

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.12.015

补肾生髓方对脑缺血再灌注大鼠神经—内分泌功能的影响

张红梅¹, 胡建鹏^{*}, 王 键¹, 徐 伟², 谭 辉², 曹 旭¹

(1. 安徽中医药大学中医临床学院, 安徽省合肥市蜀山区梅山路 103 号, 230038; 2. 安徽中医药大学省部共建新安医学教育部重点实验室)

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (2012BAI26B01); 安徽省学术和技术带头人及后备人选学术科研活动资助项目

摘要 目的 探讨补肾生髓方治疗缺血性中风的可能机制。方法 雄性 SD 大鼠采用惊恐加房劳的复合伤肾法制造肾精亏虚模型, 联合大脑中动脉线栓法改良制作左侧局灶性脑缺血再灌注大鼠模型。将造模成功的 24 只大鼠随机分为模型组、脑络欣通组和补肾生髓方组, 每组 8 只。另随机取正常大鼠 8 只为正常组。脑络欣通组和补肾生髓方组分别按每天 8.54 g/kg、10.25 g/kg 灌胃相应药物, 造模后每天灌胃 2 次; 模型组予以等量的生理盐水灌胃, 各组均持续 2 周。正常组不做处理。检测各组大鼠促肾上腺皮质激素 (ACTH)、促甲状腺素 (TSH)、红细胞生成素 (EPO)、血钙及血磷值。结果 与正常组比较, 模型组大鼠血浆 ACTH 和血清 TSH、EPO、血钙值显著降低, 而血磷值升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 脑络欣通组血磷值降低, 补肾生髓方组血清 TSH 值升高、血磷值降低 ($P < 0.05$)。结论 补肾生髓方药能升高肾精不足型脑缺血再灌注大鼠血清 TSH 值、降低血磷, 具有调节神经—内分泌的作用。

关键词 脑缺血再灌注; 补肾生髓方; 神经—内分泌调节

脑血管疾病是中老年人的常见病, 其中以脑卒中为主, 尤以缺血性中风最为多见, 且近年来呈上升趋势, 占卒中 80% 左右^[1]。中医学认为, 缺血性中风之病位在脑之脉络, 病机以肾精气亏损为根本^[2]。补肾生髓方为新安名方, 治疗缺血性中风后遗症具有一定的临床疗效^[3]。本研究建立缺血性中风肾精不足病证模型, 以前期研究^[4-6]较为成熟的方药脑络欣通为对照, 观察补肾生髓方对此模型大鼠神经—内分泌功能的影响, 探讨其治疗缺血性中风的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠 120 只, 体重 280 ~ 340 g, 雄性 40 只, 雌性 80 只, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(皖) 2011-002。

1.2 药物与试剂

补肾生髓方: 龟甲胶 10 g、鹿角胶 10 g、狗脊 10 g、杜仲 10 g 等, 脑络欣通: 黄芪 30 g、三七粉

10 g、川芎 10 g、红花 6 g 等, 由安徽中医学院中药制剂室制备成分别相当于原生药 2.4 kg/L、6.0 kg/L 的煎剂, 冷藏备用。庆大霉素注射液, 山东鲁抗医药股份有限公司 (批号: 20110515); 促肾上腺皮质激素 (ACTH) 放免试剂盒 (批号: 20110820)、促甲状腺素 (TSH) 放免试剂盒 (批号: 20120212)、红细胞生成素 (EPO) 酶联免疫试剂盒 (批号: 20120320) 均购自北京北方生物技术研究所。

1.3 模型制备

1.3.1 肾精亏虚模型建立^[7-8] 采用惊恐加房劳的复合伤肾法制造肾精亏虚模型。每天每只雄鼠按照 1:2 的比例与动情期雌鼠合笼, 每天 20:00 投入动情期雌鼠, 至次日 8:00 取出, 20:00 再投入另一批动情期雌鼠, 至次日 8:00 取出, 如此反复, 模拟房劳伤肾; 每日 8:00-20:00, 将雄鼠放入特制的小铁丝笼内, 再将此小笼固定在装有 1 只成年大猫的大笼边, 让猫与大鼠仅一网之隔, 使猫爪能碰到但无法抓到大鼠, 并每天 10:00、15:00 各另取 2 只活的小鼠喂猫示众, 使其惊恐伤

* 通讯作者: hujianpeng351@126.com, (0551) 65165478

肾。连续 21 天, 制造肾精亏虚模型。

1.3.2 局灶性脑缺血再灌注模型建立^[9-10] 采用大脑中动脉线栓法改良制作左侧局灶性脑缺血再灌注动物模型。术前动物 12 h 禁食禁水, 称重后 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉; 行颈部正中切口, 用外科镊分离颈总动脉 (CCA)、颈外动脉 (ECA)、颈内动脉 (ICA), 电凝或剪断颈外动脉的分支 (枕动脉、甲状腺上动脉), 结扎 ICA 的分支翼腭动脉; 手术显微镜下结扎 ECA 远心端, 并在近心端打结, 在两结之间用眼科剪做斜剪切口, 快速插入制备好的手术尼龙线; 剪断斜剪切口处, 向下轻拉 ECA 使之与 ICA 成近似直线, 在 ECA 内缓慢推进手术尼龙线, 直至感觉有少许阻力为止 (从 ECA 与 ICA 分叉处起始插入约 22 mm 左右); 庆大霉素注射液冲洗伤口后逐层缝合组织皮肤, 尼龙线留置 120 min 后, 固定好大鼠颈部拔出, 使缺血/再灌注。脑缺血 2h 再灌注后进行评分, 2~3 分者入选。评分标准: 0 分, 无神经缺损症状; 1 分, 不能完全伸展对侧前爪; 2 分, 向对侧转圈; 3 分, 向对侧倾倒; 4 分, 不能自发行走, 意识丧失。

1.4 动物分组及给药

按体重采用随机数字表法选取正常大鼠 8 只 (正常组), 另将造模成功的 24 只大鼠随机分为模型组、脑络欣通组和补肾生髓方组, 每组 8 只。脑络欣通组和补肾生髓方组分别按每天 8.54 g/kg、10.25 g/kg 灌胃 2 次。正常组与模型组予以等量的生理盐水灌胃。各组均持续 2 周。

1.5 观察指标及方法

各组于灌胃后 2 周经腹主动脉取血 2 ml, 注入 10% EDTA 二钠 30 μ l 的试管中摇匀, 4 $^{\circ}$ C, 3000 r/min 离心 10 min, 分离血浆, -20 $^{\circ}$ C 保存待测; 全血标本于室温放置 2 h 后于 3500 r/min 离心 20 min, 取上清置于 -20 $^{\circ}$ C 保存待测。血浆 ACTH、血清 TSH 均使用放射免疫检测, 由安徽医科大学核医学检测中心完成, 血清 EPO 使用 ELISA 法检测, 血清钙、磷由自动生化仪检测。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠血浆 ACTH、血清 TSH 水平比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组血浆 ACTH、血清 TSH 水平均明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 补肾生髓方组血清 TSH 水

平明显升高 ($P < 0.05$); 脑络欣通组与补肾生髓方组各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组脑缺血再灌注大鼠血浆 ACTH、血清 TSH 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ACTH (pg/ml)	TSH (μ IU/ml)
正常组	8	63.64 $\pm$ 19.26	1.06 $\pm$ 0.53
模型组	8	36.93 $\pm$ 16.13*	0.76 $\pm$ 0.20**
脑络欣通组	8	51.10 $\pm$ 16.77	0.92 $\pm$ 0.19
补肾生髓方组	8	59.57 $\pm$ 23.37	1.02 $\pm$ 0.28 $^{\Delta}$

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.2 各组大鼠血清 EPO、血钙及血磷水平比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组大鼠血清 EPO、血钙及血磷水平差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 脑络欣通组和补肾生髓方组大鼠血磷水平明显降低 ($P < 0.05$); 脑络欣通组与补肾生髓方组各指标比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组脑缺血再灌注大鼠血清 EPO、血钙及血磷水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	EPO (pg/ml)	血钙 (mmol/ml)	血磷 (mmol/ml)
正常组	8	382.32 $\pm$ 18.07	2.34 $\pm$ 0.13	2.34 $\pm$ 0.13
模型组	8	335.37 $\pm$ 18.11**	2.11 $\pm$ 0.17**	2.72 $\pm$ 0.33*
脑络欣通组	8	352.48 $\pm$ 29.99	2.24 $\pm$ 0.17	2.27 $\pm$ 0.27 $^{\Delta}$
补肾生髓方组	8	362.47 $\pm$ 49.20	2.25 $\pm$ 0.15	2.22 $\pm$ 0.39 $^{\Delta}$

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

下丘脑-垂体-肾上腺皮质/性腺/甲状腺是神经、内分泌和免疫网络的三大轴, 维持着机体内环境的稳态。如果网络中任何系统功能紊乱均不可避免地影响其他系统的功能, 导致疾病的产生。ACTH 是脊椎动物脑垂体分泌的一种多肽类激素, 其功能是促进肾上腺皮质组织的增生及皮质激素的生成和分泌。ACTH 缺乏, 将引起肾上腺皮质萎缩、分泌功能减退。TSH 是腺垂体分泌的促进甲状腺生长和机能的激素。EPO 是由肾皮质管周的细胞合成, 靶组织是骨髓。EPO 可促使红系前体细胞的分化; 且可促进晚期红系祖细胞增殖, 并向前体细胞分化; 进一步加速网织红细胞的释放; 提高红细胞膜抗氧化酶的活性, 使红细胞生成增多。任何因素致使 EPO 减少或功能减弱, 均可使红细胞合成减弱。红细胞减少, 器官能量供给不足, 尤其是心、脑等重要器官的能量供给不足, 则会出现器官功能异常的表现。钙是骨矿化的基本物质, 磷也是人体内重要的元素之一。磷可促进骨基质合成和

骨矿物质沉积, 改变骨细胞对钙的摄入, 导致骨细胞结构和功能改变。体内血钙、血磷受到多种内分泌激素的调节, 使其保持在一个较小的范围内波动, 才能保持细胞正常进行新陈代谢和信息传递^[1]。

补肾生髓方中的龟甲胶具有滋阴潜阳、益肾健骨、养血补心之功; 鹿角胶能补肝肾、益精血; 狗脊可补肝肾、强腰膝等。前期研究^[12-13]发现, 补肾生髓方不仅可促进局灶性脑缺血后神经干细胞的增殖分化, 还可以营养神经、减轻缺血半暗带区神经细胞突触损伤、促进神经细胞突触再生, 提高中枢神经系统可塑性, 抗脑缺血损伤。本研究发现, 肾精不足型脑缺血再灌注模型大鼠血 ACTH、TSH、EPO 和血钙值均低于正常组, 血磷则高于正常组; 补肾生髓方药可明显上调血清 TSH、下调血磷水平, 且具有上调 ACTH、EPO 和钙水平的趋势。因此, 补肾生髓方药对中风后遗症的治疗机制可能为增加了组织供血供氧, 调节血钙、血磷水平, 既强化了骨骼的结构又保证了细胞新陈代谢和信息传递。

参考文献

- [1] 王新, 黄如训. 影响缺血性卒中患者溶栓治疗的因素[J]. 国外医学脑血管疾病分册, 2002, 10(4): 268-270.
- [2] 严一文. 试论脑病(中风)从肾论治[J]. 中国中医急症, 2011, 20(9): 1450-1451.
- [3] 王仲奇. 王仲奇医案[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1992: 78-79.
- [4] 胡建鹏, 王键, 吴文萍, 等. 脑络欣通及其拆方对脑缺血再灌注大鼠海马 CA1 区 Fas、FasL 蛋白及皮质 Fas mRNA 表达影响的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(4): 720-724.
- [5] 王键, 谭辉, 胡建鹏, 等. 脑络欣通对大鼠中动脉闭塞缺血再灌注损伤模型大鼠空间认知功能和局部脑血流量的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(8): 687-690.
- [6] 王键, 谭辉, 胡建鹏, 等. 脑络欣通对局灶性脑缺血大鼠凝血与纤溶系统的影响[J]. 中医杂志, 2013, 53(22): 1954-1956.
- [7] 沈雁, 匡调元, 张伟荣, 等. “恐伤肾”的实验研究[J]. 中国医药学报, 1991, 6(1): 13-16.
- [8] 李一奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 278.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 54-91.
- [10] 李净, 王键. 益气活血法改善气虚血瘀证局灶性脑缺血再灌注模型鼠生物学特征的有效性评价[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(4): 22-26.
- [11] 王迪浚, 金惠铭. 人体病理生理学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 288-298, 822-842.
- [12] 吕磊, 胡建鹏, 王键, 等. 益气活血方与补肾生髓方对局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血半暗带形态学影响[J]. 安徽中医学院学报, 2010, 29(3): 39-42.
- [13] 胡建鹏, 周会, 王键, 等. 益气活血方和补肾生髓方对局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血半暗带 Notch-1 和 Jagged1 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(3): 483-486.

Effects of *Bushen Shengsui Formula* on Neuroendocrine Function in Cerebral Ischemia and Reperfusion Rats ZHANG Hongmei, HU Jianpeng, WANG Jian, XU Wei, TAN Hui, CAO Xu

(Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Province 230038)

ABSTRACT Objective To study the effects of *Bushen Shengsui Formula* (formula to supplement the kidney and engender marrow) on neuroendocrine function in cerebral ischemia and reperfusion rats with kidney essence insufficiency syndrome. **Methods** The kidney essence insufficiency models were established in male SD rats by fear and excessive sexual intercourse. The left focal cerebral ischemia and reperfusion rat models were established with improved middle cerebral artery occlusion method. Eight normal rats were chosen as the normal group. Twenty-four successful modeling rats were randomized into the model group, *Naoluo Xintong* group and *Bushen Shengsui Formula* group, with 8 in each. The *Naoluo Xintong* group and *Bushen Shengsui Formula* group was respectively gavaged with 8.54g/kg and 10.25g/kg corresponding drugs twice daily. The model group was gavaged with the same amount of normal saline. The intragastric administration lasted for 2 weeks. The levels of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), thyroid stimulating hormone (TSH), erythropoietin (EPO), serum calcium and phosphorus were detected. **Results** Comparing with the normal group, the levels of ACTH, TSH, EPO and serum calcium were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) but the level of serum phosphorus was significantly increased ($P < 0.05$) in the model group. Comparing with the model group, the levels of serum phosphorus were significantly decreased in both groups and the level of TSH was significantly increased in the *Bushen Shengsui Formula* group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Bushen Shengsui Formula* can increase TSH, reduce serum phosphorus and regulate the neuroendocrine function of cerebral ischemia reperfusion rats with kidney essence insufficiency syndrome.

Keywords cerebral ischemia and reperfusion; *Bushen Shengsui Formula*; nerve-endocrine regulation

(收稿日期: 2013-09-25; 修回日期: 2013-12-26)

编辑: 邓 媛