

## 乌苏里藜芦碱对大鼠脑缺血-再灌注损伤的保护作用

由广旭<sup>1</sup>,周 琴<sup>1</sup>,李卫平<sup>1\*</sup>,韩国柱<sup>1</sup>,赵伟杰<sup>2</sup>

(1. 大连医科大学基础医学院 药理教研室,辽宁 大连 116027; 2. 大连理工大学 化学制药系,辽宁 大连 116027)

**摘要:**目的 研究乌苏里藜芦碱(VnA)对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤的保护作用及可能机制。方法 采用线栓法制备大鼠大脑中动脉栓塞(MCAO)模型,缺血90 min后再灌注24 h,观察VnA对大鼠神经行为、脑梗死灶大小、相关脑区组织病理学改变、细胞间黏附分子(ICAM-1)和神经元型一氧化氮合酶(nNOS)阳性细胞表达的影响。结果 与对照组相比,VnA各给药组均能显著改善大鼠神经功能障碍,降低行为评分,并降低相关脑区神经元损伤程度;并能显著降低缺血-再灌注后大鼠脑梗死面积,20、40 μg/kg VnA分别使脑梗死面积降低34.3% ( $P < 0.05$ )和61.6% ( $P < 0.01$ )。VnA可显著抑制大鼠局灶性脑缺血-再灌注区ICAM-1表达,但对nNOS表达无明显影响。结论 VnA对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤有保护作用,其保护作用与降低损伤区ICAM-1有关。

**关键词:**乌苏里藜芦碱;脑缺血-再灌注;细胞间黏附分子-1;神经元型一氧化氮合酶

**中图分类号:**R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2004)08-0908-04

### Neuroprotection of *Veratrum nigrum* var. *ussuriense* alkaloids on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

YOU Guang-xu<sup>1</sup>, ZHOU Qin<sup>1</sup>, LI Wei-ping<sup>1</sup>, HAN Guo-zhu<sup>1</sup>, ZHAO Wei-jie<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacology, College of Basic Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116027, China;

2. Department of Chemical Pharmaceutical, Dalian University of Technology, Dalian 116027, China)

**Key words:** *Veratrum nigrum* L. var. *ussuriense* Nakai alkaloids (VnA); cerebral ischemia-reperfusion (CIR); intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1); nitric oxide synthase (nNOS)

藜芦系百合科多年生草本植物藜芦 *Veratrum nigrum* L. 的根及根茎。始载于《神农本草经》,有涌吐风痰作用。“藜芦可用于治疗中风失语、黄疸、疥疽”(《中药大辞典》),提示其有抗脑缺血作用。本实验采用的是从千山乌苏里藜芦 *V. nigrum* L. var. *ussuriense* Nakai 根中提取的乌苏里藜芦碱(*V. nigrum* L. var. *ussuriense* Nakai alkaloids, VnA)。经色谱等现代分析技术证明,该总碱中至少含有11种酯型异甾体生物碱<sup>[1]</sup>。现代研究证实本品具有降压和抗血栓作用<sup>[1~3]</sup>,本实验室曾发现其对永久性全脑和局灶性缺血性脑损伤具有保护作用<sup>[4]</sup>,本研究旨在进一步探讨其对局灶性脑缺血-再灌注损伤的保护作用及可能机制。

#### 1 材料

1.1 药品和试剂:盐酸乌苏里藜芦碱注射液(100 μg/mL),大连医药科学研究所植化室,批号950613,用前以生理盐水稀释成所需浓度;红四氮唑(TTC),上海试剂三厂(化学纯);SABC试剂盒,武汉博士德试剂公司。

1.2 仪器:SXP—1手术显微镜,上海医用光学仪器厂;显微镜,日本OLYMPUS公司;HPIAS—1000高清晰度彩色病理图文分析系统,同济医科大学千屏影像工程公司;MA240D电子天平,上海第二天平仪器厂;小型三用水箱,北京医疗设备总厂。

#### 2 方法

2.1 动物及分组:雄性SD大鼠,体重280~320 g(大连医科大学实验动物中心提供)。随机分为4组:模型+NS组、模型+VnA(20 μg/kg)组、模型+VnA(40 μg/kg)组、假手术组。

#### 2.2 对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤的影响

2.2.1 大鼠局灶性脑缺血-再灌注模型的制备:线栓制备:单股尼龙线(日本)直径0.26 mm,头端5 mm均匀涂以硅树脂,加工后直径为0.40 mm,光镜下见表面光滑。在距起始端18.0 mm处作标志,酒精清洁后置生理盐水中备用。取SD大鼠,12%水合氯醛360 mg/kg,ip麻醉,无菌条件下,参考Koizumi方法<sup>[5]</sup>将线栓经颈外动脉插入颈内动脉行大脑中动脉栓塞,造成局灶性缺血。缺血1.5 h

\* 收稿日期:2003-12-03

作者简介:由广旭(1972—),男,辽宁省海城人,医学硕士,主治医师,现于沈阳军区大连第一疗养院工作,主要从事脑血管病康复医疗及研究。

\* 通讯作者

后将插线退出至颈外动脉残端,进行再灌注。假手术组除不插线栓外,其余操作同其他组。术中以灯照保持动物体温恒定,控制室温恒定在 25℃。

模型成功标准:动物苏醒后出现线栓同侧 Horner 征和线栓对侧肢体瘫痪,表现为左前肢不能伸出、行走时向左侧倾倒或按逆时针方向旋转。

2.2.2 给药方法:各组均于再灌注时尾 iv 相应剂量的药物,6 h 后重复给药 1 次。

2.2.3 神经行为指标评定:参考文献方法<sup>[6]</sup>,大鼠于再灌注 4 h 及 24 h 各评分 1 次,评分标准:提鼠尾悬空时,左肩内旋,左前肢内收,屈曲,依程度轻重评 1~4 分;将大鼠置于光滑地面,推双侧前肩,右肩阻力下降评 1~3 分;提鼠尾,使其两前爪抓金属网,判断左前肢肌张力下降程度评 1~3 分。满分为 10 分,为避免主观操作的干扰,采用单盲法。

2.2.4 梗死面积测定:于再灌注 24 h 断头处死,迅速取脑,去嗅球、小脑及低位脑干,按照解剖位置切成厚约 2 mm 的脑片,切点依次为:前脑最前端与视交叉的边线中点处;视交叉处;漏斗柄处;漏斗柄与枕叶尾端中点处。将脑片置于 1% TTC 染色,正常组织染成玫瑰红色,梗死组织为白色。用图像分析系统统计梗死区及全脑区面积,计算梗死面积百分比。

2.2.5 病理改变:取上述第 3 片脑片做病理切片,常规石蜡包埋,切片(厚约 5 μm) HE 染色,在光学显微镜下,观察缺血区及缺血周边区病理改变,相邻切片用于免疫组化染色。

2.2.6 统计方法:实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS10.0 统计软件包 One-Way ANOVA 法检验,组间用 LSD 法两两比较。

2.3 对局灶性脑缺血-再灌注损伤区细胞间黏附分子(ICAM-1)及神经元型一氧化氮合酶(nNOS)表达的影响

2.3.1 免疫组织化学染色:取上述第 3 片脑片切片,参照武汉博士德试剂公司说明书操作,进行免疫组化的 SABC 法染色。

2.3.2 指标观察及统计方法:在光镜(10×10)下,以阳性染色的单个神经细胞为一个阳性标记,每例观察 1 张切片,于右侧纹状体及其周围皮质区随机选取 5 个相互非重叠视野进行观察,进行定量图像分析,测出每平方毫米组织切片的阳性神经细胞数,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,SPSS10.0 统计软件进行 *t* 检验。

### 3 结果

#### 3.1 对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤的影响

3.1.1 对局灶性脑缺血-再灌注大鼠行为指标的影响:于再灌注 4 h 及 24 h 各评分 1 次,除假手术组外,其余各组均出现不同程度神经功能障碍。24 h 时症状较 4 h 时有所减轻。与模型+NS 组相比,模型+VnA 组均能显著改善大鼠神经功能障碍( $P < 0.05, 0.01$ ),两剂量组之间差异无显著性( $P > 0.05$ )。结果见表 1。

表 1 VnA 对脑缺血-再灌注损伤大鼠神经行为评分的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of VnA on score of neurological deficits in CIR rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	动物数 /只	评分	
			4 h	24 h
模型+NS	-	7	7.9 ± 1.5	6.0 ± 0.6
模型+VnA	20	9	5.9 ± 1.4 *	4.5 ± 1.0 **
	40	9	4.9 ± 1.7 **	4.0 ± 0.6 **
假手术	-	6	0	0

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

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

3.1.2 对局灶性脑缺血-再灌注大鼠脑梗死面积的影响:与模型+NS 组相比,VnA 可明显缩小缺血-再灌注后的脑梗死面积,VnA 20 及 40 μg/kg 使梗死面积分别减少 39.0% 和 67.4% ( $P < 0.05, 0.01$ ),但两给药组间差异无显著性( $P > 0.05$ ),结果见表 2。

表 2 VnA 对脑缺血-再灌注损伤大鼠脑梗死面积的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of VnA on infarction area in CIR rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	动物数 /只	梗死面积百分比	抑制率
			/ %	/ %
模型+NS	-	6	19.1 ± 5.1	-
模型+VnA	20	6	10.1 ± 5.8 *	34.3
	40	6	5.1 ± 4.2 **	61.6
假手术	-	6	0	-

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

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

3.1.3 组织形态学和病理学改变:假手术组大脑半球外观正常,切片 HE 染色镜下见手术侧半球组织结构无异常。模型+NS 组大体见额颞顶部颜色苍白、肿胀,并向对侧移位,脑表面静脉充血。切片 HE 染色镜下见神经细胞呈三角形,胞浆呈深伊红着色,核固缩或溶解,半影区有不同程度的渗出,细胞间隙增大,神经细胞肿胀,梗死灶主要分布于额顶叶皮质及纹状体区域,后者明显。模型+VnA 组大

体见额颞顶部略苍白,轻度肿胀,无移位,切片 HE 染色镜下可见细胞肿胀程度、间隙及胞核变化均较模型 + NS 组轻。

3.2 对局灶性脑缺血-再灌注梗死区 ICAM-1 表达的影响:在脑组织切片中 ICAM-1 免疫阳性染色表现为神经元及血管内皮细胞胞浆棕黄色深染。假手术组双侧大脑半球均只有极少量的 ICAM-1 阳性染色血管;模型 + NS 组及两给药组未缺血侧脑半球可见少量的、低表达的 ICAM-1 免疫阳性血管,但神经细胞未见阳性染色。明显的 ICAM-1 免疫阳性染色出现在缺血-再灌注侧半球,阳性反应部位主要以梗死灶及其周围区域的神经细胞为主,而且缺血区皮质星形细胞表达最为明显。镜下观察两给药组、模型 + NS 组阳性细胞表达数量均明显高于假手术组,给药组较模型组明显减少,差异有显著性 ( $P < 0.01$ ),两剂量间差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。结果见表 3。

表 3 VnA 对脑缺血-再灌注损伤大鼠梗死区 ICAM-1 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of VnA on ICAM-1 expression in ischemic lesion area of CIR rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	动物数 / 只	阳性神经细胞数 / ( $\text{个} \cdot \text{mm}^{-2}$ )
模型 + NS	-	6	288 $\pm$ 48
模型 + VnA	20	7	223 $\pm$ 52 *
	40	6	194 $\pm$ 35 **
假手术	-	6	8 $\pm$ 3 **

与模型 + NS 组比较: \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$ ; 与假手术组比较:  $P < 0.01$

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  vs model + NS group;  $P < 0.01$  vs Sham operation group

3.3 对局灶性脑缺血-再灌注大鼠脑梗死周边区 nNOS 表达的影响:nNOS 阳性表达表现为胞浆或血管壁棕黄色深染。本实验结果显示:假手术组双侧脑半球、模型 + NS 组与给药组左侧脑半球除少数微血管可见内皮细胞染色阳性外,余未见明显染色。模型 + NS 组与给药组右侧脑半球缺血区及其周边区损伤和未损伤的神经元都有 nNOS 的阳性表达。镜下观察模型 + NS 组及给药组较假手术组 nNOS 免疫阳性细胞的数量均明显增高 ( $P < 0.01$ ),模型 + NS 组与两给药组之间阳性神经元表达数量差异无显著性 ( $P > 0.05$ ),结果见表 4。

#### 4 讨论

本实验采用局灶性脑缺血-再灌注模型研究了 VnA 对缺血-再灌注性脑损伤的影响,发现 VnA 具有明显的脑保护作用。临床上初次脑卒中的病例中大脑中动脉梗死占 70% 左右,所以大脑中动脉栓

死再灌注模型模拟的病理过程与临床卒中较相

表 4 VnA 对脑缺血-再灌注损伤大鼠脑梗死周边区 nNOS 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effect of VnA on nNOS expression in periphery ischemic lesion area of CIR rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	动物数 / 只	阳性神经细胞数 / ( $\text{个} \cdot \text{mm}^{-2}$ )
模型 + NS	-	6	284 $\pm$ 32
模型 + VnA	20	7	245 $\pm$ 67
	40	6	213 $\pm$ 79
假手术	-	6	11 $\pm$ 3

与假手术组比较:  $P < 0.01$

$P < 0.01$  vs Sham operation group

似。Koizumi 法制备的大鼠脑缺血-再灌注模型梗死灶发生率高,可有效地阻断大鼠 MCA 供血区血流,而且可以模拟血管再通后的再灌注情况,部位固定于皮质及纹状体区,创伤小,损伤程度稳定,术后动物存活期较长。本实验结果显示 VnA 两个剂量组均可明显减小脑缺血-再灌注损伤梗死灶面积,降低缺血周边区神经元损伤程度,改善缺血-再灌注所致行为障碍。据此可推测,VnA 可以挽救濒危的急性缺血神经元,减少缺血周边区转化为梗死区,为受损神经元功能恢复提供机会。另外,VnA 能明显降低损伤后神经行为障碍,可能更具有实际意义。

脑缺血-再灌注后炎症机制是加重缺血区损伤的重要原因。正常情况下,中性粒细胞及血管内皮细胞表面有少量 ICAM-1 表达,中性粒细胞及血管内皮细胞表面黏附分子的亲和力较弱,不会影响血液循环功能。但在脑缺血等病理情况下,ICAM-1 明显上调,细胞黏附性增强,导致白细胞牢固地黏附于血管内皮细胞表面。此改变一方面可机械性堵塞微循环通道,影响组织的血液供应,另一方面活化的以及进入组织内的白细胞可释放大量的毒性氧自由基和蛋白水解酶、炎症介质、细胞因子等,损害局部的血管,导致血管通透性增强,造成组织水肿,破坏残存的神经元和胶质细胞,从而加重神经组织的损伤,并吸引更多的白细胞进入组织,形成恶性循环,直到组织完全破坏。Bowes 等报道在大鼠大脑中动脉缺血-再灌注损伤中使用 ICAM-1 抗体减少了脑缺血性损伤<sup>[7]</sup>。Zhang 等发现在阻断大鼠大脑中动脉 2 h 再灌注 1 h,使用 ICAM-1 单克隆抗体能使缺血性损伤面积明显缩小<sup>[8]</sup>。本实验显示:在脑缺血 1.5 h 再灌注至 24 h,给药组较模型 + NS 组大鼠脑缺血-再灌注区 ICAM-1 免疫阳性神经元数目明显减少,而且形态学观察表明,其相应区域的神经细胞损伤

也轻于模型 + NS 组,提示 VnA 减轻脑缺血性损伤与其阻断血管内皮细胞与白细胞的黏附,抑制中性白细胞的浸润,减轻缺血脑组织的炎症反应有关。

NO 作为多功能生物效应分子,不仅参与细胞的各种生理活动,而且在许多病理过程中也发挥了重要作用。合成 NO 的一氧化氮合酶 (NOS) 存在于脑组织细胞中。缺血早期主要表达结构型一氧化氮合酶 cNOS [cNOS 包括神经元型一氧化氮合酶 (nNOS) 和内皮型一氧化氮合酶 (eNOS)]。已有研究表明 NO 在局灶性脑缺血病理过程中具有双重作用<sup>[9]</sup>,来自 eNOS 的 NO 通过保持局部脑血流起到有益作用,而 nNOS 激活后产生过量 NO 有神经毒性。正常情况下,含 nNOS 的阳性细胞散在于脑实质及脑血管表面,该种神经元约占全脑神经细胞的 2% 左右<sup>[10]</sup>。本研究显示,脑缺血-再灌注 24 h 时,nNOS 大量表达于缺血区神经元而未缺血区却较少表达亦证实了其毒性作用。许多研究已证实选择性 nNOS 抑制剂可减轻缺血性脑损伤。本实验目的之一是观察 VnA 脑保护作用是否有抑制 nNOS 机制参与,结果显示给药组与模型 + NS 组相比未见有显著性差异。

脑缺血的病理过程中有诸多因素参与,VnA 的脑保护作用具体作用于哪些环节有待进一步研究。

## References:

- [1] Li H, Gao G Y, Li S Y, et al. Effects of *Veratrum nigrum* alkaloids on central catecholaminergic neurons of renal hypertensive rats [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 2000, 21 (1): 23-28.
- [2] Chung M I, Teng C M, Cheng K L, et al. An antiplatelet principle of *Veratrum formosanum* [J]. *Planta Med*, 1992, 58(3): 274-276.
- [3] Han G Z. The study of effects of *Veratrum nigrum* alkaloids on antithrombus [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2001, 18(2): 33-34.
- [4] Li W P, Gao D Y, Zhou Q, et al. Neuroprotective effects of VnA on rats with focal cerebral ischemia injury [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 37(8): 624.
- [5] Laing R J, Jakubowski J, Laing R W. Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Which method works best? [J]. *Stroke*, 1993, 24(2): 294-297.
- [6] 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, 17:472-476.
- [7] Bowes M P, Zivin J A, Rothleir R. Monoclonal antibody to the ICAM1 adhesion site reduces neurological damage in a rabbit cerebral embolism stroke model [J]. *Exp Neurol*, 1993, 119 (1): 215-219.
- [8] Zhang R L, Chopp M, Jiang N, et al. Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rats [J]. *Stroke*, 1995, 26(5): 1438-1444.
- [9] Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury [J]. *Trends Neurosci*, 1997, 20(3): 132-139.
- [10] Bredt D S, Huang P H, Snyder S H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide [J]. *Nature*, 1990, 347: 768-770.

## 川芎嗪及其衍生物抗凝血活性的研究

夏承建,王松\*,朱鹤孙

(北京理工大学材料研究中心,北京 100081)

川芎嗪即四甲基吡嗪 (tetramethyl pyrazine, TMPZ),是从伞形科藻本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎中提取分离的生物碱单体,是川芎的主要有效成分,现已可人工合成<sup>[1]</sup>。临床上 TMPZ 主要用于治疗闭塞性脑血管疾病,如脑血栓、脑动脉栓塞等。实验研究表明其具有降压、抗肿瘤、扩张血管、抑制血小板聚集作用,并对已聚集的血小板有解聚作用<sup>[2,3]</sup>。本实验通过测定活化部分凝血激酶时间 (APTT)、凝血酶 (凝固) 时间 (TT) 以及凝血酶原时间 (PT) 3 种指标作为评价标准,初步研究 TMPZ、川芎嗪-1-氮氧化物 (TMPZO)、2-羟甲基-3,5,6-三甲基吡嗪 (TMPZ-OH)、3,

5,6-三甲基吡嗪-2-甲酸 (TMPZ-COOH)、川芎嗪-1,4-双氮氧化物 (TMPZO<sub>2</sub>) 5 种化合物的抗凝血活性。

### 1 材料

1.1 试剂:川芎嗪 (TMPZ),购自百灵威公司;磷酸川芎嗪,购自北京市燕京制药厂,白色结晶性粉末,批号 020401。30% 双氧水,购自天津市东方化工厂。采自健康人体的冰冻血浆,购自北京北太平庄血站。凝血酶、部分凝血活酶、凝血活酶、氯化钙溶液,均购自上海医科大学华山医院技协生物试剂公司。其余试剂均购自北京化学试剂公司,且均为分析纯。

\* 收稿日期:2003-12-18

基金项目:国家重点基础研究“973”项目 (G1999064705)

作者简介:夏承建(1978—),男,山东威海人,北京理工大学材料研究中心 2001 级硕士研究生,主要从事抗凝血材料的研究。

Tel: (010) 68949661(O) (010) 68943346 (H) E-mail: xchengjian @163.com

\*通讯作者 Tel: (010) 68949661 E-mail: wangsong @bit.edu.cn