

# 复方人参健脑液对大鼠缺血再灌注脑细胞损伤的作用

路雪雅\*, 胡京红

(北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

**[摘要]** 目的:观察复方人参健脑液对脑缺血再灌注损伤的保护作用。方法:大鼠随机分为正常对照组,脑缺血再灌注模型组,复方人参健脑液高剂量组(10 g·kg<sup>-1</sup>),复方人参健脑液低剂量(5 g·kg<sup>-1</sup>),维生素 E 组(1 g·kg<sup>-1</sup>)。采用颈动脉结扎法构建大鼠脑缺血再灌注损伤模型,硫代巴比妥酸法测定脑细胞脂质过氧化物含量,比色法测定还原型谷胱甘肽含量,氧电极法测定脑细胞耗氧量。结果:模型组大鼠脑脂质过氧化物含量明显增加( $P < 0.001$ ),还原型谷胱甘肽含量减少( $P < 0.001$ ),脑细胞耗氧量增加( $P < 0.01$ )。复方人参健脑液高剂量、低剂量组与模型组比较,脑脂质过氧化物水平降低( $P < 0.001$ ),还原型谷胱甘肽含量增加( $P < 0.001$ ),脑细胞耗氧量减少( $P < 0.001$ )。结论:复方人参健脑液对脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用。

**[关键词]** 复方人参健脑液; 脑缺血再灌注; 脂质过氧化物; 还原型谷胱甘肽; 脑细胞耗氧

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0208-04

## Compound Ginseng Brain Tonic Liquid on Cerebral Ischemia-reperfusion Injury in Rats

LU Xue-ya\*, HU Jing-hong

(Basic Medical College, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Compound Ginseng Brain Tonic Liquid (CGBTL) on

**[收稿日期]** 20120212(009)

**[通讯作者]** \*路雪雅,副研究员,从事生物化学研究,Tel:010-64286995,15201328572,E-mail:gaojian1663@126.com

- [4] Halaban R, Langdon R, Brichall N, et al. Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes [J]. Cell Biol, 1988, 107:1611.
- [5] 解士海,陈志强,卜今,等.丹皮酚在体外对人黑素细胞酪氨酸酶活性及黑素生成的影响[J].中华皮肤科杂志,2006,39(11):641.
- [6] Duval C, Regnier M, Schmidt R, et al. Distinct melanogenic response of human melanocytes in monoculture in co-culture with keratinocytes and in reconstructed Epidermis, to UV exposure [J]. Pigment Cell Res, 2001, 14:348.
- [7] Hunt G, Todd C, Cresswell J E.  $\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone and its analogue N1e4DPhe7 $\alpha$ -MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes [J]. J Cell Science, 1994, 107:205.
- [8] 李杰,顾军,毕新岭,等.白消一号方对黑素瘤细胞与角质形成细胞混合培养模型中黑素合成的影响[J].中国中西医结合皮肤性病学期刊,2009,8(3):139.
- [9] 王兴焱,王天叶,陈巧云,等.熊果苷对 A375 细胞与 HaCaT 共培养模型中黑素合成的影响[J].中国美容医学,2010,19(9):1321.
- [10] Curto E V, Kwong C, Hermersdorfer H, et al. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: *in vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors [J]. Biochem Pharmacol, 1999; 57(6):663.
- [11] 亓玉青. MC 激活基因的调控与治疗白发与黄褐斑的研究[D].天津:天津医科大学,2007:5.
- [12] 邓燕,杨柳.当归对体外 MC 和酪氨酸酶的激活作用[J].第一军医大学学报,2003, 23(3): 239.
- [13] 李艳莉,钟里. 6 种中药抑制酪氨酸酶活性的实验研究[J].时珍国医国药, 2002, 13(3): 129.

[责任编辑 聂淑琴]

cerebral ischemia-reperfusion injury. **Method:** Rats were randomly divided into normal control group, cerebral ischemia and reperfusion model group, large drug dose + model group (CGBTL  $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), small drug dose + model group (CGBTL  $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), vitamin E + model group. The model of cerebral ischemia reperfusion rats was established by ligaturing carotid. The lipid peroxide content of brain cell was measured with thiobarbituric acid. Reduced glutathione was determined by the method of spectrophotometer. Oxygen consumption was measured with clark oxygen electrode method. **Result:** In rats with cerebral ischemia-reperfusion injury, there showed an increase in lipid peroxide content ( $P < 0.001$ ), a decrease in reduced glutathione ( $P < 0.001$ ) and an increase in oxygen consumption ( $P < 0.001$ ) compared with those in the normal control group. In CGBTL large dose and small dose groups, compared with the model group, there showed a decrease in lipid peroxide content ( $P < 0.001$ ), and an increase in reduced glutathione content ( $P < 0.001$ ) and a decrease in oxygen consumption ( $P < 0.001$ ). In vitamin E treatment group, the outcomes were significant ( $P < 0.001$ ). **Conclusion:** CGBTL has preventive effect on cerebral ischemia-reperfusion injury.

[**Key words**] Compound Ginseng Brain Tonic Liquid; cerebral ischemia-reperfusion; lipid peroxidation; reduced glutathione; oxygen consumption

在生物体内,大脑中枢神经系统在调节生理健康、心理活动、智力发展以及高级思维活动过程中发挥着极为重要的调节作用。然而,脑中中枢神经系统的正常生理功能则依赖于脑神经细胞结构和功能的完整性。脑缺血是造成脑神经细胞损伤的病理变化主要因素之一,并引发心脑血管疾病(脑中风),衰老,老年性痴呆症等一些疾病的发展和发生<sup>[1]</sup>。预防和治疗脑缺血对于防老抗衰和防止老年性疾病的发生和发展具有重要的意义。

人参健脑液是人参、大枣等中药材根据中医药理论研制而成的中药复方制剂,具有补血益气之功效,本文主要观察该方对小鼠脑缺血再灌注脑细胞损伤的作用,为该方的临床应用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 药物和试剂** 人参(*Panax ginseng* C. A. Mey),大枣(*Ziziphus jujuba* Mill)等中药材购于北京和平里药店。四乙氧基丙烷(1,1,3,3-tetraethoxypropan),Fluka化学公司生产,批号930512;还原型谷胱甘肽(glutamine)和二磷酸腺苷(adenosine dephosphate,ADP)均由Sigma化学试剂公司提供,批号分别为G-4251和60F-7140。硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid)上海试剂二厂,批号951112。

**1.2 动物** 昆明种小白鼠,雌雄各半,体重22~25g,动物许可证号M139290;雄性Wistar大鼠,体重180~220g,动物许可证号1994-082。

**1.3 仪器** UV-120分光光度计(日本Shimadzu公司)。CY-2耗氧仪(上海华光仪表厂)。SHZ-82三用恒温水浴箱(江苏太仓仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 脑缺血再灌注动物模型的构建**<sup>[2]</sup> 实验动物在动物室适应喂养2d后,随机分为5组(雌雄各半),即正常对照组,脑缺血再灌注模型组,药物高剂量(复方人参健脑液 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重),药物低剂量(复方人参健脑液 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重),维生素E组,每组13~15只动物。药物组动物在构建模型前15d预先给予药物,每日喂服1次。动物在造模前1天晚上禁食,自由饮水。

实验动物采用水合氯醛麻醉,固定于手术台上,在颈部切口(2~2.5cm)。分离双侧颈动脉,采用血管夹夹双侧颈动脉闭塞,使脑组织缺血10min,松开血管夹,血液畅通灌流入脑组织10min,然后再夹闭双侧颈总动脉,以上操作重复1次,缺血再灌注手术1h后,动物被处死,打开颅骨,分离脑组织,用滤纸吸去残血,称重,剪碎,用生理盐水制备成10%的脑匀浆。

**2.2 脑组织脂质过氧化物测定** 测定脑组织细胞脂质过氧化物含量<sup>[3]</sup>,取其10%脑匀浆0.2mL加入1%SDS0.2mL,20%冰乙酸(pH3.5)1.5mL,0.8%硫代巴比妥酸1.5mL,用双蒸水补充体积,混匀,置于95℃油浴加热1h,取出,加入正丁醇振荡提取, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10min,上清液在532nm处测定吸光度,以四乙氧基丙烷为标准计算每克脑组织脂质过氧化物含量,结果以丙二醛(MDA  $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 脑组织)表示。

**2.3 脑组织还原型谷胱甘肽(GSH)测定** 取其10%的脑匀浆加入偏磷酸,混匀,沉淀蛋白,静置10min, $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,离心10min,取上清液加入

DTNB 和磷酸缓冲液,混匀,10 min 后分光光度计检测 412 nm 吸光度,结果以还原型谷胱甘肽为标准,计算每克脑组织 GSH 含量<sup>[4]</sup>。

**2.4 脑细胞耗氧测定** 参照 2.1 项下方法制备脑匀浆,反应体积 20 mL 中含有脑匀浆,介质中含有 0.25 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖,0.5 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA,3 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES, pH 7.2。采用装有 Clark 氧电极的 CY—2 型测氧仪测定以谷氨酸加苹果酸为底物的耗氧量。维持循环水浴的温度为 30 ℃,反应介质含量 0.225 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖,1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA,5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>,15 mmol·L<sup>-1</sup>谷氨酸加 5 mmol·L<sup>-1</sup>苹果酸,保温 2 min 后记录加入 ADP 的脑细胞耗氧量,称为呼吸状态 3,用 S<sub>3</sub> 表示。结果以氧 Natomes O<sub>2</sub>·min·mg<sup>-1</sup> protein 表示<sup>[5]</sup>。

**2.5 统计学分析** 每组实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 软件进行数据分析,两组间比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对脑缺血再灌注模型动物脑组织脂质过氧化物生成的作用** 结果表明,脑缺血再灌注模型动物脑组织细胞脂质过氧化物含量明显高于正常对照组 (*P* < 0.01)。复方人参健脑液高剂量、低剂量组动物脑组织细胞脂质过氧化物含量低于模型组 (*P* < 0.001)。维生素 E 阳性对照组动物脑组织细胞脂质过氧化物含量低于模型组 (*P* < 0.001)。实验结果表明,复方人参健脑液具有明显降低脑缺血再灌注模型组动物脑组织细胞脂质过氧化物生成的作用。

表 1 复方人参健脑液对模型动物脑组织细胞脂质过氧化物生成的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MDA/μmol·g <sup>-1</sup>
正常对照	-	0.36 ± 0.06
模型	-	0.97 ± 0.063 <sup>1)</sup>
复方人参健脑液	10	0.53 ± 0.046 <sup>2)</sup>
	5	0.58 ± 0.07 <sup>2)</sup>
维生素 E	1	0.48 ± 0.07 <sup>2)</sup>

注:与正常对照组比较<sup>1)</sup> *P* < 0.001;与模型组比较<sup>2)</sup> *P* < 0.001 (表 2 同)。

**3.2 对脑缺血再灌注模型动物脑组织 GSH 生成的影响** 实验结果表明,脑缺血再灌注模型动物脑组织 GSH 含量低于模型组,低剂量组动物脑组织 GSH 含量高于模型组 (*P* < 0.001)。维生素 E 阳性对照组动物脑组织细胞 GSH 含量高于模型组 (*P* < 0.001)。

表 2 复方人参健脑液对模型动物脑组织细胞脂质过氧化物和 GSH 生成的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	GSH/μmol·g <sup>-1</sup>
正常对照	-	5.38 ± 0.27
模型	-	4.79 ± 0.15 <sup>1)</sup>
复方人参健脑液	10	5.02 ± 0.13 <sup>2)</sup>
	5	5.24 ± 0.17 <sup>2)</sup>
维生素 E	1	5.04 ± 0.12 <sup>2)</sup>

**3.3 对脑缺血再灌注小鼠脑组织耗氧量的影响** 脑缺血再灌注模型组小鼠脑组织细胞在 ADP 作用下的耗氧量比正常对照组增加,复方人参健脑液低剂量组脑组织耗氧量比模型组动物降低,但无显著差异。维生素 E 阳性对照组脑组织耗氧量比模型组动物降低 (*P* < 0.05)。

**3.4 对脑缺血再灌注大鼠脑组织耗氧量的影响** 上述实验研究表明,复方人参健脑液有明显的降低脑缺血再灌注大鼠脑组织细胞的耗氧量。本实验继续研究该药对脑缺血再灌注大鼠脑组织细胞耗氧量的影响。实验结果表明,复方人参健脑液可明显降低大鼠脑缺血再灌注大鼠脑组织细胞耗氧量。高剂量、低剂量治疗组动物脑组织细胞耗氧量与模型组也具有显著差异 (*P* < 0.001)。维生素 E 阳性对照组动物脑组织耗氧量比模型组也降低 (*P* < 0.01)。

表 3 复方人参健脑液对脑缺血再灌注脑组织细胞耗氧量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	氧耗量/mmol·g <sup>-1</sup>	
		小鼠	大鼠
正常对照	-	0.81 ± 0.33	0.86 ± 0.24
模型	-	1.26 ± 0.26 <sup>1)</sup>	1.43 ± 0.36 <sup>1)</sup>
复方人参健脑液	10	0.98 ± 0.19 <sup>2)</sup>	0.90 ± 0.16 <sup>4)</sup>
	5	1.04 ± 0.28	0.91 ± 0.16 <sup>4)</sup>
维生素 E	1	0.94 ± 0.32 <sup>3)</sup>	0.89 ± 0.26 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> *P* < 0.01;与模型组比较<sup>2)</sup> *P* < 0.01,<sup>3)</sup> *P* < 0.05,<sup>4)</sup> *P* < 0.001。

### 4 讨论

本文研究结果表明,脑缺血再灌注实验模型组动物脑组织细胞脂质过氧化水平升高,还原型谷胱甘肽含量减少,耗氧量增加。而经口服复方人参健脑液减少了动物脑组织细胞缺血再灌注的氧自由基损伤,增加了脑组织细胞的抗氧化活性,使脑细胞脂质过氧化物水平下降,还原型谷胱甘肽含量增加,脑细胞耗氧量减少。

实验研究中发现,脑缺血再灌注时,脑组织细胞脂质过氧化水平升高,脑细胞耗氧量增加,这是由于脑组织细胞处于缺血缺氧状态下,促使机体物质代谢加强,糖、脂肪、蛋白质三大营养物质氧化反应速度加快,线粒体呼吸链氧化磷酸化功能增强,生成的三磷酸腺苷(ATP)增多所致。此时,虽然暂时缓解了脑组织细胞缺氧,但是线粒体氧化磷酸化生成ATP的过程中也伴随着超氧阴离子自由基生成增加,尤其是在脑细胞缺血再灌注时,生成的超氧阴离子自由基增多更加明显,而超氧阴离子自由基在体内快速转化成毒性很强的羟基自由基。羟基自由基作用于脑细胞膜多不饱和脂肪酸使之产生脂质过氧化损伤反应<sup>[6]</sup>。在本实验研究中发现,脑缺血再灌注时不但脑组织细胞脂质过氧化物显著升高,而且脑组织细胞内清除氧自由基,抑制脂质过氧化反应的抗氧化剂谷胱甘肽含量减少,这可能是由于脑组织细胞氧自由基生成增加<sup>[7]</sup>,而抗氧化能力相对降低,过量的氧自由基作用于脑细胞膜生成过氧化产物MDA<sup>[8]</sup>,破坏脑细胞膜的结构和功能,影响脑细胞膜的物质转化和能量代谢,导致脑细胞衰老、老年性痴呆等疾病的发展和发生<sup>[9]</sup>。而用复方人参健脑液处理的脑组织细胞,脂质过氧化物水平明显降低,谷胱甘肽含量增加,提高了脑组织的抗氧化能力。

复方人参健脑液中的人参是我国传统的名贵药材,有“神草”、“地精”和“百草之王”的美誉。《神农本草经》中曾记载:“人参味甘微苦,主补五脏,久服身轻延年。李时珍在《本草纲目》中详细记载了“人参根可入药,补气救脱,益血复脉、养心安神、止渴生津、补肺定喘、健脾止泻、拔毒合疮等功效”<sup>[10]</sup>。《中华人民共和国药典》中指出“人参大补元气,复脉固脱,补脾益脾,生津养血,安神益智,用于体虚欲脱,肢冷脉微,脾虚食少,肺虚喘咳等”<sup>[11]</sup>。人参中含有人参皂苷Rg<sub>3</sub>可以抑制减少氧化氮的产生,保护超氧化物歧化酶水平,抑制脂质体的过氧化作用,减少细胞内Ca<sup>2+</sup>的增加,对机体起保护作用<sup>[12]</sup>。大枣主要用于中气不足、脾胃虚弱、体倦乏力、食少便溏、血虚萎黄等证的治疗。明代名医李时珍认为大枣最易补脾胃,为养胃健脾、益血壮神、安中益气的良药。近年来药理研究发现,大枣中含有多种生物活性物质,如大枣多糖、黄酮类、皂苷类、三萜类、生物碱类等,对人体有多种保健治病之功效。大枣

中的黄酮类物质可以防治脑缺血症并对脑缺血所致的脑组织超微结构损伤有保护作用。大枣中含有丰富的维生素C、维生素P,对健全毛细血管、维持血管壁弹性,抗动脉硬化很有益;大枣中含有cAMP,其药理作用表现为改善人体微循环,扩张冠状动脉,增加脑和心脏的供血量,减慢心律,降低心肌耗氧量而改善缺血心肌的代谢,故可防治心脑血管病。复方人参健脑液中的中药均有益气养血之功效,该方在脑缺血缺氧状态下,对脑中枢神经系统发挥着极为重要的作用。

#### [参考文献]

- [1] 王键,赵辉,许冠荪. 脑络通对大鼠脑缺血再灌注损伤血清与脑组织NO含量及NOS活性影响的分期观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(1):29.
- [2] 陈志武,马传庚,赵维忠. 金丝桃甙对脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. 药学报,1998,33(1):14.
- [3] 路雪雅,刘春梅. 花椒与青花椒对血小板聚集和脂质过氧化作用的研究[J]. 北京中医药大学学报,1996,19(增刊):57.
- [4] 路雪雅,胡京红. 复方山楂冲剂对高脂血症作用的实验研究[J]. 北京中医药大学学报,2005,(增刊):40.
- [5] 路雪雅,陈惟昌. 黄芩甙对脑线粒体老化作用的实验研究[J]. 中国医学研究与临床,2007,5(3):1.
- [6] 汪宁,刘青云. 通窍活血汤对反复脑缺血再灌注小鼠的保护作用及机制的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2003,9(5):22.
- [7] 路雪雅. 抗坏血酸和硫酸亚铁诱导鼠肝线粒体损伤的实验研究[J]. 生物化学与生物物理进展,1997,13(1):35.
- [8] 郑宏,刘冬立,朱陵群,等. 偏瘫复康颗粒对脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(2):25.
- [9] 路雪雅,陈惟昌.  $\alpha$ -青心酮对损伤的脑线粒体Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性和脑细胞耗氧的作用[J]. 药学报,2005,40(1):13.
- [10] 江苏新医学院. 中药大辞典. 第55卷[M]. 上海:上海人民出版社,1977:29.
- [11] 中国药典. 一部[S]. 2010:8.
- [12] 张英鸽,刘天培. 人参总皂甙对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,1994,8(1):7.

[责任编辑 李玉洁]