

可能的作用机制是通过西红花酸的抗氧化作用,而发挥膜保护作用,从而阻止 LDH 外漏,保护线粒体膜,提高线粒体膜电位和琥珀酸脱氢酶活力,保证心肌细胞的能量供应。

References

[1] Ferrai R, Agnoletti L, Comini L, et al. Oxidative stress during myocardial ischemia and heart failure [J]. *Eur Heart J*, 1998, 19(Suppl1B): B2-B11.

[2] Wang D Q, She W M, Tian Y P, et al. Cell damage in Chinese Hamster V79 cells treated with hydrogen peroxide [J]. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 1995, 22(3): 278-281.

[3] Maclellan W R, Schneider M D. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease [J]. *Cir Res*, 1997, 81(2): 137-144.

[4] Gao W Y, Zhu D Y. Advances in chemical and pharmacological studies on Crocus (*Crocus L.*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(5): 389-391.

[5] Gong G Q, Liu T Z, Li L W, et al. Antioxidative activity of crocetin *in vitro* [J]. *China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(4): 306-309.

[6] Wang B H, Polya G M. Selective inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase by amphiphilic triterpenoids and related compounds [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(1): 55-63.

[7] Rao S Y, Qian Z Y. Cardioprotective effect of crocetin against low glucose and hypoxia injury in cultured rat cardiac myocytes [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(4): 427-429.

[8] Mak I T, Weglicki W B. Protection by  $\beta$ blocking agents against free mediated sarcolemmal lipid peroxidation [J]. *Circ Res*, 1988, 63(1): 262-266.

[9] Gao C X, Ding Z S, Kang W Y, et al. The study of damaging effect of hydroxyl radicals on cultured myocardial cells [J]. *J Zhejiang Tradit Chin Med Coll* (浙江中医学院学报), 2002, 26(3): 52-54.

[10] Sureda F X, Escubedo E, Gabriel C, et al. Mitochondrial membrane potential measurement in rat cerebellar neurons by flow cytometry [J]. *Cytometry*, 1997, 28(1): 74-80.

## 肉苁蓉总苷对大鼠局灶性脑缺血损伤的影响

蒋晓燕, 王晓雯, 王雪飞, 刘凤霞, 孟新珍, 朱伟江\*  
(新疆医科大学 药理教研室, 新疆 乌鲁木齐 830054)

**摘要:**目的 研究肉苁蓉总苷(GCs)对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用。方法 采用插线法阻塞大鼠大脑中动脉(MCAO)制造大鼠局灶性脑缺血模型,采用NBT染色测定脑梗死范围,用“重量求面积法”计算梗死组织占对侧大脑质量的百分比作为对梗死范围的判定,行为指标评分采用11分评分制,并测定缺血脑组织的抗氧化酶活性及丙二醛(MDA)含量。结果 GCs 125, 250mg/kg可明显缩小脑梗死范围,改善神经症状,脑组织超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性明显升高,MDA含量显著下降。结论 GCs对大鼠局灶性脑缺血损伤具有神经保护作用,此作用可能与SOD、GSH-Px活性水平的升高有关。

**关键词:** 肉苁蓉总苷; 局灶性脑缺血; 抗氧化酶; 丙二醛

中图分类号: R286.10 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)06-0660-03

### Effects of glycosides of cistanche on focal cerebral ischemic rats

J IANG X iao-yan, WANG X iao-w en, WANG X ue-fei, L I U Feng-x ia,  
M EN G X in-zhen, ZHU W ei-jiang

(Department of Phamacology, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

**Abstract:** **Object** To study the protective effects of glycosides of cistanche (GCs) on focal cerebral ischemic rats. **Methods** Focal cerebral ischemia in rats was induced by 24 h occlusion of the middle cerebral artery (MCAO). The infarct area was measured by nitrobenzene thiocyanate (NBT) staining technique. The content of neurological deficits was evaluated by 0—11 scales. The activities of antioxidant enzymes and contents of MDA in ischemic brain tissue were analyzed. **Results** Significant decrease in infarct area and improvement in neurological deficits were observed by oral administration of GCs 125, 250 mg/kg, respectively. Significant increase in activities of SOD and GSH-Px, and significant decrease in contents of MDA in rats were also observed after 24 h MCAO. **Conclusion** GCs has a neuroprotective effect against focal cerebral ischemia and the effect may be related to the increase in activities of SOD and GSH-Px.

**Key words:** glycosides of cistanche (GCs); focal cerebral ischemia; antioxidant enzyme; MDA

收稿日期: 2003-10-13

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (200121112)

作者简介: 蒋晓燕(1972—),女,湖北省武汉市人,讲师,硕士,现于上海第二医科大学神经生物学实验室攻读博士学位,研究方向为生化药理。Tel: (021) 63846590-776577 E-mail: wxfxjy22103@hotmail.com

脑缺血是临床常见病,其发病通常与氧自由基、兴奋性氨基酸、钙离子等密切相关。肉苁蓉总苷(glycosides of cistanche, GCs)是从北疆产盐生肉苁蓉 *Cistanche salsa* (C. A. Mey.) Benth. et Hook. f. 中提取,主要成分为苯乙醇苷类。本教研室前期研究发现 GCs 为强抗氧化剂<sup>[1]</sup>,具有抗心肌缺血作用<sup>[2]</sup>,但对脑缺血的作用尚未见报道。本实验采用插线法阻塞大鼠大脑中动脉(MCAO)制备局灶性脑缺血模型,观察 GCs 的抗局灶性脑缺血作用,并初步探讨其机制。

## 1 材料

1.1 药品与试剂: GCs 由新疆医科大学药学院植化教研室提供,其中苯乙醇苷含量 > 60%,代表成分是松果菊苷和麦角甾苷;银杏叶片,贵州信邦制药股份有限公司产品,国药准字 Z 20028023。硝基四氮唑蓝(NBT)为上海前进试剂厂产品;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒由南京建成生物工程公司提供;1,1,3,3-四乙氧基丙烷(1,1,3,3-tetraethoxypropane, TEP)为 Sigma 公司产品;5,5-二硫代双(2-硝基苯甲酸) [5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), DTNB] 为 Fluka 公司产品;考马斯亮蓝(Coomassie Brilliant Blue, CBB) G250,为 Fluka 公司产品;还原型谷胱甘肽,中国科学院上海生物化学研究所东风生物化学技术公司产品。其余试剂均为市售分析纯。

1.2 动物:Wistar 大鼠,雄性,体重 280~350 g,由新疆医科大学实验动物中心提供。

## 2 方法

2.1 局灶性脑缺血大鼠模型制备<sup>[3]</sup>:大鼠以水合氯醛 350 mg/kg, ip 麻醉,仰卧位固定,颈正中切口,依次暴露右侧颈总、颈外和颈内动脉,结扎颈外动脉及其分枝和翼腭突动脉以阻断颅外来源的侧副循环血流。在颈总动脉上剪一小口,将一端加热成圆珠状(< 0.3 mm)的尼龙线(直径 0.242 mm)插入小口,当进线约 18 mm 时可明显感到阻力,同时可见颈内动脉颅外段弯曲、紧张,此时再插入约 2 mm,表明线的头端已穿过大脑中动脉起始部。然后将颈总动脉残段用丝线结扎,以防插线脱落。假手术组动物除不插入尼龙线至颈内动脉外所有操作均同手术组(术中、术后室温严格控制在 24~25℃)。

2.2 分组及给药:大鼠随机分为 5 组,每组 8 只,分别为:假手术组、模型组(于造模手术前 1 周 ig 生理盐水 20 mL/kg)、GCs 大、小剂量组(分别于造模手术前 1 周 ig GCs 250, 125 mg/kg, 每天 1 次)、

阳性对照组(于造模手术前 1 周 ig 银杏叶片 50 mg/kg, 每日 1 次)。

2.3 行为指标评分<sup>[3]</sup>:分别于大鼠手术后 12, 24 h 进行行为评分。标准如下:提鼠尾离开地面约 30 cm,左前肢表现为腕屈曲、肘屈曲、肩内旋或兼而有之者,计 1~4 分;将动物置于光滑平面上,轻推肩部使其向对侧移动,检查阻力情况,降低者根据程度不同计 1~3 分;根据左前肢肌张力下降程度的差异,计 1~3 分;动物有向一侧不停转圈现象计 1 分。满分为 11 分,分数越高,动物的行为障碍越严重。

2.4 脑梗死范围的测定<sup>[4]</sup>:缺血 24 h 后大鼠断头取脑,去掉嗅球、小脑及低位脑干,沿冠状面切成 5 片,立即置于 NBT 染液(2 g/L)中,避光 37℃ 水浴孵育 20 min。取出脑片放入 10% 福尔马林中固定。正常组织染成蓝色,坏死组织呈白色。用“重量求面积法”计算梗死脑组织质量占对侧大脑质量的百分比作为对梗死范围的判定。

2.5 氧化酶活性及丙二醛(MDA)含量测定:大鼠断头取脑,去掉嗅球、小脑及低位脑干,在冰上用冰生理盐水制成 10% 组织匀浆,经 10 000 × g 于 4℃ 离心 20 min,取上清液待测。SOD 活性测定用黄嘌呤氧化酶法;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性测定用 DTNB 直接法<sup>[5]</sup>;MDA 含量测定用 TBA 显色法<sup>[6]</sup>;蛋白质定量测定用 CBB-SSD 法<sup>[7]</sup>。

2.6 统计方法:所用资料采用 SPSS 10.0 软件处理,计量资料数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,统计推断采用 ANOVA 检验。

## 3 结果

3.1 对大鼠局灶性脑缺血损伤的神经保护作用:结果见表 1。大鼠手术 12, 24 h 后,所有动物均出现了神经症状,主要表现为提尾悬空时,左肩内旋,左前肢内收,肌力下降,行走时向左侧环转,缺血 24 h 时尤为明显。脑组织出现明显的梗死灶。GCs 能显著

表 1 GCs 对脑缺血大鼠的神经保护作用 ( $\bar{x} \pm s$ , n = 8)

Table 1 Protective effect of GCs on nerve system in cerebral ischemia rats ( $\bar{x} \pm s$ , n = 8)

组别	剂量 (mg · kg <sup>-1</sup> )	行为指标评分		脑梗死范围 /%
		12 h	24 h	
假手术	-	0.63 ± 1.19**	0.50 ± 0.93**	0.00 ± 0.00**
模型	-	6.70 ± 1.16	6.60 ± 0.97	31.42 ± 6.70
GCs	125	4.25 ± 1.04**	3.50 ± 1.41**	23.34 ± 7.35*
	250	4.78 ± 1.20**	2.67 ± 1.12**	21.06 ± 7.03**
银杏叶片	50	3.50 ± 1.19**	3.50 ± 1.20**	19.91 ± 6.44**

与模型组比较: \*P < 0.05 \*\*P < 0.01

\*P < 0.05 \*\*P < 0.01 vs model group

改善大鼠的神经功能缺损, 缩小脑梗死面积 ( $P < 0.05, 0.01$ ), GCs 具有神经保护作用。

3.2 对抗氧化酶活性及 MDA 含量的影响: 结果见表 2。大鼠手术 24 h 后, 脑组织 SOD 活性明显下降, MDA 含量显著升高, 与假手术组比较差异显著 ( $P < 0.01$ )。GCs 显著升高脑组织 SOD, GSH-Px 活性, 降低 MDA 含量 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

表 2 GCs 对脑缺血大鼠脑组织 SOD, GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effect of GCs on activities of SOD and GSH-Px, and content of MDA in brain tissue of cerebral ischemia rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /(mg · kg <sup>-1</sup> )	SOD /(U · mg <sup>-1</sup> )	GSH-Px /(U · mg <sup>-1</sup> )	MDA /(mmol · mg <sup>-1</sup> )
假手术	-	7.84 ± 0.31**	2.02 ± 0.49	0.39 ± 0.04**
模型	-	6.72 ± 0.74	1.73 ± 0.51	0.62 ± 0.10
GCs	125	8.08 ± 0.43**	2.69 ± 0.94*	0.38 ± 0.09**
	250	7.88 ± 0.45**	3.05 ± 0.72**	0.29 ± 0.12**
银杏叶片	50	6.99 ± 0.69	3.08 ± 0.35**	0.47 ± 0.04**

与模型组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs model group

#### 4 讨论

脑卒中患者以局部脑缺血为多见, 而人类缺血性脑卒中的好发部位多在大脑中动脉及其分枝, 故选择阻断大脑中动脉形成局灶性脑缺血的模型与人类脑卒中最为相似。本实验采用插线法阻断大脑中动脉造成脑缺血损伤模型, 研究 GCs 对脑缺血损伤的影响。结果观察到大鼠手术后 12, 24 h 所有动物均出现了神经症状, 脑组织出现明显的梗死灶, 缺血 24 h 时尤为明显, 说明模型制备成功。

氧自由基在脑缺血损伤中起着重要作用。正常机体氧自由基产生与清除处于动态平衡, 脑缺血时,

防御系统受损, 氧自由基生成增加, 攻击生物膜, 发生脂质过氧化, 多价不饱和脂肪酸被破坏, 生成毒性中间产物 (如脂氢过氧化物) 及终末产物丙二醛等。丙二醛可交联蛋白质和磷脂上的氨基, 降低膜流动性, 致细胞变形, 功能受损, GCs 经证实有抗氧化作用, 包括抗脂质过氧化、清除超氧阴离子、抑制并清除羟自由基的作用<sup>[1]</sup>。本实验测定了大鼠脑缺血状态下 SOD、GSH-Px 活性的变化, 结果在脑缺血 24 h 时, 脑组织 SOD 的活性明显降低, GSH-Px 变化不大, MDA 含量显著升高。而 GCs 能显著改善大鼠的神经症状, 缩小脑梗死范围, 提高 SOD、GSH-Px 活性, 并降低 MDA 含量。表明 GCs 具有神经保护作用, 可能是通过升高脑组织抗氧化酶活性, 抑制脂质过氧化反应来保护脑组织免受缺血的损伤。GCs 的这种抗氧化作用可能与其结构中含有酚羟基有关, 具体机制有待进一步研究。

#### References

- [1] Wang X W, Jiang X Y, Wu L Y, et al. Scavenging effects of glycosides of cistanche on free radicals and its protection against OH · induced DNA damage in vitro [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2001, 36(1): 29-31.
- [2] Mao X M, Wang X W, Li L L, et al. The protective effect of glycosides of cistanche on myocardial ischemia in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(2): 118-119.
- [3] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [4] Wu H P, Zhu X G. The protective effect of total glucosides of paeony on cerebral infarction in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2001, 17(2): 223-225.
- [5] Xia Y M, Zhu L Z. The determination of glutathione peroxidase in blood and tissue-DTNB direct method [J]. *J Hyg Res* (卫生研究), 1987, 16(4): 29-32.
- [6] Chen S Z, Jin Y Y. Comparison of three methods in coloration of lipid peroxidation using TBA [J]. *J Clin Lab Sci* (临床检验杂志), 1984, 2(4): 8-10.
- [7] Macart M, Gerbaut L. An improvement of the coomassive blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins: application to cerebrospinal fluid [J]. *Clin Chem Acta*, 1982, 112(1): 93-101.

## 丹酚酸 B 及欧芹素乙对溶血磷脂酰胆碱刺激牛主动脉平滑肌细胞增殖的影响

王杰松<sup>1</sup>, 芮耀诚<sup>2</sup>, 倪震宇<sup>3</sup>, 刘昌叶<sup>1</sup>, 常 华<sup>1\*</sup>

(1. 解放军第 306 医院, 北京 100101; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433;

3. 成都军区联勤部药品仪器检验所, 四川 成都 610003)

摘要: 目的 研究溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 对牛主动脉平滑肌细胞 (BASMC) 增殖的影响及丹酚酸 B 和欧芹素乙的抑制作用。方法 体外培养 BASMC, 用 MTT 法测定细胞增殖。结果 LPC 在  $2.5 \times 10^{-9} \sim 2.5 \times 10^{-6} \text{ g/L}$  剂

\* 收稿日期: 2003-09-26

作者简介: 王杰松(1966—), 男, 安徽怀宁人, 博士, 副主任药师, 主要从事心脑血管药理学研究。 Tel: (010) 66356171