

# 再造丸塞隆骨替代豹骨后抗脑缺血效应机制的研究

翟建英<sup>1</sup>, 陈霞<sup>2</sup>, 靳冉<sup>2</sup>, 岳枫<sup>2</sup>, 刘丹<sup>2</sup>, 李晋生<sup>2\*</sup>

(1. 北京同仁堂科技发展股份有限公司 制药厂, 北京 100079;  
2. 北京同仁堂股份公司 科学研究所, 北京 100079)

**[摘要]** **目的:**观察塞隆骨替代豹骨后再造丸抗脑缺血的效应机制,为替代合理性提供药理学实验数据支持。**方法:**采用小鼠断头急性脑缺血实验和小鼠双侧颈总动脉结扎法造模,观察塞隆骨替代豹骨后再造丸(以下简称再造丸替代后)对小鼠急性脑缺血的影响。采用大鼠线栓法大脑中动脉阻塞(MCAO)脑缺血模型,观察再造丸替代后对大脑梗塞面积、神经功能评分以及对丙二醛(MAD),超氧化物歧化酶(SOD)和一氧化氮(NO)的影响。采用“胶原蛋白-Adr”诱发小鼠体内血栓形成模型观察偏瘫形成率和死亡率;采用急性血瘀模型大鼠管观察血液流变学及血小板聚集率,评价再造丸替代后的活血化瘀作用。**结果:**再造丸替代后可增加小鼠断头后急性脑缺血的呼吸次数和呼吸持续时间,与再造丸组比较无显著性差异;可显著延长双侧颈总动脉结扎法小鼠急性脑缺血的存活时间,与再造丸组比较无显著性差异。可显著减小 MCAO 大鼠梗塞面积;降低缺血后 4, 24 h 模型大鼠神经功能行为学评分;各给药组均可显著降低模型大鼠血清 MDA 含量;低剂量组可提高 MCAO 模型大鼠血清 SOD 活力;各剂量组均可显著升高大鼠血清 NO 水平,且优于再造丸组。可减少尾静脉注射“胶原蛋白-Adr”形成体内血栓所致小鼠 5 min 内的死亡率,提高 15 min 内的偏瘫恢复率。可降低血瘀模型大鼠全血血流变切变率降低 ADP 诱导的血小板聚集率。**结论:**再造丸替代后对脑缺血有保护作用,保护机制可能与其调节抗氧化能力及改善血流变学有关。

**[关键词]** 再造丸; 塞隆骨; 豹骨; 脑缺血; 抗氧化; 活血化瘀

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)06-0124-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016060124

## Effect of Zaizao Wan (Sailong Bone Replacement of Leopard Bone) Against Cerebral Ischemia

ZHAI Jian-ying<sup>1</sup>, CHEN Xia<sup>2</sup>, JIN Ran<sup>2</sup>, YUE Feng<sup>2</sup>, LIU Dan<sup>2</sup>, LI Jin-sheng<sup>2\*</sup>

(1. *Pharmaceutical Factory, Tongrentang Technologies Co. Ltd., Beijing 100079, China;*  
2. *Scientific Institute, Beijing Tongrentang Co. Ltd., Beijing 100079, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the mechanism of Zaizao Wan Sailong bone replacement of leopard bone against cerebral ischemia, and provide experimental pharmacology data for replacement rationality. **Method:** The decapitation ischemia experiment and bilateral carotid artery ligation were used to establish mice models and observe the effect of Sailong bone Zaizao Wan (hereinafter referred to as Sailong bone Zaizao Wan) on acute cerebral ischemia in mice. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) cerebral ischemic models were induced by using suture-occluded method. The effect of Sailong bone Zaizao Wan on infarct area, neurological scores, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and nitric oxide (NO) levels in serum were observed. ‘Collagen-Adr’ was used to induce thrombosis mice models and observe hemiplegia formation rate and mortality. Acute blood stasis rat models were used to observe hemorheology and platelet aggregation rate, and evaluate the effect of Sailong bone Zaizao Wan on activating blood circulation and dissipating blood stasis. **Result:** Sailong bone Zaizao Wan can increase breathing time and frequency of mice with acute cerebral ischemia after decollation, with

**[收稿日期]** 20150121(008)

**[基金项目]** 北京市科技计划项目(D08080203640903)

**[第一作者]** 翟建英, 硕士, 助理研究员, 从事中药药理学毒理学研究, E-mail: zhaixingshou2008@163.com

**[通讯作者]** \*李晋生, 博士, 研究员, 从事中药药理学毒理学研究, Tel: 010-87632553, E-mail: yarily@126.com

no significant difference with Zaizao Wan group; and can significantly prolong the survival time of bilateral carotid artery ligation in mice with acute cerebral ischemia, with no significant difference with Zaizao Wan group. Sailong bone Zaizao Wan could significantly decrease the infarct size in MCAO rats, and 4, 24 hours after ischemia, neurological function scores were decreased. Various treatment groups could significantly reduce serum MDA level in model rats; low dose group could improve serum SOD activity in MCAO model rats; various dose groups could significantly increase serum NO level in rats and the effect was better than Zaizao Wan group. Sailong bone Zaizao Wan could reduce the mortality within 5 min induced by tail intravenous injection of "collagen-Adr" thrombus formation, and increase the hemiplegia recovery rate within 15 min. It could decrease the whole blood flow shear rate and reduce ADP-induced platelet aggregation rate in blood stasis model rats. **Conclusion:** Sailong bone Zaizao Wan has protective effect on cerebral ischemia and its mechanisms may be related to its antioxidant capacity and improvement of hemorrheology.

[ **Key words** ] Zaizao Wan; Sailong bone; leopard bone; cerebral ischemia; antioxidant; dissipate blood stasis

同仁堂再造丸是治疗脑血管病的中医验方效药,临床疗效确切,应用广泛。方中豹骨入药历史悠久,在传统中药中应用相当广泛。豹骨性温味辛,归肝肾二经,具有祛风通络,强筋健骨,镇静安神的作用,多用于风湿痹痛,筋骨疼痛,四肢拘挛麻木,腰膝酸软。豹骨是再造丸处方中的重要药味,由于豹被列入一级保护动物,现状濒危,国家严格限制使用,从 2006 年起我国已全面禁止从野外猎捕豹类和收购豹骨,因此急需开展豹骨的替代研究工作,对确保再造丸的临床疗效具有重要意义。塞隆骨为仓鼠科动物高原鼯鼠去脑的干燥全架骨骼,性微温,味咸,归肝、肾经。具有祛风散寒除湿,通络止痛,补益肝肾的功效,多用于风寒湿痹引起的肢体关节疼痛、肿胀、屈伸不利,肌肤麻木,腰膝酸软的治疗。塞隆骨是目前较理想的虎骨代用品<sup>[1]</sup>,早在 1990 年塞隆骨药材及塞隆风湿酒(其中由塞隆骨替代虎骨)获得卫生部颁发的中药一类新药证书<sup>[2]</sup>。塞隆骨是新开发的国家级一类动物新药材,功能主治与豹骨相似,故课题组开展了再造丸塞隆骨替代豹骨的药效学对比研究,以探索药材替代的可行性。

## 1 材料

**1.1 动物** ICR 小鼠,SPF 级,雌、雄性,体重 18 ~ 22 g,购自北京大学医学部实验动物科学部,合格证号 SCXK(京)2006-0008。SD 大鼠,SPF 级,雄性,体重 180 ~ 200 g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,合格证号 SCXK(军)2007-004。

**1.2 药物及试剂** 再造丸药粉、再造丸替代后药粉(塞隆骨替代豹骨,北京同仁堂股份有限公司科学研究所提供),尼莫地平片(亚宝药业集团股份有限公司生产,批号 090943),复方丹参片(北京同仁堂

科技发展股份有限公司制药厂,批号 9122133)。盐酸肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司),I 型胶原蛋白(美国 Sigma 公司),红四氮唑(2,3,5-三苯基氯化四氮唑,TTC,批号 20100812,国药集团化学试剂有限公司),一氧化氮(NO),丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

**1.3 仪器** BT-300 型血液流变测试仪(北京博莱特医药技术有限公司),LG-PABER-I 型血小板聚集凝血因子分析仪(北京世帝科学仪器公司)。

## 2 方法

### 2.1 抗脑缺血作用

**2.1.1 对小鼠断头急性脑缺血的影响**<sup>[3]</sup> ICR 小鼠,雌雄各半。按体重随机分为 5 组,每组 12 只,雌雄各半。再造丸药粉和再造丸替代后药粉(塞隆骨替代豹骨)为北京同仁堂股份有限公司科学研究所提供。本实验用药为未添加炼蜜的粉末制剂。药典规定为每 100 g 药粉加炼蜜 120 ~ 150 g 制成大蜜丸,每丸重 9 g。用法为口服,1 丸/次,2 次/日。本研究采用“100 g 粉末加炼蜜 120 g 制成大蜜丸,每丸重 9 g,2 丸/日”的用量用法进行给药剂量的设置。尼莫地平为钙拮抗剂,临床多用于缺血后脑血管病,本研究采用其为阳性药。分组及剂量见表 1 各组连续给药 5 d,末次给药后 1 h,于小鼠耳后 2 mm 处迅速断头,立即记录小鼠断头后至脑死亡之前的张口呼吸次数及呼吸持续时间。

**2.1.2 对小鼠双侧颈总动脉结扎法急性脑缺血模型的影响**<sup>[4]</sup> ICR 小鼠,雌、雄各半。分组给药同上。末次给药后 1 h,戊巴比妥钠(50 mg·kg<sup>-1</sup>)ip 麻醉,小鼠行颈部正中切口,钝性分离双侧颈总动脉及

迷走神经,分别结扎双侧颈总动脉及迷走神经的近心端和远心端,并剪断。从结扎开始记录小鼠存活时间(以小鼠末次腹式呼吸时间为观察指标)。观察药物对小鼠存活时间的影响。

**2.1.3 对大鼠线栓法大脑中动脉阻塞(MCAO)脑缺血模型缺血状况的影响** 大鼠按体重随机分为 6 组,分组及剂量见表 3。各组大鼠连续给药 5 d。末次给药后 1 h 造模。大鼠线栓法 MCAO 模型制备<sup>[5-6]</sup>:大鼠水合氯醛(300 mg·kg<sup>-1</sup>)ip 麻醉,仰卧位固定,颈部正中切口,分离右侧颈总动脉(CCA),颈内动脉(ICA)及颈外动脉(ECA),结扎 CCA 与 ECA 近心端,动脉夹暂时夹闭 ICA 远心端,于 CCA 远心端作一切口,插入尼龙栓线并固定,插入深度约为 18 mm,假手术组只结扎 CCA 与 ECA。缺血至动物苏醒期间电热毯维持大鼠的肛温 36.5~37.5℃。动物入选标准:清醒后不能伸展健侧前肢、向健侧行走转圈、向健侧行走倾倒以及不能自发行走。无神经损伤动物剔除。分别于缺血后 4 h 和 24 h,按 Longa 法<sup>[7]</sup>对动物的神经功能行为进行评分。

模型大鼠缺血后 24 h,断头取脑,去除嗅球、小脑和低位脑干,于 -80℃ 冷冻 4 min,冰盘上冠状切成 6 片,迅速将脑片置于 TTC 染液中,37℃ 避光振荡 1 h,取出后置于 10% 甲醛液中避光保存 24 h。经染色后非缺血区为玫瑰红色,梗死区为白色。将白色组织仔细挖下称重,以梗死组织质量占全脑质量百分比作为脑梗死范围<sup>[8]</sup>。

**2.2 对大鼠线栓法 MCAO 模型抗氧化能力的影响** SD 大鼠,雄性,分组造模方法同上。缺血后 24 h,腹主动脉取血,分离血清。按试剂盒说明书,测定血清中 MDA 含量,SOD 活性及 NO 含量。

**2.3 活血化癥作用**

**2.3.1 对“胶原蛋白-Adr”诱发小鼠体内血栓形成的影响** ICR 小鼠,雄性。按体重随机分为 5 组,每组 12 只。本研究观察再造丸替代后的活血化癥作用,复方丹参片是临床常用的活血化癥,理气止痛的药物,故选其为阳性药物。分组及剂量见表 6。连续给药 5 次,末次给药后 1 h,尾静脉注射给予 0.1 mL 胶原蛋白-Adr 混合诱导剂(相当于每只鼠给予 225 μg 胶原蛋白 + 9 μg 肾上腺素),观察注射后 5 min 内小鼠死亡情况及 15 min 内小鼠偏瘫恢复情况,分别计算死亡率及偏瘫恢复率<sup>[9]</sup>。

**2.3.2 对血瘀模型大鼠血液流变学及凝血的影响** SD 大鼠,雄性。按体重随机分为 6 组,每组 12 只,分组及剂量见表 7。连续给药 5 次,末次给药前

16 h 大鼠皮下多点注射 0.03% 肾上腺素生理盐水溶液 0.2 mL/100 g 体重(肾上腺素 0.6 mg·kg<sup>-1</sup>),制备急性血瘀模型,正常组皮下注射等量生理盐水溶液<sup>[10]</sup>。末次给药后 1 h,各组大鼠水合氯醛 300 mg·kg<sup>-1</sup>腹腔麻醉,腹主动脉取血,肝素抗凝用于测定全血血液流变学参数;枸橼酸钠抗凝(1:9),离心取富血小板血浆与贫血小板血浆,用于测定 ADP 诱导血小板聚集率。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,先行正态性检验和方差齐性检验,符合正态分布采用单因素方差分析,不符合正态分布采用非参数检验。计数资料采用卡方检验,等级资料采用秩和检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 对小鼠断头脑缺血呼吸次数及持续时间的影响** 尼莫地平组、再造丸组及再造丸替代后高、中、低剂量组均可增加小鼠断头后急性脑缺血的呼吸次数及呼吸持续时间,与模型组比较有显著性差异( $P < 0.05, P < 0.01$ )。再造丸替代后高、中、低剂量组与再造丸组比较无显著性差异。见表 1。

表 1 再造丸塞隆骨替代豹骨前后对小鼠断头脑缺血呼吸次数及持续时间的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of Zaizao Wan after Sailong bone replacement leopard bone on breathing frequency and duration in broken brain ischemia of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	呼吸次数 /次	呼吸持续 时间/s
模型	-	12	9.67 ± 2.57	16.75 ± 1.82
尼莫地平	0.018	11	12.18 ± 3.06 <sup>2)</sup>	19.00 ± 1.84 <sup>2)</sup>
再造丸	1.23	12	13.58 ± 1.73 <sup>2)</sup>	18.33 ± 2.23 <sup>1)</sup>
再造丸替代后	2.46	12	13.83 ± 1.40 <sup>2)</sup>	19.50 ± 0.90 <sup>2)</sup>
	1.23	11	13.09 ± 1.45 <sup>2)</sup>	19.64 ± 1.75 <sup>2)</sup>
	0.615	12	14.00 ± 1.76 <sup>2)</sup>	18.17 ± 2.52

注:与模型组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05, ^{2)}$  $P < 0.01$ (表 2,4 同)。

**3.2 对小鼠颈总动脉结扎法急性脑缺血存活时间的影响** 尼莫地平组,再造丸组,再造丸替代后高、中剂量组均可显著延长双侧颈总动脉结扎法小鼠急性脑缺血的存活时间,与模型组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。再造丸替代后高、中、低剂量组与再造丸组比较无显著性差异。见表 2。

**3.3 对模型大鼠脑梗死面积的影响** 尼莫地平组,再造丸组,再造丸替代后高、中、低剂量组均可显著减小大鼠 MCAO 大脑半球梗死面积,与模型组比较

表 2 再造丸塞隆骨替代豹骨前后对小鼠颈总动脉结扎法急性脑缺血存活时间的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Table 2 Effects of Zaizao Wan after Sailong bone replacement leopard bone on survival time in acute cerebral ischemia of rats by common carotid artery ligation method ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	存活时间/min
模型	-	4.60 ± 1.50
尼莫地平	0.018	13.52 ± 4.25 <sup>2)</sup>
再造丸	1.23	10.43 ± 5.08 <sup>2)</sup>
再造丸替代后	2.46	12.45 ± 5.47 <sup>2)</sup>
	1.23	10.60 ± 3.87 <sup>2)</sup>
	0.615	7.69 ± 5.02

有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。再造丸替代后各剂量组与再造丸组比较,脑梗死面积无显著性差异。见表 3。

表 3 再造丸塞隆骨替代豹骨前后对大鼠 MCAO 模型脑梗死面积的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effects of Zaizao Wan after Sailong bone replacement leopard bone on brain infarct size in MCAO model of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	梗死面积/%
假手术	-	10	0.00 ± 0.00
模型	-	10	25.81 ± 2.71 <sup>1)</sup>
尼莫地平	0.012	11	10.36 ± 5.42 <sup>2)</sup>
再造丸	0.82	10	13.35 ± 5.25 <sup>2)</sup>
再造丸替代后	1.64	12	12.98 ± 3.77 <sup>2)</sup>
	0.82	12	17.65 ± 3.83 <sup>2)</sup>
	0.41	11	15.61 ± 7.73 <sup>2)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

3.4 对模型大鼠神经功能行为学的影响 缺血后 4 h 及 24 h,尼莫地平组、再造丸组与再造丸替代后高剂量组可降低模型大鼠神经功能行为学评分,与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。脑缺血后 4 h 及 24 h,再造丸替代后各剂量组与再造

表 5 再造丸塞隆骨替代豹骨前后对大鼠 MCAO 模型抗氧化的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Effects of Zaizao Wan after Sailong bone replacement leopard bone on antioxidant in MCAO model of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	MDA/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	T-SOD/ $U \cdot mL^{-1}$	NO/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
假手术	-	10	18.88 ± 1.92	232.54 ± 19.42	16.46 ± 4.71
模型	-	13	33.71 ± 6.49 <sup>2)</sup>	151.80 ± 27.35 <sup>2)</sup>	11.01 ± 3.64 <sup>2)</sup>
尼莫地平	0.012	12	25.64 ± 5.40 <sup>4)</sup>	189.37 ± 35.64 <sup>3)</sup>	16.48 ± 8.21 <sup>3)</sup>
再造丸	0.82	10	24.00 ± 5.23 <sup>4)</sup>	170.97 ± 44.38	14.56 ± 5.51
再造丸替代后	1.64	7	21.60 ± 5.13 <sup>4)</sup>	184.71 ± 55.81 <sup>1)</sup>	23.19 ± 6.47 <sup>1,4,5)</sup>
	0.82	11	19.39 ± 2.54 <sup>4,5)</sup>	161.39 ± 29.25	26.80 ± 7.61 <sup>4,6)</sup>
	0.41	12	20.98 ± 5.68 <sup>4)</sup>	190.73 ± 57.49 <sup>3)</sup>	29.93 ± 10.55 <sup>4,6)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与再造丸组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>6)</sup>  $P < 0.01$ (表 7 同)。

丸组比较,神经功能无显著性差异。见表 4。

表 4 再造丸塞隆骨替代豹骨前后对大鼠 MCAO 模型神经功能行为学的影响

Table 4 Effects of Zaizao Wan after Sailong bone replacement leopard bone on nerve functional behavior in MCAO model of rats

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	n	神经功能行为学评分/分											
			缺血后 4 h					缺血后 24 h						
			0	1	2	3	4	0	1	2	3	4		
假手术	-	10	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	
模型	-	10	0	0	7	3	0	0	2	4	3	1		
尼莫地平	0.012	11	0	4	6	1	0 <sup>1)</sup>	0	9	2	0	0 <sup>2)</sup>		
再造丸	0.82	10	0	4	6	0	0 <sup>2)</sup>	0	8	2	0	0 <sup>2)</sup>		
再造丸替代后	1.64	12	0	5	7	0	0 <sup>2)</sup>	0	9	2	1	0 <sup>1)</sup>		
	0.82	12	0	3	5	4	0	0	8	3	1	0 <sup>1)</sup>		
	0.41	11	0	5	4	2	0	0	4	7	0	0		

3.5 对大鼠线栓法 MCAO 模型抗氧化能力的影响 模型组大鼠血清 MDA 含量较假手术组显著升高,两者比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组均可显著降低模型大鼠血清 MDA 含量 ( $P < 0.01$ );再造丸替代后中剂量组 MDA 含量较再造丸组低 ( $P < 0.05$ )。模型组大鼠血清 T-SOD 活力及 NO 含量均有不同程度降低,与假手术组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ );尼莫地平组与再造丸替代后低剂量组均可提高 MCAO 模型大鼠血清 T-SOD 活力及 NO 含量,与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );再造丸组与再造丸替代后高、中剂量组虽可升高 MCAO 模型大鼠血清 T-SOD 活力,但与模型组比较无统计学意义,再造丸替代后高、中、低剂量组 MCAO 模型大鼠血清 NO 水平均较再造丸组高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 5。

3.6 对“胶原蛋白-Adr”诱发小鼠体内血栓形成的影响 复方丹参片组、再造丸组、再造丸替代后高剂量组可减少尾静脉注射“胶原蛋白-Adr”形成体内血栓所致小鼠 5 min 内的死亡率,与模型组比较有

显著性差异 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与再造丸组比较, 再造丸替代后高剂量组死亡率无显著性差异; 再造丸替代后中、低剂量组死亡率较再造丸组高, 与再造丸组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。复方丹参片组、再造丸组、再造丸替代后高剂量组均提高体内血栓所致小鼠 15 min 内的偏瘫恢复率, 与模型组比较具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 与再造丸组比较, 再造丸替代后高剂量组偏瘫恢复率无显著性差异; 再造丸替代后中、低剂量组偏瘫恢复率较再造丸组低, 与再造丸组比较有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。见表 6。

### 3.7 对血瘀模型大鼠全血血液流变切变率的影响

复方丹参片组, 再造丸替代后高、中剂量组、低

剂量组可降低血瘀模型大鼠全血血液流变  $1\text{ s}^{-1}$ ,  $3\text{ s}^{-1}$  和  $9\text{ s}^{-1}$  切变率, 与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 再造丸替代后各剂量组的全血血液流变  $1\text{ s}^{-1}$  和  $9\text{ s}^{-1}$  切变率较再造丸组低, 与再造丸组比较有显著性差异 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。再造丸替代后高、中剂量组的全血血液流变  $3\text{ s}^{-1}$  切变率较再造丸组低, 与再造丸组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。复方丹参片组、再造丸替代后高剂量组可降低血瘀模型大鼠全血血液流变  $30\text{ s}^{-1}$ ,  $100\text{ s}^{-1}$  和  $180\text{ s}^{-1}$  切变率, 与模型组比较有显著性差异; 再造丸替代后高、中剂量组的全血血液流变  $30\text{ s}^{-1}$ ,  $100\text{ s}^{-1}$  和  $180\text{ s}^{-1}$  切变率较再造丸组低, 与再造丸组比较有显著性差异。见表 7。

表 6 再造丸塞隆骨替代豹骨前后对胶原蛋白-Adr 致小鼠死亡及偏瘫的影响 ( $n = 12$ )

Table 6 Effects of Zaizao Wan after Sailong bone replacement leopard bone on collagen-Adr caused by death and hemiplegia in mice ( $n = 12$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	5 min 内死亡情况			15 min 内偏瘫恢复情况		
		死亡/只	未死亡/只	死亡率/%	未恢复/只	恢复/只	恢复率/%
模型	-	10	2	83.30	11	1	8.30
复方丹参片	0.432	0	12	0.00 <sup>2)</sup>	4	8	66.70 <sup>2)</sup>
再造丸	1.23	3	9	25.00 <sup>1)</sup>	5	7	58.30 <sup>2)</sup>
再造丸替代后	2.46	4	8	33.30 <sup>1)</sup>	5	7	58.30 <sup>2)</sup>
	1.23	8	4	66.70 <sup>3)</sup>	10	2	16.70 <sup>3)</sup>
	0.615	8	4	66.70 <sup>3)</sup>	10	2	16.70 <sup>3)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与再造丸组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。

表 7 再造丸塞隆骨替代豹骨前后对血瘀模型大鼠全血血流切变率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 7 Effects of Zaizao Wan after Sailong bone replacement leopard bone on whole blood flow shear rate in blood stasis model rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$n$	$\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$					
			$1\text{ s}^{-1}$	$3\text{ s}^{-1}$	$9\text{ s}^{-1}$	$30\text{ s}^{-1}$	$100\text{ s}^{-1}$	$180\text{ s}^{-1}$
正常	-	11	$21.01 \pm 6.11$	$12.63 \pm 2.28$	$9.00 \pm 1.94$	$5.92 \pm 0.88$	$4.52 \pm 0.40$	$4.08 \pm 0.28$
模型	-	10	$48.46 \pm 8.16$ <sup>2)</sup>	$25.59 \pm 3.87$ <sup>2)</sup>	$15.23 \pm 1.74$ <sup>2)</sup>	$9.72 \pm 0.90$ <sup>2)</sup>	$6.54 \pm 0.45$ <sup>2)</sup>	$5.39 \pm 0.32$ <sup>2)</sup>
复方丹参片	0.29	10	$34.97 \pm 7.93$ <sup>4)</sup>	$20.30 \pm 4.97$ <sup>4)</sup>	$12.35 \pm 3.27$ <sup>4)</sup>	$8.21 \pm 2.20$ <sup>4)</sup>	$5.78 \pm 1.44$ <sup>3)</sup>	$4.89 \pm 1.12$ <sup>3)</sup>
再造丸	0.82	10	$42.89 \pm 7.73$	$24.13 \pm 3.82$	$14.98 \pm 2.29$	$9.94 \pm 1.67$	$6.93 \pm 0.75$	$5.81 \pm 0.54$
再造丸替代后	1.64	11	$32.86 \pm 5.9$ <sup>4,6)</sup>	$19.03 \pm 3.15$ <sup>4,6)</sup>	$12.41 \pm 1.82$ <sup>4,6)</sup>	$8.44 \pm 0.98$ <sup>3,6)</sup>	$5.89 \pm 0.49$ <sup>3,6)</sup>	$4.94 \pm 0.35$ <sup>3,6)</sup>
	0.82	10	$33.94 \pm 6.64$ <sup>4,6)</sup>	$19.81 \pm 3.94$ <sup>4,6)</sup>	$12.81 \pm 2.15$ <sup>4,5)</sup>	$8.66 \pm 1.05$ <sup>5)</sup>	$6.21 \pm 0.53$ <sup>5)</sup>	$5.20 \pm 0.41$ <sup>6)</sup>
	0.41	11	$35.69 \pm 3.65$ <sup>4,5)</sup>	$21.08 \pm 2.53$ <sup>4)</sup>	$13.20 \pm 1.29$ <sup>3,5)</sup>	$8.94 \pm 0.92$	$6.50 \pm 0.35$	$5.44 \pm 0.24$

### 3.8 对血瘀模型大鼠 ADP 诱导血小板聚集的影响

与正常组比较, 模型组大鼠血浆 ADP 诱导血小板聚集率显著升高 ( $P < 0.01$ )。复方丹参片组, 再造丸组, 再造丸替代后高、中、低剂量组均可降低 ADP 诱导血小板聚集率, 与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。再造丸替代后高、中、低剂量组 ADP 诱导血小板聚集率较再造丸组高, 但与再造丸组比较无统计学意义。见表 8。

### 4 讨论

再造丸是同仁堂十大王牌药之一, 是治疗风痰类病症所致中风瘫痪, 半身不遂的著名中成药, 临床应用广泛, 疗效显著。但方中豹骨国家严格限制使用, 因此, 尽快寻找出豹骨的替代药材, 以适应临床及生产需要, 具有重要的经济和社会意义。

在历代中医专著和本草记载以及现代实验研究中, 均认为豹骨和虎骨在中药性味归经、功能主治、

表 8 再造丸塞隆骨替代豹骨前后对血瘀模型大鼠 ADP 诱导血小板聚集的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 8 Effects of Zaizao Wan after Sailong bone replacement leopard bone on ADP induced platelet aggregation in blood stasis model rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	ADP 诱导血小板聚集率/%
正常	-	9	15.17 ± 14.14
模型	-	9	48.01 ± 23.01 <sup>2)</sup>
复方丹参片	0.29	10	27.44 ± 12.77 <sup>3)</sup>
再造丸	0.82	10	21.80 ± 12.51 <sup>3)</sup>
再造丸替代后	1.64	11	30.88 ± 9.52 <sup>3)</sup>
	0.82	11	26.26 ± 10.91 <sup>3)</sup>
	0.41	11	23.59 ± 7.58 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01;与模型组比较<sup>2)</sup> P < 0.01。

化学成分、药理作用等方面存在较好的一致性<sup>[11-14]</sup>。因此笔者开展了塞隆骨替代豹骨后的再造丸药效学对比研究,以探索塞隆骨替代豹骨的可行性。

小鼠断头后,由于脑供血终止,在短时间内脑中原有的血液和营养物质尚能使脑功能维持短暂时间,通过观察小鼠断头后的呼吸次数和呼吸持续时间,可以观察药物对脑缺血的保护作用。小鼠双侧颈总动脉与迷走神经结扎后,在致脑缺血的同时,可使动物血压降低造成严重脑缺血,直至死亡,通过本实验可观察药物的抗脑缺血作用<sup>[2]</sup>。线栓法致大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血是一种经典的脑缺血模型,模拟了人类缺血性脑血管病的状态,所产生的梗死面积大,比较符合临床,容易观察药物的抗脑缺血作用效果。实验结果表明再造丸替代前后均可延长小鼠断头后急性脑缺血的呼吸次数与呼吸持续时间,以及双侧 O 颈总动脉结扎法小鼠急性脑缺血的时间,与模型组比较有显著性差异,而替代前后比较无显著性差异;替代前后均能够显著减小 MCAO 大鼠梗死面积,改善神经功能评分。提示再造丸中塞隆骨替代豹骨后,仍具有较好的抗脑缺血作用。

脑缺血发生后,自由基造成的损伤不可忽视,有效的清除自由基,降低过氧化脂质的生成在脑缺血的治疗中具有重要的意义。抗氧化酶 SOD 活力的高低直接反应了机体清除氧自由基的能力,MDA 的高低间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度。再造丸替代后,可升高脑缺血模型大鼠的 MDA 水平,提高 T-SOD 与 NO 的水平,具有较好的改善脑缺血状态下抗氧化能力的作用。再造丸替代前后均能降低胶原蛋白-Adr 致小鼠的死亡率与偏瘫率;可降低肾上腺素致急性血瘀模型大鼠全血血液流变

高、中、低切变率,同时降低血瘀模型大鼠的 ADP 诱导血小板聚集。

综上所述,塞隆骨替代豹骨后,在不同脑缺血实验模型中仍呈现出较好的抗脑缺血作用,提示替代具有可行性。再造丸及再造丸替代后可能通过抗氧化及抑制血栓形成、改善血液流变学(活血化瘀作用)等途径发挥其抗脑缺血作用。

[参考文献]

[1] 张宝琛. 塞隆骨代虎骨具有重要开发前景[J]. 中国中医药信息杂志, 1996, 3(7): 38-40.

[2] 曹晖, 刘玉萍, 张绍来, 等. 塞隆骨原动物高原鼯鼠核基因 18S rRNA 序列测定与分析[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(2): 90-94.

[3] 王北婴, 李仪奎. 中药新药研制开发技术与方法[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 642.

[4] 王欣, 鞠洋, 骆勤, 等. 红毛五加总苷对实验性脑缺血的保护作用及其机制[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(16): 1399-1428.

[5] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema, I: A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. Jpn J Stroke, 1986, 8: 1-8.

[6] Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1989, 20(8): 1037-1043.

[7] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 1989, 20: 84-91.

[8] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 1061.

[9] 王北婴, 李仪奎. 中药新药研制开发技术与方法[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 654.

[10] 毛娜娜, 谢梅林, 顾振纶, 等. 纳豆激酶对急性血瘀模型大鼠血液流变学及血小板聚集的影响[J]. 中成药, 2009, 31(5): 679-682.

[11] 王铮, 晓云. 中药虎骨、豹骨及狗骨的初步分析[J]. 陕西新医药, 1974, 3(5): 18-20.

[12] 王铮, 王晓云. 虎骨及其代用品的探讨[J]. 陕西新医药, 1975, 4(2): 51-54.

[13] 宋秀琴, 贲长恩, 卢慧卿, 等. 虎骨及其类似品的氨基酸成分研究[J]. 北京中医药大学学报, 1995, 18(2): 43-44.

[14] 宋秀琴, 贲长恩, 卢慧卿, 等. 虎骨及其类似品微量元素成分的研究[J]. 北京中医药大学学报, 1995, 18(4): 69-71.

[责任编辑 周冰冰]