

补阳还五汤和有效部位组方对沙土鼠脑缺血及再灌注后脑组织 EAA 的影响

邓常青^{*}, 邓奕晖¹, 贺福元¹, 唐映红²

(1. 湖南中医学院, 长沙 410007, 2. 湖南医药工业研究所, 长沙 410014)

摘要:目的: 比较研究补阳还五汤和其有效部位组方抗脑缺血及其再灌注损伤与脑组织兴奋性氨基酸(EAA)的关系。方法: 采用沙土鼠双侧颈总动脉夹闭脑缺血模型, 于缺血 15min 和再灌注 48h 取脑组织测定 Glu、Asp、GABA 和 Gly。结果: ①缺血 15min 后, 脑组织 Glu 和 Asp 含量明显升高, GABA 含量升高, 补阳还五汤可使脑组织 Glu 含量降低, 有效部位组方可使脑组织 Glu 和 Asp 含量均降低($P < 0.05$)。②缺血 15min 再灌注 48h 后, 脑组织 Glu 和 Asp 含量均显著升高($P < 0.05$), 补阳还五汤可使脑组织 Glu 含量降低, 而有效部位组方可使脑组织 Glu 和 Asp 含量均降低($P < 0.05$)。结论: 兴奋性氨基酸的兴奋毒性参与了脑缺血及其再灌注后的脑损伤, 补阳还五汤和其有效部位组方抗缺血性脑损伤的作用机理可能与其对抗脑缺血及其再灌注后 EAA 的升高有关。

关键词: 补阳还五汤; 脑缺血; 沙土鼠; 兴奋性氨基酸

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)06-0024-04

Effects of Bu Yang Huan Wu Decoction and its Active Fraction on Excitatory Amino Acid of Brain Tissue After Cerebral Ischemia and Reperfusion in Gerbils

DENG Chang-qing¹, DENG Yi-hui¹, HE Fu-yang¹, TANG Ying-hong²

(1. Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007;

2. Hunan Institute of Pharmaceutical Industry, Changsha 410014)

Abstract: To compare the effects of Bu Yang Huan Wu Decoction (BYHWD) and its active fraction on brain tissue following cerebral ischemia and reperfusion, Cerebral ischemia model in gerbils was induced by ligating bilateral common carotid artery. The contents of glutamate (Glu), aspartate (Asp) and γ -amino butyric acid, glycine in brain tissue were determined after cerebral ischemia for 15min followed by reperfusion for 48 hours. Results showed the contents of Glu, Asp and γ -aminobutyric acid in brain tissue were markedly enhanced after cerebral ischemia for 15min. BYHWD decreased the contents of Glu in brain tissue remarkably; its active fraction reduced the contents of both Glu and Asp in brain tissue remarkably. The contents of Glu and Asp in brain tissue were remarkably increased after cerebral ischemia for 15min followed by reperfusion for 48 hours, BYHWD decreased the contents of Glu in brain tissue significantly, its active fraction reduced the contents of both Glu and Asp in brain tissue remarkably.

Key words: Bu Yang Huan Wu Decoction; Cerebral ischemia; Gerbil; Excitatory amino acid.

近年来研究表明, 兴奋性氨基酸(excitatory amino acid, EAA)在脑缺血及其再灌注后的脑组织损伤中具有重要的作用, 拮抗 EAA 的兴奋毒性, 为防治缺血性脑损伤的重要环节^[1]。本室前段研究表明, 补阳还五汤及其有效部位可防止脑缺血再灌注损伤^[2,3], 而有关该方对脑缺血后 EAA 的影响尚属空

白。为此, 本文研究了补阳还五汤和其有效部位组方对沙土鼠脑缺血及其再灌注后 EAA 的影响。

1 材料与方法

1.1 试验药物 补阳还五汤原方由黄芪 60g、赤芍 9g、川芎 6g、当归 9g、地龙 9g、桃仁 9g、红花 9g 组成。上述药物由本院药剂科一次性购齐并鉴定, 各药按比例混合, 由本院药学分院按水煎醇沉法制备成注射液, 生药含量为 2g/ml, 用时以生理盐水稀释成 0.4g/ml。另由该处方提取各类有效成分部位, 各有效成分部位含量为: 总生物碱类相当于含川芎嗪

收稿日期: 2001-03-08

基金项目: 国家自然科学基金 No: 39770893

* 现在广州中国医药大学第一附属医院糖尿病研究所(510405)

62.19mg/ml, 总多糖类相当于含葡萄糖 62.09mg/ml, 总甙元类相当于含阿魏酸 2.41mg/ml, 总甙类相当于含黄芪甲苷 0.75mg/ml, 挥发油类为 8.84mg/ml。有效部位组方中各有效成分部位的含量为: 总生物碱类 1.87mg/ml, 总多糖类 15.09mg/ml, 总甙元类 0.28mg/ml, 总甙类 0.23mg/ml, 挥发油类 2.69mg/ml。

1.2 动物 体重 60~ 100g 蒙古沙土鼠, 清洁级, 雌雄兼用, 由卫生部上海生物制品研究所动物中心提供, 合格证号为医动字第 02- 21- 8 号(上海市医学实验动物管委会颁发)。

1.3 仪器和试剂 GL- 20A 型高速冷冻离心机(湘仪总厂离心机厂) LC-6A 高效液相色谱仪和 RF-530 荧光检测器(日本岛津)。谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、 γ -氨基丁酸(GABA)和甘氨酸(Gly)标准品, 纯度 99.99%, 均为 Sigma 公司产品, 其它试剂均为国产分析纯。

1.4 实验方法 沙土鼠随机分为假手术对照组(假手术组)、缺血模型对照组(缺血模型组)、缺血+ 补阳还五汤原方组、缺血+ 有效部位方组、缺血再灌注模型组(再灌注模型组)、再灌注+ 原方组、再灌注+ 有效部位方组。各组动物雌雄比例相近。缺血+ 原方汤组和再灌注+ 原方组均 ip 补阳还五汤原方 4.0g/kg(10ml/kg); 缺血+ 有效部位方组和再灌注+ 有效部位方组 ip 有效部位方液 11ml/kg(相当于各有效部位用量为: 总生物碱 20.55mg, 总多糖 166.01mg, 总甙元 3.07mg, 总甙 2.53mg, 挥发油 29.51mg); 假手术组、缺血模型组和再灌注模型组均 ip 等量生理盐水。次日缺血实验前同前给药一次。给药后 30min, 各组动物 ip 盐酸氯氨酮 60mg/kg(1.2ml/kg)麻醉, 同前法^[3]分离两侧颈总动脉。除假手术组外, 各组均以无创性小动脉夹夹闭两侧颈总动脉造成脑缺血。缺血模型组、缺血+ 原方组和缺血+ 有效部位方组均于缺血 15min 后处死, 取脑置冰箱内保存待测。再灌注模型组、再灌注+ 原方组和再灌注+ 有效部位方组在缺血 15min 后松开动脉

夹行再灌注, 缝合皮肤继续饲养, 三组均于再灌注后 12、24 和 36h 同前 ip 药物或盐水, 再灌注后 48h 处死动物, 取脑待测。假手术组不结扎两侧颈总动脉, 其它操作与再灌注各组相同。

1.5 观察指标及方法 各组动物处死后取出双侧脑组织, 在冰台上迅速分离双侧前脑皮质和海马, 以冰生理盐水冲洗后除去残血, 吸干后称重, 按 1: 9(W: V) 比例加入无水乙醇, 以高速匀浆机在冰浴下制成 10% 脑匀浆液, 匀浆条件为 10s/次, 间隔 15s, 共计 4 次。将匀浆液于 3500rpm(4℃)离心 15min, 分离上清液于 - 30℃ 保存待测。测试前标本复溶, 再 10000rpm(4℃)离心 10min, 取上清液, 按文献^[4]方法, 以高效液相色谱仪进行测定, 进样量为 100 μ l。

1.6 统计分析 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐者以方差分析和 *q* 检验分析, 方差不齐者以秩和检验分析。计数资料以 χ^2 分析。

2 结果

2.1 缺血 15min 各组动物死亡率比较: 见表 1。缺血模型组死亡数明显高于其它三组($P < 0.01$), 而缺血+ 原方组和缺血+ 有效部位方组动物死亡数均显著低于模型组。

表 1 缺血 15min 死亡率比较

组别	鼠数	死亡数	死亡率(%)
假手术组	8	0	0.0
缺血模型组	17	6	35.3 $\Delta\Delta$
缺血+ 原方组	13	1	7.7
缺血+ 有效部位方组	13	0	0.0

注: 与假手术组比 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ (下同)。

2.2 各组脑组织谷氨酸(Glu)含量比较: 见表 2。缺血 15min 后, 缺血模型组脑组织 Glu 含量明显高于假手术组($P < 0.05$), 而缺血+ 原方组和缺血+ 有效部位方组脑组织 Glu 含量均显著低于缺血模型组(均为 $P < 0.05$), 两组与假手术组之间相比均无显著性意义($P > 0.05$), 两组相比也无显著性意义($P > 0.05$)。

表 2 各组脑组织氨基酸含量的比较($\bar{x} \pm s$, μ mol/g 脑组织)

组别	鼠数	Glu	Asp	GABA	Gly
假手术组	8	6.72 \pm 0.92	0.72 \pm 0.32	0.89 \pm 0.34	0.93 \pm 0.17
缺血模型组	8	8.18 \pm 0.63 Δ	1.32 \pm 0.19 $\Delta\Delta$	1.32 \pm 0.20 Δ	0.98 \pm 0.18
缺血+ 原方组	7	7.11 \pm 0.95 Δ	1.02 \pm 0.28	1.28 \pm 0.32	1.00 \pm 0.18
缺血+ 有效部位方组	8	6.75 \pm 1.37 Δ	0.83 \pm 0.41 Δ	1.32 \pm 0.15	0.92 \pm 0.14
再灌注模型组	6	8.70 \pm 0.49 Δ	1.41 \pm 0.31 Δ	1.03 \pm 0.21	0.91 \pm 0.15
再灌注+ 原方组	6	7.62 \pm 1.55 Δ	1.00 \pm 0.26	1.08 \pm 0.21	0.93 \pm 0.36
再灌注+ 有效部位方组	6	6.51 \pm 1.10 Δ	0.77 \pm 0.48 Δ	0.95 \pm 0.17	0.74 \pm 0.15

注: 与缺血模型组比 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与再灌注模型组比 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

再灌注 48h 后,再灌注模型组脑组织 Glu 含量明显高于假手术组 ($P < 0.05$),与缺血模型组之间相比无显著性差异 ($P > 0.05$);再灌注+原方组和再灌注+有效部位方组脑组织 Glu 含量均显著低于再灌注模型组(均为 $P < 0.05$),两组与假手术组相比均无显著性差异 ($P > 0.05$),两组相比也无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 各组脑组织天冬氨酸(Asp)含量比较:见表2。

缺血 15min 后,缺血模型组脑组织 Asp 含量显著高于假手术组 ($P < 0.01$);缺血+原方组脑组织 Asp 含量虽低于缺血模型组,但差异无显著性意义 ($P > 0.05$);缺血+有效部位方组 Asp 含量显著低于缺血模型组 ($P < 0.05$)。

再灌注 48h 后,再灌注模型组脑组织 Asp 含量较假手术组显著升高 ($P < 0.05$),与缺血模型组相近 ($P > 0.05$);再灌注+原方组 Asp 虽较再灌注模型组降低,但差异无显著性意义 ($P > 0.05$);再灌注+有效部位方组 Asp 显著低于再灌注模型组 ($P < 0.05$)。

2.4 各组脑组织 γ -氨基丁酸(GABA)含量比较:见表2。除缺血模型组脑组织 GABA 含量高于假手术组 ($P < 0.01$) 外,其它各组相比均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.5 各组脑组织甘氨酸(Gly)含量比较:见表2。各组脑组织 Gly 含量比较,均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

兴奋性氨基酸主要指谷氨酸(Glutamate, Glu)和天冬氨酸(Aspartate, Asp)。EAA 是中枢神经系统中兴奋性神经元突触的主要神经递质,同时又是一种神经毒素。脑缺血缺氧时,大量 EAA 尤其是 Glu 的爆发性释放,EAA 受体过度激活,使一些受体在正常生理刺激下引起的第二信使效应得到放大,突触后神经元过度兴奋、溃变、坏死,这就是所谓的“兴奋毒性”。脑缺血时,缺血神经元大量释放的 EAA 尤其是 Glu 对神经元的损伤起关键作用。由于 EAA 使神经元持续去极化,增加了神经元内 Glu 等的大量释放;又因脑缺血后 ATP 消耗,依赖能量而重吸收 Glu 的机制衰竭,影响 Glu 摄取功能,甚至出现 Glu 向细胞外液转移,如此恶性循环,突触间隙持续高浓度的 Glu 就引起兴奋性神经毒性^[5]。大量资料证明兴奋性毒性产生的可能机制为:(1)增加细胞内 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ 外流,使细胞内外电解质紊乱,这一过程通常在缺血后 6~24h 已有明显改变,为“早期细胞损

伤”^[6];(2)过度激活 EAA 受体,引起 Ca^{2+} 通道开放,造成细胞内钙超负荷,导致蛋白质、酶等降解,神经元逐渐溃变、死亡,这一过程一般在缺血后 2~7d 内造成,为“迟发性神经损伤”^[7];(3)细胞内 Ca^{2+} 超载时,可激活磷脂酶 A_2 和 C,使膜磷脂降解,产生大量的花生四烯酸及代谢产物(前列腺素、白三烯、血小板活化因子);同时加速激活一氧化氮合酶(NOS)合成大量的一氧化氮(NO),产生 NO 的神经毒性^[8]。故拮抗 EAA 的兴奋毒性,包括抑制其过度释放,促进其再摄取,以及抑制其受体活性,对缺血性脑损伤具有防治作用^[9,10]。

脑内还存在抑制性氨基酸(inhibitory amino acid, IAA),主要指 γ -氨基丁酸(GABA)和甘氨酸(Gly),为中枢神经系统内的抑制性递质,可抑制神经元兴奋,减少由于 EAA 造成的神经细胞损伤。

本研究表明,缺血 15min 和再灌注 48h 后,脑组织 Glu 和 Asp 含量明显增加,表明 EAA 的兴奋毒性参与了脑缺血后早期细胞损伤和迟发性神经损伤的发生过程。在缺血 15min 后,脑组织 GABA 含量升高,这可能是缺血后代偿性释放增加的结果,至于其在缺血性脑损伤发生发展中的意义,还有待进一步阐明。

在本研究中,预先给予补阳还五汤原方和有效部位方,均可使沙土鼠脑缺血后死亡率降低,表明原方和有效部位方均可对抗缺血性脑损伤。原方和有效部位方均可使缺血 15min 后脑组织 Glu 含量降低,同时两者又可使再灌注 48h 后脑组织 Glu 含量降低;有效部位方可使缺血 15min 后和再灌注 48h 后脑组织 Asp 含量明显降低,但原方对 Asp 无明显影响。以上结果提示,补阳还五汤原方和有效部位方均可对抗缺血性脑损伤,两者既可防止缺血时 EAA 的升高,又可防止再灌注时 EAA 的升高。两者的区别在于,补阳还五汤原方主要通过抑制 Glu 的升高而起作用,而有效部位方对 Glu 和 Asp 的升高均有降低作用。

参考文献:

- [1] Lipton SA, Resenberg PA. Mechanisms of disease: excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders[J]. N Engl J Med, 1994, 330: 613-625.
- [2] 邓常青,刘志龙,葛金文,等.补阳还五汤抗脑缺血再灌注损伤作用机理的研究[J].中国中医基础医学杂志, 1998, 4(8): 32.
- [3] 邓常青,邓奕晖,向华林,等.补阳还五汤及其有效部位

- 对沙鼠脑缺血后 DND 脑能量代谢、NO 和 NOS 的影响 [J]. 中药药理与临床, 1999, 15(5): 3.
- [4] Chen BM, Xia LW, Zhao RQ. Determination of N^G , N^G -dimethylarginine in human plasma by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 1997, 692: 467.
- [5] Hirose K, Chan pH. Blockade of glutamate excitotoxicity and its clinical applications [J]. Neurochem Res, 1993, 18: 479.
- [6] Siesjo BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1989, 9: 127.
- [7] Manev H, Costa E, Wroblewski JT, et al. Abusive stimulation of excitatory aminoacid receptors: a strategy to limit neurotoxicity [J]. FASEB J, 1990, 4: 2789.
- [8] Kollegger H, McBean HG, Tipton KF. Reduction of striatal N-methyl-D-aspartate toxicity by inhibition of nitric oxide synthase [J]. Biochem Pharmacol, 1993, 45: 260.
- [9] Muir KW, Less KR. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs [J]. Stroke, 1995, 26(3): 503.
- [10] Rogawski MA. The NMDA receptor, NMDA antagonists and epilepsy therapy [J]. Drugs, 1992, 44(3): 279.