

脑心通胶囊对局灶栓塞性脑缺血大鼠内皮素及降钙素基因相关肽含量的影响

霍海如¹, 周 军¹, 马久太², 李沧海¹, 李兰芳¹, 郭淑英¹, 姜 楠¹, 郭建友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, 咸阳 710075)

摘要: 目的: 在大鼠局灶栓塞性脑缺血模型上观察脑心通胶囊对神经肽的影响, 探讨其治疗脑缺血的可能机制。方法: 采用 FeCl₃ 致大脑中动脉栓塞模型, 应用放免法测定 SD 和自发性高血压大鼠 (SHR) 血浆、下丘脑中 ET 和 CGRP 含量。结果: 脑心通可明显拮抗缺血 24h 以内的血浆 CGRP 降低及 ET 的升高, 提高 SHR 脑缺血时脑组织 CGRP 含量。结论: 脑心通主要对缺血早期 ET 及 CGRP 的异常变化有改善作用, 而对缺血后期神经肽尚无明显影响, 且以升高血浆及下丘脑中 CGRP 含量为主, 对血浆 ET 的升高也有一定影响。

关键词: 中风; 脑心通; 内皮素; 降钙素基因相关肽

中图分类号: R284.2 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)01-0037-04

Effect of NXT on ET And CGRP in Rats With Focal Cerebral Ischemia

HUO Hai-ru¹, ZHOU Jun¹, MA Jiu-tai², Li Cang-hai¹, LI Lanfang¹,
GUO Shu-ying¹, JIANG Nan¹, GUO Jian-you¹, 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 neuropeptide in focal stroke rats and elucidate the mechanisms. Methods: The content of endothelin (ET) and calcitonin gene related peptide (CGRP) in plasma and hypothalamus was measured via radioimmunoassay in both SD rats and spontaneous hypertension rats (SHR) with middle cerebral artery infarction. Results: Oral treatment with NXT counteracted both the decrease of CGRP and rise of NT in plasma during 24 hours after infarction and increased CGRP level in ischemic region in SHR. Conclusion: NXT increases CGRP level in both plasma and hypothalamus, and inhibits the increase of plasma NT in the early phase of stroke. no action on neuropeptide in the late phase of stroke was observed.

Key words: Stroke; Naoxintong; Endothelin; Calcitonin gene related peptide

随着社会老龄化, 缺血性脑血管病的发病率亦相对增高, 已成为老年人的常见病和多发病。内皮素 (Endothelin, ET) 和降钙素基因相关肽 (Calcitonin gene related peptide, CGRP) 分别是体内最强的缩血管和舒血管活性多肽, 它们与脑缺血的关系越来越受到人们的重视。步长脑心通是由黄芪、乳香、没药、全蝎、地龙等 16 味中药组成, 具有益气活血、化瘀通络、醒脑开窍、宣痹止痛之功效, 临床上用于治疗脑梗塞、冠心病、血管性痴呆等取得了较好的疗

效^[1-3]。本实验对 SD 大鼠及自发性高血压大鼠 (SHR) 复制局灶栓塞性脑缺血模型, 观察脑心通对 ET 及 CGRP 的影响, 探讨其治疗缺血性脑血管病的机理。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠, 体重 250~300g, 雄性, 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。

SHR 大鼠, 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。尿激酶: 天津市

收稿日期: 2004-08-24

通讯作者: 霍海如, Tel: (010) 64041008, E-mail: huohr@yahoo.com.cn

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。

CGRP(批号:2003-7-25,)及 ET(批号:2003-7-25,2003-8-28)放免试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所。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的制备 按文献方法^[4],取体重 250~300g SD 大鼠或 SHR 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。假手术组按上法以注射生理盐水替代 50% FeCl₃ 润湿棉线。

1.4 分组及给药 对缺血早期的影响: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(400mg 饮片/kg)组、中剂量(200mg 饮片/kg)组、小剂量(100mg 饮片/kg)组、尼莫地平(10mg/kg)组、尿激酶组(30 万 U/kg)组,立即给药 1 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。

对缺血后期的影响:另取 SD 大鼠,按上述方法造模,手术完毕后,分组情况同急性期,立即给药 1 次,除尿激酶组中外,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,6h 后重复给药 1 次,次日及第 7 日每日给药 1 次,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。

对 SHR 的影响:取 SHR 大鼠,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 5 组,即假手术组、模型组、脑心通胶囊大剂量(400mg 饮片/kg)组、中剂量(200mg 饮片/kg)组、尼莫地平(10mg/kg)组,术后立即给药 1 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 取大鼠眼眶血约 3mL,放入已加有 10% EDTA-2Na 30 μ L 和抑肽酶 1500U 的离心

管中,离心 10min(4℃, 3500rpm),分离血浆,按试剂盒说明分别测定 ET 和 CGRP 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℃, 3000rpm),取上清分别测定 ET 和 CGRP 含量。血浆中 ET 和 CGRP 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 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异的比较用双侧 *t* 检验法。

2 结果

2.1 脑心通胶囊对 CGRP 含量的影响 由表 1 结果可见,大鼠局灶栓塞性脑缺血 6h 后,血浆 CGRP 含量一过性的显著升高,24h 低于假手术组,在造模后第 7d 又升至正常水平。脑心通胶囊中剂量组对脑缺血 6h 血浆中 CGRP 一过性的升高有影响,大、中、小三个剂量组对缺血 24h CGRP 的降低均有显著性的拮抗作用,对缺血晚期未见明显影响。

本实验方法所致大鼠局灶栓塞性脑缺血后 24h 和 7d,下丘脑组织中 CGRP 含量均无明显改变,脑心通对此亦未见明显影响(表 2)。

表 1 脑心通胶囊对局灶栓塞性脑缺血大鼠血浆 CGRP 含量的影响

组别	剂量 (mg/kg)	CGRP (pg/mL)		
		6h	24h	7d
假手术组	—	218.48 \pm 183.61 (6)	224.21 \pm 129.19 (7)	178.68 \pm 33.94 (11)
模型组	—	634.38 \pm 448.19 (8) ¹⁾	102.04 \pm 54.99 (9) ¹⁾	175.17 \pm 73.75 (11)
尿激酶	30 万 U	272.94 \pm 162.53 (10)	454.55 \pm 326.54 (7) ²⁾	206.37 \pm 132.68 (12)
尼莫地平	10	469.24 \pm 244.29 (6)	268.86 \pm 155.96 (7) ²⁾	164.78 \pm 55.26 (12)
脑心通	100	272.95 \pm 148.12 (6)	177.68 \pm 39.95 (5) ²⁾	206.89 \pm 77.08 (11)
	200	225.47 \pm 105.15 (8) ²⁾	288.79 \pm 191.11 (9) ²⁾	173.61 \pm 40.13 (12)
	400	443.78 \pm 189.8 (9)	329.73 \pm 238.56 (8) ²⁾	184.46 \pm 65.58 (12)

注:与假手术组比较¹⁾ *P* < 0.05;与模型组比较²⁾ *P* < 0.05;()括号为例数。下同。

表 2 脑心通胶囊对局灶栓塞性脑缺血大鼠下丘脑 CGRP 含量的影响

组别	剂量 (mg/kg)	CGRP (pg/mg 脑湿重)	
		造模后 24h	造模后 7d
假手术组	—	11.91 \pm 3.80 (7)	14.79 \pm 2.19 (11)
模型组	—	15.83 \pm 3.79 (8)	15.71 \pm 1.37 (12)
尿激酶	30 万 U	11.54 \pm 4.94 (10)	14.03 \pm 3.04 (11)
尼莫地平	10	12.92 \pm 4.84 (7)	14.56 \pm 2.05 (11)
脑心通	100	11.83 \pm 5.29 (9)	15.46 \pm 4.59 (8)
	200	12.38 \pm 4.80 (9)	15.68 \pm 5.45 (12)
	400	10.40 \pm 5.34 (7)	15.12 \pm 4.14 (12)

2.2 脑心痛胶囊对 ET 含量的影响 结果见表 3。脑心痛大、中、小三个剂量组对大鼠局灶性缺血 6 和 24h 血浆中 ET 含量的增高均有不同程度的拮抗作用,对缺血 7d 后 ET 含量的降低无明显影响。

本实验条件下,无论在缺血后 24 小或 7d,无论给药与否,均未能测出 SD 大鼠下丘脑组织中 ET 含量。

表 3 脑心痛胶囊对局灶性缺血大鼠血浆 ET 含量的影响

组别	剂量 (mg/kg)	ET(pg/mL)		
		6h	24h	7d
假手术组	—	89.59 ±30.65(9)	113.77 ±17.84(10)	296.71 ±60.80(11)
模型组	—	136.17 ±23.21(12)	135.12 ±27.02(11) ¹⁾	238.31 ±38.01(13) ²⁾
尿激酶	30 万 U	111.87 ±18.05(10) ³⁾	114.28 ±18.07(10) ³⁾	241.45 ±45.13(12)
尼莫地平	10	102.19 ±17.01(11) ⁴⁾	107.35 ±12.09(11) ⁴⁾	252.94 ±52.53(12)
脑心痛	100	105.08 ±25.04(11) ⁴⁾	108.81 ±14.45(12) ³⁾	243.73 ±53.48(11)
	200	83.65 ±22.29(12) ⁴⁾	109.58 ±16.46(12) ³⁾	228.47 ±47.68(12)
	400	141.71 ±38.36(11)	99.89 ±19.61(11) ⁴⁾	256.62 ±48.89(12)

注:与假手术组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; 与模型组比较³⁾ P < 0.05, ⁴⁾ P < 0.01。

2.3 脑心痛胶囊对 SHR 下丘脑 CGRP 和 ET 含量的影响 SHR 大鼠局灶性缺血后 24h,下丘脑 ET 含量无明显改变,脑心痛胶囊对此亦未见明显影响,对 CGRP 含量的降低则有拮抗作用(表 4)。

表 4 脑心痛胶囊对 SHR 下丘脑 CGRP 和 ET 含量的影响

组别	剂量 (mg/kg)	ET	CGRP
		(pg/mg 脑湿重)	(pg/mg 脑湿重)
假手术组	—	5.26 ±0.82(5)	18.91 ±5.07(4)
模型组	—	5.05 ±0.62(4)	10.58 ±2.061(5) ¹⁾
尼莫地平	10	5.46 ±0.99(5)	13.03 ±0.95(4)
脑心痛	200	6.19 ±0.99(5)	16.40 ±2.87(5) ²⁾
	400	7.21 ±2.44(4)	12.78 ±3.19(4)

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

3 讨论

ET 是内皮细胞释放的一种体内缩血管作用最强、作用时间最久的活性物质,在体内分布广泛,在中枢神经系统又以下丘脑和纹状体中的含量最高⁵⁾。CGRP 作为一种体内最强的舒血管物质和神经递质在体内作用广泛,是一种多功能的生理调节肽,对全身血管有不同程度的扩张作用,尤对脑、心血管的作用更为显著。ET 和 CGRP 这两种作用相反的多肽物质在中枢神经系统内可作为一种神经介质,在外周血液中又是循环激素,对血液循环特别是脑血液循环起着重要作用,并参与了缺血性脑损伤的发生发展过程。

近年来,ET 和 CGRP 的平衡失调在脑栓塞病情发展、预后和治疗中的作用引起了临床学家的重视。已有病例检测结果初步表明,脑栓塞患者的病变严重程度与血浆 ET 含量呈正相关,与血浆 CGRP 含量呈负相关⁶⁾,纠正 ET 和 CGRP 的平衡失调可能是治疗脑栓塞的一种新途径。

本实验结果表明,SD 大鼠脑缺血发生后血浆 ET 和 CGRP 水平发生时相变化。在缺血早期,CGRP 呈一过性升高,与文献报道一致⁷⁻⁸⁾,缺血后 24h,CGRP 又明显低于假手术组,造模后第 7d,CGRP 恢复至正常水平。缺血缺氧可造成脑组织 ET 的合成和释放增加,而 CGRP 能拮抗 ET 的作用,并有可能促进梗塞后侧支循环血管的开放。因此,缺血早期 CGRP 水平的增高可能是一种代偿机制。脑心痛对这种代偿机制尚未见明显影响(由于实验检测点的间隔较大,是否促进其代偿机制提前或延后,尚待今后观察),但可明显拮抗造模后 24h CGRP 降低。SD 大鼠脑缺血造模后 6 和 24h,血浆 ET 含量较假手术组有所升高,分别相当于后者的 152% 和 119%;给药后可使升高的血浆 ET 含量显著降低。造模第 7d 血浆 ET 值比假手术组有所降低,脑心痛治疗组的相应值仍略低于造模组,但无统计上的显著性。

有文献报道⁹⁾,SHR 大鼠下丘脑 ET 及 CGRP 含量高于普通大鼠。本实验研究也发现,同样条件下未能测出 SD 大鼠下丘脑组织中 ET 含量,在 SHR 大鼠相应组织中则有较明显表达,与报道一致。脑心痛对造模动物下丘脑的 ET 含量未见明显影响,然可使降低的 CGRP 值有显著升高作用。

我们的实验结果提示,脑心痛主要对缺血早期 ET 及 CGRP 的异常变化有改善作用,而对缺血后期神经肽尚无影响,且以升高血浆及下丘脑中 CGRP 含量为主,对血浆 ET 的降低也有影响,从而使二者保持稳定,改善脑血管的舒缩状态,并发挥 CGRP 对神经细胞缺血损伤的保护作用。

参考文献:

[1] 张敬贤,张克峰,刘阿庆.步长脑心痛对冠心病血脂异常者的调脂抗氧化作用[J].心血管康复医学杂志,2002,11(2):163-165.

[2] 王华卿,刘林强,孙海业.步长脑心痛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] 李青.步长脑心痛治疗血管性痴呆 31 例[J].时珍国医国药,2000,11(6):535.

- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 第三版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 1067.
- [5] Yamaura I, Tani E, Méda Y, et al. Endothelin 1 of canine basilar artery in vasospasm[J]. J Neurosurg, 1992, 76: 99.
- [6] 何娅, 苏清华, 马琳, 等. 脑梗塞患者内皮素和降钙素基因相关肽含量变化及意义[J]. 陕西医学杂志, 2002, 31(9): 775-776.
- [7] 卢晓欣, 洪新如, 汤永建, 等. 高压氧治疗对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后神经肽 Y1-36 和降钙素基因相关肽含量的影响[J]. 中华航海医学与高压医学杂志, 2002, 9: 82-85.
- [8] 王文龙, 许文静, 王汝更, 等. 脑梗塞患者血浆降钙素基因相关肽和内皮素含量的动态分析[J]. 济宁医学院学报, 2002, 25(4): 29-30.
- [9] 彭英, 黄如训, 正映红, 等. 自发性高血压大鼠下丘脑和血浆 ET、CGRP 含量变化的研究[J]. 临床神经病学杂志, 1996, 9: 195.