

侯氏黑散对大鼠大脑中动脉闭塞模型缺血脑组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及一氧化氮合酶活性的影响

张秋霞, 赵 晖*

(首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

[摘要] 目的: 观察侯氏黑散对大鼠大脑中动脉闭塞模型大鼠缺血脑组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、一氧化氮合酶(NOS)活性以及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的影响。方法: 采用线栓法复制大鼠大脑中动脉闭塞模型, 利用比色法观察侯氏黑散对大鼠缺血脑组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、NOS、iNOS活性的影响。结果: 与模型组比较, 侯氏黑散组大, 中剂量组缺血脑组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性显著提高($P < 0.05$)。侯氏黑散大, 中, 小剂量组 NOS、iNOS 的活性明显降低($P < 0.05$)。结论: 侯氏黑散可能是通过提高脑组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性和降低 NOS、iNOS 的活性保护和修复缺血性脑损伤。

[关键词] 侯氏黑散; 大脑中动脉闭塞; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶; 一氧化氮合酶

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)07-0031-03

The Effects of Houshiheisan on Activeness of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and NOS in Cerebral Tissue of Middle Cerebral Artery Occlusion Model in Rat

ZHANG Qiu-xia, ZHAO Hui*

(Preclinical Department of College of TCM, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Houshiheisan on activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, NOS and iNOS in cerebral tissue of middle cerebral artery occlusion model in rat. **Methods:** Middle cerebral artery occlusion model was replicated by string ligation. Using behavioral test, the neurological deficiency of each group after operation was evaluated. The change in $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, NOS and iNOS was detected by colorimetry. We observed the effects of Houshiheisan on activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, NOS and iNOS in cerebral tissue of middle cerebral artery occlusion model. **Results:** In comparison with model group, Houshiheisan can increase the activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in ischemic tissue of brain with the large or middle dose. Moreover Houshiheisan decreased activities of NOS and iNOS in ischemic tissue of brain with the large, middle and lower dose. **Conclusions:** Houshiheisan may increase the activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and decrease activities of NOS and iNOS for protecting the ischemia tissue.

[Key words] Houshiheisan; middle cerebral artery occlusion; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$; iNOS

缺血性脑中风具有发病率高和致残率高的特点。侯氏黑散是医圣张仲景治疗中风的第一方。本文利用比色法观察侯氏黑散对大鼠大脑中动脉闭塞

模型缺血脑组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 NOS 和 iNOS 活性的影响, 探讨其抗脑缺血损伤的机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠, 清洁级, 体重(280~300) g, 由首都医科大学动物中心提供, 合格证号: SCXK(京)72000-0012。

1.2 受试药品及试剂 侯氏黑散(处方为菊花 40 g、白术 10 g、细辛 3 g、茯苓 3 g、牡蛎 3 g、桔梗 8 g、防

[收稿日期] 2007-07-18

[基金项目] 北京市教育委员会科技基金(KM2003100025099)

[通讯作者] * 赵 晖, Tel: (010) 83911635; E-mail: zhaohui8957@sina.com.cn

风 10 g、人参 3 g、黄芩 5 g、当归 3 g、干姜 3 g、川芎 3 g、矾石 3 g、桂枝 3 g) 药材均购自北京同仁堂药店, 由本实验室按常规方法制备, 加水煎煮两次, 每次 1 h, 合并煎液浓缩成相当于生药 $3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。Na⁺-K⁺-ATP 测试盒、一氧化氮合酶(NOS) 测定试剂盒、蛋白质测定试剂盒(考马斯亮兰法) 均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 方法

1.3.1 大鼠大脑中动脉闭塞模型制备 参照 Zea Longa^[1] 的方法, 稍加改进。大鼠以 10% 水合氯醛 $0.35 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ 腹腔麻醉, 仰卧固定, 颈正中切口, 依次暴露右侧颈总、颈外和颈内动脉, 结扎颈总动脉、颈外动脉, 于颈总动脉分叉下方剪一切口, 将预先用酒精灯烧成圆头的尼龙线(长 4 cm, 直径 0.20~0.25 mm) 置于颈内动脉(17~18) mm, 到有轻微阻力感为止, 扎紧动脉残端, 缝合皮肤。假手术组大鼠麻醉后, 仅暴露颈内外动脉分支, 不闭塞大脑中动脉。术中、术后室温严格控制在(24~25) °C, 大鼠体温维持在(36.5~37.5) °C。待大鼠麻醉清醒后即刻观察活动, 动物手术后有明显的左侧偏瘫体征(不能完全伸展左前肢、行走时向左侧倾倒或转圈) 为实验对象。

1.3.2 模型的判定和神经功能缺损评分 参照 Bederson^[2] 10 分法标准进行评分: (1) 提起鼠尾, 观察前肢有无异常表现。凡有左前肢内收、内旋者, 视其轻重评为(1~3) 分。如果躯体向右侧旋转, 评为 4 分。(2) 将大鼠置于金属网上, 向后轻拉鼠尾, 观察大鼠两前肢张力。根据其左前肢肌力下降程度评为(0~2) 分。(3) 将大鼠置于光滑平面上, 观察侧向推挡阻力。根据向左侧推挡阻力下降程度评为(0~2) 分。(4) 大鼠出现左眼上睑下垂、左眼分泌物增多者评为 2 分。对麻醉清醒(术后约 2 h) 大鼠进行评分, 如分值在 2 分或 2 分以上则认为模型制作成功并纳入实验研究, 动物脑缺血 24 h 后再次评分, 其结果作为评价疗效的指标之一。

1.3.3 分组及给药 将雄性 SD 大鼠 60 只随机分成 5 组, 每组 12 只, 即假手术组、模型组、侯氏黑散小、中、大剂量组, 剂量分别为生药 11.6, 23.2, 46.4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (相当于等效剂量的 1, 2, 4 倍)。给药组先灌胃给药 5 d, 第 5 天给药后 40 min 造模, 术后每 8 h 给药 1 次, 共给药 3 次。假手术组、模型组灌服等量的生理盐水。

1.3.4 缺血脑组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶、NOS、iNOS 的测

定 大鼠局灶性脑缺血 24 h, 于末次给药后 40 min, 每组取 8 只大鼠, 断头处死, 去除嗅球、小脑和低位脑干, 取缺血侧(右侧) 脑组织, 称重后放入预冰的生理盐水中, 冰浴中制成 10% 的组织匀浆, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 取上清。按试剂盒说明测定 Na⁺-K⁺-ATP 酶、NOS、iNOS 的含量, 用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。

1.3.5 统计学分析 所有数据用 SPSS 10.0 统计软件, 进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 侯氏黑散对大鼠大脑中动脉栓塞模型神经功能缺损评分的影响 结果见表 1。模型组动物出现明显的神经功能障碍; 侯氏黑散大、中、小剂量组动物神经功能缺损评分均显著低于同时段的模型组 ($P < 0.05$)。

表 1 对大鼠大脑中动脉闭塞模型神经功能缺损评分的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	神经功能缺损评分(24 h)
模型组	-	7.56 ± 0.70
侯氏黑散	11.6	6.64 ± 0.93 ¹⁾
	23.2	6.53 ± 0.89 ¹⁾
	46.4	5.95 ± 0.81 ¹⁾

注: 与模型组比较: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

2.2 对大脑中动脉栓塞模型大鼠脑组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶、NOS、iNOS 酶活性的影响 结果见表 2。大鼠大脑中动脉阻塞 24 h 后, 与假手术组比较, 模型组 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性明显降低 ($P < 0.01$), NOS、iNOS 活性显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 侯氏黑散中剂量与大剂量组 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性显著升高 ($P < 0.01$); 侯氏黑散各剂量组 NOS、iNOS 的活性明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

表 2 对大脑中动脉栓塞模型大鼠脑组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶、NOS、iNOS 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Na ⁺ -K ⁺ -ATP	NOS	iNOS
		[$\mu\text{molPi} \cdot (\text{mg prot} \cdot \text{h})^{-1}$]	[$\text{u} \cdot (\text{mg prot})^{-1}$]	[$\text{u} \cdot (\text{mg prot})^{-1}$]
假手术组	-	7.63 ± 0.73 ²⁾	2.06 ± 0.56 ²⁾	1.10 ± 0.17 ²⁾
模型组	-	4.10 ± 1.03	7.51 ± 0.68	5.49 ± 0.43
侯氏黑散	11.6	5.09 ± 2.04	5.83 ± 1.47 ¹⁾	3.74 ± 1.59 ¹⁾
	23.2	6.48 ± 1.59 ²⁾	5.32 ± 1.57 ¹⁾	3.39 ± 0.78 ²⁾
	46.4	9.79 ± 1.56 ²⁾	5.28 ± 0.35 ²⁾	4.64 ± 0.24 ²⁾

3 讨论

侯氏黑散出自《金匱要略·中风历节篇》。“治大风,四肢烦重,心中恶寒不足”。“大风”是指风邪剧烈,直入脏腑,发病急,病情重。“四肢烦重”“心中恶寒不足”说明病人是一个中阳不足的体质。侯氏黑散中菊花为君药,祛风平肝,用量极大。防风为臣药助菊花祛风,配伍白术、人参、茯苓益气健脾,培土宁风;风从上受,肝阳必然亢逆,故用当归、川芎益肝血且搜肝气;风邪速变,挟寒亦能挟热,故用桂枝、细辛、干姜祛寒,黄芩清热;牡蛎潜阳寓降于升;矾石善化风痰;桔梗既能开通气机而利五脏,亦为“心中恶寒不足者”的引药。南京中医药大学丁光迪教授^[3]认为侯氏黑散对中风病有很好的疗效,关键在于组方之巧妙,集祛风、搜风、熄风于一身,使其发挥协同作用。

侯氏黑散具有很好的抗脑缺血损伤的作用,它作用的机制如何,本文从 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 NOS 两个方面进行了探讨。细胞能量代谢主要是通过呼吸(氧化-还原反应)生成 ATP 来供给生命活动所需能量,不同的 ATP 酶则利用 ATP 完成不同的生理活动^[4]。ATP 酶的活性高低反映细胞能量代谢的水平。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶功能失调,一方面可以直接引起神经元细胞线粒体本身的损伤,另一方面又可使细胞内这些离子调节的生化反应发生紊乱,激活许多降解酶,又进一步导致神经元细胞的死亡。模型组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性降低,经侯氏黑散治疗后, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性升高,提示细胞能量代谢能力恢复。NO 是一种细胞间信息传递的重要调节因子。NO 在体内的生物合成是以 L-精氨酸(L-arg)和 O_2 为底物,在 NOS 的作用下生成。NOS 是 NO 生物合成的关键因素^[5]。NOS 主要分为 3 种类型:神经元型(neuronal nNOS),内皮型(endothelial eNOS),诱导型(inducible

iNOS)。研究表明^[6]脑缺血再灌注 6 h 脑内神经细胞即出现 nNOS, eNOS, iNOS 表达,随着再灌注时间的延长而逐渐增强。脑内 nNOS 和 iNOS 于再灌注 12 ~ 7 d 保持较高的表达水平,而 eNOS 于再灌注 6~ 3 d 保持较高水平,持续时间短,升高与降低时间均早于 nNOS 和 iNOS。本实验结果表明在脑缺血再灌注 24 h 时 NOS 和 iNOS 活性升高,经侯氏黑散治疗后 NOS 和 iNOS 活性降低。大量研究表明 NO 在急性脑缺血损伤中具有神经保护和神经毒性两种不同作用^[6]。iNOS 是一种“病理型的酶”,在免疫刺激后表达,持续产生的 NO 与细胞毒作用有关。脑缺血后产生的过多的 NO 还可与超氧自由基反应,生成具有强氧化作用的氧化亚硝酸离子。那么侯氏黑散是否通过抗氧化损伤而达到抗脑缺血损伤的作用,相关研究仍在继续。

[参考文献]

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20: 84.
- [2] 王忠诚. 神经干细胞在中枢神经系统损伤修复中的应用前景[J]. *中国康复理论与实践*, 2004, 10(1): 1.
- [3] 丁光迪. 谈侯氏黑散和风引汤的实用价值[J]. *江苏中医杂志*, 1983, 51(1): 51.
- [4] 杨 恬. 细胞生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005. 8.
- [5] 刘 辉. 一氧化氮、一氧化氮合成酶与脑缺血损伤[J]. *国外医学·生理病理科学与临床分册*, 1998, 19(2): 121.
- [6] 王 超, 孙 峰, 丁晓洁. 脑缺血再灌注损伤过程中一氧化氮合酶的表达[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(8): 1589-1592.