

补阳还五汤有效部位对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制

吴常青¹, 汪春彦¹, 邵旭², 董六一^{1*}

1. 抗炎免疫药理学部共建教育部重点实验室, 国家中医药管理局中药药理三级实验室, 安徽医科大学药理学教研室, 安徽 合肥 230032

2. 合肥七星医药科技有限公司, 安徽 合肥 230088

摘要: **目的** 研究补阳还五汤有效部位(总苷和黄酮)对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制。**方法** 采用改良的线栓法, 建立大鼠大脑中动脉栓塞(MCAO)脑缺血再灌注模型。将雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组、银杏叶提取物(100 mg/kg)组和补阳还五汤有效部位高、中、低剂量(200、100、50 mg/kg)组。缺血再灌注24 h后进行神经功能缺失症状评分; TTC染色法检测脑梗死体积; 腹主动脉取血并离心, 检测血清中乳酸脱氢酶(LDH)活性和丙二醛(MDA)水平, ELISA法检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)水平。**结果** 与模型组相比, 补阳还五汤有效部位能明显改善脑缺血再灌注大鼠的神经功能障碍, 减少大鼠脑组织梗死体积, 显著抑制LDH活性, 降低MDA和TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平($P < 0.01$ 、 0.05)。**结论** 补阳还五汤有效部位对大鼠脑缺血再灌注损伤具有明显保护作用, 其机制可能与抑制炎症因子的分泌和表达及减轻脑组织的炎症反应有关。

关键词: 补阳还五汤; 脑缺血再灌注损伤; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-1 β ; 白细胞介素-6

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)01-0114-04

Protection and mechanism of effective fraction from Buyang Huanwu Decoction on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

WU Chang-qing¹, WANG Chun-yan¹, SHAO Xu², DONG Liu-yi¹

1. Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immunopharmacology, Ministry of Education; Key Laboratory of Chinese Medicine Research and Development, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Department of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. Hefei Qi-xing Pharmaceutical Medicine and Technology Co., Ltd., Hefei 230088, China

Abstract: Objective To study the protection and mechanisms of effective fraction from Buyang Huanwu Decoction (EFBHD) on rat brain after cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods** Rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury was created by the middle cerebral artery occlusion (MCAO) by modified suture method. Healthy male SD rats were randomly divided into six groups: Sham-operated group, model group, high-, middle-, and low-dose (200, 100, and 50 mg/kg) of EFBHD groups, and positive control group (treated with EGB 100 mg/kg). The neurological deficit symptom scores were observed and the infarct volume was measured by triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining in 24 h after the cerebral ischemia. The contents of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in serum were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods. In addition, the activity of LDH and MDA content in serum were determined by abdominal arterial blood and centrifuged. **Results** Compared with the model group, EFBHD could significantly improve the neurological dysfunction, decrease the cerebral infarct volume, and inhibit the activity of LDH, and reduce the contents of MDA, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in serum ($P < 0.01$, 0.05). **Conclusion** EFBHD has significant protection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, which may be related to the inhibition of inflammatory cytokine secretion and expression and inducing the inflammation in brain tissue.

Key words: effective fraction from Buyang Huanwu Decoction (EFBHD); brain ischemia-reperfusion injury; TNF- α ; IL-1 β ; IL-6

脑缺血后中枢神经系统内产生的细胞因子(cytokines)发挥神经营养和神经毒性双重作用, 但过量的细胞因子对神经元产生严重的毒性作用^[1],

通过介导白细胞黏附、浸润于缺血脑组织, 引起炎症反应, 从而损伤脑组织^[2]。在炎症细胞因子中, 肿瘤坏死因子(TNF- α)和白细胞介素(IL)等相

收稿日期: 2010-06-25

基金项目: 安徽省2008年度科技攻关计划重大科技专项基金(08010302099); 安徽医科大学博士基金(XJ200813)

作者简介: 吴常青(1983—), 男, 安徽黄山市人, 硕士研究生, 主要从事心脑血管药理学研究。Tel: (0551)5161133 E-mail: 313352774@qq.com

*通讯作者 董六一 Tel: (0551)5161133 E-mail: dongly061@yahoo.com.cn

关因子,在脑缺血后神经元的损伤中起重要作用,故受到国内外神经科学界的广泛关注。补阳还五汤是清代名医王清任创立的益气活血名方,主治中风后遗症,临床疗效显著^[3]。药理实验研究表明,补阳还五汤及其有效部位具有良好的抗脑缺血损伤作用^[4-6]。本课题组以名方补阳还五汤为基础,进行工艺创新,从中分离出有效部位群。本实验通过线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,研究补阳还五汤有效部位是否通过抑制脑缺血后炎症相关因子的分泌和表达,从而减轻脑缺血后炎症反应,探讨其对缺血脑组织的保护作用及机制。

1 材料

1.1 实验动物

成年健康清洁级SD大鼠,雄性,体质量250~320 g,由安徽医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(皖)2005-001。

1.2 药品与试剂

补阳还五汤有效部位(含黄芪总苷30%~60%、赤芍总苷5%~20%、红花黄酮5%~10%);合肥七星医药科技有限公司,批号20090504;银杏叶提取物:安徽圣鹰药业有限公司,批号080201;氯化-2,3,5-三苯基四氮唑(TTC),Sigma公司;TNF- α 、IL-1 β 、IL-6试剂盒(ELISA法),晶美生物工程有限公司;乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所。

1.3 主要仪器

SpectraMax 190 酶标仪, Molecular Devices, 美国; TDZ4—WS 低速台式离心机, 长沙湘仪离心机仪器有限公司; 756MC 紫外分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; FA 1004 天平, 上海精科天平厂。

2 方法

2.1 动物分组及给药

将实验大鼠随机分为6组:假手术组、模型组、银杏叶提取物($100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)组和补阳还五汤有效部位高、中、低剂量(200 、 100 、 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,其中 200 、 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 分别相当于补阳还五汤临床剂量的 $1/5\sim 1/10$)组,每组12只。各给药组每天ig给药1次,给药体积为 $1\text{ mL}/100\text{ g}$,假手术组和模型组给予等量生理盐水连续7d,第7天ig给药30 min后制备模型,造模后不再给药干预。

2.2 脑缺血再灌注损伤模型的制备

参照Zea Longa等^[7]的改良的线栓法制备大脑中动脉栓塞(MCAO)模型:用10%水合氯醛($0.3\text{ mL}/100\text{ g}$)ip麻醉大鼠,仰位固定,碘酊和酒精消

毒,行长约2 cm颈正中切口,钝性分离,暴露右侧颈总动脉(CCA)和分叉部,分离分叉处的颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),在距CCA分叉处结扎CCA和ECA,微动脉夹暂时性夹闭ICA远心端,于分叉处附近,在CCA剪一“V”口,将长约5 cm,直径0.235 mm,头端加热烧灼成小球状的鱼线^[6],酒精消毒,肝素浸泡晾干后,从剪口处插入,沿着ICA走向轻轻向前推进,注意不要误入翼腭动脉。该线约进入(18.5 ± 0.5) mm,可感到阻力而无法向前推进时停止。将鱼线固定在ICA上,缝合手术切口,栓线尾部伸出皮下1 cm左右便于拔栓线,缺血2 h后,外拉栓线,实现22 h再灌注。造模24 h后进行神经功能评分^[8-9](评分标准:无神经病学征象记为0分;提尾时病灶对侧前肢不能完全伸直为1分;向瘫痪侧旋转为2分;向病灶对侧跌倒为3分;无自发活动及意识障碍者为4分)。模型成功的标志是大鼠出现右眼Horner征;提尾时左前肢内收屈曲;爬行时向左侧倾倒或按逆时针方向转圈,不成功者予以剔除。假手术组ICA不插线栓,仅分离血管。手术前12 h禁食不禁水,整个手术过程注意保温(室温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右)。

2.3 脑梗死体积的测定

造模24 h后,根据神经行为学评分结果,筛选分值1~3分的动物,每组选8只造模成功的大鼠,10%水合氯醛麻醉,腹主动脉取血, $3\ 000\text{ r}/\text{min}$ 离心10 min,分离血清, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待用。快速取出全脑,去除嗅球、小脑和低位脑干,其余脑组织置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻15 min后取出,于冰盘上自额极至枕极,以视交叉水平为中心,行冠状等厚切片,片厚2 mm,共5片。将脑片立即浸泡于1% TTC磷酸缓冲液中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温避光孵育15 min。将染色后脑片置于10%福尔马林中固定后,取出并用滤纸吸干表面水分,脑片按脑的前后顺序整齐排列,拍照,图像分析系统测量红、白区域面积,计算梗死体积比。

$$\text{梗死体积比} = (\Sigma \text{梗死面积} \times \text{厚度}) / (\Sigma \text{全脑片面积} \times \text{厚度})$$

2.4 血清各指标的测定

ELISA法检测血清TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平;按试剂盒方法测定血清LDH活性及MDA水平,具体步骤严格参照试剂盒说明书操作。

2.5 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 11.0 统计软件包进行数据统计分析,组间比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 补阳还五汤有效部位对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能缺失症状评分和脑梗死体积比的影响

假手术组脑组织 TTC 染色呈均匀的玫瑰红色。模型组脑组织可见局灶性白色拒染区域即梗死灶 ($P<0.01$), 且神经功能障碍评分较假手术组显著增加 ($P<0.01$), 说明造模成功。补阳还五汤有效部位高、中、低剂量组及银杏叶提取物组梗死体积比和神经功能缺失症状评分与模型组比较明显缩小和减少 ($P<0.05, 0.01$), 且量效关系明显。结果见图 1 和表 1。

3.2 补阳还五汤有效部位对脑缺血再灌注损伤大鼠血清中 LDH 活性和 MDA 水平的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠血清 LDH 活性和 MDA 水平明显升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 银杏叶提取物和补阳还五汤有效部位可显著抑制大鼠血清中 LDH 活性和 MDA 水平的升高 ($P<0.01$)。结果见表 2。



假手术 模型 200 100 50 银杏叶提取物
补阳还五汤有效部位/(mg·kg⁻¹)

图 1 大鼠脑缺血再灌注损伤脑组织 TTC 染色结果
Fig. 1 TTC staining of brain tissue of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

表 1 补阳还五汤有效部位对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能缺失症状评分和脑梗死体积比的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of EFBHD on neurological function deficit symptom scores and infarct volume percentage of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	神经功能缺 失症状评分	梗死体积 比/%
假手术	—	0	0
模型	—	3.0±0.3 ^{##}	23.2±5.0 ^{##}
补阳还五汤	200	1.7±0.3 ^{**}	7.1±2.2 ^{**}
有效部位	100	2.3±0.4 ^{**}	10.6±2.6 ^{**}
	50	2.6±0.3 [*]	17.3±5.2 [*]
银杏叶提取物	100	2.5±0.2 ^{**}	7.4±3.9 ^{**}

与假手术组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$
^{##} $P<0.01$ vs Sham group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

3.3 补阳还五汤有效部位对脑缺血再灌注损伤大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 银杏叶提取物和补阳还五汤有效部位可明显降低大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平 ($P<0.01, 0.05$)。结果见表 2。

4 讨论

脑缺血后的再灌注是神经功能恢复的基本条件, 也是脑组织损伤加重的重要因素。再灌注本质上是组织循环功能的恢复, 如果能消除再灌注损伤, 则可进一步减少组织损伤, 保护细胞功能和避免缺血梗死区扩大, 以及促进半暗带神经元结构和功能恢复。减轻由于脑缺血所致的神经功能异常是对脑缺血再灌注后采取处理措施的主要目的。自由基连锁反应是脑缺血再灌注损伤的核心环节, 缺血再灌

表 2 补阳还五汤有效部位对脑缺血再灌注损伤大鼠血清 LDH、MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 2 Effect of EFBHD on contents of LDH, MDA, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in serum of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	LDH 活性/ (U·L ⁻¹)	MDA/ (nmol·mL ⁻¹)	TNF- α / (ng·L ⁻¹)	IL-1 β / (ng·L ⁻¹)	IL-6/ (ng·L ⁻¹)
假手术	—	3 485±175	3.78±0.52	46.1±3.0	23.9±1.4	24.9±1.1
模型	—	5 005±525 ^{##}	8.65±1.25 ^{##}	50.9±4.5 ^{##}	30.5±3.7 ^{##}	28.6±1.2 ^{##}
补阳还五汤	200	3 895±535 ^{**}	5.45±0.85 ^{**}	46.6±2.1 [*]	24.4±0.6 ^{**}	25.0±1.5 ^{**}
有效部位	100	4 115±475 ^{**}	6.06±0.95 ^{**}	47.2±2.7	28.8±1.9 [*]	25.2±2.2 ^{**}
	50	4 215±455 ^{**}	6.35±1.05 ^{**}	48.3±2.9	28.2±2.6 [*]	26.4±1.8 [*]
银杏叶提取物	100	4 182±551 ^{**}	5.25±1.15 ^{**}	47.4±3.3	25.0±2.6 ^{**}	26.2±1.1 [*]

与假手术组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$
^{##} $P<0.01$ vs Sham group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

注可使缺血损伤加重,造成严重的迟发性神经功能损害^[10-11]。本研究结果表明,补阳还五汤有效部位可自由基生成增加、自由基连锁反应激化,显著改善大鼠脑缺血再灌注后神经功能症状,并明显减少大鼠脑组织梗死体积,抑制大鼠血清 LDH 活性的升高,减少血清 MDA 水平。提示,补阳还五汤有效部位对缺血脑组织的保护作用可能与其抗氧化、清除自由基功能有关。

脑梗死过程中炎症反应促进了脑缺血损伤的发展,是加重缺血性脑损伤和神经损伤的重要病理机制之一^[12-13]。脑缺血过程中,中性粒细胞可通过黏附于毛细血管内皮表面,堵塞微循环通道,使幸存组织得不到有效灌注,产生细胞毒作用,产生和释放许多血管活性物质和一些炎症介质,形成缺血炎症的恶性循环,加重缺血区脑组织损伤。再灌注后内皮细胞炎症反应使血脑屏障受损,加重了脑损伤及脑水肿,此病理生理过程的基础是以 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等细胞因子^[14-15]为代表的多种炎性介质失控、释放而形成的“瀑布效应”。TNF- α 是与炎症及免疫反应有关的巨噬细胞分泌的细胞因子,在脑缺血早期 TNF- α 分泌或合成的增加是脑梗死形成的主要原因^[16],它具有增加血管内皮细胞的通透性,诱导细胞黏附因子表达等作用。IL-1 是免疫和炎症反应中的重要因子,其中起主要作用的是 IL-1 β 。IL-1 β 由胶质细胞、神经元细胞及内皮细胞合成和分泌,通过诱导白细胞黏附,介导白细胞向缺血脑组织浸润,引起脑组织炎症反应,导致脑组织进一步损伤。IL-6 是一种具有广泛生物学活性的多功能单链糖蛋白细胞因子,是由 T 细胞、成纤维细胞、单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞等产生,具有广泛生物学功能,参与机体免疫应答和炎症反应,目前认为 IL-6 是急性缺血期脑损伤程度的一个标志^[17]。脑缺血损伤后在缺血受损区有细胞因子的过量表达和炎性细胞浸润,过量炎症因子的产生能加重神经细胞损伤^[18]。本实验结果表明,模型组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 相关细胞因子均升高,表明脑缺血后诱导了炎性细胞因子的分泌和表达,引起了缺血后炎症反应。补阳还五汤有效部位可显著降低缺血再灌注大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平,提示补阳还五汤有效部位可明显抑制相关炎性细胞因子的分泌和表达,抑制白细胞黏附,从而减轻脑缺血再灌注后的炎症反应,保护脑组织,这可能是其对脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用的机制之一。

参考文献

- [1] Merrill J E, Benveniste E N. Cytokines in inflammatory-brain lesions: helpful and harmful [J]. *Trends Neurosci*, 1996, 19(18): 331-338.
- [2] Yang P, Jia Y H, Li J, *et al*. Anti-oxidation of tanshinone II_A and prohibitin on cardiomyocytes [J]. *Chin Herb Med*, 2010, 2(2): 204-210.
- [3] 谢明剑. 补阳还五汤与低分子肝素钙治疗急性脑梗死临床疗效比较 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(3): 189-190.
- [4] 陈洁, 曾耀英, 曾慧兰, 等. 补阳还五汤预先干预对大鼠脑死亡后心肺炎症细胞因子表达的抑制作用 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 757-761.
- [5] 张淑萍, 梁燕, 邓常青. 补阳还五汤及其有效部位对大鼠脑缺血再灌注后 caspase 表达的影响 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 1041-1045.
- [6] 刘柏炎, 蔡光先, 刘维, 等. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血后血管内皮生长因子及其受体 Flk1 的影响 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 394-397.
- [7] Zea Longa E, Weinstein P R, Carison S, *et al*. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] 吴兰鸥, 詹合琴, 闫俊岭, 等. 三七皂苷 Rg1 对大鼠脑缺血-再灌注损伤的保护作用及机制探讨 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 229-233.
- [9] 徐淑云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [10] 关欣, 纪影实, 李红, 等. 蒺藜皂苷对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用 [J]. 中草药, 2006, 37(6): 904-906.
- [11] 刘向前, 邹亲朋, 冯胜, 等. 五加苷对大鼠脑梗死的保护作用 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 95-97.
- [12] Wang Q, Tang X N, Yenari M A. The inflammatory response in stroke [J]. *J Neuroimmunol*, 2007, 184(1-2): 53-68.
- [13] Pan W, Kastin A J. Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier [J]. *Prog Neurobiol*, 2007, 83(6): 363-374.
- [14] Beridze M, Shakarishvili R, Gogokhia N. Probable role of immunological tolerance to ischemia injury in brain [J]. *Georgian Med News*, 2008, 163: 30-35.
- [15] Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(3): 464-479.
- [16] Sairanen T, Carpen O, Karjalainen-Lindsberg M L, *et al*. Evolution of cerebral tumor necrosis factor production during human ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2001, 32: 1750-1758.
- [17] Clark W M, Rinker L G, Lessov N S, *et al*. Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia [J]. *Stroke*, 2000, 31: 1715-1720.
- [18] Basu A, Lazovic J, Krady J K, *et al*. Interleukin-1 and the interleukin-1 type 1 receptor are essential for the progressive neurodegeneration that ensues subsequent to a mild hypoxic/ischemic injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(1): 17-29.