

参芎化瘀胶囊对大鼠急性脑缺血再灌注损伤的保护作用

刘斌*, 蔡梅芝, 李爱华, 王新宇

(河北联合大学附属医院 神经内一科, 河北 唐山 063000)

[摘要] **目的:** 观察参芎化瘀胶囊对脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积、脑组织水含量及形态结构改变的影响, 探讨参芎化瘀胶囊对大鼠急性脑缺血再灌注损伤的保护作用。**方法:** 实验大鼠随机分为 5 组: 假手术组、缺血再灌注组(模型组)、参芎化瘀胶囊高、中、低剂量治疗组(480, 240, 120 mg·kg⁻¹)。ig 给药 7 d, 每天 1 次, 第 7 天 ig 2 h 后线栓法制作大鼠中动脉阻断(MCAO)再灌注模型。采用 TTC 染色法观测脑梗死体积, 干湿重法测量脑组织水含量, 光镜和电镜观察脑形态结构改变情况。**结果:** 与假手术组比较, 模型组大鼠脑梗死体积增大, 脑组织含水量升高, 差异有显著性(均 $P < 0.05$); 与模型组比较, 参芎化瘀胶囊治疗组大鼠脑梗死体积、脑组织含水量有不同程度减少, 差异有显著性($P < 0.05$, 或 $P < 0.01$), 其中以高剂量组效果最为显著。光镜和电镜下, 参芎化瘀胶囊治疗组大鼠脑组织形态结构和超微结构损伤较模型组明显减轻, 其中以高剂量组效果最为明显。**结论:** 参芎化瘀胶囊对大鼠急性脑缺血再灌注损伤具有保护作用。

[关键词] 脑缺血再灌注损伤; 脑水肿; 参芎化瘀胶囊; 大鼠模型

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0229-04

The Protective Effect of Shenxiong Huayu Capsule on Acute Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats

LIU Bin*, CAI Mei-zhi, LI Ai-hua, WANG Xin-yu

(First Department of Neurology, Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Shenxiong Huayu capsule on infarcted volume, contents of brain water and the changes of morphological and ultrastructure of acute cerebral ischemia reperfusion in rats and investigate the protective effect of Shenxiong Huayu capsule on acute cerebral ischemia reperfusion injury in rats. **Method:** The rats were randomly divided into five groups: sham operation group, ischemia reperfusion group (model group), Shenxiong Huayu capsule high, medium and low dose group (480, 240, 120 mg·kg⁻¹). Intra-gastric administration lasted 7 day, once a day. Middle cerebral artery occlusion (MCAO) and reperfusion model was made by an intraluminal filament method. The infarcted volume was measured by TTC staining, contents of brain water was measured by dry-wet method and the morphological changes were observed using light and electron microscope. **Result:** Compared with the sham operation group, the infarcted volume and contents of brain water were increased in model group and showed a significant difference (all $P < 0.05$); compared with the model group, the infarcted volume and contents of brain water were reduced in Shenxiong Huayu capsule dose groups, showed a significant difference ($P < 0.05$, or $P < 0.01$), the high dose group showed most significant actions. Under the light and electron microscope, the changes of morphological and ultrastructure of changes were reduced in Shenxiong Huayu capsule groups, and the high dose group showed most significant actions. **Conclusion:** Shenxiong Huayu capsule may relieve acute cerebral ischemia reperfusion injury in rats.

[Key words] cerebral ischemia reperfusion injury; cerebral edema; Shenxiong Huayu capsule; rat model

[收稿日期] 20111125(010)

[通讯作者] * 刘斌, 主任医师, 从事脑血管病基础与临床研究, E-mail: liubin919tsh@sina.com

缺血性脑血管病是神经科的常见病和多发病,是造成人类死亡和致残的重要原因,而目前在治疗上还没有重大突破。脑缺血后的血流恢复在某些情况下能导致进一步的组织损伤和功能障碍,这种恢复血流灌注后的有害情况称脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury)。抑制缺血再灌注损伤成为目前治疗缺血性脑血管病的关键环节。参芎化瘀胶囊具有养血益气、化瘀通络等功效,能有效改善血管性痴呆大鼠认知功能^[1-2],但对脑缺血再灌注损伤是否有保护作用,未见相关文献报道。本研究旨在通过制备大鼠大脑中动脉阻断(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型,观察不同剂量参芎化瘀胶囊对脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积、脑组织含水量及形态结构改变的影响,探讨参芎化瘀胶囊对大鼠急性脑缺血再灌注损伤的保护作用,为临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康 SD 大鼠 120 只,雌雄各半,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2010-0013,体质量 250 ~ 350 g,在河北联合大学屏障环境动物实验室自由进食喂养,室温控制在(23 ± 2) °C,自然光照,在实验前适应喂养 1 周。

1.2 药物、试剂和仪器 参芎化瘀胶囊,主要由人参、川芎、地鳖虫、全蝎、乳香(制)、没药(制)、紫河车、龙血竭、五味子、石菖蒲、桑椹子、郁金等多种中药成分组成。由河北联合大学附属医院药剂科提供,批号冀药制字 Z20051586,规格 0.40 g/粒,实验时用生理盐水配制药液(分别为 0.048, 0.024, 0.012 g · mL⁻¹)备用。红四氮唑(TTC)染色剂,购于 Sigma 公司。日立 H-7650 电子显微镜由河北联合大学电镜室提供。

2 方法

2.1 动物分组 实验动物随机分为 5 组:假手术组、缺血再灌注组(模型组)、参芎化瘀胶囊高、中、低剂量治疗组,每组各 24 只大鼠。

2.2 模型制备 参照改良的 Longa 法^[3],采用线栓法制作大鼠中动脉阻断(MCAO)再灌注模型。以 10% 水合氯醛(300 mg · kg⁻¹) ip 麻醉,仰卧固定,于颈部皮肤行常规纵行切口(约 25.0 mm),暴露并钝性游离右侧颈总动脉(CCA),结扎同侧 CCA 近心端和颈外动脉(ECA)分叉部并反向拉直 ECA,距 CCA 末端约 5 mm 处剪口,用直径 0.26 mm 的鱼线沿颈内动脉(ICA)方向插入,深度由分叉部算约计

(18.5 ± 0.5) mm,于 ICA 近心端结扎该动脉,全层缝合切口,再灌注时抽出鱼线 10 mm,术中室温保持(22 ± 2) °C。造模成功的判定标准:大鼠手术麻醉清醒后出现左侧肢体瘫痪,无力,站立不稳,提尾时左侧前爪抱爪。假手术组线栓插入深度小于 9 mm,不闭塞大脑中动脉。

2.3 给药方法 参芎化瘀胶囊高、中、低剂量治疗组灌胃(ig)给药,每日 1 次,于术前 7 d,分别连续 ig 参芎化瘀胶囊悬液(480, 240, 120 mg · kg⁻¹) 10 mL · kg⁻¹。假手术组和模型组:生理盐水 ig, 10 mL · kg⁻¹。最后 1 次 ig 2 h 后行大鼠 MCAO 再灌注模型制备。

2.4 神经症状评分 参照 Zea Longa 评分标准^[3],对缺血 2 h 再灌注 24 h 后观察各组大鼠神经功能缺失进行评定。0 分:无任何神经功能缺失;1 分:左前爪不能完全伸直;2 分:向左侧行走;3 分:向左侧转圈成追尾状;4 分:不能自发行走,意识丧失。

2.5 脑梗死体积测定 缺血 2 h 再灌注 24 h,各组随机选取 6 只大鼠,麻醉后断头取脑,置于冰箱中冷冻 0.5 h 后取右侧大脑半球,距额极 2 mm 向后以 2 mm 间隔连续取 5 个冠状脑片,将切好的脑片立刻置于 2% 红四氮唑(TTC)磷酸缓冲液中,37 °C 恒温孵育 20 min,经 4% 多聚甲醛液固定后封片,数码相机照相后,经图像分析系统进行分析。以损伤侧半球的面积减去损伤侧 TTC 染色正常的面积,求得梗死面积,所有脑片梗死面积之和乘以脑片的厚度即梗死体积,并计算脑梗死体积占全脑的百分率。

2.6 脑组织含水量的测定 缺血 2 h 再灌注 24 h,各组随机选取 6 只大鼠,麻醉后断头处死大鼠,切开大鼠两侧大脑半球,左右各取两侧皮层区和基底节区两个部位的脑组织 0.2 g,用电子天平测定其湿质量,在 100 °C 烤箱中烘烤 72 h 后再测定其干质量。根据公式计算出脑组织含水量。

$$\text{脑组织含水量} = (\text{湿质量} - \text{干质量}) / \text{湿质量} \times 100\%$$

2.7 病理观察 缺血 2 h 再灌注 24 h,各组随机选取 6 只大鼠,麻醉成功后,开胸暴露心脏,用生理盐水 150 mL 心脏灌流,再用 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液 200 mL 心脏灌流,然后断头取脑,于 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液固定 24 h 后,常规制作脑组织切片(片厚 3 μm),进行 HE 染色,在光学显微镜下观察脑组织病理变化。

2.8 超微结构观察 缺血 2 h 再灌注 24 h,各组随机选取 6 只大鼠,麻醉后断头取脑,在冰盒上迅速分离大鼠右侧中下段皮质约 0.2 mm 薄片 3 ~ 4 片,常

规作电镜标本,在透射电镜下观察超微结构变化。

2.9 统计学方法 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 Excel 数据库整理后用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析,两组之间均数比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠神经功能缺损评分 假手术组无神经功能缺失症状,模型组出现明显的神经功能缺失症状。与模型组比较,参芎化瘀胶囊治疗组脑缺血再灌注损伤后的神经功能缺失症状明显改善 ($P < 0.01$, 或 $P < 0.05$),尤其以高剂量组改善最显著。见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积和脑组织含水量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

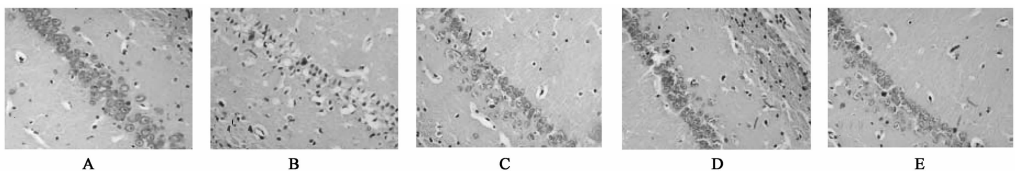
组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	神经功能 评分	脑梗死 体积/%	脑组织 含水量/%
假手术	-	0.00	0.00	76.46 ± 0.67
模型	-	2.42 ± 0.53 ¹⁾	0.21 ± 0.04 ¹⁾	84.15 ± 0.77 ¹⁾
参芎化瘀胶囊	480	1.56 ± 0.62 ²⁾	0.09 ± 0.03 ²⁾	78.53 ± 0.73 ²⁾
	240	1.75 ± 0.49 ³⁾	0.15 ± 0.01 ³⁾	80.58 ± 0.86 ³⁾
	120	1.98 ± 0.58 ³⁾	0.17 ± 0.05 ³⁾	81.49 ± 0.61 ³⁾

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

3.2 大鼠脑梗死体积 大鼠脑缺血梗死主要累及基底节和皮层,缺血梗死区呈苍白色。与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死体积增大,差异有显著性 ($P < 0.05$);与模型组比较,参芎化瘀胶囊治疗组大鼠脑梗死体积有不同程度减少,差异有显著性 ($P < 0.01$, 或 $P < 0.05$),其中以高剂量组效果最为显著。见表 1。

3.3 大鼠脑组织含水量 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织含水量升高,差异有显著性 ($P < 0.05$);与模型组比较,参芎化瘀胶囊组大鼠脑组织含水量有不同程度减少,差异有显著性 ($P < 0.01$, 或 $P < 0.05$),其中以高剂量组效果最为显著。见表 1。

3.4 大鼠脑组织病理改变 假手术组大鼠脑组织未见病理改变,细胞排列整齐密集,胞核圆而大,染色浅,核仁清晰,胞浆丰富(图 1 A)。模型组大鼠脑组织可见缺血梗死区,细胞之间的间隙增大,细胞核固缩、深染,溶解、甚至消失,神经元密度较假手术组明显减少(图 1 B)。参芎化瘀胶囊治疗组大鼠脑组织缺血梗死区存活神经元较模型组明显增多,可见部分神经细胞变性,但染色程度减轻,细胞缩小不明显,细胞周围的间隙无明显变化,水肿减轻,上述变化在高剂量组变化最为明显(图 1 C, D, E)。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 参芎化瘀胶囊 120 mg·kg⁻¹组; D. 参芎化瘀胶囊 240 mg·kg⁻¹组;
E. 参芎化瘀胶囊 480 mg·kg⁻¹组(图 2 同)

图 1 各组大鼠脑组织病理改变(HE, ×100)

3.5 大鼠脑组织超微结构比较 假手术组:神经元结构完整、清晰,核大而圆,染色质分布均匀,核仁明显,胞浆内细胞器丰富,结构完整,线粒体无肿胀(图 2 A)。模型组:神经细胞胞质电子密度增加,细胞核浓缩,核膜凹陷,线粒体肿胀,高尔基体扩张呈大泡状,粗面内质网扩张,核周见微空泡形

成,多聚核糖体解聚,高度肿胀,细胞器稀疏(图 2 B)。参芎化瘀胶囊组:神经元损伤较模型组明显减轻,可见部分神经细胞变性,但染色程度减轻,细胞核皱缩不明显,水肿减轻,线粒体肿胀不明显,粗面内质网基本正常,以高剂量组效果最为明显(图 2 C, D, E)。

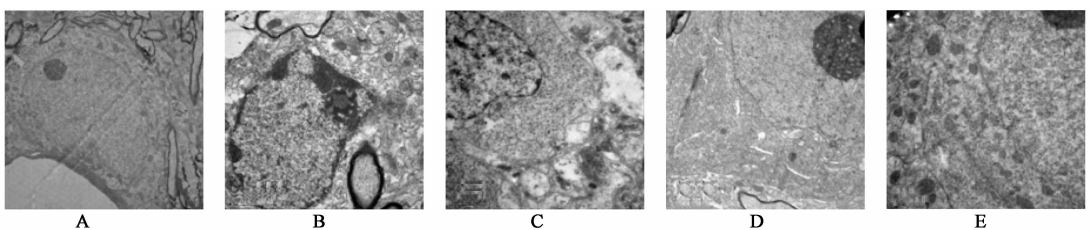


图 2 各组大鼠脑组织超微结构(透射电镜, ×8 000)

4 讨论

脑缺血再灌注损伤是引起多种脑血管病的重要病理生理机制,抗脑缺血再灌注损伤是治疗脑梗死的有效措施,许多中药对脑缺血再灌注损伤有保护作用,主要表现为抗氧化及病理损伤、减轻兴奋性氨基酸的神经毒性、清除自由基、减轻钙超载、影响血小板与血栓形成、影响基因表达与凋亡调控等诸方面^[4-7]。参芎化瘀胶囊是中药制剂,主要由人参、川芎、地鳖虫、全蝎、乳香(制)、没药(制)、紫河车、龙血竭、五味子、石菖蒲、桑椹子、郁金等多种中药成分组成,具有益气活血,化瘀通络的功效。已有研究表明,由人参中提取的人参皂苷活性成分,有改善微循环,阻止钙离子内流,抗自由基,抑制炎症反应以及提高免疫力等多种功效,从而缓解由脑缺血所引起的脑水肿和脑梗死的发生与发展^[8]。石菖蒲有抑制大鼠神经细胞凋亡的作用^[9],可降低小鼠脑组织兴奋性氨基酸的含量。川芎为血中之气药,活血行气,可通过上调脑缺血再灌注诱导的 Bcl-2 蛋白表达,抑制细胞凋亡^[10]。乳香、没药助川芎活血化瘀;全蝎搜络中之邪,使脑络畅通元神之府气血平和;人参、紫河车大补气血,填精益髓;桑椹子养血健脾开胃,使气血生化有源,气血生而精髓充,配合活血药使邪去而不伤正;郁金行气解郁;五味子宁心安神,全方共奏养血益气,化瘀通络之功,使脑络气血通畅,脑功能得到有效恢复。

本研究采用大鼠大脑中动脉阻断(MCAO)再灌注模型探讨参芎化瘀胶囊对脑缺血再灌注损伤的影响,实验结果显示参芎化瘀胶囊可以明显减少缺血再灌注脑梗死面积,可以明显降低脑缺血大鼠的脑水含量,减轻脑水肿,说明该药具有明显的脑保护作用。此外,本研究光镜下模型组大鼠脑组织可见缺血梗死区,细胞之间的间隙增大,细胞核固缩、深染,溶解、甚至消失,神经元密度较假手术组明显减少。电镜下模型组神经细胞胞质电子密度增加,细胞核浓缩,核膜凹陷,线粒体肿胀,高尔基体扩张呈大泡状,粗面内质网扩张,核周见微空泡形成,多聚核糖体解聚,高度肿胀,细胞器稀疏。给予参芎化瘀胶囊

治疗后,以上改变较模型组明显减轻,进一步证实该药具有抗缺血再灌注损伤作用。本研究结果表明参芎化瘀胶囊对脑缺血再灌注损伤有较好的保护作用,但其具体保护机制还有待进一步研究阐明。

[参考文献]

- [1] 刘斌,赵彬,毛文静,等. 参芎化瘀胶囊对血管性痴呆模型大鼠学习记忆行为的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011, 17(10): 126.
- [2] 刘斌,毛文静,李爱春,等. 参芎化瘀胶囊对血管性痴呆大鼠海马 CA1 区 p38 丝裂原活化蛋白激酶表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010, 16(8): 161.
- [3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20: 84.
- [4] 祁存芳,刘勇,张建水,等. 川芎嗪对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用[J]. 现代中西医结合杂志, 2008,17(25): 3908.
- [5] 王宝亮,韩艳丽. 中风皂贝化痰胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤后的神经保护作用及血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3): 138.
- [6] 杨德森,游秋云,田先翔,等. 红景天苷对老龄大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(9): 738.
- [7] 周珊妮,王秋娟,朱丹妮. 当归芍药散精简方对脑缺血再灌注损伤的改善作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2006, 12(10): 47.
- [8] 吴晓燕. 人参总皂甙对大鼠缺血再灌注后神经元凋亡的保护及作用机制的研究[J]. 神经疾病与精神卫生杂志,2005,5(5):347.
- [9] 方永奇,匡忠生,谢宇辉,等. 石菖蒲对缺血再灌注脑损伤大鼠神经细胞凋亡的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2002,11(17):1647.
- [10] 李庚华,杨迎春,任占川. 川芎嗪对大鼠脑缺血再灌注损伤后大脑皮质 Bcl-2 表达的影响[J]. 解剖学杂志,2010,33(1):82.

[责任编辑 聂淑琴]