

本文引用:王 胜,龚 毅,袁青青,刘晓龙,钱海兵.苗药小血藤对缺血性脑卒中大鼠的作用研究[J].湖南中医药大学学报,2019,39(11):1336-1339.

苗药小血藤对缺血性脑卒中大鼠的作用研究

王 胜¹,龚 毅²,袁青青²,刘晓龙²,钱海兵^{2*}

(1.中国人民解放军联勤保障部队第983医院,天津 300142;2.贵州中医药大学,贵州 贵阳 550002)

[摘要] **目的** 研究苗药小血藤对缺血性脑卒中大鼠的治疗作用,并初步探讨其可能的作用机制。**方法** 用改良线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。将造模成功的大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性组、苗药小血藤高、中、低剂量组(3.75、1.875、0.937 5 g/kg),给予相应药物 1次/d灌胃给药,连续 7 d。TTC染色观察脑梗死面积;试剂盒检测血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)含量;HE染色观察脑组织病理改变。**结果** 与模型组比较,小血藤水煎液各剂量组脑梗死面积明显减少($P<0.05$),大鼠脑组织匀浆中所含 SOD 活性显著提高($P<0.05$);MDA 含量显著降低($P<0.05$);HE染色发现,小血藤水煎液各剂量组可一定程度上改善 MCAO 大鼠海马区病理损伤。**结论** 小血藤水煎液对 MCAO 导致的脑缺血大鼠可以减少梗死面积,促进其神经功能恢复,对缺血造成的损伤具有一定的保护作用,其机制可能与小血藤抗氧化应激损伤有关。

[关键词] 小血藤;缺血性脑卒中;超氧化物歧化酶;丙二醛

[中图分类号]R255.2

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.11.009

Study on the Effects of Miao Medicine *Schisandra Propinqua* on Rats with Ischemic Stroke

WANG Sheng¹, GONG Yi², YUAN Qingqing², LIU Xiaolong², QIAN Haibing^{2*}

(1. The No. 983 Hospital of The Joint Logistic Guarantee Force of PLA, Tianjin 300142, China; 2. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the therapeutic effect of Miao medicine *Schisandra Propinqua* on ischemic stroke rats, and to discuss its possible mechanism. **Methods** The modified thread thrombus method was used to establish middle cerebral artery occlusion model (MCAO). The successfully modeled rats were randomly divided into a sham operation group, a model group, and a high, middle, low dose of Miao medicine *Schisandra Propinqua* group (3.75, 1.875, 0.9375 g/kg). The rats were given intragastric administration of drugs once a day, for 7 days. The volume of cerebral infarction was observed by TTC staining. The contents of superoxide dismutase (SOD) and maleic dialdehyde (MDA) in the serum were measured by kit, and the pathological changes of brain tissue were observed by HE staining. **Results** Compared with the model group, the volume of cerebral infarction in the all dose groups of *Schisandra Propinqua* decoction was significantly decreased ($P<0.05$), SOD activity contained in the brain tissue was significantly increased ($P<0.05$), and content of MDA was significantly decreased ($P<0.05$). HE staining found that each dose group of *Schisandra Propinqua* could improve the hippocampal injury of rats after MCAO to some extent. **Conclusion** The decoction of *Schisandra Propinqua* can reduce the volume of infarction and promote the recovery of nerve function in rats with cerebral ischemia caused by middle artery occlusion, and has a certain protective effect on the injury caused by ischemia. The mechanism may be related to the antioxidant stress injury of *Schisandra Propinqua*.

[Keywords] *Schisandra Propinqua*; cerebral arterial thrombosis; superoxide dismutase; maleic dialdehyde

[收稿日期]2019-06-25

[基金项目]贵州省国内一流建设学科项目(中药学)(GNYL(2017)008号);贵州省普通高等学校特色重点实验室建设任务(黔教合KY字(2017)006)。

[作者简介]王 胜,女,硕士,主要从事康复医学的临床与科研工作。

[通讯作者]*钱海兵,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:279753407@qq.com。

苗药小血藤,为茜草科(*Rubiaceae*)茜草属 *Rubia* Linn.植物茜草 *Rubia cordifolia* L 的根,其主要功效为凉血止血,活血化瘀。小血藤在苗族地区被广泛运用于体虚血少患者,治月经不调、鼻腔出血以及痔疮等^[1]。前期药理学研究表明,其具有保护神经、抗炎免疫、解聚血小板聚集等作用,所含茜草多糖具有延缓脑细胞衰老的作用,可通过上调 Bcl-2 蛋白的表达,保护线粒体避免 cyt C 的释出,提高线粒体 Ca²⁺缓冲含量,从而达到抑制脑细胞凋亡的作用^[2]。本研究拟观察小血藤对缺血脑损伤大鼠的保护作用,并初步探讨其可能的机制,以期为后续进行小血藤抗脑缺血药物的研究提供药理学研究基础。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,购于长沙市天勤生物技术有限公司,生产许可证号 SCXK(湘)2014-0011。饲养室温 20~25 ℃,湿度 50%~70%,实验动物术前 1 周进行适应性饲养,体质量(270±20) g。

1.2 药物

苗药小血藤由贵州中医药大学药理教研室提供(水煎浓缩液相当于生药材 1 g/mL,4 ℃保存备用);尼莫地平片,亚宝药业集团股份有限公司(批号 20181024)。

1.3 试剂

水合氯醛,天津市科密欧化学试剂有限公司(批号 20180627);HE 染色试剂盒,北京索莱宝科技有限公司(批号 20180820);TTC 染剂,北京索莱宝科技有限公司(批号 10110031);MDA 测定试剂盒,南京建成生物工程研究所(批号 20181226);SOD 测定试剂盒,南京建成生物工程研究所(批号 20181220)。

1.4 仪器

酶标仪(北京新风机电技术公司);组织包埋机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);组织切片机(莱卡显微系统(上海)贸易公司);电子天平(北京艾科勒有限公司);隔水式电热恒温箱(苏州威尔实验用品有限公司);医用离心机(江苏新康医疗器械有限公司);移液器(德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 造模及造模成功判定^[4,5]

参照 Longa^[3]改良线栓法制备大鼠右侧永久性大

脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)动物实验模型。造模后 24 h,采用盲法进行神经功能评分(参照 Bederson 和 Longa 等 5 级 4 分的评分筛选法)。1~3 分的大鼠即造模成功。将得 0 分和 4 分者剔除。

0 分:无神经功能缺损,提起鼠尾悬空时两前肢向地面伸直;1 分:轻微神经功能缺损,提起鼠尾悬空时手术对侧前肢屈曲,肩内收,前臂伸直;2 分:中度神经功能缺损,向病灶对侧转圈的现象;3 分:重度神经功能缺损,向手术对侧倾倒,无法行走;4 分:无自主活动伴意识障碍。

2.2 分组及给药方法

将造模成功的 MCAO 大鼠随机分为假手术组,模型组,阳性组,苗药小血藤高、中、低剂量组,每组 10 只;术后 24 h,每组大鼠开始给予相应药物干预,1 次/d,灌胃给药,连续 7 d;小血藤水煎液高、中、低剂量组按 3.75、1.875、0.9375 g/(kg·d)灌胃(分别相当于人临床拟用量的 15 倍、7.5 倍、3.75 倍);阳性组给予尼莫地平片水溶液,15 mg/(kg·d)灌胃(相当于人临床拟用量的 7.5 倍);假手术组与模型组同体积生理盐水灌胃。

2.3 指标检测

2.3.1 血清 SOD、MDA 测定 取材前所有大鼠禁食不禁水 12 h,并于末次给药 2 h 后称体质量记录,大鼠仰位固定,4%水合氯醛(0.75 mL/100 g)腹腔注射麻醉;腹主动脉取血,静置 30 min 后,分离出血清(3 000 r/min,15 min),按试剂盒说明书测定血清 SOD 活性与 MDA 含量。

2.3.2 TTC 染色测定脑梗死面积 腹主动脉取血后,迅速断头,自大脑纵裂将脑剪开,放置于冰盘上取出大脑,立即放入-20 ℃低温冰箱冷冻 30 min,剔除嗅球和小脑,于局灶缺血的中部做 2 mm 冠状切片,每只大鼠采集脑片 5~6 片,切好脑组织在 TTC 溶液中浸没染色,37 ℃恒温培养箱避光染色 30 min,每隔 15 min 翻面 1 次,染色后,用 4%多聚甲醛溶液将其固定。正常脑组织染色呈深红色,梗死灶呈苍白色。观察并拍照记录,用 Image-Pro Plus 软件统计脑梗死面积比例。

2.3.3 脑组织病理形态观察 将固定于 4%多聚甲醛中的大鼠脑组织取出,通过常规脱水、石蜡包埋切片、HE 染色、封片,置于光学显微镜下观察脑组织

形态变化。

2.4 统计学方法

实验数据计量资料均以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用 SPSS 21.0 统计软件进行单因素方差(*one-way ANOVA*)分析,组间比较方差齐时用 LSD 检验,方差不齐时用 *Dunnnett's T3* 检验,当 $P<0.05$ 时,差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小血藤对大鼠血清 SOD、MDA 含量的影响

与假手术组比较,模型组 SOD 含量明显降低($P<0.05$);与模型组比较,给药各组大鼠血清的 SOD 活力明显上升($P<0.05$)。与假手术组比较,模型组 MDA 含量明显升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠血清 MDA 含量明显下降($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 小血藤对大鼠血清 SOD 活力、MDA 含量的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
假手术组	91.06±3.54	2.78±0.47
模型组	64.34±5.47 [#]	6.29±0.41 [#]
阳性组	85.48±3.24 [*]	3.35±0.29 [*]
高剂量组	89.15±5.05 [*]	3.05±0.28 [*]
中剂量组	84.78±9.17 [*]	3.43±0.38 [*]
低剂量组	79.03±4.85 [*]	3.89±0.86 [*]

注:与假手术组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$

3.2 小血藤对脑缺血后大鼠脑梗死面积的影响

非缺血损伤脑组织 TTC 染色呈红色,缺血区域脑组织 TTC 染色呈白色。详见图 1。缺血面积统计表明,模型组大鼠脑组织出现明显手术后梗死。与模型组相比较,各给药组大鼠脑组织梗死面积显著减少($P<0.05$)。详见表 2。



假手术组 模型组 阳性组 高剂量组 中剂量组 低剂量组

图 1 大鼠大脑切片 TTC 染色图

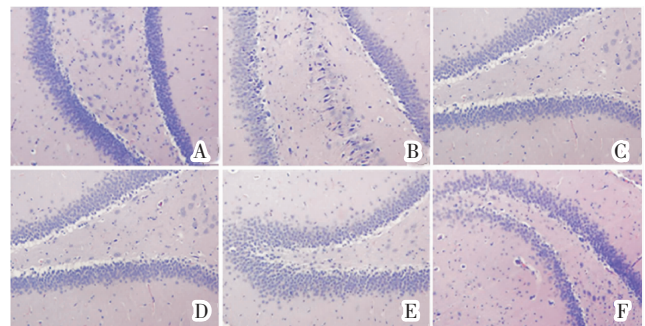
表 2 小血藤对大鼠脑梗死面积的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	脑梗死面积比例/%
假手术组	-
模型组	22.78±0.94
阳性组	14.06±1.05 [*]
高剂量组	13.11±0.63 [*]
中剂量组	15.63±0.34 [*]
低剂量组	18.00±1.00 [*]

注:与模型组比较,^{*} $P<0.05$

3.3 小血藤对脑缺血后大鼠脑组织病理形态改变的影响

大鼠脑组织 HE 染色观察,光镜下观察各组大鼠海马锥体细胞的病理改变情况。结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠海马脑组织皮质较薄,细胞数量较少,结构欠清晰,局灶性细胞水肿溶解,神经元细胞染色深。与模型组比较,小血藤水煎液各剂量组和阳性组大鼠海马区损伤减轻,细胞数量较多,排列较为整齐。详见图 2。



注:A.假手术组;B.模型组;C.阳性组;D.小血藤高剂量组;E.小血藤中剂量组;F.小血藤低剂量组

图 2 大鼠脑组织病理形态学显微图(HE,×200)

4 讨论

脑卒中又称中风,是一种突发的脑血管疾病,其中缺血性脑卒中约占全部脑卒中的 80%左右,主要是由于大脑血栓的形成或栓塞引起急性局部大脑供血不足导致^[6],同时大脑有限的代偿能力不足以弥补血液减少或中止时大脑储存的能量衰竭引起的脑组织缺血性损伤。病理损伤可分为缺血中心区和缺血半暗带两类,前者脑细胞往往在缺血后不可逆坏死,后者则大脑侧支循环损伤较轻,其中由葡萄糖的代谢功能障碍产生的级联反应损伤是缺血半暗带产生的主要因素。

氧化应激被认为是脑卒中早期重要的损伤机制,缺血时活性氧的增加通过耗竭内源性的抗氧化

物质,诱发氧化应激反应可引起细胞膜、脂质、蛋白质和 DNA 的损伤, H_2O_2 损伤细胞膜影响细胞离子通道的通透性,增加钙离子内流是增加氧化损伤的因素之一^[7]。SOD 作为生物体内非常重要的抗氧化酶一种蛋白酶,SOD 活性的高低反映机体清除氧自由基的能力,可减少 ROS 对细胞膜的损伤,降低说明体内抗氧化能力不足,细胞将产生应激性反应从而引起氧化应激损伤^[8]。可以催化超氧化物自由基歧化,清除自由基,发挥抗氧化作用,也是氧化损伤中生物体内的主要防御机制。MDA 是机体内细胞膜脂质过氧化的产物,其在体内的含量在一定程度上表明氧化应激造成的损害程度^[9]。有研究表明尼莫地平可抑制 H_2O_2 诱导的钙超载损伤、降低血管对钙的敏感性、抑制 H_2O_2 对血管的直接收缩,防止 H_2O_2 对血管的氧化应激性损伤;明显降低脑血管组织匀浆中的 MDA 含量,增强 SOD 等活性,具有一定的抗氧化保护脑损伤作用^[7]。中药黄芪、人参等可改善脑组织代谢、抗氧化应激,减轻脑组织损伤^[10]。本研究结果显示,与模型组相比,小血藤不同剂量组大鼠组织的 SOD 活力明显上升($P<0.05$),MDA 含量显著降低($P<0.05$),表明小血藤可以减轻因缺血而导致的氧化应激损伤,具有一定的神经保护作用。

缺血后脑梗死面积直接反映了损伤程度,因此对脑缺血动物模型进行脑组织梗死面积的测定对于评价脑缺血损伤程度具有重要意义。本实验研究结果显示,小血藤对脑缺血导致的脑梗死面积具有明显的减轻作用。HE 染色,在光镜下观察各组大鼠海马锥体细胞的病理改变情况。结果显示,与模型组比较,小血藤水煎液各剂量组和阳性组大鼠海马病变程度总体较轻,提示小血藤水煎液能改善 MCAO 大鼠脑组织海马损伤。

综上所述,小血藤水煎液可明显减少 MCAO 大鼠脑缺血组织的范围和界限,在一定程度上具有改善 MCAO 大鼠海马损伤的功能,其机制可能与通过调节氧化应激的相应指标,提高机体抗氧化水平,增强修复能力有关,其他方面的机制是否与钙离子通道有关等,尚待深入研究。

参考文献

- [1] 杜 江.中华本草苗药卷[M].贵阳:贵州科技出版社,2005:90-92.
- [2] 沈彩红,刘 云,余宪文,等.茜草醇提物对佐剂性关节炎大鼠肝脏、脾脏损伤及 Foxp3 的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(7):147-153.
- [3] 郑作亮,李盛青,钟瑜萍,等.茜草醇提物对大鼠肝、肾及结肠的毒性[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(12):151-156.
- [4] 肖育华,詹纯列,许 达,等.局灶性脑缺血模型的建立[J].中国比较医学杂志,2008,10(10):78-79.
- [5] 范 柳,孙继虎,王春安,等.当归萃取液对实验性急性脑梗死大鼠行为学和脑组织损伤的影响[J].中国临床药理学杂志,2002,11(2):81-83.
- [6] WICHA P, TOCHARUS J, JANYOU A, et al. Hexahydrocurcumin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury, attenuates inflammation, and improves antioxidant defenses in a rat stroke model[J]. PLoS One, 2017, 12(12):e0189211.
- [7] 蔡志春,黎 敏,李健哲,等.尼莫地平对过氧化氢诱导猪脑基底动脉氧化应激损伤的保护作用[J].中国临床药理学与治疗学,2007,(8):906-910
- [8] ZHU X Y, MA P S, WU W, et al. Neuroprotective actions of taurine on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rat[J]. Brain Research Bulletin, 2016,124:295-305.
- [9] AYUSO M I, GONZALO-GOBERNAIDO R, MONTANER J. Neuroprotective diets for stroke[J]. Neurochemistry International, 2017, 107:4-10.
- [10] 黄小平,王 蓓,邱咏园,等.黄芪甲苷、人参皂苷 Rg1、Rb 和三七皂苷 R1 抗小鼠脑缺血再灌注氧化应激损伤和促进能量代谢的配伍研究[J].湖南中医药大学学报,2014,34(7):5-11.

(本文编辑 苏 维)