

脑康口服液对脑缺血损伤模型大鼠保护作用的研究

牛筛龙^{1*},葛海生²,孙富增¹(1.武警江苏省总队医院药剂科,江苏扬州 225003;2.武警部队药品仪器检验所,北京 102613)

中图分类号 R285;R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)07-0598-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.07.08

摘要 目的:研究脑康口服液对脑缺血损伤模型大鼠的保护作用。方法:对大鼠以尼龙线线栓法复制脑缺血损伤模型。实验分为空白对照(等容生理盐水)、假手术(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)、尼莫地平(8 mg/kg)与脑康口服液高、中、低剂量(8、4、2 g/kg)组。灌胃给药,每天1次,连续7 d。测定大鼠脑梗死面积,超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO)活性,丙二醛(MDA)、白细胞介素(IL)-6含量。结果:与模型组比较,脑康口服液高、中、低剂量组大鼠脑梗死面积显著减少,SOD活性显著增强,MDA和IL-6含量显著降低,MPO活性显著减弱($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论:脑康口服液抗脑缺血损伤的机制可能与降低脑缺血模型大鼠脑梗死面积,增强SOD活性,降低MPO活性和MDA、IL-6含量有关。

关键词 脑康口服液;脑缺血损伤;脑梗死面积;超氧化物歧化酶;髓过氧化物酶

Study on Protective Effects of Naokang Oral Liquid on Cerebral Ischemia Injury in Rats

NIU Shai-long¹, GE Hai-sheng², SUN Fu-zeng¹(1.Dept. of Pharmacy, Armed Police Corps Hospital of Jiangsu Province, Jiangsu Yangzhou 225003, China; 2.Institute of Medicine and Instrument of CAPF, Beijing 102613, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the protective effect of Naokang oral liquid on cerebral ischemia injury in rats. **METHODS:** Cerebral ischemia injury rat model was induced by nylon line reaching into the external carotid artery for 12 h. The experiment rats were divided into 7 groups, i.e. blank control group (constant volume of normal saline), sham operation group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), nimodipine group (8 mg/kg), Naokang oral liquid high-dose, medium-dose and low-dose groups (8, 4, 2 g/kg). They were given relevant medicine intragastrically once a day for consecutive 7 days. Cerebral infarction area, activity of SOD and MPO, content of MDA and IL-6 were all determined. **RESULTS:** Compared with model group, cerebral infarction area decreased significantly in Naokang oral liquid groups; the activity of SOD increased significantly while MPO activity, content of MDA and IL-6 decreased significantly ($P<0.01$ or $P<0.05$). **CONCLUSION:** Naokang oral liquid can reduce cerebral infarction area, increase the activity of SOD, and reduce the activity of MPO, MDA and IL-6 content, which may be one of the protective mechanisms of cerebral ischemic injury.

KEY WORDS Naokang oral liquid; Cerebral ischemia injury; Cerebral infarction area; SOD; MPO

后,各用药组小鼠状态较模型组有显著改善,表明芫菁不同提取物对实验性2型糖尿病模型具有较理想的降血糖效应,起效较温和,对小鼠糖尿病临床症状有一定改善作用。尤其在研究中发现,芫菁醚提取物高、低剂量组小鼠在用药过程中死亡率很低,小鼠精神状态较其它组更快改善,其原因尚不明确。此外,芫菁醚提取物和水提取物在改善脏器指数方面效果好于醇提取物,可能是由于所含药效成分差异所致,这也暗示不同提取组分的作用机制可能有所不同。

生化指标的检测显示,与模型组比较,各用药组小鼠血清MDA含量均显著减少($P<0.05$),部分用药组小鼠血清SOD活力显著增加($P<0.01$ 或 $P<0.05$),提示芫菁不同提取物均具有降血糖、抗氧化、降血脂的作用,其作用机制可能与抗氧化,减轻STZ对胰岛B细胞损伤或促进已损伤的B细胞的修复有关。

本研究通过芫菁不同提取物对2型糖尿病模型小鼠的降

血糖作用研究,为深入研究高原植物芫菁的药用资源提供了平台,对进一步开发高原藏药资源具有重要意义。

参考文献

- [1] 彭彤,梁慧,郭亦然,等.芫菁根挥发油化学成分的气相色谱-质谱联用分析[J].时珍国医国药,2009,20(12):3 000.
- [2] 洪丽莉,许冠荪,申国明,等.SD大鼠2型糖尿病模型的建立[J].中国比较医学杂志,2005,15(6):379.
- [3] 周迎生,高妍,李斌,等.高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征[J].中国实验动物学报,2005,13(3):154.
- [4] 郑素玲,陈超,武炜,等.链脲佐菌素诱导小鼠II型糖尿病模型的研究[J].动物医学进展,2010,31(7):60.
- [5] 朱愉.实验动物的疾病模型[M].1版.天津:科技翻译出版社,1997:252.
- [6] 原爱红,黄哲,马骏,等.桑叶黄酮的提取及其降糖作用的研究[J].中草药,2004,35(11):1 242.

(收稿日期:2012-02-13 修回日期:2012-06-08)

* 副主任药师。研究方向:医院药学、临床药学。电话:0514-87213036。E-mail:ns177982@sina.com

脑缺血损伤是继心脏病和癌症后的第三大致死疾病,其患病率、致残率和病死率都很高。脑缺血损伤后,由于脑部血液供应障碍,其缺血缺氧引起脑组织坏死、软化,表现为半身不遂、言语蹇涩或不语、口舌歪斜、偏身麻木等,甚至出现神志障碍,上述症状临床称为缺血性脑卒中或缺血性中风。目前,中风的药物治疗很少,惟一被美国食品与药品管理局(FDA)批准的治疗中风的药物是用于重新打开被阻塞血管的组织型纤溶酶原激活物,但其治疗时间窗窄,疗法只适合于极少患者。因此,寻找新的治疗药物已成为研究热点。

脑康口服液为武警江苏省总队医院自制制剂,主要用于瘀血阻络所致的眩晕、中风,症见肢体不利、言语不清及头晕目眩、脑动脉硬化、缺血性中风及脑出血后遗症见上述证候者,临床效果显著。本研究通过复制大鼠脑缺血性损伤模型,以深入探讨脑康口服液的作用机制,为临床更加合理地使用该药提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

Allegra 25R 型低温离心机(美国 Beckman 公司); UV-2102PCS 型紫外-可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司); DSX100 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); 电热恒温水浴锅(上海医疗器械三厂); GC-911-C 型放射免疫技术器(中国科技大学实业总公司); Multiskan MS 型酶标读数仪(芬兰 Labsystems 公司); JEDA801D 形态学分析系统软件(江苏省捷达科技发展有限公司)。

1.2 药品与试剂

脑康口服液(武警江苏省总队医院自制,批号:20110917,质量分数:5%); 超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)、白细胞介素(IL)-6 试剂盒(南京建成生物制品研究所); 尼莫地平(山东瑞阳制药有限公司,批号:20111106); 其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康 SD 大鼠 84 只, ♀ ♂ 兼用, 体质量(200 ± 20)g, 由南京医科大学实验动物中心提供[动物使用许可证号: SCXK(苏)2002-0031]。

2 方法

2.1 复制模型^[1-3]

参考文献方法复制脑缺血损伤模型。大鼠称质量, ip 10% 水合氯醛(350 mg/kg)。将大鼠仰卧固定, 颈部正中皮肤切口, 钝性分离皮下组织和肌肉, 在一侧的肩胛舌骨和胸锁乳突肌形成的三角处暴露出左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。用动脉夹夹闭 CCA 和 ICA, 在 ECA 残端距 CCA 分支约 3 mm 处剪开一小口, 由 ECA 向 CCA 分支插入直径为 0.20 mm 的尼龙线导入 ICA, 松开夹闭 ICA 的动脉夹, 尼龙线继续沿 ICA 颅内走向轻柔缓慢推进至有轻微阻力感后, 将尼龙线与 ECA 残端结扎, 松开 CCA, 缝合皮下筋膜及皮肤, 即为缺血模型, 缺血时间为 12 h。大鼠清醒后出现同侧 Horner 征及对侧前肢为重的偏瘫, 主要表现为右前肢

内收, 肩内旋, 提尾悬空时, 右前肢紧贴胸壁, 行走时向右侧旋转, 右侧肌张力下降, 存活到预定处死时间(12 h)为模型复制成功。假手术组只进行麻醉和血管分离术, 不结扎血管及导入栓线。

2.2 分组与给药

将 60 只复制成功的模型大鼠均分为模型(等容生理盐水)、尼莫地平(8 mg/kg)与脑康口服液高、中、低剂量(8、4、2 g/kg)组。ig 给药, 每天 1 次, 连续 7 d。末次给药后复制脑缺血损伤模型。另设空白对照组(等容生理盐水)和假手术组(等容生理盐水), 各 12 只大鼠。

2.3 指标的测定

2.3.1 脑梗死面积的测定 复制模型 12 h 后, 每组取 6 只大鼠, 断头取脑, 除去小脑和低位脑干、嗅球。将脑沿冠状面切成厚度基本相同的 6 片, 脑片置于 3 ml 质量分数为 2% 的 TTC 溶液中, 37 °C 避光振荡孵育 20 min, 发现大鼠正常脑组织呈红色, 脑梗死组织呈白色, 拍照。以形态学分析系统软件求出梗死面积占脑片总面积的百分比。

2.3.2 SOD、MPO 活性和 MDA、IL-6 含量的测定 复制模型 12 h 后, 每组取 6 只大鼠, 断头处死, 立即在冰浴上取出损伤侧的大脑皮层, 去除嗅脑、小脑和低位脑干, 称质量, 按 1:9 (m/V) 比例在 4 °C 冰浴下匀浆, 制成 10% 脑组织匀浆, 匀浆液在 4 °C 下 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液按试剂盒说明书测定 SOD、MPO 活性和 MDA、IL-6 含量。SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法测定; MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定; MPO 活性、IL-6 含量采用酶联免疫吸附法进行测定。

3 结果

3.1 脑康口服液对模型大鼠脑梗死面积形成率的影响

空白对照组和假手术组梗死面积均为 0。与假手术组比较, 模型组大鼠脑梗死面积形成率显著增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 脑康口服液高、中、低剂量组大鼠脑梗死面积形成率显著减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。大鼠脑梗死面积形成率的测定结果见表 1。

表 1 大鼠脑梗死面积形成率的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	n	梗死面积形成率, %
空白对照组		6	0
假手术组		6	0
模型组		6	45.21 ± 3.79*
尼莫地平组	8 mg/kg	6	30.47 ± 3.04#
脑康口服液高剂量组	8 g/kg	6	16.78 ± 2.63##
脑康口服液中剂量组	4 g/kg	6	24.37 ± 2.95##
脑康口服液低剂量组	2 g/kg	6	29.13 ± 4.07#

与假手术组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

vs. sham operation group: * $P < 0.01$; vs. model group: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3.2 脑康口服液对模型大鼠大脑皮层 SOD 活性和 MDA 含量的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠大脑皮层 SOD 活性显著减

弱,MDA含量显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,脑康口服液高、中、低剂量组大鼠大脑皮层SOD活性显著增强,MDA含量显著减少($P<0.01$)。SOD活性和MDA含量的测定结果见表2。

表2 SOD活性和MDA含量的测定结果($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab 2 Determination of SOD activity and MDA content ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量	n	SOD, U/kg	MDA, $\mu\text{mol/L}$
空白对照组		6	175.67 \pm 12.38	1.94 \pm 0.23
假手术组		6	174.15 \pm 11.43	1.92 \pm 0.18
模型组		6	140.15 \pm 10.44*	2.91 \pm 0.72*
尼莫地平组	8 mg/kg	6	160.09 \pm 13.07 [#]	2.30 \pm 0.64 [#]
脑康口服液高剂量组	8 g/kg	6	164.32 \pm 10.85 ^{##}	2.17 \pm 0.35 ^{##}
脑康口服液中剂量组	4 g/kg	6	156.69 \pm 11.05 ^{##}	2.36 \pm 0.40 ^{##}
脑康口服液低剂量组	2 g/kg	6	146.94 \pm 12.46 [#]	2.57 \pm 0.31 [#]

与假手术组比较: * $P<0.01$;与模型组比较: [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

vs. sham operation group: * $P<0.01$; vs. model group: [#] $P<0.05$,

^{##} $P<0.01$

3.3 脑康口服液对模型大鼠大脑皮层MPO活性和IL-6含量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠大脑皮层MPO活性显著增强,IL-6含量显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,脑康口服液高、中、低剂量组大鼠大脑皮层MPO活性显著减弱,IL-6含量显著减少($P<0.01$)。MPO活性和IL-6含量的测定结果见表3。

表3 MPO活性和IL-6含量的测定结果($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab 3 Determination of MPO activity and IL-6 content ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量	n	MPO, $\mu\text{U/g}$	IL-6, pg/ml
空白对照组		6	104 \pm 15	48.37 \pm 3.04
假手术组		6	109 \pm 13	50.11 \pm 3.12
模型组		6	382 \pm 48*	115.56 \pm 9.46*
尼莫地平组	8 mg/kg	6	245 \pm 46 [#]	87.54 \pm 7.06 [#]
脑康口服液高剂量组	8 g/kg	6	187 \pm 23 ^{##}	80.42 \pm 7.25 ^{##}
脑康口服液中剂量组	4 g/kg	6	246 \pm 25 ^{##}	92.16 \pm 8.38 ^{##}
脑康口服液低剂量组	2 g/kg	6	294 \pm 37 [#]	98.44 \pm 7.63 [#]

与假手术组比较: * $P<0.01$;与模型组比较: [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

vs. sham operation group: * $P<0.01$; vs. model group: [#] $P<0.05$,

^{##} $P<0.01$

4 讨论

脑康口服液由三七、红花、石菖蒲、川芎、当归、天麻、泽泻、枸杞子、刺五加、山楂共10味药材制成。其中,三七止血、散血、定痛;红花活血通经、散瘀止痛;川芎活血行气、祛风止痛,共为主药。石菖蒲化湿开胃、开窍豁痰、醒神益智;当归补血活血、调经止痛、润肠通便;天麻息风止痉、平肝潜阳、祛风通络;泽泻利水渗湿、泄热通淋;枸杞子养肝、滋肾、润肺;刺五加祛风湿、补肝肾、强筋骨、活血脉;山楂消食健胃、活血化痰、收敛止痢,共为佐使之药。

脑梗死面积是脑缺血损伤中一个重要指标。本研究中,高、中、低剂量脑康口服液可减少模型大鼠脑梗死面积。缺血可使自由基急剧生成,而神经元对自由基尤为敏感。目前已

知自由基引发的脂质过氧化反应是缺血性脑损伤的重要机制之一,因此正确应用抗氧化药物可保护神经细胞免受损伤。有研究表明,SOD能够清除超氧自由基,其活性能间接反映机体清除自由基的能力。MDA是脂质过氧化反应的代谢产物,其含量间接反映细胞受自由基攻击的脂质过氧化程度^[4-5]。本研究中,高、中、低剂量脑康口服液可增强模型大鼠SOD活性,降低MDA含量。有研究表明,炎症反应促进了脑缺血损伤的发展,也限制了急性卒中溶栓治疗的疗效。中性粒细胞的黏附和浸润是脑缺血后炎症反应的核心。MPO是中性粒细胞中嗜天青颗粒产生的一种重要的过氧化物酶,可作为中性粒细胞的特异性标记物,利用其使过氧化氢还原可分析该酶的活动,既可定量测定中性粒细胞的数目,反映中性粒细胞的浸润情况,又可定量反映炎症损伤的程度。在炎症反应过程中,IL-6是一种重要的抗炎症细胞因子,可通过抑制促炎症细胞因子IL-1和肿瘤坏死因子(TNF)- α 的合成,对抗IL-1和TNF- α 所致的炎症损伤;可诱导肾上腺皮质激素的产生,控制炎症反应的多个环节^[6-7]。本研究中,高、中、低剂量的脑康口服液可减弱模型大鼠MPO活性,降低IL-6含量。

本研究结果表明,脑康口服液可降低模型大鼠脑梗死面积,升高SOD活性,降低MPO活性和MDA、IL-6含量,这可能是其抗脑缺血损伤的机制之一。

参考文献

- [1] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84.
- [2] Wei X, Liu H, Sun X, et al. Hydroxysafflor yellow A protects rat brains against ischemia-reperfusion injury by antioxidant action[J]. *Neurosci Lett*, 2005, 386(1):58.
- [3] 戴炯, 文立. 改良线栓法制备大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型[J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2007, 27(10):1218.
- [4] Nakashima M, Niwa M, Iwai T, et al. Involvement of free radicals in cerebral vascular reperfusion injury evaluated in a transient focal cerebral ischemia model of rat[J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(5/6):722.
- [5] Mollace V, Iannone M, Muscoli C, et al. The protective effect of M40401, a superoxide dismutase mimetic on post-ischemic brain damage in Mongolian gerbils[J]. *BM-C Pharmacol*, 2003(3):8.
- [6] Dihne M, Block F. Focal ischemia induces transient expression of IL-6 in the substantia nigra pars reticulata[J]. *Brain Res*, 2001, 889(1/2):165.
- [7] Legos JJ, Whitmore RG, Erhardt JA, et al. Quantitative changes in interleukin proteins following focal stroke in the rat[J]. *Neurosci Lett*, 2000, 282(3):189.

(收稿日期:2012-09-19 修回日期:2012-12-02)