

吴茱萸次碱对脑缺血再灌注小鼠的保护作用及作用机制研究

严春临, 张季, 高艳青, 吴雪智, 王树, 薛贵平
(河北北方学院药理学系, 河北 张家口 075000)

[摘要] **目的:**观察吴茱萸次碱(Rut)对脑缺血再灌注(I/R)损伤小鼠的学习记忆能力的保护作用及作用机制。**方法:**采用改进的 Himori 法暂时性阻断两侧颈总动脉制备小鼠脑 I/R 损伤模型,采用跳台实验,观察腹腔注射吴茱萸次碱(84, 252, 504 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)对脑 I/R 损伤小鼠的学习记忆能力的保护作用,并于缺血再灌注后 48 h 测定小鼠脑组织中一氧化氮(NO)的含量、一氧化氮合酶(NOS)和诱导性一氧化氮合酶(iNOS)的活性。**结果:**脑缺血再灌注后,小鼠学习记忆能力降低,脑组织中 NO 的含量, NOS 和 iNOS 的活力升高。腹腔注射吴茱萸次碱可不同程度的改善脑 I/R 损伤造成的学习记忆能力障碍;吴茱萸次碱可降低 NO 的含量, NOS 和 iNOS 的活力;与模型组比较,吴茱萸次碱(504 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)可显著改善小鼠的学习记忆功能障碍,降低 NO 的含量, NOS 和 iNOS 的活力($P < 0.01$)。**结论:**吴茱萸次碱对脑缺血再灌注(I/R)损伤小鼠的学习记忆能力具有保护作用,其机制可能与降低 NO 的含量,影响 NOS 和 iNOS 的活力有关。

[关键词] 吴茱萸次碱; 脑缺血-再灌注损伤; 学习记忆; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0264-03

Effects of Rutaecarpine on Cerebral Ischemia-Reperfusion in Mice and its Mechanisms

YAN Chun-lin, ZHANG Ji, GAO Yan-qing, WU Xue-zhi, WANG Shu, XUE Gui-ping
(Pharmaceutical Department, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective function of rutaecarpine (Rut) on learning and memory impairment induced by cerebral ischemia-reperfusion in mice and its possible mechanisms. **Method:** The bilateral common carotid artery occlusion for 5 min were conducted in mice, the mice in Rut-treated groups were administered with Rut (84, 252, 504 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively) ip before 30 min of the operation. The other groups were administered with DMSO (0.02 mL \cdot 10 g $^{-1}$). The abilities of learning and memory were examined by step-down test. The content of nitric oxide (NO) and the activities of nitric oxide synthase (NOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were measured by UV spectrophotometry scenery. **Result:** Focal cerebral ischemia-reperfusion injury could induce the disorder of learning and memory in step-down test, the latency of Rut-treated groups was significantly extended ($P < 0.01$), rutaecarpine could decrease the content of NO significantly and the activities of NOS and iNOS in mice brain. **Conclusion:** Rut could significantly improve the impairment of learning and memory and might decrease cerebral ischemia reperfusion injury by decreasing the activities of NOS and iNOS of mice brain.

[Key words] rutaecarpine; cerebral ischemia-reperfusion; learning and memory; nitric oxide; nitric oxide synthase

[收稿日期] 20120717(006)

[基金项目] 张家口市科技项目指导计划项目(1021095D);河北北方学院校级课题(Q2010018)

[第一作者] 严春临, 硕士, 从事中药药理学与药剂学研究, Tel:18931316002, E-mail:yanchunlinycl@163.com

脑缺血再灌注损伤(I/R)是指脑缺血一定时间后再恢复血液灌注,组织损伤反而进行性加重。吴茱萸次碱(Rut)是从中药吴茱萸中提取的主要生物碱成分之一,研究表明吴茱萸次碱具有心脏保护作用、舒张血管作用、降压作用、抗血小板聚集和血栓形成抗癌、抗炎、抗溃疡等作用^[1];有报道证实静脉注射 Rut(100, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)对在体大鼠心脏缺血-再灌注损伤也有保护作用^[2]。吴茱萸次碱对小鼠脑缺血再灌注损伤是否有保护作用作者未见文献报道。本实验旨在探讨吴茱萸次碱对脑缺血再灌注损伤小鼠学习记忆能力的影响及可能的作用机制。

1 材料

1.1 试药 吴茱萸次碱,南京泽朗医药科技有限公司,批号 ZL201011012,临用前将吴茱萸次碱溶于二甲基亚砜中配成所需浓度;一氧化氮试剂盒(NO)批号 20111101,一氧化氮合酶试剂盒(NOS)批号 20111108,考马斯亮蓝蛋白试剂盒批号 20111022,以上试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;二甲基亚砜(DMSO)批号 20110914,天津化学试剂公司。

1.2 仪器 DT-200 型跳台仪(中国医学科学院药物研究所);PcLab 型生物信号采集系统(北京微信斯达科技开发有限责任公司);Lab-Tech-紫外-可见分光光度计(Lab-Tech 公司);BSA223S 型电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);Sigma3k30 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);FSA-2A 型可调高速匀浆机(德国 Sigma 公司);Foma-86cULT 型冰箱(-80 $^{\circ}\text{C}$)(美国热电公司)。

1.3 动物 健康 ICR 雄性小鼠,体重(30 \pm 5)g,由北京大学医学部实验动物科学部提供,动物许可证号 SCXK(京)2006-0008。全部动物在实验室适应性饲养 3 d 后用于实验,分笼饲养,自由饮食和饮水。室温(20 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 。

2 方法

2.1 动物分组及给药 取小鼠 75 只,手术前随机分成 5 组,假手术组(进行手术,但不进行 I/R)、I/R 模型组、吴茱萸次碱治疗组(I/R + 吴茱萸次碱):吴茱萸次碱 84, 252, 504 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组。于小鼠脑手术前 30 min,吴茱萸次碱治疗组分别腹腔注射(0.02 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)不同剂量的吴茱萸次碱(84, 252, 504 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),模型组和假手术组则腹腔注射等体积的溶媒(N,N-二甲基亚砜,DMSO)。

2.2 小鼠脑缺血再灌注模型的制备 在 Himori 法基础上进行改进^[3],腹腔注射 3.5% 水合氯醛(10 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉小鼠后,仰卧固定,自胸骨柄到

下颌骨间行 5~8 mm 正中纵向切口,分离两侧颈总动脉,分离后用液体石蜡浸泡过的黑色手术线穿过左右二侧颈总动脉,尽量恢复两侧颈总动脉到原位,在气管上方轻轻将黑色手术线打一松的反手结,松紧以不压迫气管为宜。在每侧颈总动脉上方的黑线上穿过一条用液体石蜡浸泡过白色手术线,然后将颈下部黑色手术线拉紧,阻断两侧颈总动脉造成脑缺血状态,5 min 后松弛黑色手术线,拉两侧白色手术线,使颈总动脉恢复血液再灌注去除所有手术线,用手术线缝合伤口,清醒后归笼。

2.3 跳台实验 小鼠脑缺血再灌注 48 h 后,进行跳台实验训练,实验时将小鼠放入跳台实验仪中,训练小鼠受到电击跳上平台躲避伤害性刺激,记录小鼠第 1 次跳下平台的时间即潜伏期,3 min 内从平台跳下的次数为学习的错误次数及触电时间;24 h 后重新测试,记录小鼠第 1 次跳下平台的潜伏期和 3 min 内小鼠记忆错误次数及触电时间,测试时若小鼠停留在平台上超过 3 min,其潜伏期以 180 s 计^[3]。

2.4 小鼠脑内 NO 含量, NOS, iNOS 活力测定 跳台实验结束后 48 h,将小鼠快速断头处死,剥离小脑,取大脑组织,用冰生理盐水冲洗,然后用滤纸拭干,称重,加入 9 倍生理盐水,手动制成匀浆液,离心(5 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 15 min),取上清液放入离心管中,置于冰箱(-80 $^{\circ}\text{C}$)中备用,根据试剂盒说明书方法测定小鼠脑内 NO 含量, NOS, iNOS 活力,采用考马斯亮蓝法测定小鼠脑内蛋白质含量。

2.5 统计学方法 数据应用 SPSS 11.5 统计软件进行数据处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 方法,组间采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 跳台实验结果 学习训练实验中,模型组与假手术组比较,小鼠 3 min 内跳下平台的潜伏期明显降低,错误次数及触电时间显著增加($P < 0.05$);与模型组比较,吴茱萸次碱 504 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组可显著增加小鼠 3 min 内跳下平台的潜伏期,降低错误次数及触电时间($P < 0.05$)。记忆测试实验中,模型组与假手术组比较,小鼠 3 min 内跳下平台的潜伏期显著降低,错误次数及触电时间显著增加($P < 0.01$);与模型组比较吴茱萸次碱 252 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组可显著延长小鼠 3 min 内跳下平台的潜伏期($P < 0.01$),降低错误次数及触电时间($P < 0.05$)。而吴茱萸次碱 504 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组可显著延长小鼠 3 min 内跳下平台的潜伏期,显著降低错误次数及触电时间($P < 0.01$),结果见表 1。

表 1 吴茱萸次碱对脑缺血再灌注损伤小鼠学习记忆能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量 $/\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	学习训练实验			记忆测试实验		
		触电潜伏期/s	错误数/次	触电时间/s	触电潜伏期/s	错误数/次	触电时间/s
假手术	-	74.13 ± 19.51	3.17 ± 1.25	38.26 ± 14.34	113.24 ± 19.88	1.01 ± 0.81	26.64 ± 14.31
模型	-	54.24 ± 15.33 ¹⁾	4.45 ± 1.43 ¹⁾	56.11 ± 16.25 ¹⁾	64.43 ± 15.23 ²⁾	2.86 ± 1.27 ²⁾	58.44 ± 17.62 ²⁾
吴茱萸次碱	84	57.22 ± 16.87	3.88 ± 1.41	53.87 ± 15.44	80.65 ± 15.74 ³⁾	1.91 ± 0.86	47.36 ± 17.81
	252	69.46 ± 14.17 ³⁾	3.71 ± 1.26	44.23 ± 14.28	85.66 ± 17.28 ⁴⁾	1.68 ± 0.77 ³⁾	37.06 ± 16.01 ³⁾
	504	71.18 ± 16.23 ³⁾	3.21 ± 1.19 ³⁾	39.27 ± 13.15 ³⁾	90.37 ± 17.81 ⁴⁾	1.49 ± 0.79 ⁴⁾	28.57 ± 15.22 ⁴⁾

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

3.2 小鼠脑内 NO 含量, NOS, iNOS 活力测定结果
由表 2 可知,模型组与假手术组相比,小鼠脑内 NO 含量, NOS, iNOS 的活力均显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,吴茱萸次碱 252 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组可显

著降低 NOS 和 iNOS 的活力 ($P < 0.01$),降低 NO 的含量 ($P < 0.05$);吴茱萸次碱 504 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组可显著降低 NOS 和 iNOS 的活力,降低 NO 的含量 ($P < 0.01$)。

表 2 吴茱萸次碱对小鼠脑内 NO 含量、NOS 和 iNOS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	NO/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	NOS/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	iNOS/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$
假手术	-	0.77 ± 0.14	144.36 ± 22.09	214.79 ± 45.97
模型	-	2.23 ± 0.61 ²⁾	355.89 ± 77.74 ²⁾	326.69 ± 77.74 ²⁾
吴茱萸次碱	84	2.16 ± 0.62	273.83 ± 46.78 ³⁾	291.15 ± 65.10
	252	1.64 ± 0.39 ³⁾	157.24 ± 43.43 ⁴⁾	247.78 ± 52.44 ³⁾
	504	1.05 ± 0.38 ⁴⁾	149.58 ± 45.44 ⁴⁾	235.12 ± 48.69 ⁴⁾

4 讨论

本实验采用改良后的 Himori 法在麻醉状态下对小鼠进行脑缺血 5 min 后再灌注,造成小鼠学习记忆障碍,形成明显的脑缺血再灌注模型,该方法直观可见,可显著提高小鼠的成活率,保证后续实验的顺利进行。本实验最初以每组 15 只小鼠进行手术,脑缺血再灌注后各组小鼠均有不同程度的死亡,死亡率在 6.6% ~ 20%,均小于相关文献报道^[5-6]。

吴茱萸次碱难溶于水,预实验中以不同比例 DMSO、吐温和三蒸水、乙醇为溶剂来溶解吴茱萸次碱,但是溶解效果并不理想。经过摸索,以 DMSO 为溶剂可较好的溶解吴茱萸次碱,由于 DMSO 有毒性,本实验采用微量注射器单次腹腔注射 0.02 mL· kg^{-1} 保证了剂量准确、用药安全。

研究发现小鼠脑缺血前腹腔注射吴茱萸次碱后,则对其学习记忆能力有明显改善作用,且具有一定的剂量依赖性,吴茱萸次碱(252, 504 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)可显著降低 NO 的含量, NOS 和 iNOS 的活力,改善脑缺血再灌注损伤小鼠受损的学习记忆能力,提示吴茱萸次碱有益智作用,可提高学习能力,有可能开发成为 VD 治疗的新型药物^[7-8]。

[参考文献]

- [1] 赵明,王洪新. 脑缺血再灌注损伤机理及药物保护的研究进展[J]. 锦州医学院学报, 2002, 23(5): 72.
- [2] 余奇,郭澄,程泽能. 吴茱萸次碱的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2007, 25(6): 353.
- [3] 胡长平,李年生,肖亮,等. 吴茱萸次碱的心脏保护作用涉及辣椒素敏感的感觉神经[J]. 中南药学, 2003, 1(2): 67.
- [4] 王树,张力,张丹参,等. 大黄酚对脑缺血再灌注小鼠探索功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(12): 3011.
- [5] 王志琪,王晓洪,陈立峰,等. 加味芎归汤对大鼠全脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 206.
- [6] 唐婧妹,裴清华. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 210.
- [7] 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.
- [8] 王姿颖,魏欣冰,孙茹,等. 羟基葛根素对大鼠脑缺血再灌注损伤一氧化氮和一氧化氮合酶的影响[J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(2): 112.

[责任编辑 李玉洁]