

通窍化栓汤对脑缺血再灌注模型大鼠 脑组织抗氧自由基的影响

朱广旗* 吴远华 曹丽平

(贵阳中医学院第一附属医院, 贵州省贵阳市宝山北路 71 号, 550001)

基金项目: 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目 (200967)

* 通讯作者: zhuguangqii@163.com

[摘要] 目的 研究通窍化栓汤对脑缺血再灌注模型大鼠脑保护的可能作用机制。方法 将 50 只局灶性脑缺血再灌注模型大鼠随机分为模型组及通窍化栓汤高、中、低剂量组和丹参注射液组, 另设假手术组只进行麻醉和血管分离术, 各组均 10 只。通窍化栓汤高、中、低剂量组分别按 17.50、8.75、4.35 g/(kg·d) 灌胃通窍化栓汤, 丹参注射液组给予丹参注射液 5.25 g/(kg·d) 腹腔注射, 模型组给予等量生理盐水腹腔注射, 假手术组仅抓取, 各组每日 1 次, 共 15 天。测定各组大鼠脑组织丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶(SOD)含量。结果 与模型组比较, 其余各组大鼠脑组织 MDA 含量降低, SOD 水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与通窍化栓汤高剂量组比较, 通窍化栓汤中、低剂量组及丹参注射液组 MDA 水平升高, 丹参注射液组 SOD 水平降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 通窍化栓汤可能通过降低脑缺血再灌注模型大鼠脑组织 MDA 水平, 升高 SOD 水平, 从而减轻脑缺血损害。

[关键词] 脑缺血再灌注; 通窍化栓汤; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

Effects of Tongqiao Huashuan Decoction on Antioxidant Free Radical in Brain Tissues of Cerebral Ischemia Reperfusion Model Rats
ZHU Guangqi, WU Yuanhua, CAO Liping

(First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guizhou Province 550001)

ABSTRACT **Objective** To study the protective effect and mechanisms of Tongqiao Huashuan Decoction (decoction for orifice-free and thrombolysis) on cerebral ischemia reperfusion model rats. **Methods** Fifty model rats were randomized into model group, Tongqiao Huashuan Decoction high-dose, middle-dose and low-dose groups and salvia injection group, with 10 in each. Another 10 healthy SD rats were selected as sham operation group. The Tongqiao Huashuan Decoction high-dose, middle-dose and low-dose groups were gavaged with 17.50 g/(kg·d), 8.75 g/(kg·d) and 4.35 g/(kg·d) Tongqiao Huashuan Decoction respectively. The salvia injection group was intraperitoneally injected with 5.25 g/(kg·d) salvia injection. The model group was intraperitoneally injected with normal saline. The rats in the sham operation group were caught only. Each group was administered once daily for 15 days. The contents of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in brain tissues were detected. **Results** Comparing with the model group, the contents of MDA were significantly decreased but the contents of SOD were significantly increased in other groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the Tongqiao Huashuan Decoction high-dose group, the contents of MDA in the Tongqiao Huashuan Decoction middle-dose and low-dose groups and salvia injection group were significantly increased but the content of SOD in the salvia injection group was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Tongqiao Huashuan Decoction can reduce ischemic brain damage by decreasing the content of MDA and increasing the content of SOD in brain tissues of cerebral ischemia reperfusion model rats, especially with high dose therapy.

Keywords cerebral ischemia reperfusion; Tongqiao Huashuan Decoction; malondialdehyde; superoxide dismutase

近年来,氧化应激学说在缺血性脑血管疾病中的地位日益重要^[1]。脑缺血后氧化物生成系统和抗氧化系统之间的平衡被打破,组织内生成大量的自由基可以引起细胞膜脂质过氧化,从而导致细胞膜破坏、细胞溶解、组织水肿和线粒体功能下降等一系列损害作用^[2]。本研究采用可逆性大脑中动脉线栓法制备局灶性脑缺血再灌注模型,观察通窍化栓汤对脑缺血再灌注大鼠的神经功能缺损评分、脑组织氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平的影响,探讨通窍化栓汤对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠在

抗氧自由基水平方面的可能作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

健康清洁级 SD 大鼠 90 只,雌雄各半,体重 300~350 g,由重庆腾鑫生物技术有限公司提供,动物许可证号:SCXK(渝)2007-0006。

1.2 主要仪器

FA1204B 型分析天平(上海天平仪器厂);752 型紫外分光光度计(南京麒麟分析仪器有限公司);SP-Max 3500FL 型酶标仪(上海闪谱生物科技有限

公司)。

1.3 试剂及药物

MDA 试剂盒(批号:20070316)、SOD 试剂盒(批号:20070524),由南京建成生物有限公司提供;丹参注射液(正大青春宝药业有限公司,国药准字 Z33020177);通窍化栓汤制剂(组成:大血藤 15 g、飞龙掌血 10 g、土三七 12 g、金毛狗脊 12 g、络石藤 12 g、水蛭 6 g 等),由贵阳中医学院第一附属医院药剂科提供,水煎浓缩至生药含量为 1 g/ml,4℃ 存放备用。

2 方法

2.1 动物分组与给药

90 只大鼠根据随机数字表法选取 10 只为假手术组,其余进行造模。50 只造模成功大鼠采用随机数字表法分为模型组、通窍化栓汤高、中、低剂量组和丹参注射液组,每组 10 只。通窍化栓汤高、中、低剂量组分别从术前 3 天开始灌胃通窍化栓汤 17.50、8.75、4.35 g/(kg·d),分别相当于成人剂量的 14、7、3.5 倍,每日 1 次,持续给药 15 天;丹参注射液组从术前 3 天开始腹腔注射丹参注射液 5.25 g/(kg·d),相当于成人剂量的 7 倍,每日 1 次,持续给药 15 天;模型组给予等量生理盐水腹腔注射,每日 1 次,共 15 天;假手术组仅抓取不做其他处理。

2.2 模型建立

大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注损伤模型参照文献[3-4]。假手术组大鼠只进行麻醉和血管分离术。参考 Longa 方法[3]5 分制进行行为评分,评分在 1~3 分的大鼠认为模型制作成功。无神经功能损伤,计 0 分;不能完全伸展右前肢,提鼠尾离开地面 30 cm,右前肢表现为腕屈曲、肘屈曲、肩内旋或兼而有之者,计 1 分;自发转圈,计 2 分;行走时向右侧倾倒或轻推肩部时即向右侧倾倒,计 3 分;不能行走或意识丧失计 4 分;死亡计 5 分。

2.3 指标检测与方法

将各组大鼠断头处死,在冰盘上迅速取脑,称取

左侧脑组织,低温匀浆,以 3 000 r/min 低温离心 10 min,取上清检测脑组织 MDA、SOD 水平,严格按照试剂盒说明书执行。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 11.5 软件统计分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 q 检验。

3 结果

表 1 示,与模型组比较,其余各组脑组织 MDA 水平降低,SOD 水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与通窍化栓汤高剂量组比较,通窍化栓汤中、低剂量组及丹参注射液组 MDA 水平升高,丹参注射液组 SOD 水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

4 讨论

现代医学认为,正常机体内 SOD、过氧化物酶和过氧化氢酶等可不断清除代谢过程中产生的自由基,使体内自由基水平保持相对稳定。当脑缺血缺氧时,脑内腺嘌呤核苷三磷酸耗尽,可使脑细胞正常代谢途径受到破坏,体内自由基产生、清除的平衡状态遭到破坏,使得自由基迅速大量产生,细胞膜的胆固醇含量耗竭,从而破坏神经细胞膜的完整性,最终导致细胞坏死、脑水肿及其他并发症[5]。SOD 是一种带阴电荷的蛋白质,通过歧化的方式清除超氧阴离子自由基,发挥保护机体,减轻损伤的作用。MDA 作为氧自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的代谢产物,其水平的变化间接地反映了组织中氧自由基含量的变化[6],其含量越高,说明自由基越多,而对组织细胞的损伤越大。因此,通过测定 SOD 和 MDA 水平可以估价脑组织中氧自由基水平和其保护机体强弱。

丹参注射液在临床上应用广泛,主要成分为丹参酮,系从唇形科植物丹参中提取,具有活血化瘀功效。丹参注射液可使缺血再灌注大鼠脑含水量明显减少,大脑皮层及海马组织的 MDA 水平下降,SOD 活性明显升高,有显著的抑制氧自由基反应,减少脂

表 1 各组大鼠脑组织 MDA、SOD 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MDA[nmol/(mg·prot)]	SOD[nIU/(mg·prot)]
假手术组	10	1.8424±0.0188*	95.3921±2.9446*
模型组	10	4.4614±0.2757	73.5778±0.6123
通窍化栓汤高剂量组	10	1.7360±0.0168**	119.7049±0.5446**
通窍化栓汤中剂量组	10	2.2471±0.0248**△	116.9978±0.2092**
通窍化栓汤低剂量组	10	2.0948±0.1040**△	114.3968±0.3692**
丹参注射液组	10	2.3467±0.0153*△	101.8925±0.4773*△

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与通窍化栓汤高剂量组比较,△ $P < 0.05$

质过氧化的作用,对缺血再灌注引起的脑细胞损伤具保护作用^[5]。

通窍化栓汤由金毛狗脊、土三七、络石藤、大血藤、水蛭、飞龙掌血等组成,具有活血化瘀,舒筋活络之效。金毛狗脊中的有效成分金粉蔗亭对血小板凝聚具有较强的抑制作用^[7]。土三七含有葱醌衍生物有降脂,改善微循环,抗氧化、消除自由基,减轻脑水肿,降低颅内压等作用^[8-9]。络石藤中的特有成分木犀草素、芹菜素-7 新橙皮糖,具有很强的抗氧化活性^[10]。大血藤所含木质素具有较强的抗氧化作用,多糖具有抗氧化,清除自由基作用^[11-12]。水蛭所含水蛭素是迄今为止发现的最强凝血酶特异性抑制剂,具有很强的抗凝、抗血小板聚集作用,是目前最有应用前景的中药抗凝剂^[13]。飞龙掌血水提物对血管有直接扩张作用,抑制钙内流,具有钙拮抗剂之效^[14]。本研究结果表明,通窍化栓汤具有较强的抗氧化作用,可能是通过降低脑缺血再灌注模型大鼠脑组织中 MDA 的水平及升高脑组织 SOD 的水平,从而减轻脑缺血损害,起到脑保护作用。为临床预防和治疗缺血性脑血管病提供新的途径和治疗方药。在本课题研究的基础上,将对通窍化栓汤对脑缺血再灌注损伤大鼠在抗氧化自由基水平方面进行深入系统地研究。

参考文献

- [1]Rodrigo J, Fernández AP, Serrano J, et al. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia[J]. Free Radic Biol Med, 2005, 39(1): 26-50.
- [2]Murdoch J, Hall R. Brain protection: physiological and pharmacological consideration, Part I: The physiology of brain injury[J]. Can J Anesth, 1990, 37(6): 663-671.
- [3]Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in the rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [4]吴远华,朱广旗,胡蓉,等. 线栓法大鼠脑缺血再灌注模型改良与评价[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2010, 13(18): 4-6.
- [5]莫志贤,郑有顺,潘志强,等. 丹参注射液对实验性脑缺血再灌注损伤的作用机理[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(4): 24-26.
- [6]蔡英敏,薛荣亮,李伟. 全脑缺血再灌注对大鼠氧自由基和内皮素的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(4): 656-657.
- [7]Cheng QH, Yang ZL, Hu YM. Studies on the chemical constituents of Cibotium barometz[J]. Progr Pharm Sci, 2003, 27(1): 298-299.
- [8]胡昌江,马烈,何学梅,等. 九制大黄葱醌衍生物对动物高血脂及血流变学的影响[J]. 中成药, 2001, 23(1): 33-35.
- [9]Kuo YC, Meng HC, Tsai WJ. Regulation of cell proliferation, inflammatory cytokine production and calcium mobilization in primary human T lymphocytes by emodin from Polygonum hypoleucum Ohwi[J]. Inflamm Res, 2001, 50(2): 73-82.
- [10]西部三省,韩英梅. 络石藤化学成分及抗癌活性[J]. 国外医药·植物药分册, 2002, 17(2): 57.
- [11]Han GQ, Chang MN, Hwang SB. The investigation of lignans from *Sargentodoxa cuneata*(Oliv) Rehd et Wils[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1998, 20(4): 434-438.
- [12]陈彦,孙玉军,方伟. 威灵仙多糖的抗氧化活性研究[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(3): 266-269.
- [13]吕莉,宋慧君,韩国柱. 重组水蛭素药理学研究进展[J]. 血栓与止血学, 2003, 9(1): 31-34.
- [14]任先达. 飞龙掌血水提物的扩血管作用及原理初探[J]. 暨南大学学报, 1990, 11(2): 29-35.

(收稿日期:2012-03-12;修回日期:2012-12-06)

[编辑:洪涛]

基层医生手穴诊疗培训班招生通知

为了发掘民族瑰宝、弘扬中医精粹,满足广大基层医生对中医特色诊疗的需求,中国人体健康科技促进会医药科技专业委员会、世界针灸学会联合会世针针灸交流中心拟于2013年5月26~28日在重庆市举办2013年国家中医药继续教育项目“第一期基层医生手穴诊疗培训班”。由中国人体健康科技促进会医药科技专业委员会副主任委员、中国老年教授协会医药专业委员会手诊分会副会长、江苏省常州市手穴诊疗研究所所长刘浩兴主讲,传授“望诊、触诊、压诊”的手穴诊疗方法。

一、培训内容:该法以中医整体观念为基石,结合中医“四诊”与经络腧穴,创造性的将中医整体理论运用于手诊,数分钟即可概知家族遗传性疾病和自身健康状况,鉴别诊断多种疑难病症,方法独特,在临床有较高的实用价值。该法还能根据掌、指的各种特征预测部分隐患。该手诊方法直观明了、易学易用,为广大医务工作者诊病寻根、治病求本、治未病提供了新思路、新方法,尤其适用于基层医疗领域。

二、报名须知:每人学费1200元(含培训费、资料费等),学期3天,交通、食宿费用自理,会务组可协助安排食宿事宜。每班40人开班。学习经考核合格予以结业,颁发中英文对照的结业证书和国家继续教育学分证书(12分)。凡参加专修班学员的优秀论文,《世界中医药》杂志将优先发表。欲学习者请先交报名费50元,并附个人简历、身份证复印件(注明通讯地址、邮政编码、联系电话、邮箱以及职业等)。收到报名函后即做排名和安排。经审查合格,在开班前一个月内发入学通知。

三、培训地点与住宿:第一期:重庆金考源会议服务有限公司,重庆市渝北区红锦大道61号。第二期:世针针灸交流中心701会议室,绿景苑宾馆。

四、联系方式:1. 北京市朝阳区小营路19号财富嘉园A座302室《世界中医药》杂志社。邮编:100101,电话:(010)62143672,13901318403。传真:(010)58239066。邮箱:13901318403@139.com。联系人:王炳岐、徐晖、赵和爱。

2. 北京市广渠门内夕照寺大街东玖大厦B座7层,世界针灸学会联合会世针针灸交流中心。邮编:100061,电话:(010)87190518,13051608026。邮箱:info@wfas-acu.org。联系人:邓爱英。