

方药研究

补肾活血与泻下及开窍活血方药对老龄大鼠
脑缺血再灌注神经肽的影响

李建生* 赵晶* 王浩* 赵君政* 郭胜典* 张卫红*

摘要 从内皮素(ET)、降钙素基因相关肽(CGRP)、神经肽 Y(NPY)、神经降压素(NT)的变化方面研究益元活血丹与大黄及血栓心脉宁对老龄大鼠脑缺血再灌注损伤防护作用的机制。结果表明,与老龄模型组比较,尼莫地平组和益元活血丹小剂量组血浆中 CGRP 水平和老龄对照组、益元活血丹大小剂量组脑组织中 CGRP 均增高。老龄模型组血和脑组织中 ET 高于老龄对照组,益元活血丹大剂量组与血栓心脉宁组及大黄组血中 ET、尼莫地平组和血栓心脉宁组脑组织 ET 均较老龄模型组降低。与老龄模型组比较,对照组、大黄组、益元活血丹大剂量组及尼莫地平组脑组织中 NPY 均降低;大黄组和血栓心脉宁组脑组织 NT 降低,而益元活血丹大剂量组和尼莫地平组增高。提示脑缺血再灌注老龄大鼠脑组织损伤与血浆和脑组织以 ET 占优势的 CGRP 与 ET 平衡失调和脑组织 NPY 与 NT 间以 NPY 占优势的平衡失调有关。各组药物通过调节 CGRP 与 ET 间和 NPY 与 NT 间平衡失调而保护脑组织,其中以益元活血丹和血栓心脉宁对 CGRP 与 ET 间平衡的作用和尼莫地平及益元活血丹改善 NPY 与 NT 间的平衡效果较全面。

主题词 脑缺血/中医药疗法 再灌注 神经肽类/代谢

脑梗塞病理生理的研究日益受到重视,其中神经肽类内皮素(ET)、降钙素基因相关肽(CGRP)、神经肽 Y(NPY)、神经降压素(NT)起着重要作用^[1,2]。本研究在中医药理论指导下,以老龄大鼠为研究对象,观察补肾活血(益元活血丹)、泻下(大黄)及开窍活血(血栓心脉宁)方药对老龄大鼠脑缺血再灌注时血浆和脑组织神经肽的影响,为指导中药防治老龄缺血性脑血管疾病的应用和探讨作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂:SD 老年大鼠 70 只,20~22 月龄,雌雄兼半,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供(沪动合证字 152 号)。放免试剂盒内皮素(ET)、神经肽 Y(NPY)、神经降压素(NT)、降钙素基因相关肽(CGRP)由北京东亚放免研究所提供。SN-682 型放免仪(上海核福光电仪器有限公司),尼莫地平片剂(山

东新华制药股份有限公司提供,批号 9712089),生大黄粉(购于河南省药材公司,经河南中医学院中药鉴定教研室鉴定);益元活血丹(河南中医学院第一附属医院制剂室提供,由何首乌 20g,黄精 15g,沙苑子 10g,蒲黄 10g,三七 10g,葛根 10g 等组成);血栓心脉宁(吉林敦化华康药业有限公司提供,由川芎、麝香、牛黄、蟾酥、水蛭等组成,吉卫药准字 1996 第 630199 号)。

1.2 动物造模与分组:参照 Pulsinelli 四血管闭塞法^[3]制作全脑缺血再灌注模型,将大鼠以 20%乌拉坦按 0.5ml/100g 剂量腹腔注射麻醉,电灼凝固双侧椎动脉,用套有硅胶的动脉夹夹闭双侧颈总动脉(CCA),造成全脑缺血,夹闭 CCA 在 30~60 秒内昏迷,翻正反射消失,双侧瞳孔放大,痛反射消失,能自主呼吸。30 分钟后开放 CCA 灌流 60 分钟。对照组大鼠仅分离双侧 CCA 并穿线,不进行电凝和夹闭处理。实验中保持大鼠体温 $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$,未昏迷或缺血后有癫痫、抽搐等并发症的大鼠均放弃。老年大鼠分为对照组、模型组、尼莫地平组、益元活血丹大小剂量组、大黄组、血栓心脉宁组。对照组和模型组处理为造模前 2 天灌胃生理盐水,每日 1 次,夹闭双侧 CCA 前 2 小时加灌 1 次;尼莫地平组、益元活血丹大小剂量组、大黄组、血栓心脉宁组造模前 2 天分别灌胃尼莫地平片剂 6mg/kg、益元活血丹 1.28g/kg、0.64g/kg、大黄粉 0.45g/kg、血栓心脉宁 0.72g/kg,均为每日 1 次,夹闭双侧 CCA 前 2 小时加灌胃 1 次。颈动脉取血,迅速分离血浆,待测 ET、NPY、NT、CGRP;取出脑右侧脑组织,待测 ET、NPY、NT、CGRP。

1.3 测定指标:颈动脉取血,以 10%EDTA. Na₂ 和抑肽酶液抗凝,4℃3000r/min 离心 10 分钟,分离血浆,放入 -20℃保存待测,测定前,置标本于冷水中复溶,再次 4℃3000r/min 离心 5 分钟。右侧脑组织,用冷生理盐水冲洗 3 遍,除去积血,称重,尽快放入 HAC1ml 中,略做研磨,然后在 100℃水浴中煮沸 10 分钟,再次研磨制成匀浆,4℃3000r/min 离心 15 分钟,取上清,放入 -20℃保存,测定前用 PBS 5 倍以上

基金项目:河南省杰出青年基金项目(1999-05)

* 河南中医学院老年医学研究室,郑州市金水大道东段 1 号 (450003)

收稿日期:2000-04-21;修回日期:2000-05-28

表 1 各组血浆和脑组织 CGRP 和 ET 水平变化比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠 数	血 CGRP (pg/ml)	脑 CGRP (pg/mg)	血 ET (pg/ml)	脑 ET (pg/mg)
老龄对照组	8	193.800±55.593	529.875±11.429*	223.099±128.148*	4.103±1.1625*
老龄模型组	8	172.075±37.251	419.528±92.858	335.910±47.929	7.9425±1.661
尼莫地平组	8	307.460±198.410*	491.390±154.087	318.244±91.004	2.596±0.787**
益元活血丹大剂量组	8	186.838±126.046	561.015±143.826*	239.371±65.624*	7.645±1.330
益元活血丹小剂量组	8	261.735±63.148*	531.978±117.250*	250.843±98.216	7.425±0.468
大黄组	8	220.976±98.908	507.106±86.231	198.133±80.694**	6.754±1.233
血栓心脉宁组	8	195.596±25.907	424.469±67.169	179.910±30.804**	2.125±0.790**

与老龄模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 各组血浆和脑组织 NPY 和 NT 变化比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠 数	血 NPY (pg/ml)	脑 NPY (pg/mg)	血 NT (pg/ml)	脑 NT (pg/mg)
老龄对照组	8	59041.275±4734.353	36.435±8.438*	42.430±12.426	0.880±0.084
老龄模型组	8	61518.400±16590.993	46.535±2.585	49.428±8.565	0.949±0.135
尼莫地平组	8	63412.275±21083.738	29.714±10.644*	41.729±16.624	1.785±1.038*
益元活血丹大剂量组	8	58311.601±11714.093	35.583±10.923*	35.214±26.064	1.575±0.190*
益元活血丹小剂量组	8	66659.551±14271.226	53.591±15.797	34.693±22.996	1.219±0.723
大黄组	7	67116.576±14947.050	35.579±9.924*	45.236±16.398	0.621±0.240*
血栓心脉宁组	8	57833.800±23098.189	47.615±17.088	44.358±18.441	0.689±0.200*

与老龄模型组比较, * $P < 0.05$

稀释,以调节 pH。采用放射免疫法测定。

1.4 统计学方法: 本文的计量资料均应用 SPSS8.0 for Windows, 采用方差分析的方法, 其数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 血浆和脑组织 ET 和 CGRP 水平的变化: 表 1 示, 血浆中 CGRP 水平尼莫地平组和益元活血丹小剂量组高于老龄模型组($P < 0.05$), 益元活血丹小剂量组接近老龄对照组($P > 0.05$)。脑组织中 CGRP 老龄对照组高于老龄模型组($P < 0.05$), 益元活血丹大小剂量组均高于老龄模型组($P < 0.05$), 接近老龄对照组($P > 0.05$)。

老龄模型组血中 ET 高于老龄对照组($P < 0.05$), 益元活血丹大剂量组和血栓心脉宁组及大黄组低于老龄模型组($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$), 接近老龄对照组($P > 0.05$)。老龄对照组脑组织 ET 低于老龄模型组($P < 0.01$), 尼莫地平组、血栓心脉宁组低于老龄模型组($P < 0.01$), 接近老龄对照组($P > 0.05$)。

2.2 血浆和脑组织 NPY 和 NT 的变化: 表 2 示, 血浆中 NPY 含量, 各用药组较老龄模型组差异不显著($P > 0.05$)。脑组织中 NPY 老龄对照组低于老龄模型组($P < 0.05$), 大黄组、益元活血丹大剂量组、尼莫地平组低于老龄模型组($P < 0.05$)。益元活血丹大小剂量组血浆中 NT 较老龄模型组有降低趋势, 但差异无显著性($P > 0.05$)。大黄组及血栓心脉宁组脑组织 NT 低于老

龄模型组($P < 0.05$), 益元活血丹大剂量组和尼莫地平组高于老龄模型组($P < 0.05$)。

3 讨论

脑梗塞是老年人常见病, 以老龄大鼠为对象研究中医药防治老年人多发的缺血性脑血管疾病具有实际意义。尼莫地平是一种选择性较强的二氢吡啶类有机钙拮抗剂, 对脑缺血再灌注脑组织损伤有明显的拮抗作用。益元活血丹具有补肾益元、活血化瘀之效, 治疗老年人脑梗塞有明显的效果, 能够抑制血小板的活化和调节 TXA_2 — PGI_2 间的平衡, 拮抗自由基损伤和脂质过氧化反应及钙超载等, 对大鼠急性脑缺血损伤具有明显的保护作用^[4~6]。血栓心脉宁是治疗心脑血管缺血性疾病的中成药, 具有开窍醒神、活血化瘀的作用。大黄具有泻下逐瘀的作用, 治疗脑梗塞具有明显的疗效^[7]。我们以往的研究结果表明, 尼莫地平、大黄、益元活血丹、血栓心脉宁对脑缺血再灌注脑组织损伤均有明显的保护作用, 以血栓心脉宁组和尼莫地平促进胶质细胞增多和益元活血丹促进神经细胞增大为显著^[8]。因此, 本研究以尼莫地平为对照, 在肾虚血瘀、窍闭血瘀、腑实等为中风病主要病机的理论指导下, 观察具有补肾活血作用的益元活血丹和开窍活血作用的血栓心脉宁及通腑泻下大黄对老龄大鼠脑缺血再灌注脑损伤保护作用机制, 为中医药防治脑梗塞提供依据。

CGRP 与 ET 是两种对血管舒缩功能调控作用完全相反的神经多肽。它们广泛分布于中枢、外周神经和

全身血管系统,以脑、心血管更加突出。CGRP及受体结合后激活腺苷酸环化酶,使细胞内cAMP水平增高,发挥强而久扩血管作用,对缺血再灌注组织起保护作用。ET收缩血管的作用参与脑缺血损伤的病理过程,主要与激活细胞膜上反应,使细胞内 Ca^{2+} 浓度增加有关^[10]。正常情况下两者保持相对稳定,维持动态平衡。病理情况时两者平衡失控,相互制约,抑制释放,甚至引起强烈持久的相互拮抗^[11,12]。脑卒中患者血浆、脑脊液(CSF)中CGRP、ET活性效应呈同步性变化,反应敏感活跃,血浆CGRP与ET,CSF中CGRP与ET均呈负相关。脑梗塞以ET升高占优势。提示两者间平衡失控是脑血管舒缩功能紊乱的重要物质基础;同期外周血CGRP、ET变化显著说明脑卒中脑循环障碍内环境紊乱是整体反应的一部分,支持机体整体论点^[1]。本研究结果显示,脑缺血再灌注使老龄大鼠脑组织CGRP含量降低,血浆和脑组织ET含量增高,造成以ET占优势的CGRP与ET的平衡失调,如此可引起持续时间长久的脑微血管收缩和低灌注状态^[13],从而更加缺血、缺氧。ET缩血管作用所激发的自由基,兴奋性氨基酸毒性、细胞内钙超载以及细胞酸平衡失调等因素,进一步加重脑组织的损伤。益元活血丹能够明显提高血浆和脑组织中CGRP含量;益元活血丹大剂量和血栓心脉宁及大黄降低血浆ET效果显著,尼莫地平 and 血栓心脉宁可使脑组织ET水平明显减低。表明4组药物对调节脑缺血再灌注老龄大鼠脑组织和或血浆CGRP与ET间的平衡均有一定的效果,其中以益元活血丹和血栓心脉宁较为全面。

NPY与NT是一组生物学作用相拮抗的活性多肽,存在神经系统和血小板中等。在中枢神经中,NPY是交感神经的辅递质,与儿茶酚胺共存于交感神经纤维中。刺激交感神经节不仅可引起NE释放,同时促进NPY分泌^[14]。血小板释放的NPY可引起血管收缩、心肌抑制和血栓形成^[15]。缺血性脑血管病患者血小板中NPY含量明显低于对照组,而血浆中NPY增高。提示在脑梗塞、动脉硬化等病理因素所致的缺血性脑血管疾病过程中,经常有血管内膜损伤,进而引起血小板聚积并伴有NPY大量释放入血,致使血浆中NPY增高^[2]。NT主要生物学效应是强烈舒张血管、降血压。缺血性脑血管病患者中,血小板提取液中NT水平增高,是由于患者血浆中含有高水平的NPY,为拮抗NPY强烈的缩血管作用和交感神经兴奋,从而促使血小板合成分泌NT增多,是血小板中NT增高的主要原因^[2]。说明在老化过程中,老龄大鼠血浆和脑组织中NPY与NT间平衡失调,血浆中以NPY为优势,脑组

织中以NT占优势,老龄大鼠血浆中以NPY占优势的平衡失调,可促进血管收缩,易导致缺血性脑血管疾病的发生,但脑组织局部以NT为主的平衡改变对血浆整体以NPY为主的平衡失调进行了有益的代偿,脑缺血再灌注使老龄大鼠这种有益的反应减低,破坏了整体与局部的协调平衡。正如本研究结果所显示,脑缺血再灌注老龄大鼠脑组织NPY含量明显增高,而NT的变化不明显,表明脑组织NPY与NT间以NPY占优势的平衡失调,交感神经兴奋,使老龄各脏器包括脑组织动脉血管收缩或痉挛,缺血缺氧,导致组织损伤。本研究结果显示,大黄、益元活血丹、血栓心脉宁及尼莫地平均在调节脑组织神经肽NPY和NT含量方面均有一定的作用,其中以尼莫地平 and 益元活血丹效果较全面,改善NPY与NT间的平衡,维护血管正常的舒缩功能,保护缺血再灌注的脑组织。

参考文献

- 1 沈君,陈曼娥,沈吉平,等. CGRP、ET活性病变效应与急性脑卒中关系的研究. 中风与神经疾病杂志,1997,14(3):138-140.
- 2 罗南萍,杨道理,陈青,等. 缺血性脑血管病患者血浆和血小板提取液神经肽Y与神经降压素的改变. 中国病理生理杂志,1999,15(8):750-752.
- 3 Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. Stroke,1979,10(3):267-272.
- 4 李建生. 益元活血方对老年腔隙性脑梗塞患者 TXB_2 和6-Keto-PGF $_{1\alpha}$ 的影响. 辽宁中医杂志,1996,23(12):531-532.
- 5 李建生. 益元活血方治疗老年人腔隙性梗塞的观察及其对血小板功能的影响. 中国中医急症,1995,4(5):199-201.
- 6 鲁万强,李建生,赵君政,等. 益元活血丹治疗实验性脑梗塞的药效学实验报告. 河南中医,1998,18(5):285-287.
- 7 李建生. 泻下法治疗中风的研究进展. 辽宁中医杂志,2000,(增刊):155-156.
- 8 李建生. 补肾活血、泻下及开窍活血方药对老龄大鼠脑缺血再灌注多器官损伤的保护作用. 河南中医,2000,20(3):13-16.
- 9 余颂涛. 内皮素——一种新的强效血管收缩肽. 心血管病学进展,1994,(4):208-211.
- 10 Bakken IJ, Vincent MB, White LR. Mutual modification of vasoactivity by calcitonin gene-related peptide and endothelin-1 in isolated porcine ophthalmic artery. Neuropeptides,1992,23(4):209-214.
- 11 谭敦勇,张继峰,陈晓彤,等. CGRP拮抗ET生物效应的研究. 中国病理生理杂志,1993,9(5):653.
- 12 Willette RN, Sauermeier C, Ezekiel M, et al. Effect of endothelin on cortical microvascular perfusion in rats. Stroke,1990,21(3):451-454.
- 13 成蓓, Haass M, Richardt G, et al. 刺激豚鼠心脏交感神经所致神经肽Y和去甲肾上腺素释放的突触前调节. 中华医学杂志,1991,71:564-569.
- 14 杨耀芳,杨丽华,施广璞. 血小板释放的一种多肽——神经肽Y. 国外医学输血及血液分册,1992,15:197-201.