

预防性给予血塞通和金纳多注射液 对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响

邹凯杰¹, 高海琰¹, 樊星花², 杨秀芬^{1*}

(1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530001;

2. 广西柳州市工人医院药学部, 广西柳州 545005)

[摘要] **目的:**观察预防性给予血塞通(三七总皂苷)和金纳多(银杏叶提取物)注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的效果。**方法:**SD雄性大鼠130只,分两部分进行实验,第一部分为低剂量($25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)比较,设假手术组、模型组、血塞通组、金纳多组;第二部分为高剂量($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)比较,也分别设假手术组、模型组、血塞通组、金纳多组。通过研究脑梗死体积、行为学评分、死亡率、血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽-S转移酶(GSH-S-transferase)、一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)、C-反应蛋白(CRP)、黄嘌呤氧化酶(XOD)进行评价。**结果:**血塞通低剂量对4,24 h行为学评分,死亡率,SOD,NO,NOS无明显影响,但能显著降低脑梗死体积($P<0.05$)、体重下降($P<0.05$)、MDA含量($P<0.01$);高剂量时,对4 h行为学评分,死亡率,SOD,MDA,NO,NOS,XOD,CRP无明显影响,但能显著降低24 h行为学评分($P<0.05$)、脑梗死体积($P<0.05$),GSH($P<0.01$)含量。金纳多低剂量时,对4,24 h行为学评分、死亡率、MDA,SOD,GSH,NOS无明显影响,但能显著降低脑梗死体积($P<0.01$),NO含量($P<0.05$);高剂量时,对MDA,SOD,GSH,NO,CRP无明显影响,但能显著降低脑梗死体积($P<0.05$),4,24 h行为学评分($P<0.05$),NOS($P<0.01$),XOD活性($P<0.01$)。**结论:**高剂量的血塞通和金纳多对大鼠脑缺血再灌注损伤治疗效果比低剂量可能更有效,相同剂量时,血塞通与金纳多疗效并无统计学差异。

[关键词] 血塞通注射液; 金纳多注射液; 脑缺血再灌注损伤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0151-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230151

Preventive Effect of Xuesaiton and Ginaton Injections on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury of Rats

ZOU Kai-jie¹, GAO Hai-xun¹, FAN Xing-hua², YANG Xiu-fen^{1*}

(1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. Department of Pharmacy, Liuzhou Worker's Hospital, Liuzhou 545005, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the preventive effects of Xuesaitong and Ginaton injection on cerebral ischemia reperfusion (I/R) injury in rats. **Method:** Hundred and thirty SD male rats were divided into low dosage ($25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and high dosage ($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), of Xuesaitong and Ginaton injection, sham-operation and model groups. The volume of cerebral infarction, behavioral score, weight, mortality, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione-S-transferase (GSH-S-transferase), nitrogen oxide (NO), NO synthase (NOS), xanthine oxidase (XOD), C-reactive proein (CRP) were determined to evaluate preventive effect. **Result:** Low Xuesaitong dosage had no effect on volume of cerebral infarction, behavioral score at 4, 24 h, mortality, SOD, GSH, NO and NOS, but it could reduce MDA content significantly. High Xuesaitong dosage had

[收稿日期] 20140319(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260652);“教育部新世纪优秀人才支持计划人选”项目(教技函2010-14号,NCET-10-0093);“八桂学者”工程专项经费

[第一作者] 邹凯杰,硕士,从事药物防治心脑血管疾病的研究与开发工作,E-mail:kaijiezhou@foxmail.com

[通讯作者] *杨秀芬,医学博士,教授,硕士生导师,从事药物防治心脑血管疾病的研究与开发工作,E-mail:xiufenyang@163.com

no effect on behavioral score at 4 h, mortality, SOD, MDA, NO, NOS, CRP, but it could reduce behavioral score at 24 h, volume of cerebral infarction, GSH. The low Ginaton dosage had no effect on weight, behavioral score at 4, 24 h, mortality, MDA, SOD, GSH, NOS, but it could reduce volume of cerebral infarction, NO content significantly; the high dosage had no effect on MDA, SOD, GSH, NO, CRP. It could reduce behavioral score at 4, 24 h, volume of cerebral infarction, NOS and XOD activities significantly. **Conclusion:** The high dose Xuesaitong and Ginaton might be more effective than low dosage in reducing cerebral ischemia reperfusion injury. No significant difference was observed between Xuesaitong and Ginaton in a same dosage.

[**Key words**] Xuesaitong injection; Ginaton injection; brain ischemia reperfusion

脑卒中一直以来都是以老年人为主的高发性、高致死率的疾病,目前尚无完全能根治这种疾病的有效药物,但如何用药物改善脑卒中后遗症、改善生活质量一直以来是备受关注的议题^[1]。脑卒中又以脑缺血再灌注损伤疾病最为普遍^[2]。虽然目前尚无根治脑缺血再灌注损伤的药物,但随着中药及其提取物的不断发掘,已经有很多药物显示出了对脑缺血再灌注损伤的预防和治疗作用^[3]。但是目前中药提取物注射剂,由于其成分相对复杂,制造工艺要求高,还存在很多的不良反应,其不良反应主要为:过敏反应、炎症、急性肾衰竭等^[4]。而目前临床广泛应用血塞通(主要成分三七总皂苷)和金纳多(主要成分银杏叶提取物)注射液治疗脑卒中疾病,但它们的临床有效性和安全性并未经严格的随机化、标准化、合格的大规模临床试验所证实,或临床试验结果互相矛盾,可能与不同的临床试验使用的剂量不同或其他因素有关^[5]。这两个药物在临床使用上剂量相近,但是这两个药物在使用过程中,两者药物的作用机制、临床疗效以及效价比是否存在差异,两者药物的毒副作用如何,尚未见综合的对比报道。本实验通过预防性给予血塞通和金纳多注射液,同步观察它们对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响,并进行初步的评价。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠 130 只,体重 230 ~ 250 g, SPF 级,由广西医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(桂)2009-0002。

1.2 药物和试剂 0.9% 氯化钠注射液(广西裕源药业有限公司,批号 L12122404),血塞通注射液(批号 XB12002),金纳多注射液(批号 G4132),红四唑(TTC,天津科密欧化学试剂有限公司,批号 20130124),水合氯醛(成都市科龙化工试剂厂,批号 20130513),C-反应蛋白(CRP,武汉华美生物科技有限公司,批号 U20015927)。丙二醛(MDA,批号 20130812),超氧化物歧化酶(SOD,批号

20131107),谷胱甘肽-S 转移酶(GSH-S-transferase,批号 20131109),一氧化氮(NO,批号 20131109),一氧化氮合酶(NOS,批号 20131112),黄嘌呤氧化酶(XOD,批号 20131106)均由南京建成生物工程研究所提供。

1.3 仪器 5810R 型高速冷冻多用途离心机(德国,Eppendorf),HH-2 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司),725 型超低温冷冻冰箱(美国,Thermo Forma),UV-1800 型紫外-可见分光光度仪(日本,Shimadzu),Epoch 型全波长酶标仪(德国,BioTek)。

2 方法

2.1 动物实验及给药 血塞通和金纳多注射液说明书上人静脉注射使用剂量分别为 200 ~ 400, 140 ~ 175 mg·d⁻¹,按体表面积换算法^[6],换算成每日大鼠静脉注射用量分别为 18 ~ 36, 13 ~ 16 mg·kg⁻¹,考虑到静脉注射和腹腔注射(ip)生物利用度的差异,为了方便比较,换算结果统一为血塞通和金纳多注射液 ip 低剂量组各为 25 mg·kg⁻¹,高剂量组各设为 50 mg·kg⁻¹,各剂量组分别设假手术组、模型组、血塞通组、金纳多组。低剂量组中,各组动物分组情况为:假手术组 15 只,模型组 24 只,血塞通组 24 只,金纳多组 24 只;高剂量组中,各组动物分组情况为:假手术组 6 只,模型组 13 只,血塞通组 12 只,金纳多组 12 只。分笼饲养,饲养于广西中医药大学实验动物中心。喂颗粒标准饲料,自由饮水和摄食,适应性喂养 7 d 后开始给药。按体重给药,低剂量组 ip 血塞通 25 mg·kg⁻¹,金纳多 25 mg·kg⁻¹,假手术组和模型组均注射同体积 0.9% 氯化钠注射液。高剂量组按 2 倍低剂量给药,分别 ip 血塞通 50 mg·kg⁻¹,金纳多 50 mg·kg⁻¹,假手术组和模型组均注射同体积 0.9% 氯化钠注射液。各组造模前 7 d 开始给药,每日 1 次,最后 1 次于造模前 1 h 给药。

2.2 大脑缺血再灌注模型制备 大鼠术前 12 h 禁食,

自由饮水。参考 Longa 等^[7]建立大鼠脑缺血再灌注模型,ip 10%水合氯醛溶液麻醉(3.5 mL·kg⁻¹),大脑中动脉栓塞 2 h,后恢复血流再灌注 24 h。假手术组仅分离血管,不做任何处理。术后参考 Longa 等的 5 级评分法进行行为学评分。

2.3 脑梗死体积的检测 术后 24 h 断头取脑,去除嗅球及低位脑干,顺势按 2 mm 厚度切取 6 片,放入 2% TTC 的溶液中 37℃ 闭光染色 30 min。染色后按顺序排列置于黑色背景台布上,数码相机正反两面拍照,用 Image-pro plus 6.0 软件统计并计算脑梗死体积

$$\text{脑梗死体积} = \text{缺血区脑梗死体积} / \text{全脑体积} \times 100\%$$

2.4 血清指标的检测 术后 24 h 取血,分离血清,检测血清 SOD, MDA, GSH, NO, NOS, XOD, CRP, 检测步骤按试剂盒相关说明书操作。

2.5 统计学处理 结果采用 SPSS 17.0 软件进行统计,采用单因素方差分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。死亡率采用 Fisher 精确概率检验法统计。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 动物造模成功情况及死亡率 造模后,低剂量组:假手术组造模成功 15 只,存活 15 只;模型组造模成功 24 只,存活 18 只;血塞通组造模成功 19 只,存活 15 只;金纳多组造模成功 18 只,存活 14 只。高剂量组:假手术组造模成功 6 只,存活 6 只;模型组造模成功 13 只,存活 10 只;血塞通组造模成功 9 只,存活 8 只;金纳多组造模成功 11 只,存活 6 只。与模型组比较,血塞通低、高剂量,金纳多低剂量组对死亡率均无明显影响;但金纳多高剂量有增加死亡率的趋势;血塞通与金纳多比较,高、低剂量对死亡率影响均无明显差异。

3.2 药物对脑梗死体积的影响 与模型组比较,血塞通高、低剂量($P < 0.05$)、金纳多低剂量($P < 0.01$)、高剂量($P < 0.05$)均能明显降低大鼠脑梗死体积;血塞通与金纳多比较,高、低剂量对脑梗死体积影响均无明显差异。见表 1。

3.3 对行为学评分的影响 与模型组比较,低剂量时,血塞通、金纳多均不能明显降低大鼠脑缺血再灌注后 4、24 h 行为学评分;高剂量时,血塞通对大鼠脑缺血再灌注后 4 h 无明显影响,但能降低 24 h 的行为学评分($P < 0.05$);金纳多则能明显降低 4、24 h 行为学评分($P < 0.05$);血塞通与金纳多比较,高、低剂量对各时间段行为学评分影响均无明显差异。见表 2。

表 1 血塞通、金纳多注射液对大鼠脑缺血 2 h 再灌注 24 h 后脑梗死体积的影响($\bar{x} \pm s$)

批次	组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	梗死体积/%
1	假手术	15	-	0.00 ± 0.00
	模型	18	-	23.67 ± 5.27 ¹⁾
	血塞通	15	25	18.41 ± 6.32 ²⁾
	金纳多	14	25	15.30 ± 7.20 ³⁾
2	假手术	6	-	0.00 ± 0.00
	模型	10	-	19.47 ± 4.94 ¹⁾
	血塞通	8	50	13.08 ± 6.67 ²⁾
	金纳多	6	50	11.78 ± 6.49 ²⁾

注:与同批次假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与同批次模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 血塞通、金纳多注射液低剂量对大鼠脑缺血再灌注损伤不同时间段行为学评分的影响($\bar{x} \pm s$)

批次	组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	行为学评分/分	
				4 h	24 h
1	假手术	15	-	0.00 ± 0.00	0.17 ± 0.41
	模型	18	-	2.06 ± 0.66 ²⁾	1.46 ± 0.69 ¹⁾
	血塞通	15	25	1.89 ± 0.91	1.73 ± 1.10
	金纳多	14	25	2.00 ± 0.68	1.21 ± 0.97
2	假手术	6	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	模型	10	-	1.70 ± 0.48 ²⁾	1.80 ± 0.63 ¹⁾
	血塞通	8	50	1.12 ± 0.83	1.12 ± 0.64 ²⁾
	金纳多	6	50	0.83 ± 0.98 ³⁾	1.00 ± 0.89 ²⁾

3.4 对血清 MDA, SOD, GSH, NO, NOS 含量的影响 与模型组比较,血塞通低剂量组能明显降低血清 MDA 含量($P < 0.01$),对 SOD, GSH, NO, NOS 则无显著影响,金纳多低剂量能显著降低 NO 含量($P < 0.05$),但对 MDA, SOD, GSH 均无明显影响;与模型组比较,血塞通组高剂量能显著降低 GSH ($P < 0.05$),但对 MDA, SOD, NO, NOS 则无明显影响,金纳多组高剂量能显著降低 NOS 活性($P < 0.05$),但对 MDA, SOD, GSH, NO 无明显影响。见表 3。

3.5 对血清 CRP 和 XOD 的影响 与模型组比较,血塞通高剂量对 CRP 和 XOD 无明显影响;金纳多高剂量对 CRP 无明显影响,但可降低 XOD 活性($P < 0.01$)。见表 4。

4 讨论

脑缺血再灌注发生后,其血流的再灌注可以进一步损伤脑梗死体积,同时会诱发一系列的行为障碍,促进病患死亡。所以,如何利用药物减少脑梗,

表 3 血塞通、金纳多注射液低剂量对大鼠脑缺血再灌注 24 h 血清 MDA, SOD, GSH, NO, NOS 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

批次	组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	GSH/U·mL ⁻¹	NO/μmol·L ⁻¹	NOS/U·mL ⁻¹
1	空白	6	-	3.75 ± 0.60	171.4 ± 55.0	10.5 ± 2.7	1.97 ± 0.37	46.22 ± 5.23
	模型	8	-	4.35 ± 0.76	202.1 ± 27.8	15.5 ± 5.7	2.17 ± 0.69	39.15 ± 6.82
	血塞通	8	25	3.14 ± 0.46 ⁴⁾	188.9 ± 20.5	24.8 ± 14.5	1.59 ± 0.81	41.31 ± 7.26
	金纳多	6	25	3.85 ± 0.85	162.1 ± 30.2	24.1 ± 10.9	1.36 ± 0.83 ³⁾	37.94 ± 6.36
2	空白	6	-	4.03 ± 0.95	213.2 ± 15.9	18.4 ± 7.9	1.71 ± 0.74	34.13 ± 2.10
	模型	10	-	4.93 ± 0.49	198.1 ± 26.5	28.6 ± 13.6 ¹⁾	1.62 ± 0.74	41.35 ± 4.32 ²⁾
	血塞通	8	50	5.63 ± 1.84	201.7 ± 16.5	12.7 ± 3.5 ⁴⁾	2.15 ± 1.60	37.97 ± 5.58
	金纳多	6	50	5.89 ± 0.66	197.1 ± 13.7	23.6 ± 9.2	2.31 ± 1.27	35.62 ± 5.96 ⁴⁾

注:与同批次空白组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01; 与同批次模型组比较³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01 (表 4 同)。

表 4 血塞通、金纳多注射液高剂量对大鼠脑缺血再灌注 24 h 血清 CRP, XOD 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	CRP /g·L ⁻¹	XOD /U·L ⁻¹
空白	6	-	2.02 ± 0.11	42.39 ± 2.85
模型	10	-	3.42 ± 0.79 ¹⁾	59.55 ± 6.32 ²⁾
血塞通	8	50	4.64 ± 2.47	61.40 ± 9.47
金纳多	6	50	3.90 ± 1.08	43.74 ± 3.85 ⁴⁾

改善病后的行为学障碍、减少死亡率,一直是治疗脑卒中的重要目标^[8]。研究发现,血塞通及金纳多高低剂量均能有效地减少脑梗死体积,抑制脑缺血再灌注发生后脑梗的扩大,但是血塞通和金纳多低剂量对行为学评分改善不是很明显,而随着剂量的提高,血塞通和金纳多能显著的改善行为学评分。同时,血塞通和金纳多高低剂量均不能有效的改善动物死亡率。血塞通和金纳多等剂量用药时,笔者研究发现,两者对死亡率、行为学评分、脑梗死体积影响并无显著差异。

近来研究表明,脑缺血再灌注损伤发生后,会导致血清内一些酶活性的变化,而这些酶的活性增加或抑制均可以对脑缺血再灌注损伤有一定的影响^[9]。MDA 是体内脂质过氧化的关键指标,而 MDA 及其产生的代谢产物可以被 SOD, GSH 捕捉而代谢,同时, SOD, GSH 还可以清除氧自由基等过氧化物,所以它们是广泛用来评价体内自由基的敏感性指标^[10-11]。笔者研究发现,低剂量血塞通可以显著降低脑缺血再灌注后血清 MDA 水平,但高剂量血塞通对 MDA 无明显影响,且同时能显著降低 GSH,但机体的氧化自由基产生毕竟是一个很复杂的过程,并不能凭单一指标的升降就说明药物的抗氧化效果。而金纳多高低剂量对 MDA, SOD, GSH

均无明显影响,提示金纳多可能通过其他机制作用来缓解脑缺血再灌注损伤。

NO 作为信号分子参与体内众多生理反应,由 NOS 催化反应生成,而 NOS 不仅参与 NO 的生成,同时也参与生成超氧阴离子^[12]。最近的研究表明,脑缺血再灌注发生后,NO, NOS 体内的含量与脑神经损伤呈现正相关,其含量的升高可以加重脑缺血再灌注损伤^[13-14]。笔者研究发现,金纳多低剂量可以降低血清 NO 水平,减轻经血液循环入脑的 NO 带来的脑损伤,从而起到缓解脑损伤的作用。同时,金纳多高剂量也可以明显降低血清 NOS 水平,减轻脑缺血再灌注损伤。这可能是金纳多保护脑缺血再灌注损伤的机制之一。但高剂量和低剂量的血塞通均不影响 NO, NOS。

XOD 可催化黄嘌呤生成超氧化物和过氧化氢,介导组织和器官损伤,是脑缺血再灌注损伤的病理机制之一。高剂量的金纳多可以抑制 XOD 的活性,可能是金纳多保护脑缺血再灌注损伤的机制之一。

CRP 作为急性时相蛋白在各种急性炎症、组织损伤等疾病发作后数小时迅速升高,其升高的幅度与感染或炎症程度呈正相关,是脑缺血再灌注损伤的一个重要指标之一^[17]。金纳多和血塞通高剂量对 CRP 均没有明显影响。

上述实验结果表明,血塞通、金纳多注射液预防性给药对大鼠脑缺血再灌注损伤可能均有一定的疗效,且高剂量可能要好于低剂量,但笔者注意到高剂量的金纳多有增加死亡的趋势(但无统计差异)。血塞通和金纳多同等剂量用药的疗效并无统计差异。两药发挥的作用可能是通过不同机制产生的,但其具体作用机制还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 张通. 中国脑卒中康复治疗指南(2011 完全版)[J]. 中国康复理论与实践,2012,18(4):301.
- [2] 方燕南,王雪晶,张爱武. 脑卒中流行病学研究近况[J]. 新医学,2006,37(11):709.
- [3] Wu P F, Zhang Z, Wang F, et al. Natural compounds from traditional medicinal herbs in the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Acta Pharmacol Sin,2010,31(12):1523.
- [4] 梁进权,邹元平,王宁生,等. 重要不良反应特点与发生规律的文献研究[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(6):574.
- [5] Wu B, Liu M, Liu H, et al. Meta-analysis of traditional Chinese patent medicine for ischemic stroke[J]. Stroke, 2007,38(6):1973.
- [6] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069.
- [7] Longa Z E, Weinstein E R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84.
- [8] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010[J]. 中国医学前沿杂志:电子版,2010,2(4):50.
- [9] 王光胜,耿德勤. 脑缺血/再灌注损伤机制研究进展[J]. 医学综述,2011,17(24):3753.
- [10] Liu F, Mccullough L D. Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy [J]. Acta Pharmacol Sin,2013,34(9):1121.
- [11] Bains J S, Shaw C A. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death [J]. Brain Res Rev,1997,25(3):335.
- [12] 黄波,陈畅. 一氧化氮的功能及其作用机制-性质与功能[J]. 生物物理学报,2012,28(3):173.
- [13] 杨卫忠,陈春美,王春华,等. 一氧化氮和一氧化氮合酶在大鼠局灶性脑缺血中的表达特点[J]. 中国神经精神疾病杂志,2007,33(6):335.
- [14] 崔景斌,王俊萍,鄢文海,等. 大鼠脑缺血再灌注后兴奋性氨基酸、NOS 和 NO 的含量变化[J]. 郑州大学学报:医学版,2002,37(2):169.
- [15] Ono T, Tsuruta R, Fujita M, et al. Xanthine oxidase is one of the major sources of superoxide anion radicals in blood after reperfusion in rats with forebrain ischemia/reperfusion[J]. Brain Res,2009(1305):158.
- [16] Rodrigo R, Fernández-Gajardo R, Gutiérrez R, et al. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets,2013,12(5):698
- [17] 简序,王金和,程佩兰. C 反应蛋白的临床研究进展 [J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册, 2004, 25(5):471.

[责任编辑 聂淑琴]