

通窍化栓汤对脑缺血再灌注模型大鼠脑组织超微结构的影响

朱广旗*, 吴远华, 胡细佑

(贵阳中医学院第一附属医院, 贵阳 550001)

[摘要] **目的:**观察不同剂量的通窍化栓汤对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型脑组织超微结构的影响,并探讨其可能的作用机制,为临床通窍化栓汤治疗急性脑梗死提供实验依据。**方法:**将 SD 大鼠随机分为 5 组:通窍化栓汤高剂量组、中剂量组、低剂量组、模型组、假手术组。采用可逆性大脑中动脉线栓法制备成局灶性脑缺血再灌注模型(MCAO 大鼠模型),给予相应的剂量按 17.50, 8.75, 4.35 g·kg⁻¹·d⁻¹、生理盐水治疗 15 d 后,观察脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量变化及脑组织超微结构变化。**结果:**与假手术组比较,模型组 MDA 含量显著增加,SOD 活性显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,通窍化栓汤各剂量组均能降低脑组织中 MDA 含量,升高 SOD 活性,有极显著差异($P < 0.01$)。通窍化栓汤高剂量组与中、低剂量组相比有显著性差异($P < 0.05$),并能够减轻脑组织损伤后细胞凋亡。**结论:**高剂量通窍化栓汤能明显减轻神经细胞变性坏死,减少细胞凋亡,从而改善神经功能缺损,其机制可能与清除自由基有关。

[关键词] 脑缺血再灌注; 通窍化栓汤; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 形态学变化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0212-04

[doi] 10.11653/syfy2013200212

Effects of Tongqiao Huashuan Decoction on Brain Tissue Ultrastructure of Bolt in Rats with Cerebral Ischemia

ZHU Guang-qi*, WU Yaun-hua, HU Xi-you

(First Affiliated Hospital of Guiyang Collage of Tradational Chinese Medicine, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Miao medicine Tongqiao Huashuan decoction on brain tissue ultrastructure of bolt in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion injurys. **Method:** SD rats were randomly divided into 5 groups (Tongqiao Huashuan decoction high dosage group, middle dose group, low dose group, model group, sham operation group). The middle cerebral artery occlusion (MCAO) was used to establish focal cerebral ischemia-reperfusion model. The corresponding Tongqiao Huashuan decoction (17.50, 8.75, 4.35 g·kg⁻¹·d⁻¹), saline gavage were given for 15 days. The brain tissue superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) content and ultrastructure of brain tissue were observed. **Result:** Compared with the sham operation group, MDA in model group was significantly increased, SOD activity was significantly decreased ($P < 0.05$); compared with the model group, Tongqiao Huashuan decoction reduced the MDA content in brain tissues, increased the activity of SOD ($P < 0.01$). Tongqiao Huashuan decoction could reduce the damage of brain tissue after cell apoptosis. **Conclusion:** High doses of Tongqiao Huashuan decoction could obviously alleviate the degeneration and necrosis of nerve cells and reduce apoptosis, its mechanism may be related to eliminate free radicals.

[Key words] cerebral ischemia and reperfusion; Tongqiao Huashuan decoction; superoxide dismutase; malondialdehyde; morphological changes

[收稿日期] 20130407(018)

[基金项目] 贵州省优秀科技教育人才省长专项资助项目(200967)

[通讯作者] *朱广旗,教授/主任医师, E-mail: zhuguangqii@163.com

通窍化栓汤是源于贵州苗族地区人民在与疾病作斗争的漫长历史过程中创造、经过长期实践而成的治疗中风病的一良方。其组方由大血藤、飞龙掌血、土三七、金毛狗脊等苗药组成。在临床上治疗急性缺血性脑血管疾病疗效显著,而目前针对苗药对缺血性疾病的机制研究证据缺乏。本课题正是通过观察通窍化栓汤药对脑缺血再灌注模型大鼠的脑组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平变化及脑组织超微观结构的影响,探讨通窍化栓汤治疗缺血性脑血管病可能的作用机制,为其临床应用提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康清洁级SD大鼠,雌雄各半,体重300~350 g,由贵阳医学院动物实验中心提供[SCXK(黔)2009-0001],饲养以标准育成饲料,自由饮水。

1.2 仪器 PL303型电子天平[梅特勒托利多仪器(上海)有限公司],2135型石蜡切片机(德国Leica公司),H-600IV型透射电镜(日本日立公司),BX46型Olympus照相显微镜(日本奥林巴斯公司),B-600型紫外分光计(上海分析仪器有限公司)。

1.3 试剂 丙二醛(MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物有限公司);0.9%生理盐水(四川科伦药业有限公司,H51021157);通窍化栓汤(组成:大血藤15 g,飞龙掌血10 g,土三七12 g,水蛭10 g,络石藤12 g,金毛狗脊12 g)由贵阳中医学院第一附属医院药剂科提供,水煎浓度至生药含量为 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2 方法

2.1 动物分组给药 在70只SD大鼠中,随机抽出10只为假手术组,余进行造模。符合纳入标准的大鼠采用随机数字表方法分为假手术组,模型组,通窍化栓汤高、中、低剂量组,每组10只。通窍化栓汤高、中、低剂量组分别从术前3 d开始按成人剂量($1.25\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)的14倍($17.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、7倍($8.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、3.5倍($4.35\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),灌胃给药,持续15 d。模型组从术前3 d开始每日1次给予生理盐水。假手术组仅抓取不做其他处理。

2.2 尼龙线的制备 参考Zea longa^[1]的方法,将一长40 mm直径0.20 mm(或0.22 mm)的鱼线一端加热凝结成光滑的球形,然后用乙醇擦洗消毒并在距线球端 $18.5\pm 0.5\text{ mm}$ 处作标记,再垂直将其迅速放入预先熔化的石蜡中,再迅速抽出,待石蜡冷凝后,置于1:2 500单位的肝素生理盐水浸泡

备用。

2.3 动物造模 大鼠MCAO模型制备参考Zea Longa等^[1]的方法并进行改进,制备大鼠左侧大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注损伤模型。动物术前12 h禁食,自由饮水。10%水合氯醛($300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉,仰卧固定,颈部正中切口,钝性分离皮下肌肉组织,充分暴露颈总动脉,沿着颈总动脉向上,找到颈内动脉和颈外动脉,在颈总动脉上距分叉约5 mm处剪口,将鱼线经颈总动脉插入颈内动脉,建立左侧中动脉局灶性脑缺血模型,待缺血2 h后将鱼线圆头移出颈内动脉完成再灌注。整个手术过程中保持室温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$,湿度55%~75%,维持大鼠的体温恒定 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

假手术组大鼠只进行麻醉和血管分离术。

2.4 神经功能评分 参考Longa^[1]的方法进行5分制行为功能评分。其标准如下:无神经功能损伤者,计0分;不能完全伸展右前肢,提鼠尾离开地面30 cm,右前肢表现为腕屈曲、肘屈曲、肩内旋或兼而有之者,计1分;自发转圈者,计2分;行走时向右侧倾倒或轻推肩部时即向右侧倾倒者,计3分;不能行走或意识丧失者,计4分;死亡者,计5分。而纳入该实验的模型,其评分在1~3分时,认为模型成功。

2.5 脑组织病理切片的制取 分别于缺血再灌注后取各组大鼠各4只,用10%水合氯醛($300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)ip麻醉,打开颈部,暴露右侧颈总动脉,插管,先输注生理盐水约50 mL,然后输注4%多聚甲醛约50 mL灌注固定,断头取脑,取左侧大脑制作切片标本。在距额极2 mm和距尾极1 mm处各切一刀,取中间段制成光、电镜标本,观察神经细胞的超微结构变化。

2.5.1 光镜标本 将标本放入4%甲醛溶液中固定24 h,间隔2 mm连续做脑组织冠状切片5张,常规梯度脱水、透明、石蜡包埋、切片厚 $5\text{ }\mu\text{m}$,切片贴附于载玻片上,HE染色,光镜下检查。

2.5.2 标本的HE染色 切片经脱蜡脱水后,再予哈瑞氏苏木精染核,1%盐酸乙醇分化,氨水返蓝,伊红染色,脱水,透明后中性树脂胶封片,在光镜下进行观察组织形态学的变化。

2.5.3 电镜标本 用2.5%戊二醛将标本预固定4 h,1%四氧化锇再固定1.5 h,间隔2 mm连续做脑组织冠状切片5张,丙酮梯度脱水,EPON812浸透及包埋,常规制作超薄切片,醋酸铀-枸橼酸铅双重染色,在电镜下观察其组织形态结构的变化。

2.6 脑组织MDA,SOD检测 各组实验大鼠余下

的 6 只进行断头处死,在冰盘上迅速取其左侧大脑组织,放入玻璃匀浆管(玻璃匀浆管下端置于冰水混合物中)进行匀浆。将 10% 的组织匀浆在低温离心机中以 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 10 min,取出上清液,根据 SOD,MDA 试剂盒说明书,进行脑组织中 SOD,MDA 含量检测。SOD 的测定采取黄嘌呤氧化酶法,MDA 的测定采取硫代巴比妥酸法,均严格按试剂盒说明进行。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 11.5 软件统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间比较用 q 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠脑组织中 MDA,SOD 水平的比较 与假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 MDA 含量显著升高,SOD 活性显著降低($P < 0.05$);通窍化栓汤高、中、低剂量组与模型组相比,脑组织中 MDA 含量降低,SOD 活性显著升高;通窍化栓汤高剂量组 MDA 含量最低,SOD 活性最高,有极显著差异($P < 0.01$)。见表 1。

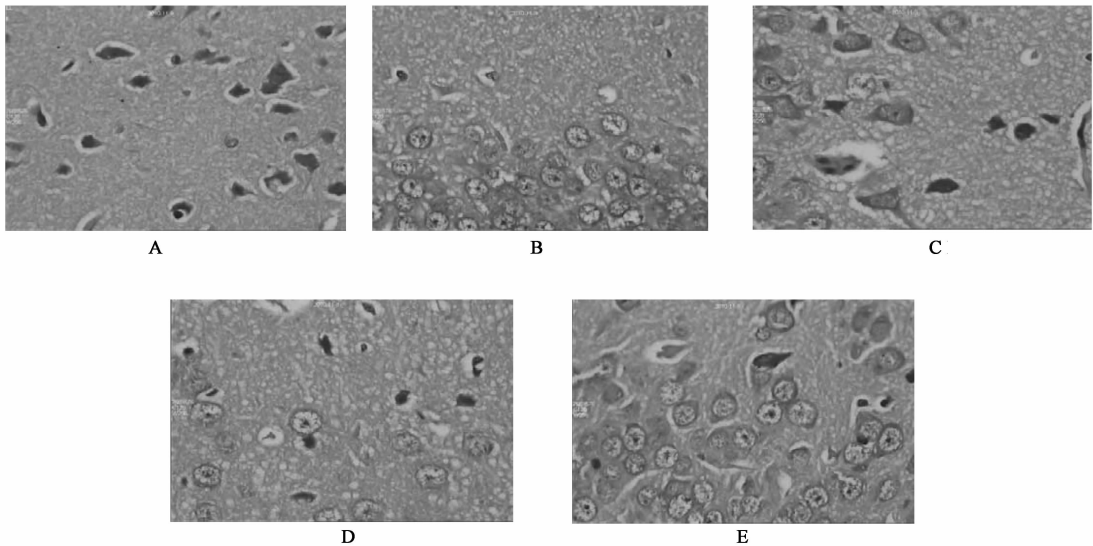
表 1 通窍化栓汤对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型脑组织中 MDA 含量及 SOD 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 $/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$	MDA $/\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$	SOD $/\text{NU}\cdot\text{mg}^{-1}$
模型	-	$4.50 \pm 0.16^{1)}$	$84.87 \pm 1.98^{1)}$
假手术	-	3.57 ± 0.98	87.92 ± 1.46
通窍化栓汤	4.35	$1.45 \pm 0.04^{2)}$	$113.68 \pm 0.84^{2)}$
	8.75	$1.35 \pm 0.07^{2)}$	$115.10 \pm 0.56^{2)}$
	17.50	$1.09 \pm 0.05^{2)}$	$121.34 \pm 0.86^{2)}$

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对缺血性再灌注后脑组织形态学观察

3.2.1 HE 染色光镜下观察 光镜下检查,模型组缺血侧大脑皮层和纹状体出现严重的神经细胞变性坏死,其中皮层锥体细胞表现为胞体固缩,核浓缩、深染,染色质浓缩、边聚,胞浆呈嗜酸性改变,细胞与周围组织形成显著的间隙,间质疏松,出现空泡性变性。而假手术组未见上述病理变化,神经细胞核仁清晰、核圆形,核膜完整。通窍化栓汤低、中剂量组可见轻微病理改变,而高剂量组则可显著改善上述病理变化。见图 1。



A. 模型组;B. 假手术组;C. 苗药通窍化栓汤 $4.35\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组;
D. 苗药通窍化栓汤 $8.75\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组;E. 苗药通窍化栓汤 $17.50\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组(图 2 同)

图 1 苗药通窍化栓汤对对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型脑组织的影响(HE, $\times 400$)

3.2.2 大脑组织超微结构变化 电镜下检查,模型组缺血侧大脑组织超微结构发生严重脱髓鞘病变,粗面内质网扩张,线粒体肿胀,并出现胶质细胞染色质聚集,细胞凋亡。而假手术组未见上述病理变化,未出现脱髓鞘病变,胶质细胞形态、结构较好。通窍化栓汤低、中剂量组亦有轻微超微机构改变,而高剂量组可显著改善上述变化。见图 2。

4 讨论

伴随着缺血性脑损伤的发病率越来越高,其机制研究逐渐成为目前研究的热点,其中,自由基学说在缺血一再灌注损伤的疾病中引起了广泛关注。有实验表明:在急性脑缺血再灌注时,自由基产生增多与游离脂肪酸作用能使脂质过氧化物生成增多^[2]。当缺血的脑组织恢复血供后其自由基引起的一系列

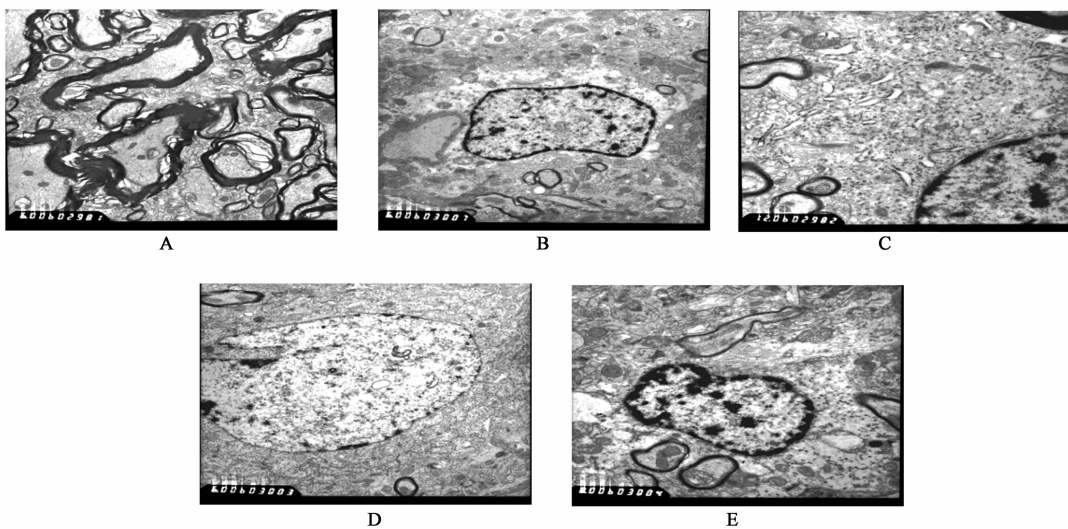


图2 苗药通窍化栓汤对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型脑组织的影响(透射电镜,醋酸铀-枸橼酸铅双重染色,×6 000)

连锁反应加重了缺血性再灌注损伤^[3],而抑制再灌注损伤成为目前治疗缺血性脑卒中的关键环节。

通窍化栓汤是源于贵州苗族地区的人民长期与疾病作斗争的过程中总结归纳出来的一经验方,在中风病的治疗中显示出明显优势。其在临床上运用疗效良好。在组方中,大血藤与络石藤合用,能起到有活血化痰,舒筋活络之效。其中大血藤属于为木通科植物大血藤的茎,其功用为祛风除湿、活血通络、清热解毒。现代研究表明:大血藤的正丁醇与水部位具有明显的抗氧化的作用^[4-5];络石藤属于夹竹桃科植物络石的干燥带叶藤茎,其功能为祛风通络、凉血活血消肿。其主要成分为黄酮类化合物具有较强的抗氧化作用^[6];其中还包括木犀草素、芹菜素-7 新橙皮糖等,具有很强的抗氧化活性^[7]。金毛狗脊为蚌壳蕨科植物金毛狗脊的干燥根茎,其主要成分包括:黄酮类、粉萜素等。与络石藤相似,主要成分黄酮类具有较强的抗氧化作用,而粉萜素对血小板凝聚具有较强的抑制作用,而土三七含有蒽醌衍生物有降脂,改善微循环等作用^[8]。水蛭所含水蛭素是迄今为止发现的最强凝血酶特异性抑制剂,具有很强的抗凝、抗血小板聚集作用^[9]。由以上药物的药理分析可以得出,通窍化栓汤能清除自由基,抗血小板聚集的作用。

本研究结果表明,通窍化栓汤尤其是高剂量具有较强的抗氧化作用,可降低脑组织 MDA 含量,增加 SOD 的活性;在光镜和电镜下,高剂量的通窍化栓汤与中、低剂量相比,能明显减轻神经细胞变性坏死,减轻粗面内质网扩张,改善线粒体肿胀,减少胶

质细胞染色质聚集,从而减少细胞凋亡,进而减轻脑缺血性脑损伤。由此可得,通窍化栓汤的脑保护作用是通过清除自由基来实现的,及早对急性脑梗死模型大鼠进行苗药高剂量灌胃治疗具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in the rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84.
- [2] 金惠铭. 病理生理学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996:145.
- [3] Mccord J M. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation[J]. *Fed Pros*, 1987, 46(7):2402.
- [4] 冯改利,宋小妹. DPPH 法筛选大血藤抗氧化活性有效部[J]. *陕西中医杂志*, 2011, 32(9):1233.
- [5] 陈彦,孙玉军,方伟,等. 威灵仙多糖的抗氧化活性研究[J]. *中华中医药杂志*, 2008, 23(3):266.
- [6] 徐悦,络石藤中的主要黄酮类化合物[J]. *国外医学:中医中药分册*, 2004, 26(1):50.
- [7] 韩英梅. 络石藤化学成分及抗癌活性[J]. *国外医药:植物药分册*; 2002, 17(2):57.
- [8] 胡昌江,马烈,何学梅,等. 九制大黄蒽醌衍生物对动物高血脂及血流变学的影响[J]. *中成药*, 2001, 23(1):31.
- [9] 吕莉,宋慧君,韩国柱,等. 重组水蛭素药理学研究进展[J]. *血栓与止血学*, 2003, 9(1):31.

[责任编辑 聂淑琴]