

# 3 种中医治法对脑缺血再灌注损伤大鼠 自由基和神经元凋亡的动态比较研究

王 键, 郜 峦, 胡建鹏  
(安徽中医学院, 安徽 合肥 230038)

**摘要:**目的: 动态比较益气活血法、化痰通腑法、潜阳熄风法三种中医治法对急性缺血性脑血管疾病的动物模型的疗效, 探讨脑缺血急性期的证候属性及其演变规律。方法: 采用线栓法制作局灶性脑缺血再灌注大鼠模型, 动态观察缺血 2h 再灌注 24h、48h 和 72h, 3 种中医治法组方灌胃给药对一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和神经细胞凋亡率的变化。结果:(1) 脑缺血 2h 再灌注 24h、48h、72h, 模型组指标较假手术组均有显著病理性改变;(2) 缺血 2h 再灌注 24h, 各治疗组与模型组相比均有显著改善。组间比较, 增强 SOD 活性潜阳熄风组最优。(3) 缺血 2h 再灌注 48h, 各治疗组与模型组相比均有显著改善。组间比较, 降低脑匀浆 NOS 益气活血组最优。(4) 缺血 2h 再灌注 72h, 各治疗组均能显著改善 SOD/MDA 和神经细胞凋亡的病理改变。组间比较, 降低脑匀浆 MDA 化痰通腑组最优; 降低脑匀浆 NO 含量和 NOS 活性, 益气活血组最优。结论: 潜阳熄风法, 在缺血 2h 再灌注 24h, 提高 SOD 活性; 益气活血法, 在缺血 2h 再灌注 48h 及 72h, 降低 NO 含量和 NOS 活性; 化痰通腑法, 在缺血 2h 再灌注 72h, 清除过量 MDA。

**关键词:** 脑缺血 一再灌注损伤; 益气活血法; 化痰通腑法; 潜阳熄风法; 动态比较; 演变规律

**中图分类号:** R285.5   **文献标识码:** B   **文章编号:** 1005-9903(2005)05-0049-03

脑血管病是由各种血管性病因引起的脑部疾病的总称, 以其高发病率、高死亡率、高致残率和高复发率的四高特点成为当今严重威胁人类健康的三大疾病之一<sup>[1,2]</sup>。中医的辨证论治理论认为, 任何一个疾病都存在不同证候的逐步演变过程, 缺血性脑血管病也不例外。但不同时点哪种证型最为常见, 哪种治法最为有效, 目前中医界尚无有力的证据予以定论。

本实验采用线栓法制作局灶性脑缺血再灌注大鼠模型, 从方药反证的角度动态观察以益气活血法、化痰通腑法、潜阳熄风法为代表的 3 种中医治法的治疗效果。时间位点为缺血 2h 再灌注 24h、48h 和 72h, 从拮抗自由基损伤(NO/NOS, SOD/MDA)和神经细胞凋亡环节加以分析比较, 以寻求不同中医治法的最佳作用环节和时间位点, 初步探讨脑缺血急性期的证候属性及其演变规律, 为中医药正确辨证论治急性脑缺血再灌注损伤提供实验依据。

## 1 材料

收稿日期: 2004-07-07

基金项目: 国家中医药管理局项目(02-03JP18)

通讯作者: 王键, 联系电话: (0551) 2813776; E-mail: wjian@mail.

hf.ah.cn

**1.1 动物** 健康 Wistar 雄性大鼠 120 只, 体重(300±20)g, 由河南医科大学实验动物中心提供, 动物房为普通级饲养室, 实验前适应性饲养 3d。

**1.2 主要药剂** 益气活血法: 选用脑络欣通(A), 主要由黄芪、三七、川芎、蜈蚣等药物按不同比例配伍组成。潜阳熄风法: 选用镇肝熄风汤(B)(怀牛膝 30g、生代赭石 30g、生龙骨 15g、生牡蛎 15g、生龟板 15g、生杭芍 15g、玄参 15g、天冬 15g、川楝子 6g、生麦芽 6g、茵陈 6g、甘草 5g)。化痰通腑法: 选用星蒌承气汤(C)(全瓜蒌 30g、胆南星 10g、生大黄 10g、芒硝 10g)。全部药物购自安徽中医学院第一附属医院中药房, 由安徽中医学院中药制剂室提供制剂, 分别相当于原生药 6g·mL<sup>-1</sup>、14g·mL<sup>-1</sup>及 4.8g·mL<sup>-1</sup>。

**1.3 主要试剂和仪器** NO 与 NOS 试剂盒、SOD、MDA 试剂盒、考马斯亮兰蛋白试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供, 碘化丙啶(PI)试剂购自美国贝克曼库尔特公司。化学药品购自合肥市长江大药房。主要仪器有 932 型电热烧灼器、721 型分光光度计、80-2 型离心机、XLIF-MCL 型流式细胞仪等。

## 2 方法

**2.1 分组方法** 将动物随机分为假手术组、模型组、益气活血组、潜阳熄风组和化痰通腑组 5 组。每组 24 只, 不同时点各 8 只。

2.2 模型制备方法 参考 Longa 改良法<sup>[3]</sup> 制作急性局灶性脑缺血动物模型, 阻塞缺血时间为 2h, 再灌注时将栓线抽出即可。通过神经功能评分判断脑缺血模型的成功与否, 无神经功能损伤者应剔除。

2.3 药物干预 药物均采用灌胃给药。给药时间: 在缺血 2h 再灌注 24h、48h、72h 时间位点处死前 2h 分别分组给药, 处死前 1 天晚上禁食不禁水。药物分别按 (A)  $8.61\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、(B)  $20.3\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  及 (C)  $7\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃给药(相当于成人等效剂量的 7 倍)。

2.4 动物处死与标本收集 在各个相应的时间位点前再次麻醉动物, 快速断头取脑, 液氮冷冻, 而后置于  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  超低温冰箱, 保存待用。分别用于生化指标以及神经细胞凋亡率的检测。

2.5 数据统计与分析 实验数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两个样本均数比较采用 *t* 检验, 多个样本均数比较采用单因素方差分析, 多重比较用 *Q* 检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。所有统计由 SPSS11.0 for windows 软件处理, 统计图表绘制采用 EXCEL 2000 软件。

### 3 结果

#### 3.1 3 种中医治法对脑缺血 2h 再灌注 24h 各指标的观察比较

表 1 3 种中医治法对脑缺血 2h 再灌注 24h NO、NOS、SOD、MDA 和神经细胞凋亡率的观察比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

分组	剂量 g/kg	NO ( $\mu\text{mol/g prot}$ )	NOS ( $\text{U/mg prot}$ )	SOD ( $\text{U/mg prot}$ )	MDA ( $\text{nmol/mg rot}$ )	凋亡率 (%)
假手术组	-	0.619 $\pm$ 0.102	0.914 $\pm$ 0.281	10.58 $\pm$ 1.13	15.52 $\pm$ 1.64	5.16 $\pm$ 0.27
模型组	-	1.167 $\pm$ 0.298 <sup>1)</sup>	1.346 $\pm$ 0.078 <sup>1)</sup>	7.34 $\pm$ 1.10 <sup>1)</sup>	23.42 $\pm$ 1.19 <sup>1)</sup>	23.77 $\pm$ 2.90
益气活血组	8.61	0.522 $\pm$ 0.161 <sup>2)</sup>	0.533 $\pm$ 0.202 <sup>2)</sup>	12.04 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	15.94 $\pm$ 1.97 <sup>2)</sup>	14.31 $\pm$ 1.13 <sup>2)</sup>
化痰通腑组	20.3	0.598 $\pm$ 0.162 <sup>2)</sup>	0.561 $\pm$ 0.248 <sup>2)</sup>	11.26 $\pm$ 0.81 <sup>2)</sup>	16.06 $\pm$ 0.39 <sup>2)</sup>	14.39 $\pm$ 1.36 <sup>2)</sup>
潜阳熄风组	7.0	0.579 $\pm$ 0.143 <sup>2)</sup>	0.495 $\pm$ 0.280 <sup>2)</sup>	18.36 $\pm$ 3.28 <sup>2)</sup>	15.23 $\pm$ 1.84 <sup>2)</sup>	13.75 $\pm$ 1.02 <sup>2)</sup>

与假手术组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。(下同)

结果表明: 在缺血 2h 再灌注早期(24h), 模型组各指标较假手术组均有显著病理性改变; 各治疗组均能降低病理性升高的 NO 和 NOS, 提高脑组织 SOD 的活性, 降低 MDA 含量, 减少脑缺血再灌注后神经元凋亡的发生; 组间比较, 在增强 SOD 活性方面, 潜阳熄风组优于益气活血组和化痰通腑组, 后两组间无显著性差异。

#### 3.2 3 种中医治法对脑缺血 2h 再灌注 48h 各指标的观察比较

在缺血 2h 再灌注中期(48h), 模型组各指标较假手术组均有显著病理性改变; 各治疗组均能降低病理性升高的 NO 和 NOS, 提高脑组织 SOD 的活性,

降低 MDA 含量, 并能降低脑缺血再灌注后神经元凋亡的发生, 发挥脑保护作用; 组间比较, 在降低脑匀浆 NOS 方面, 益气活血组优于化痰通腑组与潜阳熄风组, 后两组间无显著性差异。

表 2 3 种中医治法对脑缺血 2h 再灌注 48h NO、NOS、SOD、MDA 和神经细胞凋亡率的观察比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

分组	剂量 g/kg	NO ( $\mu\text{mol/g prot}$ )	NOS ( $\text{U/mg prot}$ )	SOD ( $\text{U/mg prot}$ )	MDA ( $\text{nmol/mg rot}$ )	凋亡率 (%)
假手术组	-	0.646 $\pm$ 0.183	0.857 $\pm$ 0.286	10.35 $\pm$ 1.15	14.97 $\pm$ 3.19	4.65 $\pm$ 0.38
模型组	-	1.079 $\pm$ 0.307 <sup>1)</sup>	1.236 $\pm$ 0.121 <sup>1)</sup>	6.14 $\pm$ 1.42 <sup>1)</sup>	27.18 $\pm$ 4.72 <sup>1)</sup>	21.80 $\pm$ 1.83 <sup>1)</sup>
益气活血组	8.61	0.498 $\pm$ 0.130 <sup>2)</sup>	0.428 $\pm$ 0.161 <sup>2)</sup>	13.93 $\pm$ 2.14 <sup>2)</sup>	16.19 $\pm$ 2.92 <sup>2)</sup>	13.13 $\pm$ 1.58 <sup>2)</sup>
化痰通腑组	20.3	0.512 $\pm$ 0.194 <sup>2)</sup>	0.897 $\pm$ 0.154 <sup>2)</sup>	15.59 $\pm$ 2.66 <sup>2)</sup>	19.11 $\pm$ 3.27 <sup>2)</sup>	12.51 $\pm$ 1.04 <sup>2)</sup>
潜阳熄风组	7.0	0.716 $\pm$ 0.162 <sup>2)</sup>	1.037 $\pm$ 0.161 <sup>2)</sup>	14.05 $\pm$ 0.98 <sup>2)</sup>	18.24 $\pm$ 1.61 <sup>2)</sup>	12.58 $\pm$ 0.93 <sup>2)</sup>

#### 3.3 3 种中医治法对脑缺血 2h 再灌注 72h 各指标的观察比较

表 3 3 种中医治法对脑缺血 2h 再灌注 72h NO、NOS、SOD、MDA 和神经细胞凋亡率的观察比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

分组	剂量 g/kg	NO ( $\mu\text{mol/g prot}$ )	NOS ( $\text{U/mg prot}$ )	SOD ( $\text{U/mg prot}$ )	MDA ( $\text{nmol/mg rot}$ )	凋亡率 (%)
假手术组	-	0.767 $\pm$ 0.087	0.505 $\pm$ 0.234	14.09 $\pm$ 1.76	15.90 $\pm$ 2.27	4.84 $\pm$ 0.16
模型组	-	1.099 $\pm$ 0.100 <sup>1)</sup>	1.312 $\pm$ 0.214 <sup>1)</sup>	7.88 $\pm$ 0.76 <sup>1)</sup>	25.34 $\pm$ 2.51 <sup>1)</sup>	18.01 $\pm$ 0.78 <sup>1)</sup>
益气活血组	8.61	0.648 $\pm$ 0.316 <sup>2)</sup>	0.994 $\pm$ 0.243 <sup>2)</sup>	13.55 $\pm$ 0.96 <sup>2)</sup>	16.53 $\pm$ 1.61 <sup>2)</sup>	11.04 $\pm$ 0.73 <sup>2)</sup>
化痰通腑组	20.3	0.979 $\pm$ 0.138	1.293 $\pm$ 0.163	13.35 $\pm$ 1.84 <sup>2)</sup>	11.63 $\pm$ 1.79 <sup>2)</sup>	12.29 $\pm$ 0.69 <sup>2)</sup>
潜阳熄风组	7.0	1.009 $\pm$ 0.093	1.289 $\pm$ 0.141	14.80 $\pm$ 2.44 <sup>2)</sup>	18.68 $\pm$ 1.56 <sup>2)</sup>	11.31 $\pm$ 0.60 <sup>2)</sup>

在缺血 2h 再灌注后期(72h), 模型组各指标较假手术组均有显著病理性改变; 各治疗组均能明显提高脑组织 SOD 的活性, 降低 MDA 含量, 减少脑缺血再灌注后神经元凋亡的发生; 益气活血组能有效降低 NO 含量和 NOS 活性, 化痰通腑组与潜阳熄风组虽然也能够降低, 但无统计学差异; 组间比较, 在降低脑匀浆 NO 含量和 NOS 活性方面, 益气活血组优于化痰通腑组与镇肝熄风组, 后两组间无显著性差异。而在降低脑匀浆 MDA 方面, 以化痰通腑组为优, 后两组间无显著性差异。

#### 3.4 相关性分析

脑匀浆 NO 与 NOS 之间存在显著正相关关系 ( $P < 0.001$ ),  $r = 0.421$ 。说明 NO 的产生与其合成酶 NOS 密切相关, 二者的变化规律相一致。SOD 与 MDA 之间存在显著负相关关系 ( $P < 0.001$ ),  $r = -0.508$ 。说明在脑缺血再灌注时, 一方面有过量的自由基产生, 另一方面, 自由基防御体系受损, 二者互为因果, 引起缺血性神经元的损害。

各生化指标与凋亡之间相关性研究表明, MDA 与凋亡之间为显著性正相关 ( $P < 0.001$ ),  $r = 0.482$ 。提示脑缺血再灌注后神经元凋亡的发生与 MDA 含量的多少密切相关, 临床应当考虑使用自由基拮抗剂以拮抗凋亡的发生。

## 4 讨论

现有的研究表明<sup>[4-6]</sup>, 缺血性脑血管病发生后, 随着时间的推移, 不仅存在着动态变化的损伤级联反应, 也存在着中医证候演变的规律。

从本实验结果来看, 各模型组的相关指标与同时段假手术组相比, 均有显著性病理改变, 说明脑缺血再灌注损伤是一个多环节、多因素的病理过程。在过度表达的 NOS 作用下, NO 的生成过量, 发挥其神经毒素作用, 对脑组织造成损伤。同时, 脑缺血时自由基防御体系受损, SOD 等自由基清除剂活性降低, 加剧了缺血时自由基引起的损害, 由于脂质过氧化反应的增强, MDA 的生成增加, 又进一步使 SOD 因消耗增加而减少, 引发自由基连锁反应。诸多因素共同作用, 诱导神经细胞的凋亡, 加重脑缺血的病理性损伤。

3 种不同中医治法, 在对抗神经细胞凋亡的环节上的差异没有统计学意义, 说明中药能有效阻止脑缺血凋亡的发生发展, 应该及早应用。虽然各中医治法的优势不一样, 重点作用环节不一样, 但是在阻止凋亡的环节上是等效的, 组间比较并无显著性差异, 大有“殊途同归”之妙。提示凋亡发生的途径有多种, 而拮抗凋亡发生的途径也是多样的。

同时, 3 种不同中医治法在不同的时间位点上, 相关指标在不同程度上都得到了改善, 说明 3 种治法都是有效的。根据方药反证的思路, 以其效测其方, 以其方测其法, 以其法测其证, 不难得出, 气虚、血瘀、痰浊、火热、腑实、阳亢、动风等因素共同存在于缺血性中风的发生发展过程中。这正从基础实验的角度反映了其病因病机的复杂性, 诸因素在不同的病理环节和发展阶段交互作用, 导致了不同的病理学特点, 显示出不同的证候学属性。而根据各治法的优势之所在, 又可以推出其最佳作用时间位点

和作用环节, 即: 潜阳熄风法, 用于缺血 2h 再灌注 24h, 提高 SOD 活性; 益气活血法, 用于缺血 2h 再灌注 48h 及 72h, 降低 NO 含量和 NOS 活性; 化痰通腑法, 用于缺血 2h 再灌注 72h, 清除过量 MDA。

“方从法立, 法从证出”, 任何一个成形的复方, 都体现一定的治法, 任何一个具体的治法, 都应该针对一定的证候。就本次实验研究而言, 我们初步得出以下结论: 在脑缺血再灌注损伤的早期, 中医证候是以阳亢风动为其主要特征, 随着病程的进展, 逐渐演变为气虚血瘀证, 至后期则虚实夹杂, 以气虚血瘀证和痰热腑实证兼而有之为主要特征。当然, 这个结论能否得到广泛的应用, 还有待今后的实验进一步证实。

### 参考文献:

- [1] Bontia R. Stroke prevention: a global perspective[J]. Stroke prevention, 2001, 259-274.
- [2] Feigin VL, Lawes CMM, Bennett DA, et al. Stroke epidemiology: a review of population based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century[J]. Lancet Neurol, 2003, 2(1): 43-53.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [4] 廖维靖, Frank WUD. 脑缺血损伤的病理生理机制损伤级联反应[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 1998, 6(4): 197-202.
- [5] 于永发, 董国淑. 脑梗死治疗时间窗的差异与个体化研究进展[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2002, 10(3): 181-184.
- [6] 王永炎, 沈绍功. 今日中医内科[M]. (上卷). 北京: 人民卫生出版社, 2000. 49-54.