

血尿停经肝微粒体代谢后可抑制 GMC 的增殖,考虑与血尿停由生地、水牛角粉、知母、当归、旱莲草、生蒲黄、虎杖、三七等组成,具有养阴清热、活血化瘀的功效有关。近年来,大量的实验研究显示,具益气养阴、清热利湿、活血化瘀作用的中药复方能明显抑制系膜增生性肾小球肾炎动物模型的 GMC 增生和系膜基质增多^[7,8],本实验结果与体内实验结果一致。

IL-6 和 ET 都是 GMC 的自分泌细胞因子,也是重要的炎症介质。IL-6 在细胞增生激活转导信号和 Ras/Map 级联反应或 HGF/c-met 轴中起重要作用^[9]。IL-6 在一定浓度范围内以剂量依赖方式诱导 GMC 增生^[10],在肾小球肾炎的发病中有重要作用^[11]。ET 是一种具有 21 个氨基酸的强烈缩血管多肽,肾脏也是其合成的场所。ET-1 是一个能导致 GMC 持续增殖的细胞因子,在肾小球肾炎发病机制中起着重要作用^[12,13]。大量的体内实验研究显示有多种细胞因子参与 GMC 的增生、迁移和黏附。在病理情况下,这些细胞因子刺激 GMC 过度增生,增殖的 GMC 分泌出一系列细胞因子及炎症介质,使损伤进一步扩大。随着 GMC 的增殖及系膜基质的增多,最终导致肾小球硬化、肾单位毁损^[14]。血尿停经肝微粒体代谢后可明显地抑制 IL-6 和 ET-1 的产生,推测血尿停抑制 GMC 增殖的机制可能是通过抑制 IL-6 和 ET-1 的产生,打破了 IL-6、ET-1 和 GMC 增殖之间的恶性循环而实现的。

References:

- [1] Xiao L, Ding Y. The effect of drug granules of Xueniaoting on treating Henoch Schonlein purpura nephritis in children [J]. *Chin J Pediatr Tradit Chin Med* (中国中医儿科杂志), 1999, (2): 120-124.
- [2] Yang X W, Hao M R, Hatoli M. *Metabolite Analysis for Chemical Constituents of Traditional Chinese Medicines* (中药

成分代谢分析) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2003.

- [3] Yao Q Q, Wang M Z. Metabolic transformation of (L)-clausenamide in rat liver microsomes [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, 33(4): 296-299.
- [4] Zheng Y T, Fen K L. The establishment of MTT assay in estimating cell survival and proliferation [J]. *Immunol J* (免疫学杂志), 1992, 8(4): 266-269.
- [5] E Z. *Technique of Tissue Culturation and Molecular Cytology* (组织培养和分子细胞学技术) [M]. Beijing: Beijing Publishing House, 1996.
- [6] Wang H Y. *Nephrology* (肾脏病学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996.
- [7] Zhao J X, Huang W Z, Jia Z J, et al. The experimental study of Yishen Tang treating membrane proliferative nephritis [J]. *Shanxi J Chin Tradit Med* (山西中医), 1993, 9(2): 26.
- [8] Ding Y, Ren X Q. An experimental study of effect of the Shenbining Granule on the mesenteries of mesentery proliferation nephritis models [J]. *Henan J Tradit Chin Med* (河南中医), 2000, 6: 21-23.
- [9] Gohda J, Makita Y, Shike T, et al. Dilazep hydrochloride, an antiplatelet drug, inhibits LPS-induced mouse mesangial cell IL-6 secretion and proliferation [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2001, 24(1): 33-38.
- [10] Wang H J, Zhang Z G, Zhang N, et al. Effect of IL-6, IL-1, and PDGF on the growth of rat mesangial cells *in vitro* [J]. *J Clin Urol* (临床泌尿外科杂志), 2000, 15(12): 556-558.
- [11] Pecoits F R, Lindholm B, Axelsson J, et al. Update on interleukin-6 and its role in chronic renal failure [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(6): 1042-1045.
- [12] Li M H, Shen Y P, Zhang Z W, et al. Inhibition of mesangial cell proliferation and mesangial matrix expansion by antisense oligodeoxy nucleotide targeting preproendothelin 1 mRNA *in vivo* [J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志), 1999, 79(2): 133-135.
- [13] Li M H, Shen Y P, Zhang Z W, et al. The mediation effect of endothelin 1 on human mesangial cell proliferation stimulated by thrombin [J]. *Chin J Intern Med* (中华内科杂志), 1999, 38(3): 153-156.
- [14] Haas C S, Schockmann H O, Lang S, et al. Regulatory mechanism in glomerular mesangial cell proliferation [J]. *J Nephrol*, 1999, 12(6): 405-415.

补阳还五汤 4 类有效部位对局灶性脑缺血大鼠脑梗死体积的影响

唐映红¹, 邓常青^{2*}, 刘旺华², 张秋雁², 李 花², 贺福元³

(1. 湖南中医学院 药理教研室, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医学院 病理生理实验室, 湖南 长沙 410007;
3. 湖南中医学院 药剂学教研室, 湖南 长沙 410007)

摘要:目的 研究补阳还五汤 (BYHWD) 中生物碱、多糖、苷、苷元 4 类有效部位对大鼠局灶性脑缺血 (MCAO) 后局灶性脑缺血大鼠脑梗死的作用。方法 用颈内动脉线栓法建立大鼠局灶性脑缺血模型, 检测脑梗死体积, 并比较其神经功能行为评分。结果 脑缺血 6 h, 模型组脑梗死体积显著增大 ($P < 0.01$), 神经功能行为评分显著升高

收稿日期: 2004-05-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171132); 教育部高等学校学术与技术带头人资助项目; 湖南省优秀博士论文作者科研项目

作者简介: 唐映红 (1962—), 女, 湖南株洲人, 医学硕士, 副研究员, 主要从事心脑血管药理研究。Tel: (0731) 5381272

* 通讯作者 Tel: (0731) 5381111 E-mail: dchangq@sohu.com

($P<0.01$);生物碱、多糖、苷、苷元各组脑梗死体积较模型组缩小 ($P<0.05, 0.01$);生物碱、苷、苷元和多糖可使 MCAO 大鼠神经功能行为评分下降 ($P<0.05, 0.01$),其中以生物碱和苷的作用较强。结论 MCAO 后,大鼠脑组织出现梗死,补阳还五汤 4 类有效部位生物碱、多糖、苷、苷元能减少脑梗死体积,改善脑缺血后神经行为症状。生物碱和苷的抗脑缺血作用较强,这可能是补阳还五汤抗缺血性脑损伤的部分物质基础。

关键词:补阳还五汤;有效部位;脑缺血;大脑中动脉闭塞

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2005)02-0236-04

Effect of four kinds of active fractions of Buyang Huanwu Decoction on cerebral infarction volume in focal cerebral ischemia rats

TANG Ying-hong¹, DENG Chang-qing², LIU Wang-hua², ZHANG Qiu-yan², LI Hua², HE Fu-yuan³

(1. Department of Pharmacology, Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

2. Department of Pathophysiology, Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

3. Department of Pharmaceutics, Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of four kinds of active fractions (alkaloid, polysaccharide, glycoside, aglycone) of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) on the volume of cerebral infarction and the scores of nervous function behavior in focal cerebral ischemia rats after middle cerebral artery occlusion (MCAO). **Methods** The model rats of MCAO were induced by the method of nylon monofilament via the internal carotid artery for 6 h, image analysis technique was used to calculate the volume of cerebral infarction and to record the scores of nervous function behavior, then to compare them. **Results** After cerebral ischemia for 6 h, both the volume of cerebral infarction of rats in the model group and the scores of the nervous function behavior were increased markedly ($P<0.01$); the volumes of cerebral infarction of rats in alkaloid, polysaccharide, glycoside, and aglycone groups were significantly lower than that of rats in the model group ($P<0.05, 0.01$); the scores of the nervous function behavior of rats in alkaloid, polysaccharide, glycoside, and aglycone groups were significantly lower than that of rats in the model group ($P<0.05, 0.01$). Effects of alkaloid and glycoside were superior to that of polysaccharide and aglycone. **Conclusion** After MCAO, the brain tissue occurs infarction. The four kinds of active fractions of BYHWD can decrease the volume of cerebral infarction of rats and improve the nervous function behavior symptom of rats after MCAO. Effects of alkaloid and glycoside are superior to that of polysaccharide and aglycone, which may be the partial substance basis of BYHWD antagonising cerebral ischemia injury.

Key words: Buyang Huanwu Decoction (BYHWD); active fractions; cerebral ischemia; middle cerebral artery occlusion (MCAO)

脑血管病的发病率居各种老年疾病的前 3 位,其中以缺血性脑血管病居多,并有逐渐上升和年轻化的趋势,严重危害着人类健康,影响着病人的生活质量。文献曾报道以益气活血法组方的复方补阳还五汤及其有效部位可对抗脑缺血再灌注损伤,调节缺血后热休克蛋白 70 的表达^[1]。另有研究表明,补阳还五汤及其有效部位可扩张脑血管、改善脑循环、对抗脑缺血后兴奋性氨基酸的毒性等^[2]。脑梗死灶大小是准确评估脑缺血的指标,对于评价药物抗脑缺血的作用具有重要的应用价值。为进一步探讨该方抗脑缺血的物质基础,在前段研究基础上,本实验研究该方 4 类有效部位生物碱、多糖、苷、苷元对脑缺血大鼠脑梗死体积的影响,以进一步明确该方的作用和有效物质基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物:清洁级 SD 大鼠,雌雄兼用,体重

(305.0±14.5) g,中南大学湘雅医学院动物学部提供,合格证号:医动字第 20-010 号。

1.2 药物:补阳还五汤原方由黄芪 60 g,赤芍 9 g,川芎 6 g,当归 9 g,地龙 9 g,桃仁 9 g,红花 9 g 组成。上述药物由本院药剂科购买并鉴定,按该方组成比例提取各类有效部位,调质量浓度为:生物碱 5.25 mg/mL,多糖 20.25 mg/mL,苷元 1.65 mg/mL,苷 33.66 mg/mL。尼莫地平注射液购自浙江一新制药股份有限公司,规格 20 mg/100 mL,批号 01092001。

1.3 主要试剂和仪器:多聚赖氨酸 (Poly-L-Lysine) 为武汉博士德生物有限公司提供,批号 03042512。水合氯醛购自上海五联化工厂,批号 20020624。直径 0.26 mm 单尼龙线为市售,使用前剪成 5 cm 长线段,筛选出前端光滑、钝圆、大小一致者,于 2 cm 处作好标记,前段 3 cm 浸入 0.1%

Poly-L-Lysin, 5 min, 自然晾干, 临用前在前端蘸取肝素。大鼠脑垫 (美国 Zivic Miller 公司生产)。2,3,5-氯化三苯四唑 (TTC), 为 Sigma 公司产品, 用生理盐水配成 2% TTC 溶液。AB204—WO 型电子天平 (瑞士梅特勒-托力多有限公司生产); 马头牌 GPS 型双极电凝器 (上海医用激光仪器厂生产)。

1.4 动物分组及给药: 大鼠按性别、体重随机分为 8 组, 即生物碱组 (0.052 5 g/kg)、苷组 (0.336 6 g/kg)、尼莫地平组 (0.002 g/kg)、假手术组 (生理盐水)、模型 I 组 (生理盐水)、模型 II 组 (蒸馏水)、多糖组 (0.202 5 g/kg)、苷元组 (0.016 5 g/kg)。前 5 组 ip 给药, 给药体积为 10 mL/kg, 于缺血前 5 min 注入; 后 3 组 ig 给药, 体积为 10 mL/kg, 于缺血前 1 h 给药。

1.5 模型制备: 参照文献方法^[3]采用左侧颈内动脉单尼龙线线栓法制备大鼠大脑中动脉闭塞 (MCAO) 局灶性脑缺血模型, 并予以改进。术前禁食 12 h, 自由饮水。实验前 ip 10% 水合氯醛 (0.35 g/kg) 麻醉, 保留自主呼吸, 仰卧位固定, 术中体温由肛温计监测, 并用白炽灯加热维持肛温在 36.5~37 °C, 防止低温对脑缺血的影响。大鼠颈正中切口, 分离暴露左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉和翼腭动脉, 分离过程中电凝血管小分支以防出血。结扎翼腭动脉, 在距颈总动脉分叉 1 cm 处结扎颈外动脉, 并于结扎处远心端用电凝器灼断以游离颈外动脉。动脉夹夹闭颈总动脉, 提起颈外动脉游离端使其与颈内动脉成一直线, 于颈外动脉结扎处近心端约 0.5 cm 处剪一切口, 将线栓蘸取肝素后, 由切口向颈内动脉插入至有阻力感停止 (18.0±0.5 mm), 固定线栓。尼龙线插入深度从颈总动脉分叉处计。手术后动物保温 (28 °C 左右) 饲养, 阻闭 6 h 后处死动物。假手术组仅结扎颈外动脉、翼腭动脉, 不插入线栓。

1.6 神经功能行为评分: 脑缺血 6 h 后采用盲法评估记录神经功能行为评分, 参考文献方法^[4], 各动物各项积分累加为神经功能行为评分值。

1.7 脑梗死体积测定: 神经功能行为评分完成后, 动物麻醉后断头处死, 迅速取脑, 生理盐水冲洗残血, 置 0 °C 生理盐水中 15 min, 再取出置于大鼠脑垫中, 间隔 2 mm 连续做 6 个脑组织冠状切片, 迅速放入 2% TTC 溶液中, 37 °C 恒温孵育 30 min, 染色后置 4% 甲醛中固定。24 h 后将脑片用数码相机 (Kodak, DC240, 美国) 拍照, 输入计算机, 用多功能真彩色病理图像分析仪 (美国 MEDIA CYBER-

NETICS IMAGE—Pro Plus Version 4.0 软件) 测量梗死灶面积 (玫瑰红色区为正常脑组织, 苍白色区为梗死区), 各脑片梗死面积之和乘以厚度 (2 mm) 为总的梗死体积。以梗死灶体积占全脑体积的百分率进行分析。

1.8 数据处理: 考虑给药途径对药效的影响, ig 给药各组与 ip 给药各组分别进行统计分析。数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS10.0 版统计软件进行统计。多组间比较用方差分析, 组间两两比较方差齐时用 LSD 检验, 方差不齐时用 Dunnett's T3 检验。

2 结果

与假手术组比较, 模型 I 组和模型 II 组相对脑梗死体积显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组 I 组比较, 生物碱、苷和尼莫地平组相对梗死体积均显著缩小 ($P < 0.05, 0.01$)。与模型 II 组相比, 多糖和苷元组也可使相对脑梗死体积显著缩小 ($P < 0.01$)。在 4 类有效部位中, 以生物碱缩小相对梗死体积的作用最强, 其次之, 而苷元和多糖的作用相对较弱。神经功能行为积分比较表明, 缺血后各组动物均出现神经功能损害症状, 各组动物神经功能行为积分值均显著高于假手术组 ($P < 0.01$)。与模型 I 组比较, 生物碱、苷和尼莫地平组神经功能行为积分值均有所下降 ($P < 0.05, 0.01$), 与模型 II 组相比, 多糖和苷元组积分值也明显下降 ($P < 0.05, 0.01$)。在 4 类有效部位中, 以生物碱和苷降低神经功能行为积分值的作用较强, 多糖和苷元的作用次之。结果见表 1。

表 1 各组大鼠脑梗死体积和神经功能行为评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of cerebral infarction volume and nervous function behavior scores of rats in all experimental groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物/只	相对脑梗死体积/%	神经功能行为评分
假手术	5	0.00±0.00	0.0±0.0
模型 I	8	22.14±5.67△△	9.2±0.5△△
模型 II	6	20.96±3.23△△	9.3±0.8△△
多糖	6	14.47±1.75△△**	6.3±1.4△△**
苷元	6	13.85±6.30△△**	6.3±1.9△△*
生物碱	6	5.66±8.03#	4.8±2.6△#
苷	6	10.98±3.84△△**	4.8±1.2△△**
尼莫地平	5	9.08±4.01△△**	4.8±1.9△#

与假手术组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$

与模型 I 组比较: # $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与模型 II 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

△ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ vs Sham-operation group

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

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

3 讨论

局灶性脑缺血动物模型是人们研究脑梗死的理

想方法之一。大脑中动脉区是脑梗死的好发部位,因此,对猫、大鼠等动物用手术阻断一侧大脑中动脉,即可形成局灶性脑缺血模型。大鼠脑血管解剖特点与人类比较类似,并且损伤部位恒定,实验重复性好。因此本研究采用大鼠线栓法 MCAO 局灶性脑缺血模型来研究补阳还五汤 4 类有效部位的作用。在制备模型中,选择直径为 0.26 mm 尼龙线,可避免烧灼使线栓线头大小不均匀对实验结果的影响;线栓前端涂 poly-L-lysine 可增加缺血程度的稳定性^[5];且插入时蘸取肝素可防止线栓部位血栓形成。

作为评价抗脑缺血效应的指标,脑梗死体积测定是最直接的指标。TTC 水溶液是一种无色溶液,它是呼吸链中吡啶-核苷结构酶系统的质子受体,是脂溶性光敏感的复合物,还原后在正常组织中呈现红色,而缺血组织不产生此变化而呈苍白色。故 TTC 染色用于测定梗死灶大小具有快速、直观地确定梗死范围的优点,且境界清楚。有文献报道,脑组织在缺血 6 h 时, TTC 染色显色的范围才与 HE 染色显示的缺血区域一致。故本研究选择了线栓法 MCAO 局灶性脑缺血模型,观察大脑中动脉闭塞后 6 h 脑组织梗死体积的变化,并观察补阳还五汤 4 类有效部位生物碱、多糖、苷、苷元对脑缺血的保护作用。结果表明,由补阳还五汤中提取的 4 类有效部位均有缩小梗死灶体积的作用,对照药尼莫地平也可使梗死灶体积缩小。提示该方中生物碱、多糖、苷、苷元具有确切的抗脑缺血作用,这 4 类有效部位可能为该方治疗缺血性脑血管病的主要物质基础。这

4 类有效部位中,以生物碱作用最强,苷次之,而苷元和多糖缩小梗死体积的作用较弱。这与以往的研究基本相似^[6]。神经功能积分也表明,4 类有效部位均可使缺血后神经功能行为积分下降,其中以生物碱和苷的作用较强,这也佐证了生物碱和苷可能为该方中重要的抗脑缺血作用的有效部位。对补阳还五汤抗脑缺血有效部位及其机制的深入研究,必将对阐明该方作用的物质基础及揭示脑缺血的治疗效果具有重要的理论意义和应用价值。

References:

- [1] Deng C Q, Wan M, He F Y, *et al.* Effect of Buyang Huanwu Decoction and its active regions combination on brain heat shock protein 70 expression in gerbils after cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2002, 22(3): 193-195.
- [2] Deng C Q, Deng Y H, He F Y, *et al.* Effects of Bu Yang Huan Wu decoction and its active fraction on excitatory amino acid of brain tissue after cerebral ischemia and reperfusion in gerbils [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2001, 7(6): 24-27.
- [3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [4] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiments* (药理实验方法学) [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002.
- [5] Ludmila B, Ofelia F A, Raul B, *et al.* Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture: neurological and pathological evaluation of an improved model [J]. *Stroke*, 1996, 27: 1616-623.
- [6] Deng C Q, Tang Y H, He F Y. Effect of Buyang Huanwu Decoction and its available compositions combination on cerebral ischemia in mice [J]. *J Human Coll Tradit Chin Med* (湖南中医学院学报), 1999, 19(4): 1-4.

龙葵碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠细胞膜流动性和膜蛋白水平的影响

季宇彬,王胜惠,高世勇,汲晨锋,邹翔

(哈尔滨商业大学药物研究所 博士后科研工作站,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 观察龙葵碱对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜流动性和膜蛋白水平的影响。方法 采用荧光探针 DPH 标记法测定肿瘤细胞膜流动性,考马斯亮蓝法测定肿瘤细胞膜蛋白水平。结果 龙葵碱可显著降低 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤细胞膜流动性,降低 H₂₂ 小鼠肿瘤细胞膜蛋白水平。结论 龙葵碱是通过影响肿瘤细胞膜的流动性和肿瘤细胞膜上的蛋白水平恢复细胞的正常生理活性而达到抗肿瘤作用。

关键词:龙葵碱; H₂₂ 荷瘤小鼠; 膜流动性; 膜蛋白水平

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)02-0239-03

收稿日期:2004-06-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400591);黑龙江省自然科学基金资助项目(D0024-13);哈尔滨市青年科学基金资助项目(2004AFQXJ035)

作者简介:季宇彬(1956—),男,博士,教授,博士生导师,多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理及分子药理学研究。