

二维三七桂利嗪胶囊对大鼠全脑缺血再灌注损伤的保护作用

高君伟¹, 邓秀玲¹, 毛海燕², 袁秉祥¹, 王 燕¹

(1 西安交通大学医学院, 陕西 西安 710061; 2 西安交通大学第一医院, 陕西 西安 710061)

摘要: 目的: 探讨二维三七桂利嗪胶囊(DNCC)对全脑缺血再灌注损伤的疗效; 方法: 阻断大鼠四动脉血流 10min, 再灌注 72h 制成全脑缺血再灌注模型; 观察 DNCC 对全脑缺血再灌注大鼠脑电图、学习记忆、脑指数、脑含水量及海马区神经元变化的影响。结果: DNCC 能降低全脑缺血后脑电图的下降幅度, 缩短再灌注后脑电图的恢复时间; 提高全脑缺血再灌注损伤大鼠的学习记忆能力; 可降低脑指数及脑含水量; 再灌注 72h 后海马 CA₁ 区存活的细胞数高于模型组。结论: DNCC 对全脑缺血再灌注具有明显的保护作用。

关键词: 脑缺血; 再灌注; 脑电图; 学习记忆

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)05-0036-04

Protective Effects of Divitamins Notonginseng and Cinnarizine Capsules on Global Cerebral Ischemia Reperfusion Injury of Rats

GAO Jun-wei¹, DENG Xiu-ling¹, MAO Hai-yan², YUAN Bing-xiang¹, WANG Yan¹

(1 Department of Pharmacology, Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;

2 Department of Neurosurgery, The First Hospital of Xi'an Jiao-tong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: Objective: To evaluate the efficacy of Divitamins Notonginseng and Cinnarizine Capsules(DNCC) on the global cerebral ischemia reperfusion injury. Methods: Ligating bilateral common carotid arteries and bilateral centrum arteries for ten minutes, and then reperusing 72 hours induced the global cerebral ischemia reperfusion model. Observing the influence of DNCC on the electroencephalogram (EEG), learning and memorizing abilities, brain index, water containing, and the number of the neuron alive. Results: DNCC can obviously reduce the decreasing scope of EEG, short recovering time of EEG after reperfusion, reduce learning and memorizing disturbance, brain index and water containing, and improve the living cells at hippocampi after reperfusion for 72 hours. Conclusion: DNCC can strongly protect the brains impaired by global cerebral ischemia reperfusion.

Key words: cerebral ischemia; reperfusion; electroencephalogram; learning and memorizing disturbance

脑缺血的临床治疗目标是恢复供血和供氧, 抑制炎症反应及维持神经元的结构和功能完整等。二维三七桂利嗪胶囊(Divitamins Notonginseng and Cinnarizine Capsules, DNCC), 是由桂利嗪、三七总皂苷、维生素 E 和维生素 B₆ 组成的以化学药物为主的中西药复方制剂。组方中桂利嗪为钙拮抗剂, 具有扩张脑血管, 增加脑血液供应的作用, 用于防止缺血状态下对脑细胞带来的损伤, 同时桂利嗪还可以通

过抑制脑缺血再灌注后谷氨酸的持续高表达, 减轻谷氨酸的神经毒性作用^[1]; 三七总皂苷有抗炎、抗氧化作用, 能提高机体对缺氧的耐受力, 改善缺血引起的脑能量耗竭, 减轻脑水肿, 保护脑组织, 还具有慢钙通道阻滞, 利尿, 防止细胞缺血坏死等作用^[2]; 维生素 E 具有很强的抗氧化作用, 维生素 B₆ 则为某些神经细胞酶系统的辅助因子。DNCC 在临床主要用于治疗缺血性脑血管病, 临床疗效较为满意, 该制剂对于脑缺血的实验治疗作用研究尚未见报道。本实验采用大鼠全脑缺血再灌注动物模型研究 DNCC 对脑缺血再灌注损伤的保护作用。

收稿日期: 2004-09-21

通讯作者: 袁秉祥, Tel: (029) 82655165, E-mail: ybx@mail.xjtu.

edu.cn

1 材料

1.1 动物 SD 雄性大鼠, 质量合格证陕医动证字 08-005 号; 由西安交通大学医学院实验动物中心提供。体重 200~250g, 动物分笼饲养, 饮自来水, 食固体饲料, 饲料由西安交通大学医学院实验动物中心提供。

1.2 药物 二维三七桂利嗪胶囊, 批号 030608, 由丽珠集团丽宝生物化学制药有限公司提供, 其中一粒胶囊 (349.7mg) 含有桂利嗪 30mg、三七提取物 150mg、VB6 15mg、VE 10mg; 桂利嗪胶囊, 批号 021001, 丽珠集团利民制药厂生产, 一粒 (214.2mg) 含桂利嗪 25mg。水合三氯乙醛, 批号 000530, 北京市旭东化工厂生产。

1.3 主要仪器 FA1004 型电子天平 (上海); XWT-204 型台式平衡记录仪 (上海); DSJ-F 生理放大器 (华南师范大学无线电厂); 电凝器、明暗箱自制。

2 方法

2.1 分组 大鼠经适应性饲养一周后, 采用随机分组的方式将大鼠分为假手术组、模型组、桂利嗪胶囊组、DNCC 大、中、小剂量组, 每组动物最少 10 只。

2.2 给药及模型制备 假手术组及模型组每日蒸馏水灌胃 1 次。桂利嗪组按成药 $270\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃。二维三七桂利嗪胶囊大、中、小剂量组分别为成药 $292\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $146\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 、 $73\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。不同成分、不同浓度的灌胃量均为 10mL/kg 体重。

给药第 7d, 参照改良的四血管夹闭法制备大鼠全脑缺血再灌注模型^[3]。10% 水合氯醛 3mL/kg (体重) 进行腹腔麻醉, 俯卧位固定, 枕后正中切口, 暴露第一颈椎的两侧横突翼板小孔, 用小的单极电凝针烧灼双侧椎动脉, 使之永久闭塞; 然后取仰卧位, 颈部正中切口, 分离双侧颈总动脉, 穿线备用, 少量喂食, 正常饮水。24h 后乙醚麻醉, 仰卧位, 清醒状态下用微型动脉夹夹闭双侧颈总动脉, 10 min 后松开动脉夹造成全脑缺血再灌注模型, 以夹闭双侧颈总动脉后出现翻正反射消失为纳入标准, 在 1min 内, 大鼠翻正反射消失, 伴有瞳孔放大。去掉动脉夹后, 大鼠很快清醒, 在随后的 1~2h 内, 行为活动接近正常。缺血后出现抽搐的大鼠被弃用。假手术组仅分离 4 条动脉而不结扎, 其余处理同实验组。再灌注后 24h、48h、72h 各给药一次, 并于末次给药后 1h 断头取脑。

2.3 脑电图 (EEG) 描记 每只大鼠于全脑缺血前

将描记电极置于右侧眶后头皮下, 参考电极置于耳后皮下, 两个电极连至 XWT-204 型台式平衡记录仪, 全脑缺血前开始描记正常脑电图, 随即全脑缺血, 同时持续描记脑电图, 直至再灌 30min。观察全脑缺血期间 EEG 降低幅度和再灌后恢复正常的时间。

2.4 避暗实验^[4] I 期手术前先进行学习训练, 电压 90V, 将大鼠放入明箱, 记录第一次进入暗箱的时间 (潜伏期) 和 5min 内进入暗箱的次数 (错误次数), 于全脑缺血后 48h 进行记忆功能测定, 以潜伏期的长短和错误次数的多少反映大鼠的记忆能力。

2.5 组织学观察及脑含水量测定 再灌 72h 称体重, 开颅取脑, 称全脑湿重, 按全脑湿重/体重 $\times 100$ 计算脑指数, 左脑称湿重后在 100℃ 烤 24~48h 至恒重, 按 (湿重-干重)/湿重计算脑水肿指数。右脑常规石蜡包埋, 切片取背侧海马, 厚度为 5 μm , 行 HE 染色。在显微镜 (400 倍) 下计数海马 CA₁ 区存活的锥体细胞数。组织学鉴定分析和细胞计数由一无关人员进行。每只大鼠海马 CA₁ 区存活的细胞数由一张切片的左右两侧存活细胞的平均值 (细胞数/mm 线长度) 来表示^[5]。皱缩、胞浆空泡化的细胞被排除。

2.6 数据处理 各组数据均用 $\bar{x} \pm s$, 统计学采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 DNCC 对大鼠脑电图变化的影响, 结果见表 1。

表 1 DNCC 对全脑缺血-再灌注大鼠脑电图的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)	<i>n</i>	下降幅度 (%)	恢复时间 (min)
模型组	—	13	62.0 \pm 16.6	25.0 \pm 5.6
桂利嗪组	270	12	43.8 \pm 15.5 ²⁾	15.1 \pm 8.3 ²⁾
DNCC	292	13	46.5 \pm 16.2 ¹⁾	12.8 \pm 6.9 ²⁾
	146	16	49.0 \pm 13.5 ¹⁾	14.7 \pm 7.6 ²⁾
	73	12	53.4 \pm 17.9	14.6 \pm 8.5 ²⁾

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

由表 1 可见, 大鼠四动脉结扎后脑电图波幅下降, 缺血 10min 后再灌注可使脑电图波幅在 25.0 \pm 5.6min 恢复, 桂利嗪胶囊和不同剂量的 DNCC 均可减轻脑缺血后脑电图波幅的下降程度, 缩短再灌注后脑电图波幅的恢复时间。

3.2 DNCC 对全脑缺血-再灌注大鼠脑指数、脑含水量的影响 表 2 表明, 全脑缺血-再灌注使大鼠脑组织含水量和脑指数增加, 大剂量的 DNCC 复方制剂可使脑水肿减轻、脑指数下降。

表 2 DNCC 对全脑缺血-再灌注大鼠脑指数、脑含水量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	n	脑指数 (g/100g)	脑含水量 (%)
假手术组	—	11	0.503 ± 0.039 ²⁾	79.13 ± 0.78 ¹⁾
模型组	—	10	0.599 ± 0.0512	80.08 ± 1.14
桂利嗪组	270	12	0.574 ± 0.039	79.59 ± 0.80
DNCC	292	10	0.540 ± 0.053 ²⁾	78.94 ± 0.40 ¹⁾
	146	10	0.580 ± 0.052	79.83 ± 1.09
	73	10	0.593 ± 0.055	80.35 ± 1.16

3.3 DNCC 对全脑缺血-再灌注大鼠学习记忆能力的影响 结果见表 3。

表 3 DNCC 对全脑缺血-再灌注大鼠学习记忆能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	n	记忆功能	
			潜伏期(s)	错误次数
假手术组	—	12	202.3 ± 144.4 ¹⁾	0.33 ± 0.49 ¹⁾
模型组	—	10	76.9 ± 119.8	0.80 ± 0.42
桂利嗪组	270	10	218.7 ± 132.1 ¹⁾	0.30 ± 0.5 ¹⁾
DNCC	292	10	176.2 ± 131.6	0.50 ± 0.53
	146	10	185.2 ± 148.6	0.40 ± 0.52
	73	10	211.6 ± 142.4 ¹⁾	0.30 ± 0.48 ¹⁾

由表 3 可知,在避暗实验的记忆能力测验中,全脑缺血-再灌注使大鼠记忆功能减退(即潜伏期缩短,错误次数增加),小剂量 DNCC 及桂利嗪均可改善全脑缺血-再灌注大鼠的记忆功能。

3.4 DNCC 对全脑缺血-再灌注大鼠脑组织病理学检查结果 假手术组海马 CA₁ 区镜下可见 3~4 层锥体细胞(放大 10×40 倍),细胞排列整齐紧密,细胞核大,圆形或椭圆形,位于细胞体中央,核膜明显,核着色淡,呈空泡状,核仁清晰可见,另外可见少数呈锥形、菱形核染色稍深的神经细胞,分散在上述神经细胞之间。未见变性、坏死的神经细胞。

全脑缺血-再灌注模型组镜下见海马 CA₁ 区多数神经细胞体积变小,胞浆皱缩,细胞核固缩、致密、深染呈死亡表现。部分细胞尚存活,其死亡细胞及存活细胞平均线密度见表 4。

桂利嗪胶囊组海马 CA₁ 区可见部分细胞死亡,大部分细胞存活,其死亡细胞及存活细胞平均线密度见表 4。

DNCC 大剂量组、中剂量组和小剂量组海马 CA₁ 区均可见到部分神经细胞死亡,其死亡细胞及存活细胞平均线密度见表 4。

表 4 DNCC 对全脑缺血-再灌注损伤大鼠海马 CA₁ 区神经细胞的影响($\bar{x} \pm s, n = 5, \text{mm}^{-1}$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	总细胞数	死亡细胞数	存活细胞数
假手术组	—	55.0 ± 2.1 ²⁾	0	55
模型组	—	46.5 ± 0.7	32.6 ± 4.2	14.0 ± 3.9
桂利嗪组	270	44.0 ± 3.2	12.8 ± 2.2 ²⁾	31.0 ± 4.0 ²⁾
DNCC	292	46.8 ± 1.9	17.0 ± 3.2 ²⁾	29.8 ± 4.8 ²⁾
	146	40.4 ± 4.8	22.0 ± 4.8 ²⁾	18.4 ± 1.8
	73	42.4 ± 2.3	21.0 ± 1.6 ²⁾	21.4 ± 2.2 ²⁾

据表 4 可见,本实验全脑缺血-再灌注模型成功,桂利嗪胶囊组及 DNCC 各剂量组与模型组比较均显示不同程度的保护作用。

4 讨论

脑缺血及再灌注以后,会出现神经组织水肿、神经元变性和迟发性坏死等结构异常;引起脑电图和学习记忆能力减退等功能障碍。

全脑缺血最早观察到的指标是皮层电活动的下降,常用缺血后电位幅度变化或再灌注后 EEG 的恢复情况来作为脑缺血再灌注损伤的监测和药物效应的评价指标。本文观察了 DNCC 对缺血再灌注时 EEG 的变化和实验治疗作用,从电生理学方面证明了该药品对脑缺血再灌注损伤的保护作用。海马 CA₁ 区神经元对运动蛋白的能量障碍特别敏感,脑缺血再灌注后学习记忆损害可能是海马组织损伤的直接结果。本实验结果表明, DNCC 能有效减轻海马 CA₁ 区神经元的坏死情况,从形态学方面直观地显示了其脑保护作用。改善记忆功能的则以小剂量 DNCC 明显,中、高剂量的作用反而减弱,可能与刺激电压偏高有关;也可能是与许多改善学习记忆药物的作用相似,出现“U”形量效曲线,说明 DNCC 改善学习记忆有一定剂量范围。

研究结论: DNCC 能改善全脑缺血脑组织的血液供应,减轻氧自由基和钙超载对神经元和神经组织所造成的损伤,保护全脑缺血再灌注造成的神经损伤,减轻脑水肿,从而改善动物的学习记忆功能,但其具体作用机制尚需进一步的研究。

参考文献:

- [1] 陶定波,胡志云,姜长斌,等. 脑缺血再灌注后海马 CA₁ 区谷氨酸的表达变化及氟桂利嗪的影响[J]. 卒中与神经疾病, 2003, 4(8): 222-224.
- [2] 王根发,王文安,周永炜,等. 三七皂甙对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国临床康复, 2002, 5(9): 1268-1269.

- [3] Tsutomu Abe, Norio Takagi, Midori Nakano. The effects of monobromobimane on neuronal cell death in the hippocampus after transient global cerebral ischemia in rats [J]. Neuroscience Letters, 2004, 357: 227-231.

[4] 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, 2002,

- [5] Kirino T, Tamura A, Sano K. A reversible type of neuronal injury following ischemia in the gerbil hippocampus [J]. Stroke, 1986, 17: 455-459.