

• 实验研究 •

脑络欣通对大脑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

王 键* 谭 辉 胡建鹏 何 玲 尹婷婷 管 威

安徽中医学院省部共建新安医学教育部重点实验室, 安徽省合肥市蜀山区梅山路 103 号, 230038

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划资助项目(2012BAI26B00);安徽省科技厅资助项目(100432)

* 通讯作者: wangjian6301@163.com, (0551)5169179

[摘要] 目的 研究脑络欣通对脑缺血大鼠再灌注损伤的作用机制。方法 将 40 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、脑络欣通组和通心络组各 10 只, 采用线栓法制作大脑中动脉闭塞模型, 2 h 后拔出栓线少许(约 5 mm)造成缺血再灌注损伤。脑络欣通组给予浓度为 85.8 mg/ml 脑络欣通溶液 1 ml/(100 g · d), 通心络组给予浓度为 30 mg/ml 通心络胶囊溶液 1 ml/(100 g · d), 模型组和正常组予以等量生理盐水, 各组大鼠连续灌胃 14 天。采用 Morris 水迷宫实验检测大鼠在不同时间点逃避潜伏期(EL)及 120 s 内通过原平台所在位置的次数(Visits), 分别在造模过程中插线后 5 min、缺血 2 h 再灌注以及造模后 7、14 天监测各组大鼠局部脑血流量(rCBF)。结果 与正常组比较, 模型组和通心络组大鼠在各时间点 EL 都明显延长, Visits 明显减少($P < 0.01$); 与模型组比较, 脑络欣通组大鼠各时间点 EL 显著缩短、Visits 显著增加($P < 0.01$); 脑络欣通组大鼠各时间点 EL、Visits 和通心络组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与正常组比较, 其余各组大鼠在各时间点 rCBF 均低于正常组($P < 0.01$); 与模型组比较, 脑络欣通组和通心络组在第 7 天和第 14 天大鼠 rCBF 明显恢复($P < 0.01$)。结论 脑络欣通可能通过增加模型大鼠 rCBF 而改善学习记忆能力, 从而对脑缺血再灌注损伤起到保护作用。

[关键词] 脑络欣通; 缺血再灌注; 水迷宫实验; 局部脑血流量

Effects of Naoluo Xintong Liquid on Spatial Cognitive Function and Regional Cerebral Blood Flow in Rats with Ischemia-Reperfusion Injury Induced by Middle Cerebral Artery Occlusion

WANG Jian, TAN Hui, HU Jianpeng, HE Ling, YIN Tingting, JIAN Wei

(Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Anhui Province 230038)

ABSTRACT **Objective** To study the mechanism of Naoluo Xintong Liquid (liquid to free the network vessels of the brain and the heart) for rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods** Forty Wistar rats were randomized into the normal group, model group, Naoluo Xintong group and Tongxinluo (liquid to free the network vessels of the heart) group, with 10 in each. The middle cerebral artery occlusion rat models were established with suture method and the thread embolism was pulled out a little (about 5 mm) to make ischemia-reperfusion injury 2 hours later. The Naoluo Xintong group and Tongxinluo group was given 1 ml/(100 g · d) of Naoluo Xintong Liquid (concentration=85.8 mg/ml) and Tongxinluo Liquid (concentration=30 mg/ml) respectively. The model group and normal group were given same amount of normal saline. The administration lasted for 14 consecutive days. The Morris water maze test was used to detect the escape latencies (EL) at different time points and the numbers of passing the location of the original platform within 120 seconds (Visits). The regional cerebral blood flow (rCBF) was monitored during the modeling, 5 minutes after the thread plugged in, reperfusion after 2 hours of ischemia, 7 days after modeling and 14 days after modeling respectively. **Results** Comparing with the normal group, the ELs at different time points were significantly prolonged but the Visits were significantly reduced in the model group and Tongxinluo group ($P < 0.01$). Comparing with the model group and Tongxinluo group, the ELs at different time points were significantly shortened but the Visits were significantly increased in the Naoluo Xintong group ($P < 0.01$). Comparing with the normal group, the rCBF at different time points was significantly decreased in other groups ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the rCBF was restored in the Naoluo Xintong group and Luoxintong group on the 7th and 14th day after modeling ($P < 0.01$). **Conclusion** Naoluo Xintong can improve learning and memory capacity by increasing rCBF, which play a protective effect on cerebral ischemia-reperfusion injury.

Keywords Naoluo Xintong Liquid; ischemia-reperfusion; Morris water maze test; regional cerebral blood flow

脑缺血再灌注损伤可不同程度地导致神经功能障碍、局部脑血流量(regional cerebral blood flow, rCBF)降低以及空间学习记忆等认知功能下降。脑缺血再灌注损伤是一个多环节、多因素、多途径酶促级联反应的病理过程,作用机制复杂。中医药具有整体调节和综合治疗的优势,在缺血性脑血管病(ICVD)的防治研究中显示了较好的疗效^[1-3]。脑络欣通是著名新安医家王乐旬针对缺血性中风创立的临床验方,本研究通过观察脑络欣通对局灶性脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损程度、rCBF 及认知功能的影响,探讨其治疗脑缺血再灌注损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重 250~300 g,由南京医科大学饲养中心提供,动物许可证号:SCXK(苏)2008-0004。康为 IR60 独立送风隔离笼具饲养,笼内温度控制在 $(22 \pm 1)^{\circ}\text{C}$,相对湿度 60%。

1.2 动物模型制作

大脑中动脉(MCA)闭塞缺血再灌注损伤模型参照 Longa EZ 法^[4]加以改良:1.5 号“红狼”尼龙鱼线截成每根长为 50 mm,一端用蚊香火焰烧灼成圆钝,在解剖镜下观察头端直径为 $(0.3 \pm 0.02)\text{mm}$ 者留用并在 20 mm 和 30 mm 处打一结。钝性分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),电凝 ECA 的分支枕动脉和甲状腺上动脉,把 ECA 远心端结扎两处。用动脉夹夹闭 CCA、ICA 和 ICA 的分支翼腭动脉(PPA)近心端。从 ECA 两结扎处中间将其剪断,向下轻拉 ECA 使之与 ICA 成近似直线,在 ECA 近游离端斜剪一“V”形切口并快速插入栓线,插入 ICA 约 $(18.0 \pm 0.5)\text{mm}$ (至感觉有少许阻力为止),阻断 MCA 血流,造成局灶性脑缺血,2 h 后拔出栓线少许(约 5 mm)造成缺血再灌注损伤。手术过程中用激光多普勒仪监测缺血区 rCBF,再灌注之前 rCBF 降低到开始水平 70%以上且苏醒后神经功能缺损评分为 2~3 分者为模型制作成功^[5]。

1.3 主要试剂和仪器

水合三氯乙醛(国药集团化学试剂有限公司,批号:20110509);DFY-800 高速中药粉碎机(温岭林大机械有限公司);IKA-HB10 旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司);FD-1C-50 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);CHR-III 双极电凝器(上

海 Fisher 实验器材有限公司);PeriFlux5000 激光多普勒仪(瑞典 Perimed 中国公司);Morris 水迷宫实验系统(淮北正华生物仪器设备有限公司)。

1.4 药物制备

脑络欣通组成:黄芪 30 g,红花 10 g,三七 4 g,川芎 6 g,蜈蚣 2 g,当归 10 g,天麻 10 g 等,按上述比例共 502.2 g 中药饮片(购于安徽中医学院国医堂门诊部)于高速中药粉碎机内制成药粉,加蒸馏水 1 600 ml 于自动煎药机中煎煮 60 min,自然冷却,102 型中速定性滤纸过滤。然后用冷冻离心机(Sigma2-16PK)离心去滓(4°C , $4000 \times g$,5 min),旋转蒸发仪低压低温($<45^{\circ}\text{C}$)浓缩至 197 ml,于冷冻干燥机内低温真空(-45°C , $<20\text{ Pa}$)制成脑络欣通冻干粉共 51.3 g,计算产出率为 10.22%。最后将脑络欣通冻干粉配制成浓度为 85.8 mg/ml 的溶液。通心络胶囊(石家庄以岭药业股份有限公司生产,国药准字 Z19980015,批号:110819,0.26 g/粒)配制成 30 mg/ml 的溶液。

1.5 动物分组及给药

采用随机数字表法将大鼠分成正常组、模型组、脑络欣通组和通心络组,每组 10 只。脑络欣通组和通心络组大鼠分别予以上述配制浓度的药液按 1 ml/(100 g·d)体重于造模第 1 天开始连续 14 天灌胃给药(相当于成人中等等效剂量的 7 倍)。模型组和正常组予以等量生理盐水。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 Morris 水迷宫实验^[6-7] 各组大鼠均于造模后第 9 天开始进行 Morris 水迷宫实验。①象限和平台设置:Morris 实验用水池直径为 150 cm,高 45 cm,水深 32 cm,在上缘等距设置 4 个标记点作为大鼠入水点,以这 4 点在水面及水池底部的投影点将水池均分成 1、2、3、4 四个象限。大鼠躲避平台直径为 12 cm,高 30 cm,固定于第 2 象限并隐藏于水面下 1.5 cm。摄像系统安装固定于水池中心上方 2 m 处。②定位航行实验:第 9~13 天进行定位航行实验,历时 5 天,每天每只大鼠第一次实验前将其置于平台上停留 10 s,使其感受在平台上的感觉并认识到平台所在的空间位置。每天将大鼠面向池壁从第 4 象限入水点放入水中 4 次,记录其从入水到寻找到隐藏在水面下平台的时间(即逃避潜伏期,EL),如果在 120 s 内仍未找到平台,则人为引导其到平台,此时 EL 记为 120 s。计算并记录第 9、11、13 天每只大鼠 EL 平均值。定位航行实验反映的是大鼠的空间学习能力。③空间探索实验:第 14 天进

行空间探索实验,撤去平台,以相同的方法放大鼠入水,记录 120 s 内通过原平台所在位置的次数(Visits),空间探索实验反映的是大鼠的空间记忆能力。

1.6.2 rCBF 的测定 运用激光多普勒仪,分别在造模过程中插线后 5 min、缺血 2 h 再灌注以及造模后 7 天、14 天监测各组大鼠 rCBF。选取手术侧(右侧)梗死灶及其周边组织作为监测区域。将大鼠麻醉后俯卧,常规消毒,沿颅骨正中偏右切开皮肤及皮下组织,钝性分离筋膜,暴露颅骨,定位头部右侧距矢状缝 2 mm、冠状缝前 1 mm 处,用生物胶将激光多普勒仪的探头座固定于此,安装连接探头,常规调试仪器和校零。参照文献[8],该点是 MCA 闭塞后梗死灶的额顶运动区和苍白球部位,皮质梗死部位是缺血周边区域(深度在大脑皮质 1 mm 以内),此即缺血半暗带区。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计学分析软件,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,经正态性检验和方差齐性检验后,方差齐时采用最小显著法(LSD)进行两两比较,方差不齐时用 Games-Howell 法。

2 结果

2.1 各组大鼠 Morris 水迷宫实验结果比较

表 1 示,与正常组比较,模型组和通心络组大鼠在各时间点 EL 都明显延长,Visits 明显减少($P < 0.01$);脑络欣通组大鼠各时间点 EL、Visits 与正常组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较,脑络欣通组大鼠各时间点 EL 显著缩短、Visits 显著增加($P < 0.01$);通心络组大鼠各时间点 EL 与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而 Visits

则明显增加($P < 0.05$)。脑络欣通组大鼠各时间点 EL、Visits 和通心络组比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠不同时间 rCBF 的比较

表 2 示,与正常组比较,其余各组大鼠在各时间点 rCBF 均低于正常组($P < 0.01$);与模型组比较,脑络欣通组和通心络组在第 7 天和第 14 天大鼠 rCBF 明显恢复($P < 0.01$),而在插线后 5 min 和缺血 2 h 再灌注两个时间点大鼠 rCBF 无明显增加($P > 0.05$);脑络欣通组和通心络组比较,不同时间 rCBF 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

供应大脑血液的动脉因各种原因阻塞引起脑组织缺血缺氧,便开始了 ICVD 的病理演变过程,可导致急性坏死和迟发性死亡两种神经元死亡形式。大脑组织能量储备极少,对缺血缺氧损害异常敏感,脑血流阻断 30 s 脑代谢会发生改变,完全缺血 5 min 可致神经元死亡。多项研究证实,ICVD 可导致不同程度神经功能障碍和空间学习记忆等认知功能降低^[9-11]。ICVD 发生后梗死部位脑组织会持续存在血液低灌注区,通过改善该区域的血液灌注量有利于改善神经功能^[12]和提高空间认知能力。rCBF 可以直观地反映局部脑组织的血液灌注状态,Morris 水迷宫实验是英国心理学家 Morris 于 1984 年设计应用于脑学习记忆机制研究的一种实验手段,其反映的被测动物空间认知功能方面较为简单,动物容易学习和记忆,对大鼠学习记忆功能的检测较为灵敏^[13-14]。

脑络欣通主要由黄芪、红花、三七、蜈蚣等组成,具有益气活血通络功效。通心络胶囊主要由人参、水蛭、赤芍、蜈蚣等组成,也具有益气活血通络功效,

表 1 各组大鼠 Morris 水迷宫实验结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	EL(s)			Visits(次)
		第 9 天	第 11 天	第 13 天	
正常组	10	61.5±8.42	62.4±7.60	62.6±8.34	2.42±0.58
模型组	10	91.8±7.81*	91.7±8.37*	89.3±7.92*	0.75±0.29*
脑络欣通组	10	68.5±8.03△△	67.0±7.30△△	64.8±7.91△△	2.20±0.65△△
通心络组	10	86.2±8.39*▲	84.6±8.85*▲	82.4±8.73*▲	1.24±0.42*△▲

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与脑络欣通组比较,▲ $P < 0.01$

表 2 各组大鼠不同时间 rCBF 比较(PU, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	插线后 5 min	缺血 2 h 再灌注	第 7 天	第 14 天
正常组	10	122.56±8.42	121.17±8.28	122.45±7.85	123.39±8.70
模型组	10	113.33±1.59*	111.22±4.75*	122.40±4.28*△	123.91±4.12*
脑络欣通组	10	10.75±1.37*	91.80±4.67*	101.48±5.97*△	112.51±7.23*△
通心络组	10	10.81±1.29*	90.78±4.42*	100.57±6.00*△	111.75±7.07*△

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

但两者仅蜈蚣一味药物相同,功效却相似,故选择其作为对照药很有研究意义。本研究结果表明,随着治疗时间的延长,脑络欣通和通心络对模型大鼠学习记忆能力和 rCBF 的恢复作用越来越明显,脑络欣通组大鼠 EL 相较于模型组和通心络组明显缩短,而 Visits 则明显增加,且在脑缺血再灌注后的 2 周内随时间的延长呈正相关。

在提高模型大鼠空间认知能力和改善受损的神经功能作用上,恢复 rCBF 是一个至关重要的环节。前期的研究已证实脑络欣通可以改善缺血后脑水肿^[15],ICVD 脑组织缺血水肿造成颅内压增高,而颅内压增高反过来又可加重脑组织缺血,降低 rCBF。脑络欣通对脑缺血再灌注损伤的保护作用机制之一可能就是通过改善脑水肿和扩张脑血管来恢复 rCBF,从而起到损伤保护的作用。总而言之,在不同时间点脑络欣通可以不同程度地恢复模型大鼠 rCBF,改善受损的神经功能和空间认知能力,从而对脑缺血再灌注损伤起到保护作用,但更深层次的作用机制和途径有待于进一步研究。

参考文献

- [1]董秋菊,杨志新. 中医治疗缺血性中风的现状[J]. 中国临床医生,2012,40(11):33-35.
- [2]张志伟,刘泰. 缺血性脑血管病颈动脉超声检测及中医药干预研究进展[J]. 中国中医急症,2011,20(6):936-937.
- [3]王键,谭辉,胡建鹏. 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,2012,53(22):1954-1956.
- [4]Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84-91.
- [5]王世全,余良,郭宁,等. 白藜芦醇对大鼠局灶性脑缺血再

灌注的治疗作用[J]. 现代生物医学进展,2012,12(16):3057-3059.

- [6]Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. J Neurosci Methods,1984,11(1):47-60.
- [7]罗小泉,骆利平,陈海芳,等. Morris 水迷宫检测大鼠记忆力方法的探讨[J]. 时珍国医国药,2010,21(10):2667-2669.
- [8]Yang GY, Betz AL. Reperfusion-induced injury to the blood-brain barrier after middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Stroke,1994,25(8):1658-1665.
- [9]刘妍君,雒扬,滕庆兰. 缺血性脑血管病导致认知障碍的研究进展[J]. 医学综述,2011,17(24):3092-3095.
- [10]姬亚杰,张博爱,刘荣丽. 慢性脑缺血大鼠海马 Notch1 表达的动态变化[J]. 第三军医大学学报,2011,33(24):2621-2623.
- [11]于娜,王晓楠,高丽芳. 人重组粒细胞集落刺激因子对大鼠缺血性脑梗死预后的影响[J]. 天津药学,2010,22(4):3-6.
- [12]刘伟,王新陆,周永红. 下调脑区激活的可能机制[J]. 中华神经医学杂志,2005,4(2):192-193.
- [13]方松, Morris 水迷宫实验中海马相关空间学习记忆的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志,2010,30(4):321-326.
- [14]Song MK, Seon HJ, Kim IG, et al. The effect of combined therapy of exercise and nootropic agent on cognitive function in focal cerebral infarction rat model[J]. Ann Rehabil Med,2012,36(3):303-310.
- [15]王键,胡建鹏,李净. 脑络欣通对脑缺血再灌注大鼠 Fas、FasL 蛋白表达、脑水肿及神经体征的影响[J]. 中华中医药杂志,2005,20(2):86-88.

(收稿日期:2012-08-29;修回日期:2012-12-29)

[编辑:邓媛]

(上接第 686 页)

参数复原脉图则很难。

古人在认识中医脉象时强调要认清脉的位、数、形、势,且脉位是首要因素。本研究结果也说明,夏季与秋季节气脉图变化的重要影响因素是脉位,秋季节气脉图变化主要体现在脉势上。脉诊是中医四诊唯一接触人体获取信息的方法,贯穿中医理法方药的全过程;知常达变是中医辨证论治的重要方法。因此,对正常人四时脉及其模型参数的研究,可以为现代中医诊断学及疗效评价,及相关生理学、药理学的深入研究提供基础参数和方法学范例。

参考文献

- [1]宋晨生.《内经》四时脉法浅谈[J]. 光明中医,2007,22

(2):1-3.

- [2]闪增郁,陈燕萍,汪南玥,等. 四时脉象变化规律是藏象现代研究的一个重点[J]. 中国中医基础医学杂志,2010,16(6):466-467.
- [3]潘晖. 高血压病患者昼夜血压节律与靶器官损害的关系[J]. 现代中西医结合杂志,2010,19(34):4397-4398.
- [4]张伯梅,梅建平,殷文治,等. 正常人脉象四季变化规律的初步探讨[J]. 上海中医药杂志,1984,18(10):42-45.
- [5]朱传湘,李冰星,李绍芝,等. 正常人四季与昼夜脉象变化的初步观测[J]. 湖南中医学院学报,1991,11(1):36-39.
- [6]闪增郁,陈燕萍,汪南玥,等. 中医脉诊信号采集与分析研究中的几个关键问题[J]. 中国中医基础医学杂志,2009,15(1):77-78.

(收稿日期:2012-10-23;修回日期:2012-12-26)

[编辑:崔京艳]