

贝加灵喷雾剂对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用

施俊辉¹, 史亚军^{1,2}, 刘剑云¹, 唐梅¹, 熊永爱¹, 杨明^{1,3*}

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 陕西中医学院药学院, 陕西 咸阳 712046; 3. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的: 研究贝加灵喷雾剂对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用, 并初步探讨其作用机制。方法: SD大鼠随机分为假手术组、模型组、贝加灵高、中、低剂量组、尼莫地平组、空白乳剂组。贝加灵高、中、低剂量组(2.66, 1.33, 0.66 mg·kg⁻¹)鼻腔给药, 尼莫地平组(0.4 mg·kg⁻¹)尾静脉注射给药, 5 d后, 采用血管内栓线阻断法建立大鼠局灶性脑缺血模型, 继续给药2 d, 观察大鼠神经功能缺损情况, 测定各组大鼠脑组织含水量, 利用紫外分光光度法测定大鼠局灶性缺血脑损伤血清中超氧化物歧化酶(SOD)活力、脑组织中Ca²⁺-ATP酶含量。结果: 与模型组比较, 贝加灵高、中、低剂量组神经功能评分(1.06 ± 0.80), (1.00 ± 0.84), (0.89 ± 0.94)分, 极显著性降低(P < 0.01); 高、中剂量组脑组织含水量(79.33 ± 1.46)%, (79.34 ± 1.01)%, 极显著性降低(P < 0.01), 低剂量组含水量(79.72 ± 1.87)%显著性降低(P < 0.05); 血清中SOD活力(177.622 ± 5.224), (160.350 ± 41.139), (167.279 ± 6.450) U·mL⁻¹, 脑组织Ca²⁺-ATP酶含量(3.444 ± 3.730), (3.192 ± 1.298), (2.866 ± 0.156) U·mg⁻¹, 均显著性降低(P < 0.05)。结论: 贝加灵喷雾剂对大鼠局灶性脑缺血损伤有一定修复保护作用, 可能通过抗自由基和改善能量代谢发挥这一作用。

[关键词] 贝加灵喷雾剂; 局灶性脑缺血; 抗自由基; 改善能量代谢

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0124-04

Protective Effect of Baicalin Spray on Focal Cerebral Ischemia in Rats

SHI Jun-hui¹, SHI Ya-jun^{1,2}, LIU Jian-yun¹, TANG Mei¹, XIONG Yong-ai¹, YANG Ming^{1,3*}

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China; 2. College of Pharmacy, Shanxi University of TCM, Xianyang 712046, China; 3. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Jiangxi University of TCM, Ministry of Education, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of baicalin spray on focal cerebral ischemia in rats,

[收稿日期] 20110713(007)

[基金项目] 国家创新药物科技专项(2009ZX09103-353)

[第一作者] 施俊辉, 在读硕士生, 从事中药新制剂研究工作, Tel: 028-61800127, E-mail: shijunhui1986@163.com

[通讯作者] * 杨明, 博士, 博士生导师, 教授, 从事中药新制剂、新剂型、新技术研究, E-mail: yangming16@126.com

[参考文献]

- [1] 赵晶, 唐启盛, 裴清华, 等. 颞颥解郁方治疗抑郁症肾虚肝郁型的临床疗效观察[J]. 北京中医药大学学报, 2008, 31(1): 61.
- [2] 唐启盛, 裴清华, 侯秀娟. 脑卒中后抑郁状态动物模型的建立[J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27(3): 33.
- [3] Wachtel H. The second-messenger dysbalance hypothesis of affective disorders[J]. Pharmacopsychiatry, 1990, 23(1): 27.
- [4] Whitaker C M, Wei H. An alternate cAMP pathway Epac promotes hippocampal long-term depression[J]. Physiol,

- 2009, 587(Pt 13): 3067.
- [5] Wong M L, Whelan F, Deloukas P, et al. Phosphodiesterase genes are associated with susceptibility to major depression and antidepressant treatment response[J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103(41): 15124.
- [6] Navakkode S, Sajikumar S, Frey J U. Mitogen-activated protein kinase mediated reinforcement of hippocampal early long-term depression by the type IV-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram and its effect on synaptic tagging[J]. Neurosci, 2005, 25(46): 10664.

[责任编辑] 聂淑琴

and to explore its possible therapeutic mechanism. **Method:** SD rats were randomly divided into seven groups: sham operation group, model group, baicalin's spray groups with high, middle and low dose, nimodipine 0.4 mg·kg⁻¹ group and blank emulsion group. Baicalin's spray groups were given baicalin (2.66, 1.33, 0.66 mg·kg⁻¹, respectively) by nasal administration, and nimodipine group was injected. After 5 days, focal cerebral ischemia model was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO). After 2 days of continued administration, the extent of neurological deficits was evaluated by Longa method and the content of brain water was assayed by weighing method, the level of SOD in serum and Ca²⁺-ATP in brain tissues were determined by the Ultraviolet Spectrophotometric. **Result:** Compared with the model group, neurological deficits scores of baicalin's spray groups with high, middle, low dose group (1.06 ± 0.80), (1.00 ± 0.84), (0.89 ± 0.94), was significantly decreased ($P < 0.01$); the content of brain water (79.33 ± 1.46)%, (79.34 ± 1.01)% was significantly decreased ($P < 0.01$), the low dose groups was also decreased ($P < 0.05$). The content of SOD in serum (177.622 ± 5.224) U·mL⁻¹, (160.350 ± 41.139) U·mL⁻¹, (167.279 ± 6.450) U·mL⁻¹, and the content of Ca²⁺-ATP in brain tissues (3.444 ± 3.730), (3.192 ± 1.298), (2.866 ± 0.156) U·mg⁻¹ were highly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Baicalin spray has protective effect on focal cerebral ischemia injury; its mechanism may be related to the anti-free radical and improvement of energy metabolism.

[**Key words**] Baicalin spray; focal cerebral ischemia; anti-free radical; improvement of energy metabolism

脑缺血损伤主要指由于脑动脉管腔狭窄或堵塞,局部脑血流量减少或突然中断,造成该动脉供应区的脑组织供血、供氧、供能减少,继而引起继发性的血管内皮损伤和自主神经功能障碍的一种病理状态^[1]。缺血性脑损伤疾病以其高发病率、高致残率和高死亡率而严重危害着人们的身心健康。

近年来有学者研究发现,以黄芩苷为主要成分的黄芩提取物可从抑制兴奋性氨基酸毒性作用、抗自由基毒性损伤、干预细胞内钙超载、抑制凋亡调控基因的激活、抑制炎症因子的表达,以及保护线粒体功能等方面对中风引起的缺血性脑损伤也具有积极地修复治疗作用^[2],这无疑对进一步深化对黄芩既往功效的认识,探索利用其新的药理作用具有积极的意义,同时也对研究开发治疗缺血性脑损伤疾病的药物给予了积极的推动作用。

本研究通过研究贝加灵喷雾剂对局灶性脑缺血大鼠脑组织含水量,利用分光光度法测定局灶性脑缺血大鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)和脑组织中Ca²⁺-ATP酶含量,研究其对实验性大鼠局灶性脑缺血损伤的保护修复作用,并初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药物 贝加灵喷雾(自制,批号 20100810)、空白乳剂(自制,批号 20100808)、尼莫地平注射液(山东东方药业股份有限公司,批号 1005191)。贝加灵喷雾剂是以黄芩苷磷脂复合物、中链油、S-75 等为油相,以泊洛沙姆、甘油和水为水相,通过高压均质而制备成的 O/W 型亚微乳制剂,本制剂为鼻腔喷

雾剂;空白乳剂则是以上述处方为基础除去黄芩磷脂复合物后,同法制备而成的。

1.2 动物 健康 SD 大鼠,体重(250 ± 25)g,雌雄各半,购于成都达硕生物科技有限公司,合格证号 SCXK(川)2008-24。

1.3 试剂 水合氯醛(成都市科龙化工试剂厂,批号 20100920),考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(批号 20101224),超氧歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20101015),超微量 ATP 酶(Ca²⁺)测试盒(批号 20101228)均由南京建成生物工程研究所提供。

1.4 仪器 岛津 UV-1700 型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司),BS-200s-WEI 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司),FLUKO F6/10-10G 型超细匀浆机[弗鲁克(上海)流体机械制造有限公司],Finnpipette 移液器(上海斯丹赛生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 大鼠随机分为 7 组,每组 12 只,即贝加灵高剂量组、中剂量组、低剂量组、尼莫地平组(0.4 mg·kg⁻¹)、空白乳剂组、假手术组、模型组。贝加灵高、中、低剂量组(2.66, 1.33, 0.67 mg·kg⁻¹)分别鼻腔给予 0.2 mL 贝加灵,空白乳剂组鼻腔给予空白乳剂,假手术组、模型组鼻腔给予等量生理盐水,每天给药 2 次;尼莫地平组尾 iv 给予尼莫地平,每天给药 1 次。预防给药 5 d,第 6 天制造局灶性脑缺血模型,造模前禁食 12 h,造模后再给药 2 d,处死大鼠,期间动物自由饮食,取出脑组

织,同时用生理盐水制备 10% 的脑组织匀浆液。

2.2 血管内栓线阻断法建立大鼠局灶性脑缺血模型 大鼠用 10% 水合氯醛 ($35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ip 麻醉。仰卧位固定,碘伏擦拭消毒,腹侧颈正中中线切口皮肤。沿胸锁乳突肌内缘分离肌肉和筋膜,分离到气管前肌后,沿右侧胸锁乳突肌腱向下分离,见到颈动脉鞘后可上拉钩。分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。在 CCA 远心端和近心端及 ECA 处挂线备用。用微动脉夹暂时夹闭 ICA,然后近心端结扎 CCA,ECA。在距 CCA 分叉部 4 mm 处剪一小口,将栓线插入到 ICA。然后用绕在 CCA 远心端的细线轻轻系牢栓线。用眼科镊轻推栓线,这时从血管分叉处开始算距离,当插入深度在 18 mm 时,轻柔地紧紧系牢 CCA 远心端的细线。常规缝合伤口。假手术组只进行麻醉和血管分离术,不结扎血管和导入栓线。2 h 后再灌注。各用药组再灌注后立即给予相应药物,假手术组和模型组给予等容量的生理盐水。

2.3 评价指标

2.3.1 大鼠神经功能缺损评分 大鼠脑缺血 2 h 再灌注 3 h 后,参照 Longa^[3]等方法进行 5 分制神经功能评分。0 分:无明显神经功能缺损症状;1 分:提尾时左前肢内收屈曲,不能完全伸展左前肢,属于轻度局灶性神经功能缺损;2 分:爬行时向左侧旋转、划圈,属于中度局灶性神经功能缺损;3 分:站立时向左侧倾斜,属于重度局灶性神经功能缺损;4 分:不能自发行走或出于昏迷状态。

2.3.2 脑组织含水量的测定 脑含水量用干湿重法测定。将染色后的脑组织放于 100 °C 烘箱中 24 h,取出测干重,计算脑组织含水量。

$$\text{脑组织含水量} = [1 - (\text{干重}/\text{湿重})] \times 100\%$$

2.3.3 测定生化指标 取已制备的大鼠血清液和脑组织匀浆液参照南京建成生物工程研究所提供的试剂盒(考马斯亮蓝蛋白浓度, Ca^{2+} -ATP 酶, SOD)操作说明操作。

2.4 数据处理 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析。数据采以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对神经功能缺损评价及脑组织含水量的影响 贝加灵高、中、低剂量组和尼莫地平组神经功能评分均小于模型组,有极显著性差异 ($P < 0.01$),说明贝加灵和尼莫地平对脑缺血再灌注后神经功能有保护作用。空白乳剂组神经功能评分大于模型组,但

是无显著性差异。模型组的大脑含水量高于假手术组,有极显著性差异 ($P < 0.01$),说明脑缺血再灌注后脑组织细胞或血脑屏障通透性增加造成脑水肿;乳剂高、中剂量组和尼莫地平组的大脑含水量低于模型组,有极显著性差异 ($P < 0.01$),贝加灵低剂量组的大脑含水量低于模型组,有显著性差异 ($P < 0.05$),说明该药物各剂量和尼莫地平减轻脑缺血再灌注后脑组织细胞或血脑屏障通透性增加;空白乳剂组的大脑含水量低于模型组,但是无显著性差异,说明空白乳剂对脑缺血再灌注后脑组织细胞或血脑屏障通透性无影响。见表 1。

表 1 贝加灵对大鼠神经功能缺损评分及脑组织含水量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	神经功能评分 /分	大脑含水量/%
假手术	-	0.00 ± 0.00	78.97 ± 0.65 ²⁾
模型	-	1.89 ± 0.68	81.03 ± 1.24
贝加灵	2.66	1.06 ± 0.80 ²⁾	79.33 ± 1.46 ²⁾
	1.33	1.00 ± 0.84 ²⁾	79.34 ± 1.01 ²⁾
	0.67	0.89 ± 0.94 ²⁾	79.72 ± 1.87 ¹⁾
尼莫地平	0.4	0.91 ± 0.97 ²⁾	79.24 ± 0.76 ²⁾
空白乳剂	-	1.92 ± 0.82	80.53 ± 1.72

注:与模型组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 对 SOD, Ca^{2+} -ATP 酶活力的影响 模型组的 SOD, Ca^{2+} -ATP 酶活力低于假手术组,有显著性差异,说明脑缺血再灌注后血液的 SOD、脑组织中 Ca^{2+} -ATP 酶活力降低,促进血液中超氧阴离子自由基的产生;贝加灵高、中、低剂量组、尼莫地平组的血液 SOD、脑组织 Ca^{2+} -ATP 酶含量均高于模型组,有显著性差异 ($P < 0.05$),说明上述给药组药物能抑制脑缺血再灌注后血液中超氧阴离子自由基的产生,并且提高脑缺血再灌注后 Ca^{2+} -ATP 酶活力以增加能量代谢;空白乳剂组的血液 SOD、脑组织 Ca^{2+} -ATP 酶活力高于模型组,但是无显著性差异,说明空白乳剂对脑缺血再灌注后血液的 SOD、脑组织 Ca^{2+} -ATP 酶活力基本无影响。见表 2。

4 讨论

人们对脑缺血的发病机制认识经历了一个漫长的过程,从最初仅停留在脑血流量减少、缺血缺氧、能量代谢障碍的表象认识,逐渐扩展深入到细胞分子方面,其发病机制涉及脑组织能量代谢缓慢、兴奋性氨基酸毒性、自由基损伤、钙超载、神经细胞凋亡等多个环节^[4],是一个复杂的病理过程。

表2 贝加灵对大鼠血清 SOD, 脑组织 Ca^{2+} -ATP 酶活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹	Ca^{2+} -ATP /U·mg ⁻¹
假手术	-	177.24 ± 22.69 ¹⁾	3.30 ± 3.80 ¹⁾
模型	-	144.98 ± 5.30	0.86 ± 0.83
贝加灵	2.66	177.62 ± 5.22 ¹⁾	3.44 ± 3.73 ¹⁾
	1.33	160.35 ± 41.14 ¹⁾	3.19 ± 1.30 ¹⁾
	0.67	167.28 ± 6.45 ¹⁾	2.87 ± 0.16 ¹⁾
尼莫地平	0.4	166.91 ± 43.59 ¹⁾	2.33 ± 4.2 ¹⁾
空白乳剂	-	149.26 ± 10.45	1.05 ± 2.99

脑缺血时氧自由基生成和清除系统平衡被打破,产生大量自由基,其能攻击细胞膜,导致花生四烯酸的释放,破坏细胞膜;打开电压依赖性钙通道,使细胞内钙离子超载;引发脂质过氧化,也可造成细胞成分间的交联^[4]。缺血缺氧使 ATP 含量减少, Ca^{2+} 进入线粒体增多,使线粒体功能受损,细胞色素氧化酶系统功能失调,以致进入细胞内的氧经单电子还原而形成的氧自由基增多^[5]。缺血、缺氧是诱发脑水肿的主要原因:①缺氧直接扩张脑血管,增加脑血流量和脑毛细血管内压,组织液增多;②缺氧致代谢性酸中毒可以增加毛细血管壁通透性,造成间质性脑水肿;③缺氧致 ATP 生成减少,细胞膜钠泵功能障碍,细胞内钠水滞留;④脑充血和脑水肿使颅内压增高,颅内压高又可压迫脑血管加重脑缺氧,形成恶性循环^[5]。

本实验结果显示,贝加灵喷雾剂可显著减轻局

灶性脑缺血大鼠的脑组织含水量,明显改善脑缺血引起的脑神经细胞病变性,这提示其可降低缺血性脑组织的含水量;贝加灵喷雾剂可显著提高缺血性血清中 SOD 活力,表明其可通过抗自由基作用对缺血脑细胞起到保护作用;贝加灵喷雾剂可显著增强缺血性脑组织中 Ca^{2+} -ATP 酶活力,提示其可能通过改善缺血脑细胞能量代谢对受损脑细胞起到修复作用。总之,贝加灵喷雾剂能对抗缺血而导致的大鼠脑组织病理损伤,增强大鼠机体内抗自由基能力,改善脑组织能量代谢,对大鼠局灶性脑缺血损伤有一定修复保护作用。这也为贝加灵喷雾剂治疗缺血性脑损伤疾病的可行性提供一定的实验依据,对后期药物进一步研究打下了扎实基础。

[参考文献]

- [1] 王淑民,闫美玲. 抗脑缺血药物的作用机制研究进展[J]. 中国药物应用与监测,2008,5(3):30.
- [2] 史亚军,施俊辉,陈世彬,等. 黄芩苷治疗缺血性脑损伤研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(7):218.
- [3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20 (1): 842.
- [4] 陈奇. 中药药效研究思路与方法[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:214.
- [5] 金惠铭,王建枝. 病理生理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:85,204.

[责任编辑 聂淑琴]