

· 药理 ·

益气解毒方对大鼠局灶性脑缺血氧化应激的影响

朱丽^{1,2}, 高健^{2,3}, 吴传鸿², 刘安², 苏培瑜², 李德凤², 张宁², 杨阳⁴, 李韶菁^{2*}

(1. 江西中医学院, 南昌 330006; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 河北大学药学院, 保定 071002; 4. 中国中医科学院, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究中药益气解毒方对大鼠局灶性脑缺血后氧化应激损伤的影响。方法: 取健康雄性SD大鼠60只, 随机分为6组: 假手术组、模型组、阳性药银杏叶提取物组(4 mg·kg⁻¹)、益气解毒高、中、低剂量组(25, 5, 1 mg·kg⁻¹)。给药组于手术麻醉前10 min 灌胃给药, 用线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型, 12 h后取血清和缺血脑组织制备组织匀浆液, 用酶标仪定量检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、单胺氧化酶(MAO)、髓过氧化物酶(MPO)。结果: 与假手术组比较, 模型组脑组织SOD和GSH-Px活性明显降低($P < 0.01$), MDA含量和MAO、MPO活性明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较, 益气解毒方高、中、低剂量组、阳性药组SOD和GSH-Px显著性升高($P < 0.01$), MAO、MDA和MPO显著性降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 益气解毒方对大鼠局灶性脑缺血有保护作用, 其作用机制可能与抗氧化应激作用有关。

[关键词] 益气解毒方; 局灶性脑缺血; 氧化应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0171-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130124.0928.005.html>

[网络出版时间] 2013-01-24 9:28

Effect of Yiqi Jiedu Formula on Oxidative Stress in the Focal Cerebral Ischemia Rat

ZHU Li^{1,2}, GAO Jian^{2,3}, WU Chuan-hong², LIU An², SU Pei-yu²,
LI De-feng², ZHANG Ning², YANG Yang⁴, LI Shao-jing^{2*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. College of Pharmaceutical Science, Hebei University, Baoding 071002, China;

4. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study effect of Yiqi Jiedu formula on oxidative stress in rat focal cerebral ischemia injury model. **Method:** SD rats were randomly divided into Yiqi Jiedu groups (25, 5, 1 mg·kg⁻¹), the model group, sham operation group, and positive control group (4 mg·kg⁻¹). Rats were given drugs before anesthesia and establish middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. The microplate reader was used to detect superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), monoamine oxidase (MAO) and myeloperoxidase (MPO) in the serum and cerebral homogenate. **Result:** Compared with the sham group, in model group SOD and GSH-Px decreased ($P < 0.01$), the content of MDA and the activity of MAO and MPO increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, SOD and GSH-Px of Yiqi Jiedu groups

[收稿日期] 20121019(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30901976, 81274133); 国家十二五“重大新药创制”科技重大专项项目(2012ZX09103-201-055)

[第一作者] 朱丽, 在读硕士, 从事中药分子药理学研究, E-mail: zhuli881104@126.com

[通讯作者] * 李韶菁, 博士, 副研究员, 从事中药组效关系和分子药理学研究, Tel: 010-84035184, E-mail: shaojingli2004@126.com

and positive group were significantly higher ($P < 0.01$), however MAO, MDA and MPO were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Yiqi Jiedu formula can exert protection antion in focal cerebral ischemia rats, the mechanism may be related to raising efficiency and reducing toxicity.

[**Key words**] Yiqi Jiedu formula; focal cerebral ischemia; oxidative stress

缺血性脑卒中属于中医缺血性“中风”的范畴^[1],它是临床常见病、多发病^[2]。中风引起脑损伤的机制包括兴奋性神经毒性,酸中毒,离子稳态失衡,氧化和硝化应激,炎症级联反应和细胞凋亡等^[3]。其中氧化应激已经成为缺血性心脑血管疾病研究的焦点^[4]。

益气解毒复方(人参、黄连、栀子)是王永炎院士根据中医脑病的证候特点,针对“毒损脑络”的新的病机特点^[5],采用扶正与解毒并举的临床经验方,临床疗效显著。本研究是在原方的配伍比例基础上,将其主要有效组分配伍得到的创新复方中药,前期研究证明其具有明显的抗脑缺血保护作用。本文旨在通过检测脑缺血后血清和脑匀浆液中与氧化应激有关的酶活性和相关氧化产物含量等指标,探讨益气解毒方对脑缺血后的氧化应激损伤保护作用及其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠,体重 250 ~ 270 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2006-0009。

1.2 药物与试剂 以原方中 3 味药主要有效成分(人参总皂苷、黄连素、栀子苷)进行本次试验。其中人参总皂苷(南京泽朗医药科技有限公司,批号 20110510, $R_g + R_e + R_d > 40.55\% \pm 2.10\%$);黄连素(咸阳航空一六八生物工程有限公司,批号 20110509,纯度 95.18%);栀子苷(宝鸡市方晟生物开发有限公司,批号 20110320,纯度 99.68%)。药物配制方法:将三者按照一定比例混合,生理盐水溶解后灌胃给药;阳性对照药:银杏叶提取物片(EGb761,德国威玛舒培博士药厂,批号 3061002);BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo 公司);超氧化物歧化酶(SOD)、脂质过氧化代谢产物丙二醛(MDA)、单胺氧化酶(MAO)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、髓过氧化物酶(MPO)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所(批号 20100505)。

1.3 仪器 高速低温冷冻离心机(J2-21,美国 Beckman Coulter 公司),酶标仪(Spectra Max M5,美国 Molecular Devices 公司);75 mm 组织匀浆器(涿州市琦瑞玻璃制品厂)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 将动物采用随机分组的方法分为 6 组:假手术组、模型组、阳性药银杏叶提取物片组^[6]($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),益气解毒方高、中、低剂量组($25, 5, 1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),大鼠灌胃容积 $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.2 脑缺血模型的制备 10% 水合氯醛溶液($400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ip 麻醉大鼠。麻醉后将大鼠仰位固定,参照 Zea-longa 等^[7]建立的大鼠大脑中动脉内栓线阻断方法,作适当改进。假手术组只进行术前麻醉和血管分离术,不结扎及导入线栓。给药组于手术麻醉前 10 min 灌胃给药。模型组与给药组制作大鼠局灶性缺血模型^[8],操作过程如下:作颈部正中切口,分离左侧颈总动脉(CCA),小心剥离附着于 CCA 上的迷走神经和肌肉,沿着 CCA 向头部方向分离出颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),在 ECA 和 ICA 分叉处 0.5 cm CCA 处,从切口处插入栓子线(直径 0.265 mm,距头端 2 cm 处作标记),插入深度约 2 cm(所标记基本位于 ECA 和 ICA 分叉处),此时感觉有阻力感时停止进线,这样阻塞大脑中动脉导致脑缺血,结扎固定栓子线,剪去剩余部分,缝合皮肤。手术线将鱼线结扎左脑颈总动脉,线栓法阻断左脑中动脉。

2.3 样品制备 SD 大鼠于 MCAO 手术 12 h 后,取全脑,在 4 °C 预冷生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸小心拭干,称重,将缺血侧脑组织放入玻璃匀浆管中加入预冷的生理盐水(生理盐水的总体积应为组织质量的 9 倍),充分研碎,制成 10% 脑组织匀浆液。整个过程在冰浴环境下进行。将匀浆液在 4 °C 下以 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液;腹主动脉采血后, $3\,500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,制备血清。

2.4 指标检测

2.4.1 脑匀浆液蛋白含量测定 采用 BCA 法蛋白定量试剂盒定量血清和脑匀浆液。样品测定波长 562 nm 测吸光度(A)。

2.4.2 各种氧化相关指标的测定 脑匀浆液中 GSH-Px, MAO, SOD, MPO^[9] 活性及 MDA 含量的测定按照南京建成试剂盒说明书进行。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计分析软件处理。各项指标的实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间计

量资料采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 蛋白含量测定中标准曲线绘制 见图 1。

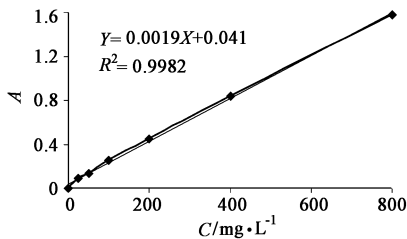


图 1 BSA 标准曲线

3.2 大鼠脑组织中氧化应激指标的含量变化 与

表 1 益气解毒方对脑缺血大鼠脑组织氧化应激指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	MAO/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	MPO/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$
假手术	-	91.59 ± 14.92	1.51 ± 0.10	125.58 ± 10.70	0.17 ± 0.02	1.59 ± 0.09
模型	-	36.84 ± 5.22 ²⁾	0.31 ± 0.11 ²⁾	191.96 ± 19.55 ²⁾	0.32 ± 0.10 ¹⁾	3.11 ± 0.56 ²⁾
银杏叶提取物	4	93.33 ± 2.99 ⁴⁾	0.92 ± 0.14 ⁴⁾	113.43 ± 4.99 ⁴⁾	0.20 ± 0.04 ³⁾	1.62 ± 0.43 ⁴⁾
益气解毒方	1	79.02 ± 19.62 ⁴⁾	0.74 ± 0.07 ⁴⁾	168.24 ± 24.46	0.20 ± 0.05	0.87 ± 0.21 ⁴⁾
	5	95.45 ± 15.49 ⁴⁾	0.82 ± 0.03 ⁴⁾	147.95 ± 11.09 ⁴⁾	0.20 ± 0.03 ³⁾	0.81 ± 0.12 ⁴⁾
	25	103.19 ± 20.2 ⁴⁾	0.87 ± 0.01 ⁴⁾	152.01 ± 13.81 ³⁾	0.18 ± 0.03 ³⁾	0.84 ± 0.32 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 大鼠血清中氧化应激指标的变化 血清指标检测中只列出 GSH-Px 和 MPO,是由于其他氧化应激指标没有显著性变化。与假手术组相比,模型组 GSH-Px 活力明显下降($P < 0.05$),而阳性对照药和益气解毒各剂量组可显著上调脑缺血后血清中 GSH-Px 的表达($P < 0.01$)。与模型组相比,益气解毒组 MPO 活性明显降低($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 益气解毒方对脑缺血大鼠血清氧化应激指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	GSH-Px	MPO
假手术	-	324.55 ± 91.29	0.15 ± 0.15
模型	-	74.37 ± 6.04 ¹⁾	0.39 ± 0.10 ¹⁾
银杏叶提取物	4	367.14 ± 15.46 ⁴⁾	0.24 ± 0.14
益气解毒方	1	417.63 ± 5.98 ⁴⁾	0.23 ± 0.10 ³⁾
	5	428.63 ± 18.36 ⁴⁾	0.28 ± 0.17
	25	372.88 ± 33.43 ⁴⁾	0.17 ± 0.12 ³⁾

3 讨论

氧化应激是自由基在体内产生的一种负性作用,并被认为是导致衰老和疾病的一个重要因素。由于大脑细胞具有高耗氧量,不饱和脂肪酸含量丰富,抗氧化物质储存水平较低等特点,大脑极易受到氧化应激性损伤^[10]。脑缺血后,大量的自由基生

假手术组相比,模型组抗氧化酶 GSH-Px, SOD 活力显著下降($P < 0.01$),而阳性对照药和益气解毒各剂量组可显著上调脑缺血后脑组织中 GSH-Px, SOD 的表达($P < 0.01$),提示药物对缺血性损伤中的自由基损伤具有很好的拮抗作用。与假手术组相比,模型组 MAO, MPO 酶活力明显增高($P < 0.01$),而阳性对照药和益气解毒高、中剂量组可明显降低其活性,提示其具有抗氧化作用。与假手术组相比,模型组 MDA 含量显著上升($P < 0.05$),而阳性对照药和益气解毒可明显减少脑组织中 MDA 含量($P < 0.05$),提示药物对脂质过氧化产生的损伤可能有保护作用。见表 1。

成,使脑内脂质过氧化作用加强^[11],导致细胞膜及血脑屏障损害。因此自由基的毒性作用已成为脑缺血损害的关键性病理环节之一^[12]。研究表明,益气解毒方通过提高抗氧化酶 GSH-Px 和 SOD 的活性,降低促氧化酶 MAO, MPO 和过氧化中间产物 MDA 含量,其抗氧化损伤的机制和益气、解毒治法密切相关。

益气解毒方(人参、黄连、栀子)是根据中医脑病的症候特点,不同于传统中风治疗“活血化瘀”,而针对“毒损脑络”的关键病机,应用益气加解毒的全新治法,采用辨证施治,扶正与解毒并举治疗脑病的临床经验方。此方中人参具有大补元气、保护神经元损伤的作用,应为君药;黄连、栀子均有解毒作用,黄连素和栀子苷文献报道均具有抗氧化作用,此两味药为佐药。益气解毒方对氧化应激损伤保护作用的阐明,将可能为开发新型有效组分配伍复方抗脑缺血中药提供新的实验依据。

[参考文献]

- [1] 范学聪,董少龙. 缺血性脑卒中的中医药治疗研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(2): 217.
- [2] 郭建生,彭康. 乌洛丹对大鼠局灶性脑缺血脑组织氧自由基的影响[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(9): 1938.

痛泻要方对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜细胞间黏附分子-1 mRNA 和蛋白表达的影响

朱向东¹, 梅晓云^{1*}, 吴红彦², 潘政³, 曹燕飞²

(1. 南京中医药大学基础医学院, 南京 210046; 2. 甘肃中医学院基础课部, 兰州 730000; 3. 兰州大学第二医院危重病科, 兰州 730000)

[摘要] 目的: 观察痛泻要方治疗溃疡性结肠炎(UC)的疗效, 并探讨其免疫作用机制。方法: 60 只 SPF 级 Wistar 大鼠随机分为空白组、模型组、痛泻要方低、中、高剂量组、柳氮磺胺嘧啶(SASP)组, 除空白组外, 其余各组大鼠均以 2, 4, 6—三硝基苯磺酸(TNBS)/乙醇一次性灌肠法制备 UC 大鼠模型。模型成功后, 痛泻要方低、中、高剂量组(按生药量分别为 11, 22, 44 g·kg⁻¹)ig, (按照临床成人用量的 5, 10, 20 倍折算), SASP 组按 0.3 g·kg⁻¹ 剂量灌胃治疗, 灌胃体积均为 10 mL·kg⁻¹, 空白组、模型组灌服等体积生理盐水, 治疗 21 d。肉眼观察结肠大体形态损伤并进行评分, 采用 RT-PCR 和免疫组化法检测细胞间黏附分子-1(ICAM-1)基因和蛋白表达水平。结果: 肉眼观察模型组大鼠结肠组织黏膜层可见炎症和溃疡形成, 模型组炎症评分(2.50 ± 1.08)分与空白组(0.08 ± 0.28)分比较, P < 0.05, 差异有统计学意义, 证实模型成功。与空白组 ICAM-1 基因相对表达和 ICAM-1 蛋白的表达量(0.17 ± 0.02), (0.32 ± 0.012 3)吸光度(A)比较, 模型组(0.27 ± 0.05), (0.44 ± 0.016 6)A 大鼠结肠组织 ICAM-1 基因相对表达和 ICAM-1 蛋白的表达量上调, 差异有统计学意义(P < 0.01); 与模型组比较, ICAM-1 基因相对表达和 ICAM-1 蛋白的表达量(A)痛泻要方高剂量组(0.19 ± 0.03), (0.32 ± 0.005 9), 中剂量组(0.20 ± 0.04), (0.34 ± 0.01)表达量下调, 差异有统计学意义(P < 0.05, P < 0.01)。结论: 痛泻要方可能下调 ICAM-1mRNA 和 ICAM-1 蛋白的表达量, 抑制炎症细胞的浸润, 阻止并减轻结肠组织损伤, 起到治疗 UC 的作用。

[关键词] 痛泻要方; 溃疡性结肠炎; 蛋白; 基因; 表达

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0174-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130124.0926.001.html>

[网络出版时间] 2013-01-24 9:26

[收稿日期] 20120920(029)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81060283)

[第一作者] 朱向东, 博士研究生, 副教授, 从事中药防治溃疡性结肠炎的研究, Tel: 15339312501, E-mail: zhuxiangdong33@163.com

[通讯作者] * 梅晓云, 硕士, 教授, 从事中医治则治法研究, Tel: 13951691010, E-mail: xiaoyun663399@163.com

- [3] 王竞, 杜俊蓉. 缺血性脑损伤机制的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35(4): 302.
- [4] Wong C H, Crack P J. Modulation of neuro-inflammation and vascular response by oxidative stress following cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Current Medicinal Chemistry, 2008, 15(1): 1.
- [5] 邹忆怀. “毒损脑络”学说的症状学研究思考探究[J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(7): 448.
- [6] 冯飞玲, 卢慧玲, 吴秋慧, 等. EGb761 对脑缺血大鼠脑组织的保护作用及机制[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(6): 1217.
- [7] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84.
- [8] Chen S T, Hsu C Y, Hogan E L, et al. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction[J]. Stroke, 1986, 17(4): 738.
- [9] 张现涛, 梁军, 刘红霞, 等. 银杏叶内酯 N 对实验性大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 141.
- [10] Schreibelt G, van Horssen J, van Rossum S, et al. Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology[J]. Brain Res Rev, 2007, 56(2): 322.
- [11] 巩红岩, 秦元旭, 王更富, 等. 葛根素对大鼠体外循环后心肌缺血再灌注损伤的保护作用及抗氧化应激机制的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 165.
- [12] Lewen A, Matz P, Chan P H. Free radical pathways in CNS injury[J]. Neurotrauma, 2000, 17(10): 871.

[责任编辑 聂淑琴]