

脑脉利颗粒对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制

任弋¹, 苏梅², 郑静¹, 秦引林², 陈涛², 季晖^{1*}(¹中国药科大学药理学教研室, 南京 210009; ²江苏柯菲平医药股份有限公司, 南京 210016)

摘要 确定经口给予受试药脑脉利颗粒对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响。除伪手术组外的其他各组大鼠均采用线栓法闭塞大脑中动脉(MCAO)制备大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。通过神经功能学评分、脑梗死面积测定、脑含水量计算、病理组织学评分以及脑组织生化指标的测定来评价脑脉利颗粒的抗脑缺血、抗脑水肿和抗氧化作用。结果显示,与模型组相比,脑脉利颗粒在6和3 g/kg的剂量下能显著缩小脑梗死面积、降低脑病理组织学评分、降低脑组织H₂O₂和MDA含量、提高抗超氧阴离子自由基和抑制羟自由基能力;此外,6 g/kg剂量组还能显著减轻脑缺血再灌注大鼠的神经功能学损伤、减少脑含水量,增加脑组织中GSH含量、提高GSH-Px、SOD酶活力。结果提示,脑脉利颗粒对大鼠脑缺血再灌注损伤具有明显的保护作用,其机制与抗氧化作用有关。

关键词 脑脉利颗粒;脑缺血再灌注损伤;中动脉缺血再灌注模型;自由基;抗氧化

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)01-0100-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150115

Protective effects of *Naomaili* granules on cerebral ischemia-reperfusion in rats and its mechanismREN Yi¹, SU Mei², ZHENG Jing¹, QIN Yinlin², CHEN Tao², JI Hui^{1*}¹Department of Pharmacology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;²Jiangsu Kefeping Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210016, China

Abstract The objective of the study was to determine the potential effects of *Naomaili* granules on rats subjected to ischemia and reperfusion. With the exception of animals in sham group, all animals in treatment groups were subjected to ischemia and reperfusion by middle cerebral artery occlusion (MCAO) with thread technique. The ability of anti-cerebral ischemia, relieving cerebral edema and antioxidation was evaluated by the measurement of neurological deficit score, ratios of infarction area, brain water content, histopathological score and biochemical indexes related to oxidative stress in brain tissue. Significantly reduction of infarction area, histopathological score, contents of H₂O₂ and MDA were observed at 6 g/kg and 3 g/kg *Naomaili* granules compared to animals in the model group; the capacity of inhibition of superoxide anion radical (O₂⁻) and hydroxyl radical (·OH) were also found to have increased. Additionally, *Naomaili* granules (6 g/kg) improved neurological function, reduced brain water content, and increased the level of GSH, GSH-Px and SOD compared with model group. The result suggested that *Naomaili* granules exhibited obvious protection against cerebral ischemia and reperfusion-induced injury due to its antioxidating effect.

Key words *Naomaili* granules; cerebral ischemia-reperfusion; middle cerebral artery occlusion reperfusion models; free radical; antioxidation

脑缺血是因大脑血流供应障碍引起的脑组织变性坏死甚至功能丧失的疾病,又称缺血性脑血管病,具有高发病率、高致残率、高死亡率的特点^[1],

可发生于各年龄段人群,是现今常见的一种神经内科多发病。脑缺血病人发生再灌注损伤,会导致组织细胞损伤进行性加重,对病情产生不利的

影响^[2]。脑脉利颗粒(*Naomaili granules*)是以益母草、三七、黄芪、姜黄等组成的中药复方制剂,用于气虚血瘀型脑卒中病中经络急性期,改善半身不遂、偏身麻木、口舌歪斜、语言蹇涩等症状^[3]。从组方上分析,其有效成分益母草碱、三七皂苷、黄芪皂苷^[4-6]等均有抗氧化应激反应,但脑脉利颗粒对实验动物脑缺血再灌注损伤的影响及抗氧化作用至今均未见有文献报道,故本实验采用大鼠脑中动脉闭塞(MCAO)模型,通过神经功能学评分、脑梗死面积、脑含水量、脑组织病理形态学变化及生化学等指标,综合评价脑脉利颗粒在大鼠脑缺血再灌注损伤模型中的保护作用及其抗氧化机制,从而为临床提供更有价值的理论支持。

1 材 料

1.1 药品和试剂

脑脉利颗粒为南京柯菲平盛辉制药有限公司产品,批号11-140301。每袋生药含量相当于益母草5 g、三七1 g、黄芪6.7 g、姜黄3 g、川芎3.3 g、红花3.3 g、丹参3.3 g、赤芍3 g、当归3 g、白芍2 g、川牛膝2 g。处方中三七粉碎直接入药,姜黄、当归提取挥发油,丹参用乙醇回流提取脂溶性成份,益母草等七味药用水煎煮,最后混合制成颗粒。该制剂的有效成分包括三七皂苷、人参皂苷、黄芪甲苷、丹参酮II A、姜黄素、芍药苷、盐酸水苏碱等。银杏叶片(每片含总黄酮醇苷19.2 mg、萜类内酯4.8 mg,扬子江药业集团有限公司);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司);40%甲醛(西陇化工股份有限公司);2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC,美国Amresco公司);0.9%氯化钠注射液(安徽双鹤药业有限责任公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究);微量还原性谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢(H₂O₂)、抗超氧阴离子自由基、羟自由基测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 仪 器

SH-1000 全波长酶标仪(日本株式会社日立制造所);BT125D 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.3 动 物

清洁级雄性SD大鼠100只,体重180~220 g,购自浙江省实验动物中心,动物合格证号:SCXK(浙)2014-0001。饲养于(25±3)℃,相对湿度60%~75%环境中,昼夜明暗交替时间12 h,自由摄食、饮水,适应性饲养一周后用于实验。

2 方 法

2.1 大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型的建立

大鼠术前禁食不禁水12 h,腹腔注射3%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉,然后对动物实施手术,以Zea Longa改良栓线法阻塞大脑中动脉造成脑缺血再灌注损伤模型^[7]。造模完成后立即给药,连续给药5 d,于末次给药后2 h处死动物,进行各项指标检测。伪手术组大鼠麻醉后,仅暴露颈内、外动脉分叉,不闭塞大脑中动脉。术中及术后保持室温25℃左右,用白炽灯照射动物以维持其肛温在(37±1)℃^[8],直到恢复活动。

2.2 给药和分组

实验前将动物随机分成5组,即:伪手术组、模型组、银杏叶片组(按萜类内酯和黄酮醇苷总量计7.2 mg/kg)、脑脉利颗粒给药组(3 g/kg、6 g/kg)。各组大鼠均于手术造模之后立即灌胃给药,连续给药5 d,给药体积为1 mL/100 g。伪手术组和模型组动物分别给予等体积的注射用生理盐水。

2.3 脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损评分

在每次给药后2 h分别对各组大鼠进行神经功能学评分。评分标准:采用Zea Longa 5分制^[9]。0分,无神经损害的症状,活动正常;1分,不能伸展对侧前爪;2分,向外侧转圈;3分,行走时身体向偏瘫侧倾倒;4分,不能自发行走,意识丧失。

2.4 脑缺血再灌注大鼠脑梗死面积测定

各组大鼠于末次给药后2 h处死,迅速取出脑组织,去除嗅球、小脑和低位脑干,冠状切为6片,迅速加入1% TTC染色液,避光置于37℃水浴中10 min,上下翻动后继续水浴10 min。经TTC染色后,正常脑组织呈玫红色,梗死组织呈白色。拍照后用Image-Pro Plus 6图像分析软件分析照片,计算梗死面积百分比^[10]。

2.5 脑缺血再灌注大鼠脑组织含水量测定

各组大鼠于末次给药后2 h处死,迅速取出脑组织,去除嗅球、小脑和低位脑干,迅速称取脑湿

重。然后将脑组织置于 110 ℃烘箱内 24 h,称取脑组织干重。计算脑含水量百分比^[11]。

2.6 脑缺血再灌注大鼠脑组织病理学检查

各组大鼠于末次给药后 2 h 处死,迅速取出脑组织,去除嗅球、小脑和低位脑干,用 10% 福尔马林固定,行病理组织学检查。观察大脑皮质神经细胞有无变性、坏死,大脑皮质、髓质有无水肿,评分标准如下:轻微病变为 0.5 分,轻度为 1 分,中度为 2 分,重度为 3 分,极重度为 4 分,无明显病变为 0 分,累加所有分数,得出总分,计算出每组每只动物的均分。

2.7 脑缺血再灌注大鼠脑组织生化指标测定

各组大鼠脑组织生化指标的测定均按照试剂盒说明书进行。

2.8 数据分析

实验数据各组采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计分析利用

GraphPad Prism 5.0 软件完成。多组均数间的比较采用单因素方差分析(ONE-WAY ANOVA),满足方差齐性要求的数据采用 Turkey 法进行各组均数的多重比较,否则采用 Dunnett's C 验证结果。统计学分析结果 $P < 0.05$ 认为有显著性差异, $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 认为有极显著性差异。

3 结果

3.1 对脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损评分的影响

脑缺血再灌注后,伪手术组大鼠未见明显神经学功能损伤,而模型组大鼠表现出严重的神经缺损症状($P < 0.01$)。与模型组相比,在连续给药至第 4 天时脑脉利颗粒高剂量组动物的神经功能得到了显著性改善($P < 0.05$),第 5 天时显示出更为显著的神经功能改善作用($P < 0.01$),结果见表 1。

Table 1 Effects of Naomaili granules on neurological deficit score in the rats subjected to cerebral ischemia and reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Group	Dose	Neurological deficit score				
		1	2	3	4	5 d
Sham	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Model	-	2.44 ± 0.53 ^{##}	2.44 ± 0.53 ^{##}	2.56 ± 0.73 ^{##}	2.89 ± 0.60 ^{##}	2.78 ± 0.44 ^{##}
Yinxingye tablet	7.2 mg/kg	2.56 ± 0.53	2.56 ± 0.53	2.33 ± 0.71	2.11 ± 0.78 *	2.00 ± 0.71 *
Naomaili granules	3 g/kg	2.44 ± 0.52	2.56 ± 0.72	2.44 ± 0.53	2.22 ± 0.67	2.11 ± 0.78
	6 g/kg	2.56 ± 0.52	2.56 ± 0.52	2.11 ± 0.60	2.00 ± 0.71 *	1.89 ± 0.60 **

^{##} $P < 0.01$ vs sham group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

3.2 对缺血再灌注大鼠脑梗死面积的影响

脑缺血再灌注大鼠连续给药 5 d,于末次给药后 2 h 将各组大鼠处死并经 TTC 染色,伪手术组未见明显的梗死区,而模型组则出现显著的梗死区。脑脉利颗粒高、低剂量组均明显缩小了梗死面积,分别缩小 50.72% ($P < 0.001$) 和 26.94% ($P < 0.01$)。结果见表 2。

Table 2 Effect of Naomaili granules on infarct area after cerebral I/R in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Dose	Infarction area/%	Infarction area reduction/%
Model	-	26.52 ± 1.85	-
Yinxingye tablet	7.2 mg/kg	10.38 ± 1.85 ***	60.86
Naomaili granules	3 g/kg	19.60 ± 3.93 **	26.94
	6 g/kg	13.07 ± 3.00 ***	50.72

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model group

3.3 对缺血再灌注大鼠脑含水量的影响

与伪手术组相比,脑缺血再灌注模型组大鼠脑

含水量显著增加。与模型组相比,脑脉利颗粒高剂量组明显降低了大鼠的脑含水量($P < 0.01$),低剂量组也在一定程度上降低了大鼠的脑含水量,但统计学上无显著性差异。结果见表 3。

Table 3 Effect of Naomaili granules on brain water content in the rats subjected to cerebral ischemia and reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Dose	Brain water content/%	Reduction of brain water content/%
Sham	-	78.62 ± 1.11	-
Model	-	83.43 ± 1.38 ^{###}	-
Yinxingye tablet	7.2 mg/kg	81.18 ± 1.37 *	2.70
Naomaili granules	3 g/kg	81.58 ± 1.06	2.22
	6 g/kg	80.60 ± 1.19 **	3.39

^{###} $P < 0.001$ vs sham group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group

3.4 对脑缺血再灌注大鼠脑组织形态学的影响

脑缺血再灌注损伤大鼠病理评分结果显示,与伪手术组相比,模型组脑缺血病变评分显著增加($P < 0.001$)。与模型组相比,脑脉利颗粒高、低剂量组大鼠的脑组织病理评分降低,且具有显

著性差异 ($P < 0.01$; $P < 0.05$)。结果见表 4 和图 1。

Table 4 Effect of Naomaili granules on histopathology scores in the rats subjected to cerebral ischemia and reperfusion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	Dose	Cerebral histopathology score	Reduction of the score/%
Sham	—	0.00 ± 0.00	—
Model	—	12.50 ± 1.50 ^{###}	—
Yinxingye tablet	7.2 mg/kg	8.33 ± 1.15 [*]	33.36
Naomaili granules	3 g/kg	8.17 ± 1.61 [*]	34.64
	6 g/kg	6.83 ± 2.02 ^{**}	45.36

^{###} $P < 0.001$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.5 对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中 GSH 含量、GSH-Px 酶活力、MDA 含量、SOD 酶活力的影响

与伪手术组相比,模型组大鼠经脑缺血再灌注损伤后脑组织中 GSH 含量、GSH-Px 活力、SOD 活力明显下降 ($P < 0.01$; $P < 0.01$; $P < 0.001$),MDA 含量明显增多 ($P < 0.01$),显示造模成功。与模型组相比,脑脉利颗粒高剂量组动物脑组织中 GSH 含量、GSH-Px 活力、SOD 活力显著升高 ($P < 0.01$; $P < 0.05$; $P < 0.01$),MDA 含量显著降低 ($P < 0.001$)。结果见表 5。

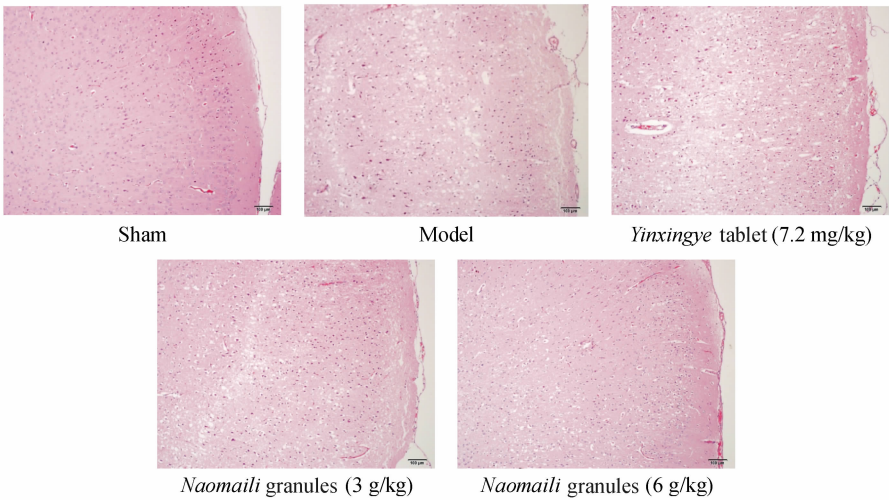


Figure 1 Effect of Naomaili granules on neuronal injury in the ischemic cerebral cortex of rats(HE, ×100)

Table 5 Effects of Naomaili granules on brain level of glutathione(GSH),glutathione peroxidase(GSH-Px),malondialdehyde(MDA) and superoxide dismutase(SOD) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Dose	GSH/($\mu\text{mol/g prot}$)	GSH-Px/(U/mg prot)	MDA/(nmol/mg prot)	SOD/(U/mg prot)
Sham	—	30.52 ± 3.04	35.01 ± 5.35	9.53 ± 1.22	158.14 ± 20.64
Model	—	21.90 ± 2.72 ^{##}	23.74 ± 3.79 ^{##}	16.71 ± 2.71 ^{##}	101.63 ± 26.27 ^{###}
Yinxingye tablet	7.2 mg/kg	29.61 ± 5.50 [*]	32.15 ± 4.15	11.70 ± 1.66 ^{**}	139.51 ± 13.37 [*]
Naomaili granules	3 g/kg	28.35 ± 3.50	30.55 ± 7.30	13.46 ± 2.34 [*]	129.11 ± 14.27
	6 g/kg	30.23 ± 3.86 ^{**}	34.31 ± 4.03 [*]	10.16 ± 10.2 ^{***}	146.94 ± 17.33 ^{**}

^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ vs model group

3.6 对脑缺血再灌注大鼠脑组织中活性氧(ROS)的影响

与伪手术组相比,脑缺血再灌注损伤模型组的H₂O₂含量明显增多 ($P < 0.001$),抗超氧阴离子自由基、抑制羟自由基的能力明显减弱 ($P < 0.05$; $P < 0.05$),表明造模成功。与模型组相比,脑脉利颗粒高、低剂量组H₂O₂含量明显减少 ($P < 0.01$; $P < 0.05$),抗超氧阴离子自由基能力明显增强

($P < 0.01$; $P < 0.05$)、抑制羟自由基能力明显增强 ($P < 0.01$; $P < 0.05$)。结果见表 6。

4 讨论

本实验采用大脑中动脉线栓塞法制备局灶性脑缺血再灌注模型,结果显示模型组大鼠神经功能学受损明显,实验后期甚至出现身体倾倒、不能自发行走等现象;经 TTC 染色表明脑梗死损伤较为

Table 6 Effects of *Naomaili* granules on reactive oxygen species(ROS) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Dose	H ₂ O ₂ /(mmol/g prot)	Inhibition of O ₂ ⁻ /(U/g prot)	Inhibition of ·OH/(U/mg prot)
Sham	–	9.99 ± 1.06	135.67 ± 15.36	89.56 ± 9.93
Model	–	16.22 ± 1.56 ^{###}	111.05 ± 11.48 [#]	69.38 ± 12.89 [#]
<i>Yinxingye</i> tablet	7.2 mg/kg	11.58 ± 3.26 [*]	137.07 ± 15.47 [*]	92.58 ± 11.64 [*]
<i>Naomaili</i> granules	3 g/kg	11.65 ± 1.61 [*]	136.12 ± 15.21 [*]	91.08 ± 11.19 [*]
	6 g/kg	10.76 ± 3.31 ^{**}	144.22 ± 14.67 ^{**}	99.73 ± 13.07 ^{**}

[#]*P* < 0.05, ^{###}*P* < 0.001 vs sham group; ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01 vs model group

严重;病理检查发现大脑皮质和髓质出现明显的病理损伤,表现为细胞性水肿和血管性水肿;脑组织的 GSH 含量、GSH-Px 酶活力、SOD 酶活力以及抗超氧化阴离子自由基能力和抑制羟自由基能力明显降低,脑组织的 H₂O₂、MDA 含量明显提高,提示缺血再灌注损伤后脑组织中自由基产生增多且脑组织清除自由基能力减弱,表明造模成功。

以灌胃给药方式对 SD 大鼠给予脑脉利颗粒,连续 5 d。结果显示,与模型组比较,脑脉利颗粒高、低剂量组均对脑缺血再灌注损伤具有良好的保护作用,尤其是高剂量组能更显著地改善脑缺血再灌注损伤后的神经功能损伤、脑缺血和脑水肿以及脑组织病理组织学损伤,还能有效地提高缺血再灌注后脑组织的 GSH 含量、GSH-Px 酶活力、SOD 酶活力以及抗超氧化阴离子自由基能力和抑制羟自由基能力,显著降低脑组织的 H₂O₂ 和 MDA 含量。各项结果均显示,脑脉利颗粒在 6 g/kg 和 3 g/kg 的剂量下对大鼠脑缺血再灌注损伤后的神经功能学损伤、脑梗死性病变、脑水肿性病变以及脑内氧自由基增多造成的脑组织损伤均有良好的保护作用。提示脑脉利颗粒对脑缺血再灌注损伤具有明显的保护作用,其机制与抗氧化作用有关。

参 考 文 献

[1] Tao T, Liu Y, Zhang J, *et al.* Therapeutic hypercapnia improves functional recovery and attenuates injury via antiapoptotic mechanisms in a rat focal cerebral ischemia/reperfusion model [J]. *Brain Res*, 2013, **1533**:52 – 62.

[2] Zhang L, Chang BB, Cao WW, *et al.* Effect of *danshensu* on myocardial energy metabolism in isolated ischemia reperfusion rat

hearts[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2010, **41**(3):278 – 282.

[3] Shang YH, Xu XY. Advance of experimental studies on protective effect of traditional Chinese medicines and their extracts on cerebral ischemia[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2013, **38**(8):1109 – 1109.

[4] Shi XR, Hong ZY, Liu HR. Neuroprotective effects of SCM198 on 6-hydroxydopamine-induced behavioral deficit in rats and cytotoxicity in neuronal SH-SY5Y cells[J]. *Neurochem Int*, 2011, **58**(8):851 – 860.

[5] Wen DZ, Qu JB, Shi Z, *et al.* Effect of sanchi saponin Rh1 against aging of astrocyte in D-galactose induced aging mice model[J]. *Chin J Neuroanatomy*(神经解剖学杂志), 2005, **21**(6):667 – 670.

[6] Zhang XH, Xu XX, Wang NQ. Progress of studies on protective mechanism of Radix Astragali in vascular endothelial cell[J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2013, **48**(18):1526 – 1530.

[7] Liu SX, Li YM, Fang WR. Protective effect of sodium tanshinone B on focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2008, **39**(4):338 – 342.

[8] Chung JY, Kim MW, Bang MS, *et al.* Increased expression of neurotrophin 4 following focal cerebral ischemia in adult rat brain with treadmill exercise[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(3):e52461.

[9] Wang JP, Yang ZT, Liu C, *et al.* l-Carnosine inhibits neuronal cell apoptosis through signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway after acute focal cerebral ischemia[J]. *Brain Res*, 2013, **1507**:125 – 133.

[10] Wang T, Li Y, Wang Y, *et al.* Lycium barbarum polysaccharide prevents focal cerebral ischemic injury by inhibiting neuronal apoptosis in mice[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(3):e90780.

[11] Wu J, Chen J, Guo H, *et al.* Effects of high-pressure oxygen therapy on brain tissue water content and AQP4 expression in rabbits with cerebral hemorrhage [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, **70**(3):1579 – 1584.