

# 扎里奴思方对气虚血瘀型脑缺血再灌注大鼠宏观表征、血液流变学及神经细胞凋亡相关机制的影响

刘抒雯<sup>1</sup>, 刘敬霞<sup>2\*</sup>, 刘超<sup>1</sup>, 甘佳乐<sup>1</sup>, 虎喜成<sup>1</sup>, 任非非<sup>1</sup>

(1. 宁夏医科大学 研究生院, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学 中医学院, 银川 750004)

**[摘要]** **目的:**通过建立气虚血瘀型脑缺血再灌注大鼠模型,探讨回药扎里奴思方对气虚血瘀型脑缺血再灌注大鼠宏观表征、血液流变学及神经细胞凋亡等相关机制的影响。**方法:**将170只SD大鼠随机分为正常组,假手术组,模型组,尼莫地平组,扎里奴思方高、中、低剂量组(29.2, 14.6, 7.3 g·kg<sup>-1</sup>);正常组、假手术组各10只,其余各组根据时间点分为3, 7 d组,每组15只;除正常组外,其余各组均采用饥饿、疲劳、寒湿、惊恐及高脂饮食等多因素制备气虚血瘀型大鼠模型,于4周证候模型完成,给予大鼠ig给药4 d(正常组、假手术组及模型组给予等体积的生理盐水),复制局灶性脑缺血(MCAO)再灌注模型,观察各组大鼠的神经精神状况、体重、进食、舌质变化及排便情况;心脏取血进行血液流变学检测;原位末端转移酶标记法(TUNEL)法检测脑组织皮质区神经细胞凋亡情况。**结果:**与正常组比较,假手术组通过宏观表征的观察及血液流变学指标的检测,出现明显的气虚血瘀证候,说明证候模型复制成功;与假手术组比较,模型组在气虚血瘀的基础上出现明显的偏瘫样症状,神经功能评分显著升高( $P < 0.01$ ),全血黏度明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),红细胞变形性指数明显降低( $P < 0.05$ )及红细胞聚集性指数和红细胞压积显著升高( $P < 0.01$ ),大鼠神经细胞凋亡较显著( $P < 0.01$ );与模型组比较,扎里奴思方可显著改善气虚血瘀型脑缺血再灌注大鼠宏观表征,降低模型大鼠全血黏度、血红细胞压积、红细胞聚集性,提高红细胞变形性,并抑制脑组织细胞凋亡,尤以扎里奴思方高剂量7 d组作用显著( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:**扎里奴思方对气虚血瘀型脑缺血再灌注大鼠损伤具有良好的保护作用,其机制可能与改善模型大鼠血液流变学、抑制脑组织神经细胞凋亡密切相关。

**[关键词]** 扎里奴思方; 气虚血瘀证; 脑缺血再灌注; 宏观表征; 血液流变学; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)02-0138-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017020138

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161107.1520.056.html>

**[网络出版时间]** 2016-11-07 15:20

## Effect of Zhali Nusi Fang on Macroscopic Syndrome, Hemorheological Parameters and Brain Cell Apoptosis in Cerebral Ischemia Reperfusion Model of Rats with Qi Deficiency and Blood Stasis

LIU Shu-wen<sup>1</sup>, LIU Jing-xia<sup>2\*</sup>, LIU Chao<sup>1</sup>, GAN Jia-le<sup>1</sup>, HU Xi-cheng<sup>1</sup>, REN Fei-fei<sup>1</sup>

(1. Graduate School, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. College of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of Zhali Nusi Fang on macroscopic syndrome, hemorheological parameters and brain cell apoptosis in cerebral ischemia reperfusion of rats with Qi deficiency and blood stasis. **Method:** Totally 170 rats were randomly divided into normal group, sham operation group, model group, nimodipine group, high, medium and low-dose Zhali Nusi Fang groups (29.2, 14.6, 7.3 g·kg<sup>-1</sup>). Expect for normal group and sham operation group, all of the remaining groups were subdivided into 3-day and 7-

**[收稿日期]** 20151223(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81260569);国家“十二五”科技支撑计划项目(SQ2013SF12E02181)

**[第一作者]** 刘抒雯,在读硕士,从事中医药防治老年病学研究, Tel:15008673616, E-mail: lswlbz@qq.com

**[通讯作者]** \*刘敬霞,博士,教授,从事中医药防治老年病学研究, Tel:13519216687, E-mail: ljx199566@163.com

day groups, with 15 in each group. Except for normal group, all of the remaining groups were included into the Qi deficiency and blood stasis mode by means of combined factors of hunger, tiredness, cold dampness, panic and high fat diet for 4 weeks. Drugs were given to the rats through intragastric administration for 4 days. The middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was duplicated to observe the rats' nerve mental status, changes in body weight, feeding, tongue and defecation. Blood was collected for hemorheology detection; Tunel method was used to detect apoptosis of brain cortex. **Result:** Compared with the normal group, according to macroscopic observation and detection of blood rheology indexes in the sham operation group, the syndrome of qi deficiency and blood stasis syndrome was observed successfully. Compared with the sham operation group, the model group showed obvious hemiplegia symptoms in addition Qi deficiency blood stasis symptoms, and neurological scores of rats in model group significantly increased ( $P < 0.01$ ), whole blood viscosity significantly rose ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and changes in blood rheology indexes were significantly reduced ( $P < 0.05$ ), blood cell aggregation index and hematocrit significantly increased ( $P < 0.01$ ), and nerve cell apoptosis was obvious ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, Zhali Nusi Fang can significantly improve cerebral ischemia and reperfusion rats with Qi deficiency and blood stasis, and decrease whole blood viscosity, hematocrit, blood cell aggregation, improve the deformation of red blood cells, and inhibit the apoptosis of brain cells, especially in the high-dose 7d group. **Conclusion:** Zhali Nusi Fang has a good protective effect on cerebral ischemia and reperfusion in rats with Qi deficiency and blood stasis, its mechanism may be closely related to improvement of blood rheology and inhibition of brain nerve cell apoptosis of model rats.

**[Key words]** Zhali Nusi Fang; Qi deficiency and blood stasis; cerebral ischemia-reperfusion; macroscopic syndrome; hemorheology; cell apoptosis

脑卒中是一组急性脑血管病,为当前世界范围内人类致死和致残的主要原因之一。据最新流行病学统计<sup>[1-2]</sup>,平均每 40 s 有一人患脑卒中,每 4 min 有一人因脑卒中而死亡。脑卒中的发生已逐渐超过心血管疾病成为我国居民的一大死因之一,尤以缺血性脑血管疾病常见<sup>[3-4]</sup>。缺血性脑卒中是脑动脉硬化出现脑动脉管腔狭窄,血流减少或完全阻塞,致使血小板聚集、血液黏稠度增高,脑血管的病理学改变,促成血管内血栓形成、栓塞,出现血液的“浓”、“黏”、“凝”、“稠”等状态<sup>[5-6]</sup>。在脑梗死发病过程中,由于缺血中心区脑血流急剧下降,周围区尤其是半暗带的一些神经细胞呈现出凋亡的形态学变化,使神经元细胞凋亡与坏死并存,如不及时给予有效治疗,缺血周围区细胞也逐渐呈死亡状态<sup>[7-8]</sup>。因此基于上述病理基础,对脑缺血患者血液流变学进行改善,对缺血半暗带神经细胞进行“抢救”,成为抗脑缺血损伤的重要手段,对于治疗急性脑缺血损伤具有现实意义。

中医认为,气为血之帅,血为气之母,由于脑组织脉络迂回狭小,气虚则无力推动脑组织血液运行,血瘀则脑脉清窍失用,引起运动、感觉功能的障碍,出现半身不遂、言语不利及偏身麻木等症状,因此气虚血瘀证为缺血性脑病发生的重要证型之一<sup>[9]</sup>。

扎里奴思方出自《回回药方》,其具有芳香开窍,辟秽化浊,补肾活血等功效。前期本课题组研究证实<sup>[10-13]</sup>,扎里奴思方在脑缺血损伤的多个环节中发挥作用,具有抗氧化、抗炎、减轻脑水肿、调控血脑屏障通透性等作用。但同时也发现<sup>[14]</sup>,回族医药在治疗脑梗死无辨证分型之分,回族药方剂均以复方为主,在方剂的用药中也无君臣佐使之分,因此回医药是否符合中医治疗脑梗死的辨证分型,需进一步研究证实。本实验从益气活血化瘀的角度出发,建立气虚血瘀型脑缺血再灌注动物模型,观察扎里奴思方对气虚血瘀型脑缺血再灌注大鼠的宏观表征、血液流变学指标的变化及神经细胞凋亡等影响,进一步验证扎里奴思方对气虚血瘀型脑缺血再灌注大鼠的保护作用。

## 1 材料

**1.1 动物** SD 雄性大鼠,清洁级,170 只,体重(250 ± 50) g,由宁夏医科大学实验动物中心提供,合格证号为 SCXK(宁)2014-0001。所有大鼠在同一房间中饲养,温度(25 ± 1) °C,湿度(50 ± 10)%,光暗周期 12 h/12 h,自由饮水和进食,常规环境适应性饲养 7 d 后进行实验。

**1.2 药物及试剂** 尼莫地平片(拜耳医药保健有限公司,批号 H20003010),用蒸馏水配成混悬液

(尼莫地平  $1.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )。水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号 20120608),卞卡青霉素钠(美国 Amresco 公司,批号 0339);羊油自购,胆固醇(郑州兴昌化工产品有限公司,批号 57785);1,2 丙二醇(徐州天鸿化工有限公司,批号 57556),多聚甲醛购自于(上海太平洋化工集团公司溶剂厂,批号 070807),A4 尼龙 MCAO 栓线(北京沙东生物技术有限公司,批号 3043-A4),TUNEL 凋亡检测试剂盒(瑞士 Roch 公司,批号 MK1020),即用型 SABC, DAB 试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司,批号均为 20150302)。

**1.3 仪器** AO-82 型轮转式切片机和 KD-BM-II 电脑生物组织包埋机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司),LBY-N6 型血液流变仪和 LBY-NW1 血浆黏度计(北京普利生公司生产),YP1201N 型电子天平(上海精科天平仪器厂),MDF-U7386S-Sanyo 型超低温冰箱(日本三洋公司),PM-10AD 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),图像分析系统 Image-Pro Plus Version 6.0(美国 Media Cybernetics 有限公司)。

## 2 方法

**2.1 扎里奴思方组成及制备** 参考《回回药方》考释<sup>[15]</sup>所载“扎里奴思方”,方药组成:安息香 3 g,法里公(即小茴香)12 g,兀沙吉(即乳香)12 g,法忒刺撒里荣(即当归)12 g,木里叶(即没药)12 g,撒法郎(即红花)12 g,牡丹皮 9g,芦荟 12 g,伯思八牙 12 g,干祖伐(即怀牛膝)24 g,肉桂 6 g,膈膈脐(即海狗肾)12 g,阿夫忒蒙(即菟丝子)12 g,石菖蒲 12 g。制剂由宁夏医科大学附属回医中医院制剂室提供。制备方法:药材去除杂质,按照药量配比,加入生药材 10 倍量蒸馏水,浸泡 1 h,具有辛香气味药物,如小茴香、乳香等先勿投入,其余用套式恒温器 250 V 煎煮;待药液沸腾后将电压调低至 150 V,保持微沸状态下煎煮 10 min,投入香药,一起滤取煎液;2 煎加入生药材 8 倍量的水,浸泡 15 min 后煎煮,保持微沸状态煎煮 30 min,滤取煎液;合并前后 2 次煎液,将药液置于恒温水浴锅中( $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ )蒸发浓缩至药液含生药  $1.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,用前浓缩至生药量  $3 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  为高质量浓度,稀释中质量浓度组至生药材  $0.75 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$  为低质量浓度组,提取率为 67%。

**2.2 分组及用药** 按随机数字表法将 170 只大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、尼莫地平组、扎方高、中、低剂量组,其中后 5 组又分为 3,7 d 组,每组大鼠 15 只,正常组、假手术组各 10 只;除正常组

外,其余各组均采用饥饿、疲劳、寒湿、惊恐及高脂饮食等多因素制备气虚血瘀型大鼠模型,4 周后随机抽样 4 只,检测大鼠宏观表征并于心脏取血检测血液流变学指标,以发现指标异常为证候造模成功;然后各组干预给药 4 d 行 MCAO 手术。正常组、假手术组及模型组以同等体积生理盐水 *ig*,用药组大鼠根据生药材含量按等效剂量换算关系计算。*ig* 体积按照 100 g 大鼠 *ig* 1 mL 计算,生药用量为  $14.6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,配成的混悬液为  $1.5 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,扎方高、低组分别为  $3.0, 0.75 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;尼莫地平组  $1.08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。术后 *ig* 于不同时间点取材,所有组大鼠均于术前 12 h 禁食不禁水。在造模过程中,大鼠成活率约 75%,保证每组大鼠保持 10 只左右。

**2.3 模型制备** 采用饥饿、疲劳、寒湿、惊恐及高脂饮食复合线栓法制备脑梗死急性期气虚血瘀证大鼠模型。

**2.3.1 气虚血瘀证动物模型制备<sup>[16]</sup>** ①饥饿:通过观察发现,正常大鼠饮食量为 25 g/只/d,按正常饮食量的 60% 即为 15 g/只/d 饲养,分早晚两次进行,其中白天投入 9 g/只/d,晚上投入 6 g/只/d。②疲劳:实验大鼠每日 10:00 开始分批置入盆内,盆内水深约 100 cm,强迫其不断游泳,如见大鼠捞出后仍能爬走,继续放入,直至力竭,除个别大鼠耐受较差,其余平均游泳时间为  $(15 \pm 5) \text{ min}$ 。③寒湿:游泳后捞出,于实验室自然晾干大鼠(室温控制  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ )。④惊恐:将未游泳大鼠放置水桶旁,任其倾听正在游泳大鼠挣扎叫声。⑤高脂饮食:将羊油 20 g(由于宁夏地区为少数民族地区,故以羊油代替猪油),胆固醇 10 g,甲硫氧嘧啶 2 g,聚山梨酯 80 20 mL,1,2 丙二醇 20 mL 及蒸馏水适量配置成脂肪乳剂,按  $5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$  体重加入实验大鼠日常饮水中,*ig* 4 周,复制气虚血瘀证大鼠模型,4 周后通过检测血液流变学指标的变化进行验证。

**2.3.2 局灶性脑缺血再灌注大鼠模型制备** 参照 Longa 等<sup>[17]</sup>制备局灶性脑缺血动物模型,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠( $350 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , *ip*),仰卧、固定大鼠消毒,颈前正中切开皮肤,暴露颈总动脉(CCA)及迷走神经,CCA 穿线备用;钝性分离颈内(ICA),颈外(ECA)动脉,穿线备用;用电凝器烧断 ECA 分出的甲状腺上动脉及枕动脉;结扎 ECA 近心端和远心端,将 ECA 从中间剪断;结扎翼腭动脉(PA),拉紧 CCA 和 ICA 的细线以阻断血流;于 ECA 近 CCA 分叉处剪一小口,将线栓通过小口穿入 ICA 并缓慢前向推进,直至有阻力感为止,线栓插入深度

约为(18.0 ± 0.5) mm;插线成功后留出线栓残端约1 cm,结扎ECA剪口处,松开CCA细线,观察有无出血;抽出CCA及ICA上的细线,缝合皮肤,并在切口处滴注青霉素钠溶液以防感染,术中与术后注意动物保暖,保持肛温(37.0 ± 0.5) °C,室温(26 ± 1) °C。缺血2 h后拆线并缓慢拔出线栓以进行缺血再灌注,后缝合皮肤。假手术组只分离CCA, ICA及ECA,不插入线栓。参照Longa等<sup>[17]</sup>的4分制评分标准,神经功能缺陷评分在1~3分为模型成功。如数小时内死亡、线栓插入过深造成蛛网膜下腔出血的大鼠被剔除。

## 2.4 指标检测与观察

### 2.4.1 宏观表征观测

气虚血瘀证大鼠模型复制过程中,于每周的第3天观察各组大鼠皮毛色泽、爪甲颜色,同时监测大鼠体质量,平均进食量、排便评分、舌质评分,第4周通过舌图照相等方面对气虚血瘀型大鼠宏观表征进行动态观察;在此基础上复制MCAO模型,于术后从模型大鼠神经功能学评分及上述表征及舌质评分、粪便评分进行参考并评分<sup>[18]</sup>。(1)舌质评分,按照以下标准进行评分,记录大鼠舌质紫暗的程度,0分为正常-舌色淡红润泽、舌底色微青,舌底静脉主干不超过舌底全部长度的1/2;1分为舌色轻微紫暗-舌底色紫暗程度相对较轻,舌尖出现散在淡紫色瘀点,舌底静脉主干不超过舌底全部长度1/2;2分为舌色紫暗-舌底色紫暗程度加重,舌尖出现少量紫褐色瘀点、瘀斑且舌底舌静脉主干长度超过舌底全部长度3/4;3分为全舌青紫-舌色紫黯并有见舌体两侧大块瘀斑,舌静脉主干长度超过舌底全部长度的3/4。(2)粪便评分,按照以下标准进行评分,0分为正常-大便成颗粒状,粪软,无臭味;1分为轻度便溏-便黑,部分不成形,轻度臭味;2分为明显便溏-粪便稀溏显著,完全不成形,恶臭。(3)精神状态评分,0分为状态良好;1分为自发活动减少,运动功能下降;2分为活动明显减少,精神状态差。

### 2.4.2 血液流变学检测

造模根据不同时间点,分别于禁食8 h后,10%水合氯醛腹腔注射麻醉实验大鼠,心尖取血进行检测相关指标。绿头管取血约5 mL左右,采血完成后轻轻摇动,4 h内以高切(200·s<sup>-1</sup>),中切(30·s<sup>-1</sup>),低切(1·s<sup>-1</sup>, 5·s<sup>-1</sup>)测定全血黏度、血浆黏度,计算红细胞(RBC)聚集指数(RE),变形指数(TK)和红细胞压积(HCT)<sup>[19-20]</sup>。

$$\eta_r(\text{低切}) = \eta_b(\text{低切}) / \eta_p; \eta_r(\text{高切}) = \eta_b(\text{高切}) / \eta_p$$
$$TK = [\eta_r(\text{高切})0.4 - 1] / [\eta_r(\text{高切})0.4 \times HCT]$$

$$RE = \eta(\text{低切}) / \eta(\text{高切})$$

### 2.4.3 细胞凋亡检测

采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)检测大鼠脑组织阳性细胞凋亡数目,将正常组、假手术组于4周后第7天取材,其余各组根据不同时间点对大鼠进行麻醉,固定取材,除去小脑和脑干,自视交叉处开始向后做冠状切片。切片常规脱蜡入水,标本片加新鲜稀释Protainase K 37 °C消化10 min。置样品于湿盒中,37 °C标记。加封闭液50 μL/片,室温孵育60 min。将Tunel反应混合液加入切片,置样品于湿盒中,37 °C反应30 min。加POD转化剂稀释混匀后取50 μL加至切片上,37 °C反应30 min。DAB显色,脱水,透明,封片。显微镜观察。在高倍显微镜下,随机选择每张切片不同皮质区4个不重叠视野,计数细胞,取其均值。

### 2.5 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件进行统计分析,所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐者用LSD法,以P < 0.05为差异有统计学意义。显著性水准取 $\alpha = 0.05$ 。

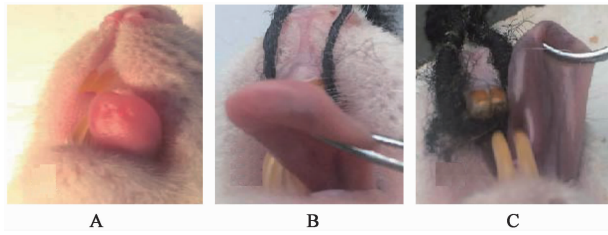
## 3 结果

### 3.1 大鼠病证结合造模后宏观表征的观察

正常组大鼠至取材前,体重自然增加,行动敏捷,爪甲红润光泽,食欲正常,皮毛密集有光泽,眼睛明亮,舌质淡红,大便正常,无死亡情况;与正常组比较,假手术组倦怠乏力,运动能力下降,对外界反应迟钝,体重增长相对缓慢,且爪甲色淡,饮食速度减缓,毛发黯淡无光泽,舌质黯红,舌下络脉增长,舌尖有散在瘀点、瘀斑,排便偶有稀溏,死亡1例;与假手术组比较,模型组大鼠术后少动或不动,无力抵抗,爪甲青紫,半身偏瘫,体重明显减轻,出现负增长,饮食量明显减缓,背毛萎黄枯槁、易脱落,舌质紫黯,舌下络脉青紫粗长,舌尖有大量瘀点瘀斑,排便溏薄,并出现对侧眼裂明显减小,给予面部针刺时反应迟钝,同侧肢体瘫痪伴活动能力丧失,运动时躯体向同侧倾斜,共死亡5只。见图1。与模型组比较,各用药组大鼠情况均有明显好转,尤以扎里奴思方高剂量组作用显著。见表1。

### 3.2 对脑缺血大鼠神经功能评分的影响

正常组、假手术组大鼠神经受损体征未出现,神经功能缺损评分均为0分。模型组大鼠均出现偏瘫样症状,主要表现为手术对侧眼裂缩小显著,对侧面部给予刺激反应缓慢,同侧肢体瘫软不用,下肢运动能力失常,症状随时间延长呈现好转趋势,个别大鼠病情加



A. 正常组; B. 假手术组; C. 模型组

图 1 正常大鼠与气虚血瘀及病证结合动物模型大鼠舌质的比较

Fig. 1 Comparison of tongue qualitative in normal, Qi deficiency and blood stasis and model combining disease and syndrome rats

表 1 扎里奴思方对脑缺血大鼠舌质评分、粪便评分及精神状态评分的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of ZLNS on tongue scores, faeces scores and mind scores of cerebral ischemia in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	舌质评分	排便评分	精神状态评分
正常	-	0.20 ± 0.11	0	0.12 ± 0.04
假手术	-	1.14 ± 0.27 <sup>1)</sup>	0.84 ± 0.25 <sup>1)</sup>	0.43 ± 0.29 <sup>1)</sup>
模型	-	2.21 ± 0.34 <sup>4)</sup>	1.43 ± 0.46 <sup>4)</sup>	1.38 ± 0.45 <sup>4)</sup>
尼莫地平	0.010 8	1.85 ± 0.17 <sup>6)</sup>	1.08 ± 0.22 <sup>5)</sup>	1.02 ± 0.23 <sup>5)</sup>
扎里奴思方	7.3	2.22 ± 0.33 <sup>5)</sup>	1.12 ± 0.31 <sup>5)</sup>	1.11 ± 0.30 <sup>5)</sup>
	14.6	1.64 ± 0.25 <sup>6)</sup>	1.01 ± 0.24 <sup>6)</sup>	0.93 ± 0.24 <sup>6,9)</sup>
	29.2	1.35 ± 0.33 <sup>6,9)</sup>	0.92 ± 0.13 <sup>6,9)</sup>	0.64 ± 0.31 <sup>6,7,9)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与假手术组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>5)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>6)</sup>  $P < 0.01$ ;与尼莫地平组比较<sup>7)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>8)</sup>  $P < 0.01$ ,与扎里奴思方低剂量组比较<sup>9)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>10)</sup>  $P < 0.01$ ,与同组 3 d 比较<sup>11)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>12)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

重,与临床疾病的自然发病过程相类似( $P < 0.01$ )。各用药组 1 d 时神经症状均无明显改善,用药 3 d 后神经功能有所恢复( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),用药 7 d

表 3 扎里奴思方对脑缺血大鼠血液黏度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effect of ZLNS on blood viscosity of cerebral ischemia in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	t /d	全血黏度				血浆黏度
			200·s <sup>-1</sup>	30·s <sup>-1</sup>	5·s <sup>-1</sup>	1·s <sup>-1</sup>	
正常	-	-	3.21 ± 0.43	5.33 ± 1.02	7.84 ± 1.51	20.04 ± 2.94	1.213 ± 0.171
假手术	-	-	4.41 ± 0.59 <sup>1)</sup>	6.68 ± 1.42 <sup>1)</sup>	9.37 ± 1.61 <sup>2)</sup>	23.04 ± 2.59 <sup>2)</sup>	1.293 ± 0.185
模型	-	3	5.97 ± 0.36 <sup>3)</sup>	9.62 ± 1.55 <sup>4)</sup>	12.28 ± 1.56 <sup>3)</sup>	30.15 ± 2.07 <sup>4)</sup>	1.346 ± 0.192
	-	7	5.77 ± 0.43 <sup>3)</sup>	9.53 ± 1.48 <sup>3)</sup>	11.87 ± 1.45 <sup>3)</sup>	31.33 ± 2.34 <sup>4)</sup>	1.274 ± 0.188
尼莫地平	0.010 8	3	4.86 ± 0.47 <sup>5)</sup>	8.37 ± 1.39 <sup>5)</sup>	10.75 ± 1.10 <sup>5)</sup>	26.28 ± 2.24 <sup>6)</sup>	1.127 ± 0.167
		7	4.56 ± 0.44 <sup>6,11)</sup>	7.70 ± 1.28 <sup>5,12)</sup>	10.11 ± 1.12 <sup>5)</sup>	24.53 ± 2.21 <sup>6,11)</sup>	1.291 ± 0.153
扎里奴思方	7.3	3	5.12 ± 0.55 <sup>5,7)</sup>	8.66 ± 1.34 <sup>5)</sup>	11.27 ± 1.24 <sup>5)</sup>	27.35 ± 2.33 <sup>5)</sup>	1.313 ± 0.156
		7	4.70 ± 0.35 <sup>5,11)</sup>	8.17 ± 1.36 <sup>5,11)</sup>	10.39 ± 1.31 <sup>5,11)</sup>	25.44 ± 2.12 <sup>6,11)</sup>	1.231 ± 0.161
	14.6	3	4.78 ± 0.32 <sup>5,9)</sup>	8.32 ± 1.23 <sup>6,9)</sup>	10.51 ± 1.26 <sup>5,9)</sup>	26.54 ± 2.88 <sup>6)</sup>	1.316 ± 0.163
		7	4.58 ± 0.41 <sup>6,9,11)</sup>	7.58 ± 1.35 <sup>6,9,11)</sup>	9.87 ± 1.18 <sup>6,12)</sup>	24.23 ± 2.13 <sup>6,12)</sup>	1.273 ± 0.152
	29.2	3	4.62 ± 0.47 <sup>6,10)</sup>	7.52 ± 1.33 <sup>6,7,9)</sup>	10.10 ± 1.04 <sup>6,9)</sup>	24.71 ± 2.67 <sup>6,7,9)</sup>	1.306 ± 0.128
		7	4.45 ± 0.25 <sup>6,9,11)</sup>	7.33 ± 1.29 <sup>6,10,12)</sup>	9.52 ± 1.32 <sup>6,7,9,11)</sup>	23.33 ± 2.17 <sup>6,9,12)</sup>	1.265 ± 0.116

后神经功能显著恢复( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),尤以扎高组各时间点大鼠再灌注后神经功能恢复症状显著( $P < 0.01$ ),扎中与尼莫地平组大鼠脑缺血再灌注后神经功能缺损症状相当。见表 2。

表 2 扎里奴思方对脑缺血大鼠神经功能评分的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of ZLNS on nerve function scores of cerebral ischemia in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	1 d	3 d	7 d
正常	-	0	0	0
假手术	-	0	0	0
模型	-	1.77 ± 0.95 <sup>4)</sup>	1.36 ± 0.73 <sup>4)</sup>	1.08 ± 0.53 <sup>4)</sup>
尼莫地平	0.010 8	1.73 ± 0.72	1.18 ± 0.55 <sup>5)</sup>	0.72 ± 0.41 <sup>5,11)</sup>
扎里奴思方	7.3	1.68 ± 0.85	1.23 ± 0.48 <sup>5)</sup>	0.96 ± 0.33 <sup>5,11)</sup>
	14.6	1.75 ± 0.71	1.02 ± 0.64 <sup>6,9)</sup>	0.78 ± 0.30 <sup>6,9,12)</sup>
	29.2	1.69 ± 0.88	0.84 ± 0.46 <sup>6,7,9)</sup>	0.47 ± 0.26 <sup>6,10,12)</sup>

3.3 血液黏度指标的测定 通过对气虚血瘀证候的制备,假手术组在 200·s<sup>-1</sup>,30·s<sup>-1</sup>,5·s<sup>-1</sup>,1·s<sup>-1</sup>切变率下的全血黏度呈升高趋势( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),表明证候模型成功;而模型组各时间点通过检测,在 200·s<sup>-1</sup>,30·s<sup>-1</sup>,5·s<sup>-1</sup>,1·s<sup>-1</sup>切变率下大鼠全血黏度显著增加,表明脑缺血再灌注气虚血瘀型大鼠血流循环障碍( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );扎方各剂量组、尼莫地平组不同时间点大鼠全血黏度低于模型组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );其中扎里奴思方高剂量 7 d 组能明显降低 30·s<sup>-1</sup>,1·s<sup>-1</sup>切变率下全血黏度。其中尼莫地平与扎中效果相当,但扎里奴思方对大鼠血浆黏度无显著作用。见表 3。

**3.4 对脑缺血大鼠 HCT, RE 和 TK 的影响** 与正常组比较,假手术组取材前 HCT, RE 升高, TK 降低 ( $P < 0.05$ ),提示证候模型成功;与假手术组比较,模型组 3,7 d HCT, RE 显著升高, TK 显著降低,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),而模型组

3,7 d 之间差异不明显;与模型组比较,扎方各组 3,7 d HCT, RE 及 TK 均有显著改善 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),尤以 7 d 组更为明显;扎高组 3,7 d HCT, RE 及 TK 较尼莫地平具有显著改善 ( $P < 0.05$ );其中扎中与尼莫地平组效果相当。见表 4。

表 4 扎里奴思方对脑缺血大鼠 HCT, RE 和 TK 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effect of ZLNS on red blood cell deformation, red cell assembling index and hematocrit of cerebral ischemia in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	t/d	HCT/%	RE	TK
正常	-	-	36.21 ± 0.72	4.33 ± 1.02	1.04 ± 0.21
假手术	-	-	38.43 ± 0.57 <sup>1)</sup>	5.58 ± 1.33 <sup>1)</sup>	0.85 ± 0.32 <sup>1)</sup>
模型	-	3	41.72 ± 0.35 <sup>4)</sup>	7.67 ± 1.54 <sup>4)</sup>	0.45 ± 0.13 <sup>3)</sup>
		7	42.34 ± 0.43 <sup>4)</sup>	7.52 ± 1.38 <sup>4)</sup>	0.43 ± 0.21 <sup>4)</sup>
尼莫地平	0.010 8	3	39.61 ± 0.47 <sup>5)</sup>	6.32 ± 1.36 <sup>5,9)</sup>	0.64 ± 0.16 <sup>5)</sup>
		7	38.18 ± 0.34 <sup>5)</sup>	6.10 ± 1.24 <sup>6,11)</sup>	0.75 ± 0.12 <sup>6,9,11)</sup>
扎里奴思方	7.3	3	40.33 ± 0.55 <sup>5)</sup>	7.16 ± 1.27 <sup>5)</sup>	0.54 ± 0.24 <sup>5)</sup>
		7	39.85 ± 0.35 <sup>6)</sup>	6.91 ± 1.32 <sup>5)</sup>	0.69 ± 0.20 <sup>5,11)</sup>
	14.6	3	39.53 ± 0.23 <sup>6)</sup>	6.22 ± 1.65 <sup>6,9)</sup>	0.66 ± 0.21 <sup>6)</sup>
		7	38.77 ± 0.11 <sup>6,11)</sup>	6.01 ± 1.31 <sup>6,9)</sup>	0.70 ± 0.28 <sup>6)</sup>
	29.2	3	37.12 ± 0.37 <sup>6,7,10)</sup>	5.52 ± 1.36 <sup>4,6,7)</sup>	0.73 ± 0.14 <sup>6,9)</sup>
		7	36.44 ± 0.25 <sup>6,7,10,11)</sup>	5.43 ± 1.17 <sup>6,7,9)</sup>	0.82 ± 0.32 <sup>6,10,11)</sup>

**3.5 对大鼠神经细胞凋亡的影响** TUNEL 阳性染色为细胞核呈棕黄色颗粒,主要见于梗死灶周围半暗带区,正常组、假手术组皮层神经细胞几乎全为 TUNEL 阴性反应细胞,细胞疏散且界限较不清晰,偶见数个阳性细胞。与假手术组比较,模型 3,7 d 组各时间点凋亡阳性细胞数量均显著增多,胞核固缩浓染,呈显棕色或深棕色,其中 3 d 组凋亡阳性细胞增加更为明显,差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ),至 7 d 时凋亡阳性细胞数目有所下降 ( $P < 0.05$ )。经扎方治疗后不同时间点各组大鼠细胞凋亡率与模型组 3,7 d 比较,均具有显著差异 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),说明扎方不同剂量组对脑缺血均具有显著的治疗作用,其中扎低作用较小,扎里奴思方中、高剂量能明显抑制脑组织神经细胞凋亡,尤以扎里奴思方高剂量组治疗效果显著,能够更明显的抑制脑组织神经细胞凋亡。见表 5,图 2。

**4 讨论**

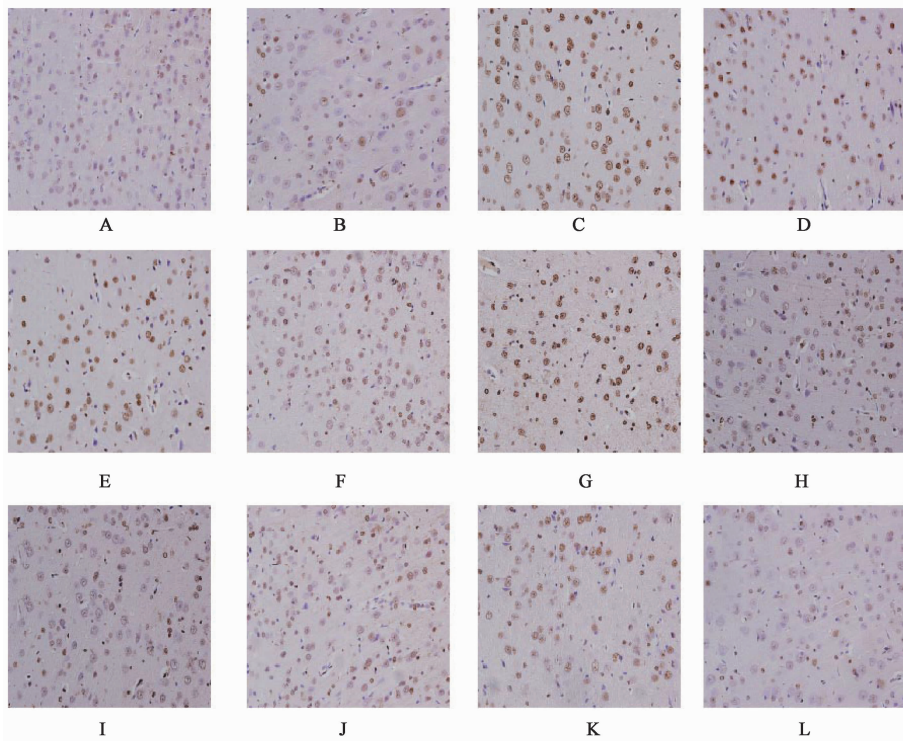
中医认为,气虚血瘀是缺血性脑梗死最常见的临床证型,贯穿了疾病发生发展的整个过程。前期我们通过大量实验对扎里奴思方治疗脑缺血再灌注大鼠的微观定量指标进行研究,发现其具有良好的保护作用,但未具体到某一证候分型,未对证候分型进行系统性宏观表征的观察。基于此,造模时模拟

表 5 扎里奴思方对大鼠神经细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Effects of ZLNS on nerve cell apoptosis of cerebral ischemia in rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	t/d	凋亡细胞/个
正常	-	-	5.36 ± 2.23
假手术	-	-	6.21 ± 2.64
模型	-	3	103.72 ± 15.35 <sup>4)</sup>
		7	36.25 ± 8.28 <sup>4,12)</sup>
尼莫地平	0.010 8	3	57.68 ± 7.63 <sup>6,9)</sup>
		7	28.21 ± 4.37 <sup>5,9,12)</sup>
扎里奴思方	7.3	3	73.64 ± 9.52 <sup>5)</sup>
		7	33.80 ± 8.15 <sup>5,12)</sup>
	14.6	3	51.42 ± 4.17 <sup>6,9)</sup>
		7	20.16 ± 5.20 <sup>6,9,12)</sup>
	29.2	3	46.22 ± 4.34 <sup>6,7,10)</sup>
		7	15.65 ± 4.17 <sup>6,7,10,12)</sup>

了导致气虚的因素,根据“劳则耗气”、“饥则损气”、“肥甘厚味易致膏粱之疾”等理论,采用多因素复合制备模型的方法先造成气虚血瘀证候模型,然后在此基础上通过阻断大脑中动脉制备脑缺血再灌注疾病模型,观察扎里奴思方对改善气虚血瘀型脑缺血再灌注模型大鼠的作用机制。在造模过程中,笔者对



A. 正常组; B. 假手术组; C. 模型 3 d 组; D. 模型 7 d 组; E. 尼莫地平 3 d 组; F. 尼莫地平 7 d 组; G. 扎方 7.3 g·kg<sup>-1</sup> 3 d 组; H. 扎方 7.3 g·kg<sup>-1</sup> 7 d 组; I. 扎方 14.6 g·kg<sup>-1</sup> 3 d 组; J. 扎方 14.6 g·kg<sup>-1</sup> 7 d 组; K. 扎方 29.2 g·kg<sup>-1</sup> 3 d 组; L. 扎方 29.2 g·kg<sup>-1</sup> 7 d 组。

图 2 扎里奴思方对脑缺血大鼠神经细胞凋亡的影响(TUNEL, ×400)

Fig. 2 Effect of ZLNS on nerve cell apoptosis of cerebral ischemia in rats(TUNEL, ×400)

疾病与证候模型分别进行观察,同时根据人所出现气虚血瘀证候的临床标准,如少气懒言、神疲乏力、不思饮食等特征,联系大鼠特殊的生物学表征,使中医宏观性指标实现定量化与定性化。此外,由于血液流变学又是血瘀证相关研究不可或缺的重要客观指标<sup>[21]</sup>,本课题又结合微观生物学指标血液流变学的变化,与临床上“证候”的辨证标准-体征变化,及血液流变学的指标相统一,使中医科研更具有规范化及科研化。上述结果显示,假手术组倦怠乏力,运动能力下降,对外界反应迟钝,体重增长相对缓慢,爪甲色淡,饮食速度减缓,毛发黯淡无光泽,舌质黯红,舌下络脉增长,舌尖有散在瘀点、瘀斑,排便偶有稀溏;而模型组大鼠术后少动或不动,无力抵抗,爪甲青紫,半身偏瘫,体重明显减轻,出现负增长,饮食量明显减缓,背毛萎黄枯槁、易脱落,舌质紫黯,舌下络脉青紫粗长,舌尖有大量瘀点瘀斑,排便溏薄,并出现左侧眼裂明显缩小,给予面部刺激反应迟缓,右侧肢体瘫痪,严重者不能爬行;各用药组大鼠情况均有明显好转,且呈量效关系,尤以扎里奴思方高剂量组作用显著。

脑缺血再灌注损伤的机制涉及能量代谢障碍、局部酸中毒、炎症介质释放、自由基损伤、细胞内

Ca<sup>2+</sup>超载、兴奋性氨基酸的毒性作用及细胞凋亡等,其中细胞凋亡起着重要的作用<sup>[22-24]</sup>。由于细胞凋亡是细胞主动死亡的方式之一,也是一种受基因调控的自主性程序性细胞死亡过程,当脑梗死灶不断的扩大,使周边细胞出现裂解,受到促凋亡基因与抑凋亡基因的协同作用,从而发生细胞凋亡坏死。因此有效抑制细胞凋亡治疗将成为脑缺血治疗的主要内容<sup>[25]</sup>。有研究表明,脑缺血再灌注大鼠早期即出现凋亡细胞,以皮质、海马、纹状体等部位为主,中医药能够迅速作用于缺血脑组织,对脑缺血大鼠的神经细胞凋亡数目具有显著抑制作用<sup>[26]</sup>。本课题研究结果证实,正常组、假手术组存在少量凋亡细胞,而模型组凋亡细胞数目显著增多,尤以 3 d 组明显,经药物治疗后,药物组大鼠神经细胞凋亡数目显著减少,且扎里奴思方高剂量组凋亡细胞减少更为明显,说明扎里奴思方对气虚血瘀型脑缺血再灌注大鼠具有显著的抑制细胞凋亡作用,且具有剂量依赖性。综上所述,扎里奴思方能明显改善气虚血瘀型脑缺血再灌注大鼠宏观表征,减少脑组织神经细胞凋亡数目,降低血液黏稠度,对气虚血瘀型脑缺血再灌注大鼠的生物学指标及其神经功能恢复具有明显的保护作用,为进一步探讨脑缺血气虚血瘀病

证结合动物模型提供了可靠的依据。

[参考文献]

- [1] Go A S, Mozaffarian D, Roger V L, et al. Heart disease and stroke statistics-2013 update a; report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2013, 127(1):143-152.
- [2] LIU L, WANG D, WONG K S, et al. Stroke and stroke care in China; huge burden, significant workload, and a national priority [J]. *Stroke*, 2011, 42(2):3651-3654.
- [3] Donnan G A, Fisher M, Macleod M, et al. Stroke [J]. *Lancet*, 2008, 371(9624):1612-1623.
- [4] Lakhani S E, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke; therapeutic approaches [J]. *J Transl Med*, 2009, 7(7):773.
- [5] 侯熙德. 神经病学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2001:138.
- [6] 程洁, 朱毅, 李忠仁. 钙调蛋白信号转导与脑缺血再灌注脑损伤关系的研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2010, 8(7):836-838.
- [7] 刘必旺, 王坤芳, 梁志刚, 等. 乙酰葛根素对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡的影响及机制研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(11):213-216.
- [8] Fredduzzi S, Mariucci G, Tantucci M, et al. Nitro-aspirin (NCX4016) reduces brain damage induced by focal cerebral ischemia in the rat [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 302(2/3):121-123.
- [9] 廖慧玲, 尹思源, 杨思进, 等. 化淤通络胶囊对气虚血瘀脑缺血大鼠血液流变学的影响[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(9):2161-2163.
- [10] 刘敬霞, 李建生, 牛阳, 等. 扎里奴思方和蜜煎菖蒲方对脑缺血大鼠血栓形成和血小板聚集的影响[J]. *宁夏医科大学学报*, 2011, 33(12):1117-1119.
- [11] 李娟, 刘洋, 刘会贤, 等. 扎里奴思方对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(3):114-117.
- [12] 刘洋, 刘会贤, 李娟, 等. 扎里奴思方对脑缺血再灌注损伤后大鼠脑内 NGF 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(5):123-126.
- [13] 任非非, 刘敬霞, 朱万平, 等. 回药方扎里奴思方联合骨髓间充质干细胞移植对脑缺血再灌注大鼠神经元及 P-糖蛋白的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(8):125-131.
- [14] 李婷婷, 董琳, 陈国霞, 等. 回药治疗脑卒中方剂收集整理[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(14):2412-2415.
- [15] 宋岷. 《回回药方》考释[M]. 北京:中华书局出版社, 2007:165.
- [16] 赵辉, 王键, 李净, 等. 多因素复合制作气虚血瘀证脑缺血动物模型体会[J]. *河南中医*, 2001, 21(4):18-20.
- [17] Longa E Z, Weinstein R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [18] 扈新刚, 张允岭, 柳洪胜, 等. 气虚血瘀大鼠模型表征及血液流变学研究[J]. *天津中医药*, 2007, 24(2):138-141.
- [19] 吕翠霞, 杨荣阁, 张永萍. 清营解表合剂对流感病毒 A/PR/8/H1N1 感染小鼠肺指数影响的动态观察[J]. *天津中医学院学报*, 2005, 24(4):197-200.
- [20] 寇俊萍, 华敏, 严永清. 当归芍药散对小鼠免疫功能的影响[J]. *中国现代应用药学*, 2003, 20(3):171-173.
- [21] 高冲, 刘璐, 胡爱菊, 等. 活血化瘀中药的药理作用研究进展[J]. *药物评价研究*, 2013, 36(1):64-68.
- [22] Saleh M C, Connell B J, Saleh T M. Resveratrol induced neuroprotection is mediated via both estrogen receptor subtypes, ER( $\alpha$ ) and ER( $\beta$ ) [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 548:217-221.
- [23] Raza S S, Khan M M, Ahmad A, et al. Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF- $\kappa$ B signaling pathway in experimental stroke [J]. *Neuroscience*, 2013, 230(1):157-171.
- [24] Mehta S L, Manhas N, Raghbir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics [J]. *Brain Res Rev*, 2007, 54(1):34-66.
- [25] Broughton B R, Reutens D C, Sobey C G. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2009, 40(5):e331-339.
- [26] 陈东丽, 陈旭东, 夏翠英. 天麻对大鼠脑缺血再灌注神经细胞凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(3):148-150.

[责任编辑 周冰冰]