

侯氏黑散对脑缺血大鼠血液流变学指标及 自由基代谢的影响

赵 晖*, 张秋霞, 穆 阳

(首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

[摘要] **目的:** 研究侯氏黑散对大鼠中动脉栓塞模型大鼠血液流变学指标、抗氧化酶及丙二醛(MDA)含量的影响,探讨侯氏黑散的脑保护作用机制。**方法:** 建立大鼠永久性中动脉栓塞模型(MCAO),观察侯氏黑散对模型大鼠红细胞变形性、聚集性、血液黏度及缺血脑组织谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT) MDA含量的影响。**结果:** 侯氏黑散能明显改善局灶性脑缺血大鼠血液流变学各项指标,降低全血黏度,增加红细胞变形性并降低红细胞聚集性,明显升高缺血脑组织 GSH-PX、SOD、CAT 活性并显著降低 MDA 含量。**结论:** 侯氏黑散对脑缺血损伤的保护作用可能与其改善模型大鼠血液流变性和自由基代谢有关。

[关键词] 脑缺血; 抗氧化; 血液流变学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)12-0037-04

[收稿日期] 2006-05-25

[基金项目] 北京市教委资助项目(NO: KM2003100025099)

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

Influence of Houshiheisan on Hemorheological Parameters and Metabolism of Free Radicals in Brain of Rats with Ischemia

ZHAO Hui*, ZHANG Qiu-xia, MU Yang

(College of Traditional Chinese Medicine, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100013, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Houshiheisan on hemorheological parameters, antioxidase activities and malondialdehyde(MDA) contents in the brain of rats with ischemia, so as to explore the protective mechanisms of rats with occlusion of the middle cerebral artery. **Methods:** Focal cerebral ischemia in rats was produced by 24 h occlusion of the middle cerebral artery(MCAO). The effects on blood viscosity, erythrocyte deformability and erythrocyte aggregability and the activities of GSH-PX, SOD, CAT and MDA in ischemic tissue of brain were observed. **Results:** Houshiheisan could significantly improve the erythrocyte deformability, reduce blood viscosity, erythrocyte aggregability and improve the activities of all the enzymes mentioned above and reduce the contents of MDA in ischemic tissue of brain. **Conclusion:** The results indicate Houshiheisan provides protective effect against focal cerebral ischemic injury and this effect may be related to improving the hemorheological parameters, increasing in activities of the GSH-PX, SOD, CAT, and reducing the lipid peroxidation.

[Key words] cerebral ischemia; antioxidant activity; Hemorheology

侯氏黑散出自《金匱要略·中风历节篇》，为张仲景治疗中风之首方，是张仲景针对中风的病机关键“正虚邪中”而设立。方中使用大量的祛风药以达到治疗中风的目的，不仅君药菊花、臣药防风均为祛风药，此外还配伍了祛风的川芎、细辛、桂枝，内外兼治，寒热并用，补泻同施，体现了风药治风的理论。为研究其阻抑脑缺血损伤的作用机理，本次实验利用永久性大脑中动脉栓塞模型大鼠，拟从自由基代谢及血液流变学的角度，探讨侯氏黑散的作用环节。

1 材料

1.1 动物 SD 雄性大鼠，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：scxkc(京)72000-0012。

1.2 药品与试剂 侯氏黑散煎剂(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，浓缩成含生药 3 g/mL 的汤剂。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、过氧化氢酶(CAT)测试盒和丙二醛(MDA)测试盒均由南京建成生物工程研究所提供。

1.3 主要仪器 752N 型分光光度计，上海精密科学仪器有限公司生产；TGL-16G 型高速台式离心机，

上海医用分析仪器厂生产；AEG-220 电子分析天平，日本 Shimadzu 公司；XIT 实体显微镜，云南光学仪器厂；红细胞变形/聚集测试仪(LG-B-190)北京世帝公司；血液黏度仪(R-80)北京世帝公司。

2 实验方法

2.1 大鼠大脑中动脉栓塞模型[MCAO]制备 参照 Koizumi 法^[1]，大鼠以水合氯醛 350 mg/kg，ip 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 0.265 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℃，大鼠体温维持在 36.5~37.5℃。采用 Bederson^[2]等介绍的神经功能评分法对麻醉清醒后(术后约 30 min)的大鼠进行评分，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。

2.2 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、缺血损伤模型组、侯氏黑散高剂量组、侯氏黑散中剂量组、侯氏黑散低剂量组。按体表面积折算，大鼠每天的侯氏黑散等效剂量为 11.6 g 生药/kg，小剂量组大鼠投以等效剂量即 11.6 g 生药/kg 中剂量组予以 2 倍等效剂量即 23.2 g

生药/kg, 大剂量组予以 4 倍等效剂量即 46.4 g 生药/kg。用药组先灌胃给药 5 d, 第 5 d 给药后 40 min 造模, 术后每 8 h 给药 1 次, 共给药 3 次。其假手术组、模型组灌服等量的生理盐水。大鼠中动脉栓塞 24 h 后, 末次给药 40 min 后, 动物取材, 检测各项指标。

2.3 红细胞变形性和聚集性的测定 颈总动脉取血, 1% 肝素抗凝, 取抗凝血 40 μ L 加红细胞变形液 1 mL, 混匀, 取样 0.8 mL 用红细胞变形/聚集测试仪测试, 以红细胞最大变形指数(MAXDI)和曲线下面积(SSS)表示红细胞变形性; 另取抗凝血 0.8 mL 用红细胞变形/聚集测试仪测试, 以红细胞最大聚集指数(MAXD)和曲线下面积(SS)表示红细胞聚集性。

2.4 血液黏度的测定 取抗凝血 0.8 mL 用血液黏度仪进行检测, 以高切(200 S^{-1})、中切(30 S^{-1})、低切(1 S^{-1} 、 5 S^{-1})时血液黏度表示全血黏度; 另取 0.8 mL 血浆用血液黏度仪测试 100 S^{-1} 时的血浆黏度。

2.5 缺血脑组织 GSH-PX SOD .CAT MDA 的测定 动物取血后, 断头处死, 开颅取脑, 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, 3 000 r/min, 离心 10 min, 取上清。按试剂盒说明书测定缺

血脑组织 GSH-PX SOD .CAT MDA 的含量, 用考马斯亮蓝法测定蛋白质的含量。

2.6 统计方法 本研究中所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均使用 SPSS10.0 统计软件, 进行单因素方差分析。

3 实验结果

3.1 侯氏黑散对 MCAO 模型大鼠血液流变学的影响

3.1.1 侯氏黑散对 MCAO 模型大鼠红细胞变形性和红细胞聚集性的影响 见表 1。结果显示侯氏黑散大剂量组(46.4 g/kg)可明显提高 MCAO 大鼠红细胞变形性并降低其聚集性($P < 0.05$); 侯氏黑散中剂量组(23.2 g/kg)升高红细胞变形性($P < 0.05$), 对红细胞聚集性有降低趋势。

3.1.2 侯氏黑散对 MCAO 模型大鼠血液黏度的影响 见表 2。结果表明侯氏黑散大剂量组(46.4 g/kg)可明显降低高切变率(200 S^{-1})、中切变率(30 S^{-1})、低切变率(1 S^{-1} 、 5 S^{-1})下的全血黏度($P < 0.05$); 侯氏黑散中剂量组(23.2 g/kg)及小剂量组(11.6 g/kg)显著降低低切变率(1 S^{-1} 、 5 S^{-1})下的全血黏度($P < 0.05$)。

表 1 侯氏黑散对 MCAO 模型大鼠红细胞变形性和红细胞聚集性的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	红细胞变形性		红细胞聚集性	
		MAXDI	SSS	MAXD	SS
假手术组	—	0.604 ± 0.024	263.24 ± 16.07	0.45 ± 0.065	80.40 ± 14.31
模型组	—	0.514 ± 0.013 ¹⁾	233.18 ± 10.79 ¹⁾	0.593 ± 0.061 ¹⁾	120.37 ± 14.37 ¹⁾
侯氏黑散组	11.6	0.527 ± 0.016	237.51 ± 13.21	0.583 ± 0.059	115.35 ± 9.04
	23.2	0.552 ± 0.035 ²⁾	247.62 ± 8.32 ²⁾	0.537 ± 0.061	109.16 ± 16.31
	46.4	0.588 ± 0.025 ²⁾	254.36 ± 19.12 ²⁾	0.486 ± 0.062 ²⁾	103.96 ± 4.66 ²⁾

注: 与假手术组比较: ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较: ²⁾ $P < 0.05$ (下同)。

表 2 侯氏黑散对 MCAO 模型大鼠血液黏度的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	全血黏度(mPa·s)				血浆黏度(mPa·s)
		200 S^{-1}	30 S^{-1}	5 S^{-1}	1 S^{-1}	100 S^{-1}
假手术组	—	2.89 ± 0.55	6.06 ± 0.27	11.35 ± 0.43	21.69 ± 3.84	1.182 ± 0.067
模型组	—	3.87 ± 0.18 ¹⁾	7.85 ± 0.65 ¹⁾	16.50 ± 1.23 ¹⁾	31.23 ± 3.99 ¹⁾	1.463 ± 0.245 ¹⁾
侯氏黑散组	11.6	3.78 ± 0.29	7.68 ± 0.74	14.58 ± 0.54 ²⁾	23.29 ± 2.00 ²⁾	1.430 ± 0.228
	23.2	3.49 ± 0.53	7.51 ± 0.54	14.47 ± 1.07 ²⁾	20.41 ± 5.42 ²⁾	1.327 ± 0.220
	46.4	3.07 ± 0.36 ²⁾	6.82 ± 0.93 ²⁾	13.51 ± 0.50 ²⁾	18.91 ± 2.11 ²⁾	1.340 ± 0.120

3.2 侯氏黑散对 MCAO 大鼠自由基代谢的影响 见表 3。结果表明侯氏黑散各治疗组均显著提高

MCAO 大鼠缺血脑组织抗氧化酶 SOD .GSH-PX .CAT 的活性, 明显降低 MDA 含量($P < 0.05$)。

表 3 侯氏黑散对 MCAO 模型大鼠脑组织自由基代谢的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	SOD (U/mgprot)	GSH-PX (U)	MDA (nmol/mgprot)	CAT (U/mgprot)
假手术组	—	488.179 ± 96.86	14.28 ± 1.64	3.37 ± 0.45	43.91 ± 6.4
模型组	—	179.52 ± 64.58 ¹⁾	2.68 ± 0.87 ¹⁾	7.64 ± 0.88 ¹⁾	18.23 ± 4.58 ¹⁾
侯氏黑散组	11.6	475.22 ± 85.12 ²⁾	5.04 ± 0.67 ²⁾	5.54 ± 0.36 ²⁾	34.04 ± 2.37 ²⁾
	23.2	533.97 ± 52.60 ²⁾	5.41 ± 1.38 ²⁾	5.04 ± 0.50 ²⁾	31.16 ± 5.59 ²⁾
	46.4	508.97 ± 43.53 ²⁾	7.17 ± 1.89 ²⁾	5.16 ± 0.68 ²⁾	27.91 ± 2.75 ²⁾

4 讨论

临床研究表明,缺血性脑血管病患者体内脂质过氧化与血液流变学关系十分密切^[3]。血液流变学的改变除加重局部微循环障碍外,还可增加氧自由基产生直接损伤神经细胞。随着自由基大量产生的同时伴有自由基清除酶功能降低,启动自由基连锁反应,可诱发血管痉挛,促进血管内凝血^[4]。由此可见脑缺血后血液流变学的改变及自由基代谢紊乱是相互联系和相互促进,形成恶性循环,因此调节自由基的代谢并及时改善局灶性脑缺血后血液流变学指标是急性缺血性脑卒中发生后早期治疗的主要目的之一,对脑卒中病人的神经功能恢复具有积极的意义。

MCAO 模型大鼠在脑缺血 24 h 后,红细胞变形性明显降低、红细胞聚集性明显提高,全血黏度及血浆黏度均显著增高,血液流变性出现黏、浓、凝、聚状态的改变。同时缺血脑组织氧自由基大量生成,抗氧化酶 SOD、GSH-PX、CAT 活性显著降低,自由基代谢系统紊乱,由此可见线栓法造成的局灶性脑缺血模型较好地模拟了临床缺血性脑血管病的病理过程,对正确评价药物的抗脑缺血作用具有重要的意义。

侯氏黑散方中使用运用了大量的祛风药,不同于目前治疗中风以平息内风为主的思想,现代药理研究证实疏风通络类中药多含有挥发油,能扩张脑

血管,改善微循环。本实验通过分析侯氏黑散对大鼠缺血脑组织自由基代谢及血液流变学各项指标的影响,证实侯氏黑散不仅能明显改善局灶性脑缺血大鼠血液流变学各项指标,降低全血黏度,增加红细胞变形性并降低红细胞聚集性。而且还能明显提高脑组织抗氧化系统谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶的活性,使氧自由基含量减少。因此推测侯氏黑散阻抑脑缺血损伤的作用环节包括调节自由基的代谢和改善血液流变性。

[参考文献]

- [1] Koizumi J, Yoshida Y, Nakaazawa T, *et al.* Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. *Stroke*, 1986, 8: 1-8.
- [2] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17: 472-476.
- [3] 章军建, 李晓琴, 杨四清. 缺血性脑血管病患者体内脂质过氧化反应与血液流变学的关系[J]. *中风与神经疾病杂志*, 1997, 14(6): 353.
- [4] 邢成名. 缺血性脑血管病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 116-118.
- [5] Tsuchidate R, *et al.* Regional cerebral blood flow during and after 2 hour middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. *Jcere Blood Flow Metab*, 1997, 17: 1066-1073.