基础研究 文章编号:0253-3626(2009)11-1506-04

参附注射液对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性及神经功能的影响

谢 健[1],闵 苏[2]

(1. 重庆市急救医疗中心麻醉科,重庆 400014;2. 重庆医科大学附属第一医院麻醉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察参附注射液(Shenfu injection, SFI)对大鼠脑局灶性缺血再灌注(Ischemic-reperfusion,IR)损伤后血脑屏障(Blood brain barrier, BBB)通透性和神经功能的影响,评价参附注射液对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤有无保护作用,为参附注射液的临床应用提供参考。方法:清洁级的 SD 雄性大鼠 80 只,随机分为 A、B、C、D 4 个组:A 组为假手术加生理盐水处理组,B 组为假手术加参附注射液处理组,C 组为造模加生理盐水处理组,D 组为造模加参附注射液处理组。A、C 组于麻醉后 5 min 经尾静脉注射生理盐水 10 ml/kg,B、D 组在相同时点给予相同剂量的 SFI。随后对 C、D 两组采用 Zea Longa 线栓法制备大鼠右侧大脑中动脉(Middle cerebral artery, MCA)缺血 2 h 再灌注 24 h 模型。A、B 两组均不作造模处理,其余处理步骤与 C、D 两组相同。记录各组麻醉后苏醒时间,缺血 2 h 及再灌注 24 h 两时间点观察神经功能缺损情况,于再灌注 24 h 结束时在每组随机选择 5 只取右侧额顶叶大脑皮质部分电镜下观察血脑屏障超微结构的情况,其余 15 只大鼠静脉注射伊文思蓝(Evan's blue, EB),对比两组伊文思蓝通过血脑屏障进入脑组织的量。结果:各组间比较,体重差异无统计学意义。麻醉后苏醒时间 A、B 两组短于 C、D 两组($P<0.05$),A、B 两组之间无差异,C 组长于 D 组($P<0.05$)。缺血 2 h 神经功能缺损评分(Longa score,Longa 评分):A、B 两组低于 C、D 两组($P<0.01$),A、B 两组之间以及 C、D 两组之间差异无统计学意义。再灌注 24 h 后 Longa 评分:A、B 两组低于 C、D 两组($P<0.01$),A、B 两组之间差异无统计学意义,C 组高于 D 组($P<0.01$)。C 组再灌注 24 h Longa 评分明显高于缺血 2 h($P<0.01$),D 组这两个时点比较,差异无统计学意义。缺血 2 h,再灌注 24h 结束时,A、B 两组大鼠脑组织内伊文思蓝含量明显低于 C、D 两组($P<0.01$),A、B 两组之间差异无统计学意义,C 组明显高于 D 组($P<0.05$)。电镜下,A、B 两组大鼠大脑皮质毛细血管周围及管腔未见明显变化。C 组大鼠大脑皮质缺血再灌注区毛细血管周围重度水肿,毛细血管管腔明显受压。D 组相应区域毛细血管周围轻度水肿,毛细血管轻度受压。结论:参附注射液可减轻局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性升高程度,减轻神经功能受损伤程度,发挥脑保护作用。

【关键词】缺血再灌注;损伤;血脑屏障;动物模型;参附注射液

【中国图书分类法分类号】R614 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-31

Effects of Shenfu injection on the permeability of blood brain barrier and the nervous function of focal cerebral ischemic reperfusion injured rats

XIE Jian, et al

(*Department of Anesthesia, Medical Emergency Centre of Chongqing*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of Shenfu injection (SFI) on the permeability of blood brain barrier (BBB) and the nervous function of focal cerebral ischemic-reperfusion injured rats, and judge if SFI has protective effects for focal cerebral ischemic-reperfusion injured rats to provide theoretical proof for the clinical application of SFI. *Methods*: Eighty male SD rats were divided into four groups randomly: group A (the sham operated control group), group B (the sham operated trial group), group C (the control group) and group D (the trial group). The rats in group A and group C received i.v. a bolus of normal saline (NS) for 10 mg/kg 5 min after anesthesia, while those in group B and group D received a bolus of SFI for 10 mg/kg instead. The focal cerebral ischemic-reperfusion injury model was established with thread embolism of middle cerebral artery(MCA) according to Zea Longa's method in group C and group D. The time for postanesthetic revival in each group was recorded. The Longa score in each group was recorded at 2 h of occlusion and 24 h of reperfusion. The injury to the blood-brain barrier was observed by the content of Evan's blue (EB) in the cerebral tissue, the changes of the structure of BBB were observed with electron microscope at the end of the experiment. *Results*: The body weight in each group had no statistical difference. The time for revival from anesthesia in group A and group B was shorter than that in group C and group D ($P<0.05$),

作者介绍:谢 健(1970-),女,硕士,研究方向:脑保护。

通讯作者:闵 苏,女,教授,E-mail:minsu89011068@yahoo.com.cn。

and that in group C was longer than that in group D($P<0.05$) but there was no difference between group A and group B. After ischemia for two hours, Longa score in group A and group B was lower than that in group C and group D($P<0.01$), and there was no difference either between group A and group B, group C and group D. After reperfusion for 24 h, Longa score in group A and group B was lower than that in group C and group D, there was no difference between group A and group B ($P<0.01$), and Longa score in group C was higher than that in group D($P<0.01$). At the 24th hour of reperfusion, Longa score in group C was higher than that at the 2nd hour of ischemia($P<0.01$), but there was no difference for group D. After ischemia for 2 h and reperfusion for 24 h, the rats in group A and group B had an evidently lower Evan's blue content in the cerebral tissue than that of the rats in group C and group D, and there was no difference between group A and group B, while that of the rats in group C was higher than that of the rats in group D. Under the electron microscope, brain edema and microvessel pressed in group C were more severe compared with those in group D. But there was no significant abnormality in group A and group B. *Conclusion*: Shenfu injection could reduce blood-brain barrier permeability after focal cerebral ischemic-reperfusion injury and it has significant nervous function protection against ischemic-reperfusion damage.

【Key words】Ischemic-reperfusion; Injury; Blood-brain barrier; Animal model; Shenfu injection

脑缺血再灌注后过多生成的自由基(Free radical, FR)与血脑屏障(Blood brain barrier, BBB)的通透性改变密切相关[1,2],BBB 最重要的一层结构血管内皮细胞(Vascular endothelial cell, VEC)在正常情况下通过释放前列腺素 I_2(Prostaglandin I_2, PGI_2)等活性物质提高自身抗损伤能力,脑缺血再灌注损伤后,VEC 成为氧自由基(Oxygen free radical, OFR)的主要攻击对象,而且 VEC 富含黄嘌呤氧化酶,缺血再灌注时能产生 OFR,是体内 OFR 的主要来源。白细胞在粘附、聚集和迁移过程中又产生大量蛋白水解酶、OFR 及花生四烯酸(Arachidonic acid, AA)代谢产物,破坏了 BBB 的脑毛细血管内皮细胞(Brain capillary endothelium cell, BCEC)和基底膜[3],BBB 开放,血循环中的物质直接进入脑实质内,导致血管源性脑水肿和出血,加重继发性脑损伤。SFI 主要含人参皂苷和乌头碱,可解除微血管痉挛,改善微循环,增加组织供氧,抗炎,抗内毒素,稳定溶酶体酶,直接灭活黄嘌呤氧化酶,提高超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性[4]。参附注射液已被不少临床研究用于对包括脑在内的多个器官、组织的缺血再灌注损伤进行保护性治疗,并得出了众多有意义的结果[5-8]。本研究拟探讨 SFI 对大鼠脑局灶性 IR 后 BBB 通透性和神经功能有无保护作用,为参附注射液的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

所有实验动物均按照美国医学研究协会"实验动物处理原则",以及美国科学学会和国家卫生研究院"实验动物使用和处理指南"进行。

清洁级雄性 SD 大鼠 80 只,体重 200~270 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,术前禁食 6 h。随机分为 A、B、C、D 4 个组:A 组为假手术加生理盐水处理组,B 组为假手术加参附注射液处理组,C 组为造模加生理盐水处理组,D 组为造模加参附注射液处理组。A、C 组于麻醉后 5 min 经尾静脉注射生理盐水 10 ml/kg,B、D 组在相同时点给予相同剂量的 SFI。随后对 C、D 两组采用 Zea Longa 线栓法制备大鼠右侧大脑中动脉(Middle cerebral artery, MCA)缺血 2 h 再灌注 24 h 模型。A、B 两组均不作造模处理,只做相应的解剖、分离、挂线和缝合,其余处理步骤与 C、D 2 组相同。

1.2 主要试剂及仪器

生理盐水(西南药业股份有限公司),参附注射液(雅安三九药业有限公司),水合氯醛(青岛宇龙海藻有限公司),伊文思蓝(美国 Sigma 公司),甲酰胺(上海南翔试剂有限公司),氯化三苯四唑氮(2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride, TTC)(美国 Sigma 公司),电镜用戊二醛(美国 EMS 公司),磷酸盐缓冲剂 (BPS)(天津市化学试剂研究所),721 型分光光度仪(上海仪器总厂),水浴箱(上海仪器总厂),离心机(上海仪器总厂),Leica 超薄切片机 (德国徕卡仪器有限公司),Hitachi-7500 型透射电子显微镜(日本日立公司)。

1.3 局灶性脑缺血再灌注动物模型的制备

大鼠术前 6 h 禁食,自由饮水,3.5%水合氯醛 10 ml/kg 腹腔注射麻醉。麻醉后仰卧位固定,颈部剃毛,常规碘酊、酒精消毒,根据 Zea Longa 线栓法[9],造成右侧大脑中动脉阻塞(Middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型,记录此刻时间,作为大脑局灶性缺血开始的时间。缺血 2 h 后,3.5%水合氯醛 3 ml/kg 腹腔注射麻醉后在直视下拉动线栓尾端, 使其头部回到 ECA 内,实行 MCA 再灌注。

1.4 指标的检测

1.4.1 麻醉苏醒时间 记录从第 1 次麻醉开始到第 2 次麻醉苏醒所需时间。

1.4.2 神经功能缺损评分 于缺血 2 h 及再灌注 24 h 分别进行 Longa[10]神经功能缺损评分。0 分:无神经功能缺损症状。1 分:轻度神经功能缺损,提尾悬空时不能伸展左前爪。2 分:中度神经功能缺损,行走时向左侧转圈。3 分:中度神经功能缺损,行走困难,并向左侧倾倒。4 分:重度神经功能缺损,不

能自发行走,意识水平明显下降。

1.4.3 血脑屏障通透性的测定 大鼠缺血 2 h,再灌注 24 h 后,用 3.5%水合氯醛腹腔注射进行浅麻醉,经尾静脉注射 2% EB 生理盐水溶液 2 ml/kg。注射 EB 1 h 后,加深麻醉,仰卧位固定大鼠,迅速开胸,用静脉留置针经左心室向主动脉插管并固定,心脏经此用生理盐水以 100 mmHg 压力灌注冲洗血管内的伊文思蓝,剪开右心耳,直至右心房流出液变得澄清透明时停止灌注,每只大鼠大约需要 150 ml 生理盐水。心脏生理盐水灌注结束后断头取脑,将左右大脑半球分开,去除皮质表面的蛛网膜、血凝块及脑室脉络丛,放入已知体积的甲酰胺中,测量并记录脑体积,继续加甲酰胺至脑体积的 5 倍,置 37℃水浴 48 h 后,在 620 nm 波长测光密度值,甲酰胺作空白对照。根据标准曲线计算出 EB 含量(μg/ml),脑组织 EB 含量为上述值的 5 倍(μg/ml)[11]。

1.4.4 血脑屏障超微结构的改变 各组大鼠缺血 2h 再灌注 24 h,到时点麻醉大鼠,仰卧位固定。迅速开胸,用静脉留置针经左心室向主动脉插管,用生理盐水灌注同前。待右心房流出液无色透明时用 2.5%戊二醛固定液进行灌注固定。灌注结束后开颅取脑,取右侧顶叶皮质,用双面刀片修块成 1 mm^3 大小,浸入上述固定液中继续固定 2 h 以上。之后用 1%锇酸固定,梯度酒精脱水,Epon812 环氧树脂包埋,用 Leica 超薄切片机制成超薄切片,铀铅染色后,置 Hitachi-7500 透射电镜下观察、拍照。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析,计量资料以均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组缺血 2 h 和再灌注 24 h Longa 神经功能缺损评分用析因设计的方差分析,其余数据用完全随机设计的方差分析,$P \leqslant 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组麻醉后苏醒时间

麻醉后苏醒时间 A、B 两组短于 C、D 2 组 ($P<0.05$),A、B 2 组之间差异无统计学意义,C 组长于 D 组($P<0.05$),见表 1。

2.2 Longa 神经功能缺损评分

分组与缺血 2 h,再灌注 24 h 对神经功能缺损评分(Longa score, Longa 评分)的影响有交互作用($P<0.01$)。总体分析,A、B 两组评分低于 C、D 2 组($P<0.01$)。缺血 2 h,A、B 组评分低于 C、D 2 组($P<0.01$),A、B 组之间以及 C、D 2 组之间差异无统计学意义。再灌注 24 h 后,A、B 2 组评分低于 C、D 2 组($P<0.01$),A、B 2 组之间差异无统计学意义,C 组评分高于 D 组 ($P<0.01$)。固定于 C 组比较,再灌注 24 h 评分高于缺血 2 h 评分($P<0.01$),固定于 D 组比较,再灌注 24 h 评分与缺血 2 h 评分差异无统计学意义,见表 2。

2.3 对血脑屏障通透性的影响

A、B 两组大鼠脑组织内伊文思蓝含量明显低于 C、D 两组 ($P<0.01$),A、B 两组之间差异无统计学意义,C 组明显高于 D 组($P<0.05$),见表 3。

2.4 4 组血脑屏障超微结构的改变

电镜下,A、B 2 组大脑皮质毛细血管周围及管腔未见明显变化。C 组大鼠大脑皮质缺血再灌注区毛细血管周围重度水肿, 毛细血管管腔明显受压,D 组相应区域毛细血管周围轻度水肿,毛细血管轻度受压。见图 1。

表 1 各组麻醉后苏醒时间(min,n=15,$\bar{x} \pm s$)

组别	麻醉后苏醒时间
A	173 ± 13
B	168 ± 10
C	209 ± 27#
D	186 ± 21*#

注:与 C 组比较,*$P<0.05$;与 A、B 组比较,#$P<0.05$

表 2 各组神经功能缺损评分(n=15,$\bar{x} \pm s$)

组别	神经功能缺损评分	
	缺血 2 h	再灌注 24 h
A	0	0
B	0	0
C	2.3 ± 0.7*	3.3 ± 0.7*△
D	2.2 ± 0.7*	2.5 ± 0.8*#

注:与 A、B 组比较,*$P<0.01$;与 C 组比较,#$P<0.01$;与缺血 2 h 比较△$P<0.01$

表 3 各组脑组织伊文思蓝含量(μg/ml,n=15,$\bar{x} \pm s$)

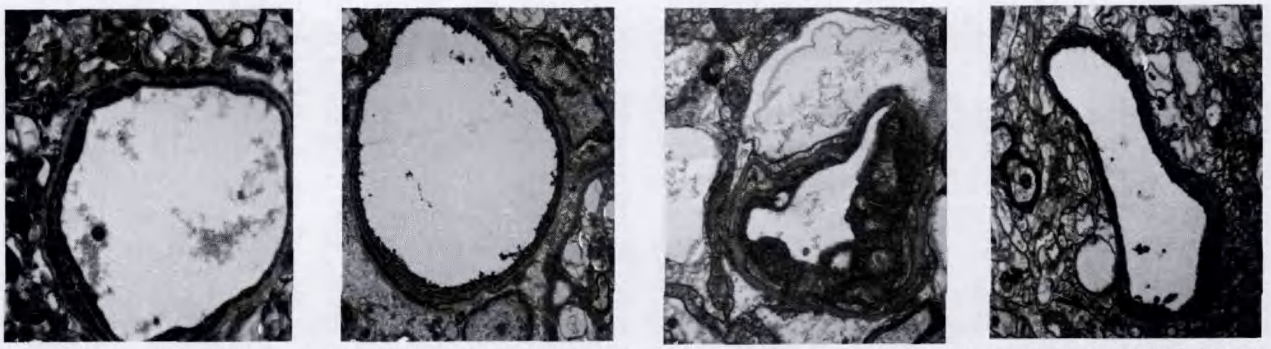
组别	脑组织伊文思蓝含量
A	3.3 ± 1.7
B	3.3 ± 1.3
C	63.1 ± 19.9*
D	29.7 ± 17.2*#

与 A、B 组比较,*$P<0.01$;与 C 组比较,#$P<0.05$

3 讨 论

Zea Longa 血管内插线栓塞法(简称线栓法)[9,12],建立动物 MCA 缺血模型效果肯定,重复性好,操作简单,不需特殊器械,无须开颅,可准确控制缺血再灌注时间,MCA 缺血及再灌注效果都很好[13]。本实验造模时,采用了 Zea Longa 的方法,但是又在其基础之上作了一些改进。Zea Longa 的方法要求结扎翼腭动脉, 本实验在造模过程中体会到这会加大损伤,增加出血量,因此未对翼腭动脉作任何处理。Zea Longa 方法实行再灌注时,直接拉动栓线留在体外的一端使之回到颈总动脉(Common carotid artery, CCA)内从而恢复 MCA 的血流,此法会导致大鼠挣扎,引起血管破裂或断裂,提高大鼠死亡率,因此,本实验实施再灌注时,对大鼠进行了再次麻醉,剪开手术切口缝线,直视下拉动栓线回到 CCA 内。上述改进提高了可操作性和成功率。

张忱等人[14]的实验结果提示大鼠 MCAO 的再灌注时间窗在 4 h 以前。Young 等[15]证明,大鼠 MCA 阻断时,挽救大部分大脑皮质的时间窗是 60min, 挽救一部分皮质的时间窗是 90~120 min。郑玉等[16]报道,参附注射液对大鼠短暂性局灶性脑缺血损伤的治疗时间窗在缺血后 4 h 以内。本实验参考以



A 组(假手术加生理盐水处理组) B 组(假手术加参附注射液处理组) C 组(造模加生理盐水处理组) D 组(造模加参附注射液处理组)

图 1 各组 BBB 超微结构改变(EM×15 000)

上资料,造模时,对每只大鼠实行缺血 2 h,再灌注 24 h 处理。

本实验表明大鼠麻醉后苏醒时间除麻醉外,与手术方式和所给药物处理措施有关,SFI 作用于假手术处理的大鼠,仅有使苏醒提前的趋势,而 SFI 作用于局灶性脑缺血再灌注处理的大鼠,可明显缩短其苏醒时间。郑传东等报道,SFI 对全麻病人有催醒作用,此作用与 SFI 升高体内 β-内啡肽有关[17,18]。本实验观察到的 SFI 在前述两种情况下存在的催醒程度上的差异有待今后进一步探讨。

在本实验中,全麻加假手术处理对神经功能无影响,脑局灶性 IR 损伤对神经功能有明显影响,对于全麻加假手术处理的大鼠,SFI 对其神经功能无明显影响,而对于局灶性脑缺血再灌注损伤的大鼠,SFI 对其神经功能表现出保护作用。可能的原因是 SFI 所含人参皂苷提高缺氧脑组织内乳酸脱氢酶活性,降低乳酸含量,提高 ATP 水平,降低神经元兴奋性,减少能量消耗,抑制兴奋性神经递质谷氨酸释放,从而保护神经细胞[19,20]。

本实验中,假手术处理对大鼠 BBB 通透性无明显影响,局灶性脑 IR 使大鼠 BBB 通透性明显升高。SFI 对假手术处理大鼠的 BBB 通透性无明显影响,而在局灶性脑缺血再灌注损伤的情况下,SFI 表现出明显的降低 BBB 通透性升高程度的作用。已知脑组织 IR 损伤过程中过多生成的 OFR 与细胞膜不饱和脂肪酸发生反应生成过氧化脂质,损害血管内皮细胞膜结构,这与 BBB 通透性升高密切相关[2]。SFI 能直接灭活黄嘌呤氧化酶,提高 SOD 活性[15],清除 OFR,抑制脂质过氧化反应,这可能是本实验中 SFI 降低大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后 BBB 通透升高程度的原因。

本实验提示参附注射液可减轻局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠血脑屏障通透性升高程度,减轻神经功能受损伤程度,发挥脑保护作用。

参 考 文 献

[1] Siesjio B K,Zhao Q,Pahlmark K,et al.Core and penumbral nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia brain damage[J].Ann Thorac Surg,1995,59(5):1316.

[2] Kontos H A.Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis Lecture[J]. Stroke, 2001,32:2712-2716.

[3] 姜亚军,何树声,丁德云.脑缺血再灌注时白细胞与脑血管内皮细胞粘附机制研究进展[J].国外医学生理、病理科学与临床分册,1996,16(4):283.

[4] 李 扬,熊利泽,秦绪军,等.参附注射液对幕上肿瘤手术患者血清 SOD 活性和 MDA 含量的影响[J].第四军医大学学报,2003,24(16):1507-1509.

[5] 闵 苏,林菁艳,张祖列. 参附注射液抗糖尿病兔心肌缺血再灌注损伤的作用[J].中华麻醉学杂志,2006,26(6):493-497.

[6] 曹 俊,闵 苏.含不同浓度参附注射液的停跳液对兔离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华麻醉学杂志,2006,26(1):61-64.

[7] Zhu W H, Leng X S, Zhu J Y. Effect of Shenfu injection on ischemic-reperfusion injury of rat liver graft[J].Hepatobiliary Pancreat Dis Int,2006,5(2):205-209.

[8] Zhang X J,Song L. Effect of shenfu injection on gastrointestinal microcirculation in rabbits after myocardial ischemia-reperfusion injury[J].World J Gastroenterol, 2006,12(27):4389-4391.

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

[10] 徐 佳,葛林宝,徐鸣曙,等.大鼠栓线法 MCAO 模型中栓线插入深度的研究[J].上海实验动物科学,2002,22(4):209.

[11] 梅元武. 络病与心脑血管疾病相关性研究及治疗新进展 通心络胶囊对缺血-再灌注大鼠血脑屏障保护作用的实验研究[N].中国医学论坛报,2003-02-20(8).

[12] Koizumi J,Yoshida Y,Nakazawa T.Experimental studies of ischemic brain edema:A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be induced in the ischemic area[J].Stroke,1986,8:1.

[13] 王 伟.严格控制实验条件,建立标准化脑缺血动物模型[J].中华神经科杂志,1998,31(5): 261.

[14] 张 忱,李 刚,徐亚萍,等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的再灌注时间窗[J].中日友好医院学报,2000,14(5):255-258.

[15] Young A R, Touzani O,Derlon J M,et al. Early reperfusion in the anesthetized baboon reduces brain damage following middle cerebral artery occlusion: a quantitative analysis of infarction volume[J]. Stroke,1997,28(3):632-638.

[16] 郑 玉,熊利泽,朱正华,等.参附注射液对大鼠短暂性局灶性脑缺血损伤的治疗时间窗[J].第四军医大学学报,2002,23(15):1353-1356.

[17] 郑传东,闵 苏. 参附注射液对全身麻醉苏醒的影响及作用机制[J].中国中西医结合杂志,2003, 23(9):651.

[18] 郑传东,闵 苏. 参附注射液对全麻病人催醒作用的临床研究[J].临床麻醉学杂志,2003,19(11): 683.

[19] Park E K,Choo M K,Oh J K,et al. Ginsenoside Rh2 reduces ischemic brain injury in rats[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(3):433-436.

[20] Kim C S, Park J B, Kim K J, et al. Effect of Korea red ginseng on cerebral blood flow and superoxide production[J]. Acta Pharmacol Sin,2002,22(12):1152-1166.

(责任编辑:冉明会)