

月季花总黄酮对局灶性脑缺血再灌注模型大鼠的影响

李艳^{1,2}, 宋亚刚², 苗明三^{2*}, 邵帅²

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] **目的:**通过研究月季花总黄酮对大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的影响,探讨其作用机制。**方法:**将大鼠随机分为假手术组、模型组、月季花总黄酮高、中、低剂量组(200, 100, 50 mg·kg⁻¹)及阳性组[尼莫地平组(20 mg·kg⁻¹), 脑络通组(500 mg·kg⁻¹)]。预先连续给药 7 d, 末次给药 1 h 后, 复制大鼠大脑中动脉局灶性栓塞(MCAO)模型。造模 2 h 后再灌注 22 h, 对死亡率、神经功能缺失评分, 检测血清中 S-100 β ; 脑组织中丙二醛(MDA), 超氧化物歧化酶(SOD), 一氧化氮(NO), 一氧化氮合酶(NOS), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-1 β (IL-1 β), 细胞间黏附分子-1(ICAM-1), 三磷酸腺苷(ATP)酶; 并观察脑组织形态学改变。**结果:**大鼠局灶性脑缺血再灌注模型复制成功。与模型组比较, 月季花总黄酮高、中、低剂量组均可显著降低大鼠神经功能缺失的评分($P < 0.01$), 显著降低血清中的 S-100 β 含量($P < 0.01$), 显著降低脑组织中 MDA, NO, NOS 活性($P < 0.01$), 显著升高脑组织中 SOD 活性($P < 0.01$), 显著升高脑组织中 Na⁺K⁺-ATP 酶, Mg²⁺-ATP 酶, Ca²⁺-ATP 酶活性($P < 0.01$), 显著降低脑组织中的 TNF- α , IL-1 β , ICAM-1 含量($P < 0.01$); 显著改善脑组织的损伤($P < 0.01$)。**结论:**月季花总黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用, 其作用机制可能与其抗自由基, 减轻脑组织的炎症反应及改善脑缺血再灌注损伤后脑组织的能量代谢有关。

[关键词] 月季花总黄酮; 中动脉局灶性栓塞(MCAO)模型; 脑缺血; 再灌注损伤

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)12-0064-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190804

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190101.1059.008.html>

[网络出版时间] 2019-01-03 15:59

Effect of Rosae Chinensis Flos Total Flavones on Focal Cerebral Ischemia-reperfusion in Rats

LI Yan^{1,2}, SONG Ya-gang², MIAO Ming-san^{2*}, SHAO Shuai²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Rosae Chinensis Flos total flavones (RCTF) on the focal cerebral ischemia-reperfusion model in rats, in order to preliminarily explore the mechanism of action. **Method:** Rats were randomly divided into sham-operated group, model group, large, medium, and low-dose RCTF group (200, 100, 50 mg·kg⁻¹) and positive group [Nimodipine group (20 mg·kg⁻¹) and Naoluotong group (500 mg·kg⁻¹)]. After 7 days of continuous administration, 1 hour later after the last administration, the middle cerebral artery middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was duplicated. After 2 hours of modeling, perfusion was performed for 22 hours. Mortality and neurological deficits were scored. Serum S-100 β was detected; brain tissue malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), nitric oxide (NO), nitric oxide synthase (NOS), tumour necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), adenosine triphosphate (ATP) ase were measured. The brain tissue morphological changes were observed.

[收稿日期] 20180827(014)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301071); 中原学者项目(162101510003); 国家国际合作基地项目(国科外函(2016)65号); 河南省国际合作项目(162102310181); 河南省产学研项目(172107000012)

[第一作者] 李艳, 在读博士, 从事中药药理研究, E-mail: 1130201207@qq.com

[通信作者] *苗明三, 教授, 博士, 从事中药药理教学与研究, E-mail: miaomingsan@163.com

Result: The rat model of focal cerebral ischemia and reperfusion was successfully replicated. Compared with the model group, RCTF in large, medium, and low-dose RCTF group significantly decreased the score of neurological deficit in rats ($P < 0.01$), significantly decreased the content of S-100 β in serum ($P < 0.01$), significantly reduce the levels of MDA, NO and NOS in brain tissue ($P < 0.01$), significantly increase the level of SOD in brain tissue ($P < 0.01$), and significantly increase Na⁺ K⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase, and Ca²⁺ in brain tissue ($P < 0.01$), significantly reduced TNF- α content, IL-1 β , ICAM-1 content in brain tissue ($P < 0.01$), and significantly improved brain tissue damage ($P < 0.01$). **Conclusion:** RCTF have a protective effect on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. The mechanism may be related to the resistance of anti-free radicals, the reduction of inflammation in brain tissue and the improvement of brain energy metabolism after cerebral ischemia reperfusion injury.

[**Key words**] Rosae Chinensis Flos total flavones (RCTF); middle cerebral artery occlusion (MCAO) model; cerebral ischemia; reperfusion injury

脑卒中,中医称为中风,具有高的发病率、死亡率和致残率的特点^[1]。占脑卒中发病率 80% 左右的是缺血性脑卒中(cerebral ischemic stroke, CIS),此病影响日常生活和工作,也给家庭和社会带来了沉重的负担^[2]。再灌注对于脑组织的存活是必不可少的,有助于额外的组织损伤和出血性转化^[3]。缺血性脑卒中引起的再灌注损伤严重影响神经元的修复和功能恢复。脑缺血再灌注损伤的病理生理过程是广泛多样的,并取决于脑缺血损伤的严重程度、持续时间和定位^[4]。

月季具有活血调经,清热解毒的功效,主要含黄酮类成分,总黄酮类成分以槲皮苷、山奈黄素等为主^[5]。有研究报道槲皮素,在心脑血管疾病方面有较好应用^[6]。恢复缺血区的血流供应对缺血性脑血管病的治疗是至关重要的,然而,再灌注损伤是一个巨大的障碍,找到有效的治疗方法是必要的^[7]。为进一步研究月季总黄酮对脑缺血再灌注损伤的保护作用,本实验采用线栓法制备大鼠中动脉阻塞缺血再灌注损伤模型,观察月季总黄酮对神经功能损伤、自由基损伤和炎症损伤的改善作用,探讨其对脑缺血再灌注的保护作用。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,雄性,SPF 级,体质量 230 ~ 250 g,山东鲁抗医药股份有限公司,合格证号 SCXK(津)2018-0001,本文设计的所有动物实验部分均符合河南中医药大学动物伦理委员会的要求。

1.2 药物及试剂 月季花总黄酮(总黄酮含量为 61.5%,由河南中医药大学中药化学室提供,批号 201208);尼莫地平片(山东新华制药股份有限公司,批号 1105036);脑络通胶囊(哈药集团三精制药四厂有限公司,批号 201109002);三磷酸腺苷(ATP)酶,考

马斯亮兰,一氧化氮(NO),一氧化氮合酶(NOS),丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD)(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20130111,20130115,20130111,20130114,20130108,20130114);S-100 β ,肿瘤坏死因子- α (TNF- α),细胞间黏附因子-1(ICAM-1),白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附测定测定(ELISA)检测试剂盒(苏州卡尔文生物科技有限公司,批号均为 20130101A);水合氯醛(上海山浦化工有限公司,批号 20120401);青霉素(哈药集团制药总厂,批号 20120507);苏木素-伊红(HE)染色试剂,羧甲基纤维素钠(天津市恒兴化学试剂制造有限公司,批号 2006072);甲醛溶液(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号 20120406);氯化钠注射液(郑州永和制药有限公司,批号 11072121)。

1.3 仪器 UV-2000 型紫外-可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司];TGL-16G 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);JA1103N 型电子分析天平[奥豪斯(上海)公司]。

2 方法

2.1 分组与给药 取 Wistar 大鼠,随即均匀分为 7 组,分别为假手术组,模型组,月季花总黄酮高、中、低剂量组(200, 100, 50 mg·kg⁻¹,临用前用 0.5% CMC 配成药物质量浓度 20, 10, 5 g·L⁻¹, 10 mL·kg⁻¹),阳性药组[尼莫地平(给药剂量为 20 mg·kg⁻¹,临用前用 0.5% CMC 配成药物质量浓度 2 g·L⁻¹, 10 mL·kg⁻¹,临床用量的 10 倍),脑络通组(给药剂量为 500 mg·kg⁻¹,临用前用 0.5% CMC 配成药物质量浓度 50 g·L⁻¹, 10 mL·kg⁻¹,临床用量的 10 倍)],每组 16 只。于造模前 7 d 给药,假手术组、模型组灌服同体积 0.5% CMC。

2.2 大鼠中动脉栓塞模型的复制 各组大鼠于第

6 天晚上 8 点分批禁食不禁水,第 7 天上午分批灌胃给药 1 h 后,用 10% 水合氯醛按体质量以 $0.3 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉大鼠。参照 Longa 等^[8] 的改良线栓法制备大鼠左侧大脑中动脉阻塞。用推毛机剔除颈部的毛,用 75% 乙醇擦干净,在大鼠颈部正中偏左切口,钝性逐层分离暴露左侧颈总动脉(CCA),颈外动脉(ECA),颈内动脉(ICA),结扎 CCA 和 ECA,用动脉夹暂时夹闭 ICA,于 CCA 距离分叉处 5 mm 时剪 0.2 mm 小口,将线栓插入,经 CCA 分叉部进入 ICA,拔掉动脉夹,继续插入 ICA 至分叉处至 1.8~2 cm,直至有阻力,即阻断大脑中动脉入口处,结扎 ICA,然后缝合。假手术组只暴露左侧血管不做插线处理,2 h 后轻轻抽出栓线。

2.3 大鼠局灶性脑缺血模型神经功能评分 造模 24 h 后采用 Longa 等^[8] 评分法对神经行为学进行评分。评分标准,0 分,无神经功能缺失症状,活动正常;1 分,提起大鼠尾巴时,对侧前爪不能完全伸展;2 分,爬行时,出现向右侧即偏瘫侧转圈;3 分,爬行时,身体向右侧即偏瘫侧倾倒者;4 分,自身不能行走,意识丧失;5 分,死亡。剔除评分为 0 分的。

2.4 血清及脑组织生化指标检测 采用摘眼球取血,0.5 h 后,3 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取血清测 S-100 β 含量;大鼠断头后,迅速剥取脑组织,除去绣球、小脑及脑干,切取损伤侧脑组织,一小半脑制备 10% 的脑匀浆用于检测 MDA, SOD, NO, NOS, TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, ATP 水平。

2.5 HE 染色观察脑组织病理变化 取另一小半脑组织,用 10% 甲醛溶液固定,用于 HE 染色,观察脑组织形态学改变。同时按照半定量标准对实验动物脑组织皮质和神经核团的病理改变进行测定。按下列标准:“-”神经细胞和神经胶质细胞基本正常;“+”少数神经细胞变性,神经胶质细胞基本正常;“++”部分神经细胞变性,神经胶质细胞基本正常或部分固缩;“+++”全部神经细胞变性,神经胶质细胞完全固缩或消失。

2.6 统计学处理 数据分析用 SPSS 17.0 进行数据资料的统计学处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料先进行正态性检验和方差齐性检验,方差齐时多组间比较采用单因素方差分析、组间的多重比较采用 LSD 法,方差不齐时采用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对局灶性脑缺血模型大鼠神经功能评分、死亡率的影响 从神经功能评分来说,模型组大鼠神经

功能评分最为严重 ($P < 0.01$),动物醒后,活动减少,精神欠佳,状态萎靡,有的出现偏瘫,不能行走甚至意识丧失,说明模型复制成功。给药后均能显著降低大鼠的神经功能评分,月季花总黄酮高、中、低剂量组及脑络通组均可显著降低大鼠神经功能缺失的评分 ($P < 0.01$),尼莫地平组可明显降低大鼠的神经功能评分 ($P < 0.05$)。缺血再灌注组大鼠的死亡率最高,达到 37.5%,给药后各组的死亡率均有所降低。见表 1。

表 1 月季花总黄酮对局灶性脑缺血模型大鼠神经功能评分、死亡率的影响

Table 1 Effect of rose chinensis total flavones (RCTF) on mortality and neurological deficit score with focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

组别	n	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	神经功能评分 ($\bar{x} \pm s$)/分	死亡率/%
假手术	12	-	0	0
模型	10	-	$3.6 \pm 0.5^{2)}$	37.5
尼莫地平	11	20	$2.8 \pm 0.6^{3)}$	31.2
脑络通	12	500	$2.6 \pm 0.7^{4)}$	25.0
月季花总 黄酮	12	200	$2.1 \pm 0.7^{4)}$	25.0
	12	100	$2.2 \pm 0.6^{4)}$	25.0
	11	50	$2.4 \pm 0.7^{4)}$	31.2

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⁾ $P < 0.01$ (表 2~6 同)。

3.2 对局灶性脑缺血模型大鼠血清 S-100 β , 脑组织 ICAM-1 含量的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清 S-100 β 含量、脑组织中的 ICAM-1 含量均显著升高 ($P < 0.01$),说明模型复制成功;与模型组比较,月季花总黄酮高、中、低剂量组及尼莫地平组、脑络通组均能显著降低血清中的 S-100 β 含量、脑组织中的 ICAM-1 含量 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 对局灶性脑缺血模型大鼠脑组织 MDA, SOD, NO 和 NOS 水平的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中 MDA, NO, NOS 水平显著升高 ($P < 0.01$),SOD 活性显著增强 ($P < 0.01$),说明模型复制成功。与模型组比较,月季花总黄酮高、中、低剂量组及尼莫地平、脑络通组均可显著降低 MDA, NO, NOS 水平 ($P < 0.01$),显著升高 SOD 活性 ($P < 0.01$)。见表 3。

3.4 对局灶性脑缺血模型大鼠脑组织 ATP 酶活力的影响 与假手术比较,模型组的大鼠脑组织中的 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATP 酶}$, $\text{Mg}^{2+} \text{-ATP 酶}$, $\text{Ca}^{2+} \text{-ATP 酶}$ 活力

表 2 月季花总黄酮对局灶性脑缺血大鼠血清 S-100 β , 脑组织 ICAM-1 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of RCTF on serum S-100 β protein and ICAM-1 in brain tissue content with focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats ($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	S-100 β	ICAM-1
假手术	12	-	10.52 ± 0.57	14.17 ± 1.02
模型	10	-	29.23 ± 0.71 ²⁾	29.13 ± 1.13 ²⁾
尼莫地平	11	20	18.38 ± 1.04 ⁴⁾	20.44 ± 1.11 ⁴⁾
脑络通	12	500	17.63 ± 1.08 ⁴⁾	19.55 ± 0.83 ⁴⁾
月季花总黄酮	12	200	14.82 ± 1.01 ⁴⁾	16.02 ± 1.15 ⁴⁾
	12	100	15.63 ± 1.08 ⁴⁾	17.84 ± 1.18 ⁴⁾
	11	50	19.23 ± 0.99 ⁴⁾	19.41 ± 1.16 ⁴⁾

表 3 月季花总黄酮对大鼠局灶性脑缺血模型脑组织 MDA, SOD, NO 和 NOS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of RCTF on MDA, SOD, NO and NOS levels in brain tissue of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	MDA/U·mg ⁻¹	SOD × 10 ² /μmol·g ⁻¹	NO/μmol·g ⁻¹	NOS/U·mg ⁻¹
假手术	12	-	3.74 ± 0.33	2.37 ± 0.21	3.11 ± 0.26	0.52 ± 0.09
模型	10	-	7.28 ± 0.59 ²⁾	1.53 ± 0.10 ²⁾	9.17 ± 1.37 ²⁾	1.26 ± 0.12 ²⁾
尼莫地平	11	20	5.05 ± 0.45 ⁴⁾	1.88 ± 0.14 ⁴⁾	6.26 ± 0.94 ⁴⁾	0.93 ± 0.11 ⁴⁾
脑络通	12	500	5.46 ± 0.83 ⁴⁾	1.98 ± 0.21 ⁴⁾	6.00 ± 1.04 ⁴⁾	0.84 ± 0.10 ⁴⁾
月季花总黄酮	12	200	4.07 ± 0.32 ⁴⁾	2.08 ± 0.11 ⁴⁾	4.97 ± 0.66 ⁴⁾	0.71 ± 0.10 ⁴⁾
	12	100	4.37 ± 0.46 ⁴⁾	2.01 ± 0.14 ⁴⁾	5.53 ± 0.74 ⁴⁾	0.83 ± 0.12 ⁴⁾
	11	50	5.34 ± 0.39 ⁴⁾	1.92 ± 0.11 ⁴⁾	6.31 ± 0.75 ⁴⁾	0.88 ± 0.11 ⁴⁾

表 4 月季花总黄酮对局灶性脑缺血大鼠脑组织 ATP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of RCTF on ATP enzyme activity in brain homogenate of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion ($\bar{x} \pm s$) $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶	Mg ²⁺ -ATP 酶	Ca ²⁺ -ATP 酶
假手术	12	-	10.82 ± 0.83	8.13 ± 0.66	12.39 ± 1.07
模型	10	-	5.16 ± 0.74 ²⁾	4.03 ± 0.67 ²⁾	7.24 ± 0.74 ²⁾
尼莫地平	11	20	6.76 ± 0.81 ⁴⁾	5.46 ± 0.49 ⁴⁾	9.14 ± 0.64 ⁴⁾
脑络通	12	500	7.08 ± 0.77 ⁴⁾	6.17 ± 0.86 ⁴⁾	9.40 ± 0.96 ⁴⁾
月季花总黄酮	12	200	9.41 ± 0.80 ⁴⁾	7.05 ± 0.12 ⁴⁾	11.01 ± 0.92 ⁴⁾
	12	100	8.18 ± 0.85 ⁴⁾	6.28 ± 0.32 ⁴⁾	9.96 ± 0.47 ⁴⁾
	11	50	7.57 ± 0.71 ⁴⁾	5.70 ± 0.59 ⁴⁾	9.40 ± 0.57 ⁴⁾

3.6 对局灶性脑缺血模型大鼠脑组织皮质区病理改变的影响 经 Ridit 检验,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织皮质区出现显著的病理变化 ($P < 0.01$),说明模型复制成功。与模型组比较,月季花总黄酮高、中、低剂量组有显著改善脑组织的损伤 ($P < 0.01$),脑络通组有明显改善脑组织的损伤的

显著降低 ($P < 0.01$),说明局灶性脑缺血再灌注模型复制成功;与模型组比较,月季花总黄酮高、中、低剂量组及尼莫地平组、脑络通组脑组织中 Na⁺ K⁺-ATP 酶, Mg²⁺-ATP 酶, Ca²⁺-ATP 酶活性均显著升高 ($P < 0.01$)。见表 4。

3.5 对局灶性脑缺血模型大鼠脑匀浆 TNF- α , IL-1 β 含量的影响 与假手术组比较,模型组大鼠缺血侧脑组织中 TNF- α , IL-1 β 含量均显著升高 ($P < 0.01$),说明模型复制成功;与模型组比较,月季花总黄酮高、中、低剂量组及尼莫地平组、脑络通组均能显著降低脑组织中的 TNF- α , IL-1 β 含量 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 月季花总黄酮对大鼠局灶性脑缺血模型脑组织匀浆 TNF- α , IL-1 β 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effect of RCTF on TNF- α and IL-1 β levels in brain tissue of rats with focal cerebral ischemia-reperfusion model ($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β
假手术	12	-	9.61 ± 0.90	10.50 ± 0.69
模型	10	-	23.43 ± 1.24 ²⁾	30.19 ± 2.40 ²⁾
尼莫地平	11	20	16.26 ± 1.16 ⁴⁾	19.26 ± 1.26 ⁴⁾
脑络通	12	500	14.98 ± 1.06 ⁴⁾	18.74 ± 1.35 ⁴⁾
月季花总黄酮	12	200	12.69 ± 0.79 ⁴⁾	12.41 ± 0.67 ⁴⁾
	12	100	11.62 ± 1.08 ⁴⁾	15.25 ± 0.90 ⁴⁾
	11	50	14.74 ± 1.02 ⁴⁾	18.04 ± 1.02 ⁴⁾

作用 ($P < 0.05$)。见图 1,表 6。

3.7 对局灶性脑缺血模型大鼠脑组织海马区神经核团病理改变的影响 经 Ridit 检验,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织海马区出现显著的病理变化 ($P < 0.01$),说明大鼠局灶性脑缺血再灌注模型成功。与模型组比较,月季花总黄酮高、中、低剂量组

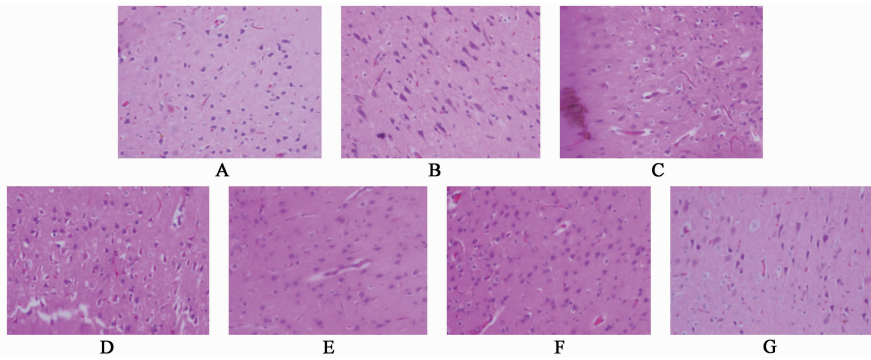


图 1 月季花总黄酮对大鼠局灶性脑缺血再灌注脑组织皮质的病理改变的影响 (HE, ×400)

Fig.1 Effect of RCTF on pathological changes of brain cortex in rats with focal cerebral ischemia and reperfusion(HE, ×400)

表 6 月季花总黄酮对大鼠局灶性脑缺血再灌注脑组织皮质的病理改变的影响

Table 6 Effect of RCTF on pathological changes of brain cortex in rats with focal cerebral ischemia and reperfusion

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	-	+	++	+++
假手术	12	-	11	1	0	0
模型	10	-	0	0	1	9
尼莫地平	11	20	0	0	5	6
脑络通	12	500	2	3	2	5
月季花总黄酮	12	200	9	3	0	0
	12	100	8	3	1	0
	11	50	5	4	2	0

可明显大鼠脑组织海马区的病理损伤程度 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 7。

4 讨论

病脑血管病是一种常见的临床疾病, 是三类严重威胁人类生命的重大疾病之一, 以缺血性脑卒中最为常见^[9]。综合其病理机制应为由于正气亏虚、五脏虚损、情志过极、劳倦内伤、饮食不节、气虚(或气滞)血瘀等, 导致痰瘀故邪, 扰乱、损耗脏腑气血, 后痰郁化火, 火极生风, 出现“风、火”证候, 进而出现阴阳失衡, 气血逆乱, 引发脑卒中^[10]。脑缺血级联反应是一个复杂的、多因素、多环节的过程, 脑缺血后会产生的一些神经毒素, 会导致脑内神经调节

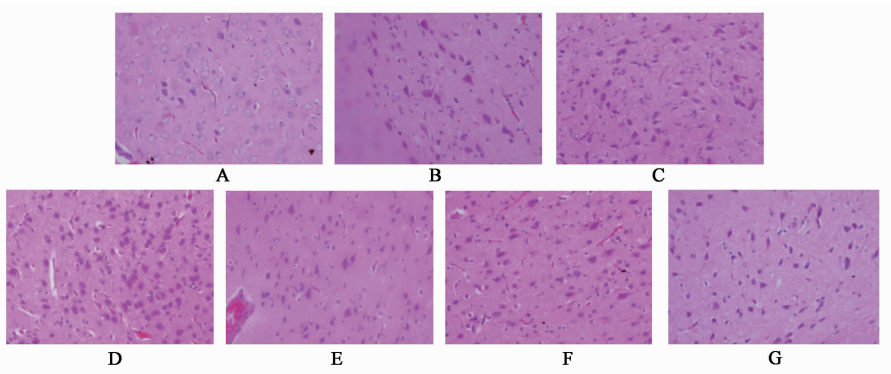


图 2 月季花总黄酮对大鼠局灶性脑缺血模型脑组织神经核团病理改变的影响 (HE, ×400)

Fig.2 Effect of RCTF on pathological changes of brain tissue in rats with focal cerebral ischemia(HE, ×400)

及分泌网络出现紊乱, 这改变了脑内正常的生理环境, 也引起了全身病理的改变。缺血性脑卒中在中医上属于“中风”的范畴, 血瘀是发生缺血性中风的常见原因^[11-12], 中医治疗脑卒中的重要方法是活血化瘀, 使体内的瘀滞消除, 周身血脉畅通, 减轻颅内压, 促进脑循环和微循环, 脑功能得以恢复改善^[13]。

本实验采用线栓法制备大鼠脑缺血再灌注模型, 发生脑缺血时, 炎症、凋亡、氧化应激、兴奋性

毒性等多种因素相互作用, 相互影响, 从而加剧神经损伤的发生、发展。S-100 β 是脑胶质细胞的特异性蛋白, 可促进神经元的发育、轴突的生长, 发生急性脑缺血时, 脑胶质细胞和血管内皮细胞会大量死亡, S100 β 蛋白会遗漏到组织液中, 血-脑屏障受损害, 此时 S-100 β 蛋白就越过血-脑屏障^[14]。ICAM-1 是属于免疫球蛋白超家族的黏附分子, 对炎症转移的病理过程起着非常重要的作用^[15]。MDA 属于脂肪

表 7 月季花总黄酮对大鼠局灶性脑缺血模型脑组织神经核团病理改变半定量测定的影响

Table 7 Effect of RCTF on semi-quantitative measurement results of pathological changes of brain tissue in rats with focal cerebral ischemia

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	-	+	++	+++
假手术	12	-	11	1	0	0
模型	10	-	0	0	3	7
尼莫地平	11	20	0	1	2	8
脑络通	12	500	0	1	2	9
月季花总黄酮	12	200	7	4	1	0
	12	100	6	4	2	0
	11	50	2	6	3	0

酸过氧化反应所产生的代谢产物,MDA 含量反映了缺血后细胞的损伤程度,含量的升高表明生成了大量的氧自由基;SOD 可阻断机体的一系列氧化连锁反应,减少脂质过氧化反应,主要是通过清除体内所生成的氧自由基而实现的,从而缓解了脑缺血再灌注所导致的脑组织损伤程度,进而起到保护脑缺血的作用^[16]。NO 在维持神经元功能的完整性和脑血流的恒定方面有重要作用,同时 NO 在脑血管病急性期导致神经细胞中毒,在继发性脑损伤过程中也发挥了重要作用^[17]。脑组织缺血再灌注病理进程中,NO 既能促进恢复缺血半暗带区的供血,减少神经元细胞的死亡,又能促进 ROS 和脂质过氧化产物生成加重脑组织损伤^[18]。

能量代谢障碍是引发一系列连锁反应加重脑缺血损伤的原因之一,作为能量代谢的重要场所,细胞能量代谢水平可由 ATP 酶活性的强弱来反映,依赖 ATP 直接供能的酶有 Na⁺ K⁺-ATP 酶, Ca²⁺-ATP 酶, Mg²⁺-ATP 酶。TNF-α 参与机体免疫反应,具有促炎性、促血栓生成及神经毒性等作用^[19]。再灌注后脑内内皮细胞炎症反应,血脑屏障受到损伤,脑损伤及脑水肿进一步加重,此病理生理过程的基础主要是以 TNF-α, IL-1β, IL-6 等^[20]为代表的多种炎症介质发生失控、进而释放形成的“瀑布效应”^[21],进一步加重缺血损伤。

本实验选择脑络通胶囊,具有补气活血、通经活络的功效,主要用于脑血栓、脑动脉硬化、中风后遗症等,其功效有活血的作用,与本实验所选的药物月季花总黄酮有相似的功效。尼莫地平主要用于急性脑血管病恢复期的血液循环改善,而月季花总黄酮也有改善血液循环的作用。所以选择这两个阳性药。

本实验发现月季花总黄酮可显著改善实验大鼠神经功能缺失评分,降低死亡率,改善缺血再灌注大鼠的大脑皮质及海马区的病变情况;降低因能量代谢障碍对脑组织的损伤;通过清除自由基,抑制脂质过氧化作用,从而减轻脑缺血再灌注损伤程度;抑制缺血后炎症反应,及改善炎症引起的一系列级联反应介质和细胞因子,从而对脑缺血再灌注损伤起到保护作用。综上所述月季花的有效活性成分总黄酮从多方面较好的对脑缺血再灌注损伤进行保护作用,为开发疗效优良的治疗脑缺血疾病药物奠定了基础。

[参考文献]

[1] Prabhakaran S, Ruff I, Bernstein R A. Acute stroke intervention: a systematic review[J]. J Am Med Assoc, 2015, 313(14):1451-1462.

[2] Kissela B M, Khoury J C, Alwell K, et al. Age at stroke: temporal trends in stroke incidence in a large, biracial population[J]. Neurology, 2012, 79(17):1781-1787.

[3] Khatri R, Mckinney A M, Swenson B, et al. Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke[J]. Neurology, 2012, 79(13 Suppl 1):S52-S57.

[4] Sabri M, Lass E, Macdonald R L. Early brain injury: a common mechanism in subarachnoid hemorrhage and global cerebral ischemia[J]. Stroke Res Treat, 2013, doi:10.1155/2013/394036.

[5] 张敏娜, 朱军, 王光辉, 等. 双水相体系与超声集成提取月季花总黄酮[J]. 上海医药, 2012, 33(3):29-30.

[6] 吴小军, 牟鲁霞, 赵爱华, 等. 黄酮类化合物治疗糖尿病及其并发症的研究进展[J]. 中药材, 2009, 32(10):1629-1635.

[7] BAI J, Lyden P D. Revisiting cerebral postischemic reperfusion injury: new insights in understanding reperfusion failure, hemorrhage, and edema[J]. Int J Stroke, 2015, 10(2):143-152.

[8] Longa E Z, Weinstein P R, Carison S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.

[9] Perjudumbravă L, Muntean M L, Muresanu D F. Cerebrovascular profile assessment in Parkinson's disease patients[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2014, 13(4):712-717.

[10] 张久亮, 李英姿, 杨海英, 等. 脑卒中的中医传统病机分析[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(1):107-110.

- [11] 程晓, 张小莉, 白明, 等. 活血化癥法、清热解毒法对脑缺血的防治特点及分析[J]. 中医学报, 2012, 27(5): 615-619.
- [12] 杨薇, 黎明全, 李杨, 等. 缺血性中风病急性期中西药群组模块探索[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(3): 618-626.
- [13] GUO H, LI M J, LIU Q Q, et al. Danhong injection attenuates ischemia/reperfusion-induced brain damage which is associating with Nrf2 levels *in vivo* and *in vitro* [J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(9): 1817-1824.
- [14] 鲁美君, 关利新, 赵鑫, 等. 西洋参茎叶皂苷对局灶性脑缺血大鼠血清中 S-100 β 含量的影响[J]. 中医药信息, 2011, 28(5): 21-22.
- [15] GAO X Q, YANG C X, CHEN G J, et al. Ginsenoside Rb1 regulates the expressions of brain-derived neurotrophic factor and Caspase-3 and induces neurogenesis in rats with experimental cerebral ischemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 132(2): 393-399.
- [16] 贾丽娜, 宋友, 程洪斌. 缺血后处理对局灶性脑缺血再灌注大鼠 SOD、MDA 的影响[J]. 航空航天医学杂志, 2011, 22(9): 1049-1051.
- [17] 王露茜, 张翔宇, 耿若君, 等. 一氧化氮对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 新乡医学院学报, 2010, 27(6): 559-563.
- [18] Moro M A, Cardenas A, Hurtado O, et al. Nitric oxide and cerebral ischemic preconditioning [J]. *Cell Calcium*, 2004, 36(3/4): 323-329.
- [19] 马增玉, 吕建卫. 注射用丹参多酚酸盐注射液对急性脑梗死患者血浆肿瘤坏死因子 α 及 C 反应蛋白的影响[J]. 河北中医, 2013, 35(6): 899-900.
- [20] 秦胜利. 红花注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤后能量代谢的影响[J]. 临床医学, 2016, 36(7): 114-116.
- [21] Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(3): 464-479.

[责任编辑 周冰冰]