

珍龙醒脑胶囊对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用

魏霞^{1,2}, 祝清芬², 王海苹³, 孙鹏⁴, 刘娜², 张娟², 武继彪^{1*}

1. 山东中医药大学基础医学院, 山东 济南 250355

2. 山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250100

3. 山东金诃药物研究开发有限公司, 山东 济南 250100

4. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

摘要: **目的** 研究珍龙醒脑胶囊对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用。**方法** 120只SD大鼠随机分为假手术组, 模型组, 尼莫地平(37 mg/kg)组, 珍龙醒脑胶囊低、高剂量(125、250 mg/kg)组。利用大鼠可逆性右侧脑中动脉闭塞线栓法制作局灶性脑缺血再灌注模型, 用Longa's法、TTC染色法评价大鼠的神经功能评分和脑梗死体积; 检测左右半脑组织中谷胱甘肽(GSH)、总抗氧化能力(T-AOC)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、丙二醛(MDA)的量; Western blotting法检测脑组织中P38、NF- κ B、Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白表达水平。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠神经功能症状评分、脑梗死体积显著增高, T-AOC、T-SOD水平降低, 同时促进P38和Caspase-3蛋白表达。与模型组比较, 珍龙醒脑胶囊低、高剂量组及尼莫地平组可显著降低脑缺血再灌注大鼠的神经功能评分, 减少脑梗死体积, 提高T-AOC、T-SOD水平, 珍龙醒脑胶囊高剂量组可抑制P38和Caspase-3的蛋白表达。**结论** 珍龙醒脑胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤具有明显的保护作用, 其机制可能与改善神经功能、减少自由基损伤和抑制炎症因子表达和细胞凋亡有关。

关键词: 珍龙醒脑胶囊; 脑缺血再灌注损伤; 神经功能; 自由基; 炎症因子; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)12-1791-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.12.015

Protection of Zhenlong Xingnao Capsule on focal cerebral ischemia-reperfusion injury of rats

WEI Xia^{1,2}, ZHU Qing-fen², WANG Hai-ping³, SUN Peng⁴, LIU Na², ZHANG Juan², WU Ji-biao¹

1. Basic Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Shandong Institute of Food and Drug Control, Jinan 250100, China

3. Shandong Jinhe Drug Research and Development Co., Ltd., Jinan 250100, China

4. Pharmaceutical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: **Objective** To study the protective effect of Zhenlong Xingnao Capsule (ZXC) on the cerebral ischemia-reperfusion injury of rats. **Methods** Total 120 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into Sham operation group, the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model group, Nimodipine (37 mg/kg BW) group, low-dose ZXC (125 mg/kg) group, and high-dose ZXC (250 mg/kg). A focal cerebral ischemia-reperfusion model was made by using the occlusion of MCAO and occlusion of the right middle cerebral artery in rats. The infarct volume and the neurological deficit were determined by TTC staining and Longa's score; And to determine the contents of GSH, T-AOC, T-SOD, and MDA in left and right half brain tissues. To detect the protein expression level changes of P38, NF- κ B, Bcl-2, Bax, and Caspase-3 by Western blotting method. **Results** Compared with the Sham operation group, the neurologic symptom scores and infarct volume of MCAO of rats in model group were significantly increased, and the vigor of T-AOC and T-SOD was decreased. At the same time the protein expression of P38 and Caspase-3 was promoted. Compared with the model group, the neurologic symptom scores, injury degree of brain tissues, and brain infarct volume of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury were significantly decreased in the Nimodipine, low-dose ZXC, and high-dose ZXC groups, the vigor of T-SOD and T-AOC was increased. The high-dose ZXC can inhibit P38 and Caspase-3 expressions. **Conclusion** ZXC has the obvious protective effect on the brain ischemia-reperfusion injury in rats. Its mechanism may be related to the improvement of neurological function, the reduction of free radical injury, the inhibition of inflammation and the cell apoptosis.

Key words: Zhenlong Xingnao Capsule; cerebral ischemia-reperfusion injury; nerve function; free radicals; inflammation factors; cell apoptosis

收稿日期: 2015-03-05

作者简介: 魏霞, 博士研究生, 主管药师, 研究方向为心脑血管药理。Tel: 13869136776 E-mail: myweixia@126.com

*通信作者 武继彪, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心脑血管药理。E-mail: wujibiao63@126.com

珍龙醒脑胶囊是公元8世纪藏医医圣宇妥·元丹贡布创制的治疗“白脉病”的良方,始载于《四部医典》,由29味中药组成。对于高血压、冠心病、脑卒中、高脂血症、急性冠脉综合征、偏瘫、中风后遗症等心脑血管疾病有良效。前期研究结果表明珍龙醒脑胶囊能够降低血液黏度、改善血液流变学、增加脑供血;提高神经细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性,有效清除自由基,并保护和修复损伤的神经细胞,改善记忆,保护血管内壁,减少血栓形成等^[1-2]。本实验采用大鼠右侧脑中动脉闭塞线栓法(MCAO)制备脑缺血再灌注损伤模型,研究珍龙醒脑胶囊对脑缺血再灌注损伤中的神经功能、自由基损伤、炎症损伤以及细胞凋亡的改善作用,探讨其对脑缺血组织的保护作用及机制。

1 材料

1.1 动物

SD大鼠,120只,SPF级,雄性,体质量130~150 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2012-0001。饲养于屏障环境动物实验室,许可证号SYXK(鲁)2013-0012。

1.2 试剂和试药

珍龙醒脑胶囊,金诃藏药股份有限公司产品,批号20130110,规格每粒0.3 g;尼莫地平片,迪沙药业集团有限公司产品,批号140201,规格每片20 mg;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC),购于国药集团化学试剂有限公司;总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽(GSH)、总抗氧化能力(T-AOC)、丙二醛(MDA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;P38、Bax、核因子- κ B(NF- κ B)、Bcl-2、Caspase-3抗体均购自Cell Signaling Technology公司,BCA购自Thermofisher公司(货号#23225),二抗购自Jackson公司。

1.3 仪器

3-18KS高速低温离心机(德国Sigma公司),十万分之一天平(Sartorius公司),MagNA Lyser组织匀浆仪(德国罗氏公司),68709型冠状切脑模具(深圳瑞沃德公司),线栓(北京西浓科技有限公司,型号2636-100, A3级),FED53恒温干燥箱(德国Binder公司),紫外分光光度计(日本岛津),生化分析仪(日立),Amersham Ruby SE600 SDS-PAGE蛋白质凝胶系统(Amersham Biosciences),蛋白质转膜系统(湿转, Amersham Biosciences),Las-4000化学发光检测仪(Fuji FILM GE)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

将大鼠随机分为假手术组,模型组,珍龙醒脑胶囊低、高剂量(125、250 mg/kg)组,尼莫地平(37 mg/kg)组,假手术组和模型组大鼠ig给予0.5%羧甲基纤维素钠,给药组ig给予相应剂量药物,给药体积均为10 mL/kg,给药2周。末次给药1 h后,以10%水合氯醛3.5 mL/kg ip麻醉大鼠,迅速按照Clark等^[3]方法,利用可逆性大鼠脑中动脉闭塞线栓法进行大脑MCAO手术,缝合并消毒,缺血90 min后拔出栓线进行再灌注24 h^[4],假手术组动物进行手术,但不插入线栓。手术前12 h禁食不禁水,整个实验过程37℃保温动物,术后动物侧卧,以降低动物死亡率。

2.2 神经功能学评分

大鼠缺血再灌注90 min后,参照Longa等^[5]方法进行神经功能障碍评分,0分:无神经损伤症状;1分:提尾时病灶对侧前肢不能完全伸直;2分:提尾时病灶对侧前肢屈曲;3分:行走时轻度向瘫痪侧转圈;4分:行走时严重向瘫痪侧转圈;5分:不能自发行走,向对侧跌倒。分值越高,说明动物行为障碍越严重。选择神经功能评分在1分及以上者(即造模成功者)用于实验。

2.3 脑梗死体积和水肿度测定

再灌注24 h后,大鼠断头取脑,将脑组织置于冰浴中迅速切片,切片厚度为3 mm, TTC染色(染色液单瓶配制,使用前约5 min配制),将切片置于TTC染液中,37℃避光染色约30 min,取出切片,拍照,用Image-ProPlus 6.0软件处理图片,计算各组大鼠脑梗死体积比^[6],同时计算缺血侧大脑水肿度。

脑梗死体积比=(非缺血侧半球面积-缺血侧半球非梗死区面积)×厚度/全脑体积

水肿度=(缺血侧半球体积-非缺血侧半球体积)/非缺血侧半球体积

2.4 脑组织中GSH、T-AOC、T-SOD、MDA的检测

脑组织置冷生理盐水冲洗掉血液,滤纸拭干;分别切取左、右大脑半球称质量,制备左、右脑10%组织匀浆液,以3 000 r/min离心15 min,取上清液,待测。血液生化分析仪测定样本总蛋白,抗氧化相关指标检测严格按照各试剂盒说明书操作。

2.5 脑组织中 P38、NF-κB、Bcl-2、Bax、Caspase-3 的检测

取假手术组、模型组、珍龙醒脑胶囊高剂量组大鼠脑组织进行检测。MCAO 手术结束后,分别在缺血 30、90 min 及缺血 90 min 再灌注 30 min 共计 3 个时间点断头取脑,迅速剥离脑组织,切取额叶皮层组织约 50 μg, RIPA 液提取蛋白,每管组织样本加入 500 μL 1×Lysis Buffer,组织匀浆器匀浆并离心,取 5 μL 蛋白上清样本稀释 5 倍后用 BCA 法测 562 nm 蛋白吸光度值。用 6×Sample Buffer 将蛋白稀释到 1 mg/mL,取 30 μL 进行 Western blotting 实验。

2.6 统计学处理方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Excel 软件计算;各组动物功能学评分统计采用 IBM SPSS Statistics19.0 Wilcoxon 秩和检验;各组大鼠脑梗死体积、水肿度以及抗氧化指标统计采用 IBM SPSS Statistics19.0 单因素 ANOVA 分析;Western blotting 实验结果以蛋白质灰度值表示,并以 GraphPad Prism V5.0 软件进行统计分析。

3 结果

3.1 对大鼠神经功能评分的影响

模型组大鼠神经功能评分显著高于假手术组 ($P < 0.01$);与模型组比较,珍龙醒脑胶囊低、高剂量组及尼莫地平组大鼠神经功能评分显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 1。

3.2 对大鼠脑梗死体积和水肿度的影响

与假手术组比较,模型组大鼠大脑可见明显缺血坏死区域和水肿, TTC 染色结果见图 1;与模型组比较,珍龙醒脑胶囊低、高剂量组以及尼莫地平组大鼠脑梗死体积比均显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,珍龙醒脑胶囊低剂量组以及尼莫地平组大鼠水肿度显著降低 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

3.3 对大鼠脑组织抗氧化指标的影响

与假手术组比较,模型组大鼠左脑组织 4 项抗氧化指标均未见显著性差异,各给药组左脑组织 4 项抗氧化指标也无显著变化,结果见表 2;而模型组右脑组织(缺血侧)中 MDA 显著升高 ($P < 0.05$), GSH、T-AOC、T-SOD 均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01);

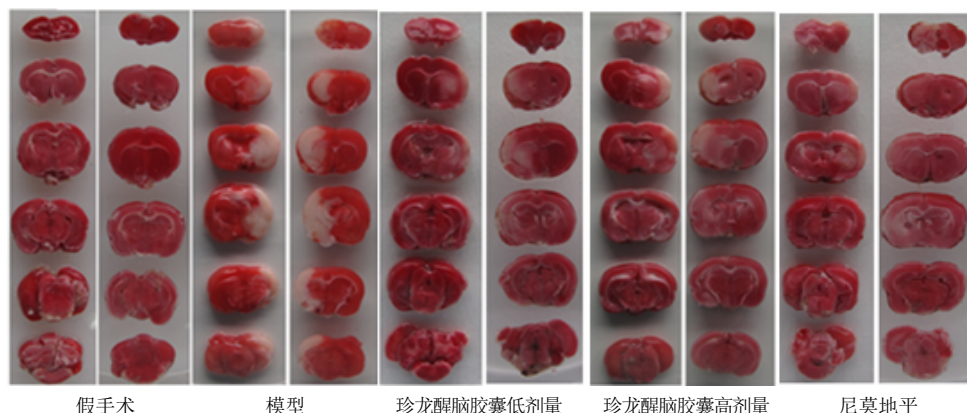
表 1 珍龙醒脑胶囊对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能评分、脑梗死体积和水肿度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effects of ZXC on neurological function score, infarction volume, and swelling degree of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	神经功能评分值	脑梗死体积比/%	水肿度/%
假手术	—	0	0	0
模型	—	2.08±0.67 ^{##}	23.02±3.20 ^{##}	27.22±4.12 ^{##}
珍龙醒脑胶囊	125	1.42±0.66 ^{**}	14.37±4.24 ^{**}	19.88±3.49 ^{**}
	250	1.50±0.67 [*]	13.55±1.98 ^{**}	25.00±4.56
尼莫地平	37	1.58±0.52 ^{**}	11.76±3.37 ^{**}	14.33±3.02 ^{**}

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下同

^{##} $P < 0.01$ vs Sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below



假手术 模型 珍龙醒脑胶囊低剂量 珍龙醒脑胶囊高剂量 尼莫地平

图 1 各组大鼠脑组织 TTC 染色结果

Fig. 1 TTC staining results of brain tissue in ischemia-reperfusion injury rats in each group

与模型组比较, 珍龙醒脑胶囊高剂量组大鼠右脑组织 T-AOC、T-SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$), 结果见表 3。

3.4 对大鼠脑额叶皮层 P38、NF- κ B、Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达的影响

与假手术组比较, 模型组缺血各时间点大鼠脑

额叶皮层中 P38、Caspase-3 表达升高, NF- κ B、Bax、Bcl-2 表达未见显著性变化; 与模型组比较, 珍龙醒脑胶囊高剂量组各时间点 P38 蛋白表达均明显下降 ($P < 0.05$), Caspase-3 在缺血 90 min 时表达显著下调。NF- κ B、Bax、Bcl-2 表达未见显著变化。结果见图 2 和 3。

表 2 各组大鼠左脑组织抗氧化指标测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Determination of antioxidant index in left brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	GSH/(mg·g ⁻¹)	T-AOC/(U·mg ⁻¹)	T-SOD/(U·mg ⁻¹)
假手术	—	2.02 ± 0.86	5.68 ± 1.84	1.82 ± 0.41	4.57 ± 1.73
模型	—	2.47 ± 0.94	5.98 ± 2.71	1.61 ± 0.47	3.84 ± 1.43
珍龙醒脑胶囊	125	3.23 ± 1.62	5.04 ± 1.50	1.54 ± 0.56	3.98 ± 1.67
	250	1.35 ± 0.64	6.92 ± 2.42	1.63 ± 0.55	4.02 ± 1.36
尼莫地平	37	2.32 ± 0.62	5.25 ± 2.06	1.65 ± 0.46	3.47 ± 1.57

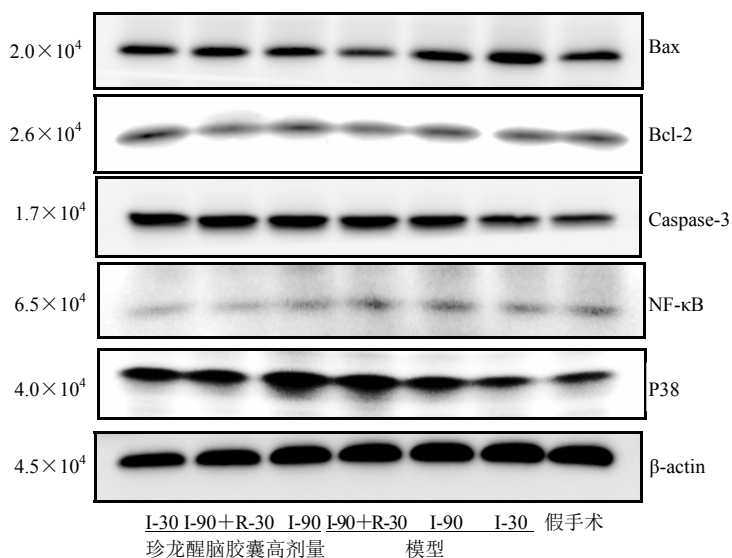
表 3 各组大鼠右脑组织抗氧化指标测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Determination of antioxidant index in right brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)	GSH/(mg·g ⁻¹)	T-AOC/(U·mg ⁻¹)	T-SOD/(U·mg ⁻¹)
假手术	—	1.73 ± 0.62	6.31 ± 2.71	2.03 ± 0.65	5.17 ± 1.83
模型	—	2.60 ± 0.82 [#]	3.83 ± 1.30 ^{##}	1.33 ± 0.34 [#]	3.78 ± 0.88 [#]
珍龙醒脑胶囊	125	2.23 ± 1.67	3.42 ± 1.16	1.34 ± 0.40	5.50 ± 2.13
	250	2.23 ± 0.73	4.89 ± 1.94	1.84 ± 0.50 [*]	5.58 ± 1.71 [*]
尼莫地平	37	2.33 ± 1.36	4.58 ± 2.18	1.38 ± 0.53	4.53 ± 1.48

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$, 下同

[#] $P < 0.05$ vs Sham group, same as below



I-30 为缺血 30 min, I-90 为缺血 90 min, I-90+R-30 为缺血 90 min 再灌注 30 min, 下图同

I-30 stands for 30 min of ischemia, I-90 stands for 90 min of ischemia, I-90+R30 stands for 30 min of reperfusion after 90 min of ischemia, same as below

图 2 Western blotting 检测各组大鼠脑额叶皮层 P38、NF- κ B、Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达结果

Fig. 2 Detection of P38, NF- κ B, Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in frontal cortex of rats in each group by Western blotting

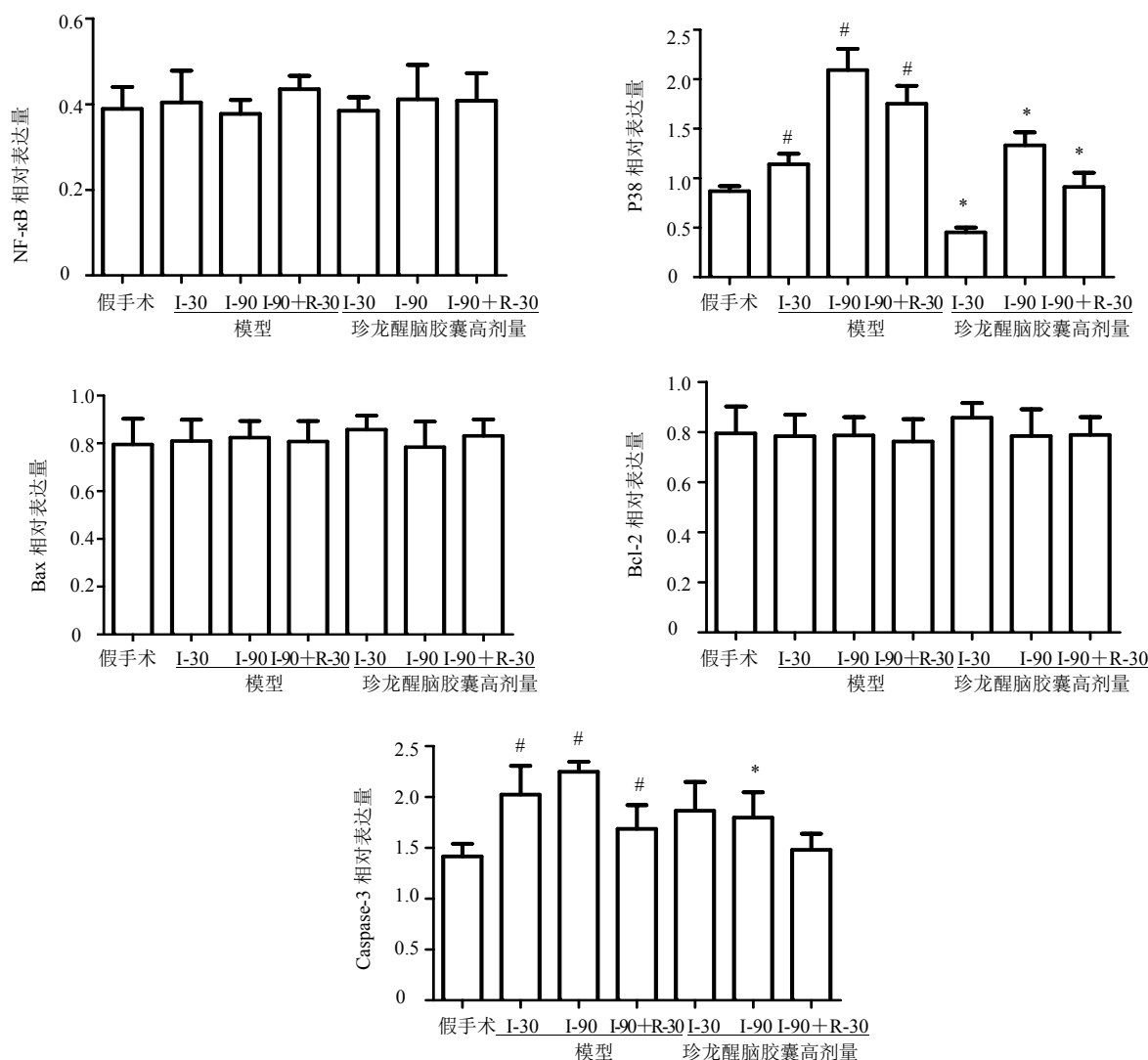


图 3 珍龙醒脑胶囊对脑缺血再灌注损伤大鼠额叶皮层 P38、NF-κB、Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达的影响

Fig. 3 Effect of ZXC on expression of P38, NF-κB, Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in brain tissues of ischemia-reperfusion injury rats

4 讨论

脑缺血再灌注损伤的病理生理学机制非常复杂，源自兴奋性氨基酸毒性、酸中毒、炎症反应、氧化应激、围梗死区去极化和细胞凋亡之间复杂的相互作用^[7-10]。

T-AOC 是由酶促和非酶促抗氧化防御体系共同组成，反映了机体总抗氧化、清除自由基的能力^[11]，这在评价应激对机体是否造成氧化损伤时具有特别重要的意义，是单项抗氧化剂指标所无法比拟的；当内源性或外源性刺激使机体代谢异常而骤然产生大量活性氧自由基^[12]，进而引起动物体内总抗氧化防御体系的反应，清除过量的活性氧自由基，保护各组织免受氧化损伤^[13]。T-SOD 是细胞内源性的抗氧化酶类，它可通过代谢转化将细胞内的活性

氧 (ROS) 转变为相对低毒性的物质，保护细胞免受损伤，对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用^[14]。T-AOC 和 T-SOD 活力的增加提示体内抗氧化酶合成增加超过了氧化/抗氧化平衡状态，以对应激损伤。尼莫地平为钙离子拮抗剂，对脑损伤的保护作用明确，在脑缺血再灌注损伤实验研究中一般选择尼莫地平作为阳性对照药，但本实验结果未见尼莫地平组抗氧化指标变化，提示尼莫地平脑保护作用不是通过抗氧化作用实现的。

P38 蛋白在脑组织中极为丰富，当受到环境应激、细胞因子刺激、DNA 损伤时，P38 被磷酸化激活，通过调节下游多个转录因子、核因子、信号蛋白等参与炎症反应、缺血再灌注损伤、调控肿瘤细胞的增殖与凋亡。Caspase 家族是细胞凋亡过程中

的关键元件,其激活与超常表达均引起细胞凋亡,因此又称死亡蛋白酶,可通过与众多蛋白因子的相互作用调控细胞凋亡。在已发现的14个家族成员中,Caspase-3处于凋亡有序级联反应的下游,是最重要的效应型Caspase,是Caspase家族中的最重要的凋亡执行者之一,是细胞凋亡的关键执行者,它的活化是凋亡进入不可逆阶段标志^[15]。

本实验结果表明,珍龙醒脑胶囊可改善大鼠神经功能评分,降低大鼠脑梗死体积和水肿度;同时能下调P38、Caspase-3的表达。说明珍龙醒脑胶囊对脑缺血再灌注损伤中的自由基损伤、炎症损伤及细胞凋亡有较明显的改善作用。由于炎症损伤和细胞凋亡是一系列复杂的过程,在后续的研究工作中,将进一步研究珍龙醒脑胶囊对信号转导途径的影响,以更深入探讨其对脑缺血再灌注损伤的保护作用。

参考文献

- [1] 高伟,张会鲜,孙建云,等.珍龙醒脑胶囊对小鼠脑缺氧及脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].中国老年学杂志,2012,32(22):4958-4960.
- [2] 高伟.珍龙醒脑对脑缺氧及脑缺血再灌注损伤的保护作用[D].济南:山东大学,2013.
- [3] Clark W M, Lessov N S, Dixon M P, *et al.* Monofilament intrauminal middle cerebral artery occlusion in the mouse [J]. *Neurol Res*, 1997, 19(6): 641-648.
- [4] Yunoki T, Deguchi K, Omote Y, *et al.* Anti-oxidative nutrient rich diet protects against acute ischemic brain damage in rats [J]. *Brain Res*, 2014, 1587: 33-39.
- [5] 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.
- [6] O'Donnell M E, Tran L, Lam T I, *et al.* Bumetanide inhibition of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter reduces edema formation in the rat middle cerebral artery occlusion model of stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24(9): 1046-1056.
- [7] Zheng Y Q, Liu J X, Li X Z, *et al.* RNA interference-mediated down-regulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30(7): 919-927.
- [8] Josefine N, Tadeusz W, Jelena P, *et al.* Enriched environment attenuates cell genesis in subventricular zone after focal ischemia in mice and decreases migration of newborn cells to the striatum [J]. *Stroke*, 2006, 37(11): 2824-2829.
- [9] Ziemka-Nalecz M, Zalewska T. Endogenous neurogenesis induced by ischemic brain injury or neurodegenerative diseases in adults [J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2012, 72(4): 309-324.
- [10] 江承平,王柏强,刘福,等.参附注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤脑组织磷酸果糖激酶表达的影响[J].药物评价研究,2013,36(2):100-103.
- [11] 高贵超,张艳红,马文强,等.脂多糖对母鸡产蛋及产道先天免疫和应激相关基因表达的影响[J].南京农业大学学报,2014,37(2):92-98.
- [12] 王秋林,王浩毅,王树人.氧化应激状态的评价[J].中国病理生理杂志,2006,21(10):2069-2074.
- [13] Mathew S, Ashok Kumar K, Anandan R, *et al.* Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon* [J]. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxic Pharmacol*, 2007, 145(3): 315-320.
- [14] 何玲,孙桂波,孙潇,等.木犀草苷对阿霉素诱导乳鼠心肌细胞损伤的保护作用[J].中国药理学通报,2012,28(9):1229-1234.
- [15] Cryns V, Yuan J. Protease to die for [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(11): 1551-1570.