

补阳还五汤复方颗粒对缺血性脑卒中模型大鼠血浆中强啡肽和神经肽 Y 的影响

胡锐宁¹, 李菲², 朱承科¹, 胡夏逢¹, 夏君¹, 林敏浩¹, 周诚^{1*}

(1. 广州中医药大学, 广州 511400; 2. 茂名市中医院 药剂科, 广东 茂名 525000)

[摘要] 目的: 探讨补阳还五汤复方颗粒对缺血性脑卒中模型大鼠血浆中强啡肽 (dynorphin, Dyn)、神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 的影响。方法: 健康雄性 SD 大鼠, 根据随机数字表抽取 14 只, 作空白对照。另抽取 15 只, 假手术处理后, 作假手术组。其他大鼠称重后采用改良 Pulsinelli 四血管闭塞法建立临床缺血性脑卒中模型, 将造模成功的大鼠纳入实验, 随机分为模型组、脑心通组、补阳还五汤复方颗粒高剂量 (30.4 g·kg⁻¹) 组、补阳还五汤复方颗粒低剂量 (15.2 g·kg⁻¹) 组, 共 6 个实验组。各组连续灌胃蒸馏水或相应药物 7 d, 用酶联免疫吸附法测定模型大鼠血浆中强啡肽, 神经肽 Y 的含量。结果: 模型组大鼠血浆中神经肽 Y 含量 (1.31 ± 0.05) μg·L⁻¹ 与空白组 (1.01 ± 0.06) μg·L⁻¹ 相比升高 (P < 0.01), 模型组血浆中 Dyn 含量平均值 (15.87 ± 1.57) ng·L⁻¹ 与空白组 (2.31 ± 0.95) ng·L⁻¹ 相比升高 (P < 0.01), 补阳还五汤复方颗粒组血浆中 NPY 含量 (1.23 ± 0.06) μg·L⁻¹, Dyn 含量 (3.02 ± 0.56) ng·L⁻¹, 与模型组相比降低, 表明补阳还五汤复方颗粒能使大鼠血浆中异常升高的 Dyn、NPY 含量降低, 趋近正常水平。结论: 补阳还五汤复方颗粒对脑卒中的治疗作用可能与调节脑内神经因子水平、神经功能有关。

[关键词] 补阳还五汤复方颗粒; 缺血性脑卒中; 强啡肽; 神经肽 Y

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0163-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014190163

Effects of Buyang Huanwu Decoction Compound Granules on Plasma Dynorphin and Neuropeptide Y Levels in Ischemic Cerebral Stroke Rats

HU Rui-ning¹, LI Fei², ZHU Cheng-ke¹, HU Xia-feng¹, XIA Jun¹, LIN Min-hao¹, ZHOU Cheng^{1*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 511400, China;

2. Traditional Chinese Medicine Hospital of Maoming City, Maoming 525000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Buyang Huanwu decoction compound granules (BYHWDCG) on the plasma dynorphin (Dyn) and neuropeptide Y (NPY) contents in ischemic cerebral stroke rats. **Method:** The model was reproduced by the four-vessel occlusion (4-VO) method with some modifications. The rats were treated with BYHWDCG (30.4, 15.2 g·kg⁻¹). The Dyn and NPY levels were assayed by ELISA. **Result:** The plasma Dyn and NPY levels in model group were increased compared with control group. However, after treated with BYHWDCG, the contents of Dyn and NPY in plasma significantly decreased. **Conclusion:** The BYHWDCG can protect rats with the ischemic stroke by down-regulation of neurotrophic factors.

[Key words] Buyang Huanwu decoction compound granules; ischemic cerebral stroke; dynorphin; neuropeptide Y

强啡肽 (dynorphin, Dyn) 是一种内源性阿片肽, 通过相应的受体参与中枢神经系统损伤后的继发延

[收稿日期] 20140314(020)

[第一作者] 胡锐宁, 硕士, E-mail: 876341393@qq.com

[通讯作者] * 周诚, 教授, E-mail: Dr_ZhouCheng@126.com

迟性损害,加重脑缺血缺氧,引起局部及周围脑组织酸中毒等代谢障碍。神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 具有强烈的收缩血管的作用, NPY 的异常升高可使血肿周边脑组织主要供应血管和侧支循环收缩,脑血管阻力增加,病灶区脑灌流量减少而加重脑缺血、缺氧和脑水肿,或刺激血小板激活或胰岛素抵抗,间接促进脑内动脉粥样硬化形成。本文则从实验的角度,观察自制补阳还五汤复方颗粒 (Buyang Huanwu decoction compound granules, BYHWDCG) 对实验性缺血性脑卒中模型大鼠血浆中 Dyn, NPY 水平等的影响,初步探究新型方剂的药效以及对缺血性脑卒中的治疗作用。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体重 180 ~ 220 g, 由广东省医学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK (粤) 2008-0002。

1.2 药物

1.2.1 供试药材 黄芪、赤芍、归尾、川芎、桃仁、红花、地龙, 以上中药饮片购自广州中药材市场。

1.2.2 对照药物 脑心痛胶囊 (陕西步长制药有限公司, 批号 1111107)。

1.3 仪器 RE-3000A 型旋转蒸发仪 (上海亚荣), LB940/LB941 型多功能酶标仪 (德国伯托), ALPHA1-2 型真空冷冻干燥机 (德国 Martin Christ), 3-18K 型台式高速冷冻离心机 (美国 Sigma)。

2 方法

2.1 缺血性脑卒中动物模型的建立 健康雄性 SD 大鼠, 采用改良 Pulsinelli 四血管闭塞法^[1] 建立缺血性卒中动物模型。适应性饲养 2 周后的大鼠用 10% 的水合氯醛 (3.5 mL·kg⁻¹) 进行 ip 麻醉。第 1 步: 将其俯卧固定于手术台, 颈下用棉签包垫高, 头后部备皮, 2% 碘酒和 75% 乙醇消毒。在枕骨后第 1 颈椎水平的正中线上作 2 cm 左右的纵切口, 从中央向两侧钝性分离背阔肌、斜方肌, 暴露第一颈椎的横突翼并找到左、右横突孔 (椎动脉在入脑前从此孔中通过), 各孔中分别有一条似血管样的细线伸出, 碰断会出血不止, 以此定位, 然后用电烙铁插入横突孔中烧灼管样的细线及双侧椎动脉, 造成椎动脉永久性闭塞, 然后分层缝合, 再在伤口处涂抹莫匹罗星软膏 (外用抗生素) 预防发脓感染。第 2 步: 将大鼠仰卧固定在手术台上, 颈部备皮, 消毒, 颈前正中部位作 1 cm 左右的纵切口, 在气管两侧分离出颈总动脉并分别置线备用, 缝合, 消毒伤口。24 h 后大鼠清醒后置于干燥器中, 用适量乙醚麻醉后, 马上将其仰

卧固定在手术台上, 拆开颈部切口, 提起标记线, 找到颈总动脉, 待动物清醒后用动脉夹夹闭双侧颈总动脉, 造成四血管阻塞引起大鼠全脑缺血, 夹闭 15 min 后松开动脉夹, 使血液再灌注后分层缝合, 在伤口处涂抹莫匹罗星软膏抗感染, 术后大鼠自由饮食。假手术组的大鼠除不烫凝椎动脉和不夹闭颈总动脉外, 其余操作与上述步骤相同; 另设空白对照组, 常规饲养。

2.1.1 SD 大鼠脑缺血评定标准 ① 双侧颈动脉夹闭后 1 min 内动物意识丧失。② 眼球变黑、变暗。③ 翻正反射消失。④ 自主呼吸加快。⑤ 毛发竖起。

2.1.2 手术过程中凡未出现 2.1.1 中的症状或症状未能持续整个缺血过程的大鼠弃用, 术后存活的大鼠留用。

2.2 供试药物的制备

2.2.1 供试样品补阳还五汤复方颗粒的制备 根据王清任《医林改错》卷下记载: 分别称取黄芪 120 g, 当归尾 6 g, 赤芍 4.5 g, 地龙 3 g, 川芎 3 g, 红花 3 g, 桃仁 3 g。以中医药学的基础理论为指导依据, 分别各自提取各药中具有保护心脑血管及保护缺血再灌注损伤细胞的主要有效部位, 粗分离后, 挥去溶剂蒸干成粉末, 按“君、臣、佐、使”的组方原则, 将各个有效部位再进行配伍, 组成新的方剂, 添加辅料, 制备成颗粒, 即为补阳还五汤复方颗粒, 通过高效液相色谱、薄层色谱等方法控制制剂的质量, 供本实验用。临用前将补阳还五汤复方颗粒用蒸馏水配成终质量浓度 3.04 g·mL⁻¹ (相当于生药量, 高剂量)、终质量浓度 1.52 g·mL⁻¹ (相当于生药量, 低剂量), 备用。

2.2.2 阳性对照药品的配制 脑心痛去掉外壳, 胶囊内容物用蒸馏水溶解成终质量浓度 0.04 g·mL⁻¹, 备用。

2.3 动物分组及给药 根据 Longa 等^[2] 评判卒中模型成功的方法, 将 1 ~ 3 级存活下来的大鼠纳入实验并编号, 按序号根据随机数字表随机分为模型组、补阳还五汤复方颗粒高、低剂量组、脑心痛组; 每组 10 ~ 12 只。各组大鼠 ig 相应药物, 各药按 10 mL·kg⁻¹ 剂量 ig 给大鼠, 模型组、空白对照组、假手术组 ig 等剂量蒸馏水, 每天 1 次, 连续给药 7 d。

2.4 观测指标 大鼠给药 7 d 后, 10% 水合氯醛, 按 3.5 mL·kg⁻¹ ip, 麻醉后, 腹主动脉取血, 加入装有枸橼酸钠的抗凝管中摇匀, 分离血浆, 用竞争性抑制酶联免疫吸附实验技术测定血浆中 NPY, Dyn 的含量。

2.5 数据分析 实验测出的数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据均采用统计软件 SPSS 17.0 进行分析。数据具有方差齐性的多组差异的比较用单因素方差分析法, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠缺血性脑卒中动物模型的建立 缺血性脑卒中动物模型中,永久闭塞大鼠的两条椎动脉及颈总动脉后,模型鼠表现为眼球发黑发暗、眼裂变窄、流泪;呼吸加深加快、偶有昏迷;四肢蜷缩;毛发失去光泽、竖立起来;饮水量及进食量减少;严重者

则精神萎靡;动作迟缓,走路打转,运动时躯体向一侧歪斜。偏身感觉障碍是本模型成功主要标志,同时出现体重增长明显减缓 ($P < 0.01$) 等症状,与缺血性脑卒中证候的临床表现基本接近。

3.2 对缺血性脑卒中模型大鼠体重的影响 造模前体重与造模后体重测量间隔 12 d。模型组大鼠的体重增长较空白对照组明显缓慢 ($P < 0.01$),补阳还五汤复方颗粒具有补气活血的作用,使造模后的大鼠体重增长加快且使造模后大鼠的体重增长量明显大于脑心通组,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$) (表 1)。

表 1 补阳还五汤复方颗粒对造模大鼠体重的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	药物剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	造模前体重/g	造模后体重/g	实验期增长值/g
空白	10	-	245.8 ± 3.1	269.6 ± 2.7	23.8 ± 2.9 ²⁾
假手术	10	-	246.5 ± 4.4	266.6 ± 3.4	20.1 ± 3.3 ²⁾
模型	12	-	242.3 ± 2.7	253.4 ± 2.8	11.0 ± 2.2
脑心通	9	0.4	242.3 ± 2.7	270.5 ± 3.6	27.8 ± 2.5 ²⁾
补阳还五汤复方颗粒	11	30.4	242.3 ± 2.7	295.3 ± 4.3	53.0 ± 3.0 ²⁾
	10	15.2	242.3 ± 2.7	293.6 ± 3.6	51.3 ± 2.8 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 对缺血性卒中模型大鼠血浆中 NPY 含量的影响 NPY 对照品的吸光度值随浓度变化的线性回归方程为 $Y = -3.9266X + 1.0419$, $R^2 = 0.9948$ 。造模后大鼠血浆 NPY 含量,均明显高于空白对照组和假手术组,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。补阳还五汤复方颗粒高、低剂量均能使造模大鼠异常升高的血浆 NPY 含量降低,趋近于正常水平,与模型组比较 ($P < 0.05$),说明补阳还五汤复方颗粒对发病大鼠血浆中 NPY 水平有一定的影响 (表 2)。

均有统计学意义 ($P < 0.01$)。造模大鼠灌服药物后,异常升高的血浆强啡肽含量明显降低,接近正常水平,和空白对照组比较,差异无统计学意义。补阳还五汤复方颗粒组的大鼠血浆 Dyn 含量和阳性对照药物脑心通组的大鼠血浆强啡肽含量相比,水平相仿 (表 2)。

4 讨论

补阳还五汤复方颗粒源自清代王清任《医林改错》里的补阳还五汤,是该课题负责老师根据多年临床经验以及中医药学的基础理论,鉴别和确认中药单方及复方基础活性成分,再经药理、药理学实验研究后,将补阳还五汤原方各个药物中对缺血性脑卒中有良好疗效的有效部位经改进、优化、完善其提取方案后,提取所需成分按照方剂理论中“君、臣、佐、使”的配伍原则,重新组成的新型方剂,加合适的辅料制备而成的复方颗粒。经将近 10 年的动物实验证明补阳还五汤复方颗粒对缺血性脑卒中的疗效显著,经多次高效液相色谱、薄层色谱等方法检测发现,该方剂质量稳定可靠,通过毒性实验研究得出补阳还五汤复方颗粒安全无毒。此外,补阳还五汤复方颗粒还能满足临床辨证施治,随证加减的需要,具有潜在的开发前景。

研究发现, NPY^[3] 和 Dyn^[4] 与缺血性脑卒中的发生发展过程密切相关。Dyn 是一种由 17 个氨基

表 2 补阳还五汤复方颗粒对缺血性脑卒中模型大鼠血浆中 NPY, Dyn 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	NPY/ $\mu g \cdot L^{-1}$	Dyn/ $ng \cdot L^{-1}$
空白	6	-	1.01 ± 0.06 ²⁾	2.31 ± 0.95 ²⁾
假手术	8	-	1.07 ± 0.04 ²⁾	2.39 ± 0.81 ²⁾
模型	9	-	1.31 ± 0.05	15.87 ± 1.57
脑心通	8	0.4	1.20 ± 0.07 ¹⁾	2.93 ± 0.85 ²⁾
补阳还五汤	9	30.4	1.23 ± 0.06 ¹⁾	3.11 ± 0.80 ²⁾
	9	15.2	1.25 ± 0.10 ¹⁾	3.02 ± 0.56 ²⁾

3.4 对缺血性脑卒中模型大鼠血浆中 Dyn 含量的影响 Dyn 对照品吸光值随浓度的变化的线性回归方程为 $Y = 0.0061X + 0.217$, $R^2 = 0.9987$ 。造模后大鼠血浆强啡肽含量,均明显高于空白对照组,差异

酸组成的内阿片肽, Dyn 有极强的阿片活性^[5]。Herman^[6]在重复韩济生等人的实验结果时,发现鞘内注射 Dyn 不仅产生强烈的镇痛作用^[7-8],还可使动物两后肢瘫痪,并随剂量的增加作用增强,而且药物不能使之完全逆转。说明 Dyn 可能参与引起脑卒中后肢体瘫痪的病理过程^[9]。研究发现, Dyn 可在血管的 NE 能神经末梢上发生突触前抑制,减少其递质释放,从而抑制血管收缩,进一步加重中枢神经系统损伤后继发性病理生理改变; NPY 是在脑内发现的含量最高的发挥神经递质和血管调节活性作用的多肽^[10],具有强烈收缩脑血管和降低脑血流的效应。有报道表明, NPY 的异常升高可使血肿周边脑组织主要供应血管和侧支循环收缩,脑血管阻力增加,病灶区脑灌流量减少而加重脑缺血、缺氧和脑水肿^[11-13],同时 NPY 过量释放会影响到心血管系统从而影响血液循环。本实验观察到实验动物脑卒中后,血浆中 Dyn 和 NPY 的含量急剧升高,与已有报道结果一致,根据文献,它们含量的异常升高可能会加重脑卒中的程度,引起脑卒中后偏瘫的发生;灌服补阳还五汤复方颗粒的大鼠血浆中异常升高的神经因子 NPY, Dyn 的含量降低,与造模组比较差异均具有统计学意义,提示补阳还五汤复方颗粒对脑卒中的治疗作用可能与其调节脑内引发脑卒中的神经因子含量有关,这些将给临床更好的应对缺血性脑卒中的发生及预后提供可靠的理论依据,也将为古方中药二次开发研究提供科学依据。

[参考文献]

[1] 李兵,章翔,蒋晓帆,等. 改良四血管阻塞法建立大鼠全脑缺血模型[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2005, 4(2):110.

[2] Longa E Z, Weinstein P R, Carson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20:84-91

[3] Allen G V, DiCarlo M A, Cechetto D F. Changes in the neurochemical organization of forebrain autonomic sites following focal cerebral ischemia [C]//Soc Neurosci Abstr, 1992, 18:1173.

[4] Honda Z. Fc epsilon and Fc gamma receptor signaling in diseases[J]. Springer Semin Immuno Pathol, 2006, 28(4):365.

[5] 洪新如,郑铃. 强啡肽 A1-13 在脑源性神经营养因子治疗新生大鼠缺氧缺血性脑损伤中的变化[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(23):1637.

[6] Herman B H, Leslie F, Goldstein A. Behavioral effects and *in vivo* degradation of intraventricularly administered dynorphin-(1-13) and D-Ala2-dynorphin-(1-11) in rats [J]. Life Sci, 1980, 27(10):883.

[7] Chakrabarti S, Liu N J, Gintzler A R. Formation of μ -/ κ -opioid receptor heterodimer is sex-dependent and mediates female-specific opioid analgesia[J]. Proc Natl Acad Sci, 2010, 107(46):20115.

[8] Liu N J, Schnell S, Wessendorf M W, et al. Sex, pain, and opioids; interdependent influences of sex and pain modality on dynorphin-mediated antinociception in rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2013, 344(2):522.

[9] 盛宝英,陆晓红,王志群,等. 脑梗死患者血浆 β -内啡肽强啡肽 A1-13 含量及纳洛酮的保护作用研究[J]. 中国急救医学, 2004, 24(2):142.

[10] Chen S H, Cheung R T F. Neuropeptide Y and its receptor analogs differentially modulate the immunoreactivity for neuronal or endothelial nitric oxide synthase in the rat brain following focal ischemia with reperfusion[J]. J Biomed Sci, 2005, 12(2):267.

[11] Chen S H, Cheung R T F. Peripheral and central administration of neuropeptide Y in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model reduces cerebral blood flow and increases infarct volume[J]. Brain Res, 2002, 927(2):138.

[12] Fassbender K, Schmidt R, Mössner R, et al. Pattern of activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in acute stroke. Relation to acute confusional state, extent of brain damage, and clinical outcome [J]. Stroke, 1994, 25(6):1105.

[13] 牛建立,张新,贾清仁,等. 血浆神经肽 Y 水平与冠状动脉病变程度及左心室功能关系的探讨[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(10):587.

[责任编辑 聂淑琴]