

中风防治灵丸对脑缺血大鼠神经功能及脑水肿的影响

赵彦青, 王伟民

(河南省中医院, 郑州 450002)

[摘要] **目的:**观察中风防治灵丸对脑缺血大鼠神经功能、脑含水量、脑梗死范围及脑组织病理形态学的影响。**方法:**60 只健康雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、缺血模型组、中风防治灵丸高、中、低剂量组 ($5.184, 2.592, 1.296 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)、步长脑心通对照组 ($0.691 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只, 从术前 7 d 开始灌胃, 第 8 天造模, 至处死前每天给药, 手术前后疗程 11 d, 分别于造模术后 6, 24, 72 h 对大鼠神经功能缺损情况评分; 于术后 72 h 进行氯化三苯四氮唑 (TTC) 染色测量脑梗死范围, 干湿重法测量脑含水量, 常规 HE 染色观察脑组织病理形态变化。**结果:**与模型组比较, 中风防治灵丸高、中剂量组动物的神经功能缺损程度显著改善, 并能显著降低大鼠局灶性脑缺血后的脑梗死范围, 均有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$); 中风防治灵丸高、中、低剂量均可显著降低大鼠局灶性脑缺血后的脑含水量, 减轻脑水肿, 与模型组相比均有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$); 中风防治灵丸高、中剂量能明显改善脑缺血造成的大鼠脑组织损伤, 减轻神经细胞的继发性损害。**结论:**中风防治灵丸对大鼠局灶性脑缺血损伤具有良好的保护作用。

[关键词] 中风防治灵丸; 脑缺血; 神经功能; 脑含水量; 脑梗死; 病理形态学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0254-04

[doi] 10.11653/syfj2013150254

The Effect of Zhongfeng Fangzhiling Pill on Neurological Function and Cerebral Edema of in Rat with Cerebral Ischemia

ZHAO Yan-qing, WANG Wei-min

(Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Zhongfeng Fangzhiling Pill (ZFP) on neurological function, brain water content, cerebral infarction and pathological morphology in rat with cerebral ischemia. **Method:** Sixty rats were randomly divided in sham group, model group, high dose group of ZFP ($5.184 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), middle dose group of ZFP ($2.592 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), low dose group of ZFP ($1.296 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and Naointong (NXT) group ($0.691 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). There were 10 rats in each group. Rats were taken medicine by gastric gavage in 7 days before operation. The cerebral ischemia model was established by blocking middle cerebral artery in rat with suture method at 8th day. The course of treatment was 11 days before and after operation. Score of nervous symptoms in rats was evaluated at 6, 24 and 72 h after operation by improved Zealanga 5 class. The cerebral infarction area was measured by 2, 3, 5-triphenyltetrazoliumchloride (TTC) staining at 72 h after operation. The brain water content was calculated through weighing anhydrous brain and hydrous brain at 72 h. The pathological change of brain tissue was analyzed by HE staining at 72 h. **Result:** Compared with model group, score of nervous symptoms was obviously improved and cerebral infarction area was reduced significantly in high dose and middle dose groups of ZFP ($P < 0.05, P < 0.01$). Brain water content was decreased obviously in all groups of ZFP ($P < 0.05, P < 0.01$). The degree of cerebral tissue injury in all groups of ZFP was less than that of in model group by observing brain tissue slice. **Conclusion:** ZFP could protect cerebral tissue in rat with localized cerebral ischemia.

[收稿日期] 20120916(004)

[基金项目] 郑州市 2010 科技计划项目(10PTGS 485-4)

[第一作者] 赵彦青, 博士, 副教授, 从事中西医结合防治中风病的研究, Tel:13526533695, E-mail: qiangwei2002b@163.com

[Key words] Zhongfeng Fangzhiling Pill; cerebral ischemia; neurological function; brain water content; cerebral infarction; pathological morphology

脑梗死是脑血管病的最常见类型,约占脑血管病的 70%,具有发病率高、死亡率高、致残率高的特点,存活的患者中,仅有 10% 左右能完全恢复正常功能,绝大多数患者遗留偏瘫、失语等后遗症,给家庭和社会带来极大地经济负担^[1];祖国医学认为,缺血性中风的主要病机是痰瘀阻络,脑脉不畅,气阴亏虚,肝风内动。中风防治灵丸是王松龄教授多年治疗缺血性中风的经验方,由太子参、制首乌、大黄、决明子、胆南星、水蛭、天麻、全蝎组成,本方据缺血性中风的病机立法组方,具有益气逐瘀化痰熄风之功效,临床研究证明能明显改善脑梗死患者神经功能^[2]。本课题观察了中风防治灵丸对缺血大鼠的脑保护作用。

1 材料

1.1 药材和试剂 中风防治灵丸(河南省中医院制剂室提供,批号 20020806),含生药 $1.63 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$,使用前研碎,用生理盐水混悬成所需浓度。步长脑心通胶囊(陕西步长制药有限公司,批号 100862),使用前用生理盐水混悬成所需浓度。

1.2 动物及分组 SPF 级 SD 大鼠,体重 250 ~ 300 g,雄性,动物许可证号 SCXK(京)2002-0003,北京维通利华实验动物技术有限公司提供。大鼠每笼饲养 5 只,饲养 3 d 后启用。动物实验室为 SPF 级。

2 方法

2.1 栓线制作 取直径 0.26 mm,长 5 cm 的尼龙鱼线,头端用极细磨砂纸磨圆钝,在距离头端 1.9 mm 处做一记号。乙醇消毒后,浸泡在含肝素($125 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)的液体中备用。

2.2 模型制作 采用改良线栓法^[3]。用 10% 水合氯醛($0.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)行腹腔麻醉后,常规消毒,取颈正中切口,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)与颈内动脉(ICA),结扎 CCA 近心端及 ECA,将尼龙栓线插入 CCA,经 ICA,稍遇阻力则止。栓线插入深度距离颈内、外动脉分叉处(1.9 ± 0.5) mm,假手术组插线深度大约 10 mm,收紧线结,缝合切口。

2.3 分组及给药 60 只大鼠随机分为 6 组,即假手术组、模型组、中风防治灵丸高、中、低剂量组($5.184, 2.592, 1.296 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),步长脑心通对照组($0.691 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组 10 只;从术前 7 d 开始灌胃给药,给药组给予相应药物,假手术组、模型组灌胃等

量生理盐水,第 8 天造模,至处死前每天给药 2 次(每日剂量分 2 次给予)。手术前后疗程共 11 d。

2.4 观测指标

2.4.1 大鼠神经功能缺损程度评分 按 Zea-Longa 法并加以改进^[4],在术后 6, 24, 72 h 采用单盲法按下列标准观测各组动物神经症状,采用 10 分制进行行为评分。评分标准:①无神经功能损伤症状,动物正常活动进食,评 0 分;②将动物尾巴提起后左前肢屈曲,1 分;③将动物放置平板上,向左侧转圈,2 分;④将动物放置平板上,用手轻推向左侧倾倒,3 分;⑤动物左侧偏瘫,不能自发行走意识朦胧或丧失,4 分。评分 > 2 分,则表明模型成功,分数越高,动物的行为障碍越严重。

2.4.2 大鼠脑梗死范围 脑缺血 72 h 后,动物麻醉,断头取脑,大脑称重后冠状切 4 刀,共切 5 个脑片,迅速将各脑片置于 TTC 染液中(每 100 mL 染液中含有 4% TTC 30 mL, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$ 2 mL), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光温孵 30 min。染色后,非缺血区为玫瑰红色,梗死区为白色,染色后置 10% 甲醛避光保存。将白色组织仔细挖出,用滤纸吸干,称重。以梗死组织占总脑重的百分比作为脑梗死范围。

2.4.3 脑含水量测定 快速断头取脑后,将大脑半球左右分开,以干湿重法测量脑含水量。取出脑后立即测湿重,置 $110 \text{ }^\circ\text{C}$ 电烤箱 24 h,再迅速测干重。

$$\text{脑含水量} = (\text{湿重} - \text{干重}) / \text{湿重} \times 100\%$$

2.4.4 形态学检查 快速取脑,10% 甲醛固定,取视交叉前后脑片,常规制片,HE 染色,观测组织形态变化。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠局灶性脑缺血后神经功能缺损评分的影响 假手术组未见行为异常改变,造模后各组实验动物偏瘫症状明显,均有程度不同的神经功能缺失,表现为左侧肢体废用或力弱,以前肢为重,行走呈顺钟向追尾状。72 h 后模型组的神经功能评分稍有降低,中风防治灵丸高、中、低剂量治疗组和步长脑心通组的神经功能评分明显低于模型组。中风防治灵丸低剂量组的神经功能评分也有所降低,但

与模型组比无显著性差异。见表1。

表1 中风防治灵丸对大鼠局灶性脑缺血后神经功能缺损评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) 分

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	神经功能缺损评分		
		6 h	24 h	72 h
假手术	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
模型	-	7.83 ± 0.76	5.75 ± 0.99	4.08 ± 1.27
中风防治灵	1.296	7.66 ± 1.22	5.19 ± 1.03	3.11 ± 1.19
	2.592	6.84 ± 1.56 ¹⁾	4.70 ± 1.07 ¹⁾	2.95 ± 0.84 ²⁾
	5.184	6.29 ± 1.73 ¹⁾	4.12 ± 1.28 ²⁾	2.51 ± 1.09 ²⁾
脑心通	0.691	6.34 ± 1.38 ¹⁾	4.41 ± 1.21 ¹⁾	2.63 ± 1.01 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表2~3同)。

3.2 对大鼠局灶性脑缺血后脑梗死范围的影响

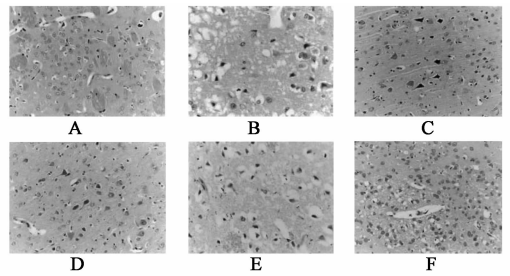
除假手术组未见脑组织异常改变外,模型组、给药组大鼠均有不同程度梗死灶,中风防治灵丸高、中剂量组、步长脑心通组的梗死灶范围均明显减少,与模型组比差异显著,中风防治灵丸低剂量组梗死灶范围也有所减少,但与模型组比无显著性差异。见表2。

表2 中风防治灵丸对大鼠局灶性脑缺血损伤梗死范围及脑含水量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	梗死范围/%	脑含水量/%
假手术	-	0 ± 0	76.96 ± 0.79 ¹⁾
模型	-	27.94 ± 3.51	83.07 ± 1.13
中风防治灵	1.296	25.47 ± 4.06	79.82 ± 1.84 ¹⁾
	2.592	22.76 ± 3.27 ¹⁾	78.49 ± 1.21 ²⁾
	5.184	20.37 ± 3.85 ¹⁾	77.34 ± 1.38 ²⁾
脑心通	0.691	23.12 ± 3.74 ²⁾	77.62 ± 1.26 ²⁾

3.3 对大鼠局灶性脑缺血后脑含水量的影响 中风防治灵丸高、中、低剂量组、步长脑心通组均能明显降低脑含水量,与模型组比较均有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$),见表2。

3.4 对大鼠局灶性脑缺血后病理形态的影响 模型组可见神经细胞坏死区范围较大,软化灶明显,坏死区内可见间质内大小不等的空泡,其间散在着神经细胞,部分神经细胞核固缩、深染、未见核仁,部分神经细胞核溶解、胞浆疏松,细胞界限不清,神经细胞水肿明显,坏死区周边可见嗜中性细胞;假手术组未见上述病理改变,形态结构正常;中风防治灵丸高、中剂量组可见坏死区明显减小,其周边神经细胞水肿明显减轻,胞浆、胞核尚能分清,部分动物神经细胞的形态结构接近正常,中风防治灵丸低剂量组的坏死区内神经细胞病变程度与模型组比较未见明显差异;步长脑心通组坏死区亦有减小,坏死区内可见神经细胞间质内有不规则的小空泡,其周边部分神经细胞、胞浆有混浊,胞核可见,部分细胞核仁清楚,部分动物神经细胞形态结构接近正常。见图1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 中风防治灵 5.184 $g \cdot kg^{-1}$ 组;
D. 中风防治灵 2.592 $g \cdot kg^{-1}$ 组; E. 中风防治灵 1.296 $g \cdot kg^{-1}$ 组;
F. 步长脑心通 0.691 $g \cdot kg^{-1}$ 组

图1 中风防治灵丸对脑缺血72 h

大鼠脑组织病理形态的影响(HE染色, ×66)

4 讨论

在缺血性卒中,血管闭塞阻断了通向特定脑区的血流,则产生与受累血管供血的脑区一致的局灶性症状和体征^[5]。现代研究证明,缺血性神经元损伤是一个随着时间进展的活跃生化过程,能量代谢障碍被认为是缺血后细胞损伤的始动环节^[6],而后钠离子内流、钙离子超载、毒性兴奋性氨基酸释放、自由基的损伤、细胞因子及血管活性物质等共同参与了脑缺血损伤的级联反应^[7-8],最终导致神经元细胞的损伤。临床研究证明:在血管闭塞6 h内,脑组织的缺血性改变是可逆的,但超过8 h就会出现脑肿胀,脑水肿一般在发病后3~5 d达到高峰^[9-10],此时的神经功能缺损症状达到最严重程度。在缺血病灶中心坏死区的周围存在着缺血半暗带,在短时间内恢复其血流,该区脑组织的损伤是可逆的。最近的研究表明^[11-13],缺血半暗带发展到最终梗死的时间窗可达到24 h,甚至48 h,因此发病后治疗时间越早,脑梗死的范围越小,临床症状改善越明显。因而,本课题选取缺血后不同时间点,观察神经功能缺损评分的变化;并观察脑水肿高峰期脑含水量、脑梗死范围及组织病理的变化,探讨中风防治灵丸对缺血性中风急性期的影响。

中风防治灵丸适用于中医辨证属风痰火亢、风火上扰、痰热腑实、气虚血瘀、阴虚风动5个证型的缺血性中风患者,临床应用效果良好^[14];方中太子参配制何首乌益气养血、滋阴潜阳;水蛭、全蝎破血逐瘀、熄风通脉,天麻、胆南星平肝熄风、化痰通络,大黄、决明子通腑降浊,清肝降火;诸药组合正切中风之风、火、痰、瘀、虚之病机。通过实验,观察到中风防治灵丸对局灶性脑缺血大鼠神经功能缺损评分、脑含水量、脑梗死范围及组织病理形态具有明显的改善作用,说明中风防治灵丸对缺血性中风急

补肾通络方对去卵巢骨质疏松模型大鼠骨组织 RANKL/OPG 基因表达的影响

闵文¹, 黄桂成^{1*}, 华永庆¹, 黄正泉²

(1. 南京中医药大学, 南京 210046; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

[摘要] 目的:研究补肾通络方对去卵巢骨质疏松模型大鼠细胞核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)/骨保护素(OPG)基因表达的影响,探讨补肾通络方治疗原发性骨质疏松症的分子机制。方法:通过卵巢去势的方法造成大鼠骨质疏松模型,造模后随机分为6组:假手术组、模型组、仙灵骨葆组($5.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、补肾基础组($5.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、通络组($0.9\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、补肾通络组($6.3\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。ig给药,1次/d,共10周。治疗10周后,在无茵条件下取出大鼠L₃椎体,剔除软组织及骨膜,用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测骨组织RANKL/OPG基因mRNA的表达。结果:与模型组相比,补肾通络组、补肾基础组、通络组RANKL mRNA表达明显下降,RANKL/OPG明显下降($P < 0.01$),3组间比较,补肾通络组的干预作用明显优于补肾基础组与通络组($P < 0.05$)。结论:补肾通络方治疗原发性骨质疏松症的作用机制可能与调控RANKL mRNA表达,改善RANKL/OPG,从而抑制破骨细胞活性,降低骨吸收有关。

[关键词] 补肾通络方;骨质疏松;细胞核因子 κ B受体活化因子配体;骨保护素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0258-04

[doi] 10.11653/syfy2013150258

[收稿日期] 20120914(019)

[基金项目] 江苏省中医药局课题(2009-2011, LZ09012)

[第一作者] 闵文,博士,副教授,从事中医骨伤科学、骨质疏松、足踝外科临床工作, Tel:13905168696, E-mail:wenge1977@yahoo.com.cn

[通讯作者] *黄桂成,教授、博士生导师,从事中医骨伤科学的临床应用及基础研究, Tel:025-85811003, E-mail:hgc@njutcm.edu.cn

性期具有显著地脑保护作用,其具体的作用机制尚需进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 郭笑冬. 缺血性卒中中西医治疗研究进展[J]. 医学理论与实践, 2012, 25(1): 31.

[2] 王松龄, 王爱凤, 张社峰. 中西医结合防治急性脑血管病[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 92.

[3] 曹勇军, 程彦斌. 线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的改进与探讨[J]. 中国应用生理学杂志, 2001, 17(2): 198.

[4] Zea-Longa Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84.

[5] David A Greenberg, Michael J Aminoff, Roger P Simon. 临床神经病学[M]. 5版. 主译: 王维治 王化冰. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 290.

[6] 刘明, 孙建宁, 董世芬, 等. 大鼠脑缺血不同时间脑能量代谢的变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5): 216.

[7] 樊凯芳, 唐迎雪, 李晓亮. 三化汤对脑缺血再灌注大鼠神经功能、脑含水量及脑组织病理改变的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 161.

[8] 朱慧渊. 川芎嗪和葛根素配伍对脑缺血损伤大鼠神经功能及脑组织形态学变化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 224.

[9] 涂雪松. 神经内科学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1999: 194.

[10] 中华医学会. 临床诊疗指南: 神经病学分册[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2008: 14.

[11] 张加英, 倪光夏. 缺血半暗带的研究概况[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(6): 1312.

[12] 许强, 张云亭. 超急性与急性期脑缺血半暗带演变的DWI研究[J]. 中国医学影像技术, 2007, 23(1): 52.

[13] 姚小梅, 佟志刚. 缺血性脑血管病的实验研究进展[J]. 天津医科大学学报, 2007, 13(1): 135.

[14] 王爱凤, 王伟民, 赵彦青. 中风防治灵颗粒治疗急性脑梗死的临床观察[J]. 中成药, 2008, 30(12): 1732.

[责任编辑 李玉洁]