

肿瘤机制与凋亡有密切关系。本研究显示赤芍总苷具有明显的抑瘤作用,有效诱导肿瘤细胞凋亡。

References:

- [1] Hua D, Wu M Y, Yu X H, et al. The influence of the total glucosides of *Radix Paeoniae Rubra* on immunological function in tumor-bearing mice [J]. *J Chin Med Pharmacol* (中医学报), 2004, 32(1): 47-48.
- [2] Xu H Y, Wang G Y, Chen Z W. The influence of the total glucosides of *Radix Paeoniae Rubra* on the expression of Bcl-2, c-myc gene and apoptosis mechanisms in tumor cell [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 2005, 10(21):

778-780.

- [3] Chen Z W, Xu H Y, Yan S C, et al. Morphologic experimental study on antitumor effect of total glucosides of *Radix Paeoniae Rubra* [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中医药学刊), 2005, 23(7): 1229-1230.
- [4] Dong L F, Liu J S, Miao Z H, et al. Antineoplastic effect of monkshood polysaccharide on mice transplanted with tumor lines of H₂₂ and S₁₈₀ [J]. *China J Basic Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2003, 9(9): 14-16.
- [5] Lu J P, Sun H, Ou Z L. Apoptosis of ovarian cancer cell line SKOV3 induced by arsenic trioxide [J]. *Curr Adv Obstet Gynecol* (现代妇产科进展), 2003, 12(2): 93-96.

蝙蝠葛酚性碱对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用

张晓娟, 罗宇芬, 杨 敏

(广东省人民医院 药学部, 广东 广州 510080)

摘 要:目的 研究蝙蝠葛酚性碱对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用。方法 线栓法制备大鼠大脑中动脉阻断局灶性脑缺血模型,缺血 2 h 后再灌注 24 h,观察蝙蝠葛酚性碱(5、10、20 mg/kg,再灌注开始时 ip 给药)对神经功能评分、脑梗死范围、脑水肿和血脑屏障通透性的影响,测定脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)水平和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性。结果 蝙蝠葛酚性碱能明显减轻大鼠的神经功能缺陷、缩小脑梗死体积、减轻脑水肿和血脑屏障通透性,显著增加 SOD 和 GSH-Px 活性,降低 MDA 水平。结论 蝙蝠葛酚性碱对脑缺血再灌注损伤有保护作用,其机制可能与降低血脑屏障通透性、抗脂质过氧化有关。

关键词:蝙蝠葛酚性碱;脑缺血再灌注损伤;血脑屏障;脂质过氧化

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)09-1367-03

Protection of phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum* on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

ZHANG Xiao-juan, LUO Yu-fen, YANG Min

(Department of Pharmacy, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China)

Key words: phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum* (PAMD); cerebral ischemia-reperfusion injury; blood brain barrier (BBB); lipid peroxidation

蝙蝠葛酚性碱(phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum*, PAMD)是从防己科植物蝙蝠葛 *Menispermum dauricum* DC. 根茎中提取的多种脂溶性生物碱的混合物。其主要成分为蝙蝠葛碱(dauricine)和蝙蝠葛苏林碱(daurisoline),两者均为双苄基异喹啉类生物碱,脂溶性高,易通过血脑屏障(BBB),在脑组织中有较高的浓度分布。经研究证明 PAMD 对大鼠脑缺血再灌注继发的炎性损伤具有抑制作用^[1],本实验进一步研究 PAMD 对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:PAMD(含蝙蝠葛碱约 83%,含蝙蝠葛苏林碱约 15%),本实验室自制,用 1 mol/L HCl 溶解后,再用 1 mol/L NaOH 调 pH 值 6.4。水合氯醛、红四氮唑(TTC),国药集团化学试剂有限公司;伊文思蓝(EB),Fluka 进口分装;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒及考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物、分组及给药方法:SD 大鼠(中山大学医学院实验动物中心提供),雄性,体重 200~250 g,随机分为 5 组:假手术组(除了不插尼龙线外,其余操

收稿日期:2006-10-22

作者简介:张晓娟(1975—),女,山东文登人,主管药师,硕士,主要从事临床药学及脑血管药理学研究。

Tel: (020) 83827812 E-mail: xiaojuanzhang@yahoo.com.cn

作与模型组相同),模型组(缺血 2 h 再灌 24 h,再灌后立即 ip NS 1 mL),PAMD 组(缺血 2 h 再灌 24 h,再灌后立即分别 ip PAMD 5、10、20 mg/kg)。

1.3 大鼠局灶性脑缺血模型的制备:参照 Longa 法^[2]制备右侧大脑中动脉栓塞(MCAO)模型,并加以改进。大鼠 ip 10% 水合氯醛溶液(300 mg/kg)麻醉,仰卧固定于恒温手术台上[温度(37±0.5)℃]。颈部正中皮肤切口,分离右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉和翼腭动脉,穿线备用。结扎翼腭动脉,在颈外动脉距颈总动脉分叉约 3 mm 处剪一切口,将一尼龙线(长 5 cm,直径 0.23 mm)经颈外动脉切口缓慢向颈内动脉入颅方向推进,以颈总动脉分叉处为标记,推进 17~20 mm 感到轻微阻力时即止,固定线栓。缺血 2 h 后,拔出尼龙线,扎紧动脉残端,缝合皮下组织和皮肤,完成缺血再灌注损伤模型。

1.4 神经功能评分:大鼠再灌 24 h,按 Longa 法^[2]5 分制标准进行评分:0 分,无明显神经功能缺陷症状;1 分,不能完全伸展左前肢;2 分,向左侧旋转;3 分,行走时向左侧倾倒;4 分,不能自行行走。

1.5 脑梗死体积测定:大鼠再灌 24 h 后,断头取脑,剔除嗅球、小脑和低位脑干,-20℃ 冷冻 10 min,沿冠状面切成厚度基本相同的 5 片,37℃、2% TTC 液中温育 20 min,10% 甲醛固定。正常脑组织呈玫瑰红色,脑梗死区呈白色。称取脑片的总质量及脑梗死组织的质量,计算后者占前者的百分比,即为梗死率。

1.6 脑组织含水量测定:大鼠再灌 24 h 后,断头取脑,立即称取缺血侧即右侧大脑半球的湿质量。然后将右侧大脑半球置 120℃ 的烤箱中烘烤 24 h 后称取干质量,计算脑组织含水量。

脑组织含水量=(脑湿质量-脑干质量)/脑湿质量×100%

1.7 血脑屏障通透性检测:参照 Matsuo 等^[3]的方法,采用 EB 染料检测 BBB 通透性。大鼠脑缺血 2 h 再灌注 22 h 后,经股静脉 iv 2% EB 生理盐水 3 mL/kg。2 h 后,大鼠用 10% 水合氯醛溶液 ip 麻醉,由左心室用生理盐水灌注至右心耳流出清亮液体,然后断头取脑,称湿质量后置入装有 0.5 mL 1 mol/L KOH 溶液的离心管中,37℃ 过夜,用 0.75 mL 0.33 mol/L H₃PO₄ 溶液中和碱性溶液,然后加入 2.25 mL 丙酮。振荡数秒,3 500 r/min 离心 15 min,重复 3 次。取上清液,用 751 型分光光度计在波长 620 nm 处测定吸光度值。根据 EB 液的标准曲

线,计算脑组织中的 EB 水平。

1.8 脑组织中 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平的测定:大鼠再灌 24 h 后断头取脑,剔除嗅球、小脑和低位脑干,在冰上分离左右两侧大脑半球,用冰生理盐水漂洗,除去血液,滤纸拭干。称质量,制成 10% 脑组织匀浆,离心取上清液,按试剂盒操作说明分别测定 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平。脑组织中的蛋白质采用考马斯亮蓝 G-250 法定量。

1.9 统计学处理:采用 SPSS 11.0 统计软件对实验数据进行处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用单因素方差分析,当方差分析有显著性时,进一步用 q 检验进行两两比较。

2 结果

2.1 PAMD 对神经功能评分和脑梗死体积的影响:大鼠缺血 2 h 后再灌 24 h,模型组出现明显的神经功能障碍和脑组织梗死。PAMD 组神经功能评分与模型组相比显著降低,脑梗死体积明显缩小。见表 1。

表 1 PAMD 对脑缺血再灌注大鼠神经功能评分和脑梗死体积的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of PAMD on neurological score and infarct size in cerebral ischemia-reperfusion rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	神经功能评分	脑梗死体积/%
假手术	—	—	—
模型	—	2.17±0.41	28.45±1.55
PAMD	5	1.50±0.55*	24.82±2.15**
	10	1.33±0.52*	21.78±1.43**
	20	1.17±0.41**	17.02±1.45**

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

2.2 PAMD 对脑组织含水量和 BBB 通透性的影响:大鼠脑缺血再灌注后,缺血侧脑组织中的含水量和 EB 水平明显增加,BBB 通透性增加。PAMD 组大鼠脑组织中的含水量和 EB 水平与模型组比较显著降低。见表 2。

2.3 PAMD 对脑组织中 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平的影响:大鼠缺血 2 h 后再灌 24 h,模型组与假手术组相比,脑组织中的 SOD 和 GSH-Px 活性显著降低,MDA 水平显著增加。PAMD 呈剂量依赖性提高脑组织中 SOD 和 GSH-Px 活性,降低 MDA 水平。结果见表 3。

3 讨论

用线栓法阻塞大鼠大脑中动脉建立局灶性脑缺血模型,无需开颅,清醒状态下即可再灌,其模拟的病理过程与临床卒中相似^[2],是目前最常用的脑缺

表 2 PAMD 对脑缺血再灌注大鼠脑组织含水量和 EB 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Table 2 Effect of PAMD on water content and EB level of brain tissue in cerebral ischemia-reperfusion rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	脑组织含水量/%	EB/(μg·g ⁻¹)
假手术	—	78.59±0.65	4.80±0.03
模型	—	81.32±0.60 $\Delta\Delta$	8.01±0.14 $\Delta\Delta$
PAMD	5	80.45±0.55*	7.80±0.17*
	10	79.51±0.38**	7.45±0.18**
	20	78.99±0.41**	6.85±0.13**

与假手术组比较: $\Delta\Delta P<0.01$ 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ $\Delta\Delta P<0.01$ vs Sham group* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group表 3 PAMD 对脑缺血再灌注大鼠脑组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Table 3 Effect of PAMD on SOD and GSH-Px activity and MDA level of brain tissue in cerebral ischemia-reperfusion rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(μmol·g ⁻¹)	GSH-Px/(U·g ⁻¹)
假手术	—	30.21±0.85	5.39±0.19	48.56±2.20
模型	—	18.02±0.50 $\Delta\Delta$	7.42±0.18 $\Delta\Delta$	26.51±1.83 $\Delta\Delta$
PAMD	5	23.07±0.43**	5.92±0.24**	35.48±1.57**
	10	26.16±0.18**	5.64±0.16**	40.60±1.44**
	20	28.54±0.47**	5.31±0.14**	45.04±1.86**

与假手术组比较: $\Delta\Delta P<0.01$; 与模型组比较: ** $P<0.01$ $\Delta\Delta P<0.01$ vs Sham group; ** $P<0.01$ vs model group

血再灌注模型。本实验结果证明, PAMD 低、中、高 3 个剂量能不同程度减轻脑缺血再灌注大鼠的神经功能缺陷, 缩小脑梗死体积, 表明 PAMD 对脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用。

脑缺血再灌注时, 各种损伤机制会导致 BBB 的破坏^[4], 从而使一些平时不能通过的大分子物质得以通过。EB 是一种经典的 BBB 受损示踪剂, 注射入血后能与血浆蛋白稳定结合, 该复合物不能通过完整的 BBB。当 BBB 受损通透性增加时, 结合有 EB 的血浆蛋白外渗进入脑组织, 使脑组织中的 EB 增加, 用分光光度计检测脑组织中的 EB 水平可反映出 BBB 通透性的变化情况^[5]。本研究发现, PAMD

能显著降低脑缺血再灌注大鼠脑组织中的 EB 水平, 具有维持 BBB 完整性、减轻脑水肿的作用。

目前认为, 脑缺血再灌注损伤是多种致病机制共同作用的结果, 其中氧自由基在脑缺血再灌注损伤中起着重要作用。脑缺血再灌注后, 脑组织中产生大量活性氧, 正常情况下这些氧自由基会被抗氧化酶如 SOD、GSH-Px 等清除, 而在缺血再灌注时, 抗氧化酶大量消耗, 不能有效清除而导致自由基堆积。急剧增加的氧自由基可与细胞膜不饱和脂肪酸发生反应, 形成过氧化脂质, 损伤膜成分, 导致细胞损伤破裂, BBB 破坏, 脑水肿形成^[6], MDA 作为氧自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的代谢产物, 其水平变化间接反映了组织中氧自由基的变化。本研究发现, PAMD 呈剂量依赖性的提高脑缺血再灌注大鼠脑组织的 SOD、GSH-Px 的活性, 减少 MDA 的产生, 具有良好的抗自由基损伤作用。

综上所述, PAMD 能够改善脑缺血再灌注大鼠的神经功能缺陷, 缩小脑梗死体积, 减轻脑水肿, 维持 BBB 正常通透性, 对脑缺血再灌注损伤具有良好的保护作用。PAMD 的保护作用可能与减轻自由基损伤有关, 其相关机制有待进一步研究。

References:

- [1] Zhang X J, Guo L J, Qu L, et al. Protective effects of phenolic alkaloids from *Menispermum dauricum* on inflammatory injury following focal cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2004, 39(8): 661-665.
- [2] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [3] Matsuo Y, Mihara S I, Ninomiya M, et al. Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(9): 2143-2148.
- [4] Rosenberg G A, Estrada E Y, Dencoff J E. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain [J]. *Stroke*, 1998, 29(10): 2189-2195.
- [5] Belayev L, Busto R, Zhao W, et al. Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Brain Res*, 1996, 739(1-2): 88-96.
- [6] Chan P H. Role of oxidants in ischemia brain damage [J]. *Stroke*, 1996, 27(6): 1124-1129.

欢 迎 投 稿

欢 迎 订 阅