

红花天麻不同配伍提取物防治局灶性 脑缺血的实验研究

康旭亮¹, 梁菊生², 丁家欣¹, 刘德麟^{1*}

(1. 中国中医科学院基础理论研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究红花天麻不同配伍提取物对局灶性大鼠脑缺血体积的影响。方法: 将大鼠随机分为模型组, 假手术组, 尼莫地平组, 红花提取物组、天麻提取物组, 红花天麻(1:1)组, 红花天麻(1:4)组。采用插线法制作大鼠脑缺血模型, 观察红花天麻不同配伍提取物对局灶性脑缺血大鼠 4, 8, 24h 行为以及 24h 脑缺血体积的影响。结果: 红花天麻(1:1)提取物组, 能减轻神经功能损害症状及减小脑缺血体积($P < 0.05$), 而其余各配伍组虽有一定程度改善, 但无显著性差异。结论: 红花天麻(1:1)提取物组具有防治局灶性脑缺血的作用。

[关键词] 红花天麻配伍; 脑缺血; 缺血体积

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)06-0036-03

脑血管疾病已成为人类三大死亡原因之一, 其中脑缺血是临床常见的脑血管疾病, 其发病率、致残率和死亡率均较高, 占脑血管病的 56.6%~80%^[1], 因此国内外学者对防治脑缺血的有效药物进行了广泛的研究。据我们课题组前期的文献研究和临床观察, 发现脑缺血患者中最常见的临床症状为眩晕。我们在研究红花、天麻时发现红花天麻(4:1)提取物具有防治局灶性脑缺血的作用。就天麻与红花比较, 在治疗眩晕时天麻比红花使用更为广泛, 而在前期研究中天麻只用了红花的 1/4 量, 那么增加天麻的量防治局灶性脑缺血的效果是否会更好呢? 以及单独使用红花是否具有同样作用呢? 为此, 我们进行了红花天麻不同剂量的配伍研究。

1 实验材料

1.1 仪器 中药材粉碎机: FW135 型, 天津市泰斯特仪器有限公司。旋转蒸发仪: RE-52AA, 上海亚荣生化仪器厂。电热恒温鼓风干燥箱: SFG-02.300, 黄石市恒丰医疗器械有限公司。尼龙线: 直径 0.26mm, 使用前剪成 4cm 长线段, 筛选出前端光滑、钝圆者, 于 2cm 处做好标记, 浸于甘油中备用。

1.2 药物与试剂 红花(*Carthamus tinctorius* L.), 购

于同仁堂药店。天麻(*Gastrodia elata* Bl.), 购于贵州大方县。乙醇: 分析纯, 北京化工厂, 批号 20021021。红四氮唑(TTC): 分析纯, 北京化学试剂公司, 批号 040114, 临用前用生理盐水配成 2% TTC 溶液。尼莫地平: 天津市中央药业有限公司, 批号 031102。

1.3 动物 清洁级 SD 雄性大鼠, 中国科学院遗传与发育生物学研究所动物中心提供, 合格证号: SCXK(京)20020006。

2 红花天麻不同配伍提取物制备

2.1 红花 方法: 称取红花 170g, 装入圆底烧瓶, 加入 10 倍量 95% 乙醇, 回流提取 1.5h, 两次, 过滤, 回收溶剂, 残渣加 10 倍量水回流提取 1.5h, 两次, 过滤, 回收溶剂, 与上述回收完后药液合并。放置水浴锅上浓缩。备用。

2.2 天麻 称取天麻 170g, 提取浓缩方法同 2.1;

红花天麻(1:1) 称取红花、天麻各 85g, 提取浓缩方法同 2.1;

红花天麻(1:4) 称取红花 34g, 天麻 136g, 提取浓缩方法同 2.1。

3 红花天麻提取物防治局灶性脑缺血的实验研究

3.1 方法^[2,3] 取 300~320g 雄性 SD 大鼠 70 只, 随机分为假手术组, 模型组, 尼莫地平组(24mg/kg), 红花提取物组(12g 药材/kg)、天麻提取物组(12g 药材/kg), 红花天麻(1:1)提取物组(12g 药材/kg), 红花天麻(1:4)提取物组(12g 药材/kg), 共 7 组。手术前 3d 假手术组、模型组按照 10mL/kg 容积给大鼠 ig

[收稿日期] 2006-02-07

[基金项目] 国家科技部社会公益研究专项《方剂分析的方法体系》(2001DIB00150)

[通讯作者] 刘德麟, Tel: (010) 64014411-2293

蒸馏水, 其余各药物组按照 10mL/kg 容积给相应药物, 末次给药后 0.5h, 用 3.5% 水合氯醛 ip 麻醉, 沿颈正中作约 2cm 长切口, 分离出右侧颈总动脉。再分离出颈外动脉, 穿两根线, 准备结扎。在颈外动脉下方小心分离出颈内动脉及其旁边一根小分支(翼突腭动脉, pterygopalatine)。用两根线结扎颈外动脉, 并从中间剪断, 夹闭颈内动脉, 颈总动脉及翼突腭动脉, 在颈外动脉远心端用一线轻轻拉起, 并于颈外动脉上剪一小口, 将尼龙线棒(0.26mm)插入小口, 并放开颈内动脉的动脉夹, 将尼龙线棒缓慢推入至前脑动脉(约 20mm)再往回拉 2mm 即至大脑中动脉口, 长约 17mm(自颈外动脉分叉处算起), 用缝线结扎固定尼龙棒。最后, 取下颈总动脉动脉夹, 缝合肌肉和皮肤, 手术完毕后, 回笼饲养。假手术组, 插线插入约 10mm, 其余同前。

3.2 行为评分^[2] 手术后 4.8.24h 观察动物活动情况并进行评分。

评分标准为: 1. 提起鼠尾巴观察前肢屈曲情况, 双前肢对称伸向地面, 计为 0 分; 如手术的对侧前肢出现腕屈, 肘屈曲, 肩内旋, 或既有腕肘屈曲又有肩内旋者, 分别计为 1, 2, 3, 4 分。2. 将动物置于平地面上, 分别推双肩向对侧移动, 检查阻力, 如双侧阻力对等者计为 0 分; 如向手术的对侧推动时阻力下降者, 根据阻力下降程度不同分为轻, 中, 重, 分别计为 1, 2, 3 分。3. 将动物双前肢置一金属网上, 观察双前肢的肌张力, 双前肢肌张力对等者计为 0 分; 同样根据手术对侧肌张力下降程度不同分别计为 1, 2, 3 分。4. 动物不停向一侧转圈者计为 1 分。根据评分, 满分为 11 分, 分数越高, 动物行为障碍越严重。

3.3 脑缺血面积测定^[2,4] 术后 24h 给动物行为评分后, 将动物麻醉后断头处死, 迅速取脑, 生理盐水冲洗残血, 去掉嗅球、小脑和低位脑干, 放置 0℃生理盐水 15min, 再取出大鼠大脑, 冠状切四刀分为 5 片, 每两片之间间隔 2mm。第一刀在脑前极与视交叉连线中点处, 第二刀在视交叉部位, 第三刀在漏斗柄部位, 第四刀在漏斗柄部位与叶尾极之间, 迅速放入 2% 红四氮唑(TTC) 溶液中, 37℃恒温孵育 30min, 染色后置 4% 甲醛中固定; 24h 后用数码相机拍照, 输入电脑采用 photoshop7.0 图像处理软件测量梗死灶面积(正常组织为玫瑰红色, 缺血区为苍白色), 各脑片梗死面积之和乘以厚度(2mm)为总的梗死体

积, 以梗死体积占全脑体积的百分率进行分析。

3.4 数据统计 采用 *t* 检验进行组间比较。

3.5 实验结果

表 1 红花天麻不同配伍对大鼠局灶性脑缺血行为的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g 生药/kg)	4h 行为 评分	8h 行为 评分	24h 行为 评分
假手术组	—	0 ± 0 ²⁾	0 ± 0 ²⁾	0 ± 0 ²⁾
模型组	—	9.2 ± 0.8	9.3 ± 0.9	9.4 ± 1.0
尼莫地平组	0.024	6.4 ± 0.6 ²⁾	6.7 ± 0.6 ²⁾	6.8 ± 0.6 ²⁾
红花组	12	8.9 ± 0.7	8.9 ± 0.7	9.1 ± 0.5 ¹⁾
天麻组	12	9.0 ± 0.6	9.1 ± 0.7	9.1 ± 0.7
红花: 天麻 1: 1 组	12	8.4 ± 0.4 ¹⁾	8.5 ± 0.5 ¹⁾	8.6 ± 0.4 ¹⁾
红花: 天麻 1: 4 组	12	8.7 ± 1.4	8.8 ± 1.3	8.9 ± 1.2

与模型组相比: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 下同。

表 2 红花天麻不同配伍对大鼠局灶性脑缺血体积的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g 生药/kg)	相对脑缺血体积%
假手术组	—	0 ± 0 ²⁾
模型组	—	32.72 ± 3.29
尼莫地平组	0.024	16.18 ± 5.68 ²⁾
红花组	12	30.56 ± 4.07
天麻组	12	30.35 ± 3.03
红花: 天麻 1: 1 组	12	29.00 ± 4.31 ¹⁾
红花: 天麻 1: 4 组	12	30.43 ± 2.96

从表 1 结果可见模型组大鼠在手术后 4.8.24h 3 个时间点的行为评分值明显高于假手术组大鼠术后对应时间点的行为评分值, 且具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。说明手术后 3 个时间点模型组大鼠均出现神经功能损害症状, 表明插线法是造成局灶性脑缺血模型的一种切实可行的方法。与模型组相比, 尼莫地平组与红花天麻(1:1)提取物组在手术后 4.8.24h 3 个时间点行为评分值均小于模型组对应时间点的行为评分值, 尼莫地平组具有极显著性差异 ($P < 0.01$), 红花天麻(1:1)提取物具有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明尼莫地平、红花天麻(1:1)提取物均能减轻神经功能损害症状, 而红花提取物组、天麻提取物组, 红花天麻(1:4)提取物组在手术后 4.8.24h 3 个时间点行为评分值虽然小于模型组, 但无统计学意义。

从表 2 结果可见模型组大鼠的脑缺血体积明显高于假手术组, 且具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。进

一步说明采用插线法造成大鼠局灶性脑缺血模型的方法是可行的。与模型组相比,尼莫地平组、红花天麻(1:1)提取物组脑缺血体积均小于模型组的脑缺血体积,尼莫地平组 $P < 0.01$,红花天麻(1:1)提取物组 $P < 0.05$ 。红花提取物组、天麻提取物组,红花天麻(1:4)提取物组脑缺血体积虽然小于模型组,但无统计学意义。

4 讨论

研究表明临床上缺血性脑血管疾病的易患部位是大脑中动脉(MCA),在脑梗死患者中,大脑中动脉主干分布区梗死占 82.2%,所以对 MCA 闭塞的研究在脑血管病的研究中占有极其重要的地位^[5]。因此,国内外学者对大鼠由大脑中动脉闭塞(MCAO)所致的局灶性脑缺血动物模型进行了大量研究,其中插线法为公认的较好的一种模型。该模型不需开颅,不需特殊设备且缺血部位恒定,避免了开颅对颅内环境的影响。

目前关于脑缺血研究的指标较多,我们选择了最直接客观的指标,采用 TTC 染色来测定脑缺血梗死灶大小不仅境界清楚且具有快速、直观地确定梗死范围的优点。而行为评分方法,简便直接不需特殊仪器,可以作为辅助指标。

在本实验的制备工艺条件下红花天麻在 1:1 配伍使用时具有防治局灶性脑缺血的作用,而单独使用或红花天麻(1:4)时则无此作用。在前期的研究中发现当红花继续增大到 4:1 时其作用较 1:1 时作用更强。那么,其起作用的药效物质基础是什么呢?是不是红花中的羟基红花黄色素 A,天麻中的天麻苷元,天麻苷,以及其起作用的机理是怎样的?我们对这些问题继续进行了深入研究。

[参考文献]

- [1] 信照亮. 鼠急性脑缺血的试验研究进展[J]. 国外医学神经病学神经外科学分册, 1991, (2): 90.
- [2] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 9, 1066-1067.
- [3] 陈国俊, 秦震. 大鼠插线法大脑中动脉缺血一再灌流模型的方法学与改进[J]. 临床神经科学, 1996, 4(3): 150-152.
- [4] 唐映红, 邓常青, 刘旺华, 等. 补阳还五汤 4 类有效部位对局灶性脑缺血大鼠脑梗死体积的影响[J]. 中草药, 2005, 36(2): 236-239.
- [5] Tsuchidate R. Regional cerebral blood flow during and after 2 hour middle cerebral artery occlusion in the rat[J]. J Cere Blood Flow Metab, 1997, 17: 1066-1073.