论著

文章编号:1000-5404(2011)03-0290-04

珠子参水提物预处理对小鼠脑缺血再灌注损伤的影响

石孟琼[1],贺海波[2],覃宁玲[1],陈述威[1] (443002 湖北 宜昌,三峡大学医学院:基础医学实验中心[1],中药药理实验室[2])

【摘要】 **目的** 研究珠子参水提物预处理对小鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用。**方法** 雄性5周龄昆明小鼠170只,采用完全随机设计分组法分为6组:假手术组($n=20$)、模型组($n=30$)、尼莫地平组(2 mg/kg,$n=30$)和珠子参水提物低、中、高剂量组(2.5、5.0、10.0 g/kg,$n=30$)。除假手术组和模型组灌胃给予蒸馏水20 ml/kg外,其余各组灌胃给予相应剂量的药物。以上各组给药7 d后制作大鼠大脑中动脉闭塞模型,假手术组切开缝合不进行动脉阻塞,在缺血2 h再灌注24 h后进行行为学检测,记录各组小鼠存活率。取大脑并用2,3,5-三苯基氯化四氮唑染色后测定梗死面积和脑含水量;制作脑匀浆测超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、过氧化氢酶(CAT)、黄嘌呤氧化酶(XOD)酶活性和丙二醛(MDA)含量。**结果** 珠子参水提物中、高剂量组的成活率分别为77.8%(21/27)和82.1%(23/28),与模型组[51.9%(14/27)]比较具有统计学差异($P<0.05$);珠子参水提物高剂量组的神经症状评分(1.77±0.38)、斜板角度(63.6±5.5)°优于模型组[神经症状评分(2.21±0.43),斜板角度(55.1±7.5)°]($P<0.05$,$P<0.01$),与尼莫地平效果接近;与模型组比较,珠子参水提物中、高剂量组能显著降低脑梗死面积和脑含水量($P<0.05$,$P<0.01$),并能明显增加SOD、GSH-PX、CAT酶活性($P<0.01$),降低XOD酶活性和MDA含量($P<0.01$);高剂量组在改善GSH-PX、SOD和CAT酶及XOD酶活性方面优于尼莫地平组。**结论** 珠子参水提物预处理对小鼠局灶性脑缺血再灌注损伤具有明显的保护作用。

【关键词】 珠子参;局灶性脑缺血;再灌注;保护作用

【中图法分类号】 R282.71;R285.5;R743.31 **【文献标志码】** A

Effect of pretreatment with water extract from *Rhizoma Panacis majoris* on cerebral ischemia-reperfusion injury in mice

Shi Mengqiong[1], He Haibo[2], Qin Ningling[1], Chen Shuwei[1] ([1]Experimental Center of Basic Medicine, [2] Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmacology, Medical College of Three Gorges University, Yichang, Hubei Province, 443002, China)

【Abstract】 **Objective** To study the protective effect of water extract from *Rhizoma Panacis majoris* on cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury in mice. **Methods** Mice were divided into low dose (2.5 g/kg), medium dose (5.0 g/kg) and high dose (10.0 g/kg) *Rhizoma Panacis majoris* water extractive of *Rhizoma Panacis majoris* groups, nimodipine group and sham group respectively, after pretreating homologous drugs for 7 days. The mouse model of middle cerebral artery occlusion was induced, and neurological symptom scoring and inclined board testing were performed within 24 h after I/R. The survival rate, infarct volume and neuron density of mice were recorded. The levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA), xanthine oxidase (XOD) were measured. **Results** The survival rate was higher in medium and high dose groups than in model group (77.8% and 82.1% *vs* 51.9%, $P<0.05$). The neurological symptom score and inclined board degree were greater in high dose group than in model group (1.77±0.38 and 63.6±5.5 *vs* 2.21±0.43 and 55.1±7.5, $P<0.05$), which were similar to those in nimodipine group. The infarct size and water content were significantly lower in medium and high dose groups than in model group ($P<0.05$), which significantly increased the activity of SOD, GGSH-PX and CAT while decreased the activity of XOD and MDA level ($P<0.05$). The improvement in activity of SOD, GGSH-PX and CAT was better in high dose group than in nimodipine group. **Conclusion** Pretreatment of water extract from Panacis majoris rhizoma can significantly protect mice against cerebral I/R injury.

【Key words】 *Rhizoma Panacis majoris*; focal cerebral ischemia; reperfusion; protective effect

Corresponding author: He Haibo, Tel: 86-717-6396558, E-mail: shmq0212@126.com

【通信作者】 贺海波,电话:(0717)6396558,E-mail:shmq0212@126.com

珠子参(*Rhizoma Panacis majoris*)为五加科植物珠子参或羽叶三七的干燥根茎,为我国传统益气活血中药。其化学成分主要为皂苷类(珠子参苷、竹节参苷、人参皂苷、齐墩果酸、β-谷甾醇等),其次为多糖、倍半萜类以及人体必需微量元素(如 Fe、Cu、Zn、Mn、Ni、Co、Mo 等)[1-2]。现代药理学研究显示,珠子参具有较广泛的药理作用,对心血管系统、血液及造血系统、免疫系统、肿瘤等均有作用,其主要成分珠子参总皂苷类化合物除具有强心、扩张血管、保护心肌缺血性损伤外,还可抑制钙内流,减轻心肌钙沉积。我们的研究和文献也证实了这一点[3-5]。但到目前为止,有关珠子参及其活性成分对脑缺血性损伤的研究还少见报道。由于缺血性心脑血管疾病同属血管病变,在生理、病理方面既有其共同特性,又相互影响,关系极为密切。临床资料表明,脑梗死和冠心病常并见于同一患者。因此在进行珠子参对心肌损伤研究的同时,积极开展其对脑缺血性损伤的研究,有着极其重要的意义。本研究探讨珠子参对小鼠脑缺血再灌注损伤的影响,初步探寻其对脑组织的作用机制,为该天然药物的开发应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性5周龄昆明小鼠(KM,清洁级)170只,体质量25~30 g,由湖北省实验动物研究中心提供[许可证号:SCXK(鄂)2008-0005]。遵照国家实验动物饲养和使用指南,室温(22±1)℃,湿度(60±5)%,12 h明暗循环,自由饮食和饮水。

1.2 药品和试剂

珠子参购自宜昌市中医院,并经宜昌市药品食品监督管理局鉴定为五加科人参属植物珠子参(Panacis majoris rhizoma),珠子参水提物的具体提取方法参见文献[6]。尼莫地平片(亚宝药业集团股份有限公司生产,批号090806),水合氯醛(上海化学试剂采购供应五联化工厂提供,批号060818),2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC,美国 Sigma 公司生产,上海化学试剂公司进口分装,批号060710),超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)和黄嘌呤氧化酶(XOD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),其他试剂均为市售分析纯。

1.3 实验动物分组与给药

将KM雄性小鼠采用完全随机设计分组法分为6组:假手术组($n=20$)、模型组($n=30$)、尼莫地平组(2 mg/kg,$n=30$)和珠子参水提物低、中、高剂量组(2.5、5.0、10.0 g/kg,$n=30$)。除假手术组和模型组灌胃给予蒸馏水20 ml/kg外,其余各组灌胃给予相应剂量的药物。

1.4 小鼠脑缺血再灌注模型

于实验前7 d开始灌胃给药,每天1次,第7天于缺血前60 min给药。采用 Longa 等[7]创建的线拴法,在此基础上经过改良建立小鼠短暂性的大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型。假手术组切开缝合不进行动脉阻塞。以动物清醒后行动不协调、爬行时向左转圈、提尾时左前肢屈曲或作旋转运动为制模成功标志。

1.5 行为学检查

1.5.1 神经症状评分 小鼠MCAO 2 h,再灌注24 h后的神经症状参照 Longa 等[7]的分级法评分。0级:无症状;1级:提尾时损伤对侧前肢不能伸直;2级:向损伤侧旋转;3级:向对侧倾倒;4级:无自发活动或意识不清。

1.5.2 斜板实验 依据 Yonemori 等[8]的方法将MCAO 2 h,再灌注24 h小鼠放置在一平板(25 cm×15 cm)上,待动物在平板上站稳后,将平板从水平缓慢倾斜至垂直,记录小鼠在平板倾斜时跌落的最大角度,每只动物每次重复3次,取平均值。

1.6 梗死面积及脑含水量的测量

小鼠MCAO 2 h,再灌注24 h,进行行为学检查后,将实验动物分成2部分,一部分断头处死,取出脑,去掉嗅球、小脑和低位脑干,称湿质量。然后冠状均切4刀,共5片,将切片后的脑组织放置0.25% TTC溶液中,37 ℃避光孵育,每隔7~8 min翻动1次,染色30 min,10%的福尔马林固定并经图像扫描后用 Image/J 图像分析软件测量梗死面积,计算梗死脑组织百分比[9]。测量完梗死面积后,然后将染色后的脑组织块置入电热恒温烘箱(100±2)℃中烘干24 h至恒质量,称取干质量。脑含水量用湿质量的百分比表示。

梗死脑组织百分比=梗死区面积/(梗死区面积+非梗死区面积)×100%

脑含水量=(脑组织湿质量-脑组织干质量)/脑组织湿质量×100%

1.7 脑组织氧化损伤指标的测定

小鼠MCAO 2 h,再灌注24 h,进行行为学检查后,一部分断头处死,进行脑梗死面积和含水量的测量,另一部分在冰盘上迅速取脑,去掉嗅球、小脑和低位脑干后,用生理盐水制成10%脑组织匀浆,3 000 r/min,离心15min,取上清液,用分光光度计法测定组织中的SOD、GSH-PX、CAT、MDA、XOD的含量,所有步骤严格按试剂盒说明书进行操作。

1.8 数据统计分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件,多组间差异的比较行单因素方差分析,两组间均数的差异比较行 Dunnett-t 检验;神经症状评分结果用非参数 Krukal-Wallis 检验;缺血侧与对侧的脑体积和神经元密度比较用配对 t 检验;小鼠MCAO术后及再灌注后死亡率用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 珠子参水提物对脑缺血再灌注小鼠成活率的影响

脑缺血再灌注小鼠成活率统计时剔除假手术组麻醉过量引起死亡的小鼠1只,模型组和珠子参低组分别剔除颅内出血引起死亡的小鼠3只,珠子参中剂量组剔除麻醉过量引起死亡的小鼠1只和颅内出血引起死亡的小鼠2只,珠子参高剂量组和尼莫地平组剔除麻醉过量引起死亡的小鼠1只和颅内出血引起死亡的小鼠1只。假手术组成活率为100.0%(19/19),模

型组小鼠成活率为51.9%(14/27),珠子参低剂量组的成活率为74.1%(20/27),与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$);珠子参中、高剂量组的成活率分别为77.8%(21/27)和82.1%(23/28),与模型组比较差异具有统计学意义($P<0.05$),阳性药尼莫地平组的成活率为85.7%(24/28),与模型组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.2 珠子参水提物对脑缺血再灌注小鼠行为学的影响

与假手术组比较,模型组小鼠出现严重的神经功能散失。珠子参不同剂量组均能改善神经症状,其改善作用随剂量的增加而增强,与模型组比较,珠子参高剂量组差异具有统计学意义($P<0.05$)。在斜板实验中,术前6个组小鼠的倾斜角度差异无统计学意义。术后再灌注24 h后,模型组倾斜角度显著下降,珠子参水提物干预后倾斜角度呈逐渐恢复。与模型组比较,珠子参中、高剂量组差异具有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$),其中高剂量组对小鼠行为学的改善作用几乎与尼莫地平相当(表1)。

表1 珠子参水提物对脑缺血再灌注小鼠神经症状、斜板实验角度的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	神经症状评分	斜板角度(°)
假手术组	19	0.00±0.00	74.6±5.1
模型组	14	2.21±0.43[b]	55.1±7.5[b]
珠子参(2.50 g/kg)	20	1.91±0.41	59.0±6.5
珠子参(5.00 g/kg)	21	1.87±0.35	61.7±4.8[c]
珠子参(10.00 g/kg)	23	1.77±0.38[c]	63.6±5.5[d]
尼莫地平(0.002 g/kg)	24	1.70±0.46[c]	64.5±5.0[d]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与假手术组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与模型组比较

2.3 珠子参水提物对脑缺血再灌注小鼠梗死面积、脑含水量的影响

同假手术组相比,模型组的梗死面积和脑含水量明显增大($P<0.01$),表明造模成功。同模型组相比,珠子参不同剂量组均能降低缺血再灌注小鼠脑的梗死面积和脑含水量,且作用随剂量的增加而增强,其中珠子参中、高剂量组能明显减少脑缺血再灌注小鼠脑的梗死面积和降低脑含水量($P<0.05$,$P<0.01$)(图1、表2)。

2.4 珠子参水提物对脑缺血再灌注小鼠脑组织氧化损伤的影响

模型组小鼠脑组织MDA含量和XOD活性较假手术组出现了显著的升高($P<0.01$),而GSH-PX、SOD和CAT的活性则呈现明显的降低($P<0.01$)。珠子参水提物干预后,上述指标均得到了不同程度的改善,以中、高剂量组更为显著($P<0.05$,$P<0.01$),甚至高剂量组在改善GSH-PX、SOD和CAT酶及XOD酶活性方面优于尼莫地平组(表3)。



A:假手术组;B:模型组;C:珠子参低剂量组;D:珠子参中剂量组;E:珠子参高剂量组;F:尼莫地平组

图1 珠子参水提物对脑缺血再灌注小鼠梗死面积的影响

表2 珠子参水提物对脑缺血再灌注小鼠梗死面积、脑含水量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	梗死面积(%)	脑含水量(%)
假手术组	9	0.0±0.0	62.1±5.0
模型组	7	36.8±5.8[b]	75.4±6.6[b]
珠子参(2.50 g/kg)	10	32.0±6.2	71.3±5.3
珠子参(5.00 g/kg)	10	30.8±5.1[c]	69.2±5.7[c]
珠子参(10.00 g/kg)	11	27.9±5.2[d]	67.1±6.0[d]
尼莫地平(0.002 g/kg)	12	25.7±4.5[d]	65.2±5.6[d]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与假手术组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与模型组比较

3 讨论

脑血管病是临床常见病、多发病,与心脏病、恶性肿瘤构成了目前三大致死疾病,是首位致残因素,其中缺血性脑血管病尤其脑缺血后的再灌注损伤危害极大,后果更为严重。近年来,随着对自由基研究的深入,逐渐证实了自由基的连锁反应是脑缺血再灌注损伤的核心病理环节。它主要是通过氧化作用攻击生物体内大分子,使其产生过氧化变性、交联或断裂,从而引起细胞结构和功能的破坏,导致机体组织损害和器官退行性变化[10]。在正常情况下,机体内氧自由基的产生和清除是平衡的;在脑缺血时很容易受到自由基($O_2^-\cdot$、H_2O_2、OH·、NO及$ONOO^-$)的攻击,导致自由

表3 珠子参水提物对脑缺血再灌注小鼠脑组织氧化损伤的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MDA(nmol/mg)	GSH-PX(U/mg)	SOD(U/mg)	CAT(U/mg)	XOD(U/mg)
假手术组	10	8.98±2.37	22.25±3.71	99.2±8.5	0.012±0.004	11.60±1.93
模型组	7	19.60±4.30[b]	13.85±2.94[b]	76.2±7.9[b]	0.005±0.002[b]	19.45±2.07[b]
珠子参(2.50 g/kg)	10	16.50±2.73	14.95±2.04	80.8±8.1	0.006±0.002	17.22±1.96[c]
珠子参(5.00 g/kg)	11	15.84±2.53[c]	17.87±4.52[c]	84.4±7.9[c]	0.007±0.001[c]	15.58±1.55[d]
珠子参(10.00 g/kg)	12	13.83±2.02[d]	18.03±3.37[d]	86.8±6.8[d]	0.009±0.004[d]	13.30±1.60[d]
尼莫地平(0.002 g/kg)	12	12.73±3.20[d]	16.89±3.06[c]	85.4±6.6[d]	0.008±0.002[d]	14.70±1.36[d]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与假手术组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与模型组比较

基大量堆积,引起脂质、蛋白质和核酸的过氧化,使膜结构遭到破坏、蛋白降解、核酸主链断裂、透明质酸解聚、细胞崩解、细胞发生不可逆改变,最终导致神经元死亡、脑水肿和梗死的形成[11]。因此,进行清除自由基的抗氧化治疗将是脑缺血再灌注损伤的重要治疗手段。

近年研究发现,珠子参具有强心、扩张血管、保护心肌缺血再灌注损伤,抑制钙内流,减轻心肌钙沉积等药理作用,其总皂苷类化合物除具有强心、扩张血管、保护心肌缺血再灌注损伤外,还可抑制钙内流,减轻心肌钙沉积[12]。前期研究发现珠子参能够改善阿霉素诱导的慢性心力衰竭大鼠的心功能,减少细胞凋亡,并初步证实其主要通过增强机体对氧自由基的清除能力,降低炎症因子的产生,从而改善心衰[13]。由于缺血性心脑血管病同属血管病变。根据缺血性心脑血管病发生发展的临床规律,探讨"心脑同治"的作用机制,有着十分重要的学术理论意义和临床实用价值。结合我们前期研究发现珠子参在治疗慢性心衰方面显示出较好的疗效[13]。本实验进一步观察其对缺血性脑损伤是否也有改善作用,结果表明,珠子参水提物能明显增加脑缺血再灌注小鼠的成活率,并且其疗效随剂量的增加而增强。在改善神经症状方面,珠子参水提物高剂量的疗效与尼莫地平的疗效非常接近;在脑形态学和脑含水量的分析中,珠子参水提物能明显减少脑缺血再灌注小鼠脑的梗死面积和降低脑含水量,显示出了脑缺血性损伤的较好的保护作用。在进行脑组织的生化分析中发现模型组小鼠脑组织的氧化还原系统受到明显破坏,提示脑缺血再灌注诱发了脑组织氧化损伤,与文献[14]报道一致。当脑组织缺血时,XOD的生成急剧增加,进而产生大量的次黄嘌呤(HX)。当缺血脑的血流重新恢复时,HX和分子氧在XOD的催化下生成大量的氧自由基(O_2^-·及OH·)。一方面,O_2^-·在超氧化物歧化酶的作用下生成H_2O_2,它又可通过Fenton反应和Haber-weiss反应生成OH·;另一方面,O_2^-·与NO反应形成$ONOO^-$,引起细胞膜脂质过氧化反应。而OH·是一种特别不稳定氧化剂,可与细胞膜脂质反应,引发细胞膜脂质过氧化连锁反应,导致膜结构遭到破坏,造成细胞死亡[15]。本研究中实验小鼠经珠子参水提物预防治疗后脑组织中CAT、SOD、GSH-PX酶的活性明显活性升高,XOD活性和MDA含量显著降低。通过与尼莫地平的对比分析,发现珠子参水提物高剂量组在改善GSH-PX、SOD和CAT酶及XOD酶活性方面优于尼莫地平组。综合分析本实验结果及同尼莫地平的比较,发现珠子参是通过对抗自由基、拮抗脑组织过氧化损伤,减轻缺血再灌注对脑组织所造成的损伤,进而实施对脑的保护作用。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社,2010:254-255.

[2] Morita T, Kasai R, Tanaka O, *et al*. Saponins of Zu-Tziseng, rhizomes of Panax japonicus C. A. Meyer var. major (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng, collected in Yunnan, China[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1982, 30(12): 4341-4346.

[3] Chan H H, Sun H D, Reddy M V, *et al*. Potent alpha-glucosidase inhibitors from the roots of Panax japonicus C. A. Meyer var. major[J]. Phytochemistry, 2010, 71(11/12): 1360-1364.

[4] 赵仁,赵毅,李东明,等. 珠子参研究进展[J]. 中国现代中药,2008,10(7):3-6.

[5] Satoh Y, Satoh M, Isobe K, *et al*. Studies on panax acetylenes: absolute structure of a new panax acetylene, and inhibitory effects of related acetylenes on the growth of L-1210 cells[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2007, 55(4): 561-564.

[6] 贺海波,石孟琼,陈涛,等. 珠子参水提物抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 第三军医大学学报,2010,32(20):2224-2227.

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

[8] Yonemori F, Yamaguchi T, Yamada H, *et al*. Evaluation of a motor deficit after chronic focal cerebral ischemia in rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998, 18(10): 1099-1106.

[9] 马秀华,吕富荣,吕发金,等. CT灌注成像对大鼠急性脑缺血及再灌注模型的评价[J]. 第三军医大学学报,2009,31(6):506-509.

[10] 安晶晶,蒋宝泉,孙海岚,等. 富硒SOD绿茶对老龄大鼠机体抗氧化能力的影响[J]. 第三军医大学学报,2009,31(7):608-610.

[11] 刘筱蔼,吴伟康. 中药防治脑缺血再灌注损伤的研究[J]. 中国中西医结合杂志,2001,21(10):794-796.

[12] 韩红,李麟仙,王琼仙,等. 珠子参总皂甙、三七总皂甙及绞股兰总皂甙对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国病理生理杂志,1994,10(2):128-133.

[13] Chen T, Hu Y Q, Deng L R, *et al*. Effects of polysaccharides extracted from Zhu Zi Shen (Rhizoma Panacis Majoris) on Oxidative stress and hemodynamics in the adriamycin-induced chronic congestive heart failure rats[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, In Press, Available online 19 May 2011.

[14] Chen H, Yoshioka H, Kim G S, *et al*. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection[J]. Antioxid Redox Signal, 2010 Sep 2. [Epub ahead of print].

[15] Warner D S, Sheng H, Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain[J]. J Exp Biol, 2004, 207(Pt 18): 3221-3231.

(收稿:2010-09-09 修回:2010-10-27)
(编辑 龙 亮)