维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)01－0049－04

复方阿魏酸对实验性大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

陈莉芬，胡长林，谢运兰

(重庆医科大学第二临床学院神经内科，重庆 400010)

【摘 要】目的:研究复方阿魏酸对实验性大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用，并探讨其作用机制。方法:采用大鼠双侧颈总动脉阻断和尾部放血并重复缺血再灌的脑缺血模型。观察复方阿魏酸对大鼠脑组织内皮素－1(ET－1)、降钙素基因相关肽(CGRP)、丙二醛、能量代谢、热休克蛋白 70(HSP70)表达及病理组织学的影响。结果:复方阿魏酸可以抑制 ET－1、丙二醛及乳酸的过量产生，提高脑组织 CGRP、ATP 及 $Na^+－K^+－ATP$ 酶活性。复方阿魏酸的以上作用存在量效关系，其作用优于阳性对照药物丹参。复方阿魏酸治疗组大脑皮层 HSP70 表达明显增强，大脑缺血损伤程度有减轻。结论:复方阿魏酸对脑缺血再灌注损伤具有保护作用，其机制与改善脑细胞能量代谢、拮抗自由基、改善微循环等多环节作用有关。

【关键词】脑缺血再灌注损伤;复方阿魏酸;大鼠

【中国图书分类法分类号】R743.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－04－01

Protection of ferulic acid compound in ischemia reperfusion brain injury in rats

CHEN Lifen, et al

(*Department of Neurology, The Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the protective effect and its mechanism of the traditional Chinese medicine complex, ferulic acid compound, on cerebral ischemia reperfusion in rats. *Methods*: Experimental cerebral ischemia reperfusion in rats was made by occluding the two－vessel and bleeding from tails. To observe the effect of ferulic acid compound on levels of endothelin－1 (ET－1), calcitonin gene－related peptide (CGRP), malonaldehyde (MDA), energy metabolism, the expression of heat shock protein 70 (HSP70) and histopathological analysis in brain tissue. *Results*: Ferulic acid compound can decrease the level of ET－1, MDA and lactic acid in brain after cerebral ischemia reperfusion in rats, and also improve the contents of CGRP, ATP and $Na^+－K^+－ATP$ase activity. The effect of ferulic acid compound was related to dosages, and its effect was better than the positive salvia miltiorrhiza. Ferulic acid compound can increase the HSP70 expression significantly and alleviate cerebral ischemic changes histopathologically. *Conclusion*: The effect of ferulic acid compound in many ways may be related to its protection against ischemia reperfusion brain injury.

【Key words】Cerebral ischemia reperfusion damage; Ferulic acid compound; Rats

近年研究发现能量耗竭乳酸蓄积酸中毒、细胞内钙超载、兴奋毒性、内皮素过量合成、自由基及其脂质过氧化等在脑缺血的病理生理机制过程中发挥着重要作用，实验通过大鼠脑缺血再灌注模型，观察复方阿魏酸对脑缺血再灌注后缺血脑组织 ET－1、CGRP、丙二醛、能量代谢、HSP70 表达及病理组织学的影响，旨在探讨该制剂对脑缺血再灌注损伤的保护作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康成年 Wistar 大鼠，雌雄各半，体重 200～250g，由重庆医科大学实验动物中心提供。复方阿魏酸由党参、川芎和甘草组成，重庆市中药研究所提供其干浸膏，用生理盐水配制成浓度为 0.2g/ml 的药液备用。复方丹参滴丸由天津天士力集团生产，用生理盐水配制成浓度为 30mg/ml 的药液备用。

1.2 方法

1.2.1 脑缺血模型[1] 大鼠经腹腔注射 3.5% 水合氯醛(10ml/kg 体重)麻醉，颈中切口分离双侧颈总动脉并结扎造成脑缺血，同时在距尾尖 0.3cm 处剪断放血 0.8ml，以热凝止血。缺血 30min 后，解开结扎扣恢复脑血流，即再灌 20min;然后再次结扎，缺血 30min 后恢复血供。假手术组只分离双侧颈总动脉。

1.2.2 动物分组与给药 60 只大鼠随机分为假手术组、模

作者介绍:陈莉芬(1969－)，女，博士生，主要研究方向:脑血管疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

型组、模型 + 复方丹参治疗组(简称丹参组)、模型 + 复方阿魏酸低剂量治疗组(简称低剂量组)及模型 + 复方阿魏酸高剂量治疗组(简称高剂量组),每组均为 12 只。给药途径:模型组、丹参组与高剂量组分别给予生理盐水、丹参药液或复方阿魏酸药液灌胃(1ml/100g 体重,药物剂量相当于 70kg 成人体重剂量的 10 倍),低剂量组给予复方阿魏酸药液灌胃(0.5ml/100g 体重)。每天 1 次,连续 5 天,于第 5 日灌胃 1h 后手术制备局灶脑缺血再灌注模型。模型组仅制备局灶脑缺血再灌注模型,不作治疗。假手术组大鼠不作血管结扎与治疗。

1.2.3 脑组织 ATP、ET－1、CGRP、乳酸、丙二醛含量、Na^+－K^+－ATP 酶活性测定

1.2.3.1 标本采集 各组于术后 24h 断头处死 8 只动物,快速取前脑,以冰生理盐水洗净血液后置液氮罐保存待用。

1.2.3.2 HPLC 法测定脑组织 ATP 含量 将约 100mg 组织样本于 0℃ 0.4mol/L $HClO_4$ 中制成 10% 脑组织匀浆。经超声粉粹 30s,再经自动高速冷冻离心(4℃ × 5000r/min × 20min),取上清液 0.2ml 加 K_2CO_3 0.1ml 中和过多的 $HClO_4$,高速离心(15000r/min)3min 后,取 15μl 进样分析。

1.2.3.3 放免法测定脑组织 ET－1、CGRP 含量 严格依据试剂盒所附说明书进行操作。将约 100mg 组织样本尽快置入 1N HAc 1ml 内研磨匀浆后,煮沸 10min。4℃ 下 3000r/min 离心 15min,取上清液以 5 倍 PBS 稀释,以调节 pH 值。之后按说明书测定标准液和样本中 ET－1、CGRP 含量之 cpm,并自动给出样品 ET－1、CGRP 值。

1.2.3.4 比色法测定乳酸、丙二醛含量、Na^+－K^+－ATP 酶活性 严格依据试剂盒所附说明书进行操作。乳酸、丙二醛、Na^+－K^+－ATP 酶试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

1.2.4 免疫组织化学和病理学观察 各组剩余动物术后 24h 开胸暴露心脏,经升主动脉插管,用生理盐水 100ml 快速冲洗,再用 4% 多聚甲醛(PH7.4,4℃)灌 1h,取脑组织经过 10% 福尔马林固定,脱水,透明,浸蜡,包埋,切片厚 5μm。切片分别用 HE 染色进行病理组织学观察及进行免疫组化测定。免疫组织化学使用 ABC 法:鼠抗 HSP70 单克隆抗体购于武汉博士德生物工程有限公司。神经细胞胞浆内出现棕黄色颗粒者为阳性。

1.3 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用方差分析和 q 检查,显著性水平 $P<0.05$。

2 结 果

2.1 各组大鼠脑内 ATP、ET－1、CGRP、乳酸、丙二醛含量、Na^+－K^+－ATP 酶活性变化(见表 1)

表 1 大鼠脑内 ATP、ET－1、CGRP、乳酸、丙二醛含量及 Na^+－K^+－ATP 酶活性的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	ATP (μg/g 脑重)	乳 酸 (μmo/g 脑重)	Na^+－K^+－ATP 酶 (μmolPi/mgPr/h)	丙二醛 (nmol/g 脑重)	ET－1 (Pg/mg 脑重)	CGRP (Pg/mg 脑重)
假手术组	8	26.45±2.24	14.02±0.53	3.46±0.31	96.4±7.88	0.56±0.04	2.39±0.41
模型组	8	10.87±0.85*	29.46±3.05*	1.34±0.20*	216.6±24.2*	1.64±0.19*	0.62±0.06*
丹参组	8	12.94±0.80*	21.92±1.67*△	1.99±0.16*△	128.4±10.41*△	1.21±0.06*△#	1.22±0.08*△
复方阿魏酸低剂量组	8	14.04±0.77*△	19.16±1.15*△	1.89±0.16*△	139.8±7.82*△	0.91±0.05*△	1.11±0.08*△
复方阿魏酸高剂量组	8	18.22±0.83*△#▲	16.28±1.19△#	2.69±0.23*△#▲	116.8±7.55△▲	0.73±0.04*△#▲	1.62±0.13△#▲

注:*$P<0.05$ 与假手术组比较 △$P<0.05$ 与模型组比较 #$P<0.05$ 与丹参组比较 ▲$P<0.05$ 与复方阿魏酸低剂量组比较

由表 1 可知,各组脑组织上述指标有明显差异。其中模型组 ET－1、乳酸、丙二醛含量最高,而 ATP、CGRP、Na^+－K^+－ATP 酶活性最低,与假手术组比较有显著性差异($P<0.05$)。3 个治疗组的以上各项指标均有不同程度的改善,复方阿魏酸高、低剂量组脑组织 ET－1、乳酸、丙二醛含量明显降低,ATP、CGRP、Na^+－K^+－ATP 酶活性显著升高,与模型组相比,有显著性差异($P<0.05$),其中复方阿魏酸高剂量组 CGRP、丙二醛及乳酸含量与假手术组比较无显著性差异($P>0.05$)。复方阿魏酸的以上作用存在量效关系,其高剂量组优于阳性对照药复方丹参滴丸的作用。提示复方阿魏酸预防和治疗性给药对大鼠脑内 ET－1、CGRP、丙二醛含量及能量代谢有一定的调节作用。

2.2 各组脑组织的 HSP70 表达

假手术组脑组织无 HSP70 免疫染色阳性细胞。模型组大脑皮层可见少量 HSP70 表达,HSP70 阳性颗料主要位于脑皮层神经细胞核及胞浆,呈棕黄色。丹参组大脑皮层 HSP70 表达有增强,复方阿魏酸高剂量治疗组大脑皮层 HSP70 表达明显增强,HSP70 阳性颗粒位于神经细胞核、胞浆和轴突、树突中,分布密,染色偏深。

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 病理组织学观察

模型组大鼠大脑皮层神经细胞呈缺血改变,神经元形态不完整,部分细胞核消失,细胞缩小,细胞周围间隙增大。丹参组及复方阿魏酸低剂量治疗组皮层神经细胞呈轻度缺血改变,细胞无缩小,细胞周围间隙改变不明显。复方阿魏酸高剂量治疗组无明显大脑缺血改变。

3 讨 论

脑缺血卒中的病理机制甚为复杂,各种病理机制诸如乳酸蓄积酸中毒、细胞内钙超载、兴奋毒性、内皮素过量合成、自由基及脂质过氧化、NO 等共同作用,导致病情加重。虽然有关的治疗药物日益增多,但理论上研究结果与临床疗效相距甚远,就是因为仅针对某单一病理机制环节,理想的药物应在尽快恢复脑血灌注水平,改善局部微循环的同时,又有在多环节阻抑有害因素的细胞保护双重作用。因此,实施"鸡尾酒"方案可能是有前途的研究。提取党参皂甙、甘草黄酮及阿魏酸并分别进行了前期脑保护实验研究,取得良好结果。现在以 3 种有效成分制备成"复方阿魏酸"制剂进行局灶脑缺血的治疗研究,以探讨复方阿魏酸多环节的综合性治疗作用。

能量衰竭是引发脑缺血后损伤机制的关键步骤[2],因此,在局灶脑缺血后迅速阻抑能量代谢紊乱,矫正乳酸酸中毒是保护细胞膜机能及离子稳态的首要问题。中药党参有"补中益气、生津养血之功效",且"甘平缓和、补而不腻,润而不燥",有抗疲劳、耐缺氧、增强抗病能力作用。实验表明复方阿魏酸有阻抑局灶脑缺血后能量代谢紊乱、增加脑组织 ATP、激活 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶活性,抑制乳酸生成的作用,发挥这种细胞保护作用的主要成份是党参皂甙。

实验结果提示,脑缺血再灌注大鼠脑中 ET－1 与 CGRP 的平衡失调,使血管收缩,特别是脑微血管收缩、闭塞,局灶脑组织缺血缺氧,甚至可影响远隔脑区血流量。复方阿魏酸能抑制 ET－1 的合成,并促进 CGRP 的释放,从而维持和调节脑组织中两者的动态平衡,改善因 CGRP 与 ET 平衡失控造成的脑血管功能紊乱,发挥 CGRP 对神经细胞缺血损伤的保护作用[3]。"川芎活血祛瘀,兼有行气作用,性善走散",复方阿魏酸发挥以上作用的机制可能与所含有机酸成份阿魏酸抑制 ET－1 合成有关,其对 ET－1 生物效应拮抗机理源于对 ET－1 受体的拮抗作用[4],对 ET－1mRNA 表达的影响尚须进一步研究。

迄今为止,国内外对自由基在缺血性脑损害中发挥了重要的病理作用已形成共识,致力于对抗自由基损害、保护脑细胞是当前研究热点之一[5,6]。自由基加速和催化神经细胞膜结构脂质过氧化是造成脑缺血不可逆损害的重要原因,丙二醛是脂质过氧化反应的最终产物,测定丙二醛的含量可反应组织中自由基含量及脂质过氧化程度[7]。甘草是一味重要中药,具"补中益气,调和诸药"之功效,其中含有丰富的黄酮成份,有很强的抗自由基作用,在体内可抑制花生烯酸代谢中脂质过氧化作用,并能提高机体超氧化物歧化酶、谷胱甘肽抗氧化活性。在本项研究中甘草黄酮与其它两种中药组分具协同作用,抗自由基活性表现更为强大,能更有效地保护神经细胞。

目前认为 HSP70 对缺血脑细胞有保护作用,过度表达 HSP70 的转基因小鼠可以抗脑缺血损伤[8]。有实验表明 HSP70 可抑制还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷磷酸(NADPH)氧化酶[9],减少氧自由基的产生,从而保护缺血性神经元免受损害,提示机体在损伤后启动自身保护机制。实验结果提示,与单纯脑缺血再灌注未治疗大鼠相比,复方阿魏酸高剂量治疗组大鼠的大脑皮层 HSP70 免疫反应明显增加,免疫反应阳性细胞数显著增多,而病理组织学观察皮层神经细胞缺血性改变有减轻。说明复方阿魏酸可能通过加速脑缺血细胞 HSP70 基因在转录和翻译水平的表达,使 HSP70 合成增多并导致神经细胞对缺血产生耐受[7],从而对急性脑缺血再灌注损伤有一定保护作用。

本项研究采用临床常用的对改善脑缺血效果肯定的丹参作为对照药物,结果显示,复方阿魏酸治疗组特别是大剂量组的作用效果强于复方丹参,其机制与改善脑细胞能量代谢、拮抗自由基、抑制血管痉挛改善微循环等有关。表明复方阿魏酸发挥多环节作用以阻抑脑缺血后多种病理机制,对脑缺血再灌注损伤具有保护作用。

参 考 文 献

[1] 强文安,左萍萍,刘景生.大鼠脑缺血再灌后 NMDA 受体、NO 及 cGMP 含量的变化[J].中国医学科学院学报,

维普资讯 http://www.cqvip.com

1999;21(3):175－178.

[2] Escuret E. Cerebral ischemic cascade[J]. Ann Fr Anesth Reanim, 1995;14(1):103.

[3] Holland JP, Sydserff SGC, Taylor WAS, et al. Calcitonin gene－related peptide reduces brain injury in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. Stroke, 1994;25(10):2055－2059.

[4] 王 峰,刘 敏,杨连春,等.咖啡酸、阿魏酸:新的非肽类内皮素拮抗剂[J].中国临床药理学与治疗学杂志,1999;4(2):85－91.

[5] Pak H. Chan. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain[J]. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2001;21(1):2－14.

[6] Durmaz R, Inal M, Angin K, et al. The effects of MK－801 and U－83836E on post－ischemic reperfusion injury in rat brain[J]. Acta－Neurobiol－Exp－(Warsz), 1999;59(2):99－104.

[7] Branghler JM, Slis H, Meldrun BS. Central nervous system trama and stroke: Biochemical consideration[J]. Free Radical Biolmed, 1989;6(2):289－292.

[8] Rajdev S, Hara K, Solway KE, et al. Overexpression of rat inducible heat shock protein 70 confers resistance to permanent focal ischemic injury in transgenic mice[J]. Soc Neuroxce Abstracts, 1998;24(3):496－498.

[9] Nishimura RN, Dwyer VE, Clegg K, et al. Comparison of the heat shock protein in cultured cortical neurons and astrocyte [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1991;9(1):39－45.

(上接第 38 页)宿主、体内复制的过程,疾病的转归,筛选有效的抗病毒药物等是目前研究人类乙型肝炎的重要实验手段。应用鸭乙型肝炎动物模型进行新药抗乙型肝炎病毒药效学评价的试验,用以往的实验方法(DHBV DNA 斑点杂交法)来检测病毒血清学标志,以及 Southern blot、原位杂交法检测肝组织中 DHBV DNA 从而进行药物抗病毒治疗效果的评价和监测及其预后的判断,虽有重要的参考价值,但若能应用 AmpliSensor－PCR 这一世界领先技术,建立动物乙肝病毒核酸定量的标准方法,使得新药药效学考核的动物学试验有一个客观的量化指标,将会为开发治疗病毒性肝炎的新药提供更科学、更有参考价值的实验资料。

参 考 文 献

[1] Nagata I, Colucci G, Gregorio GV, et al. The role of HBV DNA quantitative PCR in monitoring the response to interferon treatment in chronic hepatitis B virus infection [J]. J Hepatol, 1999;30(6):965.

[2] Kessler H H, Preininger S, Stelzl E, et al. Identification of different states of hepatitis B virus infection with a quantitative PCR assay [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000;7(2):298.

[3] Chen T, Luk J M, Cheung S T, et al. Evaluation of quantitative PCR and branched－chain DNA assay for detection of hepatitis B virus DNA in sera from hepatocellular carcinoma and liver transplant patients [J]. J Clin Microbiol, 2000;38(5):1977.