

脑心通胶囊对局灶性脑缺血大鼠血管活性肠肽的影响

李沧海¹, 李兰芳¹, 林玉红², 周 军¹, 郭淑英¹, 姜 楠¹, 郭建友¹, 霍海如¹, 姜廷良¹

(1 中国中医研究院中药研究所唐氏中药研究中心, 北京 100700;

2 陕西咸阳步长制药有限公司, 陕西 咸阳 710075)

摘要:目的: 研究步长脑心通对动脉局灶性栓塞模型大鼠血浆及下丘脑组织血管活性肠肽的影响。方法: 采用放射免疫法测定 VIP 浓度。结果: 脑心通可以升高缺血早期血浆 VIP 水平, 但降低缺血晚期下丘脑组织 VIP 浓度。结论: 在中风早期和晚期, 脑心通调节 VIP 的机制不同。

关键词: 中风; 步长脑心通; 血管活性肠肽

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)03-0036-04

Study of NXT Capsule on Vasoactive Intestinal Peptide in Rats with Focal Cerebral Ischemia

LI Cang-hai¹, LI Lanfang¹, LIN Yu-hong², ZHOU Jun¹, GUO Shu-ying¹,

JIANG Nan¹, GUO Jian-you, HUO Hai-ru¹, JIANG Ting-liang¹,

(1 Tang Center for Herbal Medicine Research, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China; 2 Shanxi Xianyang Buchang Pharmaceuticals Company, Xianyang 710075, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Buchang Naoxintong (NXT) on the level of vasoactive intestinal peptide (VIP) in plasma and hypothalamus in rats with middle cerebral artery infarction. Methods: The VIP content was measured via radioimmunoassay. Results: Oral treatment with NXT augmented the VIP level in plasma at the early acute phase of stroke, while the VIP content in hypothalamus decreased both in acute and chronic phases. Conclusion: NXT could modulate the VIP via different mechanisms during the development of stroke.

Key words: Stroke; Buchang Naoxintong capsule;

Vasoactive intestinal peptide

收稿日期: 2004-08-24

通讯作者: 霍海如, Tel 和 Fax: (010) 64041008, E-mail: huohr@

yahoo.com.cn

缺血性脑血管疾病的病理过程是细胞严重缺氧诱发细胞膜通透性改变、钙超载、自由基生成及兴奋性氨基酸释放增加等一系列病理变化,导致脑组织细胞肿胀、坏死或凋亡,机体表现多方面神经机能的丧失,是危害人类健康的一种重大疾患,但至今尚无有效的治疗方法^[1]。寻找新的治疗药物或拟合新的治疗方案一直是医药工作者不懈努力的研究方向,我国由于具有几千年的临床经验结晶,具有得天独厚的优势。

步长脑心通(脑心通)由黄芪、乳香、没药、全蝎、地龙、桃仁、红花、丹参、牛膝、当归等 16 味中药精制而成,具有益气活血,化淤通络,醒脑开窍,宣痹止痛之功效,用于脑血管意外、冠心病、动脉硬化症等,其疗效也已见诸报道^[2],但关于该方作用机理方面的研究还较少。

VIP(vasoactive intestinal peptide, VIP)具有扩张脑血管,增加脑血流量,促进侧枝循环的开放等作用,有利于恢复缺血组织的血氧供应^[3];它又能介导免疫功能、刺激勃起、促进肾上腺嗜铬细胞分泌儿茶酚胺及甲状腺素、胰岛素释放,对外分泌腺及分泌液体的多种上皮细胞也有调节作用^[4]。近来又有报道^[5],VIP 还可以减轻谷氨酸等诱导的神经元损伤,促进神经营养因子释放以及树突生长等作用,这些均可能减少缺血区神经元的继发性死亡,促进神经再生或回路重建。本实验就脑心通对中风模型大鼠血浆、脑组织中 VIP 含量的影响进行研究。

1 材料与方 法

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,体重 250~300g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证编号 SCXK(京)2002-0003。自发性高血压大鼠(SHR),雌雄兼用,8 周龄,体重 200~240g,购自阜外医院实验动物科。

1.2 药品及仪器 脑心通胶囊粉:陕西咸阳步长制药有限公司提供,1g 粉含饮片 4g,人临床用量为 4.8g 粉/人/日,临用时以蒸馏水制成适当浓度混悬液;尿激酶:天津市生物化学制药厂生产,批号 20020301;尼莫地平,丽珠集团丽珠制药厂生产,批号 021101;VIP 放免测定盒购自北京海科锐生物技术中心生产,批号为 030815。GC-911 γ 放射免疫计数器,中国科学技术大学科技实业总公司产品。

1.3 局灶栓塞性脑缺血大鼠模型复制 取体重 250~300g SD 大鼠,戊巴比妥钠(35mg/kg, ip)麻醉,常规消毒,在右眼外眦与右外耳道连线的中点作一

弧形切口,分离颞肌,沿颞弓向下分离至蝶骨大翼,用牙科钻开一 4×4mm 的骨窗,在此处找到中动脉分枝,取直径约 0.5mm、长约 5cm 棉线,以 50% FeCl₃ 润湿一端(约 0.5mm),沿中动脉分枝向前下方伸进 0.5mm 左右,贴于其前下段,润湿棉球覆盖,放置 20min 后取出棉线,缝合切口即可。假手术组以注射生理盐水替代 50% FeCl₃ 润湿棉线。

1.4 分组及给药 缺血早期 SD 大鼠造模手术完毕后,按体重分层随机分为 7 组,即假手术组、模型组、脑心通胶囊大剂量(4000mg 饮片/kg)组、中剂量(2000mg 饮片/kg)组、小剂量(1000mg 饮片/kg)组、尼莫地平(10mg/kg)组、尿激酶组(30 万 U/kg)组,并立即给药一次,除尿激酶组 ip 外,其余各组均为灌胃给药,假手术组和模型组给同体积的蒸馏水,在术后 5h 及 23h 各重复给药 1 次,术后 6h 和 24h 经眼眶采血,分离血浆,备用;并在 24h 采血后处死动物,快速取脑,干冰速冻, - 80℃ 保存备用。

缺血晚期 另取 SD 大鼠,按上述方法造模。手术完毕后,随机分为 7 组,即假手术组、模型组、脑心通胶囊大剂量(4000mg 饮片/kg)组、中剂量(2000mg 饮片/kg)组、小剂量(1000mg 饮片/kg)组、尼莫地平(10mg/kg)组、尿激酶组(30 万 U/kg)组,并立即给药一次,除尿激酶组 ip 外,余其各组均为灌胃给药,假手术组和模型组给同体积的蒸馏水,6h 后重复给药一次,次日至第 7 日每日给药一次,术后 3d 和 7d 经眼眶采血,分离血浆,备用;末次给药后 1h 采血处死动物,快速取脑,干冰速冻, - 80℃ 保存备用。

SHR 大鼠 取 SHR 大鼠(血压在 190~220mmHg),按上述方法复制局灶栓塞性脑缺血大鼠模型,手术完毕后,随机分为 6 组,即假手术组、模型组、脑心通胶囊大剂量(4000mg 饮片/kg)组、中剂量(2000mg 饮片/kg)组、小剂量(1000mg 饮片/kg)组、尼莫地平(10mg/kg)组,术后立即给药一次,在术后 6h 及 23h 各重复给药 1 次,末次给药后 1h 处死动物,快速取脑,干冰速冻, - 80℃ 保存备用。

1.5 组织取材和处理 将大鼠眼眶血约 3mL,放入已加有 10% EDTA-2Na 30 μ L,抑肽酶 1500U 的离心管中,离心 10min(4℃, 3500 rpm),分离血浆,按试剂盒说明测定 VIP 含量;取大鼠全脑,生理盐水煮沸 10min,以灰结节及视交叉之间的中心点为中心确定下丘脑,分别称取一定量的下丘脑组织,加入 1N 冰醋酸 700 μ L,匀浆,加 1N NaOH 700 μ L 中和,离心 30min(4℃, 3000 rpm),取上清测定 VIP 含量。血浆

中 VIP 含量以 pg/mL 表示, 组织中以 pg/mg 组织湿重表示。

1.6 统计方法 各组实验数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间差异的比较采用方差检验, 两组间采用 *q* 检验。

2 结果

2.1 脑心通对局灶性缺血大鼠血浆 VIP 含量的影响

表 1 脑心通对局灶性缺血 SD 大鼠血浆 VIP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量(mg/kg)	血浆 VIP(pg/mL)			
		6h	24h	72h	7d
假手术组	—	433.1 ± 210.4	460.9 ± 174.5	423.9 ± 196.4	300.2 ± 133.5
模型组	—	645.9 ± 248.6 ¹⁾	473.3 ± 207.8	500.1 ± 223.8	335.1 ± 92.2
尿激酶	30 万 U	572.0 ± 202.8	556.5 ± 182.3	215.5 ± 48.4 ¹⁾	282.4 ± 47.3
尼莫地平	10	675.6 ± 165.4	637.0 ± 306.5	376.2 ± 167.1 ²⁾	299.2 ± 130.6
脑心通	1000	777.9 ± 231.9	556.4 ± 251.1	319.6 ± 163.6	231.9 ± 90.9
	2000	760.4 ± 341.7	510.9 ± 256.8	445.4 ± 176.9	272.3 ± 122.2
	4000	942.4 ± 286.2 ¹⁾²⁾	481.1 ± 129.5	458.9 ± 102.5	274.0 ± 99.8

注: 与假手术组比较, ¹⁾ *P* < 0.05; 与模型组比较, ²⁾ *P* < 0.05。

2.2 脑心通对局灶性缺血大鼠下丘脑 VIP 含量的影响 结果见表 2。与血浆中结果相似, 在早期 (24h), 模型组下丘脑组织 VIP 较之假手术组升高, 7d 后两组 VIP 水平均下降至相似水平; 观察期间, 尼莫地平在造模后第 7 天可显著降低 VIP 浓度; 脑心通除大剂量组在术后 7d 显著降低下丘脑 VIP 水平外, 其它各点变化不明显。

表 2 脑心通对局灶性缺血 SD 大鼠下丘脑 VIP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 (mg/kg)	VIP(pg/mg 脑湿重)	
		24h	7d
假手术组	—	32.6 ± 12.2	23.3 ± 5.2
模型组	—	47.9 ± 13.8 ¹⁾	24.0 ± 4.5
尿激酶	30 万 U	38.2 ± 12.8	20.2 ± 4.3
尼莫地平	10	33.6 ± 13.8	17.1 ± 4.8 ²⁾
脑心通	1000	35.6 ± 22.0	23.4 ± 3.6
	2000	37.2 ± 23.3	21.5 ± 6.7
	4000	36.3 ± 14.9	16.9 ± 5.6 ²⁾

注: 与假手术组比较, ¹⁾ *P* < 0.05; 与模型组比较, ²⁾ *P* < 0.01。

2.3 脑心通对局灶性缺血 SHR 下丘脑 VIP 含量的影响 总体看来 SHR 大鼠反应差别较大 (图 1), 模型组在造模后 24h 的 SHR 大鼠下丘脑 VIP 水平较假手术组为低, 尼莫地平组恢复至假手术组水平, 大剂量脑心通可明显降低该部位 VIP 水平, 差别具显著性意义 (与模型组比较 *P* < 0.05)。

3 讨论

缺血性脑血管疾病尤其是缺血性中风是危害人类健康的一种重大疾患, 但至今尚无很好的治疗方

响 结果见表 1。在术后 6h, 大鼠中动脉局灶性栓塞大鼠血中 VIP 较之假手术组明显升高, 24h 后则无显著差异; 对于尿激酶和尼莫地平, 除前者在造模后 72h 点 VIP 水平明显低于模型组外, 其它各时相点与模型组相比变化不大; 脑心通在术后 6h 可升高血浆中 VIP 浓度, 尤其以大剂量组较为明显, 之后虽有所波动, 但与模型组相比, 不具统计学意义。

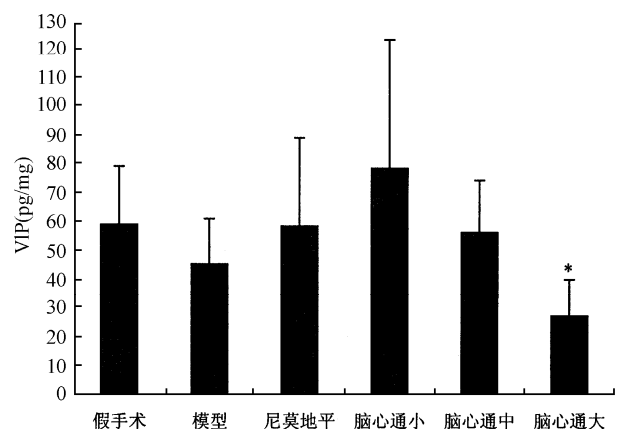


图 1 脑心通对局灶性缺血 SHR 下丘脑 VIP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$) (与模型组比较* *P* < 0.05)

案。20 世纪的近 200 个规模较大的临床试验结果显示, 现行的较为单一的药物治疗如恢复血供 (抗血栓药物、抗血小板药物、溶栓剂等) 以及神经保护剂 (电压依赖型钙通道阻滞剂、NMDA 受体拮抗剂和自由基清除剂等) 很难获得疗效, 根据疾病的不同阶段采取多种药物的复合治疗成为当前新的趋势^[6]。这为创制治疗该类疾病的中药复方提供了新的契机。步长脑心通含有具有上述多种药理活性的成分, 临床试验也证明该方具有一定疗效。其机制是否与影响神经肽水平有关, 迄今未见报道。

VIP 既为胃肠道激素, 又是神经肽, 在中枢和外周组织广有分布, 尤其是下丘脑某些区域、皮层、杏仁、海马、纹状体等处含量较高, 且具有广泛的生理作用, 也参与多种病理过程。它是由 28 个氨基酸残基构成的直链肽, 属胰高血糖素/胰泌素家族, 受体

主要为 PACAP/VIP 受体亚族中的 VPAC₁ 和 VPAC₂, 均为 G 蛋白耦联受体, 直接激活腺苷酸环化酶, 促进胞内 cAMP 生成增加, 降低细胞内该离子浓度, 有些亚型也与 PLC 通路耦联, 引发广泛的生物效应^[7], 与本研究较为密切的是舒张脑血管, 增加脑血流量, 增加胰岛素分泌, 改善能量代谢, 抑制兴奋性氨基酸毒性, 促进神经元突出生长等。

在中风模型早期(术后 6h), 血浆 VIP 升高, 这可能是对于中枢局部缺血的应激反应, 脑心通显著升高 VIP 水平, 对于增加缺血半影区的血氧供应, 促进侧枝循环的建立, 改善该区的能量代谢是有益的。但其它时间点血浆 VIP 变化均不明显, 参考尿激酶组变化时相, 这个特点可能与溶栓药物治疗窗狭窄无关(脑心通组成药味主要具有抗栓/溶栓作用), 原因可能与栓塞本身病理过程有关。

有文献报道^[8,9], 脑组织中 VIP 参与细胞的凋亡。结合本实验结果, 对于 SD 大鼠下丘脑组织 VIP 变化, 推测可能反映的是缺血半影区细胞迟发性凋亡状况, 因为尼莫地平组 VIP 水平在 7d 后显著降低。如果这样, 脑心通在这方面药效与尼莫地平组相当。

自发性高血压大鼠由于本身 VIP 水平异常, 对脑组织缺血反应性与 SD 大鼠有所差异。又因每组样本量较少, 放免法测定标准差较大, 各组 SHR 脑组织 VIP 虽有变化, 统计意义上的阳性结果很少(包括阳性药尼莫地平)。但脑心通大剂量组 VIP 水平显著下降, 是否通过调节 VIP 对促肾上腺素分泌儿茶酚胺的负反馈, 使血管扩张, 以有利于病态的恢复, 有助于抑制病变的进一步发展, 值得进一步研究。

总之, 在中风急性期早期, 脑心通升高血浆中

VIP 含量, 而在晚期该方可显著降低脑组织 VIP 水平, 提示 VIP 在中风病理过程可能起着不同的作用, 而脑心通可能通过不同的成分或环节调节 VIP 的变化。

参考文献:

- [1] Wolfgang Walz. Cerebral Ischemia. Molecular and Cellular Pathophysiology [M]. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1999. 3-32.
- [2] 王华卿, 刘林强, 孙海业. 步长脑心通治疗缺血性脑血管病疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2001, 10(8): 720.
- [3] White RP. Responses of human basilar arteries to vasoactive intestinal polypeptide [J]. Life Sci, 1987, 41(9): 1155-1163.
- [4] Goyes I, Lilling G, Davidson A, et al. Development of VIP agonists and antagonists with tissue and receptor specificity: Effects on behavioral maturation, sexual function, and the biologic clock [J]. Ann N Y Acad Sci, 1996, 805: 159-171.
- [5] Gressens P, Marret St, Hill JM, et al. Vasoactive Intestinal Peptide Prevents Excitotoxic Cell Death in the Murine Developing Brain [J]. J Clin Invest, 1997, 100(2): 390-397.
- [6] Gladstone DJ, Black SE and Hakim AM. Toward Wisdom From Failure: Lessons From Neuroprotective Stroke Trials and New Therapeutic Directions [J]. Stroke, 2002, 33: 2123-2136.
- [7] Grimaldi M and Cavallaro. Function and molecular diversity of PACAP/VIP receptors in cortical neurons and type I astrocytes [J]. European J Neurosci, 1999, 11(8): 2767-2772.
- [8] Zupan V, Nehlig A, Evrard P, Gressens P. Prenatal blockade of vasoactive intestinal peptide alters cell death and synaptic equipment in the murine neocortex [J]. Pediatr-Res, 2000, 47(1): 53-63.
- [9] Antonawich FJ, Said SI. Vasoactive intestinal peptide attenuates cytochrome c translocation and apoptosis in rat hippocampal stem cells [J]. Neuroscience letters, 2002, 325(3): 151-154.