

# 藏药七十味珍珠丸灌胃给予脑缺血再灌注损伤模型大鼠的量-时-效关系研究<sup>△</sup>

梁源<sup>1\*</sup>, 付珂<sup>1</sup>, 王张<sup>2#</sup>, 孙位军<sup>1</sup>, 徐文龙<sup>1</sup>, 贾晓静<sup>2</sup>, 胥培艳<sup>2</sup>, 陈璐<sup>2</sup>(1.成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2.成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137)

中图分类号 R285.5; R931.71 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)01-0094-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.01.20

**摘要** 目的:研究七十味珍珠丸治疗大鼠脑缺血再灌注损伤的量-时-效关系。方法:将大鼠随机分为假手术组(生理盐水, 10 mL/kg)、模型对照组(生理盐水, 10 mL/kg)、阳性对照组(尼莫地平, 30 mg/kg)、七十味珍珠丸不同剂量组(0.52、1.04、2.08、4.17、8.33、16.67、33.34、66.68、133.36、266.72、533.44 mg/kg), 每组18只, 各组大鼠灌胃相应药物1次;灌胃25 min后, 除假手术组外, 其余各组大鼠均用线栓法制造脑缺血再灌注损伤模型。脑缺血24、48、72 h后, 对各组大鼠进行神经行为学评级, 检测大鼠脑梗死率以评价脑缺血各时段七十味珍珠丸的最佳有效时间点、最佳给药剂量( $D_{max}$ )和最大效应(最小脑梗死率,  $E_{max}$ ), 然后采用 Thermo Kinetic 5.1 软件对七十味珍珠丸给药剂量与脑梗死率进行量-时-效关系拟合, 计算量效曲线下面积(AUClast)、滞留剂量(MRTlast);并检测各组大鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的水平。结果:与假手术组比较, 模型组大鼠神经行为显著异常( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 脑梗死率明显增加( $P < 0.01$ ), 大鼠血清中SOD水平显著降低( $P < 0.01$ , 48 h), MDA水平显著升高( $P < 0.05$ , 48 h)。与模型对照组比较, 尼莫地平组神经行为异常无显著变化( $P > 0.05$ ), 脑梗死率显著降低( $P < 0.01$ , 24、48 h), 大鼠血清中SOD水平显著升高( $P < 0.01$ , 48 h), MDA水平显著降低( $P < 0.05$ , 48 h);七十味珍珠丸2.08~33.34 mg/kg剂量组神经行为异常显著改善( $P < 0.05$ , 24 h);脑缺血24 h, 七十味珍珠丸4.17~133.36 mg/kg剂量组脑梗死率均显著降低(以33.34 mg/kg剂量组最低,  $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 33.34~533.44 mg/kg剂量组大鼠血清中SOD水平均显著升高( $P < 0.05$ ), 0.52~2.08、8.33、33.34、266.72、533.44 mg/kg剂量组MDA水平均显著降低( $P < 0.05$ ),  $D_{max}$ 为33.34 mg/kg,  $E_{max}$ 为3.02%, AUClast为5 141.76 mg/kg, MRTlast为329.161 mg/kg;脑缺血48 h, 七十味珍珠丸2.08~133.36 mg/kg剂量组脑梗死率均显著降低(以66.68 mg/kg剂量组最低,  $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 1.04~533.44(除4.17外) mg/kg剂量组大鼠血清中SOD水平均显著升高( $P < 0.05$ ), 15.67~66.68、533.44 mg/kg剂量组大鼠血清中MDA水平均显著降低( $P < 0.05$ ),  $D_{max}$ 为66.68 mg/kg,  $E_{max}$ 为2.13%, AUClast为5 219.36 mg/kg, MRTlast为340.521 mg/kg;脑缺血72 h, 七十味珍珠丸各剂量组脑梗死率、MDA水平均无显著降低( $P > 0.05$ ), SOD水平均无显著升高(除0.52 mg/kg剂量组外,  $P > 0.05$ )。结论:七十味珍珠丸治疗大鼠脑缺血再灌注损伤的最佳有效时间点为48 h,  $D_{max}$ 为66.68 mg/kg, 其改善机制可能与增强SOD水平、降低MDA水平有关。

**关键词** 七十味珍珠丸; 脑缺血再灌注损伤; 量效关系; 时效关系; 脑梗死率

## Study on the Dose-time-effect Relationship of Tibetan Medicine Rannasangpei in Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Model Rats with Intragastric Administration

LIANG Yuan<sup>1</sup>, FU Ke<sup>1</sup>, WANG Zhang<sup>2</sup>, SUN Weijun<sup>1</sup>, XU Wenlong<sup>1</sup>, JIA Xiaojing<sup>2</sup>, XU Peiyan<sup>2</sup>, CHEN Lu<sup>2</sup>(1. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China; 2. College of Ethnomedicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the dose-time-effect relationship of Tibetan medicine Rannasangpei in cerebral ischemic-reperfusion injury model rats with intragastric administration. METHODS: The rats were randomly divided into sham operation group (normal saline, 10 mL/kg), model control group (normal saline, 10 mL/kg), positive control group (nimodipine, 30 mg/kg), Rannasangpei different dose groups (0.52, 1.04, 2.08, 4.17, 8.33, 16.67, 33.34, 66.68, 133.36, 266.72 and 533.44 mg/kg), with 18 rats in each group. Each group was given relevant medicine intragastrically once; 25 min after intragastric administration, cerebral ischemic-reperfusion injury model was established with suture-occluded method in those groups except for

sham operation group. 24, 48, 72 h after cerebral ischemia, neuroethology of rats were graded in each group. The rate of cerebral infraction was detected to evaluate the optimal effective time, the optimal dose ( $D_{max}$ ) and maximal effect (the rate of minimum cerebral infraction,  $E_{max}$ ) of Ratnasangpi at different periods of cerebral ischemia. Dose-time-effect relationship of Rannasangpei dose with the rate of cerebral infraction was fitted with Thermo Kinetic 5.1 software. The

<sup>△</sup> 基金项目:中国博士后科学基金面上资助项目(No.2012M511916);四川省科技计划项目(No.2016JY0017);四川省中医药管理局科技专项(No.2012-E-040);成都中医药大学2015年度校基金立项课题(No.ZRQN1544)

\* 硕士研究生。研究方向:中药理论与应用。电话:028-61656141。E-mail:13548190660@163.com

# 通信作者:副研究员,博士。研究方向:民族药理学。电话:028-61656141。E-mail:wzcqcd@163.com

area under curve (AUClast) and retention dose (MRTlast) of dose-effect curve were calculated, and detect the levels of SOD and MDA. RESULTS: Compared with sham operation group, the neurobehavior of model group was significantly abnormal ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the rate of cerebral infarction was significantly increased ( $P < 0.01$ ); the level of SOD was decreased significantly ( $P < 0.01$ , 48 h), and the level MDA was increased significantly ( $P < 0.05$ , 48 h). Compared with model control group, there was no significant change in neurobehavioral abnormalities in the nimodipine group ( $P > 0.05$ ), and the rate of cerebral infarction was decreased significantly ( $P < 0.01$ , 24, 48 h). The level of SOD in rats were increased significantly ( $P < 0.01$ , 48 h), while the level MDA decreased significantly ( $P < 0.05$ , 48 h). Rannasangpei 2.08-33.34 mg/kg could significantly improved neurobehavioral abnormalities ( $P < 0.05$ , 24 h); 24 h after cerebral ischemia, the rate of cerebral infarction was decreased significantly in Rannasangpei 4.17-133.36 mg/kg group (the lowest is 33.34 mg/kg group,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The level of SOD in rats were increased significantly in 33.34-533.44 mg/kg groups ( $P < 0.05$ ). the level MDA was decreased significantly in 0.52-2.08, 8.33, 33.34, 266.72 and 533.44 mg/kg groups ( $P < 0.05$ ).  $D_{max}$  was 33.34 mg/kg,  $E_{max}$  was 3.02%, AUClast was 5 141.76 mg/kg and MRTlast was 329.161 mg/kg. 48 h after cerebral ischemia, the rate of cerebral infarction was decreased significantly in Rannasangpei 2.08-133.36 mg/kg groups (the lowest is 66.68 mg/kg group,  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), while the level of SOD was increased significantly in 1.04-533.44 (except for 4.17) mg/kg groups ( $P < 0.05$ ). The level of MDA was decreased significantly in 16.67-66.68, 533.44 mg/kg groups ( $P < 0.05$ ),  $D_{max}$  was 66.68 mg/kg,  $E_{max}$  was 2.13%, AUClast was 5 219.36 mg/kg and MRTlast was 340.521 mg/kg. 72 h after cerebral ischemia, the rate of cerebral infarction and the level of MDA had no significant decreased in Rannasangpei groups ( $P > 0.05$ ), and the levels of SOD had no significant increase (except for 0.52 mg/kg group,  $P > 0.05$ ). CONCLUSIONS: The optimal effective time of Rannasangpei for the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats is 48 h, and the  $D_{max}$  is 66.68 mg/kg. The improvement mechanism may be related to increase the level of SOD and decrease the level of MDA.

**KEYWORDS** Rannasangpei; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Dose-effect relationship; Time-effect relationship; Rate of cerebral infarction

中风严重危害人类的生命健康,其中缺血性中风占80%以上,最常见的是脑血栓或脑梗死<sup>[1-4]</sup>。现代医学认为缺血性脑损伤后,脑组织因供血、供氧不足引起神经细胞的凋亡和坏死<sup>[5]</sup>,破坏血脑屏障的完整性<sup>[6]</sup>,进而导致细胞膜产生脂质过氧化反应,其中丙二醛(MDA)作为脂质过氧化反应的产物,可间接地反映细胞损伤程度<sup>[6-7]</sup>。当MDA增多时超氧化物歧化酶(SOD)的消耗随之增加,活性显著下降<sup>[8]</sup>。

藏医将中风与中风后遗症统称为白脉病<sup>[9]</sup>,是由瘟疫病、毒病、热病等侵害导致。七十味珍珠丸始载于藏医经典著作《四部医典》,用于治疗黑白脉病、龙血不调、中风、瘫痪等疾病<sup>[5]</sup>;其说明书用法用量为重症患者每日1 g(1丸),一般患者每隔3~7 d服用1 g。由于七十味珍珠丸治疗的病种繁多,对于缺血性中风的治理,临床上既无特定的用量标准,亦不清楚最佳有效时间点(药物在体内治疗作用最佳的时间点)和最佳给药剂量,用法用量随意性大,容易增加不良反应的发生率。

本课题组前期对七十味珍珠丸的量效关系和时效关系分别进行了一些探索<sup>[6,10]</sup>,但是缺乏系统性和关联研究。故笔者在前期研究的基础上,系统研究七十味珍珠丸治疗大鼠脑缺血再灌注损伤的量-时-效关系,以期确定其最佳有效时间点和最佳给药剂量( $D_{max}$ ),为后期深入研究其作用机制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

BS-600L电子秤(上海有声衡器有限公司);BP121S

电子天平(德国赛多利斯仪器有限公司);V-1100D可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);TDZ5-WS低速离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);DZKW-4电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

七十味珍珠丸(西藏甘露藏药股份有限公司,批号:14049A、16044A,规格:1 g/丸);尼莫地平片(拜耳医药保健有限公司,批号:BJ17436、BJ30601,规格:30 mg/片);2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC,上海灵锦精细化工有限公司,批号:20160500);硫酸庆大霉素注射液(四川省长征药业股份有限公司,批号:20170704,规格:4 IU/mL);SOD、MDA试剂盒均购至南京建成生物工程研究所。

### 1.3 动物

SPF级SD大鼠336只,♂,体质量( $260 \pm 10$ ) g,购自四川省中医药科学院实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(川)2013-19。购入后自由饮水,饲养环境温度 $22 \sim 26$  °C。

## 2 方法

### 2.1 分组与给药

大鼠随机分为假手术组(生理盐水,10 mL/kg),模型组(生理盐水,10 mL/kg),阳性对照组(尼莫地平片,30 mg/kg,为成人临床日用剂量的5倍换算而得),七十味珍珠丸0.52、1.04、2.08、4.17、8.33、16.67、33.34、66.68、133.36、266.72、533.44 mg/kg剂量组(按照重症患者日用剂量的0.031 25、0.062 5、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16、

32倍换算而得)。各组大鼠均于手术前25 min灌胃给药1次。

## 2.2 造模

灌胃给药25 min后,参考文献方法<sup>[11]</sup>沿大鼠颈部正中线偏右作一切口分离右侧颈总动脉、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA)和翼腭动脉,在分叉处结扎ECA和翼腭动脉,于ECA远心端的结扎线和近心端的松结之间剪一小口,在自制挑针的辅助下将拴线插入到ICA,插入长度约20 mm,动脉阻断2 h后进行再灌注,然后缝合手术创口并消毒。假手术组仅在大鼠动脉处备线处理,不造模。术中保温(37±0.5)℃至大鼠清醒。

## 2.3 神经行为学评级

参考文献方法<sup>[12-13]</sup>在大鼠脑缺血24、48、72 h时对其神经行为学进行评级:Ⅰ级,无神经损伤症状;Ⅱ级,不能完全伸展左侧前爪;Ⅲ级,向左侧转圈;Ⅳ级,向左侧倾倒;Ⅴ级,不能自发行走,意识丧失。

## 2.4 脑梗死率测定和量-时-效关系拟合

大鼠脑缺血24、48、72 h时,各组随机选取6只大鼠麻醉,立即断头取全脑组织,滤纸吸干脑组织表面水分,称质量后将其置于-20℃冰箱中速冻20~30 min,用配好的1% TTC溶液染色30 min,分离梗死组织呈苍白色部分并称质量,然后计算脑梗死率(脑梗死率=脑梗死组织质量/脑组织质量×100%)。根据脑梗死率考察脑缺血24、48、72 h时有效剂量范围、最佳给药剂量(D<sub>max</sub>)、有效时间范围、最佳有效时间、最大效应(最小脑梗死率, E<sub>max</sub>)。然后采用Thermo Kinetica 5.1软件对脑缺血24、48、72 h时七十味珍珠丸各给药剂量与脑梗死率进行量效关系拟合,并计算相关参数,量效曲线下面积(AUClast)和滞留剂量(MRTlast)。

## 2.5 血清中SOD、MDA水平测定

大鼠缺血再灌注24、48、72 h后腹腔注射水合氯醛麻醉,腹主动脉采血5 mL,离心(3 500 r/min, 10 min)分离血清,取上清液,测定血清中SOD、MDA的水平,具体操作严格按相关试剂盒方法进行。

## 2.6 统计学方法

采用SPSS 21.0统计软件进行数据统计分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用*t*检验;等级资料采用非参数检验。*P*<0.05表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 神经行为学评级

与假手术组比较,模型对照组大鼠在24、48、72 h时均有明显的神经行为显著异常(*P*<0.05或*P*<0.01),表现为大鼠向左转圈,向左侧倾倒,左前脚不自然伸直等;与模型对照组比较,尼莫地平组大鼠的神经行为异常无显著变化(*P*>0.05);七十味珍珠丸2.08~33.34 mg/kg剂量组大鼠的神经行为异常显著改善(*P*<0.05, 24 h),七十味珍珠丸0.52 mg/kg剂量组大鼠的神经行为异常显

著改善(*P*<0.05, 48、72 h)。各组大鼠神经行为学评级见表1。

表1 各组大鼠神经行为学评级(*n*=6)

Tab 1 Neuroethologic grading of rats in each group (*n*=6)

组别	剂量, mg/kg	神经行为学评级																					
		24 h					48 h					72 h											
		-	I	II	III	IV	P值	-	I	II	III	IV	P值	-	I	II	III	IV	P值				
假手术组		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
模型对照组		0	2	4	0	0	0.002 <sup>##</sup>	1	2	3	0	0	0.007 <sup>##</sup>	2	3	1	0	0	0.021 <sup>#</sup>				
尼莫地平片组	30.00	0	2	3	1	0	0.715	0	3	1	2	0	0.445	0	3	2	1	0	0.101				
七十味珍珠丸组	0.52	0	3	3	0	0	0.575	0	0	5	1	0	0.045 <sup>*</sup>	0	1	5	0	0	0.023 <sup>#</sup>				
	1.04	1	4	1	0	0	0.057	0	3	3	0	0	0.789	0	4	2	0	0	0.116				
	2.08	0	3	3	0	0	0.014 <sup>*</sup>	1	1	4	0	0	0.523	0	3	3	0	0	0.665				
	4.17	1	4	1	0	0	0.041 <sup>*</sup>	0	5	1	0	0	0.865	0	5	1	0	0	0.932				
	8.33	0	2	4	0	0	0.014 <sup>*</sup>	2	2	2	0	0	0.118	0	5	1	0	0	0.527				
	16.67	1	5	0	0	0	0.075 <sup>*</sup>	0	6	0	0	0	0.859	1	5	0	0	0	0.652				
	33.34	1	4	1	0	0	0.018	0	4	2	0	0	0.248	1	4	1	0	0	0.923				
	66.68	2	4	0	0	0	1.000	2	4	0	0	0	0.495	0	6	0	0	0	0.338				
	133.36	3	2	1	0	0	0.075	1	3	1	1	0	0.523	3	1	2	0	0	0.338				
	266.72	2	4	0	0	0	0.575	0	5	1	0	0	0.652	3	2	1	0	0	0.116				
	533.44	2	3	1	0	0	0.075	0	3	3	0	0	0.789	0	3	3	0	0	0.206				

注:与假手术组比较,<sup>\*</sup>*P*<0.05,<sup>##</sup>*P*<0.01;与模型对照组比较,<sup>#</sup>*P*<0.05

Note: vs. sham operation group, <sup>\*</sup>*P*<0.05, <sup>##</sup>*P*<0.01; vs. model control group, <sup>#</sup>*P*<0.05

### 3.2 脑梗死率和量时-效关系结果

3.2.1 脑梗死率与假手术组比较,模型对照组大鼠脑梗死率显著增加(*P*<0.01),与模型对照组比较,尼莫地平片组大鼠脑梗死率显著降低(*P*<0.01, 24、48 h),脑缺血24 h时,七十味珍珠丸4.17~133.36 mg/kg剂量组大鼠脑梗死率均显著降低(*P*<0.05或*P*<0.01),有效剂量范围为4.17~133.36 mg/kg, D<sub>max</sub>为33.34 mg/kg, E<sub>max</sub>为3.02%;脑缺血48 h时,七十味珍珠丸2.08~133.36 mg/kg剂量组大鼠脑梗死率均显著降低(*P*<0.05或*P*<0.01),有效剂量范围为2.08~133.36 mg/kg, D<sub>max</sub>为66.68 mg/kg, E<sub>max</sub>为2.13%;脑缺血72 h时,七十味珍珠丸各剂量组脑梗死率均无显著降低(*P*>0.05)。由此可知有效时间范围为2~48 h,最佳有效时间点为脑缺血后48 h。各组大鼠脑梗死率结果详见表2。

3.1.2 量-时-效关系拟合 大鼠脑缺血24、48、72 h时,采用Thermo Kinetica 5.1软件对七十味珍珠丸各剂量与脑梗死率进行量-时-效关系的拟合,结果见图1。

大鼠脑缺血24 h时,七十味珍珠丸AUClast为5 141.76 mg/kg, MRTlast为329.161 mg/kg;大鼠脑缺血48 h时,七十味珍珠丸AUClast为5 219.36 mg/kg, MRTlast为340.521 mg/kg;大鼠脑缺血72 h时,七十味珍珠丸AUClast为5 680.20 mg/kg, MRTlast为304.295 mg/kg。

### 3.3 血清中SOD、MDA水平测定结果

3.3.1 SOD水平测定结果 与假手术组比较,模型对照组大鼠血清中SOD水平显著降低(*P*<0.01, 48 h);与模型对照组比较,尼莫地平片组大鼠血清中SOD水平显



表2 各组大鼠脑梗死率结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 2 Rate of cerebral infarction in rats of each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量,mg/kg	脑梗死率,%		
		24 h	48 h	72 h
假手术组		0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型对照组		18.96±4.71 <sup>##</sup>	17.64±4.38 <sup>##</sup>	13.03±4.78 <sup>##</sup>
尼莫地平片组	30.00	4.40±1.92 <sup>**</sup>	3.17±0.56 <sup>**</sup>	13.01±4.92
七十味珍珠丸组	0.52	18.61±3.46	15.38±2.53	14.72±7.07
	1.04	15.99±4.38	13.46±3.04	11.93±6.07
	2.08	14.39±2.25	11.92±1.69 <sup>*</sup>	12.47±3.08
	4.17	13.09±2.54 <sup>*</sup>	10.34±2.53 <sup>**</sup>	14.40±6.14
	8.33	8.31±5.09 <sup>**</sup>	6.18±1.87 <sup>**</sup>	11.39±6.92
	16.67	4.98±1.59 <sup>**</sup>	3.38±1.44 <sup>**</sup>	11.80±4.95
	33.34	3.02±0.62 <sup>**</sup>	2.15±0.59 <sup>**</sup>	9.18±6.95
	66.68	3.40±1.53 <sup>**</sup>	2.13±0.72 <sup>**</sup>	9.09±5.56
	133.36	3.03±1.44 <sup>**</sup>	2.14±0.54 <sup>**</sup>	7.72±5.23
	266.72	13.43±6.19	14.75±6.24	9.58±8.74
533.44	12.83±7.40	13.13±1.42	15.07±5.67	

注:与假手术组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与模型对照组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, <sup>##</sup> $P<0.01$ ; vs. model control group, <sup>\*</sup> $P<0.05$

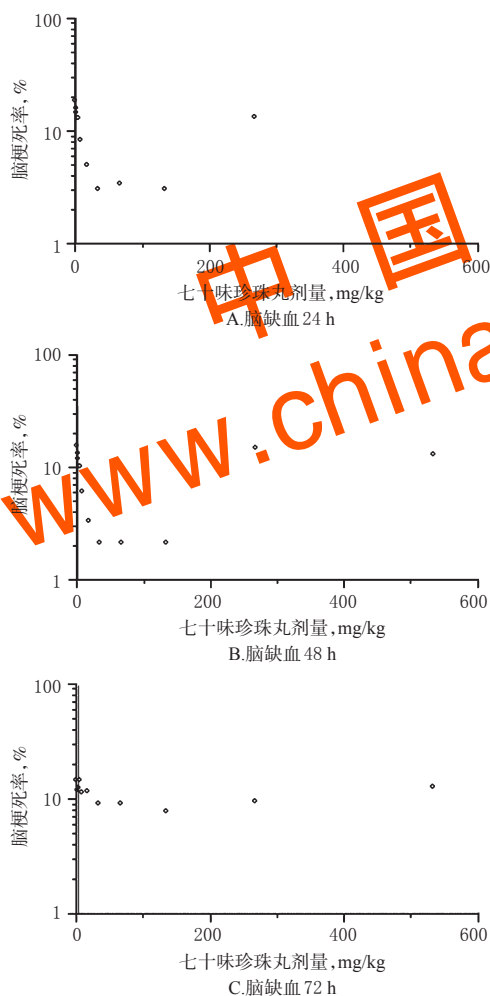


图1 七十味珍珠丸剂量-效应曲线散点图

Fig 1 Dose-effect curve scatter plot of Rannasangpei  
著升高( $P<0.01$ , 48 h);脑缺血 24 h,七十味珍珠丸

33.34~533.44 mg/kg 剂量组大鼠血清中SOD水平均显著升高( $P<0.05$ );脑缺血 48 h,1.04~533.44(除 4.17 外) mg/kg 剂量组大鼠血清中SOD水平均显著升高( $P<0.05$ );脑缺血 72 h,七十味珍珠丸各剂量组大鼠血清中SOD水平无显著升高(除 0.52 mg/kg 剂量组外, $P>0.05$ )。各组大鼠血清中SOD水平测定结果见表3。

表3 各组大鼠血清中SOD水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 3 Serum levels of SOD in rats of each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量,mg/kg	SOD水平,U/mL		
		24 h	48 h	72 h
假手术组		241.25±116.56	246.18±13.91	277.31±9.16
模型对照组		207.14±31.08	160.22±17.06 <sup>##</sup>	255.88±24.75
尼莫地平片组	30.00	286.73±64.01	211.28±14.40 <sup>**</sup>	278.80±9.14
七十味珍珠丸组	0.52	284.58±109.62	179.53±61.09	297.43±8.00 <sup>**</sup>
	1.04	267.13±100.90	183.31±15.73 <sup>*</sup>	274.64±10.59
	2.08	252.89±65.15	191.12±12.84 <sup>*</sup>	268.14±12.75
	4.17	242.77±88.60	205.40±65.46	269.34±24.07
	8.33	226.82±57.25	211.42±9.22 <sup>**</sup>	275.71±24.86
	16.67	219.87±67.15	224.04±41.98 <sup>**</sup>	276.13±23.37
	33.34	326.46±76.70 <sup>*</sup>	235.39±16.84 <sup>**</sup>	272.40±15.72
	66.68	306.76±57.66 <sup>**</sup>	236.69±15.55 <sup>**</sup>	262.38±27.34
	133.36	341.58±67.55 <sup>**</sup>	238.79±22.01 <sup>**</sup>	270.38±13.71
	266.72	302.77±20.26 <sup>**</sup>	299.69±8.83 <sup>**</sup>	248.41±24.88
533.44	302.25±4.80 <sup>**</sup>	303.64±6.14 <sup>**</sup>	275.04±13.30	

注:与假手术组比较,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与模型对照组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, <sup>##</sup> $P<0.01$ ; vs. model control group, <sup>\*</sup> $P<0.05$

33.2 MDA水平测定结果 与假手术组比较,模型对照组大鼠血清中MDA水平显著升高( $P<0.05$ , 48 h);与模型对照组比较,尼莫地平片组大鼠血清中MDA水平显著降低( $P<0.05$ , 48 h);脑缺血 24 h,0.52~2.08、8.33、33.34、266.72、533.44 mg/kg 剂量组大鼠血清中MDA水平均显著降低( $P<0.05$ );脑缺血 48 h,16.67~66.68、533.44 mg/kg 剂量组大鼠血清中MDA水平均显著降低( $P<0.05$ );脑缺血 72 h,七十味珍珠丸各剂量组大鼠血清中MDA水平均无显著降低( $P>0.05$ )。各组大鼠血清中MDA水平测定结果见表4。

#### 4 讨论

本课题组在前期<sup>[5]</sup>中探讨大鼠脑缺血 2、24 h时,七十味珍珠丸 0.52、1.04、2.08、4.17、8.33、16.67、33.34、66.68、133.36 mg/kg 9 个剂量组治疗大鼠脑缺血再灌注损伤的量效关系,但设置的时间点较少,不利于确定最佳有效时间点;在此基础上,本课题组又探讨了大鼠脑缺血 2、6、12、24、48、72 h时,剂量为 33.50 mg/kg 的七十味珍珠丸与大鼠脑缺血再灌注的时效关系<sup>[10]</sup>,由于仅设置 1 个剂量组,不利于明确最佳用药剂量及有效剂量范围。因此本研究在前期实验的基础上,系统研究七十味珍珠丸治疗大鼠脑缺血再灌注损伤的量-时-效关系。

表4 各组大鼠血清中MDA水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 4 Serum level of MDA in rats of each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量,mg/kg	MDA水平,mmol/mL		
		24 h	48 h	72 h
假手术组		6.03±0.99	6.09±0.52	4.18±1.11
模型对照组		6.97±1.01	7.24±0.90 <sup>a</sup>	4.29±1.15
尼莫地平片组	30.00	6.50±1.05	6.12±0.45 <sup>a</sup>	5.48±1.32
七十味珍珠丸组	0.52	4.81±0.48 <sup>a</sup>	7.06±0.89	4.70±1.27
	1.04	5.28±0.70 <sup>a</sup>	6.92±0.28	3.94±1.21
	2.08	4.80±0.85 <sup>a</sup>	6.52±0.46	4.23±1.44
	4.17	6.14±0.72	6.39±0.47	5.98±4.80
	8.33	5.24±0.64 <sup>a</sup>	6.26±0.57	5.77±2.05
	16.67	5.62±0.84	6.14±0.32 <sup>a</sup>	4.07±0.50
	33.34	4.10±2.06 <sup>a</sup>	6.02±0.72 <sup>a</sup>	3.68±0.86
	66.68	6.18±0.80	6.07±0.35 <sup>a</sup>	3.89±0.83
	133.36	5.93±0.20	6.00±0.51 <sup>a</sup>	5.98±3.00
	266.72	5.14±0.96 <sup>a</sup>	5.96±1.31	5.21±3.36
533.44	5.16±1.08 <sup>a</sup>	5.05±1.22 <sup>a*</sup>	4.63±1.26	

注:与假手术组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>##</sup> $P<0.01$ ;与模型对照组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ ; vs. model control group, <sup>\*</sup> $P<0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P<0.01$

本次研究结果发现,七十味珍珠丸可不同程度地改善脑缺血再灌注损伤大鼠的神经行为学异常;由大鼠脑缺血24、48、72 h时的脑梗死率可知七十味珍珠丸治疗脑缺血再灌注损伤模型大鼠的有效剂量范围为2.08~133.36 mg/kg,最佳给药剂量为66.68 mg/kg,将七十味珍珠丸的脑梗死率有统计学意义的时间点作为有效时间,其有效时间范围为2~48 h,最佳有效时间点为48 h,由此也说明七十味珍珠丸给药后具有缓释样效应。大鼠灌胃七十味珍珠丸的临床等效剂量为83.33 mg/kg(成人日用剂量的5倍),其在有效剂量范围内,证明了其临床用量的合理性;而有效时间范围2~48 h与临床给药时间不一致,临床上推荐每隔3~7 d给药1次,而本研究结果表明最佳有效时间点为48 h,即每隔2 d给药1次,由此建议临床上可每隔2 d服药1次。

脑缺血再灌注损伤的发病机制尚未阐明,但氧自由基学说引起了人们的重视<sup>[14]</sup>。在发生脑缺血再灌注时,神经细胞重新获得供氧,在脑组织缺血、缺氧得到缓解的同时会产生大量的自由基,加重脑组织损伤<sup>[15-16]</sup>。本研究结果显示,脑缺血24、48、72 h时,七十味珍珠丸可增加大鼠血清中SOD的活性;脑缺血24、48 h时,七十味珍珠丸可降低大鼠血清中MDA的活性,由此表明七十味珍珠丸对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织具有保护作用。

综上所述,七十味珍珠丸能改善脑缺血再灌注损伤模型大鼠的神经行为学异常,降低大鼠的脑梗死率,其改善机制可能与增强SOD活性、降低MDA水平有关。七十味珍珠丸治疗大鼠脑缺血再灌注损伤的有效剂量范围为2.08~133.36 mg/kg,最佳给药剂量为66.68 mg/kg;有效时间范围为2~48 h,最佳有效时间点为48 h,本实

验结果也可为后期深入研究七十味珍珠丸对血脑屏障的相关作用提供参考。

### 参考文献

- [1] HU X, DE SILVA TM, CHEN J, et al. Genetic cerebral vascular disease and neurovascular injury in ischemic stroke[J]. *Circ Res*, 2017, 120(3):449-471.
- [2] 汤海波,章剑,朱爱萍,等. 2012—2015年江阴市脑卒中发病率及类型分析[J]. *江苏预防医学*, 2017, 28(4):414-416.
- [3] 华俊.白果内酯对缺血性脑损伤的神经保护作用及其机制研究[D].南京:南京医科大学,2017.
- [4] 于秀华,周鸣,邓毅峰.脑心舒胶囊抗脑缺血作用研究[J]. *中国药房*, 2010, 21(35):3282-3284.
- [5] 徐文龙,孙位军,王张,等.七十味珍珠丸抗大鼠脑缺血再灌注损伤的量效关系研究[J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(1):10-15.
- [6] SCHMIDBUCHI S, HALFENS RJ, MULLER M, et al. Factors associated with supportive care needs of patients under treatment for breast cancer[J]. *Eur J Oncol Nurs*, 2013, 17(1):22-29.
- [7] 颜娟,郑茂东,崔玉环,等.大黄酚脂质体对脑缺血再灌注损伤小鼠体内抗氧化作用的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(3):703-704.
- [8] 洪森荣,尹明华.银杏叶提取物对缺血/再灌注小鼠脑细胞凋亡的保护作用[J]. *中草药*, 2007, 38(12):1864-1867.
- [9] 毛继祖.藏医诊疗秘诀[M].兰州:甘肃人民出版社,2000:184.
- [10] 梁未莹,黄春娟,王张,等.藏药七十味珍珠丸对线粒体致大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的时效关系初步研究[J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(1):182-187.
- [11] 王张,张艺,赵启鹏,等.灯盏细辛治疗脑缺血再灌注损伤的时-效关系初步研究[J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(2):62-64.
- [12] LONGA EZ, WEINSTEIN PR, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.
- [13] BEDERSON JB, PITTS LH, TSUJI M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(3):472-476.
- [14] 闫安,谢云亮.当归多糖对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织氧化应激水平及炎症因子表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2):123-127.
- [15] FISZER C, DOLBEAULT S, SULTAN S, et al. Prevalence, intensity, and predictors of the supportive care needs of women diagnosed with breast cancer: a systematic review[J]. *Psycho-Oncol*, 2014, 23(4):361-374.
- [16] CHEN SH, LIN MT, CHANG CP. Ischemic and oxidative damage to the hypothalamus may be responsible for heat stroke[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2013, 11(2):129-140.

(收稿日期:2018-08-07 修回日期:2018-11-01)

(编辑:唐晓莲)