

丹芪偏瘫胶囊对大鼠实验性脑缺血再灌注损伤的保护作用

王 洋¹, 陈 涛¹, 张艳军², 李 正¹, 崔维利¹, 李 进^{1*}

1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

2. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193

摘要: **目的** 采用大鼠脑缺血再灌注模型, 研究丹芪偏瘫胶囊对脑缺血的保护作用, 并初步探讨其机制。 **方法** 180只雄性SD大鼠随机分为假手术组, 模型组, 阳性药组(银杏叶片 6.58 mg/kg), 丹芪偏瘫胶囊高、中、低剂量(306、153、76 mg/kg)组。各组大鼠每天ig给药1次, 连续给药3 d, 于第3次给药后1 h制备左侧大脑中动脉栓塞(MCAO)模型。术后24 h眼内眦取血, 测定血清超氧化物歧化酶(SOD)活性、内皮素(ET)水平。术后72 h取脑组织, 红四氮唑(TTC)染色法测定脑梗死面积、脑指数。 **结果** 与模型组比较, 丹芪偏瘫胶囊高、中剂量组能明显降低大鼠脑缺血再灌注损伤后的脑梗死指数和脑指数($P < 0.05$), 丹芪偏瘫胶囊各剂量组均可增强大鼠血清SOD的活性, 其中高、中剂量组与模型组比较差异显著($P < 0.05$); 丹芪偏瘫胶囊各剂量组可降低大鼠血清ET水平, 但与模型组比较差异无显著性。 **结论** 丹芪偏瘫胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用, 其作用机制可能与减轻脑水肿、抗氧化及抑制ET生成有关。

关键词: 丹芪偏瘫胶囊; 脑缺血再灌注; 脑梗死; 抗氧化; 内皮素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)07-0978-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.07.015

Protection of Danqi Piantan Capsule on experimental cerebral ischemia-reperfusion injury model in rats

WANG Yang¹, CHEN Tao¹, ZHANG Yan-jun², LI Zheng¹, CUI Wei-li¹, LI Jin¹

1. First Teaching Hospital, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To study the protective effect of Danqi Piantan Capsule (DPC, a capsule made of *Salviae Miltiorrhizae Radix*, *Astragali Radix*, *Paeoniae Rugra Radix*, etc. for the poststroke recovery) on the cerebral ischemia in the rat model of cerebral ischemia-reperfusion and its mechanism. **Methods** One hundred and eighty male SD rats were randomly divided into six groups: Sham operation, model, positive drug (6.58 mg/kg), the high-, mid-, and low-dose (306, 153, and 76 mg/kg) DPC groups. The rats were ig administered once daily for consecutive 3 d, and the rat models with left middle cerebral artery occlusion (MCAO) were established at 1 h after the last administration. The blood samples were collected from the fossa orbitalis vein of rats at 24 h after the surgery, used to determine the content of serum superoxide dismutases (SOD) and endothelin (ET). The brain tissue samples were collected at 72 h after the surgery for determining the cerebral infarct size and cerebral index through TTC-staining. **Results** Compared with the model group, the high- and mid-dose DPC could significantly reduce ($P < 0.05$) the cerebral index for the cerebral ischemia-reperfusion injury of rats; The three groups of DPC all could enhance the activity of SOD, especially the high- and mid-dose groups had the significant difference ($P < 0.05$); The three groups also could reduce the content of ET, but there was no significant difference. **Conclusion** DPC has the protective effect on cerebral ischemia-reperfusion and its mechanism may be related with relieving cerebral edema, anti-oxidation, and inhibiting ET.

Key words: Danqi Piantan Capsule; cerebral ischemia-reperfusion; cerebral infarction; anti-oxidation; endothelin

丹芪偏瘫胶囊为国家中药六类新药, 由丹参、黄芪、赤芍等药物组成, 主要用于脑梗死的恢复期^[1-2]。研究表明, 丹芪偏瘫胶囊可以增加中风患者的脑血流量^[3], 改善功能性自立及神经修复^[4]。为了探讨

收稿日期: 2013-09-09

基金项目: 天津市科技创新专项资金项目(06FZZDSH00408); 天津市西青区科技创新专项计划项目(XQCXZX2012-006)

作者简介: 王 洋(1981—), 男, 博士, 主管药师, 主要从事中药体内药物分析和中药药理学研究。

Tel: (022)83969680 E-mail: dayang810025@163.com

*通信作者 李 进 Tel: (022)83969822 E-mail: lijn@shitian.com

丹芪偏瘫胶囊对脑缺血再灌注损伤的保护作用, 本实验通过制备中动脉栓塞导致的大鼠脑缺血再灌注模型, 观察丹芪偏瘫胶囊对脑缺血大鼠脑梗死指数、脑指数、血清超氧化物歧化酶 (superoxide dismutases, SOD) 活性及血清内皮素 (endothelin, ET) 水平的影响, 为阐释丹芪偏瘫胶囊治疗脑缺血再灌注损伤的作用机制提供实验依据。

1 材料

1.1 药品和试剂

丹芪偏瘫胶囊 (其中含黄芪甲苷 0.5 mg/g, 批号 200810014, 天津市石天药业有限责任公司); 银杏叶片 (批号 20090506, 贵州信邦制药股份有限公司); 红四氮唑 (TTC) (Sigma 产品, 天津联星生物技术有限公司分装); SOD 免疫组化试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 内皮素 ET (北京普尔伟业生物科技有限公司); 其他化学试剂均为分析纯。

1.2 实验动物

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 (300 ± 20) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2007-0001。

1.3 仪器

电热恒温干燥箱, 予华仪器有限公司; JA1003 型电子天平; LD4—2A 医用离心机, 北京医用离心机厂; Micro Lab300 半自动生化仪; 荷兰威图; DU—530 紫外分光光度计; DNA/蛋白质分析仪 (美国 Beckman)。

2 方法

2.1 分组与给药

SD 大鼠 180 只随机分为假手术组, 模型组, 阳性药组 (银杏叶片 6.58 mg/kg), 丹芪偏瘫胶囊高、中、低剂量 (306、153、76 mg/kg) 组, 共 6 组, 每组 30 只, 各给药组每天 ig 给药 10 mL/kg (蒸馏水稀释) 1 次, 连续 3 d, 假手术组和模型组给予同样体积的蒸馏水。

2.2 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型制备

于第 3 次给药后 1 h 造模。参照 Zea 等^[5]的方法制备左侧大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型, 并加以改进。具体操作如下: 颈部备皮, 正中切口约 1 cm, 钝性分离皮下组织和肌肉; 分离左侧颈总动脉、颈外和颈内动脉, 沿颈内动脉继续向颅内方向分离至翼腭动脉分叉处, 暂夹闭颈总动脉和颈内动脉; 将直径为 0.26 mm、头端烧圆的单尼龙线经颈外动脉插入颈内动脉至大脑中动脉起始端, 进线深度距颈内、外动脉分

叉处 18~22 mm 时可感到轻微阻力, 即到达了较细的大脑前动脉。将尼龙线与颈内动脉一并结扎, 缝合皮下筋膜及皮肤, 即为 MCAO 模型。2 h 后轻轻提拉插线至颈内与颈外动脉分支处, 予以再灌注。假手术组进线深度 10 mm 左右, 不阻塞大脑中动脉。

2.3 检测指标

2.3.1 脑组织形态学观察和脑梗死指数测定 造模后 72 h 取脑, 剔除嗅球、低位脑干及小脑, 称质量。-20 ℃ 冷冻 10 min, 脑组织做冠状切片, 厚度为 2 mm 左右, 切成 5 片。脑片置于 1% TTC 溶液中, 37 ℃ 避光孵育 30 min。取出脑片用生理盐水冲洗 2 次, 10% 甲醛固定。正常脑组织呈玫瑰红色 (正常区), 而脑梗死区呈苍白色 (梗死区)。用眼科镊仔仔细分离苍白区和非苍白区, 参照文献方法^[6]分别称质量, 计算梗死区脑质量占全脑质量的百分比作为脑梗死指数。

脑梗死指数 = 苍白区质量 / (苍白区质量 + 非苍白区质量)

2.3.2 脑指数测定 将实验动物处死后, 取脑。剔除嗅球及小脑, 用滤纸吸干水分, 立即称质量, 计算脑指数。

脑指数 = 脑质量 / 体质量

2.3.3 血清 SOD 活性和 ET 水平测定 缺血再灌注 24 h 后, 眼内眦取血, 离心取血清; 用半自动生化分析仪按试剂盒说明书测定 SOD 活性, 采用放射免疫分析法、按试剂盒说明书操作测定 ET 水平。

2.4 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 18.0 统计学软件对不同组间进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 大鼠存活情况

假手术组大鼠无死亡, 其他各组大鼠的存活率均超过 90%, 最终各组的入组大鼠数量均为 30 只。

3.2 脑梗死指数比较

由表 1 可知, 与模型组比较各给药组脑梗死指数均降低, 说明药物各剂量均有一定疗效, 呈现一定的剂量依赖性, 其中丹芪偏瘫胶囊高剂量组与模型组比较具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3.3 脑指数比较

从表 2 可见, 模型组与假手术组比较脑指数明显增加 ($P < 0.05$), 说明造模成功; 与模型组比较丹芪偏瘫胶囊高、中、低剂量组均可降低大鼠的脑指数, 其中丹芪偏瘫胶囊高、中剂量组与模型组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 1 丹芪偏瘫胶囊对脑缺血再灌注损伤大鼠脑梗死指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 1 Effect of DPC on cerebral infarction index in cerebral ischemia-reperfusion of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物 / 只	脑梗死指数
模型	—	5	3.67 ± 0.72
银杏叶片	6.58	5	3.15 ± 0.66
丹芪偏瘫胶囊	306	6	2.13 ± 0.36*
	153	5	2.50 ± 0.63
	76	4	2.87 ± 0.77

与模型组比较: * $P < 0.05$, 下表同* $P < 0.05$ vs model group, same as below表 2 丹芪偏瘫胶囊对脑缺血再灌注损伤大鼠脑指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effect of DPC on cerebral index in cerebral ischemia-reperfusion of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物 / 只	脑指数
假手术	—	16	0.59 ± 0.05*
模型	—	9	0.71 ± 0.09
银杏叶片	6.58	6	0.64 ± 0.46
丹芪偏瘫胶囊	306	6	0.59 ± 0.47*
	153	7	0.63 ± 0.42*
	76	6	0.66 ± 0.09

3.4 血清 SOD 活性比较

从表 3 可见, 与模型组比较, 丹芪偏瘫胶囊各剂量组 SOD 活性有所增加, 其中丹芪偏瘫胶囊高、中剂量组 SOD 活性明显增加 ($P < 0.05$), 提示丹芪偏瘫胶囊能提高脑缺血再灌注损伤大鼠的抗氧化能力。

3.5 血清 ET 水平比较

从表 4 可见, 与模型组比较, 丹芪偏瘫胶囊各剂量组大鼠血清的 ET 水平均有所降低, 但差异不具

表 3 丹芪偏瘫胶囊对脑缺血再灌注损伤大鼠血清 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of DPC on content of serum SOD in cerebral ischemia-reperfusion of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物 / 只	SOD / (U·mL ⁻¹)
假手术	—	9	102.46 ± 19.16*
模型	—	12	125.57 ± 19.81
银杏叶片	6.58	7	113.09 ± 19.42
丹芪偏瘫胶囊	306	9	154.79 ± 17.25*
	153	8	146.68 ± 19.07*
	76	8	133.95 ± 22.79

表 4 丹芪偏瘫胶囊对脑缺血再灌注损伤大鼠血清 ET 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)Table 4 Effect of DPC on content of serum ET in cerebral ischemia-reperfusion of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	动物 / 只	ET / (pg·mL ⁻¹)
假手术	—	8	127.78 ± 49.39*
模型	—	8	180.64 ± 30.95
银杏叶片	6.58	7	194.31 ± 33.14
丹芪偏瘫胶囊	306	7	162.85 ± 32.13
	153	8	160.94 ± 19.09
	76	10	169.02 ± 32.52

有显著性, 表明丹芪偏瘫胶囊在一定程度上可以抑制脑缺血再灌注损伤大鼠血清中 ET 水平的增加。

3.6 脑组织形态学比较

假手术组脑组织结构完整, 呈正常的玫瑰红色, 未见苍白色。模型组大鼠, 左右脑形态不对称, 其右侧体积增大且有明显的苍白色脑梗死区。丹芪偏瘫胶囊 3 个给药剂量组对脑梗死大鼠均有不同程度的治疗作用, 其中高剂量组给药后, 梗死区面积明显减少, 脑组织形态与假手术组最为接近。结果见图 1。

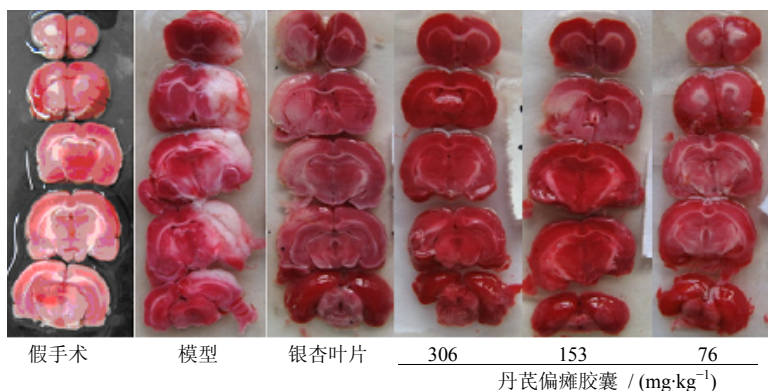


图 1 各组大鼠脑梗死形态观察

Fig. 1 Morphological observation on cerebral infarction of rats in each group

4 讨论

实验结果显示,脑缺血 2 h、再灌注 72 h 后,丹芪偏瘫胶囊高、中剂量组能明显降低大鼠脑缺血再灌注损伤后的脑指数 ($P<0.05$),减轻脑水肿,提示丹芪偏瘫胶囊对脑缺血再灌注后脑损伤有保护作用。缺血再灌注损伤的主要原因是氧自由基的过度产生^[7],在脑缺血再灌注过程中,自由基急剧增高可引起生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,从而损伤细胞膜结构,导致细胞膜功能障碍。脑组织内源性抗氧化酶 SOD 等活性下降,导致细胞膜发生脂质过氧化反应,而过氧化产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)等又进一步损伤细胞膜的流动性和通透性。本实验结果显示,脑缺血 2 h,再灌注 24 h 后,与模型组比较,丹芪偏瘫胶囊高、中剂量组均能明显升高脑缺血再灌注模型大鼠血清中 SOD 活性($P<0.05$),具有一定的抗氧化作用。ET 是一种具有强烈缩血管作用的血管活性肽。近年来已有研究表明,ET 在脑缺血后合成、释放增加,并可能参与了脑血管功能的紊乱及缺血性神经组织损伤^[8]。ET 水平的增高可使局部脑血流(regional cerebral blood flow, rCBF)明显减少加重缺血中心及半暗带的缺血及组织损伤,同时还可能通过直接损伤神经元及胶质细胞来参与脑梗死的形成和发展。临床及动物实验均发现脑缺血急性期血浆 ET 浓度增高,且与缺血脑组织中的变化相一致。本实验结果显示,脑缺血 2 h,再灌注 24 h 后,丹芪偏瘫胶囊高、中、低剂量组对脑缺血再灌注后大鼠血浆的 ET 水平增加有一定程度的抑制作用。提示丹芪偏瘫胶囊的神经保护作用可能与抑制 ET 生成有关。

本实验阳性对照组各指标未观察到明显的阳性结果,可能与药物给药剂量过小或药物对本病理模型不适用有关,而受试药物丹芪偏瘫胶囊与模型

组比较均显示出一定的治疗作用,今后的研究中将对其产生的原因进行分析,以期获得与受试药物治疗作用趋势相一致的阳性对照结果。

综上所述,丹芪偏瘫胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用,其作用机制可能与减轻脑水肿、抗氧化及抑制 ET 生成有关。

参考文献

- [1] Chen C, Venketasubramanian N, Gan R N, *et al.* Danqi Piantang Jiaonang (DJ), a traditional Chinese medicine, in poststroke recovery [J]. *Stroke*, 2009, 40(3): 859-863.
- [2] Quintard H, Borsotto M, Veyssiere J, *et al.* MLC901, a traditional Chinese medicine protects the brain against global ischemia [J]. *Neuropharmacology*, 2011, 61(4): 622-631.
- [3] Bavarsad S R, Shamsaei G, Pakdaman H, *et al.* The effect of NeuroAiD™ (MLC601) on cerebral blood flow velocity in subjects' post brain infarct in the middle cerebral artery territory [J]. *Eur J Intern Med*, 2011, 22(5): 509-513.
- [4] Siddiqui F J, Venketasubramanian N, Chan E S, *et al.* Efficacy and safety of MLC601 (NeuroAiD®), a traditional chinese medicine, in poststroke recovery: A systematic review [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2013, 35(Suppl 1): 8-17.
- [5] Zea Longa E L, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [7] 李利华, 库宝善, 饶煜. 褪黑素对大鼠全脑缺血-再灌注损伤及 P53 蛋白表达的影响 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2001, 15(6): 418-422.
- [8] Sharkey J, Butcher S P. Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin 21 adjacent to the rat middle cerebral artery [J]. *J Neurosci Methods*, 1995, 60(1/2): 125-131.