升科技有限公司), Harvard Inspira 动物呼吸机 (美国哈佛仪器有限公司), ECG—1350C 十二道自动分析心电图机 (上海舒康仪器技术有限公司)。

1.3 动物

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 250~300 g, 由中南大学湘雅医学院实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (湘) 2010-0018。

2 方法

2.1 实验分组

取 SD 大鼠 180 只, 称定体质量, 随机分为 6 组, 分别为假手术组、脑缺血再灌注 (模型) 组、银杏叶提取物 (0.5 g/kg) 组、血三七水煎液高、中、低 (0.3、0.2、0.1 g/kg) 剂量组。各组动物连续 ig 给药 14 d, 模型组和假手术组给予等量的生理盐水。

2.2 血三七水煎液的制备

取血三七药材 100 g, 分别加 6、5 倍量水煎煮 2 次, 合并水煎液, 低温浓缩至 100 mL。每毫升水煎液相当于 1 g 生药。临用前采用生理盐水稀释。

2.3 模型的制作^[6]

各给药组于末次给药 60 min, 采用 10%水合氯

醛 (330 mg/kg) ip 麻醉大鼠, 将大鼠仰卧固定在手术台上, 行颈正中切口, 分离右侧颈总动脉, 再分离出颈外动脉结扎, 在已分离的颈总动脉近心端用动脉夹阻断血流, 远心端用一手术线轻轻拉起, 于颈总动脉上剪一小切口。将细小的尼龙线由颈总动脉小口插入, 向颈内动脉入颅方向推进 1.8~2.1 cm, 遇阻即止, 即达到大脑前动脉, 此时供应大脑中动脉的所有血供均被阻断, 完成大脑中动脉缺血模型的制备。动物清醒后, 出现同侧 Horner 征、提尾时右侧前肢屈曲内收为造模成功。缺血 2 h 后将尼龙线轻缓外抽, 使其头端回到近心端的结扎处, 实现缺血再灌注。假手术组除不栓线外均同模型组相同操作。

2.4 神经功能障碍评分^[6]

中动脉缺血 2 h 再灌注 24 h 后采用 Zealunga 评分法。0 分: 无神经功能缺失症状, 活动正常者; 1 分: 不能完全伸展对侧前爪者; 2 分: 爬行时出现向右转圈者; 3 分: 行走时身体向偏瘫侧倾倒者; 4 分: 意识丧失者; 5 分: 死亡。

2.5 脑梗死组织质量的测定

在缺血 2 h 再灌注 24 h 后, 每组分别取 10 只大鼠迅速断头取脑。将大脑从视交叉起作 2 mm 冠状切片, 然后将脑片放入 0.2%硝基四氮唑蓝 (NBT) 中, 于 37 °C 下温育培养 30 min, 小心挖取未被染成蓝色的白色梗死组织并称其质量, 计算脑梗死组织质量比和抑制率。

脑梗死组织质量比=梗死灶质量/右侧大脑半球质量

抑制率=(模型组脑梗死组织质量比-药物组脑梗死组织质量比)/模型组脑梗死组织质量比

2.6 脑组织含水量的测定

在缺血 2 h 再灌注 24 h 后, 每组分别取 10 只大鼠迅速断头取脑。将缺血侧大脑半球脑片用滤纸吸去表面残血, 然后在电子分析天平上称湿质量, 然后置 105 °C 烘箱中烤干至恒定质量, 在电子分析天平上称干质量, 计算脑组织含水率。

脑组织含水率=(脑组织湿质量-脑组织干质量)/脑组织湿质量

2.7 脑组织生化指标的测定

在缺血 2 h 再灌注 24 h 后, 每组分别取 10 只大鼠迅速断头取脑。在冰浴中切取手术侧大脑海马区脑组织约 0.2 g, 去除脑膜和血液, 加 4 °C PBS 制成 10%脑组织匀浆, 按试剂盒说明书测定 SOD、MDA、NO 量。

2.8 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件 one-way ANOVA 进行方差分析。

3 结果

3.1 神经功能障碍评分

脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后大鼠神经功能缺损主要表现为左前肢屈曲, 侧推阻力降低, 肌张力降低, 活动量明显减少。与模型组比较, 银杏叶提取物组、血三七水煎液高和中剂量组明显改善, 差异具有显著性 ($P < 0.05$), 但血三七水煎液低剂量组与模型组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。

表 1 血三七水煎液对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤致神经功能障碍评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of PAWD on neurological scores of cerebral ischemia-reperfusion injured rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	神经功能评分
假手术	—	0.00±0.00
模型	—	2.67±0.19*
银杏叶提取物	0.2	1.46±0.13 ^{△△}
血三七水煎液	0.1	2.38±0.17
	0.2	1.78±0.15 [△]
	0.3	1.53±0.17 ^{△△}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs Sham group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group

3.2 脑梗死组织质量的测定

与模型组比较, 血三七水煎液各剂量组和银杏叶提取物组均明显降低大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤致脑梗死组织的质量比, 差异具有显著性 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示血三七水煎液具有明显的减少脑梗死组织的作用效果。见表 2。

3.3 脑组织含水量的测定

模型组的脑组织含水量与假手术组比较差异具有显著性 ($P < 0.05$), 提示大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型造模成功。与模型组比较, 血三七水煎液高、中剂量和银杏叶提取物组均显著减低脑组织含水量, 差异具有显著性 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示血三七水煎液可以减少局灶性脑缺血再灌注损伤致大鼠脑组织含水量。见表 3。

3.4 脑组织生化指标的测定

与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织中 MDA、NO 量明显增加, SOD 活性降低, 说明模型制作成功。血三七水煎液高、中剂量组和银杏叶提取物组

表 2 血三七水煎液对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤致脑梗死组织质量比的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of PAWD on tissue weight rate of cerebral ischemia-reperfusion injured rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	脑梗死组织质量比/%	抑制率/%
假手术	—	0	—
模型	—	26.8±4.1*	—
银杏叶提取物	0.2	18.7±3.6 ^{△△}	30.4
血三七水煎液	0.1	22.4±2.9 [△]	19.3
	0.2	20.3±3.2 [△]	22.6
	0.3	18.2±3.5 ^{△△}	29.9

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs Sham group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group

表 3 血三七水煎液对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤致脑组织含水量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effect of PAWD on water content of cerebral ischemia-reperfusion injured rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	脑组织含水量/%
假手术	—	77.23±0.46
模型	—	80.15±0.51*
银杏叶提取物	0.2	78.11±0.75 ^{△△}
血三七水煎液	0.1	79.24±0.38
	0.2	78.75±0.46 [△]
	0.3	78.21±0.39 ^{△△}

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs Sham group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group

均升高大鼠脑组织中 SOD 活性, 降低 MDA、NO 的量, 与模型组比较差异具有显著性 ($P < 0.05$ 、 0.01)。见表 4。

4 讨论

脑卒中属于常见的急性多发病, 与恶性肿瘤、心脏病构成 3 类严重威胁人类生命的重大疾病。我国属于脑卒中的高发地区, 据流行病学统计, 我国每年患脑卒中病 600 万, 死亡近 100 万人, 在幸存者中约 3/4 的患者留下偏瘫等后遗症, 部分患者丧失劳动能力和生活能力。目前治疗脑卒中的药物很多, 民族医药具有应用历史悠久, 疗效显著, 副作用小, 药材资源丰富等优良特点, 因此, 采用民族药物来防治多发性的脑卒中, 一方面可以推动民族医药的产业化, 另一方面可以预防性地减少脑卒中的发病率。

局灶性缺血再灌注损伤是大多数缺血性卒中发

表 4 血三七水煎液对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤致脑组织 SOD, MDA 和 NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Table 4 Effect of PAWD on SOD, MDA, and NO levels in brain of cerebral ischemia-reperfusion injured rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组 别	剂量/(g·kg ⁻¹)	MDA/ (μmol·g ⁻¹)	SOD/ (U·mg ⁻¹)	NO/ (μmol·L ⁻¹)
假手术	—	26.28±5.45	289.87±52.64	16.59±3.71
模型	—	54.44±6.17 [*]	183.04±45.18 [*]	30.65±4.24 [*]
银杏叶提取物	0.2	41.83±5.24 ^{△△}	265.21±39.29 ^{△△}	25.06±5.15 [△]
血三七水煎液	0.1	49.73±5.62	218.76±41.75 [△]	28.14±3.19
	0.2	45.19±6.07 [△]	234.53±43.67 [△]	27.18±5.23 [△]
	0.3	42.87±5.98 ^{△△}	258.71±49.83 ^{△△}	26.09±4.72 [△]

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

生和发展的病理生理学基础,血栓形成后,严重阻塞脑血流的顺畅流行,随之引发神经细胞、胶质细胞、内皮细胞和微血管损伤,释放大量的炎症因子、氧自由基和细胞凋亡因子,从而促使脑缺血进一步加重^[7]。血三七具有活血化淤的功效,民间常用来治疗损伤后的血液淤积不畅,该作用效果恰好可以用于血栓性疾病引起的血流不畅。从化学组分分析,血三七药材中含有多种黄酮类化合物,可以提高抗氧化酶活性,抑制自由基的产生,并抑制氧自由基引起的脂质过氧化反应,从而对脑血再灌注损伤起保护作用。本研究结果发现,血三七水煎液可以明显缩小梗死脑组织质量,减少脑水肿,并能促使大鼠脑组织中 SOD 活力明显升高,MDA 含量显著下降,提示血三七水煎液对局灶性缺血再灌注引发的自由基损伤有保护作用。另外,NO 本身也属于自由基的一种,现代研究结果发现脑缺血后期,脑组织中 NO 含量增加,可变成作用较强的神经毒素,加剧脑细胞的损伤^[8-9]。本实验结果显示,血三七水煎液可以显著降低缺血后脑组织中 NO 的含量,表明该作用与血三七对局灶性缺血再灌注的保护作用密切相关。

综上所述,血三七水煎液对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤有保护作用,其机制可能与其减少自由基的产生,抑制 NO 生成有关。

参考文献

- [1] 方志先, 胡淑玲, 雷永恕. 鄂西药物志 [M]. 第 1 册. 武汉: 湖北民族出版社, 1998: 338.
- [2] 殷 智, 彭再生, 杨长丰. 复方血三七胶囊治疗脑动脉粥样硬化症 42 例疗效观察 [J]. 中国民族民间医药杂志, 2005, 73: 90-92.
- [3] 向梅先, 胡亚京, 闫云君. 血三七乙酸乙酯部位化学成分研究 [J]. 中药材, 2012, 35(10): 1610-1614.
- [4] 王海楼, 任恒春, 邹忠梅. 血三七抗氧化活性成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(11): 819-822.
- [5] 曾碧映, 李新才, 李学军, 等. 血三七水煎剂抗血栓作用及其机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 256-259.
- [6] 刘俊芳, 李昌俊, 郑 瑶, 等. 山楂叶总黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的探讨 [J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(10): 832-835.
- [7] 罗胜勇, 方 明, 陈志武. 山茶花总黄酮对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(9): 665-668.
- [8] Ma S W, Zhao M, Liu H X, et al. Pharmacokinetic effects of baicalin on cerebral ischemia-reperfusion after iv administration in rats [J]. Chin Herb Med, 2012, 4(1): 53-57.
- [9] 王文波, 夏学巍, 杜贻庆, 等. 龙眼壳总黄酮对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制 [J]. 中药药理与临床, 2011, 27(1): 45-47.