

薯蓣皂苷与冰片配伍对大鼠局灶性脑缺血的保护作用

张晓双*, 张恩户, 申昕, 陈静茹
(陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] 目的: 考察薯蓣皂苷与冰片配伍对大鼠局灶性脑缺血的保护作用。方法: 大鼠随机分为假手术组、模型对照组、薯蓣皂苷和冰片配伍处方 1~6 组, 其中薯蓣皂苷和冰片配伍按照基线等比增减设计方法, 各组均灌胃给药, 1 次/d, 给药体积 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 连续给药 7 d。末次给药后 1 h 采用线栓法阻塞大脑中动脉制备大鼠局灶性脑缺血模型, 大鼠清醒后立刻行为学评分, 造模后 24 h TTC 染色法测定脑梗死面积和脑含水量。结果: 与模型对照组比较, 处方 2, 3 能降低神经学行为评分、脑梗死面积、脑含水量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 处方 1 能降低脑梗死面积、脑含水量 ($P < 0.05$), 处方 4, 5, 6 无显著性差异。结论: 薯蓣皂苷和冰片抗大鼠局灶性脑缺血的最佳配比为 8:2, 6:4。

[关键词] 薯蓣皂苷; 冰片; 局灶性脑缺血; 基线等比增减设计

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)24-0151-03

The Protective Effects of Compatibility of Dioscin and Borneol on the Focal Cerebral Ischemia in Rats

ZHANG Xiao-shuang*, ZHANG En-hu, SHEN Xin, CHEN Jing-ru
(Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects of compatibility of dioscin and borneol on the focal cerebral ischemia in rats. **Method:** Rats were randomly divided into control group, model control group, groups with prescription 1-6 of compatibility of diosgenin and borneol, compatibility of diosgenin and borneol was based on the method of increase-decrease design method of experiment with baseline geometric proportion. Rats were given medicine of $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ intragastrically, once a day, lasting 7 days, after 1 h of the last administration, focal cerebral ischemia model was established in rats of the middle cerebral artery, determining neurological behavior score after the rats were awake immediately, TTC staining was used to determine method infarction area and brain water content after 24 h of model. **Result:** Compared with model group, rescription 2, 3 could alleviate neurological score, decrease infarct size, brain water content ($P < 0.05$, $P < 0.01$), prescription 1 can reduce neurological score, infarct size and brain water content ($P < 0.05$), prescription 4, 5, 6 have no significant differences. **Conclusion:** The best ratio of dioscin and borneol are 8:2 and 6:4 in terms of protection on focal cerebral ischemia in rats.

[Key words] dioscin; borneol; focal cerebral ischemia; increase-decrease design method of experiment with baseline geometric proportion

薯蓣皂苷广泛存在于薯蓣科、百合科、豆科等

植物中, 临床用于冠心病、动脉粥样硬化、高血脂等心血管疾病, 但抗脑缺血的研究报道较少。本室前期研究证实了薯蓣皂苷与冰片配伍对脑缺血大鼠有一定的保护作用^[1]。本实验将按照基线等比增减设计方法研究薯蓣皂苷和冰片配伍对大鼠局灶性脑缺血保护作用, 揭示两者治疗脑缺血的最佳配伍关系。

[收稿日期] 20110603(014)

[基金项目] 陕西省教育厅科研计划项目(2010JK487); 陕西中医学院中药药理重点学科项目

[通讯作者] * 张晓双, 讲师, 硕士, 从事心脑血管药理研究, Tel: 13992019151, E-mail: sxzyxzs@126.com

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,雄性,SPF 级,体重 250 ~ 280 g。由西安交通大学医学院实验动物中心提供,实验动物质量许可证号 SCXK(陕)2007-001。

1.2 药物及试剂 薯蓣皂苷,陕西中鑫生物技术有限公司生产,批号 110212,高效液相色谱技术(HPLC)检测薯蓣皂苷含量 98.09%;冰片购于陕西中医药大学附属医院中药房,批号 20110320。水合氯醛,上海山浦化工有限公司生产,批号 20100104;2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC),国药集团化学试剂有限公司,批号 F20090416;其他试剂均为国产,分析纯。

1.3 仪器 AR1140 电子天平,奥豪斯国际贸易(上海)有限公司生产;DHG-9076A 电热恒温鼓风干燥箱,上海跃进医用光学器械厂生产。

2 方法

2.1 配比处方设计^[2] 按照基线等比增减设计方法,以薯蓣皂苷为主药,每次 400 mg 为配比基线,在总量薯蓣皂苷(A 药)含量以 20% 递减,冰片(B 药)药含量以 20% 递增,向两侧扩展,最后扩大到极点,以此确定药物之间的最佳配伍配比关系。以行为学评分、脑梗死面积、脑含水量为考察指标。组分配比例见表 1。

表 1 薯蓣皂苷(A)和冰片(B)组分配比例

组别	处方/mg					
	1	2(8:2)	3(6:4)	4(4:6)	5(2:8)	6
A	400	320	240	160	80	0
B	0	80	160	240	320	400

2.2 分组与给药 大鼠按体质量随机分为 8 组:假手术组、模型对照组、处方 1 ~ 6 组,假手术组 10 只,其余各组 12 ~ 13 只。各组均 ig 给药,1 次/d,给药体积 10 mL·kg⁻¹,连续 7 d。假手术对照组和模型对照组给予相同体积的 1% 的吐温溶液 ig,其余各组皆用 1% 的吐温溶液溶解。

2.3 造模 末次给药后 1 h 采用线栓法制备大鼠中动脉局灶性脑缺血模型^[3]。水合氯醛 350 mg·kg⁻¹ ip 麻醉,仰位固定,在无菌操作下,用手术刀从颈正中纵向切约 3 cm 长口,锐钝结合分离出右侧颈总动脉(CCA),小心剥离附着于 CCA 上的迷走神经和肌肉,绕 CCA 穿两根 4 号手术线,以备结扎,沿着 CCA 向头部方向分离出颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),绕 ECA 穿一根 4 号手术线,分别用手术线

结扎 CCA 和 ECA,另有一线留于 CCA 做固定栓子线(鱼线)用。用血管夹夹闭 ICA,用眼科剪在 CCA 近心端开一小口,开口处离 ECA 和 ICA 分叉处 0.5 cm,从切口处插入前端磨成球形(栓子)的栓子线(直径 0.28 mm,距头端 18 mm 处作标记),插入深度 18 mm(所记标记基本位于 ECA 和 ICA 分叉处),此时感觉有阻力感时停止进线,这样阻塞大脑中动脉导致脑缺血,结扎固定栓子线,剪去剩余部分,消毒后,逐层缝合肌肉和皮肤。im 0.5% 青霉素 0.1 mL 保温单笼饲养。假手术组仅进行麻醉和血管分离,不插入栓子线,其余各组手术步骤按上述方法进行。用于指标检测动物,假手术组 10 只,其余各组 9 只。

2.4 观察指标

2.4.1 行为学评分 大鼠清醒后立刻观察动物行为障碍程度,按照 Zea Longa 5 级评分法^[4]评定进行神经行为学功能缺损评分,分值越高,脑损伤越严重。评分标准:无明显神经病学症状,0 分;不能完全伸展左侧前爪,1 分向左侧旋转;2 分行走时向左侧倾倒,3 分昏迷;不能自行行走,4 分。

2.4.2 TTC 染色测定脑梗死面积 神经行为学评分后,断头处死动物,取脑。除去嗅球、小脑和低位脑干,称重后,置 -20 °C 冰箱冷冻 10 min,冠状方向平均切成 4 ~ 5 片厚约 2 mm 的脑片。将脑片迅速放入 2% TTC 染液中,37 °C 避光孵育 30 min,隔 10 min 翻动 1 次,翻动第 2 次后取出,置 4% 多聚甲醛液中避光保存 24 h。TTC 被线粒体过氧化氢酶还原,诱发产生深红色产物而使正常组织染成红色,缺血组织的线粒体损伤,不能诱导染色反应而呈白色。用数码相机等焦距下拍照(镜头距组织块的距离相等),采用 ImagePro Plus 6.0 图像分析系统分析,计算脑组织缺血面积比值。以梗死灶面积占全脑面积的百分率进行分析。

2.4.3 脑组织含水量 术后 24 h,按 2.4.2 取脑称质量后将其置于 100 °C 电热恒温鼓风干燥箱内烘烤 24 h 后称取干质量,计算脑含水量。

$$\text{脑含水量} = (\text{湿质量}(\text{g}) - \text{干质量}(\text{g})) / \text{湿质量}(\text{g}) \times 100\%$$

2.5 统计方法 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计学软件进行 *t* 检验。*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

与假手术组比较,模型对照组行为学评分显著增高、脑梗死面积增加、含水量显著增高(*P* <

0.01),说明脑缺血模型成功。与模型对照组相比,处方2,3能降低行为学评分、脑梗死面积、脑含水量($P < 0.05, P < 0.01$)。处方1能降低脑梗死面积、

脑含水量($P < 0.05$)。处方4,5,6与模型对照组比较无显著性差异。结果提示,处方2,3疗效较好,能改善脑缺血的3个指标。见表2。

表2 薯蓣皂苷与冰片配伍对大鼠局灶性脑缺血行为学评分、脑梗死面积、脑含水量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	行为学评分/分	面积比/%	脑含水量/%
假手术	-	10	0 ± 0 ²⁾	0 ± 0 ²⁾	76.09 ± 2.49 ²⁾
模型对照	-	9	2.67 ± 0.71	27.36 ± 3.29	83.05 ± 2.06
处方1	400 + 0	9	2.00 ± 0.93	23.62 ± 2.93 ¹⁾	80.52 ± 1.77 ¹⁾
处方2	320 + 80	9	1.56 ± 0.88 ²⁾	20.22 ± 2.94 ²⁾	78.77 ± 3.45 ²⁾
处方3	240 + 160	9	1.67 ± 1.00 ¹⁾	22.45 ± 4.39 ¹⁾	80.80 ± 1.63 ¹⁾
处方4	160 + 240	9	1.89 ± 0.93	24.47 ± 2.89	81.65 ± 2.05
处方5	80 + 320	9	2.11 ± 0.60	24.58 ± 2.35	81.39 ± 2.77
处方6	0 + 400	9	2.22 ± 0.83	25.08 ± 4.07	82.22 ± 1.24

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

薯蓣皂苷(dioscin, D)是甾体总皂苷的一种,近年来随着分离提取技术的不断发展,多种薯蓣皂苷被分离出来,并发现其生物活性,尤其在心血管方面有研究表明其具有活血化瘀、行气止痛、宣痹通阳、补益气血等功能,具有减慢心率、降低血压、改善心脏舒缩功能及保护缺血损伤心肌等作用。地奥心血康胶囊主要成分为薯蓣皂苷,占药物成分量的30%,用于治疗心绞痛患者有确切疗效,近年来临床观察到地奥心血康对缺血性脑血管疾病有一定疗效^[5],但报道病例少且缺乏基础研究。目前用于治疗脑血管及中枢神经系统疾病的许多中成药都含有冰片。中医理论认为,冰片“芳香走窜”,“引药上行”,“独行则势弱、佐使则有功”。冰片在胃肠道吸收迅速,极易透过血脑屏障进入脑内^[6]。冰片可开放血脑屏障,促进某些水溶性大分子物质和药物透过血脑屏障进入脑内^[7-10]。这些都为冰片作为引药(使药)提供了佐证。本课题将薯蓣皂苷和冰片配伍,目的是使薯蓣皂苷能够更多的透过血脑屏障而发挥作用。实验结果表明,薯蓣皂苷与冰片配伍能降低脑缺血大鼠行为学评分、减小脑梗死面积,减少脑含水量,表明冰片可以很好的促使薯蓣皂苷透过血脑屏障,两药合用有协同作用,8:2,6:4是薯蓣皂苷和冰片抗大鼠局灶性脑缺血的最佳配比。其确切作用机制有待进一步探讨。

[参考文献]

[1] 王光建,张波,张晓双,等.薯蓣皂苷与冰片配伍对MCAO致大鼠局灶性脑缺血的影响[J].中药药理与临床,2010,26(5):54.

[2] 商洪才,张伯礼,王永炎,等.一种适用于中药小复方配比优选设计方法的建立[J].中国实验方剂学杂志,2003,9(3):1.

[3] 徐叔云,卞如濂,陈修,等.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1062,1066.

[4] Zea Longa E L, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke,1989,20:84.

[5] 师勇珍,地奥心血康在缺血性脑血管疾病中的治疗作用[J].实用医技杂志,2004,12(11):2758.

[6] 梁美容,刘启德,黄天来,等.冰片在大鼠血清和脑组织中的药代动力学特征[J].中药新药与临床药理,1993,4(4):38.

[7] 梁美容,叶少梅,张银卿,等.冰片对兔、大鼠脑组织伊文氏蓝染色作用的观察[J].广州中医学院学报,1993,10(4):211.

[8] 刘启德,梁美容,陈芝喜,等.冰片对庆大霉素透血脑屏障的影响[J].广州中医学院学报,1994,11(1):34.

[9] 徐伟,王宗锐.薄荷醇及冰片对磺胺嘧啶和伊文氏蓝在脑中分布的影响[J].中药药理与临床,1995(6):31.

[10] 王宁生,梁美容,刘启德,等.冰片“佐使则有功”之实验研究[J].中医杂志,1994,35(1):46.

[责任编辑 聂淑琴]