

# 注射用舒血宁对脑缺血的保护作用

郑 骏<sup>1</sup>, 程 敏<sup>2</sup>, 叶小弟<sup>2</sup>, 缪云萍<sup>2</sup>, 郑高利<sup>2</sup>

(1. 浙江大学第一附属医院 中药房, 浙江 杭州 310003; 2. 浙江省医学科学院药物研究所, 浙江 杭州 310013)

目前以银杏提取物为原料制成的各种制剂, 已广泛应用于药物、保健食品、功能性饮料等产品。银杏制剂作为中成药品种, 在心脑血管疾病用药中处于比较重要的地位。舒血宁是银杏制剂中的主导产品之一, 具有扩张血管、改善微循环的作用, 用于缺血性心脑血管疾病、冠心病、心绞痛、脑栓塞、脑血管痉挛等。本实验主要研究注射用舒血宁对缺血性脑病的治疗作用, 初步探讨其作用机制。

## 1 材料

1.1 药品与试剂: 注射用舒血宁, 淡黄色粉末, 西林瓶封装, 每瓶含总黄酮醇苷 4.2 mg、萜类内酯 1.2 mg, 相当于提取物 17.5 mg/瓶, 由浙江康恩贝药品研究开发有限公司生产提供, 批号 040305, 临用时用 5% 葡萄糖注射液溶解。注射用丹参, 规格: 0.4 g/瓶, 哈药集团中药二厂生产, 批号 20050129。5% 葡萄糖注射液, 张家港市制药厂生产, 批号 04022001。水合氯醛, 分析纯, 中国医药集团上海化学试剂公司生产, 批号 20001025。注射用硫喷妥钠, 规格: 0.5 g/瓶, 上海新亚药业有限公司生产, 批号 041102。红四氮唑 (TTC), 分析纯, 华东师范大学化工厂生产。生化试剂, 宁波市慈城生化试剂厂生产。

1.2 动物: ICR 小鼠, 清洁级, 浙江省实验动物中心提供, 动物合格证: SCXK (浙) 2003—0001。SD 大鼠, 清洁级, 浙江省实验动物中心提供, 动物合格证: SCXK (浙) 2003—0001。

1.3 仪器: 电子分析天平, 日本岛津生产。MOTIC 图像采集分析系统, 厦门麦克奥迪实业公司生产。

## 2 统计方法

所有计量数据表示为  $\bar{x} \pm s$ , 进行组间  $t$  检验。

## 3 方法和结果

3.1 对小鼠急性不完全性脑缺血的影响: ICR 小鼠, 清洁级, 50 只, 雌性, 体重 19~23 g。随机分成 5 组, 每组 10 只。按表 1 剂量, 给药组尾 iv 给予 5% 葡萄糖注射液配制的注射用舒血宁药液, 阳性对照组 iv 给予注射用丹参, 模型组给予 5% 葡萄糖注射液, 每天 1 次, 第 7 天, 尾 iv 硫喷妥钠麻醉小鼠 (25

mg/kg), 分离双侧颈总动脉 (合并迷走神经), 埋线, 待小鼠清醒时 (确保小鼠不因为麻醉造成死亡), 再尾 iv 给药 1 次, 10 min 后完全结扎双侧颈总动脉合并迷走神经, 立即观察小鼠反应, 记录小鼠存活时间, 死亡小鼠立即取大脑称质量, 计算脑指数, 并置 110 ℃ 烘箱中烘至恒重, 称脑组织干质量, 计算脑含水量<sup>[1]</sup>, 结果见表 1。将迷走神经和颈总动脉一起结扎, 迷走神经受刺激则引起血压下降, 从而造成脑缺血。表 1 结果表明, 注射用舒血宁能明显改善小鼠双侧颈总动脉合并迷走神经结扎引起脑组织水肿的程度, 减轻脑组织损伤, 延长小鼠的存活时间, 剂量关系明确。

表 1 注射用舒血宁对小鼠急性不完全性脑缺血的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Table 1 Effect of Shuxuening Injection on acute incomplete cerebral ischemia of mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

| 组 别    | 剂量/<br>(mg · kg <sup>-1</sup> ) | 脑指数/<br>%   | 脑含水量/<br>%   | 存活时间/<br>s |
|--------|---------------------------------|-------------|--------------|------------|
| 模型     | —                               | 1.37±0.03   | 81.03±1.41   | 307±146    |
| 注射用丹参  | 100                             | 1.28±0.08** | 79.17±1.06** | 535±174**  |
| 注射用舒血宁 | 35                              | 1.29±0.06** | 79.72±0.98*  | 615±198**  |
|        | 18                              | 1.30±0.08*  | 79.93±0.79*  | 519±183**  |
|        | 9                               | 1.34±0.05   | 80.10±1.05   | 443±136    |

与模型组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$

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

3.2 对大鼠双侧颈总动脉结扎致急性不完全性脑缺血的影响: SD 大鼠, 清洁级, 60 只, 雌性, 体重 170~210 g, 随机分成 6 组, 每组 10 只。按表 2 剂量, 给药组尾 iv 给予 5% 葡萄糖注射液配制的注射用舒血宁药液, 阳性对照组 iv 给予注射用丹参, 模型组和假手术组给予 5% 葡萄糖注射液, 每天 1 次, 第 7 天, ip 水合氯醛 (400 mg/kg) 麻醉大鼠, 分离双侧颈总动脉 (分离迷走神经), 埋线, 尾 iv 给药, 10 min 后除假手术组外其余各组大鼠完全结扎双侧颈总动脉 (不结扎迷走神经), 3 h 后所有大鼠断头, 立即取大脑, 称质量, 计算脑指数, 并置 110 ℃ 烘箱中烘至恒重, 称脑组织干质量, 计算脑含水量<sup>[2]</sup>。结果见表 2。注射用舒血宁能降低双侧颈总动

表 2 注射用舒血宁对大鼠急性不完全性脑缺血的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Table 2 Effect of Shuxuening Injection on acute incomplete cerebral ischemia of rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

| 组别     | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 脑指数/%                    | 脑含水量/%                 |
|--------|---------------------------|--------------------------|------------------------|
| 假手术    | —                         | 0.572±0.063              | 79.2±0.9               |
| 模型     | —                         | 0.640±0.066 <sup>#</sup> | 79.9±0.6 <sup>#</sup>  |
| 注射用丹参  | 70                        | 0.586±0.031 <sup>*</sup> | 78.9±1.0 <sup>**</sup> |
| 注射用舒血宁 | 25                        | 0.573±0.074 <sup>*</sup> | 79.1±0.7 <sup>**</sup> |
|        | 12.5                      | 0.590±0.036 <sup>*</sup> | 79.0±1.0 <sup>*</sup>  |
|        | 6.25                      | 0.597±0.054              | 79.7±0.6               |

与假手术组比较: <sup>#</sup> $P<0.05$

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

<sup>#</sup> $P<0.05$  vs Sham group

<sup>\*</sup> $P<0.05$  <sup>\*\*</sup> $P<0.01$  vs model group

脉结扎大鼠脑指数,使脑含水量(水肿程度)减少,剂量关系明确。提示注射用舒血宁能明显改善脑缺血后大鼠脑水肿程度。

3.3 对小鼠局部脑缺血-中动脉栓塞模型的影响: ICR 小鼠,清洁级,60 只,雌性,体重 22~28 g。随机分成 5 组,每组 12 只。按表 3 剂量尾 iv 给予 5% 葡萄糖注射液配制的注射用舒血宁药液,模型组和假手术组给予 5% 葡萄糖注射液,4 h 后重复给药 1 次,10 min 后 ip 水合氯醛(400 mg/kg)麻醉小鼠,将小鼠仰卧固定,剪开颈部正中皮肤,分离小鼠颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,避免伤及迷走神经,结扎颈总动脉和颈外动脉近心端,于颈内动脉置一动脉夹,在颈总动脉近分叉处剪一“V”形剪口,备一缝线,插入线栓(线栓长约 1.2 cm,头的直径约 0.20 mm),取下动脉夹,使线栓进入大脑中动脉,深度约为 0.9~1.1 cm,扎紧备线固定线栓,缺血 15 min 后,将线栓抽出,结扎颈总动脉“V”形剪口两端,缝合肌肉和皮肤,回笼饲养。手术后 4、8、12、20 h,各组小鼠分别 iv 给药,并在手术后 24 h,参照文献方法,对小鼠行为进行评分<sup>[3]</sup>,处死小鼠,取大脑,于 -15℃ 冰冻 10 min,将脑组织切等厚度的 5 片,用 0.5% 的 TTC 染液染色。染色后 30 min,数码相机摄影, MotiC Advance 3.2 图像分析软件测量脑缺血区面积,5 片脑片中的脑缺血区面积之和即为梗死面积,梗死面积与 5 片脑片总面积的比即为梗死率<sup>[4]</sup>。结果见表 3。注射用舒血宁大、中剂量组的小鼠脑梗死面积、梗死率和行为障碍评分总分均明显低于模型组,小剂量组也有改善的趋势,剂量关系明确。提示注射用舒血宁对小鼠中动脉线栓模型所致的局部脑缺血有明显保护作用。

3.4 对大鼠全脑缺血(四动脉结扎模型)的影响:

表 3 注射用舒血宁对小鼠中动脉栓塞所致的局部脑缺血的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ )

Table 3 Effect of Shuxuening Injection on infarction area, infarction ratio, and behavioral obstacle score in MACO mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=12$ )

| 组别     | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 梗死面积/cm <sup>2</sup>      | 梗死率/%                  | 行为障碍评分总分              |
|--------|---------------------------|---------------------------|------------------------|-----------------------|
| 假手术    | —                         | 0±0                       | 0±0                    | 0±0                   |
| 模型     | —                         | 0.554±0.211               | 23.2±8.4               | 8.5±3.2               |
| 注射用舒血宁 | 35                        | 0.273±0.233 <sup>*</sup>  | 12.0±10.2 <sup>*</sup> | 5.8±1.5 <sup>*</sup>  |
|        | 18                        | 0.205±0.204 <sup>**</sup> | 8.7±8.8 <sup>**</sup>  | 4.4±2.6 <sup>**</sup> |
|        | 9                         | 0.423±0.307               | 17.6±12.7              | 6.1±2.9               |

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

<sup>\*</sup> $P<0.05$  <sup>\*\*</sup> $P<0.01$  vs model group

SD 大鼠,清洁级,60 只,雄性,体重 190~230 g,随机分成 6 组,每组 10 只。按表 4 剂量,给药组尾 iv 给予 5% 葡萄糖注射液配制的注射用舒血宁药液,阳性对照组 iv 给予注射用丹参,模型组和假手术组给予 5% 葡萄糖注射液,每天 1 次,第 7 天,用 Pulsinelli 法略加改良制作大鼠全脑缺血模型:ip 水合氯醛(400 mg/kg)麻醉大鼠,颈部正中切口分离双侧颈总动脉(分离迷走神经),埋 1 号丝线备用。项部正中切口并暴露第一颈椎两侧的翼小孔备用。大鼠尾 iv 给药,10 min 后除假手术组外其余各组大鼠用直径 0.5 mm 的电凝针(电离子治疗仪)烧灼两侧翼小孔内的椎动脉,使椎动脉闭塞,再用无创性小动脉夹夹住双侧颈总动脉,造成大鼠全脑缺血。缺血 30 min 后,松开动脉夹进行缺血再灌注,30 min 后颈椎脱臼处死大鼠,取大脑。分离右半脑立即称质量,其质量乘以 2,即全脑质量。计算脑指数,并置 110℃ 烘箱中烘至恒重,称脑组织干质量,计算脑含水量。另取约 0.2 g 左侧大脑组织加 1.5 mL 冷生理盐水匀浆,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液以 10 倍冷生理盐水稀释,再取 5  $\mu$ L 用生化分析仪测定乳酸脱氢酶(LDH)活性;取上清液以 100 倍冷生理盐水稀释,再取 5  $\mu$ L 生化分析仪测定肌酸激酶(CPK)活性。计算脑组织中 LDH 和 CPK 的活性<sup>[5]</sup>。结果见表 4。注射用舒血宁组大鼠大脑指数降低,含水量(水肿程度)减少,并提高脑组织中 LDH 和 CPK 的活性,剂量关系明确。提示注射用舒血宁能明显降低全脑缺血大鼠脑水肿程度,降低 LDH 和 CPK 释放,一定程度保护脑神经细胞的破坏。

#### 4 讨论

脑缺血后首先影响到大脑的能量代谢过程,继而引发乳酸堆积,钙离子超载等病理生理变化,从而导致脑功能的严重损伤,逆转或改善缺血后脑功能

表 4 注射用舒血宁对大鼠全脑缺血再灌注模型的影响  
( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Table 4 Effect of Shuxuening Injection in global cerebral ischemia/reperfusion of rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

| 组别     | 剂量/<br>(mg · kg <sup>-1</sup> ) | 脑指数/<br>%                  | 脑含水量/<br>%              | LDH/<br>(U · L <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>5</sup> | CPK/<br>(U · L <sup>-1</sup> ) × 10 <sup>5</sup> |
|--------|---------------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 假手术    | —                               | 0.566 ± 0.031              | 78.7 ± 0.5              | 1.40 ± 0.67                                      | 12.5 ± 4.3                                       |
| 模型     | —                               | 0.604 ± 0.035 <sup>#</sup> | 79.4 ± 0.7 <sup>#</sup> | 0.77 ± 0.28 <sup>#</sup>                         | 6.2 ± 2.0 <sup>#</sup>                           |
| 注射用丹参  | 70                              | 0.570 ± 0.030 <sup>*</sup> | 78.8 ± 0.6 <sup>*</sup> | 1.30 ± 0.45 <sup>**</sup>                        | 11.4 ± 6.9 <sup>*</sup>                          |
| 注射用舒血宁 | 25                              | 0.562 ± 0.032 <sup>*</sup> | 78.8 ± 0.4 <sup>*</sup> | 1.33 ± 0.47 <sup>**</sup>                        | 11.8 ± 4.5 <sup>**</sup>                         |
|        | 12.5                            | 0.563 ± 0.029 <sup>*</sup> | 78.5 ± 1.0 <sup>*</sup> | 1.16 ± 0.35 <sup>*</sup>                         | 9.8 ± 4.3 <sup>*</sup>                           |
|        | 6.25                            | 0.562 ± 0.041              | 78.9 ± 0.6              | 1.15 ± 0.58                                      | 8.0 ± 3.2                                        |

与假手术组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

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

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs Sham group

<sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

异常是药物治疗的主要目标<sup>[6]</sup>。脑缺血实验模型按局部解剖学通常分为全脑缺血和局部脑缺血两大类。本实验采用的 4 种模型中,小鼠急性不完全性脑缺血、大鼠双侧颈总动脉结扎、小鼠中动脉栓塞属局部脑缺血模型,大鼠四动脉结扎属全脑缺血模型。实验结果表明,注射用舒血宁给药组能明显延长小鼠存活时间,降低大、小鼠脑缺血后的脑指数,改善脑

水肿程度,降低脑组织中的 LDH、CPK 的释放。脑梗死面积和神经学行为指标更从整体水平反映了注射用舒血宁改善小鼠神经行为,缩小脑梗死面积,有明确的抗实验性脑缺血作用。

缺血性脑血管疾病是一种多危险因素的疾病,且各因素错综复杂。本实验表明注射用舒血宁对实验动物脑缺血的保护作用机制还待进一步的深入研究。

#### References:

- [1] He T, Ming L. Protective effects of extract of *Astragalus* on injuries of global cerebral ischemia and reperfusion in rats and anoxia in mice [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2004, 20(5): 576-580.
- [2] Ren J, Jia Z P. Protective effects of *Ginkgolides* on three types of cerebral ischemic models in rats [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2005, 16(1): 41-45.
- [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, 2001.
- [4] Han Y, Liu N. The change of the content of interleukin-8 after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Arterioscler* (中国动脉硬化杂志), 2005, 13(2): 155-157.
- [5] Liu J, Yao C S. The effect of ischemic preconditioning on the expression of intercellular adhesion molecule-1 induced by cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. *J Apoplexy Nerv Dis* (中风与神经疾病杂志), 2004, 21(6): 510-512.
- [6] Li X Y, Tu C C. Study of protective effect of pentoxifylline (PTX) on acute cerebral ischemia in mice [J]. *Acta Acad Med Jiangxi* (江西医学院学报), 2003, 43(6): 37-39.

## 羟基红花黄色素 A 抗凝作用的研究

臧宝霞,金 鸣\*,李金荣

(首都医科大学附属北京安贞医院-北京市心肺血管疾病研究所 药理研究室,北京 100029)

红花为菊科植物 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,为活血化瘀代表药,常用于治疗冠心病、脑血栓等心脑血管疾病。羟基红花黄色素 A (hydroxy-safflor yellow A, HSYA) 是红花主要有效成分,具抗血小板激活因子的作用<sup>[1]</sup>,红花黄色素为红花抗血栓有效部位<sup>[2]</sup>。红花黄色素所含主要成分为 HSYA,为了探索红花抗血栓形成的有效成分,本实验观察了 HSYA 抑制血小板聚集及抗凝的作用,以探讨红花活血化瘀的机制。

### 1 材料与方法

1.1 仪器:Chrono-Log 型血小板聚集仪。

1.2 药品与试剂:HSYA 为本研究室以红花水提液经大孔树脂-葡聚糖凝胶柱色谱法制备,质量分数

为 97%;ADP 钠盐为 BM 公司进口分装,以生理盐水配成 2 mmol/L 溶液, -30 ℃ 保存,用前解冻;冻干含钙组织凝血活酶,上海荣盛生物技术有限公司产品,肝素为北京鼎国生物技术有限公司产品,香丹注射液为雅安三九药业有限公司产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 动物:雄性新西兰家兔为合格动物,体重 3~4 kg,中国药品生物制品检定所提供;清洁级 Wistar 大鼠为维通利华公司提供,体重 300 g。

1.4 HSYA 抑制 ADP 诱导家兔血小板聚集试验:家兔耳正中动脉取血,枸橼酸钠抗凝,120 × g 离心 5 min,取富血小板血浆 (PRP),下层 1 100 × g 离心 10 min 得贫血小板血浆 (PPP),用 PPP 稀释

收稿日期:2006-10-23

作者简介:臧宝霞(1961—),女(满族),北京人,主任药师,医学硕士,研究方向为中药红花活血化瘀作用机制的研究。

Tel: (010) 64456481 64456308

\* 通讯作者 金 鸣 Tel: (010) 64456308 E-mail: jinzhang@public3. bta. net. cn