

脑络通对大鼠脑缺血再灌注损伤血清与脑组织 NO 含量及 NOS 活性影响的分期观察

王 键, 赵 辉, 许冠荪 (安徽中医学院, 合肥 230038)

摘要: 目的: 探讨中药脑络通改善脑缺血损伤的作用机制。方法: 多因素复合制作气虚血瘀证大鼠脑缺血动物模型, 采用化学比色法测定血清与脑组织匀浆一氧化氮(NO) 浓度及脑组织匀浆一氧化氮合酶(NOS) 活性。结果: 预防治疗组可以显著升高缺血急性期病理性降低的血清 NO 含量, 降低缺血急性期病理性升高的脑匀浆 NO 含量、NOS 活性。结论: 具有益气活血功效的中药脑络通对于缺血性中风具有预防和治疗作用。

关键词: 脑缺血-再灌注损伤; 气虚血瘀证; 脑络通; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)01-0029-03

Periodic Observation for NO Level and NOS Activity in Serum and Brain Tissue of Rats Damaged by Cerebral Ischemic Reperfusion with Naoluotong

WANG Jian, ZHAO Hui, XU Gran-sun (Anhui College of TCM, Hefei 230038, China)

Abstract: It was studied that the mechanisms of Naoluotong on preventing and treating cerebral ischemic reperfusion damage rats. The cerebral ischemic model with Qi deficiency and blood stasis syndrome was established to observe the level of nitric oxide (NO) in serum and brain tissue, and the activity of nitric oxide synthase (NOS) of brain tissue through chemical colorimetric method. The results show that Naoluotong can remarkably raised the level of NO in serum, and decreased the level of NO and the activity of NOS in brain tissue.

Key words: Cerebral ischemic-reperfusion; Qi deficiency and blood stasis syndrome; Naoluotong; Nitric oxide; Nitric oxide synthase

急性缺血性脑血管病是我国的常见病、多发病, 是威胁人们健康的主要疾病之一。在脑缺血兴奋性毒性机制中, NO 由于其独特的双重作用受到重视, 其合酶 NOS 的变化是重点。本实验拟以气虚血瘀证型大鼠制作不全性全脑缺血一再灌注损伤模型, 主要观察中药脑络通对不同时期实验动物血清及脑组织内 NO 含量及 NOS 活性等变化的影响, 探讨脑络通治疗脑缺血损伤的主要作用机制, 并确定脑络通的最佳用药时期与有效治疗时期。

1 材料与方 法

1.1 动物分组 健康 Wistar 大鼠 70 只, 雌雄不拘, 月龄 (18 ± 3) 个月, 体重 280~340g, 由安徽省实验动物中心提供 (合格证号: 皖医实动准第 01 号), 随机分为空白对照组、假手术组、预防治疗组、急性模型组、急性治疗组、再灌模型组、再灌治疗组、慢性模型组和慢性治疗组共 9 组, 除空白对照组 6 只外其余

每组各 8 只大鼠。空白对照组正常饲养, 其余各组按实验设计要求进行模型复制。

1.2 主要药剂与仪器 中药脑络通为胶囊剂型, 主要由黄芪、三七、川芎、蜈蚣等药物按不同比例配合组成, 本试验中采用传统水煎剂型, 具体制备方法为: 全部药物购自安徽中医学院第一附属医院中药房, 经安徽中医学院中药鉴定教研室认定为正品, 冷水浸泡 24h, 武火煮沸后改文火, 头煎 20min 取汁, 二煎 30min 取汁, 加热浓缩, 制为 6g/ml 水煎液, 每次按 12g/kg 体重供灌胃使用。NO 与 NOS 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供, 化学药品购自合肥市长江大药房。主要仪器有分光光度计 (756 型, 上海第三分析仪器厂), 酶标仪 (514 型, 上海)。

1.3 复制动物模型 参照以往试验^[1] 制作气虚血瘀证脑缺血动物模型。实验第 1 至 10d, 除空白对照组外其余 8 组大鼠采用饥饿、疲劳、寒湿、惊慌忧恐、高脂饮食等复合造模方法制作气虚血瘀证大鼠模型; 实验第 11d, 除空白对照组外其余 8 组大鼠采用双侧颈总动脉结扎法制作急性不全性脑缺血模型,

收稿日期: 2001-07-13

基金项目: 安徽省教委科研计划项目 (99j10131)

其中假手术组仅分离双侧颈总动脉并缝合伤口但不进行结扎;再灌模型组及再灌治疗组分离双侧颈总动脉后用微型无损动脉夹夹闭双侧颈总动脉,3h后松开动脉夹使其动脉恢复血流,然后缝合伤口消毒。

1.4 药物干预 预防治疗组于造模每日9:00予中药脑络通灌胃给药,颈部手术后不再给药;急性治疗组于结扎手术后缺血1.5h、5.5h两次予中药脑络通灌胃;再灌治疗组于再灌注1.5h给予中药脑络通灌胃;慢性治疗组于结扎手术后缺血6h、12h、18h三次予中药脑络通灌胃。

1.5 动物处死与标本收集 空白对照组任意择时处死;假手术组、预防治疗组、急性模型组、急性治疗组于术后6h处死;再灌模型组、再灌治疗组于再灌注3h后处死;慢性模型组和慢性治疗组于术后24h处死。采用断头法处死动物,断头后立即收集新鲜动脉血离心吸取上清液作为待测血清,切取大脑右侧前1/2半球约黄豆大小,搅为脑组织匀浆,离心、吸取上清液作为待测脑匀浆,血清与脑匀浆样品放置于超低温冰箱,-20℃保存待用。

1.6 指标检测与数据统计分析 NO采用硝酸还原酶的化学比色法测定标本中的NO₂⁻+NO₃⁻含量,NOS采用化学比色法测定其脑匀浆活性,数据表达均为均数±标准差($\bar{x} \pm s$),同一指标各组间多元方差分析(MANOVA)和不同指标间双变量相关分析采用SPSS 10.0 for windows软件处理。

2 结果

2.1 脑络通对模型大鼠血清及脑组织匀浆NO含量变化的影响 各组动物血清及脑组织匀浆NO含量情况见表1。从中可以看出,病理方面:空白对照组血清NO含量明显高于假手术组,空白对照组、再灌模型组和慢性模型组血清NO含量明显高于急性模型组;急性模型组脑匀浆NO含量明显高于空白对照组,假手术组、再灌模型组和慢性模型组脑匀浆NO含量明显低于急性模型组,高于空白对照组。治疗方面:预防治疗组脑匀浆NO含量明显低于急性模型组。

2.2 脑络通对模型大鼠脑组织匀浆NOS活性变化的影响 各组动物脑组织匀浆NOS活性情况见表2。从中可以看出,病理方面:空白对照组脑匀浆NOS活性明显低于假手术组、急性模型组和再灌模型组,慢性模型组较急性模型组NOS活性明显降低;治疗方面:预防治疗组脑匀浆NOS活性明显低于急性模型组。

表1 脑络通对模型鼠血清、脑匀浆NO含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血清NO(μmol/l)	脑匀浆NO(μmol/g·pro)
空白对照组	6	44.0±18.1	0.5690±0.1509
假手术组	8	18.0±6.2**	1.2380±0.1400***#
预防治疗组	8	30.1±10.9##	1.1990±0.3982##
急性模型组	8	19.5±3.3**	1.8048±0.3326**
急性治疗组	8	26.2±6.3	1.7278±0.4122
再灌模型组	8	41.3±5.3##	1.4085±0.1471***#
再灌治疗组	8	46.9±16.1	1.1835±0.2499
慢性模型组	8	37.2±11.9##	1.3727±0.2082***#
慢性治疗组	8	42.3±8.2	1.4085±0.3494

注:与空白对照组比较,*P<0.05,**P<0.01;与急性模型组比较,#P<0.05,##P<0.01(下同)。

表2 脑络通对模型鼠脑匀浆NOS活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	脑匀浆NOS(μ/mg·pro)
空白对照组	6	0.4093±0.0968
假手术组	8	0.6343±0.1520*
预防治疗组	8	0.4707±0.1816#
急性模型组	8	0.6398±0.1304**
急性治疗组	8	0.6767±0.1653
再灌模型组	8	0.6027±0.1361*
再灌治疗组	8	0.4982±0.0696
慢性模型组	8	0.4690±0.0327#
慢性治疗组	8	0.6042±0.1121

3 讨论

一般认为急性脑血管病与中医中风相对应,而缺血性脑血管病与缺血性中风基本对等。关于缺血性中风的病因病机,清代王清任明确提出了气虚血瘀为脑贫血类中风发病基本病机,如《医林改错》言“半身不遂……非风火湿痰所中”,明确提出“亏损元气是其本源”,其病机是由于“元气既虚,必不能达于血管;血管无气,必停留而淤”,王氏用于治疗半身不遂的“补阳还五汤”作为益气活血治法的代表方剂至今仍广泛应用于中风临床防治中。当代大多数学者倾向于认为气虚血瘀是缺血性中风的主要病因病机^[2-3]。由此可见,针对益气活血法治疗脑缺血机理研究的深入探讨是十分必要和有意义的。

中药复方制剂脑络通是全国名老中医、安徽中医学院已故著名教授王乐旬先生在多年临床实践中摸索总结出的治疗缺血性脑血管病的经验效方,组方中重用黄芪益气补虚,配用川芎、三七以活血祛瘀、通利血脉,佐用蜈蚣性走窜、善搜剔以祛风通络,

全方标本兼顾, 攻补并施, 共奏益气活血、熄风通络之功效。盖“气为血之帅”, 气足则助血运行; “治风先治血, 血行风自灭”, 留络之瘀血消散则营血流畅, 经脉得养则偏废自愈。现代药理研究表明, 黄芪能扩张血管, 降压, 抗凝血, 对免疫功能具有双向调节作用; 三七能抗脑缺血, 抗炎镇痛, 抗凝扩管; 川芎能扩张血管, 抗血栓形成, 抗损伤; 蜈蚣有抗惊厥、镇静作用等。多年临床观察证明: 在辨证论治的整体思想指导下, 以该方为基础灵活加减处方, 对于大多数临床辨证为气虚血瘀证型的缺血性脑血管病患者均可收到满意疗效。

一氧化氮(NO)作为一种重要的神经介质、分子信使和细胞功能调节因子, 广泛参与了体内血管功能调节、神经传递、炎症免疫反应等机体众多生理活动和病理过程。国内外文献报道显示脑缺血后NO的含量变化具有复杂性, 但总体上以增高为主^[4-5]。NO在脑缺血损伤中具有双重作用。缺血早期NO具有积极的神经保护作用, 其减轻脑缺血损伤的机制可能有: (1) 扩张血管; (2) 抗血小板聚集和白细胞粘附; (3) 抑制NMDA受体介导的兴奋性毒性作用; (4) 调控一些递质的释放; (5) 对自身合酶NOS的反馈性调节。缺血中后期大量NO聚集在脑组织可通过坏死与凋亡两种途径介导细胞死亡, 其加重脑缺血损伤的神经毒性机制可能有: (1) 参与NMDA介导的兴奋性氨基酸毒性作用; (2) 介导脑组织自由基氧化性损伤; (3) 影响能量代谢; (4) 致使神经细胞凋亡; (5) 加剧早期神经细胞坏死^[6]。NO复杂的双重作用与其自身复杂的生物及理化性质有关, 并受周围环境氧化还原状态的影响, 而其合酶NOS的不同类型是决定其不同作用的关键因素。

一氧化氮合酶(NOS)作为一种还原型黄素酶是合成NO的关键酶, 根据其来源的不同可分为两大类共三种: 第一类是构成型(constitutive NOS, cNOS), 包括神经元型(neuronal NOS, nNOS)和内皮型(endothelial NOS, eNOS)两种, 其活性的激活依赖于离子钙/钙调素(Ca^{2+} /Cam)。第二类为诱导型(inducible NOS, iNOS)或免疫型(immunologic NOS, iNOS), 不依赖于 Ca^{2+} /Cam而可由内毒素、细胞因子等诱导产生。国内外文献报道显示脑缺血后NOS的活性在各期均有明显升高^[7-8]。在脑缺血过程中不同时期不同类型的NOS具有不同的作用。

本实验结果显示: (1) 模型大鼠脑缺血6h血清NO含量低于正常代表自身应激性脑保护作用的降低; 脑匀浆NO含量高于对照组显示其损伤作用的增强, 随时间推移至持续缺血24h含量有所下降但仍高于正常对照组表明其晚期毒性作用的存在。(2) 各治疗组血清NO含量均较相应模型组有所升高, 脑匀浆NO含量有所降低, 其中预防治疗组血清NO含量明显高于急性模型组, 脑匀浆NO含量明显低于急性模型组, 具有统计学差异($P < 0.01$), 说明中药脑络通预防性给药可降低模型大鼠脑缺血6h脑组织NO含量, 升高模型大鼠脑缺血6h血清NO含量, 从而通过改善脑组织血液供应发挥脑缺血保护作用。

实验结果还显示: (1) 模型大鼠持续脑缺血6h和缺血3h再灌3h时NOS活性高于正常对照组, 提示nNOS的剧增和iNOS的开始表达; 持续缺血2h时NOS活性有所下降, 可能与nNOS表达下降而仅有iNOS的高表达有关。(2) 预防治疗组和再灌治疗组较相应模型组NOS活性有所下降, 急性治疗组和慢性治疗组较相应模型组有升高趋势, 其中预防治疗组脑匀浆NOS活性明显低于急性模型组具有统计学意义($P < 0.05$), 说明中药脑络通预防性给药可降低模型大鼠脑缺血发病急性期病理性升高的脑组织NOS活性(主要为nNOS), 从而通过多种途径降低脑缺血损伤程度, 发挥脑缺血保护作用。

参考文献:

- [1] 王键, 胡建鹏. 缺血性中风气虚血瘀证动物模型的初步研究[J]. 安徽中医学院学报, 1999, 18(2): 46-49.
- [2] 陶根鱼, 杜晓泉. 益气活血法在缺血性中风病中的地位[J]. 陕西中医学院学报, 1998, 21(3): 1-2.
- [3] 刘华. 益气活血法治疗缺血性中风临床和药理研究10年回顾与展望[J]. 现代中西医结合杂志, 2000, 9(13): 1217-1219.
- [4] Olesen SP; Moller A; Mordvintcev PI; et al. Regional measurements of NO formed in vivo during brain ischemia[J]. Acta Neurol Scand 1997 Apr; 95(4): 219-24.
- [5] 曹非, 孙圣刚, 童萼塘. 一氧化氮在局灶性脑缺血中的作用研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 1998, 6(6): 347-349.
- [6] 刘辉. 一氧化氮、一氧化氮合酶与脑缺血损伤[J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 1999, 19(2): 121-123.