

偏瘫复康颗粒对脑缺血再灌注损伤的保护作用

郑宏¹, 刘冬立¹, 朱陵群², 邹忆怀²

(1. 北京宣武中医医院内科, 北京 100050;
2. 北京中医药大学东直门医院脑病研究所, 北京 100700)

摘要:目的: 探讨大鼠脑缺血再灌注损伤后偏瘫复康颗粒的保护作用及其可能机制。方法: 采用线栓法制备大鼠大脑中动脉缺血再灌注模型。观察组织病理学、脑组织含水量、血浆 ET 和 CGRP 含量, 血清 SOD 和 NO 含量的变化。结果: 与模型组比较, 偏瘫复康颗粒对手术侧脑组织含水量有明显降低作用, 对血清 SOD、血浆 CGRP 具有显著升高作用 ($P < 0.01$), 对血清 NO、血浆 ET 含量具有显著降低作用。结论: 偏瘫复康颗粒对脑缺血再灌注损伤所具有的保护作用可能和参与调节 ET、CGRP、NO、SOD 等因素有关。

关键词: 偏瘫复康颗粒; 缺血; 脑再灌注损伤

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)02-0025-04

Protective Effect of Pian Tan Fu Kang Granule on Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury in Rats

ZHENG Hong¹, LIU Dong-li¹, ZHU Ling-qun², ZOU Yi-huai²

(1. Beijing Xuan Wu Hospital of Tradition Chinese Medicine, Beijing 100050, China;
2. Dong Zhi Meng Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100700, China)

Abstract: To study the protective effect and the possible mechanism of Pian Tan Fu Kang Capsule (PTFK) on injury induced by cerebral ischemia and reperfusion in rats, Rats were exposed to right middle cerebral artery occlusion for 40 min and reperfusion for 24 hours. Pathological changes, content of water on brain tissue, content changes of endothelin (ET) and calcitonin gene related peptide (CGRP) on plasma, and content changes of superoxide dismutase (SOD) and nitric oxide (NO) in serum were observed. Results showed PTFK could significantly alleviate the pathological damage and reduce content of water on brain tissue compared with injury side of brain, it could obviously increase contents of SOD in serum and CGRP on plasma, and decrease contents of NO in serum and ET in serum and ET in plasma compared with control group. The results indicate the protective effect of PTFK on cerebral ischemia and reperfusion injury might be relation to regulating balances of ET, CGRP, SOD and NO in plasma or serum.

Key words: Pian Tan Fu Kang Capsule; Ischemia; Cerebral reperfusion injury

偏瘫复康颗粒是根据活血行气、化痰潜阳的治法研制而成的复方颗粒制剂, 由川芎、泽兰、郁金、天麻、钩藤、石菖蒲、赤芍、红花等中药组成, 临床用于缺血性中风急性期实证的治疗。我们利用大鼠大脑中动脉阻断(MCAO)模型对其进行脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究, 旨在进一步探讨偏瘫复康颗粒在脑缺血过程中的药理作用机制, 为临床用药提供理论依据。

1 材料

1.1 药物和试剂 偏瘫复康颗粒(PTFK)由北京宣武中医院制剂中心提供, 批号: (99)京卫药制字

[062]第F-2024号。北京市药品检验所负责中药生药鉴定。主要制备工艺: 取泽兰2份(唇形科毛叶地瓜苗 *Lycopus Lucidus Turcz. var. hitus* Regal), 川芎1份(伞形科川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort), 郁金0.5亿(姜科温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling)粉碎成细粉, 过筛混匀。再取泽兰2份, 郁金0.5份, 川芎、红花(菊科红花 *Carthamus tinctorius* L)、赤芍(毛茛科芍药 *Paeonia Lactiflora* Pall)、天麻(兰科天麻 *Gastrodia elata* Bl)、钩藤(茜草科钩藤 *Uncaria rhynchophylla* Jack)、石菖蒲(天南星科石菖蒲 *Acorus tatarinowii* Schott)各1份加水煎煮两次, 合并煎液, 滤过浓缩, 加入泽兰等上述药粉混匀, 干燥制成颗粒。乐脉颗粒由中国华西医科大学制药厂提供, 批号:

ZZ-4289-111。天麻钩藤颗粒由成都制药厂提供,批号:ZZ-5526-111。内皮素(ET)放免药盒、降钙素基因相关肽(CGRP)放免药盒:由解放军总医院科技开发中心放免所提供。超氧化物歧化酶(SOD)放免药盒:由北京北方生物技术研究所提供。一氧化氮(NO)试剂盒:由深圳晶美生物工程有限公司提供。

1.2 动物 SD 大鼠,雄性,体重 $320 \pm 30\text{g}$,由中国医学科学院动物中心繁育场提供。合格证号:SCXK11-00-0006

1.3 仪器 多功能显微镜:BX60,日本 OLYMPUS 公司。电子分析天平:JA1003,上海天平仪器厂。美国 BCKMAN DP5500 型 γ 计数仪。光栅分光光度计:722 型,上海第三分析仪器厂。

2 方法

2.1 分组及给药 实验动物随机分为 7 组,即假手术组,模型组,偏瘫复康颗粒小、中、大(4.144g 生药/kg 体重、 8.288g 生药/kg 体重、 16.576g 生药/kg 体重)剂量组,乐脉颗粒($3\text{g}/\text{kg}$ 体重)组,天麻颗粒($5\text{g}/\text{kg}$ 体重)组。五个用药组造模前连续灌胃给药 3d,每天两次。假手术组,模型组予等量生理盐水。

2.2 脑缺血再灌注模型 采用“血管内栓线阻断法”MCAO 模型。大鼠经 10% 水合氯醛腹腔麻醉,小心分离右侧颈总动脉,剥离周围神经和组织;仔细分离右侧颈外动脉,结扎细小动脉;小心分离颈内动脉,结扎翼腭动脉;选用 3 号进口尼龙鱼线(直径 0.285mm)经颈外动脉插入颈内动脉,约 $2.0 \pm 0.1\text{cm}$ 达大脑中动脉入口处,缝合线固定。大脑中动脉缺血 40min 后,小心抽出栓线,结扎颈外切口,畅通颈总动脉,恢复血供。正常手术时间约 15~20min。假手术组只进行到分离右颈总动脉的过程。

2.3 指标测定

2.3.1 神经功能状态评价 评价标准按《现代药理实验方法》10 分法。

2.3.2 脑组织形态学的观察 术后 24h 断头取脑,常规脱水,石蜡包埋。然后作 $5\mu\text{m}$ 的连续冠状切片,HE 染色,观测组织形态学变化。

2.3.3 脑组织含水量的测定 术后 24h 断头取脑,左右分开,用滤纸吸干表面水分,分别称量左右脑片湿重。置于烘箱中, 90°C 烘烤 48h 至恒重后精确测量干重,测两次,计算含水量。

2.3.4 血清 SOD 和 NO 的测定 术后 24h 腹主动脉取血 4ml,置离心机 3000rpm 离心 10min,按 SOD 测定试剂盒说明测定 SOD 含量。NO 测定采用硝酸还原

酶法,按 NO 测定试剂盒说明添加样品及试剂, 530nm 波长, 0.5cm 比色杯,分别测定标准管和测定管 OD 值。

2.3.5 血浆 ET 和 CGRP 的测定 术后 24h 腹主动脉取血 2ml,注入 10% EDTA 二钠 30 μl 和抑肽酶 40 μl 的试管中,混匀, 4°C ,离心机 3000rpm 离心 10min,分离出血浆。按 ET 和 CGRP 放免药盒说明测定 ET 和 CGRP 含量。

2.4 统计学方法 应用 SPSS10.0for Windows 软件,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 神经功能状态评价 MCAO 大鼠术后 24h,模型组和各个受试组、对照组均出现不同程度的行为异常改变,主要表现为手术对侧前肢内收,肩内旋,前肢肌张力降低,肩抗力下降。其中 PTFK 大剂量组(评分 5.20 ± 1.10)、对照药乐脉颗粒组(5.29 ± 0.76)的神经体征与模型组(7.33 ± 0.82)比较有显著改善($P < 0.01$)。PTFK 小、中剂量组的神经体征亦有明显改善($P < 0.05$)。

3.2 脑组织形态学改变 结果显示,假手术组神经细胞数量多,形态正常,轮廓清晰。而模型组 MCAO 大鼠的脑组织则呈现明显的神经细胞缺血性改变,表现为神经细胞数量减少,细胞间隙扩大,排列紊乱,神经元泡沫样改变明显,核大量固缩。PTFK 治疗组光镜下可见损伤区神经细胞数量明显增加,核固缩减少,神经元泡沫样改变明显减少。

3.3 PTFK 对 MCAO 大鼠脑组织含水量的影响 假手术组左右两侧脑组织含水量无异常改变,模型组手术侧脑组织含水量比对侧明显增加($P < 0.01$)。PTFK 小、中剂量组、天麻颗粒组手术侧脑组织含水量明显少于模型组($P < 0.05$)。而 PTFK 大剂量组、乐脉颗粒组手术侧脑含水量下降更为明显($P < 0.01$)。各给药组脑组织含水量手术侧与手术对侧相比均有不同程度增加,但无统计学意义($P > 0.05$)。(见表 1)

3.4 偏瘫复康颗粒对 MCAO 大鼠血清 SOD 和 NO 的影响 模型组 MCAO 大鼠血清 SOD 含量明显低于假手术组;PTFK 三个剂量组和对照药天麻颗粒组、乐脉颗粒组都能够明显升高血清 SOD 含量,与模型组相比具有显著意义($P < 0.01$)。模型组血清 NO 含量与假手术组比较明显升高($P < 0.01$);PTFK 小剂量组、天麻颗粒组的 NO 含量与模型组比较明显降低($P < 0.01$);PTFK 中、大剂量组和乐脉颗粒组

的 NO 含量降低, 接近于假手术组, 与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$)。(见表 2)

表 1 偏瘫复康颗粒对 MCAO 大鼠脑组织含水量的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量 (g/kg)	n	含水量 (%)	
			左	右(手术侧)
假手术组		7	76.99 ± 0.58	76.78 ± 0.88**
模型组		6	77.01 ± 1.41	78.76 ± 0.99 [△]
PTFK 组	4.144	8	71.79 ± 4.88	73.21 ± 6.25*
PTFK 组	8.288	6	69.96 ± 5.91	71.28 ± 6.61*
PTFK 组	16.576	6	69.10 ± 4.73	69.82 ± 4.90**
天麻颗粒组		7	72.33 ± 4.09	73.96 ± 5.19*
乐脉颗粒组		7	70.46 ± 5.53	70.47 ± 4.70**

注: 与模型组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 手术侧与手术对侧比较[△] $P < 0.01$ (下同)

表 2 偏瘫复康颗粒对 MCAO 大鼠血清 SOD 和 NO 的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量 (g/kg)	n	NO	SOD
			($\mu\text{mol/L}$)	(pg/ml)
假手术组		7	45.87 ± 6.52**	36.56 ± 6.33**
模型组		6	66.06 ± 11.83	15.02 ± 7.84
PTFK 组	4.1448	8	25.23 ± 7.56**	43.61 ± 8.38**
PTFK 组	8.288	6	47.91 ± 3.20*	43.07 ± 7.59**
PTFK 组	16.576	6	48.26 ± 9.39*	42.32 ± 9.15**
天麻颗粒组		7	35.73 ± 10.29**	31.92 ± 11.05**
乐脉颗粒组		7	49.37 ± 7.61*	26.01 ± 7.31**

注: 与模型组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.5 偏瘫复康颗粒对 MCAO 大鼠血浆 ET 和 CGRP 的影响 模型组血浆 ET 含量与假手术组比较明显升高 ($P < 0.01$); PTFK 三个剂量组的 ET 含量与模型组比较明显降低 ($P < 0.01$); 对照药天麻颗粒、乐脉颗粒组的 ET 含量亦较模型组降低 ($P < 0.05$)。模型组血浆 CGRP 含量较假手术组明显下降 ($P < 0.01$)。PTFK 三个各剂量组和乐脉颗粒组 CGRP 含量明显高于模型组 ($P < 0.01$); 天麻颗粒组 CGRP 含量与模型组比较也有明显升高 ($P < 0.05$)。(见表 3)

表 3 偏瘫复康颗粒对 MCAO 大鼠血浆 ET 和 CGRP 的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量 (g/kg)	n	ET	CGRP
			(pg/ml)	(pg/ml)
假手术组		7	147.81 ± 13.24**	108.39 ± 11.88**
模型组		6	239.43 ± 19.16	91.67 ± 13.32
PTFK 组	4.144	8	170.26 ± 17.66**	167.05 ± 35.81**
PTFK 组	8.288	6	192.62 ± 27.54**	169.86 ± 22.33**
PTFK 组	16.576	6	191.52 ± 19.22**	157.51 ± 19.15**
天麻颗粒组		7	206.74 ± 21.53*	121.21 ± 18.07*
乐脉颗粒组		7	208.14 ± 25.33*	135.76 ± 29.21**

4 结论

自由基在脑缺血再灌注损伤中具有重要作用。NO 是一种气体自由基, 兼有细胞内、细胞间的信使和神经递质作用, 具有广泛的生物学特性^[1]。脑缺血过程中 NO 具有潜在的有益和有害双重作用。目前研究提示 NO 产生在最初几小时内具有细胞保护作用^[2-3], 如维持脑血流量, 抑制血小板或白细胞聚集和粘附等。而随着缺血再灌注损伤时间的延长 NO 则表现出神经毒作用^[4], 加重神经细胞损害。自由基清除系统中的 SOD 是机体重要的抗氧化酶, 脑缺血过程中 SOD 能够对抗自由基, 减轻脑缺血, 防止氧代谢物的损伤。特别是在减轻再灌注后的脑损伤方面具有重要作用^[5]。

ET 是迄今发现作用最强的内源性血管收缩剂, 而 CGRP 是目前发现最强的一种舒血管活性肽, 两者在正常情况下, 作用相反, 但相对稳定, 呈动态平衡状态。在脑梗塞时平衡失控, 引起强烈持久的相互拮抗^[6]。脑缺血后应激反应使全身血管系统内皮细胞产生 ET 非特异增加, 同时构成血脑屏障的脑微血管内皮细胞间的紧密连接受到破坏, 使脑组织 ET 漏入血管内, 局部 ET 的升高使脑组织缺血区和周围正常区侧支血管产生强烈而持久的收缩, 从而加重中心区、半暗带的缺血和组织损伤^[7]。大量动物实验和临床研究表明, 急性脑缺血时血浆 ET 浓度与梗死灶大小、脑水肿程度或临床症状轻重相一致。CGRP 在中枢神经系统尤其是脑血管中含量丰富, 正常情况下不影响血浆 ET 的基础含量和释放, 但在病理条件下能抑制 ET 的大量释放。在保护缺血性脑组织损伤的研究中, 使用降钙素基因相关肽预防性治疗可明显减小脑缺血体积, 保护缺血神经组织^[8]。脑缺血时中枢神经组织 CGRP 分泌减少, CGRP 含量显著降低, 而外周 ET 含量升高, 舒缩血管物质比例失调, 是使脑组织损伤加重的重要原因。

本研究结果表明, 大鼠脑组织缺血 40min 再灌注 24h 后, 有明显的神经功能异常改变, 并出现明显脑组织水肿和神经细胞缺血性改变。血清 NO、血浆 ET 含量显著增加; 血清 SOD、血浆 CGRP 含量显著降低。而偏瘫复康颗粒能使脑水肿明显减轻, 显著改善缺血再灌注所致的神经细胞损伤, 降低 NO、ET 含量, 升高 SOD、CGRP 含量。结果提示偏瘫复康颗粒对脑缺血再灌注所致的脑组织损伤具有保护作用, 其保护机理可能与其显著升高血清中 SOD 含量、降低 NO 含量, 减轻自由基对脑组织损伤, 以及升高血

浆中 CGRP 含量、降低 ET 含量, 调节缩血管物质和舒血管物质之间平衡的作用机制有关。

参考文献:

- [1] 田恒力, 张镛. 一氧化氮生物作用研究进展[J]. 国外医学神经病学神经外科分册, 1995, 22(2): 87-90.
- [2] Morikawa E, Moskowitz MA, Huang Z, et al. L-arginine infusion promotes nitric oxide-dependent vasodilation, increases regional cerebral blood flow, and reduces infarction volume in the rat[J]. Stroke, 1994, 25(2): 429-435.
- [3] Zhang F, White JG, Iadecola C. Nitric oxide donors increase blood flow and reduce brain damage in focal ischemia: evidence that nitric oxide is beneficial in the early stage of cerebral ischemia. [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1994, 14(2): 217-226.

- [4] Faraci FM, Brian JE Jr. Nitric oxide and the cerebral circulation[J]. Stroke, 1994, 25(3): 692-703.
- [5] Young B, Runge JW, Waxman KS, et al. Effects of pegorgotein on neurologic outcome of patients with severe head injury. A multicenter, randomized controlled trial[J]. JAMA, 1996, 276(7): 538-543.
- [6] 沈君, 陈曼娥, 沈吉平, 等. CGRP、ET 活性应变效应与急性脑卒中关系的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 1997, 14(3): 138-140.
- [7] 李胜, 雷征霖. 内皮素与缺血性脑血管病关系的研究进展[J]. 国外神经病学脑血管疾病分册, 1998, 6(3): 131-134.
- [8] 陈道文, 李作汉, 张平. 降钙素基因相关肽对大鼠局灶性脑缺血保护作用的研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 1998, 6(5): 271-273.