

清脑宣窍滴丸对大鼠急性脑缺血再灌注损伤保护作用的研究

王斌^{1,2}, 孙建宁^{2*}, 石任冰², 张硕峰², 孙文燕²

(1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 北京中医药大学, 北京 100102)

[摘要] 目的: 研究清脑宣窍滴丸对急性脑缺血损伤的保护作用。方法: ig 给予清脑宣窍滴丸 (180, 90, 45 mg·kg⁻¹ 剂量), 每天 1 次, 连续 3 d, 采用线栓法致大鼠大脑中动脉缺血再灌注 (MCAO) 模型, 缺血 2 h 再灌注 22 h, 评分法评价神经损伤行为症状异常; 放射免疫法检测血清中神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 的活性; HE 染色法观察脑组织病理形态的变化。结果: 各给药组可不同程度改善损伤模型大鼠 6 h 和 22 h 的神经缺损症状, 清脑宣窍滴丸 180 mg·kg⁻¹ 组与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$); 清脑宣窍滴丸 45, 90, 180 mg·kg⁻¹ 组可降低模型大鼠 NSE 活性; 病理结果显示, 清脑宣窍滴丸组正常神经细胞数量明显增多, 变性坏死组织范围缩小、程度减轻。结论: 清脑宣窍滴丸对脑缺血有保护作用。

[关键词] 清脑宣窍滴丸; 脑缺血; 神经症状; 神经元特异性烯醇化酶

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0151-04

Protective Effect of Qingnao Xuanqiao Dropping Pill on Experimental Ischemic Injury in Rats

WANG Bin^{1,2}, SUN Jian-ning^{2*}, SHI Ren-bing², ZHANG Shuo-feng², SUN Wen-yan²

(1. Department of Pharmacology, Shanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China;

2. Department of Pharmacology, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] Objective: To study the protective effect of Qingnao Xuanqiao Dropping Pill on acute cerebral ischemia in rats. **Method:** Intragastric gavage of Qingnao Xuanqiao Dropping Pill (high, medium and low dose), once a day for three days. The last day animal model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) induced by suture-occluded method was adopted. Scoring method of ischemia for 2 h and reperfusion for 22 h was used to evaluate the abnormal behaviour by nerve injury. Radioimmunoassay was used to evaluate NSE activity in serum. HE staining was employed to observe pathological morphology in brain tissue. **Result:** Each administrated group could improve the nerve defect symptoms of model rats at 6 h and 22 h to some extent. Compared with model group, 180 mg·kg⁻¹ group of Qingnao Xuanqiao Dropping Pill was significantly different ($P < 0.05$); 45, 90, 180 mg·kg⁻¹ group of Qingnao Xuanqiao Dropping Pill could reduce NSE activity of the model rats. Pathological results showed the number of normal nerve cells in Qingnao Xuanqiao Dropping Pill group was increased significantly, the scope and the degree of necrotic tissue was reduced. **Conclusion:** Qingnao Xuanqiao Dropping Pill has a protective effect on cerebral ischemia.

[Key words] Qingnao Xuanqiao Dropping Pill; ischemial; neurological symptoms; neuron-specific enolase

[收稿日期] 20100512(005)

[基金项目] 北京市教委产学研合作项目 (CXY1002604010)

[通讯作者] * 孙建宁, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为心脑血管病的防治研究, Tel: 010-84738626, E-mail: jn_sun@sina.com

缺血性脑血管病以其高发病率、高致残率、高死亡率和复发率严重危害着人类健康, 研究中药及其复方防治缺血性脑病具有重要意义。清脑宣窍方是王永炎院士的临床经验方, 由三七、栀子、冰片组成, 组方遵循中医药理论, 功效为醒神开窍、解毒通络, 在治疗缺血性脑中风急性期和恢复期早期具有

很好的疗效,经北京中医药大学化学系提取纯化加工为清脑宣窍滴丸。前期研究发现,清脑宣窍滴丸具有一定的抗脑缺血作用^[1,2],本文拟对清脑宣窍滴丸对脑缺血后神经症状、特异性标志酶、脑组织病理形态的影响,进一步探讨其抗脑缺血损伤的作用。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,体重 250 ~270 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2007-0001。

1.2 药品与试剂 试验用清脑宣窍滴丸全方的提取物,由北京中医药大学化学系石任兵教授提供,棕黄色粉末,临床用药剂量:每人每日 0.58 g,约 10 mg·kg⁻¹。批号 20080805,用饮用水配制。安宫牛黄丸,北京同仁堂制药厂生产,每丸含生药 3 g,功效:清热解毒,镇惊开窍,批号 1010383。复方丹参滴丸,天津天士力制药股份有限公司,口服或舌下含服,1 次 10 丸,3 次/d,每丸含生药 27 mg。批号 20071011。氯化三苯基四氮唑、多聚甲醛,北京化学试剂公司。神经元特异性烯醇化酶(NSE)放免测定试剂盒,北京北方生物技术研究所。

1.3 仪器 外科手术灯,上海医疗器械五厂;钓鱼尼龙线,直径 0.25 mm,日本;AEG-220 电子分析天平,日本 Shimadzu 公司。SN-695 型放射免疫计数器,上海核福光电仪器有限公司。

2 方法

2.1 分组及给药 将大鼠随机分为 6 组,即假手术对照组、模型组、清脑宣窍滴丸 45, 90, 180 mg·kg⁻¹ 组(分别相当于人用量的 4.5, 9, 18 倍)、安宫牛黄丸按生药量计 300 mg·kg⁻¹ 组(相当于人用量的 6 倍),每组 12 ~13 只。ig 给药,1 次/d,第 3 次给药后 1 h 造模,造模后再给药 1 次,假手术对照组、MCAO 模型组给予等量的饮用水(10 mL·kg⁻¹)。

2.2 造模方法 大鼠 10% 水合氯醛(3.5 mL·kg⁻¹) 麻醉后,将其仰卧固定。分离右侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)及颈外动脉(ECA),结扎 ECA 与 CCA,用动脉夹夹闭 ICA 远心端后,迅速于 ECA 与 ICA 分叉处作一切口,插入一端加热成光滑球形并涂了多聚赖氨酸的尼龙线(直径为 0.25 mm,距球端 18 mm 处作标记),插入深度为 18 mm,实现大脑中动脉阻塞导致脑缺血。结扎入口处,尼龙线外留约 1 cm,缝合皮肤,用电热毯维持大鼠的体温。2 h 后轻轻提拉所留线头至略有阻力,实现大脑中动

脉再灌注,造模完成。假手术组同样分离 CCA, ICA, ECA,但不结扎,缝合皮肤。

2.3 神经症状评分 按照 Zea Longa 5 级评分法^[3],分别于术后 6 h(即再灌注 4 h)和 24 h(即再灌注 22 h)进行评定,0 分及昏迷不醒者剔除。评分标准:无明显神经症状,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;不能自行行走,4 分。

2.4 血清 NSE 水平放射免疫测定 试剂盒组成: NSE 抗体包被球,¹²⁵I-抗 NSE 溶液, NSE 标准(S0-S5): 0, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 μg·L⁻¹。测定方法:采用双抗体夹心法进行测定。样品中的 NSE 与包被球上的 NSE 抗体结合,再与¹²⁵I-抗 NSE 结合,形成免疫复合物,测定包被球的放射性计数(CPM)值,即可检测样品中的 NSE 浓度。

结果计算:各对照点及样品的 cpm 值减去 NSE 的 cpm 值,以对照品的 cpm 值和相对应的标准物浓度进行回归得到标准曲线方程,将样品的 cpm 值带入方程求出样品 NSE 的质量浓度(μg·L⁻¹)。

2.5 清脑宣窍滴丸对 MCAO 模型大鼠海马组织病理形态的影响

2.5.1 灌注固定、取材、组织处理 于术后 24 h,每组随机取 3 只大鼠,经 10% 水合氯醛 ip 麻醉(3.5 mL·kg⁻¹),常规胸腹联合切口,充分暴露心脏,经左心室插管,以 37 ℃ 生理盐水冲洗 5 min 后,用 4% 多聚甲醛 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 7.4) 心内灌注固定,待固定充分后,开颅取全脑,冠状位取视交叉向尾端 3 mm ~4 mm 组织块,投入相同固定液于 4 ℃ 固定 1 周。置于真空组织脱水机中以梯度乙醇脱水及二甲苯透明,石蜡包埋,蜡块 4 ℃ 保存。

2.5.2 苏木素-伊红染色 (Haematoxylin-eosin staining, HE) 石蜡制成 5 μm 厚度的同一冠状面石蜡切片,常规脱蜡水化处理后,HE 染色。

2.5.3 图像处理及统计分析 在 Olympus 光学显微镜下观察 HE 染色切片,LEICA 数字显微照相机采集图像,在各组动物缺血侧(右侧)皮层、海马 CA1, CA3 区各选取 2 个视野,利用 NIS-Elements Basic Research 图像采集分析系统计算每个视野内完整的锥体细胞数。

2.6 统计方法 运用 SPSS 11.5 for windows 进行数据统计分析,数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 ANOVA 分析。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 清脑宣窍滴丸对 MCAO 大鼠神经症状评分的影响 假手术组大鼠没有神经功能缺损表现, 其他组大鼠缺血 6 h 出现了不同程度的神经功能缺损症状, 22 h 有所加重。表现为左侧前爪不能完全伸展, 行走时向左侧旋转或倾倒, 甚至不能行走。各给药组可不同程度改善损伤模型大鼠 6 h 和 22 h 的神经缺损症状, 清脑宣窍滴丸 $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和安宫牛黄丸 300 mg 生药/kg 组与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 清脑宣窍滴丸对 MCAO 大鼠神经症状评分的影响 (珣±s)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	缺血再灌 6 h	缺血再灌 24 h
假手术	-	12	0 ±0 ¹⁾	0 ±0 ¹⁾
模型	-	13	2.83 ±0.55	3.02 ±0.57
清脑宣窍滴丸	45	10	3.69 ±0.58 ¹⁾	3.84 ±0.71
	90	9	3.04 ±0.79	3.19 ±0.96
	180	10	2.90 ±0.57 ¹⁾	2.96 ±0.61 ¹⁾
安宫牛黄丸	300	9	2.91 ±0.64 ¹⁾	2.94 ±0.66 ¹⁾

注: 各组与模型组相比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ (表 2 同)。

3.2 脑组织外观变化 假手术组大鼠两侧大脑半球对称, 脑底结构、大脑中动脉均完好无损, 沟、回清楚, 未见水肿。模型组大鼠大脑冠状切面可见缺血侧(右侧)大脑中动脉供血中心区有明显的缺血坏死灶, 同时可见缺血侧脑室扩大及中线移位。

3.3 清脑宣窍滴丸对 MCAO 大鼠血清 NSE 水平的影响 结果表明: NSE 在假手术组血清低水平表达, 模型组 NSE 表达水平显著升高, 与假手术组相比, 具有显著性差异 ($P < 0.01$)。各给药组均可降低模型大鼠 NSE 水平。同模型组相比, 清脑宣窍滴丸 $45, 90, 180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和复方丹参滴丸 $81 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组具有明显差异 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 清脑宣窍滴丸对 MCAO 大鼠血清中 NSE 活性的影响 (珣±s)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	NSE/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术	-	12	2.88 ±0.63 ²⁾
模型	-	13	4.72 ±1.16
清脑宣窍滴丸	45	10	3.48 ±0.78 ¹⁾
	90	9	3.54 ±0.61 ¹⁾
	180	10	3.62 ±0.82 ¹⁾
复方丹参滴丸	81	9	3.40 ±1.20 ¹⁾

3.4 脑切片 HE 染色 假手术组大鼠皮层、海马 CA1, CA3 区脑组织结构完整, 神经元密集, 层次清晰, 胞浆丰富, 胞核居中染色清楚, 形态正常; 血管内皮细胞完整, 连接紧密, 未见瘀血和血细胞嵌塞, 管周组织致密。造模后大鼠脑组织出现了明显的损伤和局部的炎症反应。模型组大鼠脑病灶区明显水肿, 着色明显变浅, 可见神经元排列散乱, 大量变性坏死, 密度降低, 胞核不清, 固缩深染, 胞体皱缩, 胞膜与周围分界明显, 间质疏松呈筛状, 神经元脱失, 胶质细胞增生明显; 血管内皮细胞肿胀, 管壁扭曲, 管周间隙增大。对侧皮层神经细胞结构基本正常, 无明显神经元缺失及血管内皮细胞的肿胀。各给药组与模型组相比, 正常神经细胞数量明显增多, 变性坏死组织范围缩小、程度减轻。结果见图 1。

4 讨论

脑缺血再灌注损伤后, 导致神经元损伤及神经功能损害, 出现神经缺损症状, 源于神经元的大量坏死或脱失。目前多采用体征评分法评价神经缺损程度, 参考 longa 及 Bederson 的方法, 研究发现在术后 24 h 或更长时间进行的神经症状评分随缺血时间延长逐渐升高, 约 60 ~90 min 可出现神经系统体征异常, 缺血 120 ~180 min 较为理想, 术后 24 h 大鼠神经功能受损症状有所好转, 存活更长时间的大鼠神经功能缺损症状会有不同程度地恢复^[4], 术后 7 d 时, 即使原先神经功能缺损评分很高的大鼠也不能观察到原地旋转。亦有人^[5]采用爬杆记分法检测神经功能缺损情况, 根据大鼠爬杆的表现和远近给予评分。此外 Carcial H 等^[6]将缺血损伤后的大鼠神经功能缺损共分 6 项, 采用 18 分制。本研究按照 Zea Longa 5 级评分法, 结果发现模型组出现了右侧肢体瘫痪症状, 表现为左侧前爪不能完全伸展, 行走时向左侧旋转或倾倒, 甚至不能行走。清脑宣窍滴丸 $90, 180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可明显改善模型大鼠神经缺损症状, 得分显著降低。实验研究表明, 脑梗死灶的大小与脑脊液 (CSF) 中 NSE 的水平有关, 梗死面积大, 则 CSF 中 NSE 水平高。对大脑中动脉闭塞的大鼠给予脑保护剂 MK801 治疗, NSE 水平随病情改善而有所减低^[7]。本实验选择放射免疫分析法 (RIA) 检测外周血清的 NSE 含量, 实验结果显示, 脑缺血 2 h 时再灌 22 h 后, 外周血清 NSE 明显升高, 数值达 $4.72 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明脑神经元受损严重, 清脑宣窍滴丸组均有不同的降低, 显示该药能减轻神经元损伤,

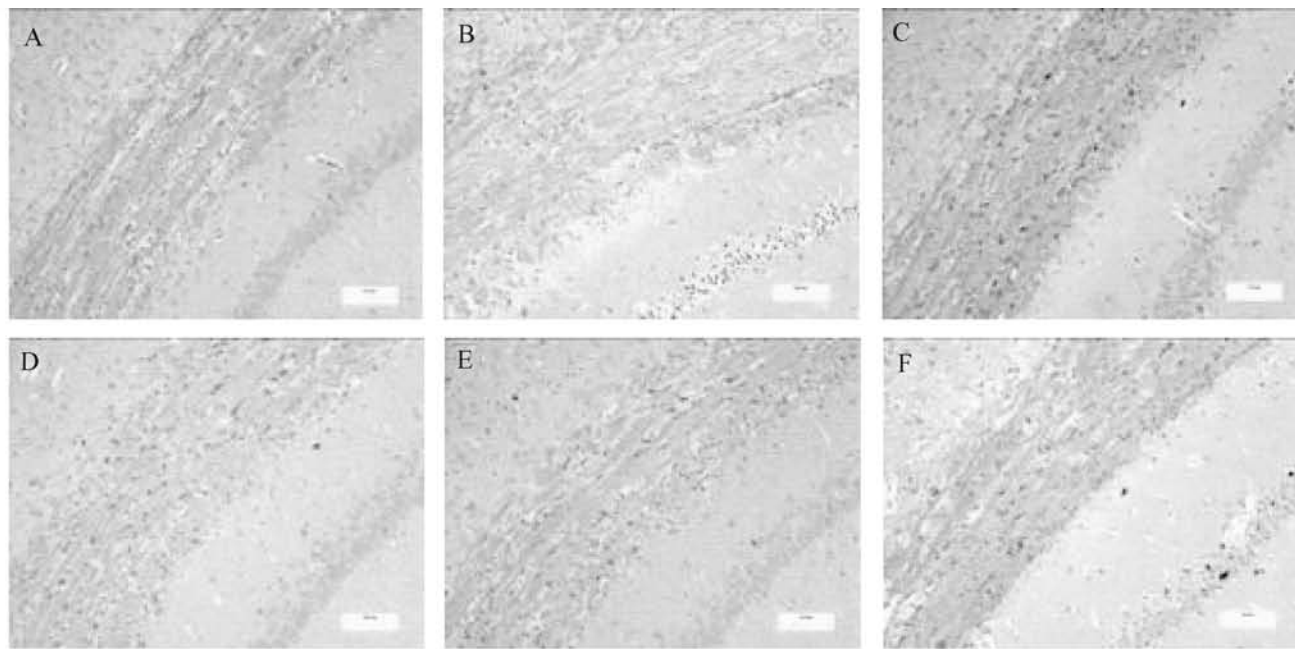


图 1 清脑宣窍滴丸对 MCAO 模型大鼠海马组织 (CA1 区) 病理形态的影响 (SABC 法, $\times 200$)

A. 假手术; B. 脑缺血再灌注模型; C. 清脑宣窍滴丸 $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 清脑宣窍滴丸 $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; E. 清脑宣窍滴丸 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;
F. 复方丹参滴丸 $81 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

对脑缺血再灌注损伤有保护作用, 其实验结果和文献一致^[8]。

清脑宣窍滴丸则显示出一定的脑保护作用, 表现为降低神经症状评分, 血清中 NSE 酶活性升高, 病理形态有一定的改善。

[参考文献]

[1] 王斌, 于绍坤, 孙建宁, 等. 清脑宣窍滴丸对急性脑缺血损伤大鼠的保护作用及机理初探 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1): 37.
[2] 王斌, 孙建宁, 张硕峰, 等. 清脑宣窍滴丸对实验性急性脑缺血损伤大鼠一氧化氮及其合酶的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(2): 39.
[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): 84.

[4] Memezawa H, Minamisawa H, Smith M L, et al. Ischemic penumbra in a reversible middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. Exp Brain Res, 1992, 89(1): 67.
[5] 高晓群, 段东晓, 邢莹, 等. 低氧预适应对大鼠脑缺血再灌注神经细胞凋亡及 Bcl-Bax 表达的影响 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2004, 39(5): 810.
[6] Garcia J H, Wagner S, Liu K F, et al. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats: statistical validation [J]. Stroke, 1995, 27(9): 627.
[7] Hatfield R H, Mckernan R M. CSF neuron specific enolase as a quantitative marker of neuronal damage in a rat stroke model [J]. Brain Res, 1992, 577(2): 249.
[8] 陈立英, 廖仁昊, 梁容仙, 等. 阿司匹林预处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的神经保护作用 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 5(8): 710.

[责任编辑 聂淑琴]