

·方药研究·

脑伤乐生颗粒抗脑损伤作用机理研究

沙松华¹ 李广明² 刘猛陆²

(1. 广东省深圳市社会福利中心康复医院颅脑外伤康复科, 深圳市梅林路30号 518049; 2. 中国药科大学)

[摘要] **目的** 探讨脑伤乐生颗粒(NSLS)治疗脑损伤的作用机理。**方法** SD大鼠分组后,分别灌胃给予NSLS(12g/kg、6g/kg、3g/kg)及尼莫地平(10mg/kg),观察药物对脑含水量、脑指数、丙二醛含量、大脑中动脉阻塞后脑梗死程度、运动神经功能损伤情况的影响;健康杂种犬分组后分别灌胃给予NSLS(3.0g/kg、1.5g/kg)及尼莫地平(10mg/kg),观察药物对犬脑血流量及脑血管阻力的影响。**结果** NSLS能够显著降低脑缺血及脑损伤大鼠脑含水量、脑指数、脑组织中丙二醛含量;明显提高犬脑血流量、降低脑阻力,而对心率、血压、心电图无明显影响;明显改善脑损伤大鼠运动神经功能;显著降低大鼠中动脉阻塞后脑梗死面积。**结论** NSLS对脑损伤的治疗有显著效果。

[关键词] 脑损伤;中医药疗法;脑伤乐生颗粒

Mechanism of Naoshang Lesheng Granule on Brain Injury

SHA Song-hua¹, LI Guang-ming², LIU Meng-lu²

(1. Rehabilitation Hospital of Shenzhen Social Welfare Center, Guangdong, 518049; 2. China Pharmaceutical University)

ABSTRACT **Objective** To study the mechanism of Naoshang Lesheng Granule for brain injury. **Methods** SD rats were divided into different groups, and Naoshang Lesheng Granule (12g/kg, 6g/kg, 3g/kg) and Nimodipine (10mg/kg) were given respectively. Moisture capacity of brain, cerebral index, MDA, degree of cerebral infarction and injury condition of motor nerval function were observed. Healthy hybrid dogs of different groups were given Naoshang Lesheng Granule (3.0g/kg, 1.5g/kg) and Nimodipine (10mg/kg) respectively. Cerebral blood flow (CBF) and cerebral vascular resistance (CVR) were observed. **Results** Naoshang Lesheng Granule could reduce moisture capacity of brain, cerebral index, MDA and area of cerebral infarction and improve motor nerval function of rats with cerebral ischemia and brain injury remarkably. It could improve CBF and reduce CVR of dogs obviously and had no effect on heart rate, blood pressure and ECG. **Conclusion** Naoshang Lesheng Granule has significant therapeutic effect for brain injury.

Key Words Brain injury; Chinese medical treatment; Naoshang Lesheng Granule

脑伤乐生颗粒(NSLS)为治疗颅脑外伤及颅脑手术后所致的脑神经损伤的经验方,对运动功能障碍、语言功能障碍等症状有效。本实验通过观察该药对脑缺血、脑水肿、脑肿胀、梗死面积、运动神经功能及血管通透性等方面的作用,探讨其抗脑损伤的作用机理。

1 材料

1.1 动物

杂种犬24只,雌雄兼用,体重6.0~12.0kg;SD大鼠170只,雌雄各半,体重200~280g。每只动物仅供一种模型使用,无交叉使用。动物均由中国药科大学动物房提供。动物合格证号:苏动质字第97004号。

1.2 药品与试剂

NSLS组成:当归9g,黄芪25g,人参6g,三七10g,丹参15g,天麻10g,地龙12g,葛根12g,珍珠3g,石菖蒲9g,川芎10g等。地龙、葛根、天麻、人参用醇提法,川芎

蒸馏提取,其余水煎过滤,浓缩喷雾干燥制粒。每袋15g,临床用量每天0.7g/kg,每克颗粒剂相当于生药3.7g,临用前配成1g/ml水溶液(所有剂量均以颗粒剂计,深圳市沙松乐生实业有限公司提供,批号971016)。尼莫地平片为天津市中央制药厂产品,批号970708;维脑路通片为南通第三制药厂产品,批号960118;伊文氏蓝,购自上海化学试剂采购供应站;丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;ADP钠盐购自中国科学院上海生物化学所,批号971031;红四氮唑,上海第三试剂厂。

2 方法

2.1 NSLS对脑损伤大鼠脑含水量、脑指数及MDA含量的影响

参照文献[1, 2]方法制作大鼠脑损伤模型。SD大鼠60只,随机分成假手术组,脑损伤模型组,尼莫地平组(1mg/kg)以及NSLS高、中、低剂量组(12g/kg、6g/kg、3g/kg),每组10只。后4组每天灌胃给药1次,连

续7天。末次给药1小时后,以3%戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉大鼠,俯卧固定,中线切开头皮2.0cm,用齿科钻于左颅钻孔并扩大为0.3cm圆形骨扇,用20g砝码自30cm高处落下,撞击预置于骨窗处的圆锥体,造成左脑损伤。假手术组大鼠只切开头皮,颅骨开窗,但不致脑损伤。3小时后取脑组织,观察药物对脑含水量、脑指数及MDA的影响。

2.2 NSLS 对大鼠大脑中动脉阻塞后脑梗死程度的影响

参照文献[3]方法制作大鼠局灶性脑缺血模型。SD大鼠50只,随机分成模型组、尼莫地平组(10mg/kg)以及NSLS高、中、低剂量组(12g/kg、6g/kg、3g/kg),每组10只。除模型组外,其余4组大鼠连续7天灌胃给药,之后用7.0%水合氯醛(350mg/kg)腹腔注射麻醉,侧卧固定,在左侧眼耳连线上作切口,分离颞肌以暴露颞骨并作一小骨扇,可见大脑中动脉斜行向上,用加热的不锈钢细丝烫灼血管使其凝固而闭合。术后回笼,室温恒定在(25±1)℃,24小时后,取大鼠脑组织,进行冠状切片,共5片,0.5%红四氮唑磷酸盐溶液于37℃染色15分钟,正常组织为红色,梗死组织为白色,分别称重,梗死程度以梗死区重量占整个大脑重量的百分数来表示。

2.3 NSLS 对脑外伤大鼠运动神经功能损伤的影响

大鼠60只,随机分成空白组、脑外伤模型组、尼莫地平组(10mg/kg)和NSLS高、中、低剂量组(12g/kg、6g/kg、3g/kg)。在给予相应药物之前,将大鼠用乙醚麻醉,俯卧固定,中线纵切开头皮约2.0cm,用齿科钻于左颅钻孔,并扩大为直径为0.5cm圆形骨扇,用20g砝码自40cm高处垂直落下,撞击预置于骨窗处的圆锥体,造成左脑损伤,空白组大鼠只切开头皮,颅骨开窗但不致脑损伤,用酒精棉球轻擦并缝合手术伤口。将大鼠放回鼠笼,每天灌胃给药1次,并对运动神经功能进行评分,连续7天(d1~d7)。0分:正常,无活动障碍,大鼠被提尾悬空时两前肢向地面伸直,置动物于软塑料板上轻握鼠尾,在鼠肩后施加侧向推力使鼠滑动约

10cm,手感左右推动的阻力相等;1分:运动轻度障碍,大鼠被提尾悬空时,脑损伤对侧前肢呈屈曲、抬高、肩内收、肘关节伸直;2分:运动轻度障碍,损伤大脑半球对侧的侧向推动阻力明显降低;3分:运动严重障碍,损伤大脑半球对侧前肢失去支持功能;4分:动物前后肢失去支持功能;5分:死亡。

2.4 NSLS 对麻醉犬脑血流量及脑血管阻力的影响

参照《中药药理研究方法学》^[4]及文献[5]方法,将健康杂种犬24只分成空白对照组、尼莫地平组(10mg/kg),NSLS高剂量组(3.0g/kg)及NSLS低剂量组(1.5g/kg),每组6只。3%戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉犬,仰卧位固定,颈部正中中线切口,行气管插管。分离右颈总动脉,并结扎颈外动脉。以小弯止血钳将椎动脉与周围结缔组织分离,穿线。在两动脉下放置电磁流量计。分离一侧股动脉以测血压,针型电极插入四肢皮下记录Ⅱ导联心电图。上腹正中部切口开腹分离十二指肠,切开并插入一塑料管。各项指标稳定后,经十二指肠给药,分别按不同剂量组滴入药物,10分钟后记录首次观察指标,每10分钟记录1次脑血流量及血管阻力各项数值。按下述公式计算^[4,5]:

脑血流量(ml/min)=[颈内动脉血流(ml/min)+椎动脉血流(ml/min)]×100(g)/一侧脑重(g);脑血管阻力(mmHg·min/ml·100g)=血压/脑血流量。

2.5 统计学方法

采用SPSS 11.0统计软件分析,数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)或百分率表示,计量资料用t检验,计数资料用χ²检验。

3 结果

3.1 NSLS 对脑损伤大鼠脑含水量、脑指数及MDA含量的影响

表1示,脑组织损伤后,脑组织含水量、MDA含量和脑指数均明显上升(均P<0.01),NSLS及尼莫地平均能够有效地降低以上各指标(P<0.05或P<0.01),NSLS各剂量组对脑含水量及脑指数的作用差异无显著性意义,对MDA的作用呈剂量依赖性。

表1 NSLS 对脑损伤大鼠脑含水量、脑指数及MDA含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量	脑含水量(%)	脑指数	MDA(nmol/mg)
假手术组	10	—	77.95±0.92	0.67±0.05	4.11±0.18
脑损伤模型组	10	—	80.32±0.99 [△]	0.73±0.04 [△]	6.56±0.51 [△]
NSLS高剂量组	10	12g/kg	78.58±0.83**	0.68±0.05*	5.30±0.36**
NSLS中剂量组	10	6g/kg	79.14±0.75**	0.68±0.06*	5.85±0.37**
NSLS低剂量组	10	3g/kg	79.26±1.11*	0.72±0.04	6.03±0.48*
尼莫地平组	10	10mg/kg	79.27±0.85*	0.69±0.03*	5.96±0.37**

与假手术组比较,△P<0.01;与脑损伤模型组比较,*P<0.05,**P<0.01

3.2 NSLS 对大鼠大脑中动脉阻塞后脑梗死程度的影响

表2示, NSLS 及尼莫地平平均能够使大鼠大脑中动脉结扎所诱发的脑梗死程度显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。NSLS 低、中、高剂量组及尼莫地平组下降幅度分别为14.8%、21.6%、23.4%。NSLS 中、低剂量组与尼莫地平组比较差异有显著性意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3.3 NSLS 对脑外伤大鼠运动神经功能的影响

表3示, 大鼠脑损伤后, 运动神经功能明显降低, 给予 NSLS 后大鼠运动神经功能有所恢复和改善。

3.4 NSLS 对麻醉犬脑血流量、脑血管阻力的影响

表4示, NSLS 能够明显升高犬脑血流量, 给药后10分钟脑血流量开始上升, 100~140分钟达最高峰,

表2 NSLS 对大鼠大脑中动脉阻塞后脑梗死程度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	剂量	梗死程度
模型组	10	—	16.2±2.6
NSLS 高剂量组	10	12g/kg	12.4±1.8**
NSLS 中剂量组	10	6g/kg	12.7±1.9**△
NSLS 低剂量组	10	3g/kg	13.8±2.3**△△
尼莫地平组	10	10mg/kg	10.8±1.7**

与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与尼莫地平组比较, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$

随后脑血流量开始下降, 但仍比基础血流量高。3个给药组同一时段差异无显著性意义。表5示, NSLS 给药10分钟后, 脑血管阻力开始下降, 60~120分钟时达到峰值, 随后脑血管阻力开始增加, 但仍比基础阻力低。

4 讨论

本实验结果证实, NSLS 可显著增加麻醉犬脑血流量, 降低脑血管阻力, 改善脑缺血, 从而有效地改善脑血管循环; NSLS 可明显降低脑缺血时脑血管通透性、脑含水量以及 MDA 含量, 对脑损伤大鼠运动神经功能有显著的改善作用, 这些结果与临床应用 NSLS 能有效改善脑损伤患者的语言、运动功能的结果一致。

脑损伤后, 局灶性或全脑缺氧引起脑水肿, 灌流障碍, 毛细血管通透性过高或滤过性血压升高, 可使脑组织液增多, 脑细胞肿胀。动物实验表明, 脑损伤后, 脑含水量增加, 脑指数及 MDA 含量升高。NSLS 为补气养血益脑之药, 能有效减轻脑水肿, 增加脑血流, 降低脑血管阻力, 改善脑缺血, 具有减轻脑细胞损伤, 保护未损伤脑细胞的作用。

脑损伤后, 脑血流自动调节功能紊乱, 严重影响脑的正常代谢, 促发脑自由基反应, 细胞钙超载, 兴奋性氨基酸、儿茶酚胺等神经递质释放紊乱^[6], 从而加剧脑

表3 NSLS 对脑外伤大鼠运动分数的影响(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	鼠数	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
脑外伤模型组	—	10	3.1±0.3	3.3±0.5	3.3±0.5	3.2±0.4	3.4±0.7	3.7±0.8	3.7±0.8
NSLS 高剂量组	12g/kg	10	3.0±0.7	2.8±0.6	2.5±0.5**	2.5±0.5**△	2.4±0.5**	2.0±0.6**	2.0±0.6**
NSLS 中剂量组	6g/kg	10	3.0±0.5	2.9±0.6	2.7±0.5*	2.7±0.5**△	2.5±0.5**	2.0±0.5**	2.0±0.5**
NSLS 低剂量组	3g/kg	10	3.0±0.5	2.9±0.6	2.8±0.4*	2.5±0.5**△	2.5±0.5**	2.6±0.5**△	2.6±0.5**△
尼莫地平组	10mg/kg	10	2.9±0.6	2.7±0.5*	2.6±0.5**	2.0±0.5**	2.2±0.8**	2.0±0.6**	2.0±0.6**

与脑外伤模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与尼莫地平组比较, △ $P<0.05$

表4 NSLS 对麻醉犬脑血流量的影响(ml/min, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	犬数	给药前	40分钟	60分钟	80分钟	100分钟	140分钟
空白对照组	—	6	113.5±18.4	116.2±16.4	117.6±14.9	117.3±16.0	113.5±16.6	114.9±18.2
NSLS 高剂量组	3.0g/kg	6	114.7±16.2	147.3±24.0*	160.8±24.3**	170.8±27.4**	167.5±26.2**	145.5±22.9*
NSLS 低剂量组	1.5g/kg	6	115.3±21.9	135.7±22.9	146.1±22.7*	151.3±22.6*	154.8±22.1*	141.0±23.0
尼莫地平组	10mg/kg	6	117.9±14.7	148.4±25.1*	165.5±25.6**	173.8±26.8**	180.2±25.3**	162.2±23.6**

与本组给药前比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表5 NSLS 对麻醉犬脑血管阻力的影响(mmHg·min/ml·100g, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	犬数	给药前	30分钟	60分钟	120分钟
空白对照组	—	6	0.89±0.13	0.88±0.14	0.85±0.11	0.83±0.11
NSLS 高剂量组	3.0g/kg	6	0.90±0.11	0.74±0.10*	0.63±0.08**△	0.63±0.08**△△
NSLS 低剂量组	1.5g/kg	6	0.96±0.18	0.79±0.12	0.68±0.09**△△	0.66±0.09**△△
尼莫地平组	10mg/kg	6	0.88±0.10	0.68±0.11**	0.50±0.07**	0.40±0.04**

与本组给药前比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与尼莫地平组同时段比较, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$

肝细胞凋亡可以达到保护肝细胞的作用。

本课题在既往研究的基础上,再次应用中药提取物雷公藤多苷片灌胃建立小鼠急性 DILI 模型,经肝功能检测、普通病理观察和电镜下细胞超微结构观察,小鼠血清 ALT、AST 明显升高,肝细胞广泛损伤,细胞超微结构显著变化,说明造模成功。研究结果显示,模型组小鼠血清 IL-18 水平明显升高,说明雷公藤多苷所致的 DILI 与 IL-18 有一定关系。而保肝解毒颗粒可使血清 IL-18 水平明显降低,说明保肝解毒颗粒可能通过有效降低模型小鼠血清 IL-18 水平,减少相关因子的产生,影响 FasL 的表达,而起到减低肝脏损害的作用。本课题研究还证实,雷公藤多苷可使小鼠肝细胞出现显著凋亡,说明其所致的 DILI 与其能够诱导肝细胞发生凋亡有关。而保肝解毒颗粒可使小鼠肝细胞凋亡程度不同程度地减轻,说明保肝解毒颗粒可对雷公藤多苷诱导的小鼠肝细胞凋亡产生抑制作用。

保肝解毒颗粒是课题组在多年实践中总结出来的防治 DILI 行之有效的经验方药,全方寒温并用,苦甘齐进,泻补兼施,药仅三味,少而精当,针对 DILI 湿热毒邪蕴结、肝(胆)脾(胃)不和的基本病机,共奏清热燥湿、凉肝解毒、疏肝理气、健脾和胃之功,俾毒邪去,湿热除,肝气舒,脾胃和,则诸症自解。

本研究显示,保肝解毒颗粒可通过降低雷公藤多苷所致的急性 DILI 小鼠血清 IL-18 水平、抑制肝细胞凋亡等环节,起到有效预防 DILI 的作用。实验结果进

一步阐明了 DILI 的发病机理和中药保肝解毒颗粒的作用机制,为临床防治本病和新药保肝解毒颗粒的开发奠定了良好基础。

参考文献

- [1]彭勃,苗明三,王宇亮.雷公藤多甙片致小鼠急性肝损伤的初步探讨.中国中药杂志,2003,28(11):1067~1070.
 - [2]彭勃,苗明三,王宇亮.保肝解毒胶囊对雷公藤多甙片所致小鼠急性肝损伤保护作用的实验研究.河南中医学院学报,2004,19(2):18~20.
 - [3]Trautwein C, Rakemann T, Brenner DA, et al. Concanavalin A-induced liver damage: activation of intracellular pathways triggered by tumor necrosis factor in mice. Gastroenterology, 1998, 114(5): 1035~1045.
 - [4]Fiorucci S, Santucci L, Antonelli E, et al. NO-aspirin protects from T cell-mediated liver injury by inhibiting caspase-dependent processing of Th1-like cytokine. Gastroenterology, 2000, 118(2): 404~421.
 - [5]Dao T, Ohashi K, Kayano T, et al. Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. Cell Immunol, 1996, 173(2): 230~235.
 - [6]Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, et al. Involvement of the CD95(APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. J Exp Med, 1995, 182(5): 1223~1230.
 - [7]Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. Science, 2002, 296(5573): 1635~1636.
- (收稿日期:2005-11-22;修回日期:2006-01-04)

(上接第168页)

损伤的继发性病理损害,损伤神经功能,出现运动、语言、感觉、智能障碍。而 NSLS 补气养血、益脑开窍、祛瘀通络、调节大脑机能,且方中的人参皂甙 Rg1 可对神经细胞抑制高浓度谷氨酸介导升钙效应,阻断钙离子的过量内流^[7];人参中的 Rb1、Rg1 有抑制过氧化作用,直接清除氧自由基,还可诱导抗氧化酶消除自由基^[7]。在动物实验中,NSLS 可显著增加脑血流量,改善脑缺血的诸多指标,有效改善脑血管循环。

NSLS 的功效为养血补血,方中当归养血化瘀、补气活血,与人参、川芎配伍,使气血互补、互用、互生。现代药物分析,当归对脑缺氧、脑缺血后再灌注脑组织脂质过氧化物增高有明显的抑制作用^[8]。实验表明,当归有改善脑循环作用,能明显增强以脑缺氧为主的缺氧耐受力。NSLS 在动物实验中明显增加脑供血、减低脑血管阻力,能够使大鼠大脑中动脉结扎所诱发的脑梗死面积显著减少。

参考文献

- [1]王锐.急性脑损伤后继发性脑肿胀和脑水肿发生机制的实验研究.中国创伤杂志,1998,14(4):200~202.
 - [2]张志文.中枢性心房钠尿肽对创伤性脑水肿影响的实验研究.第四军医大学学报,1994,15(3):200~202.
 - [3]严薇瑾.大鼠局灶性脑缺血模型的研究.中华神经精神科杂志,1988,21(1):3~5.
 - [4]陈奇.中药药理研究方法学.北京:人民卫生出版社,1994:168.
 - [5]曾贵云.维替新拉亭对犬和猫脑血流、血管阻力及血压的影响.中国药理学报,1991,12(5):471~474.
 - [6]江基尧,朱诚.现代脑损伤.上海:上海科技文献出版社,1995:19.
 - [7]中国医学科学院药物研究所.中草药现代研究.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1996:439~440,451~453.
 - [8]康健,郭力弓.中药现代研究与临床应用.北京:学苑出版社,1994:287.
- (收稿日期:2006-04-07;修回日期:2006-06-19)