

三化汤对大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障损伤的保护作用

樊凯芳¹, 李晓亮², 梁晓东³, 唐迎雪^{3*}

(1. 山西中医学院, 太原 030024; 2. 山西中医学院附属医院, 太原 030024;
3. 山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] **目的:**观察三化汤对大鼠脑缺血再灌注血脑屏障损伤的保护作用。**方法:**将大鼠随机分为假手术组、模型组、三化汤低、高剂量组(7.2, 14.4 g·kg⁻¹)ig, 尼莫地平组(8.1 mg·kg⁻¹)ig。大鼠常规饲养 3 d 后灌胃给药, 每日 1 次, 连续给药 7 d 后采用线栓法制备脑缺血再灌注大鼠模型。采用比色法检测大鼠脑组织伊文思蓝(EB)的含量, 采用酶联免疫法检测大鼠血清 S100B 蛋白的含量。**结果:**假手术组大鼠脑组织 EB 含量、血清 S100B 蛋白含量减少, 模型组大鼠脑组织 EB 含量、血清 S100B 蛋白含量显著升高($P < 0.01$); 与模型组比, 各用药组大鼠脑组织 EB 含量、血清 S100B 蛋白含量显著降低($P < 0.05$), 其中三化汤高剂量组、尼莫地平组比三化汤低剂量组降低明显($P < 0.05$)。**结论:**大鼠脑缺血再灌注后可引起血脑屏障的损伤, 三化汤对大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障损伤具有一定的保护作用。

[关键词] 三化汤; 脑缺血再灌注; 血脑屏障

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0181-04

The Protective Effect of Sanhua Tang on Blood Brain Barrier Injury in Cerebral Ischemia-reperfusion Rat

FAN Kai-fang¹, LI Xia-liang², LIANG Xiao-dong³, TANG Ying-xue^{3*}

(1. Shanxi College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Taiyuan 030024, China;
2. The Affiliated Hospital of Shanxi College of TCM, Taiyuan 030024, China;
3. Shandong University of TCM, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effect of Sanhua Tang on blood brain barrier injury in cerebral ischemia-reperfusion rat. **Method:** The rats were randomly divided into sham operation group, model group, low dose group of Sanhua Tang, high dose group of Sanhua Tang and nimodipine group. Blocking middle cerebral artery of rat with suture method was used to prepare cerebral ischemia reperfusion model. The content of EB in rat brain tissue was detected by colorimetry. The content of S100B protein was detected in serum of cerebral ischemia-reperfusion rat by enzyme linked immunoassay. **Result:** In sham operation group the content of EB, S100B protein was decreased. The content of EB, S100B protein in model operation group was significantly increased ($P < 0.01$); compared with model operation group, in drug group the content of EB, S100B protein was significantly decreased ($P < 0.05$); in large dose group of Sanhua Tang and nimodipine group the content of EB, S100B protein was more significantly reduced than other groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sanhua Tang can protect blood brain barrier injury of cerebral ischemia reperfusion rat.

[Key words] Sanhua Tang; cerebral ischemia-reperfusion; blood brain barrier

[收稿日期] 20110909(011)

[基金项目] 山东省教育厅课题(J06L18)

[第一作者] 樊凯芳, 博士, 讲师, 从事中药及复方的基础和临床应用研究, Tel: 18935153825, E-mail: fankaifang108@163.com

[通讯作者] *唐迎雪, 博士, 教授, E-mail: doctoryxt@sina.com

脑缺血再灌注后引起脑损伤的病理涉及多个方面, 其中血脑屏障(BBB)损伤是脑缺血再灌注脑损伤的重要病理生理基础^[1]。BBB 是存在于脑组织和血液之间的一个复杂的细胞系统, 是机体维持中枢神经系统内环境稳定的基础, 其结构的改变对神

经系统的病理生理有着重要影响。近年研究发现 S100B 蛋白正常由中枢神经系统内细胞合成,仅局限于中枢神经系统组织间液中,当 BBB 开放或受损时,可由中枢到达外周血中,通过外周血可以很容易检测其变化。因此,血清 S100B 蛋白被认为是反映血脑屏障损伤比较特异和敏感的指标^[2]。

三化汤出自《素问病机气宜保命集·中风论第十》,为金元医家刘完素所创,方由大黄、枳实、厚朴、羌活组成,是调气开通玄府法治疗中风病之名方,具有宣行气血、通腑开结、调畅气机、开通玄府的作用,临床用于治疗急性中风病取得良好疗效,但其产生作用的具体机制尚不清楚,尤其对脑缺血再灌注后血脑屏障损伤的保护作用,尚缺乏有效的科学依据。为此,作者通过实验观察三化汤对大鼠脑缺血再灌注后血清 S100B 蛋白含量的影响,探讨三化汤治疗缺血性脑血管病的作用机制,研究其对血脑屏障的保护作用,为临床应用三化汤及调气开通玄府法治疗急性中风病提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 90 只 SD 雄性大鼠,体重 250 ~ 300 g。由山东中医药大学动物实验中心提供,符合普通实验动物质量标准。生产许可证号 SCXK(鲁)20050015。使用许可证号 SYXK(鲁)20050043。

1.2 药物

1.2.1 中药 三化汤由大黄、枳实、厚朴、羌活各等分组成。各药均购于山东中医药大学门诊部,经山东中医药大学中药鉴定教研室李峰老师鉴定,符合《中国药典》2010 年版药品标准。使用前按传统方法做成水煎液,并浓缩至含生药 0.72, 1.44 g·mL⁻¹ 2 种浓度。

1.2.2 西药对照药 尼莫地平,山东新华制药股份有限公司,国药准字 37022778。使用前用生理盐水溶解成浓度为 0.81 g·L⁻¹ 的混悬液。

1.3 仪器 直径 0.22 ~ 0.28 mm 进口尼龙鱼线(日本第一株式会社);微血管夹(苏州医疗器械厂);JA5003 型电子分析天平(上海精科天平厂);SM-3 自动化酶免分析仪(北京天右医疗用品制作所);洗板仪(Biocell AWT);电温恒温水浴箱(天津市威仪科技发展有限公司);全自动低速冷冻离心机(湖南离心机厂);移液器(北京东南仪诚实验室设备有限公司)。

1.4 试剂 生理盐水(山东齐都药业有限公司,批号 1D07091609);10% 水合氯醛(山东济南千佛山医院,批号 080408);S100B 试剂盒(美国 ADL)。

2 方法

2.1 分组 实验动物按随机数字表分为假手术组、模型组、三化汤低剂量组、三化汤高剂量组、尼莫地平组,每组 18 只。

2.2 给药方法 动物常规饲养 3 d 后进行预防性给药,药物剂量按人鼠体表面积折算等效比率计量表,计算出大鼠的等效剂量。三化汤低、高剂量组(7.2, 14.4 g·kg⁻¹) ig;尼莫地平组给予等效剂量 8.1 mg·kg⁻¹ ig;各给药组 ig 体积均为 10 mL·kg⁻¹,假手术组、模型组大鼠给予 10 mL·kg⁻¹ ig 生理盐水。各组均为每日 1 次,连续 7 d。于末次给药后 24 h 进行大鼠脑缺血再灌注模型的建立。

2.3 大鼠脑缺血再灌注模型建立 参照 Zea Longa 等^[3]人的线栓法。将直径约 0.22 ~ 0.28 mm 的鱼线沿右侧颈总动脉(CCA)分叉处插入颈内动脉(ICA)约 17 ~ 18 mm,阻断大鼠大脑中动脉(MCA),形成 MCA 供血中断,缺血 2 h 后拔出线栓约 15 mm 形成大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型(简称 MCAO),再灌注 24 h 后处死动物进行观察。假手术组渔线插入 CCA 深度为 5 mm,其余操作均同手术组。

2.4 脑组织伊文思蓝含量的测定 每组取 8 只大鼠,于缺血 2 h 再灌注 24 h 后,经股静脉注射 2% 伊文思蓝(EB)2 mL·kg⁻¹ 体重,1 h 后迅速断头取脑,分开大脑半球,去除蛛网膜、血凝块及脑室脉络丛,置已知体积的甲酰胺中,测量脑体积。继续加甲酰胺至脑体积的 5 倍,置 37℃ 水浴 48 h 后,在波长 632 nm 处测定吸光度(A)。甲酰胺作空白比色,根据标准曲线计算出 EB 含量(mg·L⁻¹)。脑 EB 含量为上述值的 5 倍(μg·mm⁻³)。

2.5 大鼠血清 S100B 的含量测定

2.5.1 标本采集 缺血 2 h 再灌注 24 h 后,各组大鼠用 10% 水合氯醛过量麻醉,从腹部正中线打开腹腔暴露腹主动脉,用注射器抽取血液 1 mL,放入试管中,于室温下自然凝固析出血清后,以 4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后取上清液并放入 -20℃ 冰箱保存待测。

2.5.2 酶联免疫法检测血清 S100B 的含量 ①将血清样本从 -20℃ 冷柜中取出,37℃ 水浴加热 30 min 解冻,将试剂盒里提供的浓缩洗涤液与蒸馏水按 1:20 稀释待用;②取出酶标板,依照次序对应加入 100 μL 的对照品于空白微孔中;③分别标记样品编号,加入 100 μL 样品于空白微孔中;④在对照孔和样品孔中加入 50 μL 的酶标记溶液;⑤在(36 ±

2)℃下孵育反应 60 min;⑥洗板机清洗 5 次,每次静置 10~20 s;⑦每孔加入底物 A、B 液各 50 μL ;⑧(36±2)℃下避光孵育反应 15 min;⑨每孔加入 50 μL 终止液,终止反应。⑩将显色后的酶标板放于波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔 A,以标准值计算标准曲线,并在曲线上查找对应样品浓度,结果输入 SPSS 13.0 软件统计包进行统计学处理。

2.5 统计方法 采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障通透性的影响

结果显示:与假手术组比,模型组大鼠脑组织 EB 含量明显升高 ($P < 0.01$),说明脑缺血再灌注后血脑屏障通透性增加;与模型组比,各用药组大鼠脑组织 EB 含量显著降低 ($P < 0.05$),其中三化汤大剂量组、尼莫地平组比三化汤小剂量组降低明显 ($P < 0.05$),说明三化汤对脑缺血再灌注后血脑屏障的损伤具有一定的保护作用。见表 1。

3.2 对脑缺血再灌注大鼠血清 S100B 含量的影响

假手术组血清 S100B 蛋白含量很少,模型组血清 S100B 蛋白含量显著升高 ($P < 0.01$),说明脑缺血再灌注后随着血脑屏障的损伤使 S100B 蛋白通过受损的血脑屏障进入到血液;与模型组比,各用药组血清 S100B 蛋白含量显著降低 ($P < 0.05$),其中三化汤大剂量组、尼莫地平组比三化汤小剂量组降低明显 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠脑组织 EB 及血清 S100B 含量的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	EB 含量 / $\mu\text{g} \cdot \text{mm}^{-3}$	S100B / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术	-	3.52 ± 0.54 ¹⁾	0.03 ± 0.01 ¹⁾
模型	-	15.79 ± 3.78	0.79 ± 0.12
三化汤	7.2	13.45 ± 2.98 ²⁾	0.67 ± 0.11 ²⁾
	14.4	11.24 ± 3.09 ^{1,3)}	0.52 ± 0.09 ^{1,3)}
尼莫地平	0.008 1	12.13 ± 3.94 ^{1,4)}	0.53 ± 0.15 ^{1,4)}

注:与模型组比¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.05$;与三化汤 7.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组比³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

血脑屏障是存在于脑组织和血液之间的一个复杂的细胞系统。它能控制血循环中的某些物质向中枢神经组织转运,也能将中枢神经组织内有害或过剩物质排出脑外,从而保证中枢神经组织内环境的

稳定。研究显示,血脑屏障损伤是脑缺血再灌注损伤的重要病理生理基础^[1]。缺血性脑损害时血脑屏障的结构和功能发生相应的变化,血脑屏障的破坏反过来又影响脑缺血的病理生理过程,两者密切相关。

S100B 蛋白是一类相对分子质量较小 ($9 \times 10^3 \sim 13 \times 10^3$) 的 EF 手型钙结合蛋白,主要分布于中枢神经系统和周围神经系统的神经胶质细胞、某些神经元细胞、黑色素细胞、软骨细胞和脂肪细胞中,是神经胶质细胞和神经元相互联系的中介物质之一,其具有广泛的生物学活性,在细胞增殖、分化、肌肉收缩、基因表达、分泌及细胞凋亡中发挥重要作用^[4]。S100B 蛋白在正常成人血清中通常较难测出,当脑组织受损后脑脊液的 S100B 蛋白通过受损的血脑屏障进入血液,血清中的 S100B 蛋白含量升高。因此脑脊液和血浆中的 S100B 蛋白升高可以作为神经系统损伤比较特异和敏感的标志物,其浓度变化可反映神经系统损伤的程度。另外,缺血性和出血性脑血管病导致神经细胞水肿、变性和坏死,甚至造成血脑屏障的破坏,BBB 的开放使只出现在脑脊液中的 S100B 蛋白通过受损的血脑屏障进入血液,血清的 S100B 蛋白水平升高。因此,S100B 浓度变化亦可反映血脑屏障损伤的程度。Nicola 等^[5]发现 S100B 蛋白含量与血脑屏障开放程度相关,提出 S100B 蛋白可作为反映血脑屏障损伤的外周生化标志物的理论。Marchi^[6-7]模拟 BBB 暂时性可逆开放,测定单纯 BBB 开放时血浆中 S100B 的浓度,以及 BBB 开放和神经损伤同时存在时 S100B 的血浆浓度,发现后者要比前者浓度要高并且持续时间要长,说明单纯的 BBB 开放要比没有 BBB 开放时 S100B 的浓度高得多,充分证明了,S100B 的血浆水平与 BBB 的开放程度有更直接的相关性。本实验通过检测大鼠血清 S100B 蛋白含量,结果显示:模型组血清 S100B 蛋白含量比假手术组明显升高 ($P < 0.01$),说明脑缺血再灌注后随着血脑屏障的损伤 S100B 蛋白通过受损的血脑屏障进入到血液;与模型组比,各用药组血清 S100B 蛋白含量显著降低 ($P < 0.05$),其中三化汤大剂量组、尼莫地平组比三化汤小剂量组降低明显 ($P < 0.05$);三化汤大剂量组与尼莫地平组无显著性差异,说明三化汤能降低脑缺血再灌注大鼠血清 S100B 蛋白含量,对脑缺血再灌注引起的血脑屏障损伤具有一定的保护作用。

补康灵对辐射损伤小鼠造血功能的影响

季屹红¹,倪美鑫¹,蔡晶¹,张锦林^{1*},王庆华²

(1. 南通大学附属肿瘤医院,江苏南通 226361; 2. 南通大学医学院,江苏南通 226300)

[摘要] 目的:探讨补康灵对辐射损伤小鼠造血功能的影响。方法:50只小鼠被随机分为5组:正常对照组、辐射对照组、补康灵低、中、高剂量组。实验组小鼠在⁶⁰Co γ射线4 Gy照射后,补康灵组分别灌胃9,18,36 g·kg⁻¹,其余2组给予生理盐水,连续给药10 d,照射后第5,10天检测血象。10 d后处死小鼠,观察补康灵对骨髓DNA含量、骨髓有核细胞数、脾结节的影响。结果:⁶⁰Co γ射线照射后小鼠外周白细胞、血小板数减少,补康灵给药后,中、高剂量组小鼠外周白细胞、血小板数升高,中、高剂量组骨髓DNA含量吸光度(A)为(1.05±0.27), (1.22±0.26);骨髓有核细胞数为(5.12±1.22), (6.01±1.35)×10⁶/L,脾结节(7.67±1.56), (8.52±2.12)个,均比辐射对照组明显增加(P<0.05)。结论:补康灵照射后给药能促进辐射损伤小鼠造血功能的恢复。

[关键词] 补康灵;辐射损伤;造血功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0184-03

Effects of Bukangling on Hematopoietic Function in Radiation-injured Mice

Ji Yi-hong¹, Ni Mei-xin¹, Cai Jing¹, Zhang Jin-lin^{1*}, Wang Qin-hua²

(1. Affiliated Tumor Hospital of Nantong University, Nantong 226361, China;

2. Medical School of Nantong University, Nantong 226300, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Bukangling on hematopoietic function in radiation-injured mice. **Method:** Fifty mice were randomly divided into five groups: control group, radiation injure group, high, medium and low dose group of Bukangling. 9, 18, 36 g·kg⁻¹ of Bukangling were ig given for 10 days after they

[收稿日期] 20110824(009)

[基金项目] 江苏省卫生厅医学科技发展基金项目(P200939)

[第一作者] 季屹红,主管药师,从事医院药学研究, Tel: 13585226278

[通讯作者] *张锦林, Tel: 15896263061, E-mail: ntzjl0513@163.com

[参考文献]

- [1] Fu jimura M, Gache Y, Moritar Fujimura Y, et al. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion [J]. Brain Res, 1999, 842 (1):92.
- [2] Kanner A A, Marchi N, Fazio V, et al. Serum S100beta: A nonin-vasivemarker of blood-brain barrier function and brain lesions [J]. Cancer, 2003, 97 (11): 2806.
- [3] 孟宜良.线栓法大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血模型研究现状[J].国外医学:神经病学神经外科学分册, 2002,29(2):113.
- [4] Garcia J H, Liu K F, Hb K L. Neuronal necrosis after

middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex[J]. Stroke, 1995, 2(4):636.

- [5] Nicola M, Marco C, Vincent F, et al. Peripheral markers of blood-brain barrier damage [J]. Clin Chim Acta, 2004, 342(1): 1.
- [6] Marehi N, Rasmussen P, Kapural M, et al. Peripheral markers of brain damage and blood-brain-barrier dysfunction [J]. Restor Neurol Neurosci, 2003, 21 (3/4):109.
- [7] Rothermundt M, Arolt V, Wiesmann M, et al. S100B is increased in melancholic but not in non-melancholic major depression [J]. J Affect Disord, 2001, 66(1): 89.

[责任编辑 聂淑琴]