

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-02-0122-03

守宫水蛭组方对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用

黄红林, 朱炳阳, 谢志忠, 申锦林¹, 汪煜华, 张海涛, 邹岳萍¹, 廖端芳

(南华大学基础医学院药理学教研室, 1 衡阳市中医医院, 湖南省衡阳市 421001)

[主题词] 守宫水蛭组方; 脑缺血; 再灌注损伤; 疾病模型, 动物; 保护作用

[摘要] 为观察守宫水蛭组方是否对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤有保护作用, 将 48 只 Wester 大鼠随机分为偏瘫康大、小剂量组、模型组、假手术组、西比灵及华佗再造丸阳性对照组, 分别给予一周药物后用尼龙线栓塞大脑中动脉, 栓塞 1 h 后再通, 制做局部脑缺血再灌注损伤模型, 于手术后分别对大鼠行为障碍进行术后评分, 断脑取血测血清乳酸脱氢酶和肌酸激酶含量, 取手术侧脑测定含水量及脑组织 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 含量。结果发现, 脑缺血再灌注损伤 6 h 后, 大鼠行为障碍术后评分增高, 出现脑水肿, Na^+ 含量增高, 血清乳酸脱氢酶和肌酸激酶含量也明显升高; 而预先服用不同剂量的守宫水蛭组方均可明显逆转大鼠脑缺血再灌注损伤的上述变化。说明守宫水蛭组方对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤有保护作用。

[中图分类号] R961

[文献标识码] A

Protective Effect of Shou- Gong Shui- Zhi Composition on Regional Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats

HUANG Hong-Lin, ZHU Bing-Yang, XIE Zhi-Zhong, SHEN Jin-Lin, WANG Yu-Hua, ZHANG Hai-Tao, ZOU Yue-Ping, and LIAO Duang-Fang

(Department of Pharmacology, Nanhua University, Hengyang, 421001, China)

[MeSH] Shou- Gong Shui- Zhi Composition; Cerebral Ischemia; Reperfusion Injury; Disease Models, Animal; Protective Effect

[ABSTRACT] **Aim** Investigate the Protective Effect of Shou- Gong Shui- Zhi Composition on Regional Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats. **Methods** Acute cerebral ischemia reperfusion injury model in the rat was established by introducing nylon suture into middle cerebral artery (MCA) for occlusion and then taking out the nylon suture. The behavior obstacle marks of rats was studied, and the water contents in brain, LDH and CK activity in serum, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} levels of cerebral tissue was measured. **Results** Shou- Gong Shui- Zhi Composition can enhance the behavior obstacle marks of rats, decrease contents of H_2O , LDH, CK activity and Na^+ levels after ischemia reperfusion.**Conclusion** Shou- Gong Shui- Zhi Composition could protect brain ischemia-reperfusion injury.

中风是一种发病率、死亡率和致残率均相对高的疾病。近年来, 由于抢救技术提高, 其死亡率相对减少, 然而致残率仍居高不下。对于中风后遗症的治疗, 临床常用自由基清除剂、钙拮抗剂、脑细胞活化剂和溶栓剂, 但均缺乏特异性, 疗效不十分理想。传统中医药对此病的治疗有几千年历史, 积累了丰富的理论和方法, 开发了不少中成药, 疗效不断提高。我们从临床实践中筛选了有效中药, 自拟了“守宫水蛭组方”治疗中风后遗症, 显示了较好的疗效^[1]。本实验在模拟中风的大鼠大脑中动脉阻塞一再灌注模型^[2]上观察了自拟的守宫水蛭组方对局灶性脑缺血的保护作用, 为推广应用提供实验依据。

1 材料与方法

[收稿日期] 2001-09-18 [修回日期] 2002-03-11

[基金项目] 湖南省卫生厅中医药科研基金(98221)资助

[作者简介] 黄红林, 女, 1963 年出生, 湖南省浏阳县人, 副教授, 硕士研究生导师。谢志忠, 男, 1969 年出生, 湖南省衡阳市人, 硕士, 讲师。廖端芳, 男, 1959 年出生, 湖南省沅江市人, 教授, 博士研究生导师, 湖南省学位委员会委员, 为本文通信作者。均从事心血管药理科研及教学工作。

1.1 药物

自拟守宫水蛭组方合剂(由守宫、水蛭、丹参、川芎、菖蒲、郁金、远志、赤芍等组成)为衡阳市中医院药剂科生产。华佗再造丸(Huatuo Zaizao Pill, Hua, 广州奇星药业有限公司产品)和西比灵(盐酸氟桂利嗪, flunarizine hydrochloride, Flu)胶囊(西安杨森制药有限公司)作为阳性对照药。红四唑(red tetrazolium)为华美生物公司产品, 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒为德国 Entronic GmbH 公司产品, 肌酸激酶(creatine kinase, CK)试剂盒为美国 Bioresun 公司产品, K^+ 和 Na^+ 测定试剂盒为日本 Phoenix 公司产品, Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 离子测定试剂盒为德国 Centronic 公司产品, 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 动物分组及给药方法

250 ± 50 g Wistar 大鼠 48 只(南华大学实验动物部提供), 随机分为 6 组: 缺血再灌注组(I/R)、假手术组(sham-operate, SO)、守宫水蛭组方合剂小剂量[2.5 mL/(kg·d)]+ 缺血再灌注组(SSCS+ I/R)、守宫水蛭组方合剂大剂量[7.5 mL/(kg·d)]+ 缺血再灌注组

(SSCL+ I/R)、华佗再造丸[8 g/(kg·d)]+ 缺血再灌注组(Hua+ I/R)和西比灵[10 mg/(kg·d)]+ 缺血再灌注组(Flu+ I/R)。均于手术前 6 天灌胃给药, 每天 2 次, 第 7 天最后一次于手术前 60 min 给药。

1.3 大鼠局灶性脑缺血模型制备^[2]

用 10% 水合氯醛(300 mg/kg) ip 麻醉大鼠, 仰位固定, 颈部正中切口, 暴露右侧颈总动脉, 由分叉处向头端依次游离, 结扎并剪断枕骨下动脉和甲状腺上动脉, 在颈外动脉远端结扎并切断, 游离备用。分离颈内动脉, 用丝线在颈外动脉根部打一松扣, 夹闭颈总动脉和颈内动脉; 将尼龙线(长 4 cm, 直径 0.20 ~ 0.25 mm)经颈外动脉主干切口, 缓慢向颈内动脉入颅方向推进, 以颈总动脉分叉处为标记, 推进 20 mm 左右时感到阻力, 到达大脑前动脉内。扎紧颈外动脉根部松扣。1 h 后, 小心拔出尼龙线, 扎紧动脉残端, 缝合皮肤, 再灌 6 h, 完成大脑中动脉栓塞。假手术组大鼠麻醉后, 仅暴露颈内外动脉分叉, 不闭塞大脑中动脉。

1.4 大鼠行为障碍评分、梗死和脑含水量的测定

1.4.1 大脑中动脉栓塞后 6 h 按 Longa 的方法[3]对大鼠的行为障碍进行分级评分, 标准是: 0 分为未见神经症状; 1 分为不能完全伸展左侧前爪; 2 分为大鼠置于光滑平面上, 推手术侧肩部向对侧移动时, 阻力降低; 3 分为大鼠自由行走时向左侧环转、转圈或倾倒; 4 分为软瘫, 肢体无自由活动。积分越高, 说明大鼠行为障碍越严重。

1.4.2 断头处死大鼠, 迅速取出大脑, 分别取各组一只大鼠的右大脑半球沿冠状面切成 5 片, 用红四唑(2 g/L)染色, 置 37℃水浴避光保温 15 min 后, 正常组织呈红色, 完全梗死组织呈白色。初步观察可见模型组出现明显的白色栓塞区。用药后可缩小梗死面积, 说明模型成功。

1.4.3 取各组大鼠右大脑半球称湿重, 然后 80℃烘至恒重称干重, 计算脑组织含水量(%) = [(脑组织湿重 - 脑组织干重)/脑组织湿重] × 100%。

1.5 大鼠血清乳酸脱氢酶和肌酸激酶含量的测定

大鼠断头处死后留取血清用自动生物化学分析仪(Bickman 产, Hitachi 717 型)按试剂盒说明书测定乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)含量, 测定结果以 u/L 表示。

1.6 大鼠脑组织 K⁺、Na⁺、Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 含量测定

称完干重的大鼠右半脑用优级纯硝酸 80℃消化, 纯水定容(5%), 用自动生物化学分析仪按试剂盒说明书测定脑组织 K⁺、Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺ 含量, 结果以 μmol/g 表示。

1.7 统计学处理

采用 Spss for Windows 8.0 统计软件包中的方差分析, 两两比较用 LSD 法。

2 实验结果

2.1 大鼠行为障碍评分结果

大脑中动脉栓塞术后, 缺血损伤组大鼠表现出明显运动功能障碍, 提鼠尾可见其左前肢内收紧贴胸壁, 左侧肢体肌紧张下降, 行走时偏向左侧; 预先服用守宫水蛭组方合剂能不同程度地改善大脑中动脉栓塞大鼠的行为障碍, 其作用强度与阳性对照华佗再造丸和西比灵组无明显差异(表 1, Table 1)。

表 1. 大鼠行为障碍评分结果及血清乳酸脱氢酶和肌酸激酶含量($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1. The effect of regional cerebral ischemia reperfusion injury in rats on behavior obstacle marks, LDH and CK activity ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Groups	BOM	LDH (u/L)	CK (u/L)
Sham-operate	0.00 ± 0.00	2487 ± 3897	265 ± 101
I/R	2.32 ± 0.58 ^c	4780 ± 617 ^c	595 ± 78 ^c
SSCS+ I/R	1.35 ± 0.35 ^{cd}	2785 ± 737 ^{fg}	234 ± 85 ^f
SSCL+ I/R	1.54 ± 0.29 ^{cd}	2725 ± 443 ^{fg}	283 ± 103 ^f
Hua+ I/R	1.44 ± 0.32 ^{cd}	3260 ± 802 ^{bf}	278 ± 111 ^f
Flu+ I/R	1.31 ± 0.26 ^{cd}	3413 ± 596 ^{af}	297 ± 81 ^f

BOM: behavior obstacle mark. a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$, compared with Sham-operate groups; f: $P < 0.001$, compared with I/R groups; g: $P < 0.05$, compared with Flu+ I/R groups.

2.2 大鼠血清乳酸脱氢酶和肌酸激酶含量

缺血再灌注组 LDH 和 CK 含量比假手术组显著升高, 不同剂量守宫水蛭组方 LDH 和 CK 含量明显低于缺血损伤组, 与假手术组基本一致; 守宫水蛭组方合剂不同剂量组血清 LDH 含量明显比西比灵组低, 也略低于华佗再造丸组($P > 0.05$), 可见在减轻脑损伤某些方面守宫水蛭组方优于西比灵, 与华佗再造丸接近(表 1, Table 1)。

2.3 大鼠脑含水量和脑组织 K⁺、Na⁺、Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 含量

缺血再灌注损伤后, 脑组织 Na⁺ 含量比假手术组明显增高, 脑组织明显水肿, K⁺ 和 Ca²⁺ 含量呈升高趋势但差异无显著性意义, 预防性使用不同剂量守宫水蛭组方合剂降低脑组织含水量及 Na⁺ 和 K⁺ 浓度, 但对 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 含量无明显影响(表 2, Table 2)。

表 2. 局灶性脑缺血大鼠脑含水量和脑组织 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 含量($\bar{x} \pm s$, $n=8$)Table 2. The H_2O contents in the brain and level of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} of cerebral tissue in rats with regional cerebral ischemia reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Groups	WC in brain(%)	K^+ ($\mu\text{mol/g}$)	Na^+ ($\mu\text{mol/g}$)	Ca^{2+} ($\mu\text{mol/g}$)	Mg^{2+} ($\mu\text{mol/g}$)
Sham operate	78.1 \pm 1.1	155.0 \pm 16.7	1141 \pm 396	33.5 \pm 2.9	20.5 \pm 0.5
I/R	80.1 \pm 0.7 ^c	170.7 \pm 30.3	1644 \pm 487 ^a	34.9 \pm 2.5	20.0 \pm 1.7
SSCS+ I/R	79.0 \pm 0.3 ^{ac}	126.5 \pm 17.1 ^{bfg}	855 \pm 480 ^f	33.3 \pm 1.7	20.1 \pm 1.7
SSCL+ I/R	79.0 \pm 0.7 ^{ac}	137.2 \pm 9.8 ^e	1252 \pm 314 ^{dh}	34.4 \pm 3.0	20.2 \pm 1.5
Hua+ I/R	78.3 \pm 1.1 ^f	143.9 \pm 14.0 ^d	965 \pm 364 ^e	36.4 \pm 6.1	19.8 \pm 1.8
Flu+ I/R	78.6 \pm 0.4 ^f	152.2 \pm 17.7	1247 \pm 251 ^d	33.7 \pm 1.5	20.0 \pm 1.5

WC: water content. a: $P < 0.05$, c: $P < 0.001$, compared with sham operate group; d: $P < 0.05$, e: $P < 0.01$, f: $P < 0.001$, compared with I/R group; g: $P < 0.05$, compared with Flu+ I/R group; h: $P < 0.05$, compared with SSCS+ I/R group.

3 讨论

自拟守宫水蛭组方由守宫、水蛭、丹参、川芎、菖蒲、郁金、远志、赤芍等组成,方中除守宫外,皆为众所周知的活血化瘀开窍药。守宫即“壁虎”,别名“天龙”,《中药大词典》中称其具有“祛风、定惊、解毒、散结、治中风瘫痪”等功效;《本草纲目》称其“善治中风瘫痪、手足不举或历节风痛及风疾,血积成痞”,且“守宫以食蝎蚁为主,故其性有似蜈蚣而通经络,又具化痰行血之性”;《中药现代研究与应用》谓其“具17种氨基酸,其中含有8种人体必需的氨基酸”,并“具有祛风活络,散结功能,用于中风瘫痪,风湿关节痛、骨髓炎、淋巴结核、肿瘤”等,故其在方中起主要作用。

根据以上理论,我们用守宫水蛭组方防治实验性大鼠局灶性脑缺血损伤,结果表明,能明显改善大鼠大脑中动脉栓塞一再灌注损伤的行为障碍并显著降低血清LDH和CK含量,减轻脑水肿,降低脑组织 Na^+ 离子浓度,对局灶性脑缺血损伤有保护作用。且疗效及各项指标均优于西比林,不亚于华佗再造丸。因此认为,对中风偏瘫症的防治,给活血祛瘀、化痰通络的中药方剂也是一条新的途径。

有实验及临床观察证明脑缺血时脑组织LDH和CK释放量增加^[4,5],故血清LDH和CK活性测定可以作为脑缺血损伤程度的敏感指标。本实验结果表明缺血再灌注损伤脑组织血清LDH和CK活性比伪手术组显著增高。

祖国医学认为,中风后遗症的主要成因,一是脑缺血后,最早受到影响的是能量耗竭,导致局灶性神经原坏死;二是病理性代谢产物潴留,产生毒性作用,如兴奋性氨基酸的神经毒、氧自由基、酸中毒、花生四烯酸等,损伤神经元;二者互为因果^[6]。这些病理产物的毒性称之为“毒邪”,王永炎教授^[7]谓之

“瘀毒、热毒、痰毒”等。中风之毒邪产生,主要是邪气亢盛败坏形体,即转化为毒,毒系脏腑功能和气血运行失常,使体内的生理和病理产物不能及时排出,蕴积体内过多而生成。中风偏瘫症主要为瘀毒、痰毒相互为患,盘踞脑络,使脑髓失氧而产生局灶性神经功能障碍症状。因此,治疗的根本途径是如何尽快地清除这些有毒的病理产物。本实验缺血再灌注损伤模型组血清LDH和CK活性增高可能是瘀毒的病理产物指征,守宫水蛭组方通过活血化瘀,去除病理产物,能降低血清LDH和CK活性;“血不利则为水”,瘀毒去则脑水肿减轻,故减少缺血再灌注损伤大鼠脑组织 Na^+ 含量,促进水、钠排泄而消除脑水肿。

本实验用的大、小两个剂量组守宫水蛭组方合剂无明显的量效关系,且大剂量还反可使脑组织 Na^+ 含量增加,说明活血化瘀药物应用也不能过量。有关此组方的其他作用机制、量效关系及安全性等还有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 申锦林. 脑脉通口服液治疗中风后遗症48例疗效观察. 实用中西医结合杂志, 1998, 11(7): 597
- [2] 冯亦璞, 闰韶华. 大鼠短暂性MCAO模型. 见: 张均田. 现代药理实验方法. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998; 1240-247
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 1989, 20: 84
- [4] Lu YF, Xing YZ, Pan BS, et al. Neuroprotective effects of phencyclidine on acute cerebral ischemia and reperfusion injury of rabbits. 中国药理学报, 1992, 13(3): 218-222
- [5] D'Erasmus E, Pisaini D, Romagnoli S, et al. Clinical and prognostic significance of hyperfibrinogenemia in cerebral ischemia. *J Med*, 1998, 29(3-4): 115-123
- [6] 陈修, 陈维洲, 曾贵云. 心血管药理学(Cardiovascular Pharmacology). 北京: 人民卫生出版社, 1998; 141-144
- [7] 王永炎. 关于提高脑血管疾病疗效难点的思考. 中国中西医结合杂志, 1997, (4): 195-196

(此文编辑 胡必利)