

田蓯苣对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织的保护作用研究[△]

马丽月^{1,2*}, 曾 诚^{1,2}, 郑瑞芳^{1,2}, 姜 雯¹, 何承辉², 邢建国^{2#}(1.新疆医科大学, 乌鲁木齐 830054; 2.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)20-2805-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.20.15

摘要 目的:研究田蓯苣(TIL)对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织的保护作用。方法:120只雄性SD大鼠随机分为假手术组(0.9%氯化钠溶液)、模型组(0.9%氯化钠溶液)、尼莫地平组(32 mg/kg)和TIL低、中、高剂量组(4、8、16 mg/kg),每组20只。灌胃相应药物,每天1次,连续7d,末次给药15 min后,以改良线栓法建立脑缺血再灌注损伤模型。进行大鼠神经功能缺损评分;计算大鼠脑梗死体积百分比;采用苏木精-伊红染色法观察大鼠脑组织病理形态学;检测大鼠脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、乳酸脱氢酶(LDH)活性和丙二醛(MDA)含量;采用Western blot法检测大鼠脑组织中降钙素基因相关肽(CGRP)、血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR₂)蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分显著升高($P<0.01$);脑组织梗死体积百分比显著升高($P<0.01$);脑组织神经细胞明显缩小变形,细胞间质水肿明显;脑组织中SOD、CAT活性均显著减弱,LDH活性显著增强,MDA含量显著增加,CGRP、VEGFR₂蛋白表达均显著增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,尼莫地平组 and TIL 中、高剂量组大鼠神经功能缺损评分均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);脑组织梗死体积百分比均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);脑组织上述病理改变均明显减轻;脑组织中SOD、CAT活性均显著增强,LDH活性均显著减弱,MDA含量均显著减少,CGRP、VEGFR₂蛋白表达均显著增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:TIL对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织具有一定保护作用,其机制可能与上调CGRP和VEGFR₂表达有关。

关键词 田蓯苣;脑缺血再灌注损伤;降钙素基因相关肽;血管内皮细胞生长因子受体2;保护作用

Protective Effects of Tilianin on Brain Tissue in Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Model Rats

MA Liyue^{1,2}, ZENG Cheng^{1,2}, ZHENG Ruifang^{1,2}, JIANG Wen¹, HE Chenghui², XING Jianguo² (1. Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. Xinjiang Uygur Autonomous Region Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of tilianin (TIL) on brain tissue in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. METHODS: Totally 120 male SD rats were randomly divided into sham operation group (0.9% sodium chloride solution), model group (0.9% sodium chloride solution), nimodipine group (32 mg/kg) and TIL low-dose and medium-dose, high-dose groups (4, 8, 16 mg/kg), with 20 rats in each group. The rats were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 7 d. 15 min after last medication, cerebral ischemia-reperfusion injury model was established by reforming suture-occluded method. The neurological deficit score in rats were evaluated, and percentage of cerebral infarction volume of rats was determined. Histopathological changes of brain tissue were observed by HE staining. The activities of SOD, CAT and LDH, MDA content in cerebral tissue of rats were determined. The expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and peripheral vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR₂) protein were determined by Western blot assay. RESULTS: Compared with sham operation group, neurological deficit score and percentage of cerebral infarction volume of model group were increased significantly ($P<0.01$); the nerve cells in brain tissue were significantly reduced and the interstitial edema was obvious. SOD and CAT activities were decreased significantly, LDH activity was increased significantly, MDA content was decreased significantly, protein expression of CGRP and VEGFR₂ were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, neurological deficit score of nimodipine group, TIL medium-dose and high-dose groups were decreased significantly; percentage of cerebral infarction volume was decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); above pathological conditions of cerebral tissue in rats were relieved significantly; SOD and CAT activities were strengthened significantly, MDA content and LDH activities were decreased significantly, protein

[△] 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81760045);新疆维吾尔自治区科技计划项目(No.201517109);新疆维吾尔自治区科技支疆项目(No.201591149)

* 硕士研究生。研究方向:中药药理学。E-mail:1395012936@qq.com

通信作者:研究员,博士生导师。研究方向:中药药理学。E-mail:xjguodd@163.com

expression of CGRP and VEGFR₂ were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: TIL has certain protective effects on cerebral ischemia-reperfusion injury model rats, and its mechanism may be related to the up-regulation of CGRP and VEGFR₂ expression.

KEYWORDS Tilianin; Cerebral ischemia-reperfusion injury; CGRP; VEGFR₂; Protection

田蓟苷(Tilianin, TIL)是新疆维吾尔药香青兰(*Dracocephalum moldavica* L.)的主要活性成分,属黄酮类化合物^[1]。研究表明,TIL对模型大鼠高血压、高血脂、动脉粥样硬化等病理状态均有显著改善作用,并对模型大鼠心肌缺血再灌注损伤有显著保护作用^[2-4],在心脑血管疾病的防治方面具有广阔的应用前景。

脑缺血再灌注损伤是脑卒中溶栓并发症之一,是指脑组织经过一定时间的缺血缺氧,待血液供应恢复后,过量的自由基攻击该部分重新获得血液供应的脑组织内的细胞造成的损伤^[5]。其过程是一个快速的级联反应,包括诸多环节,如炎症细胞浸润、能量代谢障碍、细胞凋亡、细胞水肿、自由基生成等^[6-7]。

本实验通过建立脑缺血再灌注损伤模型,考察不同剂量的TIL对模型大鼠神经功能缺损评分、脑梗死体积、脑组织病理形态学、脑组织中相关实验指标及降钙素基因相关肽(CGRP)和血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR₂)蛋白表达的影响,从促进血管新生的角度探讨TIL在模型大鼠脑缺血再灌注损伤过程中发挥的作用,为其进一步研究与应用奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

FluorChem HD2型化学发光凝胶成像系统(美国Alpha Innotech公司);Mini-protean 3型十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)仪(美国Bio-Rad公司);BS210S型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];Microfuge 22R型台式微量冷冻离心机(美国Beckman Coulter公司);HP Scanjet F2410型扫描仪(美国HP公司);JY92-II型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);SG-200型塑料薄膜封口机(上海凯鸣电子机械有限公司);620E型冰冻切片机(美国Thermo Fisher Scientific公司);CHK213型光学显微镜(日本Olympus公司);HY-2A型水浴恒温振荡器(金坛市医疗仪器有限公司);UV-2501PC型紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司);BCD-206STPA型冰箱(青岛海尔股份有限公司);Image Pro Plus 6图像分析系统(美国Media Cybernetics公司)。

1.2 药品与试剂

TIL(新疆维吾尔自治区药物研究所自制,批号:20170805,纯度:95%);尼莫地平(黑龙江天宏药业股份有限公司,批号:20160823,规格:60 mg/片);二喹啉甲酸法(BCA)蛋白定量试剂盒(批号:P1511)、放射免疫沉淀试验(RIPA)裂解缓冲液(批号:P0013B);5×蛋白上样缓冲液均购自北京普利莱基因技术有限公司;苏木精-伊红(HE)染色液(北京博奥森生物技术有限公司,批号:170609);超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(批号:20171205)、过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(批号:20171127)、乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(批号:20171105)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(批号:20171211)均购自南京建成生物工程研究所;2,3,5-氯

化三苯基四氮唑(TTC,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号:STY102);CGRP一抗(批号:ab47027)、VEGFR₂一抗(批号:ab461)均购自艾博抗(上海)贸易有限公司; β -actin一抗(批号:TA-09)、山羊抗兔二抗(批号:ZB-23011)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;电化学发光法(ECL)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0018);其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

SPF级SD大鼠,雄性,体质量220~260 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2012-0036。所有大鼠实验期间自由进食饮水。

2 方法

2.1 分组与给药

将120只大鼠随机分成6组,即假手术组(等体积0.9%氯化钠溶液)、模型组(等体积0.9%氯化钠溶液)、尼莫地平组(32 mg/kg)^[8]和TIL低、中、高剂量组(4、8、16 mg/kg)^[9],每组20只。各组大鼠均灌胃相应药物,每天1次,连续7 d,灌胃体积为1 mL/100 g。

2.2 造模

采用改良线栓法^[10]并略加改进以建立大脑中动脉阻断(MCAO)模型。末次给药15 min后,模型组、尼莫地平组和TIL低、中、高剂量组大鼠腹腔注射10%水合氯醛(0.35 mL/kg)进行麻醉,仰卧位固定于鼠板上,颈部正中切口,钝性分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。永久性结扎ECA和CCA的近心端,动脉夹临时夹闭ICA,CCA远心端结扎一道缝合线,勿扎紧。CCA接近ECA和ICA分叉处用眼科剪作一斜行细切口,插入顶端涂有硅胶的线栓,稍扎紧缝合线,松开动脉夹,推动线栓进入ICA,插入约0.8 cm时注意调整线栓方向,避免误入翼腭动脉,插入约1.8 cm时减慢插线速度,遇轻微阻力时即停止插线,此时MCAO模型建立。记录栓塞开始时间,缝合肌肉、皮肤,栓塞30 min后拔出线栓。假手术组大鼠除不插入线栓外,其余操作与各组相同。

2.3 大鼠神经功能缺损评分

大鼠清醒后进行第1次神经功能缺损评分,以评价模型是否建立成功,评价标准参考相关文献^[8,11],总分共21分。以>7~<13分为模型建立成功;剔除<7分或>13分者,并随机补充各组设计所需的大鼠数量。本实验建模成功率为50.73%。大鼠给药7 d后,进行第2次神经功能缺损评分。神经功能缺损评分细则见表1。

2.4 大鼠脑梗死体积百分比的计算

造模成功24 h后,大鼠腹腔注射1%水合氯醛(0.35 mL/kg)进行麻醉,而后处死,剥离脑组织,置于-20℃冰箱内急冻5 min后取出,放入脑槽中沿冠状面水平切7刀,取中间6片,每片厚约2 mm。将切片放入2% TTC染色液中,严格避光,置于37℃水浴箱中,每隔10 min摇动1次,30 min后取出。正常脑组织呈红色,梗死组织

表1 神经功能缺损评分细则

Tab 1 Detailed rules of neurological deficit score

评分项	行为	得分
提尾悬空实验(总分4分)	前肢伸直,无屈曲	0
	前肢屈曲	2
	前肢长期屈曲	3
	头向后30 s内偏离垂直轴	4
	大鼠在空旷平地上正常行走	0
Longa EZ实验(总分5分)	大鼠不能直线行走,前肢有屈曲	2
	大鼠向缺血侧侧转大圈	3
	大鼠向缺血侧侧转小圈	4
	大鼠不能行走	5
	将大鼠置于平衡木上,大鼠正常行走	0
平衡木实验(总分8分)	失足几率<50%	2
	失足几率>50%	4
	缺血对侧肢体从平衡木上垂落,但仍可行走	5
	不能行走,但可抱住平衡木	6
	不能抱住平衡木,放上即跌落	8
	视觉亚实验(总分2分)	将大鼠握于手中,使其前肢能自由伸展,从上方10 cm处逐渐靠近桌沿,大鼠前肢立即抓向桌沿
触觉亚实验(总分2分)	大鼠反应时间<2 s	1
	大鼠反应时间≥2 s	2
	将大鼠握于手中,将其眼睛蒙住,用物体触碰其胡须或前肢毛发,大鼠前肢立即抓向物体	0
	大鼠反应时间>4 s	2

呈白色。将脑组织切片置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h后取出,用图像分析系统计算大鼠脑组织的梗死体积、总体积并计算大鼠脑梗死体积百分比^[11-12](大鼠脑梗死体积百分比=脑组织切片总梗死体积/脑组织切片总体积×100%)。

2.5 大鼠脑组织病理形态学的观察

造模成功24 h后,按“2.4”项下方法取脑组织,以10%中性甲醛溶液固定24 h后依次经水洗、脱水、透明、包埋。由切片机连续切取6 μm的冠状脑组织切片,经脱蜡、水化、染色(HE)、脱水、封片后,置于光学显微镜下随机选取5个视野观察大鼠脑组织病理形态学。

2.6 大鼠脑组织中SOD、CAT、LDH活性和MDA含量的检测

造模成功24 h后,按“2.4”项下方法取脑组织,于冰上剪碎后加入适量冷RIPA裂解缓冲液后研磨匀浆,3 000 r/min离心10 min,取上清液,按试剂盒说明书,以紫外-可见分光光度计检测大鼠脑组织中SOD、CAT、LDH活性和MDA含量。

2.7 大鼠脑组织中CGRP和VEGFR₂蛋白表达的检测

采用Wester blot法检测CGRP和VEGFR₂蛋白表达。造模成功24 h后,按“2.4”项下方法取脑组织,分离右侧脑皮质,于冰上充分剥离白色梗死组织周边的组织,放入标识好的离心管中。加入RIPA裂解缓冲液(脑组织质量与裂解液体积比为1:7),匀浆,超声(功率:250 W,频率:50 kHz,下同)处理5 s,静置5 s,再超声处理1 min后以12 000 r/min离心30 min。取上清液,加入5×蛋白上样缓冲液以体积比1:4稀释,95℃变性10 min,电泳,转膜,以5%脱脂奶粉封闭2 h。加入一抗

(CGRP:1:1 000; VEGFR₂:1:500; β-actin:1:1 000),4℃放置过夜,加入山羊抗兔二抗(1:1 000),室温放置2 h。以ECL法显色,化学发光凝胶成像系统曝光,拍照。以目的条带与内参β-actin灰度值的比值表示蛋白表达强弱,进行半定量分析。

2.8 统计学方法

采用SPSS 16.0软件进行数据统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠神经功能缺损评分比较

与假手术组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,尼莫地平组 and TIL中、高剂量组大鼠神经功能缺损评分均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表2。

表2 各组大鼠神经功能缺损评分比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Comparison of neurological deficit scores among those groups($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,mg/kg	神经功能缺损评分
假手术组		0
模型组		10.50 ± 0.34 ^a
尼莫地平组	32	5.29 ± 0.67 ^{##}
TIL低剂量组	4	8.83 ± 0.31
TIL中剂量组	8	7.37 ± 0.56 [#]
TIL高剂量组	16	5.17 ± 0.45 ^{###}

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

Note: vs. sham operation group, ^a $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ 。

3.2 各组大鼠脑梗死体积百分比比较

与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死体积百分比显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,尼莫地平组 and TIL中、高剂量组大鼠脑梗死体积百分比均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见表3。

表3 各组大鼠脑梗死体积百分比比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab 3 Comparison of percentage of cerebral infarction volume among those groups($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量,mg/kg	脑梗死体积百分比,%
假手术组		0
模型组		27.96 ± 0.16 ^a
尼莫地平组	32	5.82 ± 0.04 ^{###}
TIL低剂量组	4	24.32 ± 0.11
TIL中剂量组	8	11.73 ± 0.16 [#]
TIL高剂量组	16	6.04 ± 0.08 ^{###}

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

Note: vs. sham operation group, ^a $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$ 。

3.3 各组大鼠脑组织病理形态学比较

假手术组大鼠脑组织形态结构正常,可见神经细胞

数量多,胞质丰富,细胞核大而圆,未见病理性损伤。模型组大鼠脑组织神经细胞明显缩小变形,细胞核固缩深染,核固缩呈三角形或不规则形状,部分胞核和胞质界限不清;细胞间质水肿明显,组织结构被破坏(疏松呈网状),染色浅淡,甚至在部分红染区域仅见到无明显结构的坏死组织。TIL低剂量组大鼠脑组织神经细胞排列紊乱无序,细胞核形态较模糊,有部分细胞体积变小,出现皱缩,部分细胞变性、坏死,细胞间质较疏松。尼莫地平组 and TIL中、高剂量组大鼠脑组织病理改变均明显减轻,细胞排列较整齐,细胞形态较正常,细胞层数略少,细胞核清晰,细胞质较饱满,仅可见少量不同程度被破坏的细胞,详见图1。

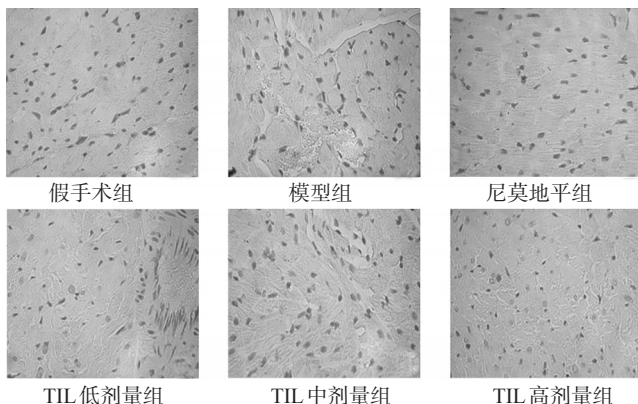


图1 各组大鼠脑组织病理形态学显微图(HE,×200)

Fig 1 Pathological micrographs of cerebral tissue in rats among those groups(HE,×200)

3.4 各组大鼠脑组织中SOD、CAT、LDH活性和MDA含量比较

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中SOD、CAT活性均显著减弱,LDH活性显著增强,MDA含量显著增加,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,尼莫地平组和TIL中、高剂量组大鼠脑组织中SOD、CAT活性均显著增强,LDH活性均显著减弱,MDA含量均显著减少,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见表4。

表4 各组大鼠脑组织中SOD、CAT、LDH活性和MDA含量比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab 4 Comparison of the activity of SOD, CAT, LDH and the contents of MDA in cerebral tissue of rats among those groups($\bar{x}\pm s, n=6$)

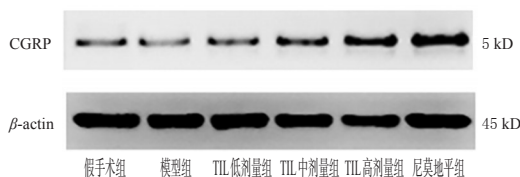
组别	剂量,mg/kg	SOD,U/mL	CAT,U/mL	LDH,U/mL	MDA,nmol/mL
假手术组		68.51±6.75	23.24±5.61	175.72±15.19	3.82±1.93
模型组		25.28±5.49 [△]	8.52±3.95 [△]	322.53±38.73 [*]	9.77±4.25 [*]
尼莫地平组	32	60.86±2.88 ^{##}	21.15±2.93 ^{##}	181.51±11.42 ^{##}	4.36±1.42 ^{##}
TIL低剂量组	4	33.18±5.75	10.37±2.52	294.57±28.55	8.57±4.51
TIL中剂量组	8	46.79±4.71 [*]	14.27±6.31 [*]	259.32±21.51 [*]	5.58±2.62 [*]
TIL高剂量组	16	62.33±3.59 ^{##}	20.82±3.08 ^{##}	183.34±19.75 ^{##}	4.28±1.76 ^{##}

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

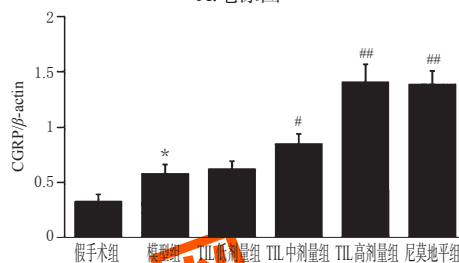
Note: vs. sham operation group, ^{*} $P<0.01$; vs. model group, [△] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

3.5 各组大鼠脑组织中CGRP和VEGFR₂蛋白表达比较

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织中CGRP、VEGFR₂蛋白表达均显著增强,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,尼莫地平组和TIL中、高剂量组大鼠脑组织中CGRP、VEGFR₂蛋白表达均显著增强,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见图2、图3。



A.电泳图



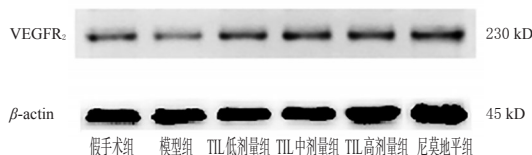
B.统计结果

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

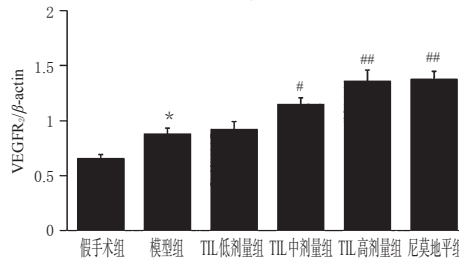
Note: vs. sham operation group, ^{*} $P<0.05$; vs. model group, [△] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

图2 各组大鼠脑组织中CGRP蛋白表达比较($n=6$)

Fig 2 Comparison of CGRP expression in cerebral tissue of rats among those groups($n=6$)



A.电泳图



B.统计结果

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

Note: vs. sham operation group, ^{*} $P<0.05$; vs. model group, [△] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

图3 各组大鼠脑组织中VEGFR₂蛋白表达比较($n=6$)

Fig 3 Comparison of VEGFR₂ expression in cerebral tissue of rats among those groups($n=6$)

4 讨论

脑缺血再灌注损伤模型动物脑部血液再灌注后,相关

细胞损害和形态学改变程度较再灌注前更加明显^[13-15]。本研究结果显示,8、16 mg/kg的TIL可有效改善模型大鼠脑组织病理形态学。

神经功能缺损评分是评价大鼠神经功能的指标,分值越低表明其神经功能越好。本研究结果显示,8、16 mg/kg的TIL可显著降低模型大鼠神经功能缺损评分,表明TIL有助于大鼠神经功能恢复。脑梗死体积百分比直观地反映了大鼠的梗死灶大小。本研究结果显示,8、16 mg/kg的TIL可显著降低模型大鼠脑梗死体积百分比,表明TIL有助于缺血后的康复。LDH是一种糖酵解酶,当组织细胞受损时,LDH活性会显著增强,这使得LDH成为评价组织损伤程度的有效指标^[13]。本研究结果显示,8、16 mg/kg的TIL可显著减弱模型大鼠脑组织中LDH的活性,表明TIL可以减轻脑组织损伤。CAT为一种过氧化氢分解酶,可保护细胞免受H₂O₂的伤害^[13]。本研究结果显示,8、16 mg/kg的TIL可显著增强模型大鼠脑组织中CAT的活性,避免脑组织损伤。SOD是机体内氧自由基的头号“杀手”,能将机体中有害的超氧阴离子自由基转化为过氧化氢,进而在其他酶的作用下转化成水和氧气^[14]。生物膜被攻击引发脂质过氧化反应,会产生大量脂质过氧化物,MDA是最典型的产物之一,其含量通常可作为机体脂质过氧化反应程度的一个指标,也能间接反映机体的受损程度^[14]。MDA的含量检测和SOD的活性检测通常同时进行,以便更好地评估组织的脂质过氧化损伤程度。本研究结果显示,8、16 mg/kg的TIL可显著增强模型大鼠脑组织中SOD的活性,减少MDA的含量,提示TIL具有抗氧化的脑保护作用。

目前研究表明,CGRP是一种广泛分布于中枢和外周神经系统中的辣椒素敏感感觉神经的重要肽类递质,具有增加脑血流量和神经保护双重功能,可促进血管生成^[16-18]。同时,促进血管新生最主要的体液因子为血管内皮细胞生长因子(VEGF),其在体外可促进内皮细胞增生,在体内可诱导血管生成,同时还可促进单核细胞、中性粒细胞的迁移,并参与脑缺血性损伤的炎症反应^[19]。VEGF受体主要包括VEGFR₁、VEGFR₂和VEGFR₃等,其中VEGFR₂是血管内皮细胞上的主要受体类型,是血管形成的主要调控因子,与血管形成和生长密切相关^[20]。因此,推测CGRP和VEGFR₂可能在血管新生的早期发挥关键性作用,是整个脑缺血后血管新生调控的中心环节。大鼠脑缺血再灌注损伤发生时,机体产生应激性反应,CGRP和VEGFR₂蛋白表达均增强,但这种自我修复能力有限,不足以改善脑缺血预后。本研究结果显示,8、16 mg/kg的TIL可显著增强模型大鼠脑组织中CGRP和VEGFR₂蛋白表达,说明TIL具有促进内源性血管新生的作用。

综上所述,TIL对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织具有一定保护作用,其机制可能与上调CGRP和VEGFR₂表达有关。

参考文献

- [1] TAN MM, HE CH, JIANG W, et al. Development of solid lipid nanoparticles containing total flavonoid extract from *Dracocephalum moldavica* L. and their therapeutic effect against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12(4): 3253-3265.
- [2] 郭新红, 曹文疆, 樊鑫梅, 等. 田蓟苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(5): 168-171.
- [3] 曹文疆, 彭克军, 袁勇, 等. 田蓟苷对大鼠血脂水平和炎症因子的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(11): 164-167.
- [4] WANG Y, REN Q, ZHANG X, et al. Neuroprotective mechanisms of calycosin against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(2): 537-546.
- [5] MERETOJA A, TATLISUMA K. Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke-basic concepts[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2006, 4(1): 31-44.
- [6] 舒庆, 郑其萍. 金丝桃苷抗心/脑缺血损伤作用的药理学研究进展[J]. *中国药房*, 2016, 27(10): 1415-1417.
- [7] TAOUFIK E, PROBERT L. Ischemic neuronal damage[J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(33): 3565-3573.
- [8] 王向慧, 王迪. 尼莫地平对大鼠急性脑缺血再灌注损伤NF- κ B和Caspase-3蛋白表达的影响[J]. *中国生化药物杂志*, 2015, 35(1): 10-13.
- [9] ZENG C, JIANG W, ZHENG R, et al. Cardioprotection of tiliarin ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury: role of the apoptotic signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0193845.
- [10] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [11] CHEN JL, LI Y, WANG L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(4): 1005-1011.
- [12] BEDERSON JB, PITTS LH, GERMANO SM, et al. Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats[J]. *Stroke*, 1986, 17(6): 1304-1308.
- [13] 黎丹东, 谢国旗, 高延玲, 等. 清脑片对大鼠脑缺血再灌注损伤的预防作用[J]. *中国药房*, 2017, 28(16): 2198-2201.
- [14] ZHANG Y, LI YW, WANG YX, et al. Remifentanyl preconditioning alleviating brain damage of cerebral ischemia reperfusion rats by regulating the JNK signal pathway and TNF- α /TNFR1 signal pathway[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(12): 6997-7006.
- [15] AI J, WAN H, SHU M, et al. Guhong injection protects against focal cerebral ischemia-reperfusion injury via anti-inflammatory effects in rats[J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40(5): 610-622.

HPLC法同时测定三味龙胆花片中马钱苷酸和异金雀花素的含量^Δ

艾悦言^{1*}, 赵学勇^{2#}, 付林¹, 卞晓莲², 古锐¹, 张静波², 南措¹, 西绕娜姆¹(1.成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137; 2.宇妥藏药股份有限公司, 四川红原 624400)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)20-2810-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.20.16

摘要 目的:建立同时测定三味龙胆花片中马钱苷酸、异金雀花素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil ODS-3,流动相为甲醇-0.2%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为240 nm,柱温为30℃,进样量为10 μL。结果:马钱苷酸和异金雀花素进样量线性范围分别为0.040 08~4.008 0 μg($r=0.999\ 9$)、0.021 96~2.196 0 μg($r=0.999\ 9$);定量限分别为0.160 32、0.087 8 ng/mL,检测限分别为0.080 16、0.043 92 ng/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%;加样回收率分别为103.07%~104.26%(RSD=0.52%, $n=6$)、95.57%~99.61%(RSD=1.55%, $n=6$)。结论:该方法简便、精确,可用于同时测定三味龙胆花片中马钱苷酸和异金雀花素的含量。

关键词 高效液相色谱法;三味龙胆花片;马钱苷酸;异金雀花素;含量测定

Simultaneous Determination of Loganic Acid and Isoscoparin in Sanwei Longdanhua Tablets by HPLC

AI Yueyan¹, ZHAO Xueyong², FU Lin¹, BIAN Xiaolian², GU Rui¹, ZHANG Jingbo², Nancuo¹, Xiraonamu¹(1. School of Ethnomedicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Yutuo Tibetan Pharmaceutical Co., Ltd., Sichuan Hongyuan 624400, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of loganic acid and isoscoparin in Sanwei longdanhua tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Inertsil ODS-3 column with mobile phase consisted of methanol-0.2% phosphoric acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 240 nm, and column temperature was 30 °C. The sample size was 10 μL. RESULTS: The linear range were 0.040 08-4.008 0 μg ($r=0.999\ 9$) for loganic acid and 0.021 96-2.196 0 μg ($r=0.999\ 9$) for isoscoparin. The quantitative limits were 0.160 32 and 0.087 8 ng/mL, and detection limits were 0.080 16 and 0.043 92 ng/mL. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The recoveries were 103.07%-104.26% (RSD=0.52%, $n=6$) and 95.57%-99.61% (RSD=1.55%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and suitable for simultaneous determination of loganic acid and isoscoparin in Sanwei longdanhua tablets.

KEYWORDS HPLC; Sanwei longdanhua tablets; Loganic acid; Isoscoparin; Content determination

三味龙胆花片为国药准字藏药,处方中主要含白花龙胆、甘草等,具有清热、润肺的作用,可用于肺热气喘

和咽喉炎等症的治疗。该制剂在国家食品药品监督管理局标准中已有含量测定项目,但仅以甘草有效成分甘

[16] 陈丹丹,谢晓芳,万峰,等. 氢溴酸樟柳碱对急性脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织细胞凋亡及ERK1/2磷酸化水平的影响[J]. 中国药房,2017,28(28):3907-3910.

[17] CHEN W, WEI S, YU Y, et al. Pretreatment of rats with increased bioavailable berberine attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury via down regulation of adenosine-5' monophosphate kinase activity[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 779(5):80-90.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603395);四川省第一批科技计划项目(No.2016FZ0044);成都中医药大学科技发展基金课题(No.CGPY1604)

* 硕士研究生。研究方向:中药化学。E-mail:972177255@qq.com

通信作者:实习研究员,硕士。研究方向:植物药新药开发。E-mail:398087968@qq.com

col,2016,779(5):80-90.

[18] LIU Z, LIU Q, CAI H, et al. Calcitonin gene-related peptide prevents blood-brain barrier injury and brain edema induced by focal cerebral ischemia reperfusion[J]. *Regul Pept*, 2011, 171(1/2/3):19-25.

[19] 余晴晴,柏建峰,王江军. 当归补血汤对脑缺血再灌注损伤大鼠血管新生及Ang-1、Ang-2、VEGF和Tie-2的影响[J]. 国际医药卫生导报,2017,23(9):29-33.

[20] ZHANG X, CHEN XP, LIN JB, et al. Effect of enriched environment on angiogenesis and neurological functions in rats with focal cerebral ischemia[J]. *Brain Research*, 2017(1655):176-185.

(收稿日期:2018-01-08 修回日期:2018-03-06)

(编辑:张静)