

三甲散对大脑中动脉阻断模型的保护作用

卞慧敏, 王灿辉, 刘涛, 黄小涛, 邵宇, 刘学风

(南京中医药大学, 南京 210029)

摘要:目的 观察三甲散对大脑中动脉阻断模型(MCAAO)大鼠的保护作用,并探讨其作用原理。方法 复制大脑中动脉阻断模型,采用脑片染色法、评分法,观察该药对模型大鼠脑梗塞面积、梗塞率和行为学评分的影响,同时还观察了该药对模型大鼠血液流变学指标和过氧化物歧化酶(SOD)活性的影响。结果 三甲散能够降低模型大鼠脑梗塞面积、梗塞率和行为学评分,抑制血小板聚集,提高血浆SOD活性,与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。结论 三甲散对大脑中动脉模型大鼠有明显的保护作用,可能是通过其抑制血小板聚集作用,增强机体清除自由基的能力,减轻自由基对脑组织的损伤,从而达到缩小脑梗塞面积的目的。

关键词:三甲散; 大脑中动脉阻断模型; 血液流变; SOD

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2002)02-0041-03

三甲散是根据吴鞠通《温病条辨》三甲复脉汤加减而来,临床上用于血管性痴呆^[1],疗效良好。我们在观察了其对记忆障碍模型小鼠有增强记忆作用^[2]的基础上,利用大脑中动脉阻断模型(MCAO),进一步探讨了其对该模型的保护作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 雄性大鼠,体重 250~350g。由解放军南京军区总医院实验动物中心提供(合格证书:苏动质字第 97001 号)。

1.2 受试药物

1.2.1 尼莫地平制剂原液(德国拜耳公司生产,中国北京拜耳医药保健有限公司分装,批号:CANAL2),10mg/50ml,腹腔注射给药 0.002g/kg,每日一次。

1.2.2 复方丹参注射液(华西医科大学制药厂,批号:990301),20g(生药)/10ml,用时将药液用生理盐水稀释为每 100ml 含生药量 80g 的溶液,腹腔注射 8g/kg,每日一次。

1.2.3 三甲散由龟板(*Chinemys reevesii* (Gray))、鳖甲(*Trojanx sinensis* Wiegmann)、牡蛎(*Ostrea rivularis* Gould)、地龙(*Pheretima aspeergillum* (E. Perrier))、何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb)、当归(*Angelica Sinensis* (Oliv.) Diels)、石菖蒲(*Acorus gramineus* Sirland)等药组成(江苏江阴天江制药有限公司提供,批号:970111)。临用时取蒸馏水将三甲散配制成每

100ml 含药粉 6.3、18.9g 的混悬液。

1.3 方法 将大鼠随机分为 6 组,即正常组、模型组、尼莫地平组、丹参组、三甲散高(1.89g/kg)、低(0.63g/kg)2 个剂量组。各组动物每天腹腔注射给药 1 次(三甲散组注射等容积生理盐水),同时灌胃蒸馏水(三甲散组灌胃给药),连续 3d。第三天按文献方法^[3]复制大鼠局灶性脑缺血模型,观察术后 4h、24h 对其行为评分的影响。评分标准:①提鼠尾离地面约 1 尺,观察前肢情况。正常大鼠两前肢对称地伸向地面。有左肩内旋,左前肢内收者,评为 4 分。否则 0 分;②将动物置平滑地板上,分别推左(或右)肩向对侧移动,检查抵抗推动的阻力。正常大鼠双侧阻力对称。右肩向左侧移动时,发现阻力下降者,根据下降程度的不同,评为 1~3 分;③将动物两前肢置一金属网上,观察两前肢的肌张力。正常大鼠两前肢肌张力对称。发生左前肢肌张力明显下降者,根据下降程度的轻重,评为 1~3 分。根据以上标准评分,满分 10 分,分数越高,说明动物的行为障碍越严重。评分采用单盲法。造模 24h 后,颈动脉放血,测试相关指标,并立即处死大鼠,取出脑组织,将脑置冰冷的生理盐水中 10min,去除嗅球、小脑和低位脑干后,冠状切成五片。然后迅速将脑片置 5ml 含有 1% TTC 的磷酸缓冲溶液中,避光温孵 30min,其中每隔 7~8min 翻动一次,经染色后,正常脑组织呈玫瑰红色,而梗塞组织呈白色,且界限分明。温孵完毕后将脑片照相,剪下红白颜色区称重计算之。然后分别计算出五个脑片共 10 个平面的

总重量和梗塞区域的重量, 求出梗塞区重量占总重量的百分比, 即梗塞率。

1.4 检测指标

1.4.1 血液粘度 大鼠在造模 24h 后用水合氯醛麻醉, 颈动脉放血, 3.8% 的枸橼酸钠 1:9 抗凝, 用 LG-R-80 电脑血液粘度测试仪(北京世帝科学仪器公司)测定全血粘度和血浆粘度。

1.4.2 血沉 红细胞压积 用温氏管法测定。

1.4.3 血小板聚集试验 (PAcT) 按文献方法^[4], 以 ADP(最终浓度为 4mol/L)为诱导剂, 用 PAPER-I 型血小板聚集及血凝测定仪(北京世帝科学仪器公司)测定血小板聚集率。

1.4.4 血凝学指标测定 凝血酶原时间(PT)、自陶土部分凝血活酶时间(APTT)、凝血活酶时间(TT): 采用上海医科大学华山医院提供的试剂盒和方法进行测定。

1.4.5 血浆纤维蛋白原(Fg)测定 按文献^[5]的方法进行。

1.4.6 血浆超氧化物歧化酶(SOD)活性测定 采用南京建成生物工程公司提供的试剂盒和方法进行检测。

所有数据均采用 *t* 检验法, 进行显著性比较。

2 结果

2.1 对 MCAO 梗塞率和行为学的影响 通过脑组织切片染色可见造模鼠梗塞脑组织呈白色(正常脑组织呈玫瑰红色), 界限分明, 且 MCAO 组行为学评分明显升高。各给药组(除小剂量组外)梗塞率均明显下降, 行为学评分(24h)也明显减少, 与 MCAO 组比较有显著性差异(见表 1)。

2.2 对 MCAO 血小板聚集率的影响 造模后大鼠血小板最大聚集率明显升高, 与假手术组比较差异有高度显著性, 1min 和 5min 聚集率也略有增高, 但差异无显著性。各给药组均能降低血小板最大聚集率, 与 MCAO 组比较, 除小剂量组外, 差异均有显著

性。三甲散大剂量组还能降低 1min、5min 聚集率, 与 MCAO 组比较均有显著性差异; 其 1min 和 max 聚集率与小剂量组比较也有显著性差异(见表 2)。

表 1 三甲散对 MCAO 梗塞率和行为学的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	梗塞率 (%)	行为学评分	
			4h	24h
假手术组	11	0 ^{**}	0 ^{**}	0 ^{**}
MCAO 组	14	23.62 ± 9.14	6.14 ± 2.93	6.43 ± 3.16
尼莫地平组	11	5.80 ± 4.71 ^{**}	5.36 ± 1.75	3.91 ± 1.70 [†]
丹参组	10	8.54 ± 5.57 ^{**}	5.50 ± 2.07	3.10 ± 1.45 ^{**}
三甲小剂量	10	17.83 ± 7.60	7.10 ± 1.78	3.80 ± 1.69
三甲大剂量	10	4.76 ± 2.26 ^{**}	5.20 ± 2.10	4.20 ± 1.48 [‡]

注: 与模型对照组比较 * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01(下同)。

表 2 通脉益智胶囊对 MCAO 血小板聚集率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	血小板聚集率		
		1min	5min	max
假手术组	10	32.41 ± 6.08	16.85 ± 9.97	34.33 ± 5.84 ^{**}
MCAO 组	13	36.97 ± 8.66	20.49 ± 10.57	41.29 ± 5.46
尼莫地平组	10	30.00 ± 9.65	16.72 ± 14.02 [#]	32.72 ± 8.71 [†]
丹参组	10	29.85 ± 10.23	13.12 ± 11.17	32.33 ± 9.69 [‡]
三甲小剂量	10	33.64 ± 7.11 [#]	11.62 ± 8.72 [‡]	34.91 ± 7.53
三甲大剂量	10	27.98 ± 9.76 ^{**}	8.37 ± 8.70 ^{**}	31.48 ± 9.58 ^{**}

注: 与大剂量组比较 # *P* < 0.05, ** *P* < 0.01(下同)。

2.3 对 MCAO 大鼠血液粘度的影响 MCAO 组大鼠全血低切粘度和血浆粘度均有升高, 与假手术组比较有显著性差异。各给药组全血低切粘度和血浆粘度也有不同程度的升高, 与假手术组比较(全血粘度除两个阳性组, 血浆粘度除小剂量组外)差异有显著性, 各给药组与模型组比较差异无显著性。血沉与红细胞压积各组间比较均无显著性差异(见表 3)。

2.4 对 MCAO 大鼠血凝学指标的影响 如表 4 所示, 各组间 TT、PT、APTT 时间和 Fg 含量均无明显差异。

表 3 通脉益智胶囊对 MCAO 血液流变性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	全血粘度(map.s)		血浆粘度 1000·s ⁻¹	血沉 mm/h	压积 %
		200·s ⁻¹	1.0·s ⁻¹			
假手术组	11	3.48 ± 0.36	17.18 ± 2.69 [*]	1.27 ± 0.045 [‡]	4.00 ± 3.62	42.5 ± 3.57
MCAO 组	11	3.63 ± 0.40	20.56 ± 3.24	1.35 ± 0.09	2.68 ± 2.19	42.73 ± 2.72
尼莫地平组	11	3.70 ± 0.19	20.41 ± 2.94	1.37 ± 0.08 [‡]	4.91 ± 3.05	41.91 ± 5.11
丹参组	11	3.72 ± 0.28	20.67 ± 3.21	1.37 ± 0.08 [‡]	4.25 ± 4.11	42.10 ± 4.09
三甲小剂量	9	3.68 ± 0.40	21.52 ± 2.87 [‡]	1.34 ± 0.09	3.95 ± 4.68	44.11 ± 3.52
三甲大剂量	9	3.75 ± 0.34	22.92 ± 3.62 [‡]	1.36 ± 0.21 [‡]	3.06 ± 3.45	44.11 ± 3.44

注: 与假手术组比较: [‡] *P* < 0.05, ^{‡‡} *P* < 0.01(下同)。

表 4 通脉益智胶囊对 MCAO 大鼠血凝学指标的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	TT s	PT s	APTT s	Fg mol/L
假手术组	11	28.00 ± 17.16	17.82 ± 3.19	21.64 ± 3.85	2.35 ± 0.27
MCAO 组	13	28.31 ± 9.99	17.85 ± 2.23	22.69 ± 3.07	2.25 ± 0.31
尼莫地平组	11	29.00 ± 16.69	20.91 ± 6.22	28.64 ± 17.39	2.64 ± 0.55
丹参组	10	26.20 ± 6.88	17.90 ± 2.56	22.00 ± 5.46	2.86 ± 0.67
三甲小剂量	9	24.67 ± 5.72	18.89 ± 5.53	24.67 ± 5.55	2.47 ± 0.84
三甲大剂量	10	24.20 ± 7.98	18.40 ± 3.57	24.00 ± 4.76	2.49 ± 0.81

2.5 对 MCAO 大鼠血浆 SOD 活性的影响 MCAO 大鼠血浆 SOD 活性明显下降(97.77 ± 27.37 , $n = 13$), 与假手术组(127.4 ± 11.94 , $n = 11$) 比较有非常显著性差异($P < 0.01$)。尼莫地平组(166.3 ± 15.37 , $n = 10$)、丹参组(130.2 ± 29.83 , $n = 10$)、三甲散小剂量组(131.2 ± 28.23 , $n = 10$) 和大剂量组(130.13 ± 15.85 , $n = 10$) 均能增强 SOD 活性, 与 MCAO 组比较差异均有显著性(分别为 $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 讨论

脑组织对氧及能量的需要量很大, 且无储备功能, 脑局部血液供应中断 10s, 即可出现神经功能紊乱, 氧贮备耗尽; 中断 2min 脑内的葡萄糖贮备也被耗尽^[6]。因此当各种因素导致脑缺血缺氧时, 很快出现代谢障碍, 糖酵解增加, 乳酸增多, ATP 减少, 导致酸中毒, 引起神经细胞损伤, 导致记忆功能障碍。当影响涉及皮层、海马、基底节等与智能相关的结构时, 可出现痴呆。在阻断大鼠 MCA 后, 所有动物都出现了程度不同的运动障碍, 这些神经症状的出现, 表明 MCAO 后造成了感觉运动皮质及纹状体的缺血性损伤。三甲散可减轻 MCAO 引起的运动障碍, 可能与其改善 MCAO 模型大鼠缺血区脑组织供血与供氧有关。

在造成 MACO 模型的大鼠, 体内血小板被激活, 表现为血小板聚集率明显增加, 由此可能进一步加剧脑组织血液循环的障碍, 而三甲散可抑制血小板聚集率的增高, 从而有助于改善缺血区脑组织的血流供应, 减轻局部组织的损伤。MCAO 大鼠全血低切粘度均有所升高, 提示红细胞的聚集性增强, 而各给

药组对此均无明显抑制, 说明该药降低 MCAO 大鼠脑梗塞率的作用不是通过改善血液流变性来实现的。

脑缺血时, 脑细胞生物氧化功能发生异常, 产生大量氧自由基。作为氧自由基清除剂的 SOD 被大量消耗和破坏, 由于氧自由基水平的升高和抗氧化水平的下降, 可介导细胞的凋亡^[7]。本文的实验结果提示 MACO 大鼠血浆 SOD 活性明显下降, 而三甲散则能抑制模后血浆 SOD 的下降, 增强机体清除自由基的能力, 减轻自由基对脑组织的损伤, 从而使脑梗塞面积明显缩小。

参考文献:

- [1] 王灿辉, 刘涛, 杨进, 等. 滋肾通窍法对血管性痴呆患者精神量表评定的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(7): 405.
- [2] 刘涛, 卞慧敏, 刘学风, 等. 改良三甲散对东莨菪碱诱导小鼠学习障碍的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(2): 18.
- [3] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 下册. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 1240.
- [4] 陈奇. 中药药理研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 258.
- [5] 邓家栋. 血液病实验诊断[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1985. 258.
- [6] 赵宗礼. 抗血栓疗法[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 1998. 256.
- [7] 孙存普, 张建中, 段绍瑾, 等. 自由基生物学导论[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1999. 150.