

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

李娟¹, 刘洋¹, 刘会贤¹, 任非非¹, 虎喜成¹, 刘敬霞^{2*}

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

[摘要] **目的:**研究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。**方法:**SD大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平组、扎里奴思方组;线栓法制备大鼠中动脉阻塞缺血再灌注模型;大鼠灌胃给药,于缺血再灌注后1,3,7,14 d取脑,评价神经功能积分,干湿重法测脑含水量,免疫组化法测IgG表达变化。**结果:**与假手术组比较,缺血再灌注后脑含水量、IgG表达显著增高($P < 0.01$, $P < 0.05$),神经功能积分明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,尼莫地平组脑含水量、神经功能积分均有不同程度改善($P < 0.05$),IgG表达有所下降,尤以3,7 d明显($P < 0.01$);与尼莫地平组比较,扎里奴思方组脑含水量、IgG表达呈不同程度下调($P < 0.05$),神经功能积分增大,尤以3,7 d明显;扎里奴思方3,7 d组与1 d比较,IgG含量显著降低($P < 0.05$)。**结论:**脑缺血再灌注损伤后1~7 d可引起血脑屏障通透性增加,7 d以后血脑屏障通透性逐渐恢复;扎里奴思方可有效降低缺血再灌注脑含水量及改善脑缺血后神经功能积分,降低IgG在脑内的表达量;其机制可能是通过调控血脑屏障的通透性,抑制有害物质进入脑内,从而发挥脑保护作用。

[关键词] 扎里奴思方; 脑缺血再灌注损伤; 脑保护; 血脑屏障

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0114-04

[doi] 10.11653/syjf2014030114

Effects of Zhali Nusi Fang on Permeability Changes of Blood Brain Barrier after Focal Cerebral Ischemia-reperfusion in Rats

LI Juan¹, LIU Yang¹, LIU Hui-xian¹, REN Fei-fei¹, HU Xi-cheng¹, LIU Jing-xia^{2*}

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

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

[Abstract] **Objective:** To research the effects of Zhali Nusi fang (ZLNSF) on the permeability changes of blood brain barrier after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. **Method:** SD rats were divided randomly into Sham-operated, model, nimodipine and ZLNSF groups. Rat focal cerebral ischemia-reperfusion model was established by middle cerebral artery occlusion with nylon thread. After rats were administered orally with corresponding drugs 1, 3, 7, 14 d, then take out brain. The neurological scores were evaluated. Wet and dry weight measured brain water content; immunohistochemical method to measure IgG expression. **Result:** Compared with the Sham-operated group, ischemia reperfusion brain water content, IgG expression was significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$), neurological function score significantly dropped ($P < 0.01$); compared with the model group, the nimodipine group of brain water content, neurological function score emerged varying degrees of improvement ($P < 0.05$), the expression of IgG level decreased, especially in 3, 7 d significantly ($P < 0.01$); compared with nimodipine group, ZLNSF group brain water content, IgG expression was emerged varying degrees down ($P < 0.05$), and nerve function integral increases especially in 3, 7 d; compared with 1 d, ZLNSF 3, 7 d groups the expression of IgG levels were significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusion:** Cerebral ischemia-

[收稿日期] 20130401(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260569)、宁夏科技支撑计划项目(2012ZYH230)

[第一作者] 李娟, 硕士, 从事中医、回医药防治脑缺血性疾病的研究, Tel:13519599821, E-mail:lijuanwupeng@163.com

[通讯作者] * 刘敬霞, 博士、副教授、硕士生导师, 从事中医、回医药防治老年病研究, Tel:13519216687, E-mail:ljk199566@163.com

reperfusion injury can induced breakdown and increased permeability of the blood-brain barrier after 1-7 d, then the blood-brain barrier permeability gradually restored after seven days; it is indicated that the treatment of the ZLNSF can promote the cerebral protection. Its mechanism may be related to down-regulate the expression of IgG and reduce the permeability of blood-brain barrier, hold back harmful and large molecules from entering the brain, which plays a critical protective effect.

[**Key words**] Zhali Nusi fang; cerebral ischemia-reperfusion injury; cerebral protection; blood-brain barrier

随着中国人口的老齡化,缺血性脑梗死疾病已成为危害中老年人健康的重大疾病之一,其发病率、死亡率、致残率及复发率逐年增加。近年来发现脑梗死发病趋于年轻化,脑梗死后导致了患者肢体功能缺损、生活质量下降,给家庭及社会带来了严重的负担^[1-2]。脑梗死的治疗目的多从促进中风后神经功能修复、减少有害物质进入脑内、减轻患者残疾程度及减少复发率入手。脑梗死后,研究血脑屏障通透性改变可以为治疗提供一个新思路^[3],以降低脑梗后伤残程度,对提高患者生存质量具有重要意义。扎里奴思方是出自《回回药方》治疗脑系疾病的常用方剂,具有抗脑缺血损伤、神经元保护作用^[4-6],本课题组拟采用与临床病人发病情况相类似的大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,进一步深入研究其脑保护作用。

1 材料

1.1 动物 190 只雄性 SD 大鼠,清洁级,3~4 月龄,(300±50)g,由宁夏医科大学实验动物中心提供,合格证号 NXXY(宁)2001-0001。

1.2 药物

1.2.1 扎里奴思方出自《回回药方》,方药组成:安息香 3 g,法里公(即茴香)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 9 g,芦荟 12 g,伯思八牙(即水龙骨)12 g,干祖伐(即怀牛膝)24 g,肉桂 6 g,膈肭脐(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,方中所用生药材去除杂质,按组方剂量配比,煎煮滤取煎液后浓缩至药液含生药 3.0 g·mL⁻¹,4℃ 保存备用;用前稀释至生药材含量为 1.5 g·mL⁻¹。

1.2.2 尼莫地平片(拜耳医药保健有限公司提供,30 mg/片,批号 H20003010),用蒸馏水配成混悬液(尼莫地平 1.08 g·L⁻¹)。

1.3 试剂和仪器 水合氯醛(分析纯,上海五联化工厂。临用时用蒸馏水现配成含水合氯醛 10% 的溶液);FX4-2 型电热恒温干燥箱(Shellab 公司),

BT224S 型电子天平(Sartorius 公司),病理图像分析软件(技易科技),免疫球蛋白 IgG(SC-2027,稀释到 1:75,试剂购自 Santa cruz Biotechnology)。

2 方法

2.1 分组与给药 随机抽取 10 只作为假手术组,余成模后随机分至模型、尼莫地平、扎里奴思方 1, 3, 7, 14 d 组内。考虑脑缺血模型制造时的死亡率,需扩大样本含量,除去假手术组 10 只余各组每组 15 只;所有动物于成模清醒后 2 h 按相应分组灌胃给药,给药剂量按动物与人体表面积折算:扎里奴思方 1.5 g·mL⁻¹;尼莫地平 1.08 g·L⁻¹,模型组和假手术组以生理盐水代替,1 次/d。

2.2 动物模型的制备 参照线栓法^[5]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,待麻醉后固定,颈前正中切口,左侧钝性分离颈总、颈内外动脉,穿线备用;于颈外动脉近动脉分叉处剪一小口,栓线穿入颈内动脉,缓慢推进,直至出现阻力感,进线长度为(20±2)mm,穿线成功后缝合皮肤,2 h 后进行缺血再灌注,拆线后拔出栓线,再缝合。假手术组只分离颈总、颈内外动脉,不穿入栓线。手术过程中保持大鼠肛温(37.0±0.5)℃,保持室温(26±1)℃。

2.3 神经功能积分 神经功能积分评测方法按 Garcia J H^[7]进行,从自发运动、四肢对称实验、前肢伸展运动检测、攀登运动、痛觉、位置觉等 6 个方面进行,总分共为 18 分,其损伤越重得分越小。

2.4 脑含水量测定 采用干湿质量法测定缺血侧含水量。脑缺血 2 h 再灌注至各时间点后处死大鼠,快速断头取脑,滤纸擦去表面水分,取缺血侧半边大脑,置天平内精密称量湿质量,然后置 100℃ 电烤箱 24 h,再迅速测得干质量。

$$\text{脑含水量} = (m_{\text{湿脑}} - m_{\text{干脑}}) / m_{\text{湿脑}} \times 100\%$$

2.5 脑组织 IgG 的表达及测定 用 IgG 表达含量来评价血脑屏障通透性。IgG 阳性表达观察及测定,用 Image Pro Plus 6.0 图像全自动分析系统分析 IgG 表达。测出 iod sum 和 area sum,用平均吸光度

值(\bar{A})表示每张切片的结果, $\bar{A} = (A_{\text{积分}} / \text{选定对象的面积})$,取其平均值,反映 IgG 含量的表达多少为差异具有显著性意义。

2.6 数据处理 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.5 版统计软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义。

3 结果

3.1 神经功能积分 神经功能积分比较表明,成模及各药物组与假手术组比较,缺血后动物均出现神经功能损害症状。与假手术组比较,模型各组神经功能明显下降($P < 0.01$)。与模型组比较,各药物组神经功能评分明显好转($P < 0.05$);与尼莫地平组比较,扎里奴思方组神经功能恢复明显,以 3,7,14 d 组更为显著($P < 0.01$)。模型组 3,7,14 d 组与 1 d 组比较,神经功能评分恢复显著($P < 0.01$);

14 d 组与 3,7 d 组比较,神经功能评分恢复显著($P < 0.01$);3,7 d 组互相比,神经功能评分恢复有意义($P < 0.05$)。尼莫地平 3,7,14 d 组与 1 d 组比较,神经功能评分趋于恢复,有显著差异性($P < 0.01$);14 d 组与 3,7 d 组比较,神经功能评分恢复有统计学意义($P < 0.05$)。扎里奴思方组 3,7,14 d 组与 1 d 组比较,神经功能评分恢复显著($P < 0.01$);14 d 组与 3 d 组比较,神经功能评分恢复显著($P < 0.01$);14 d 组与 7 d 组比较,神经功能评分恢复有统计学意义($P < 0.05$)(表 1)。

3.2 脑含水量 与假手术组比较,模型组缺血侧脑含水量含量增加(均 $P < 0.01$)。与模型组比较,扎里奴思方组缺血侧脑含水量降低($P < 0.05$),与尼莫地平组比较,扎里奴思方组脑含水量 3,7 d 有统计学意义($P < 0.05$)(表 2)。

表 1 扎里奴思方治疗各组大鼠神经功能积分比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	剂量	大鼠神经功能评分($\times 10^{-2}$)			
		1 d	3 d	7 d	14 d
假手术	-	18.00 \pm 0.00	18.00 \pm 0.00	18.00 \pm 0.00	18.00 \pm 0.00
模型	-	10.00 \pm 0.74 ^{1,12,14)}	12.43 \pm 1.27 ^{1,10,13)}	13.33 \pm 0.97 ^{1,10,11)}	15.63 \pm 0.83 ^{1,10,12,14)}
尼莫地平	1.08 g·L ⁻¹	12.78 \pm 0.81 ^{4,12,14)}	14.79 \pm 1.26 ^{4,7,10)}	14.50 \pm 0.55 ^{2,8,10)}	15.79 \pm 1.11 ^{8,10,12,13)}
扎里奴思方	1.5 g·mL ⁻¹	12.83 \pm 0.64 ^{4,12,14)}	15.81 \pm 1.40 ^{4,5,10,13)}	16.98 \pm 1.35 ^{4,6,9,11)}	17.08 \pm 1.41 ^{4,6,10,12,13)}

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与尼莫地平组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与 ZLNSF 组比较⁷⁾ $P < 0.05$,⁸⁾ $P < 0.01$;与 1 d 组比较⁹⁾ $P < 0.05$,¹⁰⁾ $P < 0.01$;与 3 d 组比较¹¹⁾ $P < 0.05$,¹²⁾ $P < 0.01$;与 7 d 组比较¹³⁾ $P < 0.05$,¹⁴⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 扎里奴思方治疗各组大鼠脑组织含水量水平比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	剂量	大鼠脑含水量($\times 10^{-2}$)			
		1 d	3 d	7 d	14 d
假手术	-	79.33 \pm 0.39	79.33 \pm 0.39	79.33 \pm 0.39	79.33 \pm 0.39
模型	-	84.49 \pm 0.74 ^{1,6,11)}	86.10 \pm 1.62 ^{1,6,9)}	84.29 \pm 0.54 ^{1,6,11)}	81.33 \pm 0.39 ^{2,5,9,11)}
尼莫地平	1.08 g·L ⁻¹	82.63 \pm 0.75 ^{4,10)}	81.97 \pm 1.24 ^{4,8)}	81.75 \pm 0.79 ^{4,9)}	80.23 \pm 1.97 ^{3,7,9,10)}
扎里奴思方	1.5 g·mL ⁻¹	82.26 \pm 0.92 ^{4,11)}	80.12 \pm 1.47 ^{4,5)}	80.37 \pm 1.23 ^{4,5,9)}	79.62 \pm 1.09 ^{4,9,10)}

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与尼莫地平组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与 ZLNSF 组比较⁷⁾ $P < 0.05$;与 1 d 组比较⁸⁾ $P < 0.05$,⁹⁾ $P < 0.01$;与 3 d 组比较¹⁰⁾ $P < 0.05$,¹¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 大鼠脑组织 IgG 表达变化 与假手术组比较,模型组 IgG 表达增强($P < 0.01$);与模型 1 d 相比,3 d 组 IgG 含量增加,7,14 d 含量有所降低($P < 0.01$);模型组与各药物组比较,IgG 表达均不同程度降低($P < 0.01, P < 0.05$);组内比较,扎里奴思方 3,7,14 d 组 IgG 明显比 1d 组降低($P < 0.01$),7 d 与 14 d IgG 含量没有统计学意义(表 3)。

4 讨论

血脑屏障(BBB)通透性研究在脑缺血-再灌注损伤中的作用逐渐引起人们的重视^[8-9]。脑缺血再灌注损伤后,BBB 结构及功能受到创伤,通透性增加,炎性物质、血浆蛋白、水、电解质及细胞间液进入

脑内,造成神经细胞间质出现明显水肿,不但加重神经功能缺失,还可引发颅内高压、脑疝甚至危及生命。正常情况下,血清蛋白 IgG 不能通透完整的 BBB,脑缺血-再灌注损伤时脑组织中就会有外渗的血清蛋白,即说明 BBB 完整性受到破坏,对大分子物质及水液的通透性增加^[10],所以可以通过检测脑组织 IgG 的表达来反映血脑屏障通透性。本实验结果显示:成模组及各药物治疗组神经功能均具有不同程度的损伤与假手术组作对比。随着缺血再灌注时间的延长,模型组神经功能缺损与脑水肿逐渐加重,在 3~7 d 达到最大峰值,在 7 d 后,神经功能损害及脑水肿趋于下降,说明神经功能缺损有一个

表3 扎里奴思方治疗各组大鼠脑组织 IgG 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)mg·L⁻¹

分组	剂量	IgG(×10 ⁻²)			
		1 d	3 d	7 d	14 d
假手术	-	19.56 ± 1.24	19.56 ± 1.24	19.56 ± 1.24	19.56 ± 1.24
模型组	-	32.53 ± 0.89 ^{1,11)}	34.24 ± 1.10 ^{1,8)}	32.97 ± 1.08 ^{1,9,11)}	31.10 ± 0.71 ^{1,9,11)}
尼莫地平	1.08 g·L ⁻¹	30.59 ± 1.04 ³⁾	30.07 ± 1.67 ^{4,6)}	27.84 ± 0.64 ^{4,9,11)}	27.19 ± 1.42 ^{4,6,9,11)}
扎里奴思方	1.5 g·mL ⁻¹	29.41 ± 0.92 ^{3,4,6,7)}	27.82 ± 0.80 ^{4,6,9)}	26.64 ± 1.87 ^{4,5,9)}	26.31 ± 0.65 ^{4,6,9,10)}

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与尼莫地平组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$;与扎里奴思方比较⁷⁾ $P < 0.05$;与1 d组比较⁸⁾ $P < 0.05$,⁹⁾ $P < 0.01$;与3 d组比较¹⁰⁾ $P < 0.05$,¹¹⁾ $P < 0.01$ 。

自我修复的过程,这与刘氏的研究结果是相符的,其研究发现脑缺血后大鼠 28 d 神经功能评分明显优于 14 d^[11],但这种自我修复的能力是非常有限的。模型组 IgG 的表达在 1~3 d 呈升高趋势,在 3d 组达峰后又逐渐下调,说明缺血损伤后血脑屏障功能在早期是受损的,7 d 以后功能又逐渐趋于恢复,IgG 的表达可以反映血脑屏障的通透性,试验中发现呈现这种规律是与 Elisa E. Konofagou,郑跃英等的研究^[12-13]基本一致的。

脑缺血再灌注损伤早期,下调血脑屏障通透性可能有脑保护作用^[14-15]。本实验研究发现:扎里奴思方能明显下调缺血再灌注损伤后大鼠神经功能缺损及脑水肿现象,尤以 3,7 d 作用明显;1 d 组比较,扎里奴思方组功效也是明显优于模型组,与尼莫地平组无明显差别,可能是两种药物均可以透过血脑屏障,作为神经保护剂而对缺血再灌注损伤部位起到保护作用。扎里奴思方具有芳香开窍、益髓补肾、活血祛瘀等作用,切中脑中风后痰蒙神窍、气虚血瘀等诸病机,有很好的抗缺血损伤、神经元保护作用,可以减轻缺血脑组织中 IgG 的渗出量,从而起到血脑屏障保护作用,尤其是在缺血早期(1,3 d)的作用较为突出,说明早期调控血脑屏障通透性可减少有害物质的进入和脑实质水肿及神经功能失调的发生,改善受损神经功能恢复。由此认为:扎里奴思方在缺血性脑病治疗中能促进神经功能恢复、减轻脑水肿及减少 IgG 表达,其发挥脑保护作用的机制可能是通过调控血脑屏障通透性而实现的。

[参考文献]

[1] 曹晓岚,郭闫葵,陈建强,等.缺血性中风患者 392 例临床流行病学回顾性调查[J].中医药研究,2012,12(1):48.

[2] 赵建国.脑梗死[M].北京:人民卫生出版社,2006:2.

[3] Nicolas Weiss, Miller F, Cazaubon S. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases [J]. BBA Biomembranes, 2009, 1788(4):842.

[4] 单晓宇,刘敬霞,楚国庆,等.回药扎里奴思方对脑梗死患者颈动脉硬化的影响[J].宁夏医科大学学报,2012,34(8):753.

[5] 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神经元损伤的影响[J].宁夏医科大学学报,2011,33(11):1001.

[6] 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.

[7] Garcia J H, Wagner S, Liu K F, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. Stroke, 1995, 26(4):627.

[8] 邹伟,孙晓伟,于学平,等.血脑屏障与脑缺血再灌注损伤研究进展[J].中华中医药学刊,2009,27(3):466.

[9] Schmidt K, Szymas J, Hossman K. Immunohistochemical study of glial reaction and serumprotein extravasation in relation to neuronal damage in rat hippocampus after ischemia[J]. Neuro-science, 1990, 38:527.

[10] 王耀明,莫雪安,童萼塘,等.脑缺血再灌注后大鼠血脑屏障通透性的免疫组织化学研究[J].中国病理生理杂志,2000,16(8):755.

[11] 刘会贤,刘敬霞,俞维,等.补阳还五汤和星萎承气汤促进脑缺血大鼠神经修复和对肝肾功能的保护研究[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(8):247.

[12] 郑跃英,兰允平,祝胜美.大鼠脑缺血/再灌注损伤后梗死灶周围水通蛋白 4 与血脑屏障通透性的动态变化[J].中国病理生理杂志,2008,24(8):1647.

[13] Elisa E Konofagou. Optimization of the ultrasound-induced blood-brain barrier opening [J]. Theranostics, 2012,12(2)f:1223.

[14] Jin Xinchun, Liu Jie, Yang Yi, et al. Spatiotemporal evolution of blood brain barrier damage and tissue infarction within the first 3 h after ischemia onset [J]. Neurobiol Disease, 2012,48(3):309.

[15] 樊凯芳,李晓亮,梁晓东,等.三化汤对大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(7):181.

[责任编辑 邹晓翠]