

# 地黄饮子对脑缺血再灌注模型大鼠血清、脑组织 SOD, CAT 和 GSH-Px 及 MDA 的影响

宫健伟<sup>1,2</sup>, 叶蕾<sup>2</sup>, 张秀丽<sup>2</sup>, 樊巧玲<sup>1\*</sup>

(1. 南京中医药大学, 南京 210029; 2. 滨州医学院, 山东烟台 264003)

**[摘要]** 目的: 揭示地黄饮子抗脑缺血再灌注损伤的作用机制。方法: 将 SD 大鼠 60 只随机分为 6 组, 即假手术组、模型组、阳性药尼莫地平组 ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 和地黄饮子高、中、低 ( $32, 16, 8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 剂量组, 每组 10 只, 用药 7 d 后造模。通过双侧颈总动脉结扎法制作 SD 大鼠脑缺血再灌注模型, 观察地黄饮子对大鼠脑缺血再灌注 120 min 后血清、脑组织超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力及丙二醛 (MDA) 含量的影响。结果: 模型组大鼠血清、脑组织 SOD, CAT 和 GSH-Px 活性明显降低, MDA 含量明显增加, 地黄饮子能显著抑制模型大鼠血清、脑组织中 SOD, CAT 和 GSH-Px 活力的降低及 MDA 含量的升高。结论: 地黄饮子可通过减轻自由基损伤、提高脑组织抗氧化能力达到抗脑缺血再灌注损伤的作用。

**[关键词]** 地黄饮子; 脑缺血; 再灌注损伤; 抗氧化

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0247-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013140247

## Effects of Dihuang Yinzi on the SOD, CAT, GSH-Px Activities and MDA Contents in the Serum and Brain of Cerebral Ischemia-reperfusion Model Rats

GONG Jian-wei<sup>1,2</sup>, YE Lei<sup>2</sup>, ZHANG Xiu-li<sup>2</sup>, FAN Qiao-ling<sup>1\*</sup>

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

2. Binzhou Medical University, Yantai 264003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of Dihuang Yinzi in ameliorating the damage induced by cerebral ischemia-reperfusion. **Method:** Sixty SD rats were selected and randomly divided into six groups: sham group, model group, Dihuang Yinzi high, medium, low dose group ( $32, 16, 8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and nimodipine positive drug group ( $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), each group include 10 rats. The cerebral ischemia-reperfusion model was established after 7 days drug administration. The activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and the content of malonaldehyde (MDA) in the serum and brain of rats were observed at 120 min after the cerebral ischemia-reperfusion. **Result:** The activities of SOD, CAT and GSH-Px were lower and the contents of MDA were higher in serum and brain of model rats than normal rats. Dihuang Yinzi could increase the activities of SOD, CAT and GSH-Px and decrease the content of MDA. **Conclusion:** Dihuang Yinzi can ameliorate the oxidative damage induced by cerebral ischemia-reperfusion.

**[Key words]** Dihuang Yinzi; cerebral ischemia; reperfusion injury; antioxidant

**[收稿日期]** 20130306(007)

**[基金项目]** 山东省高等学校科技计划项目 (J12LM54)

**[第一作者]** 宫健伟, 2010 级在读博士研究生, 讲师, 从事方剂的配伍作用机制与临床应用研究工作, Tel: 0535-6913150, E-mail: jwgongfzh@163.com

**[通讯作者]** \* 樊巧玲, 教授, 博士, 从事方剂的配伍作用机制与临床应用的研究工作, Tel: 025-85811929, E-mail: njfangl@163.com

地黄饮子祖方为地黄饮,载于宋代《圣济总录》五十一卷肾脏门<sup>[1]</sup>,主治“肾虚暗瘵,语声不出,足废不用”,功能“滋肾阴、补肾阳、开窍化痰”。近年来运用本方治疗脑血管病取得了一定进展,用于治疗缺血性中风病的疗效已为临床和实验研究所证实<sup>[2-6]</sup>。本实验通过夹闭双侧颈总动脉法制作 SD 大鼠脑缺血再灌注模型,观察地黄饮子对模型大鼠血清、脑组织 SOD, CAT, GSH-Px 活力及 MDA 含量的影响,研究其抗脑缺血再灌注损伤的机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体重 250 ~ 300 g, 购自山东绿叶天然药物研究开发有限公司。动物许可证号 SCXK(鲁)20090009。

**1.2 药物与试剂** 3.5% 水合氯醛注射液(上海化学试剂公司, 批号 20120206); 超氧化物歧化酶(SOD) 试剂盒(批号 20120703)、丙二醛(MDA) 试剂盒(批号 20120706)、过氧化氢酶(CAT) 试剂盒(批号 20120707)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px) 试剂盒(批号 20120713)均由南京建成生物工程研究所提供;地黄饮子按原方比例(熟地黄、巴戟天、山茱萸、石斛、肉苁蓉、炮附子、五味子、肉桂、茯苓各 30 g, 麦冬、石菖蒲、远志各 15 g, 生姜 3 片、大枣 2 枚均购自滨州医学院附属医院)配伍,用 10 倍量和 8 倍量的水煎煮 2 次, 1 h/次, 合并水煎液, 用旋转蒸发仪浓缩, 制成含生药为 3.2, 1.6, 0.8 g·mL<sup>-1</sup> 的药液备用。尼莫地平[拜耳仙灵医药保健股份公司(德国), 批号 BXFS1K7]。

**1.3 仪器** MK3 型酶标仪[热电(上海)仪器有限公司], AR1140 型电子分析天平(Ohaus USA), T6 型新世纪紫外-可见分光光度仪(北京普析通用仪器有限责任公司), LG10-3A 型高速离心机(北京医用离心机厂), AT-858 型自动酶标分析仪(上海安泰分析仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 造模** 将大鼠用 3.5% 水合氯醛 10 mL·kg<sup>-1</sup> ip 麻醉后, 仰卧固定, 切开颈前皮肤, 沿气管两侧分离出左右颈总动脉(CCA), 用无创动脉夹阻断双侧颈总动脉 40 min, 造成大鼠急性脑缺血, 分离手术完毕后以及颈总动脉夹闭、松开过程中用浸有温热生理盐水的纱布覆盖切口表面, 保持组织湿润, 40 min 后松开动脉夹再灌注 120 min。假手术组操作与模型组相同, 但不进行夹闭双侧颈总动脉的操作。

**2.2 分组及给药** SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平阳性药组、地黄饮子高、中、低剂量组

共 6 组, 每组 10 只。假手术组及模型组生理盐水 10 mL·kg<sup>-1</sup>, 地黄饮子高、中、低剂量组(含生药 32, 16, 8 g·kg<sup>-1</sup>), ig, 1 次/d, 连用 7 d 后造模, 尼莫地平 1 mg·kg<sup>-1</sup> 术前 30 min, sc。

**2.3 指标测定** 双侧颈总动脉夹闭 40 min 后开放再灌注 120 min 后腹主动脉取血 5 mL, 立即断头取脑。血液置 4 °C 下 2 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 吸取上清液到离心管中, 4 °C 冷藏备测。取右侧半大脑自额极至枕叶正中切开, 靠枕叶侧在冰冻生理盐水中匀浆, 进行脑组织及血清 SOD(酶标法), MDA(硫代巴比妥酸法), CAT(分光光度法), GSH-Px(比色法)含量的测定。

血清中 GSH-Px 酶活力计算: 每 0.1 mL 血清在 37 °C 反应 5 分钟, 扣除非酶促反应作用, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol·L<sup>-1</sup> 为 1 个酶活力单位; 组织中 GSH-Px 活力计算: 规定为每毫克蛋白质, 每 min 扣除非酶反应的作用, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol·L<sup>-1</sup> 为 1 个酶活力单位。按试剂盒操作步骤的要求测定。

**2.4 统计学方法** 采用 SPSS 17 统计软件, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用多组样本比较的 *t* 检验, *P* < 0.05 为有统计意义。

## 3 结果

**3.1 对血清 SOD, CAT, GSH-Px 活力及 MDA 含量的影响** 模型组与假手术组比, 血清 SOD, CAT, GSH-Px 明显降低, MDA 明显增高, *P* < 0.01。各用药组与模型组比较, 尼莫地平和地黄饮子高、中、低剂量组均能明显升高 SOD (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01), 地黄饮子高、中剂量组能明显降低 MDA (*P* < 0.01), 地黄饮子高、中剂量组能明显升高 CAT (*P* < 0.01), 各用药组对 GSH-Px 活性无明显影响。地黄饮子高、中剂量组升高 SOD, CAT 活性、降低 MDA 含量作用强于尼莫地平组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。见表 1。

**3.2 对脑组织 SOD, CAT, GSH-Px 活力及 MDA 含量的影响** 模型组与假手术组比, 脑组织 SOD, CAT, GSH-Px 活性明显降低, MDA 含量明显增高 (*P* < 0.05)。各用药组与模型组比较, 尼莫地平和地黄饮子高、中剂量组均能明显升高 SOD 活性 (*P* < 0.01), 尼莫地平和地黄饮子高、中、低剂量组能明显降低 MDA 含量 (*P* < 0.01), 尼莫地平和地黄饮子高、中、低剂量组能明显升高 CAT 活性 (*P* < 0.01), 地黄饮子高剂量组能明显升高 GSH-Px 活性 (*P* < 0.01)。地黄饮子高剂量组升高 SOD 活性作用强于尼莫地平组 (*P* < 0.01)。见表 2。

表 1 地黄饮子对血清 SOD,CAT,GSH-Px 活力及 MDA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	MDA/nmol·mL <sup>-1</sup>	CAT/U·mL <sup>-1</sup>	GSH-Px/活力单位
假手术	-	51.24 ± 3.91 <sup>2)</sup>	38.27 ± 1.76 <sup>2)</sup>	26.25 ± 1.74 <sup>2)</sup>	2 965.21 ± 53.81 <sup>2)</sup>
模型	-	38.07 ± 2.58	65.56 ± 3.78	15.25 ± 0.93	2 673.27 ± 74.87
尼莫地平	1 × 10 <sup>-3</sup>	44.41 ± 3.38 <sup>2)</sup>	61.83 ± 3.59	17.02 ± 0.67	2 678.50 ± 46.07
地黄饮子	8	42.76 ± 1.29 <sup>1)</sup>	64.08 ± 3.34	16.48 ± 2.82	2 627.48 ± 21.56
	16	47.04 ± 1.87 <sup>2)</sup>	54.00 ± 3.07 <sup>2,3)</sup>	23.09 ± 3.34 <sup>2,4)</sup>	2 668.22 ± 95.51
	32	49.22 ± 2.56 <sup>2,3)</sup>	43.89 ± 4.82 <sup>2,4)</sup>	24.99 ± 2.24 <sup>2,4)</sup>	2 711.66 ± 45.41

注:与模型组比较<sup>1)</sup>P < 0.05,<sup>2)</sup>P < 0.01;与尼莫地平组比较<sup>3)</sup>P < 0.05,<sup>4)</sup>P < 0.01(表 2 同)。

表 2 地黄饮子对脑组织 SOD,CAT,GSH-Px 活力及 MDA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	SOD/U·mg <sup>-1</sup>	MDA/nmol·mg <sup>-1</sup>	CAT/U·mg <sup>-1</sup>	GSH-Px/活力单位
假手术	-	28.37 ± 2.59 <sup>2)</sup>	5.54 ± 1.19 <sup>2)</sup>	26.61 ± 1.33 <sup>2)</sup>	5.76 ± 1.12 <sup>2)</sup>
模型	-	16.88 ± 1.15	11.18 ± 1.39	9.55 ± 1.56	3.41 ± 0.59
尼莫地平	1 × 10 <sup>-3</sup>	20.35 ± 1.30 <sup>2)</sup>	5.94 ± 1.70 <sup>2)</sup>	17.80 ± 1.36 <sup>2)</sup>	4.09 ± 0.52
地黄饮子	8	18.54 ± 1.60	6.21 ± 2.10 <sup>2)</sup>	18.10 ± 1.20 <sup>2)</sup>	4.11 ± 0.40
	16	20.05 ± 1.59 <sup>2)</sup>	5.35 ± 1.39 <sup>2)</sup>	20.58 ± 4.48 <sup>2)</sup>	4.13 ± 0.25
	32	23.38 ± 1.55 <sup>2,4)</sup>	5.60 ± 0.97 <sup>2)</sup>	20.65 ± 2.78 <sup>2)</sup>	4.60 ± 0.50 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

肾为人体之根本,主骨生髓,脑为髓海,为精、气、神首会之所,统帅着五脏六腑,协调各自的生理功能。《灵枢·经脉》云:“人始生,先成精。精成而脑髓生”,肾精充足,髓海得养,则思维敏捷,精力充沛;反之,肾精不足,髓海空虚,脑失所养,则见“闹转耳鸣,目无所见,懈怠安卧”(《灵枢·海论》)。因此脑脉之荣润与肾之精气密切相关。中风病多发于 50 岁以上老年人,此时已元气虚弱,髓海空虚,阴阳不调,正如《医经溯洄集·中风辨》云:“中风者,非外来风邪,乃本气自病也。凡人年逾四旬,气衰之际,多有此疾。”资料证实,50 岁以后中风发病者可占总数的 79.5% ~ 86.1%<sup>[7]</sup>。

刘小雨等<sup>[8]</sup>认为:肾为精、气、神之本,亦主髓海,故与病位在脑之缺血性中风关系密切;其病机为肾元不足,阴阳失调,虚、风、热、痰、瘀、毒互结,治疗当注重补肾,以复脑之神机。彭明付等<sup>[9]</sup>认为:肾气亏虚与缺血性中风关系密切,肾气亏虚是缺血性中风发病的基础,同时又是缺血性中风的病理转归。因此,应当明确,肾元亏损是引发中风的一个重要因素。而此点亦正是临床将地黄饮子用于治疗中风病的重要理论依据和辨证准绳<sup>[10]</sup>。

氧化应激是缺血性脑中中风极其重要的病理机制之一,活性氧所引发的连锁反应是脑组织缺血再灌注损伤的核心病理环节,过量的氧自由基通过诸多

环节导致脑组织神经元坏死或凋亡<sup>[11]</sup>。MDA 是脂质过氧化反应的终产物之一,其含量可以反映机体脂质过氧化的速度和血管损伤程度以及氧自由基存在的水平。SOD,CAT,GSH-Px 作为自由基清除剂,在脑缺血、缺氧时的抗氧化作用非常显著,亦日益受到人们的重视。

本研究发现,大鼠脑缺血再灌注损伤后脑组织中 SOD,CAT 和 GSH-Px 活性明显降低,MDA 含量明显增加,地黄饮子能显著抑制模型大鼠血清、脑组织中 SOD,CAT 和 GSH-Px 的降低及 MDA 的升高,表明脑缺血再灌注后,脑组织内自由基产生增加,发生了明显的脂质过氧化反应,地黄饮子可以减少自由基的产生,减轻脂质过氧化反应,表现出良好的抗氧化损伤作用。

#### [参考文献]

[1] 何德山.地黄饮子探源[J].江西中医药,2003,34(4):31.  
 [2] 张山.地黄饮子加减治疗中风后失语 31 例[J].陕西中医,2011,32(6):726.  
 [3] 潘伟.地黄饮子治疗中风后遗症 50 例疗效观察[J].中国中医药现代远程教育,2010(20):8.  
 [4] 何华,王桂香,钟士江,等.地黄饮子对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].山东医药,2006,46(4):28.

# 生川乌配不同比例生半夏对乳鼠心肌细胞的毒性作用

许柳<sup>1</sup>, 佟继铭<sup>2</sup>, 李平<sup>2</sup>, 刘玉玲<sup>2</sup>, 张树峰<sup>2\*</sup>

(1. 河北联合大学中医学院, 河北 唐山 063000; 2. 承德医学院, 河北 承德 067000)

**[摘要]** 目的:以半数抑制浓度及细胞搏动频率为指标,评价生川乌与生半夏合用对原代乳鼠心肌细胞的毒性影响及与生半夏比例的关系。方法:分离出生 3 d 内的 SD 乳鼠心肌细胞进行原代培养。生川乌组(I 组),生川乌配生半夏 1:0.25(II 组),1:0.5(III 组),1:1(IV 组)分别以生川乌终质量浓度 0,0.016,0.078,0.235,0.392,0.548,0.705,0.861,1.018 g·mL<sup>-1</sup>(高效液相色谱法测得乌头碱含量分别为 0,1.5,15,25,35,45,55,65 mg·L<sup>-1</sup>)染毒心肌细胞,分别培养 1,2,4,12 h,观察各时间点细胞搏动频率,以 MTT 法检测培养 12 h 时细胞存活率,应用概率单位法计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。结果:①染毒 12 h,生川乌组抑制率(CI)显著高于其他配伍组(P<0.01),且随着生半夏比例的提高,抑制率降低。②I,II,III,IV 组的 IC<sub>50</sub> 分别为 0.446,0.460,0.530,0.575 g·mL<sup>-1</sup>。③在生川乌终质量浓度 0.016~0.078 g·mL<sup>-1</sup>内,1~2 h 细胞搏动频率增高,4~12 h 搏动频率降低。在 0.235~0.861 g·mL<sup>-1</sup>内,1 h 时细胞搏动频率降低,2 h 时搏动频率高于 1 h,但低于正常水平,4~12 h 频率低于 1 h。给药 1.018 g·mL<sup>-1</sup>,细胞立即停搏。结论:生半夏配伍生川乌降低了生川乌的毒性,且有明显的剂量依赖关系。

**[关键词]** 心肌细胞;生川乌;生半夏;心肌毒性;半数抑制浓度

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0250-06

**[doi]** 10.11653/syjf2013140250

## Toxicity of Raw Rhizoma Pinellia in Combination with Raw Radix Aconiti with Different Ratio on Lactation Rat Myocardial Cell

XU Liu<sup>1</sup>, TONG Ji-ming<sup>2</sup>, LI Ping<sup>2</sup>, LIU Yu-ling<sup>2</sup>, ZHANG Shu-feng<sup>2\*</sup>

(1. College of Chinese Medicine of Hebei Unite University, Tangshan 063000, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica of Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the toxicity effect of raw Radix Aconiti and raw Rhizoma Pinelliae on lactation rat's myocardial cells and the relationship between the toxicity effect and different proportion. **Method:** The SD lactation rat's myocardial cells were separated and cultivated when born in 3 days. The four groups were raw Radix Aconite, Radix Aconiti and raw Rhizoma Pinelliae 1:0.25, 1:0.5, 1:1 (I, II, III, IV) were given the final concentration of the Radix Aconiti of 0, 0.016, 0.078, 0.235, 0.392, 0.548, 0.705, 0.861, 1.018

**[收稿日期]** 20130125(007)

**[基金项目]** 河北省教育厅重点项目(ZD2010132)

**[第一作者]** 许柳,在读硕士研究生,从事中药毒理学研究,Tel:0314-2290076,E-mail:xuliuweixiao@163.com

**[通讯作者]** \*张树峰,教授,博士研究生导师。从事中药毒理研究,Tel:0314-2291111,E-mail:zsf@cdmc.edu.cn

[5] 谢鸣,卞一明,白晶.地黄饮子对果蝇寿命的影响[J].中国实验方剂学杂志,1996,2(2):20.

[6] 谢鸣,袁学勤,张家俊,等.地黄饮子对老龄大鼠的血、脑组织过氧化脂质及相关酶的影响[J].中国实验方剂学杂志,2001,7(6):21.

[7] 陈帮森.脑血管疾病[M].北京:人民卫生出版社,1991:112.

[8] 刘小雨,杨孝芳,李国菁,等.肾与缺血性中风关系探析[J].中国中医急症,2005,14(2):165.

[9] 彭明付,郑湘瑞.肾气亏虚是缺血性中风的病理基础[J].中医研究,2003,16(9):9.

[10] 潘鹏.地黄饮子治疗脑血管病的临床与实验研究述要[J].中医药学刊,2002,20(5):659.

[11] 牛文民,李忠仁.缺血性脑血管病自由基损伤病理学及抗氧化治疗进展[J].上海针灸杂志,2005,24(1):43.

[责任编辑 李玉洁]