

刺五加叶皂苷对实验性脑缺血大鼠的保护作用

睢大员¹, 于晓凤¹, 曲绍春¹, 徐华丽¹, 王志才², 陈燕萍²

(1. 吉林大学药学院 药理教研室, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学化学学院 天然药物化学研究室, 吉林 长春 130021)

摘要:目的 观察刺五加叶皂苷 (ASLS) 对大鼠实验性脑缺血的保护作用。方法 采用大鼠结扎双侧颈总动脉伴低血压模型, 探讨 ASLS 对实验性脑缺血大鼠脑含水量、脑组织病理、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、钙离子 (Ca²⁺) 及乳酸 (LA) 的影响。结果 ASLS 能明显降低实验性脑缺血大鼠的脑含水量、改善脑组织病理变化, 提高脑组织 SOD 活性, 降低 MDA、Ca²⁺、LA 水平。结论 ASLS 对大鼠实验性脑缺血具有明显保护作用, 可能与其抑制脂质过氧化物损害、提高抗氧化酶活性及降低 LA 酸中毒和细胞内钙超载有关。

关键词:刺五加叶皂苷 (ASLS); 实验性脑缺血; 钙离子; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 乳酸

中图分类号:R286.10 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2005)04-0561-03

Protective effect of *Acanthopanax senticosus* leaf saponins on experimental cerebral ischemia rats

SUI Da-yuan¹, YU Xiao-feng¹, QU Shao-chun¹, XU Hua-li¹, WANG Zhi-cai², CHEN Yan-ping²

(1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Department of Natural Medicine Chemistry, School of Chemistry, Jilin University, Changchun 130021, China)

Key words: *Acanthopanax senticosus* leaf saponins (ASLS); experimental cerebral ischemia; Ca²⁺; superoxide dismutase (SOD); malondialdehyde (MDA); lactic acid (LA)

刺五加叶皂苷 (*Acanthopanax senticosus* leaf saponins. ASLS) 系从五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms 叶中提取分离得到的含有 13 种新发现活性成分的总皂苷^[1,2]。前期研究发现, ASLS 对急性心肌缺血及心肌梗死具有明显的保护作用, 主要与改善自由基代谢和钙通道阻滞作用有关^[3,4]。本实验进一步采用大鼠结扎双侧颈总动脉伴低血压模型, 探讨 ASLS 对实验性脑缺血的影响, 为扩大其适应症提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物: Wistar 大鼠, 雌雄各半, 体重 250~300 g, 合格证号: 医动字第 10-5112, 由吉林大学实验动物部提供。

1.2 药品与试剂: ASLS 由吉林大学化学学院天然药物化学研究室提供, 含总皂苷 85%, 实验时以生理盐水配制成所需质量浓度使用; 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 及 Ca²⁺ 试剂盒均购于南京建成生物技术研究所。

1.3 动物分组与给药: 取 120 只 Wistar 大鼠, 雌雄

各半, 按体重随机分成 5 组, 即: 假手术组、模型组及 ASLS 小、中、大剂量组, 每组 24 只。ASLS 组大鼠分别 ip ASLS 25、50、100 mg/kg, 假手术组及模型组 ig 生理盐水, 体积均为 0.2 mL/100 g, 每日 1 次, 连续 3 d。

1.4 脑缺血模型的建立^[5]: 动物于末次给药后 1 h 用氯醛糖 0.3 g/kg ip 麻醉, 灯照保温, 使肛温维持 37~37.5 °C, 股动脉插管监测血压, 股静脉插管用于再灌。塑料管从颈外静脉插入右心房供放血用。连续记录脑电图 (EEG), 用抽血的方法放血, 失血使血压达到 10.7 kPa (80 mmHg) 时分离双侧颈总动脉并结扎, 再继续抽血, 当血压下降到 6.7 kPa (50 mmHg) 时, EEG 呈一直线, 此时即造成不完全性脑缺血模型, 维持 15 min。假手术组只插管, 不放血及结扎。抽出的血放入肝素化试管中, 37 °C 水浴保存, 以备血压过低时回输。15 min 后, 每组取出 10 只动物, 断头处死, 开颅取脑, 去除嗅脑、脑干、小脑后取大脑左侧半球冲净残血后, 放入 10% 甲醛中固定, 常规石蜡包埋, HE 染色, 光镜下观察病理改变; 右侧放置冰盆上, 用冰生理盐水冲去残血, 质量

收稿日期: 2004-08-25

基金项目: 吉林省中医管理局科研基金重点课题 (98A17)

作者简介: 睢大员 (1957—), 男, 吉林省长春人, 教授, 博士, 主要从事心脑血管药物的药理及毒理研究。

Tel: (0431) 5619660 E-mail: dayuansui@163.com

与体积比按 1 : 9 在冰浴下以冰生理盐水为匀浆介质制备 10% 脑组织匀浆,分装至 4 个 1.5 mL Eppendorf 管中。于 4 °C、以 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液采用 722 紫外分光光度计分别测定脑组织 SOD、MDA 及 Ca²⁺ 水平,以对羟基苯法测定脑组织乳酸 (LA) 水平^[6]。与此同时,每组另取 10 只大鼠断头处死后,开颅取脑,去除嗅脑、小脑、脑干后称脑湿重,然后放入 110 °C 烤箱中烤至恒重,称其干重,计算脑含水量。

$$\text{脑含水量} = (\text{脑湿重} - \text{脑干重}) / \text{脑湿重} \times 100\%$$

表 1 ASLS 对实验性脑缺血大鼠脑组织含水量、SOD 活性和 MDA、LA、Ca²⁺ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of ASLS on water content, SOD activity and MDA, LA, Ca²⁺ levels of brain tissue in experimental cerebral ischemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg · kg ⁻¹)	含水量/%	SOD/(nU/mg ⁻¹)	MDA/(nmol · mL ⁻¹)	LA/(μmol · g ⁻¹)	Ca ²⁺ /(mmol · g ⁻¹)
假手术	—	76.84 ± 0.72	10.45 ± 1.56	5.54 ± 0.98	16.675 ± 2.871	0.021 ± 0.007
模型	—	78.41 ± 0.61 ^{△△△}	8.71 ± 1.25 [△]	7.02 ± 1.37 [△]	21.784 ± 3.657 ^{△△}	0.035 ± 0.010 ^{△△}
ASLS	25	78.13 ± 0.85	9.67 ± 1.98	6.87 ± 1.68	18.667 ± 2.351*	0.026 ± 0.007*
	50	77.82 ± 0.53*	10.18 ± 1.43*	5.68 ± 1.72*	17.023 ± 2.185**	0.024 ± 0.008*
	100	77.25 ± 0.56**	10.36 ± 1.76*	5.62 ± 0.89**	16.916 ± 2.362**	0.023 ± 0.005**

与假手术组比较:△P<0.05 △△P<0.01 △△△P<0.001; 与模型组比较:*P<0.05 **P<0.01

△P<0.05 △△P<0.01 △△△P<0.001 vs Sham group; *P<0.05 **P<0.01 vs model group

2.2 ASLS 对实验性脑缺血大鼠脑组织病理的影响:1)大体标本检查:大鼠大脑皮层沟回不明显,肉眼观察表面及切面各组之间无明显差别。2)光镜检查:镜下所见石蜡制片的假手术组大鼠脑组织神经细胞正常,核膜清楚,核仁明显,神经胶质细胞核仁清楚,胞浆透亮或淡染,毛细血管和小血管管腔较窄或呈一道缝隙,神经细胞、毛细血管和小血管周围都产生一道空隙。脑缺血模型组大鼠脑组织发生明显的病理性改变,神经细胞的胞浆和胞核浓缩、染色深,整个胞体变小,轴突和树突都呈锐角形状,神经细胞及毛细血管、小血管周围的空隙增宽,间质疏松,神经胶质细胞肿胀,其胞浆透亮区加大,尤以室管膜周围的神经胶质细胞肿胀更明显。ASLS 3 个剂量组大鼠脑组织神经细胞浓缩、深染较缺血模型组明显减轻,神经胶质细胞肿胀及间质疏松程度均明显轻于缺血模型组,整个脑细胞结构与假手术组大鼠脑组织无明显差异。

2.3 ASLS 对实验性脑缺血大鼠脑组织 SOD 活性及 MDA 水平的影响:与假手术组比较,模型组大鼠脑组织 SOD 活性明显降低,MDA 水平明显增高 (P<0.05),表明实验性脑缺血时伴有脑组织自由基的堆积及抗氧化酶活性的降低。ASLS 50、100 mg/kg 组均能明显增强脑组织中 SOD 活性,降低 MDA 水平,与模型组比较差异显著 (P<0.05)。提示 ASLS 对缺血后脑组织氧自由基损害有一定保

护作用,见表 1。

2 结果

2.1 ASLS 对实验性脑缺血大鼠脑含水量的影响:模型组与假手术组比较脑含水量增加,差异显著 (P<0.001),说明该模型能引起脑组织明显水肿。与模型组比较,ASLS 50、100 mg/kg 能明显降低大鼠脑含水量,具有减轻脑水肿作用 (P<0.05、0.01)。ASLS 25 mg/kg 组对脑含水量亦有降低趋势,但与模型组比较无统计学差异 (P<0.05),见表 1。

2.4 ASLS 对实验性脑缺血大鼠脑组织乳酸 (LA) 及 Ca²⁺ 水平的影响:与假手术组比较,模型组脑组织 LA 及 Ca²⁺ 水平均明显增高 (P<0.01),表明实验性脑缺血时脑组织伴有 LA 堆积及钙超载。ASLS 各剂量组均能明显降低 LA 及 Ca²⁺ 水平,与模型组比较差异显著 (P<0.05、0.01)。提示 ASLS 能减少脑缺血时 LA 酸中毒及钙超载对脑组织的损伤,见表 1。

3 讨论

近年来的研究发现,不完全性脑缺血比完全性脑缺血引起的脑损伤更为严重^[5]。脑缺血后的损伤与兴奋性氨基酸 (EAA) 增多、细胞内钙超负荷、氧自由基的损伤、LA 酸中毒及花生四烯酸 (AA) 代谢活性升高等因素有关。这些因素彼此交叉,共同构成脑缺血后的脑实质损伤^[7]。脑缺血时由于毛细血管通透性增加,大量血浆成分外渗,尤其水分及小分子物质,引起脑组织明显水肿。脑水肿可使颅压升高,严重时导致脑疝而危及生命。在脑缺血期间,葡萄糖代谢由有氧氧化转变为无氧酵解时,促使细胞内 LA 堆积,pH 值下降。若 LA 升高超过 25 pmol/g 时,就会产生不可逆的神经元损伤。离体实验证明,当 pH 值从 7.0 降至 6.0 时,脑脂质过氧化速率增加 10 倍^[8]。因此,LA 堆积对脑组织极为不利。ASLS 能明显降低脑组织含水量及 LA 堆积,并减

少脑组织病理改变,提示其可能通过抑制无氧酵解及降低脑水肿产生保护脑缺血作用。

脑缺血时由于EAA释放增加,作用于其受体,引起受体门控型 Ca^{2+} 通道开放,使 Ca^{2+} 大量内流。此外,线粒体及内质网膜 Ca^{2+} -ATP酶由于能量代谢障碍而不能摄取细胞内过量的 Ca^{2+} 而进一步加重 Ca^{2+} 超载。细胞内超载 Ca^{2+} 可激活磷脂酶C,后者使磷脂酰胆碱(PIP_2)转变为三磷酸肌醇(IP_3)和二酰甘油(DAG), IP_3 作用于其受体,导致细胞内 Ca^{2+} 库释放 Ca^{2+} ,各种因素互相交叉促使细胞内 Ca^{2+} 超载。这是最终引起神经元不可逆性坏死的主要原因。因而有效降低脑组织中 Ca^{2+} 水平,可减轻脑细胞的不可逆性坏死^[8]。ASLS能明显降低实验性脑缺血大鼠脑组织 Ca^{2+} 水平,表明其对脑组织的保护作用可能与降低脑组织中 Ca^{2+} 水平有关。

脑缺血时细胞内 Ca^{2+} 超载可激活依赖 Ca^{2+} 蛋白水解酶,使黄嘌呤脱氢酶(XD)变成黄嘌呤氧化酶(XO)。次黄嘌呤(Hpy)在XO作用下生成黄嘌呤(Xan),Xan在XO作用下生成尿酸,这两个过程均产生大量氧自由基,可攻击生物膜中多聚不饱和脂肪酸引起脂质过氧化作用,形成脂质过氧化物,降低膜的流动性,使膜的通透性增加,大量水分离子内流,导致线粒体及细胞肿胀,抑制电子传递和氧化磷酸化,进一步加重能量代谢障碍,溶酶体酶释放引起细胞自身消化,最终导致细胞死亡^[9,10]。ASLS能明显降低实验性脑缺血大鼠脑组织MDA水平,提高SOD活性,提示其可能通过清除氧自由基及提高抗氧化酶活性对脑组织产生保护作用。研究还表明,ASLS能明显降低实验性脑缺血大鼠的全血及血浆

黏度,抑制血小板的黏附物聚集功能^[11],这对于防治缺血性脑血管病也具有重要价值。

References:

- [1] Shao C J, Ryoji K, Xu J D, et al. Saponins from leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms, Ciwujia. Structures of Ciwujianosides B, C₁, C₂, C₃, C₄, D₁, D₂ and E [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(2): 601-606.
- [2] Shao C J, Ryoji K, Xu J D, et al. Saponins from leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms, Ciwujia I. Structures of Ciwujianosides B, A₁, A₂, A₃, A₄ and D₃ [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(1): 42-46.
- [3] Zhang Y H, Han C C, Qu S C, et al. Protective effect of ASLS on experimental myocardial infarction in rats [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2002, 11(9): 695-697.
- [4] Ma L N, Sui D Y, Lu Z Z, et al. Effects of ASLS on hemodynamics and cardiac oxygen metabolism in acute myocardial infarction in dogs [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 1994, 29(11): 654-657.
- [5] Smith M L, Bendek G. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat [J]. *Acta Neurol Sci*, 1984, 69: 385-401.
- [6] Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. *Experimental Method and Technology of Biochemistry* (生物化学实验方法和技术) [M]. Beijing: Higher Education Press, 1981.
- [7] Tang G, Zhang J T. Research advance on mechanism with cerebral ischemic injury and therapeutic policy [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2000, 9(12): 809-812.
- [8] Zeng G Y, Feng Y P. *Cardiovascular Pharmacology* (心血管药理学) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1997.
- [9] Slater T F. Free-radical mechanism in tissue injury [J]. *Biochem J*, 1984, 222: 1-3.
- [10] Dormandy T L. Free radical oxidation and antioxidants [J]. *Lancet*, 1978 (1): 647-651.
- [11] Jiang H Y, Sui D Y, Yu X F, et al. Effect of ASLS on hemorheology and platelet function in experimental cerebral ischemia rats [J]. *J Jilin Univ—Med Ed* (吉林大学学报·医学版), 1978.

麻黄汤拆方对过敏性炎症的抑制作用

刘永刚,罗佳波,吴忠,贺丰

(第一军医大学 中药制剂重点实验室,广东 广州 510515)

摘要:目的 通过对麻黄汤各拆方配伍组合对嗜酸性粒细胞和肥大细胞的抑制作用探讨其配伍规律。方法 采用在体试验观察致敏小鼠抗原攻击后肺灌洗液(BALF)和外周血中的嗜酸性粒细胞聚集反应,采用离体试验观察致敏大鼠抗原攻击后腹腔肥大细胞脱颗粒反应。结果 麻黄汤及拆方减少BALF和外周血中嗜酸性粒细胞的浸润不完全相同;麻黄汤及拆方也不同程度抑制致敏大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒反应。结论 麻黄汤对嗜酸性粒细胞和肥大细胞具有抑制作用,拆方分析显示麻黄汤全方效果最佳,并初步验证了麻黄汤组方的科学性和合理性。

收稿日期:2004-09-03

基金项目:国家自然科学基金重点项目(300301500)

作者简介:刘永刚(1971—),男,湖北天门人,主管药师,中药学博士,现于武警广东总队医院从事中药新药与临床药理研究工作。

Tel: (020) 61648265