

丹酚酸 B 对小鼠急性局灶性脑缺血的神经保护作用

肖文喜,汪红,钟晓明,黄真*
(浙江中医药大学,杭州 310053)

[摘要] 目的:探讨丹酚酸 B 对急性局灶性脑缺血的神经保护作用。方法:采用改进的 Zea Longa 方法阻塞小鼠大脑中动脉(medial cerebral artery occlusion, MCAO),建立局灶性脑缺血动物模型。造模后分别立即尾静脉注射丹酚酸 B(11.25, 22.5, 45 mg·kg⁻¹),尼莫地平(30 μg·kg⁻¹);模型组和假手术组给予同等体积的生理盐水。造模 6 h 后,观察小鼠行为学、脑指数、脑含水量、脑梗死体积及脑组织病理形态学变化;采用比色法测定各组脑组织中谷氨酸含量。结果:造模 6 h 后,与模型组比较,丹酚酸 B 各剂量组小鼠神经功能行为学评分、脑指数、脑含水量、脑梗死体积呈显著性降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);病理组织切片显示,丹酚酸 B 各剂量组均能不同程度减轻脑组织神经元核固缩、核溶解程度,改善脑组织缺血的病理损伤;丹酚酸 B 各剂量组均能显著减少脑组织中谷氨酸含量($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:丹酚酸 B 可降低 MCAO 小鼠神经功能损伤,减轻脑水肿,减少谷氨酸含量,抑制兴奋性氨基酸神经毒性作用。丹酚酸 B 对小鼠急性局灶性脑缺血具有神经保护作用。

[关键词] 丹酚酸 B; 局灶性脑缺血; 谷氨酸

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)17-0163-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014170163

Neuroprotective Effect of Salvianolic Acid B against Acute Focal Cerebral Ischemia in Mice

XIAO Wen-xi, WANG Hong, ZHONG Xiao-ming, HUANG Zhen*
(Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the neuroprotective effect of salvianolic acid B (Sal B) against acute focal cerebral ischemia in mice. **Method:** The acute cerebral ischemic model induced by medial cerebral artery occlusion (MCAO) was reproduced. The modeling mice were given Sal B 11.25, 22.5, 45 mg·kg⁻¹ or Nimhorizon 30 μg·kg⁻¹ by tail vein injection after MCAO immediately. The model group and control group were treated with the same volume of physiological saline. After 6 h, the following indexes were observed including: the behavior, brain index, brain water content, cerebral infarction volume and brain tissue pathological morphology were observed. The glutamate contents in brain tissue was determined by colorimetric methods with commercial kit. **Result:** After MCAO for 6 h, compared with model group, the nerve functional behavior score, brain index, brain water content and cerebral infarction volume of Sal B dose groups in mice were significantly reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). According to the results of pathological tissue section, all the Sal B groups could reduce the brain neurons nucleus pycnosis, nuclear dissolve degree, irregular degree, and improve the pathological injury of brain tissue ischemia. The different Sal B dose groups could significantly reduce the content of glutamic acid ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Sal B can ameliorate neurological damage in mice with cerebral ischemia injury, and reduce cerebral edema, decrease glutamate contents, inhibit the excitatory amino acid neurotoxicity action. Sal B has neuroprotective effects on acute focal cerebral ischemia in mice.

[Key words] salvianolic acid B; medial cerebral artery occlusion; glutamate

[收稿日期] 20140403(012)

[基金项目] 浙江省科技厅公益性项目(2013C31106)

[第一作者] 肖文喜, 硕士, 从事中药品质评价及资源开发利用, E-mail: x12ww@sina.com

[通讯作者] *黄真, 教授, 博士生导师, 从事中药品质评价及资源开发利用, Tel: 0571-86633088, E-mail: huangzhen@zjtcn.net

丹酚酸 B 是丹参水溶性成分中的主体成分之一,含量和提取得率相对较高,有良好的应用前景。研究发现丹酚酸 B 对心脑血管缺血再灌注损伤具有保护作用^[1],Chen 等^[2]以莫里斯水迷宫测试来评价实验动物的空间学习能力和记忆功能,证实丹酚酸 B 的干预下,可以改善脑缺血小鼠的功能状态以及空间学习和记忆能力。本实验旨在建立大鼠中动脉栓塞(MCAO)模型后,立即尾静脉注射丹酚酸 B,探讨丹酚酸 B 对急性局灶性脑缺血的治疗性神经保护作用。

1 材料

1.1 动物 ICR 小鼠,雄性,体重 23 ~ 25 g,由浙江中医药大学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(沪)2013-0016。饲养环境温度为 22 ~ 25 ℃,相对湿度 45% ~ 70%,喂以普通饲料,自由饮水。

1.2 药品与试剂 丹酚酸 B(成都普瑞法科技开发有限公司,批号 12062602,使用时用生理盐水配制成 1.125,2.25,4.5 g·L⁻¹),尼莫地平(亚宝药业集团股份有限公司,批号 111206,使用时用生理盐水配制成 3 mg·L⁻¹),总蛋白定量试剂盒(考马斯亮蓝法,批号 20131217),谷氨酸试剂盒(批号 20140224),均购自南京建成生物工程研究所,其他化学试剂均为分析纯。

1.3 仪器 FA1004 型电子天平(上海天平仪器厂),HH 系列数显恒温水浴锅(上海红星仪器有限公司),HM560 型冷冻切片机(美国塞默飞世尔科技有限公司),Power Wave X340 型酶标仪(美国 Bio-Tek 仪器有限公司),BX51 型光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 模型制备与分组给药 小鼠 MCAO 模型:实验前小鼠禁食不禁水 12 h,参考改进的 Zea Longa^[3]方法,用 4% 水合氯醛(0.4 g·kg⁻¹)ip 麻醉,仰卧固定,颈正中切口,依次暴露并分离左侧的颈总动脉(CCA),颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA),结扎 CCA 近心端,将左侧 CCA 剪一小口,插入线栓,沿着 ICA 轻轻的向前推进遇轻微阻力即停止,进线长约(10 ± 0.5)mm,阻断大脑中动脉的供血来源。结扎颈总动脉,消毒缝合伤口,造成左侧大脑中动脉的缺血模型。

小鼠按体重随机分为 6 组:假手术组,模型组,尼莫地平组(30 μg·kg⁻¹),丹酚酸 B 高、中、低剂量组(45,22,11.25 mg·kg⁻¹)。各组按照上述模型制备方法造模(假手术组只分离颈总动脉,分离后即

缝合伤口),造模后立即尾静脉给药,其中假手术组和模型组给予同等体积的生理盐水。

2.2 神经功能缺损评分 参照 Bederson^[4-5]确立的 5 级评分法,对小鼠的神经功能缺损进行评分。小鼠造模 6 h 后,对小鼠的神经功能进行评分,评分在 1 ~ 3 级者定为造模成功小鼠,0 级和 4 级者弃去。

2.3 脑含水量、脑指数的测定 采用干、湿比重法,造模 6 h 后断头取脑,用生理盐水冲洗,滤纸吸干表面液体。用电子天平称取标本的湿重,然后将脑组织置入电热恒温烘箱(100 ± 2)℃ 中烘干至恒重,称取干重。脑指数及脑组织含水量计算公式:

$$\text{脑组织含水量} = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$$

$$\text{脑指数} = \text{脑湿重} / \text{体重} \times 100\%$$

2.4 脑梗死体积的测定 分组建模 6 h 后,迅速断头取脑,去掉嗅球、小脑和低位脑干,将脑组织放入 -20 ℃ 冰箱冷冻 10 min,利用小鼠脑切片模具切成 2 mm 厚切片,共 5 片。然后迅速将脑片置于 5 mL 含有 2% TTC 的磷酸缓冲溶液中,37 ℃ 避光温孵 15 min,染色期间翻面。经染色后,正常脑组织呈玫瑰红色,而梗死组织呈苍白色,且界限分明。染色后用 4% 多聚甲醛避光固定,数码相机拍照,然后用 MedBrain2_0 系统对图片进行分析测量脑梗死体积。

2.5 脑组织病理形态学检测 分组建模 6 h 后脱脊柱处死小鼠,断头取出整个大脑组织。于视交叉起始处及其后 4 mm 两点做冠状切面,冷冻切片机切片,片厚 6 μm,然后常规苏木精-伊红染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察脑组织的病理形态学变化。

2.6 脑组织中谷氨酸含量测定 分组建模 6 h 后脱脊柱处死小鼠,取出脑组织置于培养皿中,用生理盐水冲洗干净,滤纸吸水,称重,在冰水浴条件下加生理盐水制成 10% 脑组织匀浆液。按蛋白定量试剂盒和谷氨酸试剂盒说明书操作,分别测定脑组织中蛋白含量和谷氨酸含量。

2.7 统计学处理 所有实验数据采用 SPSS 18.0 进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 students' *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。*P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对 MCAO 小鼠神经功能缺损的影响 与假手术组比较,模型组小鼠神经功能损伤评分为 1 ~ 3 级,表明造模成功;与模型组比较,丹酚酸 B 中、低剂量组及尼莫地平组小鼠神经功能损伤评分均显著

降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

3.2 对 MCAO 小鼠脑含水量、脑指数、脑梗死体积的影响 与假手术组比较,模型组的脑含水量、脑指数、脑梗死体积极显著升高($P < 0.01$),说明脑水肿明显,表明造模成功。与模型组相

比,丹酚酸 B 高、中剂量组的脑含水量显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),丹酚酸 B 各剂量组的脑指数、脑梗死体积均极显著降低($P < 0.01$),表明丹酚酸 B 能显著降低局灶性脑缺血引起的脑水肿。见表 1。

表 1 丹酚酸 B 对 MCAO 小鼠神经功能损伤、脑含水量、脑指数、脑梗死体积的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	神经功能缺损评分 /分	脑含水量 /%	脑指数 /%	脑梗死体积比 /%
假手术	-	0	75.67 ± 2.36	1.35 ± 0.03	0
模型	-	2.80 ± 0.35 ¹⁾	80.48 ± 1.28 ¹⁾	1.52 ± 0.03 ¹⁾	30.31 ± 2.85 ¹⁾
尼莫地平	30 × 10 ⁻³	2.10 ± 0.52 ³⁾	78.24 ± 1.35 ³⁾	1.42 ± 0.06 ³⁾	17.19 ± 6.07 ³⁾
丹酚酸 B	45	2.40 ± 0.61	78.34 ± 1.08 ²⁾	1.41 ± 0.09 ³⁾	17.23 ± 4.15 ³⁾
	22.5	2.05 ± 0.44 ³⁾	77.46 ± 1.43 ³⁾	1.39 ± 0.05 ³⁾	16.60 ± 6.10 ³⁾
	11.25	2.30 ± 0.59 ²⁾	79.01 ± 1.37	1.40 ± 0.08 ³⁾	21.11 ± 5.12 ³⁾

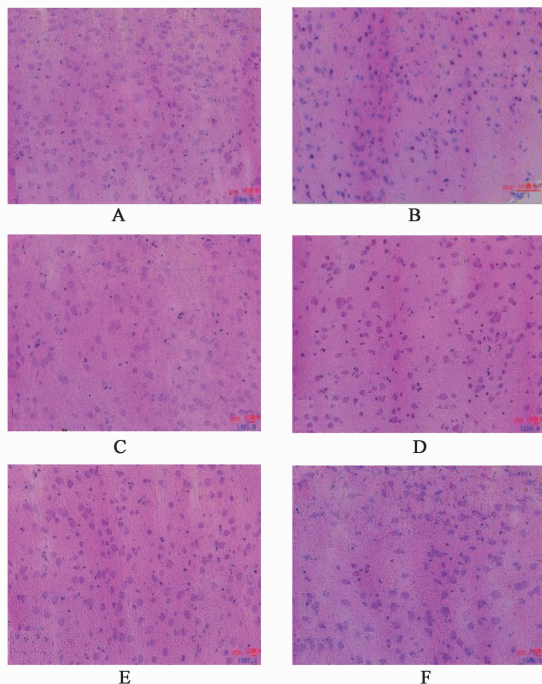
注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 对 MCAO 小鼠脑组织病理组织学的影响 结果如图 1 所示,假手术组脑组织神经元及神经胶质细胞结构正常,核仁明显可见,未见神经细胞变性坏死及炎细胞浸润等明显病理变化。模型组脑组织神经元结构模糊、构型紊乱,出现不同程度的核深染、核固缩、核体不规则。丹酚酸 B 各剂量组与模型组相比均有不同程度的缓解恢复,其中丹酚酸 B 22.5 mg·kg⁻¹组脑组织神经元核固缩、核体不规则程度与模型组比有显著的减轻,软化灶明显减少。见图 1。

3.4 丹酚酸 B 对 MCAO 小鼠脑组织中谷氨酸含量的影响 与假手术组比较,模型组的脑组织中谷氨酸含量显著增高($P < 0.01$),表明造模后产生了显著的兴奋性氨基酸毒性作用。与模型组相比,丹酚酸 B 3 个剂量组能显著的降低脑组织中谷氨酸含量($P < 0.01, P < 0.05$),表明丹酚酸 B 能显著降低急性脑缺血所造成的兴奋性氨基酸毒性作用。见表 2。

表 2 丹酚酸 B 对 MCAO 小鼠脑组织中谷氨酸含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	谷氨酸/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
假手术	-	91.43 ± 18.86
模型	-	120.47 ± 34.64 ¹⁾
尼莫地平	30 × 10 ⁻³	103.16 ± 20.46 ²⁾
丹酚酸 B	45	99.38 ± 27.58 ²⁾
	22.5	94.86 ± 20.95 ³⁾
	11.25	101.65 ± 17.89 ²⁾



A. 假手术组; B. 模型组; C. 尼莫地平 30 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;
D. 丹酚酸 B 45 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 丹酚酸 B 22.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;
F. 丹酚酸 B 11.25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图 1 丹酚酸 B 对 MCAO 小鼠脑组织顶叶皮层病理组织学的影响(HE 染色, ×200)

4 讨论

近年来,复方中药和单味中药抗脑缺血研究多以预先给药来考察药物的抗脑缺血作用,优点是建立脑缺血模型时,体内已达到一定的血药浓度,可观察药物直接发挥作用的效应。但此法与实际临床应用有一定区别,一般患者发病后才会服药就医,少见

预先给药的情况,而近年来许多专家报告的研究成果从不同侧面证明,缺血性脑卒中在起病后 6 h 内,是最有利的抢救治疗时机,且越早治疗越好,抓紧这一“时间窗”,就能大大提高治愈的成功率,并减少后遗症的发生^[6]。由于小鼠脑缺血接近人类脑供血不足时脑组织病理生理的演变过程^[7],故小鼠脑缺血模型可以作为研究脑梗死后神经功能修复和药物治疗保护作用的实验基础。本实验研究采用造模缺血后立即给药治疗,观察各项指标,符合实际临床应用和早治疗原则,能在一定程度上体现药物实际治疗效果,对以后临床应用有一定借鉴意义。

脑水肿是缺血性脑血管病基本病理变化之一,脑缺血时,血脑屏障受损,血管通透性明显增加,毛细血管内的水分与血浆蛋白外渗,致细胞间隙内水分增多而形成血管源性脑水肿,从而加重脑损伤,更易诱发脑组织病变^[8]。因此,减轻脑水肿是改善缺血性脑损伤的重要标志之一。本实验研究显示,与模型组比较,丹酚酸 B 各剂量组小鼠神经功能行为学评分、脑指数、脑含水量、脑梗死体积呈显著性降低;病理组织切片结果显示,丹酚酸 B 各剂量组能不同程度减轻小鼠局灶性脑缺血区大脑皮层神经细胞结构的损伤。表明丹酚酸 B 能减轻 MCAO 小鼠脑水肿程度,降低脑损伤,减少脑缺血后神经元损伤。脑缺血神经元损伤与多种病理生理过程有关,神经递质代谢紊乱是脑缺血研究的一个重要方面。兴奋性氨基酸(excitatory amino acid, EAA)是广泛存在于哺乳类动物中枢神经系统的正常兴奋性神经递质,参与突触兴奋传递,与多种神经变性疾病有关,其中起主要作用的便是谷氨酸。神经元外谷氨酸主要来源于神经末梢突触囊泡的释放,生理情况下,谷氨酸合成、分解、摄取和重吸收是一个动态平衡的过程,谷氨酸摄取机制维持细胞外谷氨酸在较低水平下参与神经信号的传导;缺血性脑损伤后,高效能摄取谷氨酸的机制出现障碍,细胞间隙堆积的谷氨酸使谷氨酸受体过度激活,引起一系列毒性反应,即兴奋性毒性,进而诱发各种神经变性疾病^[9-10]。本实验研究显示,与假手术组比较,模型组的脑组织中谷氨酸含量显著增高,表明造模后产生了显著的兴奋性氨基酸毒性作用。与模型组相比,丹酚酸 B 各剂量组和尼莫地平组均能显著性降低脑组织中谷氨酸

含量,表明丹酚酸 B 能减轻急性局灶性脑缺血所造成的兴奋性氨基酸毒性作用。

综上所述,本实验研究采用造模缺血后立即给药治疗,观察各项指标,符合实际临床应用和早治疗原则,能在一定程度上体现药物实际治疗效果。本实验研究结果表明丹酚酸 B 可通过降低神经功能损伤,减轻脑水肿,减少谷氨酸含量,抑制兴奋性氨基酸神经毒性作用对小鼠急性局灶性脑缺血发挥神经保护作用。本实验研究为对丹酚酸 B 抗脑缺血的具体治疗时间窗和相关作用机制进一步研究提供一定基础。

[参考文献]

- [1] Wang Y, Jiang Y F, Huang Q F, et al. Neuroprotective effects of salvianolic acid B against oxygen-glucose deprivation/reperfusion damage in primary rat cortical neurons[J]. Chin Med J, 2010, 123(24): 3612.
- [2] Chen T, Liu W B, Chao X, et al. Salvianolic acid B attenuates brain damage and inflammation after traumatic brain injury in mice [J]. Brain Res Bull, 2011, 84(2): 163.
- [3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20: 84.
- [4] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of aneuragicexamination [J]. Stroke, 1986, 17(3): 472.
- [5] 陈绍春, 潘伟生, 李明, 等. 神经行为学实验 Narrow-Ailey Test 及 Corner Test 改良; Narroo-Alley Corner Test [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(6): 406.
- [6] 孙清廉. 脑卒中治疗越早预后越好[J]. 家庭中医药, 2013, 20(1): 28.
- [7] 马从, 王蕾. 小鼠脑缺血再灌注模型方法及中药的药理作用[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(2): 280.
- [8] 张春丽, 孟强. 缺血性脑血管病血脑屏障研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(11): 1935.
- [9] 宋文婷, 徐摇立, 刘建勋. 脑缺血后谷氨酸及其受体介导的神经细胞损伤及相关药物研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(6): 747.
- [10] 王阳, 姜建东. 谷氨酸与缺血性卒中早期神经功能恶化 [J]. 国际脑血管病杂志, 2013, 21(2): 132.

[责任编辑 聂淑琴]