

黄芪桂枝五物颗粒抗局灶性脑缺血的药效学研究

庄 严¹, 沈 欣²

(1 北京中医药大学药理教研室, 北京 100029; 2 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 研究观察了黄芪桂枝五物颗粒给药后, 对大鼠大脑中动脉血栓模型和光化学诱导脑血栓模型的影响作用, 通过对动物行为障碍、脑梗塞面积、血管损伤区、血小板聚集等指标的检测, 发现黄芪桂枝五物颗粒可使脑梗塞范围明显减少, 行为障碍程度明显改善。

关键词: 黄芪桂枝五物颗粒; 脑梗塞; 行为障碍; 血栓形成

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2004)03-0043-03

黄芪桂枝五物颗粒处方来源于《金匱要略》中的黄芪桂枝五物汤, 由黄芪、赤芍、桂枝、生姜、大枣五味中药组成, 其功能为益气温经、和经通痹, 临床用于中风恢复期和后遗症期的治疗, 现经现代工艺提取后制成颗粒剂。本文通过大鼠局灶性脑缺血模型, 探索了黄芪桂枝五物颗粒对实验性脑缺血的治疗作用。

1 实验材料

1.1 动物 SD 大鼠, 雌雄兼用, 体重 190~210g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号: SCXK11-00-0008。

1.2 受试药与试剂 黄芪桂枝五物颗粒由中国中医研究院中药所化学室提供, 黄棕色粉末, 18.5 克生药/克, 批号: 20010828, 用饮用水配制。阳性对照药: 天保宁康恩贝集团制药有限公司生产, 口服, 3 次/日, 1~2 次/日, 每片含银杏叶精提物 40mg。批号: 980902。芪溶栓胶囊, 成人每日用药量 1.8g 折合成大鼠用药量为 0.162g/kg。试剂: FeCl₃·6H₂O (A. R.), 北京化工厂产品, 用 1mol/L 盐酸配制; 红四氮唑(TTC), 北京化工厂产品, 批号: 960307。化学诱导剂: 化学荧光染料四碘四氯荧光素二钠(rose bengal RB), 分子量为 1017.60, 分析纯(北京化工厂 810627)。取 RB 溶于 0.9% 生理盐水中, 浓度为 5.0%, 经 0.45μm 超滤后遮光低温保存备用。

1.3 仪器 XTT 实体显微镜, 北京电光科学仪器厂产品; SHZ-22 型恒温水浴振荡器, 江苏太仓医疗器械厂产品; AEG-220 型电子分析天平, 日本岛津仪器公司产品。光源: 采用北京泰克仪器公司生产的光

导纤维冷光源。大鼠颅脑定位仪(北京卓立汉光仪器有限公司)

2 方法与结果

2.1 黄芪桂枝五物颗粒给药对大鼠中动脉血栓(MCAO)模型大鼠的试验

2.1.1 分组及给药 将 66 只大鼠随机分为六组, 即假手术对照组、MCAO 模型组、芪桂冲剂 11.34g 生药/kg 组、芪桂冲剂 5.67g 生药/kg 组、芪桂冲剂 2.83g 生药/kg 组、天保宁 24mg/kg 组(相当人用量的 6 倍), 每组 11 只。造模前灌胃给药, 一日一次, 共给药七次, 假手术对照组、MCAO 模型组给予等量的饮用水(1ml/100g 体重)。造模后灌胃给药一次。

2.1.2 造模方法 大鼠腹腔注射 12% 水合氯醛溶液(350mg/kg)麻醉。按 Tamura (1) 等的方法, 稍加改进。大鼠右侧卧位固定, 在眼外眦和外耳道连线中点作一弧形切口, 长约 1.5cm, 夹断颞肌并切除, 暴露颞骨, 用牙科钻在颞骨与颞鳞骨接合处靠近口侧 1mm 处作一直径 2.5mm 骨窗, 清理残渣, 暴露大脑中动脉(位于嗅束及大脑下静脉之间)。置一小片中空塑料薄膜保护血管周围组织。将吸有 50% 氯化铁溶液 10μl 的小片定量滤纸敷在此段大脑中动脉上(2), 30 min 后取下滤纸, 用生理盐水冲洗局部组织, 逐层缝合, 回笼饲养。假手术组, 除不滴加氯化铁溶液外, 其余手术步骤同模型组。

2.1.3 MCAO 大鼠神经症状和梗塞范围的评定 在术后不同时间(6h, 24h), 按 Bederson 等的方法并加以改进, 对动物进行行为评分。1. 提鼠尾离开地面约一尺, 观察前肢屈曲情况。如双前肢对称伸向地面, 记为 0 分; 如手术对侧前肢出现肩屈曲、肘屈曲、肩内旋或既有腕时的屈曲又有内旋者, 记为 1 分。

2. 将动物置于平滑地面上, 分别推双肩向对侧移动, 检查阻力。如双侧阻力对等且有力者记为 0 分; 如向手术对侧推动时阻力下降者, 记为 1 分。3. 将动物两前肢置一金属网上, 观察两前肢的肌张力。双侧肌张力对等且有力者为 0 分; 手术对侧前肢肌张力下降记为 1 分。4. 提鼠尾离开地面约一尺, 动物有不停地向手术对侧旋转者, 记为 1 分; 否则, 记为 0 分。根据以上标准评分, 满分为 4 分, 分数越高, 动物的行为障碍越严重。对行为检测打分值进行组间比较, *t* 检验。结果见表 1。动物经末次行为

评分后, 断头取脑。去掉嗅球、小脑和低位脑干, 剩余部份在 4℃ 下冠状切成 5 片。迅速将脑片置于 TTC 染液中 (每 5ml 染液中含 4% TTC 1.5ml, 1M K₂HPO₄ 0.1ml), 37℃ 避光温孵 30min, 再取出, 置于 10% 甲醛液中避光保存。经染色后非缺血区为玫瑰红色, 梗塞区为白色 (4)。将白色组织仔细挖下称重, 以梗塞组织重量占右侧半脑重量的百分比作为脑梗塞范围。结果进行组间比较, *t* 检验, 结果见表 2。

表 1 芪桂冲剂对 MCAT 大鼠脑梗塞范围及神经症状的影响 ($\bar{x} \pm s; n = 10$)

组 别	剂量 (g/kg)	脑梗塞范围 (%)	精神症状评分	
			6h	24h
假手术组	—	0.00 ± 0.00 [*]	0.00 ± 0.00 [*]	0.00 ± 0.00 [*]
MCAT 模型组	—	16.40 ± 2.76	3.45 ± 0.52	3.36 ± 0.50
芪桂冲剂组	0.828	10.98 ± 3.47 [*]	2.45 ± 0.52 ^{**}	2.27 ± 0.47 ^{**}
	0.414	11.52 ± 5.24 [*]	2.73 ± 0.65 ^{**}	2.36 ± 0.50 ^{**}
	0.207	13.41 ± 5.98	3.00 ± 0.45 [*]	2.91 ± 0.54
天保宁组	0.024	10.18 ± 4.72 ^{**}	2.45 ± 0.52 ^{**}	2.36 ± 0.89 ^{**}

注: 各组与模型组相比^{*} *P* < 0.05, ^{**} *P* < 0.01, ^{***} *P* < 0.01。

表 2 黄芪桂枝五物颗粒对光化学诱导脑血栓形成大鼠脑梗塞的影响 ($\bar{x} \pm s; n = 12$)

组 别	剂量 (g/kg)	梗塞面积 (红区占右半脑%)	血管损伤区面积 (蓝区占右半脑%)	血小板聚集 (记分)
模型组	—	16.8 ± 3.28	20.4 ± 4.97	2.17 ± 0.94
假手术组	—	无梗塞	无损伤	0.75 ± 0.62 ^{***}
阳性药组	0.162	14.8 ± 3.13	17.9 ± 3.62	1.58 ± 1.00
芪桂大剂量	0.828	12.2 ± 2.52 [*]	18.0 ± 2.84	1.25 ± 0.97 [*]
芪桂中剂量	0.414	13.1 ± 2.14 [*]	16.9 ± 2.50 [*]	1.25 ± 1.06 [*]
芪桂小剂量	0.207	11.5 ± 2.19 ^{**}	18.8 ± 3.04 [*]	1.33 ± 1.07

结果显示, 除假手术组未见行为异常改变, MCAT 模型组大鼠在术后 6h, 24h 均出现偏瘫样症状, 主要表现为手术对侧前肢内收, 肩内旋, 前肢肌张力降低, 肩抗力下降。芪桂冲剂各剂量组与天保宁组的大鼠在术后 6h, 芪桂冲剂 11.34g/kg 5.67g/kg 组、天保宁 0.024g/kg 组的大鼠在术后 24h 其神经症状均有不同程度的改善 (*P* < 0.01, *P* < 0.05)。术后 24h, 除假手术组未见脑组织异常改变外, 模型组、给药组大鼠均有不同程度梗塞灶, 芪桂颗粒 11.34g/kg 5.67g/kg 组、天保宁 0.024g/kg 组的大鼠梗塞程度明显减轻, 与模型组相比具有显著差异 (*P* < 0.01, *P* < 0.05)。芪桂颗粒 2.83g/kg 组可减轻梗塞灶, 但无统计学差异, 结果显示出一一定的量效关系。

2.2 黄芪桂枝五物颗粒对光化学诱导脑血栓形成大鼠的影响

2.2.1 分组及给药 将 72 只大鼠随机分为 6 组, 模型组、假手术组、阳性药组、黄芪桂枝五物颗粒小剂量组 (0.207g/kg)、中剂量组 (0.414g/kg) 和大剂量组 (0.828g/kg)。每组 12 只大鼠。每日口服给药 1 次, 容积为 10ml/kg。连续灌胃 15 天, 模型组及假手术组给等容积的蒸馏水。

2.2.2 造模方法 3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 沿头正中切口, 小心剥离右侧附着于顶骨处的软组织及肌肉, 电凝止血, 完全暴露右侧顶骨, 使用自制微型开颅钻, 以矢状缝右侧 0.3cm、冠状缝后 0.3cm 为中心开直径 0.6cm 的颅窗, 保留下层骨板及硬脑

膜,股静脉注射 5% RB(125mg/kg),时间为 1min。注射 RB 结束后 5min,移入光导纤维照射 10min,位置为颞窗脑区。整个手术过程中,环境温度保持于 $25.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 。

2.2.3 实验指标与评定 实验组动物于光照结束后 10min,假手术组于注射 RB 结束后 25min,经舌下静脉注射 1% Evans Blue 1ml,1h 后断头取脑,去除小脑及嗅球,将脑部图象扫描输入计算机。用图象分析软件计算梗塞灶(红染区)及 VIP(蓝染区)的范围(占右半脑的相对面积,%)。并用显微观察法评价 ADP 诱导的血小板聚集。显微镜放大倍数为 150,ADP 诱导富血小板血浆的终浓度为 $0.74\mu\text{mol/ml}$ 。记分标准定为视野内无聚集为 0;所见最大聚集体中血小板数小于 5 记分为 1;5~10 记分为 2;10~20 为 3;大于 20 为 4。

结果表明,模型组与假手术组之间,各项指标均有显著性差异,说明大鼠脑梗塞和血管损伤模型成功。阳性药龙芪组虽然在多项指标没有统计学显著性,但平均数的改变方向也都是与模型组背道而驰的,这说明药效的趋向。黄芪桂枝五物颗粒对于脑梗塞的发生有相当显著的抑制作用,三个剂量组的显著性均达到 $P < 0.01$ 以上。对于血管损伤的发生也有一定抑制作用,表现为蓝区面积平均数的减小,在中剂量组也达到统计显著限,黄芪桂枝五物颗粒对于血小板聚集表现了剂量依赖的抑制作用,在两个剂量达到统计显著限。因此,黄芪桂枝五物颗粒的抗血小板聚集作用可能是它抗脑梗塞和血管损伤的主要机理,从而使给药组血栓形成的程度低于模型动物。

3 讨论

中风病的发生是一个动态演变的过程,发病的急性期多以标实证候为主,或肝阳暴亢、内风动越,或痰浊壅盛,或热毒炽盛,或瘀血内阻等。鉴于中风病急性期标实症状突出,治疗当以祛邪为主,但是祛邪法尤其是清热、通腑、活血等方法的应用,易于损

伤正气。另外,作为病机的自然演变,热毒易耗气伤阴,痰浊瘀血的痹阻,影响气化,亦导致正气亏虚。因此,在中风病的恢复期和后遗症期,多是虚实夹杂,既有阳气不足,又见瘀血阻络。根据此期的病机特点,在治疗上宜扶正祛邪,益气活血为常用之法。《金匱要略》中的黄芪桂枝五物汤原是治疗血痹证的方剂,其所治疗的血痹证的基本病机是阳气不足,瘀血阻络方中黄芪为君药,该药甘、微温,归肺、脾经,能大补元气,使气化复常,气旺以促血行,气足则表卫得固。赤芍为臣药,本品味苦微寒,专血分,功擅活血化瘀、通络止痛,与黄芪配伍,一方面可以共奏益气活血之功;另一方面使黄芪补益而无呆滞之虞,使赤芍活血而无伤正之虑。佐桂枝以温经通阳,助黄芪、赤芍通达经络而运行气血,佐生姜以宣发阳气,气行而血不滞。大枣益脾,以助气血生化之源,为方中的使药。诸药合用,可以益气温经、活血通络,符合中风病恢复期和后遗症期的基本治法,切合基本病机。本实验证明,黄芪桂枝五物颗粒可减少 MCAO 模型和冷光源模型大鼠的脑梗塞范围,行为障碍程度得到改善,血小板聚集被明显抑制,表明黄芪桂枝五物颗粒对脑缺血具有一定的防治作用,为本方临床治疗缺血性脑血管病提供了实验依据。

参考文献:

- [1] Tamura A, Graham DI, McCullough J et al. Focal Cerebral ischemia in the rat. 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle Cerebral artery occlusion[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1981, 1: 53.
- [2] 刘小光,徐理钠.一种能评价溶栓药和抗栓药的大鼠大脑中动脉血栓模型[J].药学报,1995,30:662.
- [3] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M et al. Rat middle Cerebral artery occlusion: evaluation of the mode and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17: 472.
- [4] Lundy EF, Solik BS, Frank RS et al. Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils[J]. J Pharmacol Method, 1986, 16: 201.