

灯盏细辛注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤后梗死面积比和波谱的影响

刘 华¹, 廖维靖², 周 华³, 魏 黎⁴

(1. 苏州卫生职业技术学院 康复医学教研室, 江苏 苏州 215002; 2. 武汉大学中南医院 康复医学科, 湖北 武汉 430071;
3. 苏州大学附属第一医院 急诊外科, 江苏 苏州 215006; 4. 中国科学院武汉物理与数学研究所, 湖北 武汉 430071)

摘要:目的 研究大鼠脑缺血再灌注后梗死面积比的变化、 T_2 加权像 (T_2WI) 以及波谱变化, 探讨灯盏细辛注射液在脑缺血再灌注损伤中的作用。方法 采用线栓法制作大鼠脑缺血再灌注不同时间点模型, 观察灯盏细辛注射液对脑缺血 1.5 h 再灌注 24、48、96 h 的 T_2WI 和局域质子谱显示的一些代谢分子 N -乙酰天门冬氨酸 (NAA)、肌酐 (Cr)、胆碱 (Cho) 的影响, 取出脑组织进行红苯氮唑 (TTC) 染色测定脑梗死面积比。结果 模型组缺血侧再灌注 24 h 显示出高信号强度区, 与体外取出大脑进行的 TTC 染色相比, 缺血位置大致相同。波谱检测显示在 24 h NAA/Cr 减小, Cho/Cr 增大, 96 h 这种趋势继续增大。灯盏细辛注射液治疗组 NAA/Cr、Cho/Cr 值与同时时间点模型组相比, 均有所改善。TTC 染色显示灯盏细辛治疗后减小了脑梗死面积比。结论 灯盏细辛注射液能对脑物质代谢产生影响, 减轻脑梗死, 从而对脑缺血再灌注损伤起到一定程度的改善作用。

关键词:灯盏细辛注射液; 缺血再灌注损伤; 核磁共振; 波谱

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)06-0898-04

Effects of Dengzhan Xixin Injection on changes of brain infarction area ratio and NMR spectra after cerebral ischemia-reperfusion injury

LIU Hua¹, LIAO Wei-jing², ZHOU Hua³, WEI Li⁴

(1. Department of Rehabilitation Medicine, Suzhou Health Technical College, Suzhou 215002, China; 2. Department of Rehabilitation Medicine, South-Center Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 3. Department of Emergency Surgery, First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215006, China; 4. Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Science, Wuhan 430071, China)

Key words: Dengzhan Xixin Injection; ischemia-reperfusion injury; nuclear magnetic resonance (NMR); spectrum

缺血性脑损伤的病理生理机制是血液循环障碍, 造成细胞能量代谢衰竭, 使细胞膜释放大量的谷氨酸, 启动损伤级联反应^[1]。核磁共振技术是非侵入性的检查手段, 可界定梗死部位、范围和水肿情况。核磁共振成像对梗死区水分的变化非常敏感, 可较早确定梗死病灶^[2]。灯盏细辛 (灯盏花) 是菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. - Mazz., 主要成分为黄酮、灯盏甲素、灯盏乙素、挥发油、氨基酸等。黄酮类药物已被证明能扩张脑微细动脉, 降低血黏度, 改善微循环, 防止脑缺血再灌注损伤。近年来, 很多学者在灯盏细辛对脑缺血再灌注后细胞凋亡、水肿等的影响方面做了较多的研究^[3~7], 但灯盏细辛对脑缺血再灌注后梗死面积及波谱的影响报道较少, 动态检查灯盏细辛对代谢物水平的影响, 对了解病理过程具有重要意义。本实验通过波谱技术初步探讨灯盏细辛注射液对大鼠脑缺血再灌注

损伤后物质代谢的影响, 为进一步探讨灯盏细辛的药理学、有效成分提供依据。

1 材料

1.1 药品及剂量确定: 灯盏细辛注射液, 云南生物谷灯盏花药业有限公司生产, 批号 20021115, 含总黄酮 4.5 mg/mL。章小兵等^[8]报道灯盏花素滴丸 40 mg/kg 能明显减轻线栓法所致的局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠的神经功能障碍。临床上治疗短暂性脑缺血发作、偏瘫患者, 一般采用 20 mL 灯盏细辛注射液 (用 250 mL 生理盐水稀释), 静脉点滴。本实验借用经验剂量, 将 20 mL 灯盏细辛注射液用生理盐水稀释到 225 mL, 含总黄酮 0.4 mg/mL, 治疗大鼠剂量为 45 mg/kg。

1.2 实验动物: 成年健康雄性 Wistar 大鼠, 体重 200~250 g, 购自武汉同济医学院实验动物中心。

2 方法

收稿日期: 2005-09-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (39970935 和 30271671); 中国科学院武汉物理与数学研究所波谱与原子分子物理国家重点实验室开放项目资助 (T152210)

作者简介: 刘 华 (1978—), 女, 湖北武穴市人, 硕士, 2004 年毕业于武汉大学, 发表文章 10 篇, 主要研究方向为脑血管疾病的康复。

2.1 动物造模:参照 Zea Longa^[9]的线栓造模方法,并进行部分改良^[10]。各组动物术前进行浅度麻醉。分离迷走神经,在距右颈总动脉(CCA)分叉处近端结扎右颈总动脉。将尼龙线栓送入右大脑中动脉(MCA)起始部,遇阻力时停止,插入深度 (1.7 ± 0.2) cm,造成右大脑中动脉血供(MCAO)阻断。缺血 1.5 h 后,将线栓拔至 CCA。造模时动物的肛温维持在 (37 ± 0.5) °C。假手术组线栓插入深度为 1 cm,1.5 h 后拔至 CCA。

2.2 动物分组与处理方式:35 只大鼠随机分为假手术组、模型组和治疗组。假手术组 5 只动物,其他每组再随机分为缺血再灌注 24、48、96 h 3 个时间点进行观察,各个时间点 5 只动物。假手术组不做任何处理。模型组($n=15$)以生理盐水 45 mg/kg ip 给药。治疗组($n=15$)ip 灯盏细辛注射液 45 mg/kg,后用相同剂量每天进行治疗。各组于术后 24、48、96 h 分批处死动物。

2.3 T_2 加权像(T_2WI)检测: T_2WI 检测方法见廖维靖^[10]报道方法。动物深度麻醉后,头部固定,俯卧在检查凹槽内。用黏胶带固定身体。所有测试均在 Bruker Biospec 4.7/30 核磁共振成像仪上完成。成像方法采用多片多回波自旋回波脉冲序列,1 次完成 7 片成像,视场范围 FOV 为 3 cm×3 cm。片厚 0.8 mm,2 片之间的中心距离为 1.6 mm。 $t_R=2\ 500$ ms, $t_E=90,120$ ms。Xwin-NMR1.0 版处理软件。

2.4 1H 磁共振波谱(1H -MRS)检查: 1H -MRS 检测方法见廖维靖^[11]报道方法。扫描前自动匀场、压水峰。序列选取点分辨自旋回波波谱(PRESS)采集波谱, $t_R=1\ 000$ ms, $t_E=136$ ms。采集的波谱对代谢物如 *N*-乙酰天门冬氨酸(*N*-acetyl aspartate, NAA)、肌酐(creatine, Cr)、胆碱(choline, Cho)进行基线校正,将 NAA 峰定标在 2.02×10^{-6} 。计算出各峰的积分面积。以 Cr 峰作为标准,将各峰下面积的积分值与之比较,得到 NAA/Cr、Cho/Cr 值。

2.5 梗死面积比:采用红苯氮唑(TTC)染色。每

组大鼠去除嗅球、小脑、脑干和软脑膜,自前额极起沿标尺切出 5 张冠状切片,每片厚约 2.5 mm,取第 2 片做常规 HE 染色,其余置 2% TTC 溶液(pH=7.4),37 °C 避光孵育 30 min,甲醛固定。

2.6 统计方法:资料采用 SAS8.1 软件进行统计学处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 T_2WI 检测:假手术组大鼠双侧对称,无结构改变。缺血再灌注 24 h 可见右脑顶叶、颞叶和外侧尾壳核出现高信号强度区,与周围正常组织对比明显,提示存在缺血损伤病灶。48、96 h 后大脑结构明显不对称,右脑肿胀,可见梗死灶。(图 1)

3.2 1H -MRS 检查:NAA、Cr 和 Cho 的化学位移分别是 2.02、3.0 和 3.2,呈正向峰。对照正常右大脑,假手术组差异无显著性。缺血再灌注后 24、48、96 h NAA/Cr 分别与假手术组比较,差异显著($P<0.01$)。模型组间互相比较无明显变化,只是在数值上有减少的趋势。灯盏细辛治疗后,同时点与模型组相比,差异显著($P<0.05$);治疗组间比较无明显改变,与假手术组相比只在 96 h 时显示有差异。Cho/Cr 值在脑缺血再灌注后各时间点与假手术组相比,均有差异,其中在 96 h 时差异更加显著,比值较假手术组有增加,模型组之间比较也无差异。灯盏细辛治疗后,与模型组相比有差异(表 1 和图 2)。

3.3 HE 染色:缺血坏死区域颜色苍白、组织疏松、细胞密度明显减少。灯盏细辛治疗后,组织水肿减轻,间隙变窄。

3.4 梗死面积比:TTC 染色后,未缺血侧被染成均匀的红色,而缺血侧部分组织呈苍白色,与周围未缺血区域界限清楚,其中坏死组织颜色更浅。本实验缺血区域主要在大脑皮层。用眼科镊分离白色区和红色区,分别称取质量,计算梗死面积比[梗死面积比=白色区质量/(白色区质量+红色区质量)]。缺血再灌注后 24 h 即可见明显的梗死灶,48、96 h 后这种趋势进一步扩大,与 24 h 相比有差异,但 48 与

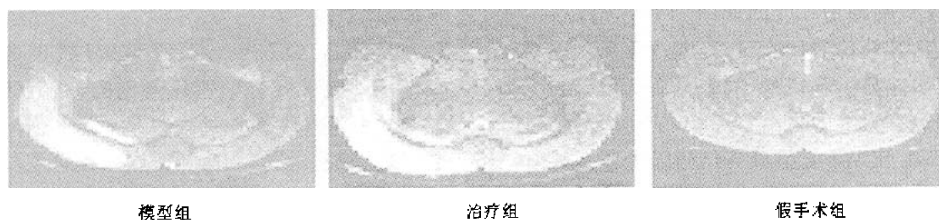
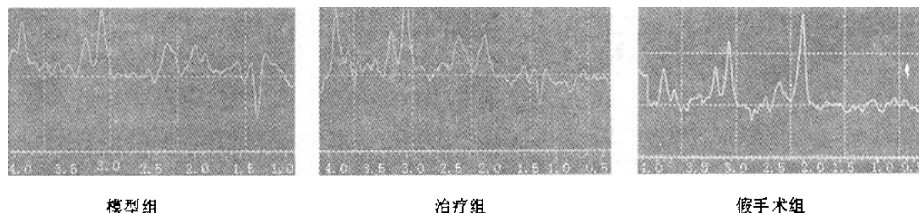


图 1 大鼠再灌注后 24 h T_2WI 像

Fig. 1 T_2WI Image after 24 h reperfusion of rats

表 1 灯盏细辛治疗后脑缺血再灌注大鼠 NAA/Cr 和 Cho/Cr 的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)Table 1 Changes of NAA/Cr and Cho/Cr after Dengzhan Xixin treatment in cerebral ischemia-reperfusion rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	NAA/Cr			Cho/Cr		
	24 h	48 h	96 h	24 h	48 h	96 h
假手术	1.382±0.254	1.382±0.254	1.382±0.254	0.892±0.213	0.892±0.213	0.892±0.213
模型	0.931±0.184**	0.875±0.174**	0.852±0.158**	1.264±0.247*	1.350±0.341*	1.470±0.362**
治疗	1.173±0.221 Δ	1.112±0.212 Δ	1.095±0.175* Δ	0.902±0.224 Δ	0.944±0.261 Δ	0.987±0.278 Δ

与假手术组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: $\Delta P<0.05$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.05$ vs model group图 2 大鼠再灌注后 24 h ^1H -MRS 波谱Fig. 2 ^1H -MRS Spectra after 24 h reperfusion of rats

96 h 比较无明显的差异。灯盏细辛治疗后发现梗死面积比明显减少,24 h 与模型组同时时间点相比差异显著 ($P<0.05$);48 与 96 h 和模型组相比,差异非常显著 ($P<0.01$)。(表 2)

表 2 灯盏细辛治疗缺血再灌注大鼠脑梗死面积比的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)Table 2 Changes of brain infarction area ratio after Dengzhan Xixin treatment in cerebral ischemia-reperfusion rats ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	梗死面积比/%		
	24 h	48 h	96 h
假手术	0	0	0
模型	17.54±1.56	21.27±1.73**	23.65±2.47**
治疗	14.85±2.01 Δ	16.78±1.45 $\Delta\Delta$	18.67±1.84 $\Delta\Delta\Delta$

与模型组 24 h 比较: ** $P<0.01$; 与模型组同时时间点比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$; 与治疗组 24 h 比较: $\Delta\Delta\Delta P<0.01$ ** $P<0.01$ vs model group at 24 h; $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ vs model group at same time; $\Delta\Delta\Delta P<0.01$ vs treatment group at 24 h

4 讨论

动态评价脑损伤程度的准确性是 NMR 技术最显著的优点,其他仪器无法比拟。 $T_2\text{WI}$ 反映移动状态的水,可敏感显示脑梗死^[2]。缺血后病灶脑组织水肿,短时间内有大量的自由水聚集,使组织的弛豫时间 T_2 增加,在 $T_2\text{WI}$ 上呈现高信号强度区。缺血早期膜离子泵功能障碍,钠离子和水分子移入细胞内。进入细胞内的水,由于细胞膜和细胞器的限制,其分子弥散活动受到限制,加上细胞间隙的游离水减少,导致 $T_2\text{WI}$ 出现明显的高信号。高信号反映了细胞

水肿的程度。MRS 检测是通过分析代谢物质的波谱的改变,了解神经组织代谢物质的量,以判断神经元的存活状况和功能。因此,MRI 和 MRS 成为评价缺血性脑损伤神经可塑性的有效工具。

本实验通过 $T_2\text{WI}$ 和 TTC 染色的大体组织学进行对比,发现梗死区域大致相似,但 $T_2\text{WI}$ 更加敏感。从而可以通过 $T_2\text{WI}$ 的早期检查确定脑损伤的程度,以免贻误病情。 ^1H -MRS 对判断神经元的功能很有帮助。 ^1H -MRS 可以检测的物质约为 20 min,每种物质的波谱都有特定的峰,根据其峰值大小可判断该物质在体内的水平。NAA、Cho 和 Cr 是最容易检测的物质。NAA 仅存在于神经组织,是神经元代谢的标志物,其强度或积分值(水平)可灵敏地反映神经元死亡和功能受损的状况,可视为神经可塑性的标志物。Cr 是能量代谢分子,其值的大小反映细胞的能量平衡。Cho 是细胞膜脂的组成成分,反映细胞膜的合成与髓鞘的降解。脑组织出现乳酸,提示缺血、缺氧,有氧呼吸受到限制,能量代谢紊乱,无氧酵解增加。

从 TTC 的染色结果和 $T_2\text{WI}$ 的图像显示灯盏细辛注射液能减轻脑梗死面积比,提示灯盏细辛能在脑缺血再灌注损伤过程中起一定的作用。很多学者对灯盏细辛抗脑缺血和对脑缺血再灌注保护作用做了相关研究。研究表明灯盏花注射液能明显延长小鼠缺氧生存时间,明显延长小鼠因结扎迷走神经的两侧颈总动脉造成急性脑缺血的生存时间,能减轻大鼠实验性血栓的湿质量和干质量,显著降低大

鼠急性不完全性脑缺血脑组织含水量^[4]。研究还表明灯盏花总黄酮和灯盏花醇提取物 ig 给药能明显降低动物的卒中指数,减轻脑缺血再灌注损伤引起的脑水肿和脑缺血所致的脑电图改变,促进再灌注后脑电图电位幅度的恢复,减轻大脑皮质组织钙累积及降低脑组织脂质水平。显示灯盏花总黄酮和灯盏花醇提取物对脑缺血再灌注损伤均具有保护作用^[5]。本实验结果表明灯盏细辛注射液治疗后脑组织的代谢得到明显改善,治疗前后同时间点相比,差异有显著性。其中缺血再灌注后显示 NAA/Cr 有减小趋势,灯盏花治疗后对这种下降趋势有抑制作用;Cho/Cr 在脑缺血再灌注后逐渐增加,但组间并没有差异,与假手术组比较有差异;灯盏细辛治疗组与模型组比较有差异,提示灯盏细辛能改善脑代谢,作用机制可能与灯盏细辛能抑制蛋白激酶 C,从而减少细胞钙离子内流^[6];能抑制脂质过氧化^[4];能减轻脑缺血再灌注后的炎症反应^[7]等有关。

References:

- [1] Liao W J, Frank W, Yang W T, et al. An experimental study on the neuroprotective effects of chinese angelica on cerebral ischemia injury in rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1999, 30(4): 273-275.
- [2] Ding G L, Hu H B, Wang X B, et al. Photochemical model of cerebral ischemic injury of rat demonstration by T2 weighted MRI [J]. *Chin J Magn Resonance* (波谱学杂志), 1999, 16(1): 1-4.
- [3] Zhang Z M, Yang Y H. Clinical effect observation of erigeron injection on acute cerebral infarction [J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med* (现代中西医结合杂志), 2002, 11(17): 1645-1646.
- [4] Liu H. Protective effect of brevescapin against acute experimental cerebral ischemia [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2001, 18(2): 96-98.
- [5] Li L, Yang W M, Wu W L, et al. Neuroprotective effects of erigeron breviscapus flavonoids on transient cerebral ischemic reperfusion injury in gerbils [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12(5): 55-59.
- [6] Yu G, Luo Y, Peng G G, et al. Effect and mechanism of protein Kinase C inhibitor on cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke Nerv Dis* (卒中与神经疾病), 2002, 9(6): 321-324.
- [7] Luo Z M, Shang H F, Xi J, et al. Protective function of breviscapini in focal cerebral ischemic-reperfusion injury in rats [J]. *J Apoplexy Nerv Dis* (中风与神经疾病杂志), 2000, 17(4): 230-232.
- [8] Zhang X B, Peng D Y, Zhu M G, et al. Protective effect of breviscapine dropping pill against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats [J]. *J Anhui Tradit Chin Med Coll* (安徽中医学院学报), 2003, 22(1): 45-47.
- [9] Zea Longa E, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84-91.
- [10] Liao W J, Liu S H, Fan M, et al. Modification of the preparation models of focal ischemic brain injury with suture occlusion in rats [J]. *Chin J Phys Med Rehabil* (中华物理医学与康复杂志), 2002, 24(6): 345-348.
- [11] Liao W J, Yang W T, Fan M, et al. The impact of ischemic and reperfusion brain injury on NMR and spectroscopy of the cerebrum and cerebellum in rats [J]. *Chin J Phys Med Rehabil* (中华物理医学与康复杂志), 2002, 24(11): 675-678.

葛根素对糖尿病小鼠胰岛素抵抗的影响

曹莉², 顾振纶^{1,3}, 茅彩萍³

(1. 苏州大学医学院 药理学教研室, 江苏 苏州 215007; 2. 苏州大学药学院, 江苏 苏州 215007;

3. 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007)

摘要:目的 观察葛根素对糖尿病小鼠胰岛素抵抗的作用。方法 以链脲菌素(STZ)诱导糖尿病小鼠及以氢化可的松琥珀酸钠(HCSS)诱导胰岛素抵抗小鼠模型,观察葛根素对正常、糖尿病及胰岛素抵抗模型小鼠血糖及血清胰岛素水平的影响。结果 葛根素对正常小鼠空腹血糖无明显影响,可明显降低 STZ 诱导的糖尿病小鼠的血糖和血清胰岛素水平,使胰岛素敏感性指数显著升高,对 HCSS 诱导的小鼠胰岛素抵抗也有明显的改善,且均呈一定的剂量依赖性趋势。结论 葛根素可显著改善实验性糖尿病小鼠的胰岛素抵抗。

关键词:葛根素;糖尿病;胰岛素抵抗

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)06-0901-04

Effect of puerarin on insulin resistance in diabetic mice

CAO Li², GU Zhen-lun^{1,3}, MAO Cai-ping³

(1. Department of Pharmacology, Medical College of Suzhou University, Suzhou 215007, China; 2. College of Pharmaceutical Sciences, Medical College of Suzhou University, Suzhou 215007, China; 3. Suzhou Institute of Chinese Materia Medica, Medical College of Suzhou University, Suzhou 215007, China)

收稿日期:2005 11 03

基金项目:香港保健协会研究项目(HK-2002.0819);江苏省中医药管理局课题(H-028)

作者简介:曹莉(1976—),女,江苏通州人,讲师,硕士,主要从事中药药理学教学、研究与新药开发。

Tel: (0512) 65125270 E-mail: caoli8545@sohu.com