丹红对脑卒中后运动功能改善的实验研究

王 伟[1],崔广冉[1],马天怡[1],辛娟娟[1],刘 波[1],蔡志平[2] (1. 包头医学院第一附属医院神经内一科,内蒙古 包头 014010;2. 包头医学院人体解剖学教研室, 内蒙古 包头 014060)

[摘 要] **目的** 观察丹红对脑梗塞再灌注大鼠运动功能改善的治疗作用。**方法** SD 大鼠制备大脑中动脉阻塞模型,再灌注 24 h 后随机分为对照组、丹红高剂量、丹红低剂量组及维脑路通组。对照组生理盐水腹腔注射,丹红高、低剂量组据大鼠体质量给予丹红注射液 14.4 mg/kg 和 3.6 mg/kg 腹腔注射,维脑路通组以 0.04 g/kg 腹腔注射给药。计算脑梗死灶面积,行横木行走实验,双前肢抓握力量检测。**结果** 各组大鼠在 24 h 和 3 d 可见对照组梗塞面积最大,与其他各组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。大鼠 3 d 时横木行走实验,对照组、维脑路通组、丹红高、低剂量组得分分别为:(1.30 ± 0.91)分、(3.78 ± 1.72)分、(4.18 ± 2.05)分、(4.63 ± 2.45)分,用药各组与对照组相比,有统计学差异($P<0.05$)。药物组与对照组大鼠双前肢肌力有统计学差异($P<0.05$)。**结论** 丹红可明显提高大鼠运动功能恢复,且与维脑路通作用相当。

[关键词] 脑卒中;丹红注射液;运动功能;大鼠
[中图分类号] R743.33 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)02-0157-03

Laborotary study of DanHong in improving the movement function after stroke

WANG Wei[1], CUI Guang-ran[1], MA Tian-yi[1], XIN Juan-juan[1], LIU Bo[1], CAI Zhi-ping[2] (1. Neurology 1' st Department, 1' st Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou Inner Mongolia 014010; 2. Human Anatomy Department, Baotou Medical College, Baotou Inner Mongolia 014060, China)

Abstract: Objective To investigate Danhong in improving the movement function of reperfused rat after stroke. **Methods** Rats to make middle cerebral artery occlusion model, after 24 hours of reperfusion were divided into control group, high dose and low dose of Danhong groups and Venorruton group randomly. Rats in Control group were injected saline. High and low dose group were injected DanHong according to their weight, high dose as 14.4 mg/kg, low dose as 3.6 mg/kg. Venorruton group were injected Venorruton as 0.04 g/kg. The infarcted square of rat brain was measured, the rats were tested with walking wood bar and two fore limb grasp strength. **Results** Rat infarcted squre in 24 hours and 3 days, control groups is the biggest, compared with others, there are statistically difference ($P<0.05$). Score in each group of walking wood bar in 3rd days are (1.30 ± 0.91), (3.78 ± 1.72), (4.18 ± 2.05), (4.63 ± 2.45). Compared between control and other druge groups, there are statistically differnec ($P<0.05$). There are statistically differences between control and other groups in two fore limb grasp testing ($P<0.05$). **Conclusion** Danhong has the same effect which can improve the movement function to stroke rat as Venorruton.

Keywords: stroke; Danhong injection; move function; rat

脑卒中是当今世界范围内导致患者死亡或致残的第 3 大原因,仅次于心脏病和癌症。全球有 5 000 多万的缺血性脑卒中和短暂性脑缺血(transient ischemic attack, TIA)生存者。随着我国进入老龄化社会,近几年脑卒中发病率有上升趋势,并趋向年轻化[1]。我国脑卒中发生率以每年 8.7% 的速率上升[2],在所有的卒中患者中,缺血性卒中大约占 85%。因此对缺血性卒中的发病原因及卒中后神经功能缺损症状恢复的研究,一直是国内外研究热点,同时也是一个重大的社会问题。本研究利用大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occulsion, MCAO)的方法制备脑缺血再灌注

doi:10.11659/jjssx.10E014021
[基金项目] 内蒙古自治区自然科学基金面上项目(2012MS1103)
[收稿日期] 2014-10-09 [修回日期] 2014-11-17

[13] Haris M, Husain N, Singh A, et al. Dynamic contrast-enhanced (DCE) derived transfer coefficient (ktrans) is a surrogate marker of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression in brain tuberculomas[J]. J Magn Reson Imaging, 2008, 28(3): 588 – 597.
[14] Alonzi R, Taylor NJ, Stirling JJ, et al. Reproducibility and correlation between quantitative and semiquantitative dynamic and intrinsic susceptibility- weighted MRI parameters in the benign and malignant human prostate[J]. J Magn Reson Imaging, 2010, 32(1): 155 – 164.
[15] Bergamino M, Barletta L, Castellan L, et al. Evaluation of IAUGC indices and two DCE-MRI pharmacokinetic parameters assessed by two different theoretical algorithms in patients with brain tumors[J]. Clin Imaging, 2014, 38(6): 808 – 814.

(编辑:周小林)

损伤的模型,腹腔注射不同剂量的丹红注射液观察其是否具有治疗效果,为中药治疗脑卒中提供基础实验依据,也为进一步发挥传统中药的治疗优势奠定理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

雄性 SD 大鼠 90 只,体质量 220 ~ 250 g,所有动物均购于内蒙古大学实验动物中心。实验动物操作及饲养均符合实验动物伦理学要求,动物随机数字表法分为 4 组。丹红注射液(批号 Z20026866)为菏泽步长制药有限公司生产。维脑路通注射液(批号 19912337656)为天津药业集团新郑股份有限公司生产。

1.2 动物模型及各组处理方法

大鼠大脑中动脉栓塞动物制备参照 longa 法并加以改进[3]。10% 的水合氯醛按每 100 g 体质量注射 0.35 mL 腹腔麻醉。麻醉成功后,颈部正中切口,游离左侧颈总动脉,确认颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,结扎颈外动脉后,动脉夹夹闭颈内动脉远心端,于颈外动脉与颈内动脉分叉处做 1 个小切口,将球状的单丝尼龙线插入,松开动脉瘤夹,直视下尼龙线自动脉分支处插入颈内动脉阻塞大脑中动脉入口。缺血 3 h 后,拔线栓,梗阻后再灌注 24 h。

大鼠完全清醒后随机分为 4 组(每组 20 只),分别为对照组、丹红注射液高、低剂量组和维脑路通组,其中丹红高、低剂量组根据大鼠体质量分别给予丹红注射液 14.4 mg/kg、3.6 mg/kg腹腔注射,维脑路通组给予 0.04 g/kg 的剂量腹腔注射给药,每天 1 次,对照组给予相同体积的生理盐水腹腔注射,共给药 3 d。末次给药 1 h 后,动物用 10% 水合氯醛(30 mg/kg)麻醉,开颅取脑。

1.3 各组动物观测评分

1.3.1 横木行走实验 利用横木行走实验及抓握力测试[4]评价大鼠脑缺血损伤后运动的整合和协调能力。横木厚 1.0 cm,宽 2.0 cm,长 120 cm,悬空放置于距地面 80 cm 水平,横木一端连接一个暗盒,通过刺激大鼠走过横木进入暗盒的方法进行测试。实验造模前训练 4 d,每天 1 次,让所有大鼠评分到 6 分为止,分别于动物造模后的各时间点进行检测。实验的评分标准:不能呆在横木上者为 0 分;能在横木上站住但不能动者为 1 分;试图通过但直接从横木上摔下者为 2 分;能够通过但损伤的后肢滑落下横木,滑落次数超过 5 次的大鼠评分为 3 分;从横木上滑落超过 1 次但不到 5 次者为 4 分;从横木上滑落 1 次者为 5 分;能够顺利通过横木者为 6 分。

1.3.2 抓握力量测试 为了检测大鼠双前肢抓握力量的大小,利用抓握力量测试评价大鼠脑缺血后两前肢抓握横杆的拉力。测试者拉住鼠尾向后拖拽,大鼠为了不从横杆滑脱,会抓握横杆不放,读取使大鼠双前肢滑脱的最大拉力值。分别于实验造模 3 d、7 d 和 14 d 后进行测量,每只测 2 次,取其最大值。

1.3.3 大鼠脑梗死灶测量 TTC 与细胞内脱氢酶反应后脑组织会变成红色,而脑缺血梗塞部位的细胞脱氢酶失活不能与 TTC 反应呈苍白色。大鼠脑缺血再灌注 24 h 后,麻醉取脑,立即置于 -20 ℃低温冰箱快速冷冻 20 min,由前向后冠状面切片,片厚 3 mm,均匀切 6 片。同时在 3 d 后各组再取 2 只大鼠进行脑组织切片测量梗塞面积。已切好的脑切片放到 1% TTC 溶液的玻璃器皿中,脑切片全部浸没,置于 37 ℃恒温烤箱避光加热,染色 15 min 后,组织切片翻面后继续避光染色约 15 min,切面上正常脑组织染色呈红色,梗死区域的脑组织呈苍白色,染好的脑切片置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h。脑梗面积的计算:由于脑组织的水肿程度随着脑缺血后再灌时间的不同而变化,为了消除脑水肿对脑梗面积检测的影响,每组各个时间点取 2 只大鼠,按切片顺序进行每只大鼠脑组织标本的 6 个切片测量,测量后据以下公式来计算每一层面上脑梗塞面积:100 ×[对侧大脑皮质的面积 -(同侧大脑皮质的面积 - 脑梗塞的面积)]/对侧大脑皮质的面积。

1.4 数据的统计处理

利用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示所有数据,组间比较采用 SNK-q 检验,成组设计的多个样本均数比较用单因素方差分析,检验水准为 $\alpha = 0.05$,使用 SPSS 13.0 统计软件对所有数据进行处理。

2 结果

2.1 各组大鼠横木行走实验得分

对照组大鼠随着时间的延长,其横木的行走能力也出现一定的恢复,但与用药组相比,仍然有明显的差异。在各用药组中,可见大鼠横木行走能力随着时间的延长而明显改善,且药物组大鼠横木行走能力的表现明显优于对照组,二者相比有显著的统计学差异($P < 0.05$)。在药物组内部,可见丹红高低剂量组的大鼠横木行走能力要高于维脑路通组($P < 0.05$),但在丹红高、低剂量组之间比较差异并不明显,在观察周期末大鼠的横木行走能力几乎接近于健康大鼠(表 1)。

表 1 各组大鼠不同时间段横木行走得分($\bar{x} \pm s$,分)

组别	造模 3 d	造模 7 d	造模 14 d
对照组	1.30 ± 0.91	2.64 ± 1.39	3.22 ± 0.24
维脑路通组	3.78 ± 1.72 *	4.04 ± 1.77 *	5.38 ± 2.47 *
丹红高剂量组	4.18 ± 2.05 *	5.43 ± 1.32 *	5.60 ± 1.29 *
丹红低剂量组	4.63 ± 2.45 *	5.03 ± 2.40 *	5.92 ± 2.82 *

*:与对照组比较,$P < 0.05$

2.2 各组大鼠造模后不同时间段握力测量值

各组大鼠不同时间段测量抓握力见表 2。第 3 天时,各组大鼠的抓握力差别不大,但丹红高剂量组的抓握力与其他几组相比,有明显统计学差异($P < 0.05$)。第 7 天时,可见用药组与对照组抓握力有明显差异($P < 0.05$)。而在药物组内部两两相比,未见明显统计学差异。第 14 天时,与对照组相比,可见药物组各组抓握力都比对照组要大,经统计学处理有明显差异($P < 0.05$),药物组组内相比差异并不明显,还不能说明丹红高低剂量组与维脑路通组相比有任何差异。

表 2 各组大鼠不同时间段抓握力测量值($\bar{x} \pm s$,gf)

组别	造模 3 d	造模 7 d	造模 14 d
对照组	453.50 ± 10.52	583.64 ± 52.16	658.50 ± 63.19
维脑路通组	464.08 ± 31.26	670.19 ± 43.44 *	753.94 ± 41.10 *
丹红高剂量组	481.35 ± 45.33	681.58 ± 50.09 *	785.65 ± 19.95 *
丹红低剂量组	473.54 ± 40.46	665.14 ± 27.63 *	796.12 ± 54.09 *

*:与对照组比较,$P < 0.05$

2.3 不同时间点脑梗塞面积与正常面积比例测量结果

各组大鼠在不同时间段进行梗塞面积测量,结果见图 1。与各用药组相比,生理盐水组(对照组)分别在 24 h 与 3 d 时间点可见梗塞面积都高,与其他各组相比差异明显($P < 0.05$)。在用药组间比较时,24 h 时间点可见丹红组(高低剂量)梗塞面积比例要小于维脑路通组,在 3 d 时间点可见丹红高剂量组梗塞面积比例明显低于对照组,二者相比结果有明显差异($P < 0.05$)。

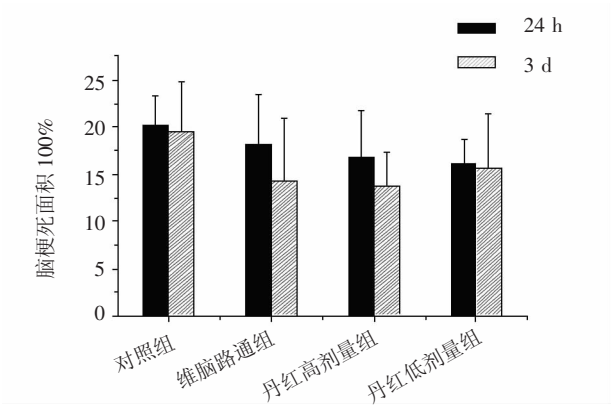


图 1 各组大鼠不同时间段梗塞面积测量

3 讨论

目前研究脑缺血的模型很多,但脑缺血再灌注损伤动物模型的研究选择,一直以来都是神经科学领域研究的焦点[5-6]。比较经典的方法是 Longa 模型[3],但国内一般都会对该类模型进行适当的改良。本研究采用了改良的 Longa 模型,此模型的操作由一人完成,在实验前进行了大量的定位实验,在这些基础上确保造模成功。实验操作均由一人完成,实验的重复率高,模型的性状稳定,保证了下一步实验的顺利进行。

目前应用丹红临床治疗方面,国内高春光等[7]通过对 TIA 患者用丹红和芦丁静脉滴注,丹红组治愈率为 61.3%,好转率 38.7%,总有效率 100%,芦丁组总有效率为 90.3%。巴瑞琼等[8]采用丹红注射治疗脑梗死,对照组用临床常用的复方丹参注射液,结果对照组总有效率为 72%,治疗组为 89.33%,且丹红治疗对血液流变学各项指标有所下降,表明其有改善血液流变学的作用。另外有研究利用丹红治疗缺血性脑卒中,丹红治疗的总有效率更高,可有效改善急性脑梗死患者的预后[9-11]。本研究结果显示,利用丹红治疗,大鼠的运动功能恢复与维脑路通组相比并无明显差异,表明二者的作用无明显差别,与国内的研究结果相似。辛勤等[10]利用丹红治疗脑栓塞,发现大鼠在脑指数,脑含水量、脑血管通透性各方面都能减轻脑缺血引起的损伤。国外应用丹红注射液对脑卒中进行治疗的研究并不多,关于这方面转化医学的研究也不是很多,利用丹红进行研究,结合近年的趋势,希望为临床及基础研究奠定一定的基础。近年对于脑卒中本身神经生物标记分子的研究还比较少,因此这也是我们进一步利用该模型和丹红注射液进行研究的方向。

[参考文献]

[1] 王 娟,马 玲. 康复护理干预对脑卒中偏瘫患者的影响[J]. 局解手术学杂志,2011,20(1):85.

[2] 王 晨,张学军,罗 军,等. 颈动脉内膜剥脱术在防治缺血性脑卒中的临床分析[J]. 局解手术学杂志,2012,21(5):511 - 512.

[3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84 - 91.

[4] 郭云良,姚维成,高焕民,等. 神经生物学技术[M]. 青岛:中国海洋大学出版社,2005:8 - 9.

[5] 杨 鑫. 丹红注射液对脑梗塞患者基质金属蛋白酶-2 及氧化低密度脂蛋白的影响[D]. 吉林:吉林大学,2010.

[6] Whiteley W, Wardlaw J, Dennis M, et al. Blood biomarkers for the diagnosis of acute cerebrovascular diseases: a prospective cohort study[J]. Cerebrovasc Dis, 2011, 32(2): 141 - 147.

[7] 高春光,刘宝旭,高 国,等. 步长丹红治疗椎基底动脉供血不足 62 例临床观察[J]. 中国保健(医学研究版),2008,16(8):298.

[8] 巴瑞琼,胡艳萍. 丹红注射液治疗脑梗死 300 例[J]. 云南中医中药杂志,2008,29(3):66.

[9] 袁加文,王 枫,孙晓江. 丹红注射液治疗急性缺血性脑卒中的临床研究[J]. 中国老年学杂志,2011,31(1):41 - 42.

[10] 辛 勤,李秀芳,司端运,等. 丹参红花注射液对实验性大鼠脑缺血的保护作用[J]. 中成药,2004,26(3):222 - 224.

[11] He Y, Wan H, Du Y, et al. Protective effect of Danhong Injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Ethnopharmacol, 2012, 144(2): 387 - 394.

(编辑:杨 颖)