

· 药理实验与临床观察 ·

总丹酚酸对小鼠和大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

吴俊芳*, 王洁, 张均田

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要:目的 观察总丹酚酸(Sal)对脑缺血再灌注损伤的保护作用。方法 采用小鼠和大鼠脑缺血再灌注模型。结果 在小鼠和大鼠全脑缺血再灌注模型上, Sal 10, 20 mg/kg iv 及 Sal 5, 10 mg/kg iv 可显著提高脑组织乳酸脱氢酶(LDH)及超氧化物歧化酶(SOD)活性, 明显降低丙二醛(MDA)含量。在大鼠局灶性脑缺血 2h 再灌注 24h 模型上, Sal 5, 10 mg/kg iv 可明显缩小梗死灶面积, 改善神经功能缺损, 并显著抑制缺血脑组织中 LDH 和 SOD 活性降低, 减少 MDA 的过量产生。结论 Sal 对小鼠和大鼠脑缺血再灌注损伤有显著保护作用, 其机制与其抗氧自由基作用有关。

关键词: 总丹酚酸; 脑缺血再灌注; 乳酸脱氢酶; 氧自由基

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)03-0227-03

Protective effect of total salvianolic acids against cerebral ischemia-reperfusion injuries in mice and rats

WU Jun-fang, WANG Jie, ZHANG Jun-tian

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract Object It was reported that salvianolic acid A from *Salvia miltiorrhiza* Bge. could improve memory dysfunction of mice with cerebral ischemia-reperfusion injury. The effects of total salvianolic acids (Sal), including salvianolic acid A and B, rosmarinic acid and protocatechic aldehyde was now studied to observe its effect on cerebral ischemia-reperfusion injury in hope of obtaining a preliminary view on its mechanism of action. **Methods** The effects of Sal on lactic dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) of cerebral ischemia-reperfusion injured mouse and rat models were observed. **Results** Sal 10, 20 mg/kg iv and 5, 10 mg/kg iv could markedly increase the activities of LDH and SOD and lower the production of MDA in the injured cerebral tissue. On focal cerebral ischemia reperfusion injured rat, 24 h reperfusion after 2 h ischemic injury, 5, 10 mg/kg iv Sal could decrease infarct size, ameliorate neurological deficit with obvious inhibition of the decrease of LDH and SOD activities and the over production of MDA. **Conclusion** Sal showed obvious protective effects on cerebral ischemia reperfusion injuries of mice and rats via attenuating oxygen free radical.

Key words total salvianolic acids(Sal); cerebral ischemia reperfusion; lactic dehydrogenase; oxygen free radical

丹参是我国传统中药,具有活血化瘀、通经活络功能。总丹酚酸(total salvianolic acids, Sal)是从丹参中提取的水溶性有效成分,易通过血脑屏障,安全指数大。过去的研究表明^[1-3], Sal在体内、外均有很强的抗氧化作用,对白内障、大鼠心肌缺血再灌注损伤、心律失常等均具有预防和治疗作用。杜冠华等^[4]报道,丹酚酸 A 对小鼠脑缺血再灌注所致记忆功能障碍有明显改善作用。但 Sal 对脑缺血再灌注损伤

的影响未见报道。本文在小鼠和大鼠脑缺血再灌注损伤模型上观察 Sal 的作用,并进行初步作用机制探讨。

1 材料与方法

1.1 动物:昆明种小鼠,雄性,体重 20~23 g; Wistar 大鼠,雄性,体重 250~300 g,均由中国医学科学院实验动物中心提供。

1.2 药品与试剂:总丹酚酸由中国医学科学院药物

* 收稿日期: 2000-06-15

基金项目: 国家科委“1035”工程新药基金资助项目 (No. K95-12-27)

作者简介: 吴俊芳,女,副研究员。1995年在南京医科大学神经药理专业获博士学位,1995~1997年在中国医学科学院药物所从事博士后研究,主要研究方向:神经药理学。曾获首届法国 Servier 药理学奖。至今已发表学术论文 40 余篇。目前正在承担“973”子课题项目。

研究所植化室提供,含丹酚酸 A B 迷迭香酸、原儿茶醛等酚类化合物,其中以高效液相分析法测得丹酚酸 B 的含量为 40%。临用前以生理盐水溶解成所需浓度。超氧化物歧化酶 (SOD)和丙二醛 (MDA)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;乳酸脱氢酶 (LDH)试剂盒及红四氮唑 (TTC)均为北京化工厂产品 其它试剂均为市售分析纯。

1.3 小鼠脑缺血再灌注模型^[5]:取昆明种小鼠 50 只,随机分为 5 组,给药组分别给予 Sal 5, 10, 20 mg/kg iv, 1 次/日,连续 3 d。对照组 iv 等容量生理盐水,假手术组除不结扎颈总动脉,其余处理同对照组。末次给药后 10 min 小鼠乙醚麻醉,颈部正中切口,小心分离迷走神经后,在两侧颈总动脉下分别穿线备用,待动物清醒后,拉线结扎双侧颈总动脉,20 min 后松开拉线,恢复脑供血,24 h 后断头取脑备用。

1.4 大鼠急性不完全性脑缺血再灌注模型:取 Wistar 大鼠 40 只,随机分为 5 组,给药组分别给予 Sal 2.5, 5.0, 10 mg/kg iv, 1 次/日,连续 3 d。对照组 iv 等容量生理盐水,假手术组除不结扎颈总动脉,其余处理同对照组。末次给药后 10 min,大鼠以乌拉坦 1.0 g/kg ip 麻醉,参照文献^[6]方法结扎双侧颈总动脉,30 min 后再恢复脑供血,24 h 头取脑备用。

表 1 Sal 对小鼠脑缺血再灌注损伤的影响 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg·d)	LDH (U/mg 蛋白)	MDA (nmol/mg 蛋白)	SOD (U/mg 蛋白)
假手术组	—	183±33	12.79±1.85	4.36±0.87
对照组	—	108±27 [#]	24.31±2.72 [#]	1.79±0.87 [*]
Sal	5	122±27	23.04±2.35	2.07±0.51
	10	140±32 [†]	20.36±2.12 [*]	2.49±0.72 [†]
	20	160±31 ^{†*}	15.72±1.91 [*]	3.35±0.84 [*]

与假手术组比较:## P<0.01; 与对照组比较:* P<0.05 ** P<0.01

2.2 Sal 对大鼠急性不完全性脑缺血再灌注损伤的影响:大鼠全脑缺血 30 min 再灌注 24 h,脑组织 LDH SOD 活性明显降低,MDA 含量明显升高,而

表 2 Sal 对大鼠急性不完全性脑缺血再灌注损伤的影响 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg·d)	LDH (U/mg 蛋白)	MDA (nmol/mg 蛋白)	SOD (U/mg 蛋白)
假手术组	—	182±33	13.55±1.78	5.26±0.88
对照组	—	105±28 [#]	25.21±2.94 [#]	1.88±0.43 [#]
Sal	2.5	124±29	23.19±2.45	2.15±0.57
	5.0	139±31 [†]	21.34±2.37	2.67±0.74 [†]
	10.0	164±35 ^{†*}	16.19±2.42 [*]	4.09±0.96 [*]

与假手术组比较:## P<0.01; 与对照组比较:* P<0.05 ** P<0.01

2.3 Sal 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响:大鼠局灶性脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后,所有动物均出现了神经功能缺损,对照组大鼠尤为明显。Sal 5, 10 mg/kg iv 可使局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠神

1.5 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型:取 Wistar 大鼠 80 只,分组及给药同 1.4,每组动物 16 只。末次给药后 10 min,按吴俊芳等^[7]的方法,用插鱼线法阻塞大鼠大脑中动脉,2 h 后再恢复血供。神经功能缺损在大鼠局灶性脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后观察,其严重程度参照文献^[7]分为 8 级。断头取脑,部分脑组织以 TTC 染色法测定脑梗死灶面积,部分于 -20℃ 储存,供生化测定。

1.6 脑组织 LDH SOD 活性及 MDA 含量的测定:小鼠和大鼠分别断头取脑,去除小脑和脑干,制成 10% 匀浆,经分级离心后取上清液,按硫代巴比妥酸法^[8]测定 MDA 含量,按试剂盒说明书测定 LDH 活性,按 Mizuno 的方法^[9]测定 SOD 活力。蛋白质定量用 Folin 酚法^[10]。

1.7 统计学处理:所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异的显著性用 t 检验。

2 结果

2.1 Sal 对小鼠脑缺血再灌注损伤的影响:如表 1 所示,脑缺血再灌注小鼠脑组织 LDH SOD 活性显著下降,脂质过氧化产物 MDA 含量显著升高。Sal 10, 20 mg/kg iv, 1 次/日,连续 3 d,可明显抑制缺血再灌小鼠脑组织 LDH SOD 活性的下降,并减少 MDA 的生成。

Sal 5, 10 mg/kg iv 能显著提高缺血脑组织的 LDH SOD 活力,降低 MDA 含量,但不能达到假手术组水平(表 2)。

经功能缺损明显减轻,且能明显缩小脑梗死灶面积(表 3)。如表 4 所示,大鼠局灶性脑缺血再灌注后,脑组织 LDH SOD 活力有显著下降,MDA 含量有显著升高,而 Sal 5, 10 mg/kg iv 可显著抑制 LDH

SOD活性的下降以及MDA含量的增高

表3 Sal对局灶性脑缺血大鼠神经功能缺损及梗死面积的影响 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg·d)	神经功能评分 (级)	梗死面积 (%)
假手术组	—	1.3±0.23	0
对照组	—	5.7±1.15 [#]	27.3±3.78 [#]
Sal	2.5	4.9±0.82	25.2±3.42
	5.0	4.3±0.95 [△]	22.45±3.16 [△]
	10.0	3.2±0.76 [*]	19.37±3.14 [*]

与假手术组比较: [#] P < 0.01

与对照组比较: ^{*} P < 0.05 ^{**} P < 0.01

表4 Sal对局灶性脑缺血大鼠脑组织LDH SOD活力及MDA含量的影响 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg·d)	LDH (U/mg蛋白)	MDA (nmol/mg蛋白)	SOD (U/mg蛋白)
假手术组	—	170±32	12.79±1.64	5.1±0.94
对照组	—	96±25 [#]	23.2±2.57 [#]	1.97±0.51 [#]
Sal	2.5	112±27	21.18±2.31	2.63±0.85
	5.0	133±29	19.87±2.35	3.32±0.88 [*]
	10.0	15±34 [*]	14.55±2.08 [*]	4.0±0.97 [*]

与假手术组比较: [#] P < 0.01; 与对照组比较: ^{*} P < 0.05 ^{**} P < 0.01

3 讨论

缺血性脑血管疾病是临床上常见且预后不良的一种疾病,严重影响着人类的健康。由于其发病机制复杂,迄今为止,临床上应用的各类治疗药物仍效果不甚理想。因而寻找疗效确切,毒副作用小的抗脑卒中药物,仍然是药理学工作者的迫切任务。

目前国际上趋向认为,抗氧化剂对治疗脑缺血特别是脑缺血再灌注损伤是一个值得重视的新途径。我们已经证明^[3],丹酚酸具有很强的抗氧化作用。在体外,Sal能抑制Fe²⁺—半胱氨酸诱导的肝微粒体脂

Liu等^[1]在心肌缺血再灌注实验的结果是一致的
参考文献:

[1] Liu Y, Zhang J T. Hydroxyl radical scavenging effect of salvianolic acids [J]. J Chin Pharm Sci, 1994, 3: 43-46.
 [2] 黄治森,张均田. 丹参中三种水溶性成分的体外抗氧化作用[J]. 药学学报, 1992, 27(2): 96-100.
 [3] 王洁,吴俊芳,张均田. 总丹酚酸的抗脑缺血研究[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(2): 164.
 [4] 杜冠华,裴月,田月娥,等. 丹酚酸A对大鼠半乳糖性白内障形成的抑制作用[J]. 药学学报, 1995, 30(8): 561-566.
 [5] 陈志武,马佳庚,赵维忠. 金丝桃苷对脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. 药学学报, 1998, 33(1): 14-17.
 [6] 潘鑫鑫,刘天培. 人参总皂苷对急性脑缺血的保护作用[J]. 南京医学院学报, 1992, 12(3): 237-239.
 [7] 吴俊芳,史以菊,刘天培. 小檗碱对小鼠和大鼠脑缺血的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1995, 9(2): 100-103.
 [8] Yoshida S, Busto R, Watson B D, et al. Changes in superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activities and thiobarbituric acidreactive products levels in early stages of development in dystrophic chickens [J]. Exp Neurol, 1984, 84(1): 58-73.
 [9] Mizuno Y. Postischemic cerebral lipid peroxidation in vitro modification by dietary vitamin [J]. E J Neurochem, 1985, 44(5): 1593-1601.
 [10] Lowry O H, Rosenbaum N J, Farr A L. Protein measurement with folin phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-271.

质过氧化,并能直接清除黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶体系产生的超氧阴离子以及Fe²⁺-H₂O₂体系产生的羟自由基。在本实验的小鼠和大鼠全脑缺血再灌注损伤模型上,我们观察到Sal能明显抑制缺血脑组织LDH活性的下降,显示了其抗脑缺血再灌注损伤的作用。而减轻细胞损伤,缩小梗死面积和改善运动功能,是治疗脑缺血的最终目的。本文在大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型上也以此作为判断Sal是否有保护缺血脑组织的直接指标。结果显示,Sal 5, 10 mg/kg iv 能有效地缩小脑梗死灶面积,减轻神经功能缺损。

众所周知,氧自由基与脑缺血再灌注损伤有着密切关系。脑缺血再灌注时,大量氧自由基产生,攻击生物膜的不饱和脂肪酸,使膜发生脂质过氧化损伤,进而加剧神经细胞的损害。本实验显示,Sal能明显抑制缺血再灌注脑组织脂质过氧化产物MDA的过量生成。Sal还可显著提高脑组织SOD活性,这有利于清除自由基,减少膜脂质过氧化损伤。这与

新书介绍——《植物活性成分辞典》第一册

《植物活性成分辞典》是天津药物研究院在科技部生命中心和原国家医药管理局新药管理办公室支持下建立的《植物活性成分数据库》的基础上编纂而成。全书由中国医药科技出版社分三册陆续出版。第一册收载国内外1982-1998年报道的植物活性成分1153个(近200万字),每一成分包括中文名、英文名、别名、化学名、结构式、CA登录号、分子式、分子量、化学分类、物理性状、植物来源、生物活性、专利状况和参考文献14项内容。正文后有6个索引(中文名、英文名、植物学名、CA登录号、分子式、生物活性),通过索引即可找到正文。

本书第一册已于2001年1月正式出版。每本186元,加邮费10元,共196.00元/本。欲订者请与《植物活性成分数据库》周北君联系。

地址:天津市南开区鞍山西道308号 天津药物研究院 植物活性成分数据库
 邮编:300193 联系电话:022-23006825 E-mail:tipi@tjlink.tisti.ac.cn