

## ·博士论坛·

## 养血清脑颗粒对 MCAO 模型大鼠神经功能保护机制研究

王中琳

(山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011)

**摘要:**目的:探讨养血清脑颗粒对 MCAO 大鼠脑损伤的保护机制。方法:选用 22 月龄纯种健康大白鼠,采用线栓法阻塞大鼠中动脉诱发脑缺血模型,治疗组给以养血清脑颗粒治疗,对照组和假手术组则给以等量生理盐水灌胃。结果:治疗组可以显著减轻模型鼠神经缺损症状,改善阻断侧额顶区脑电图波幅降低和频率减慢;脑组织形态学观察发现,缺血区星形细胞增殖明显,神经元较对照组仅轻度减少。脑血流量也有显著改善,血中 GSH、GSH-PX 水平升高,MDA 水平则受抑制而降低。结论:养血清脑颗粒对脑缺血损伤的保护机制是多方面的,而增强星形细胞活性,保护神经元缺血性损害,改善脑血流量及抗自由基损伤是其治疗缺血性脑损伤的主要机制之一。

**关键词:**养血清脑颗粒;MCAO 模型;实验研究

**中图分类号:**R285.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1000-1719(2002)12-0704-03

笔者运用养血清脑颗粒,在临床治疗缺血性脑血管病方面取得明显疗效的基础上,为了进一步探讨其作用机制,提高防治水平,利用老龄大鼠 MCAO 脑缺血模型观察了养血清脑颗粒对脑组织病理形态学、脑血流量、梗塞侧脑电活动及抗自由基活性的影响等,现将研究结果报道如下。

## 1 材料及方法

1.1 动物及分组 选择 22 月龄纯种健康大白鼠

(由山东省实验动物中心提供)60 只,体重 250~300g,雌雄各半,随机分为 3 组:假手术组 20 只,病理模型对照组(对照组)20 只,模型加中药组(治疗组)20 只。

1.2 动物模型制备 参照 Koizumi 1985 年在日本脑卒中会议上报道的方法,用尼龙线穿线法建立大鼠中动脉阻塞(MCAO)模型。假手术组不插入尼龙线,余同其他两组。

司富春<sup>[15]</sup>对二仙汤在温肾益精和滋阴泻相火两种作用分子机制,进行探索研究了二仙汤及其拆方对下丘脑 GnRH 基因表达水平和下丘脑-垂体-性腺 3 个层次生殖激素含量的作用,结果表明二仙汤及其拆方对下丘脑 GnRH 基因表达水平和性腺轴机制具有不同程度的调节作用,全方和拆方作用比较发现二仙汤及其拆方对老年大鼠下丘脑 GnRH 基因表达和性腺轴机制的作用有性别差异。实验发现温肾药对雌性大鼠 GnRH 生物合成和下丘脑-垂体轴功能无改善作用,而能明显改善雄性大鼠下丘脑 GnRH 合成和性腺轴的功能,推测老年雄性大鼠肾脏精气在衰老过程中偏于阳虚。中医认为肾脏精气衰而致机体衰老,即《内经》指出男子“七八”、女子“七七”,由于肾气衰,天癸竭,而致生殖机能减退。

## 参考文献:

- [1] 李广曦. 肾阳虚证动物模型的造模方法及其相关指标回顾[J]. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6(4): 46.
- [2] 唐铁军, 吴伟康, 卢汉平. 四逆汤调节大鼠缺血心肌  $\beta$  受体信号转导的机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(3): 206.
- [3] 包天桐. 应激致“肾虚”动物模型介绍[J]. 药学学报, 1998, (9): 717.
- [4] 贾敏, 王明艳, 法京, 等. 温阳药对环磷酸腺苷诱发 MN 的抑制作用[J]. 南京中医药大学学报, 1995, 11(6): 36.
- [5] 王明艳, 赵凤鸣, 张旭, 等. 滋阴补阳药的抗突变研究[J]. 中

医杂志, 2000, 4(5): 303.

- [6] 袁世宏, 王米渠, 金沈锐. 金匱肾气丸对“恐伤肾”大鼠丘脑、海马 c-fos 基因表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(6): 32.
- [7] 王米渠, 马向东. 惊恐伤肾雄鼠的应激行为学研究[J]. 成都医药, 1997, 23(2): 65.
- [8] 张弋, 马骏. 补肾益精方延缓老年雄性大鼠骨与脑衰老的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(1): 43.
- [9] 狄俊英, 崔洪英. 肾气丸与六神丸对靶组织 cAMP 含量影响的实验研究[J]. 天津中医, 1998, (4): 180.
- [10] 郑振, 沈自尹, 黄辉. 补肾与活血复方调节老年鼠 T 细胞凋亡的对比研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(10): 610.
- [11] 许得盛, 沈自尹, 王文健, 等. 右归汤、四君子汤、桃红四物汤调节肾虚、脾虚、血瘀证患者免疫功能的观察[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(12): 712.
- [12] 钟历勇, 沈自尹, 蔡定芳, 等. 补肾健脾活血三类复方对下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺轴及 CRF 基因表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(1): 39.
- [13] 刘菊妍. 温阳益气活血复方治疗阿片类药物依赖的临床研究[J]. 南京中医药大学学报, 1997, 13(4): 204.
- [14] 沈小衍. 二仙汤及其拆方对老年大鼠 SOD、CAT 酶活性及其 mRNA 表达水平影响作用的实验研究[C]. 中医博士论文集粹. 上海: 上海中医药大学出版社, 1996. 99.
- [15] 司富春. 二仙汤及其拆方对老龄大鼠下丘脑 GnRH 基因表达及调节作用[C]. 中医博士论文集粹. 上海: 上海中医药大学出版社, 1996. 99.

编辑:刘 劲

收稿日期:2002-08-06

作者简介:王中琳(1965-),男,山东平邑人,博士研究生,主要从事中医疗治神经系统疾病的研究。

1.3 实验药物及给药途径 养血清脑颗粒,由天津天士力制药股份有限公司生产,4.0g/包,主要药物成分为当归、川芎、熟地、珍珠母、决明子、细辛等。于造模成功后给药,药物组 4.0g/kg 灌胃,每日 1 次。假手术组和对照组分别以等量生理盐水代替药物灌胃,每日 1 次。均连续进行 15 天,每 5 天为 1 个周期。

1.4 主要试剂与仪器 试剂:MDA、GSH 和 GSH-PX 试剂盒,均由南京建成生物工程研究所提供。仪器:日本光电 16 导脑电图机;Leica 公司 Q-570 型显微镜图像分析仪;蔡司公司 ISM501 型激光共聚焦显微镜;冰冻切片机;高速冷冻离心机;国产 751-分光光度计;国产计算机控制 LS-III 型组织血流仪。

## 2 观察指标

2.1 神经症状观察 参照 Bederson<sup>[1]</sup> 分级标准,神经功能缺损评定如下。正常(0 级):①无活动异常,大鼠被提尾时,两前肢向下伸直;②将动物置于塑料板上,在鼠肩后施加侧向推力使鼠滑动约有 10cm,手感左右推力相等。中度(I 级):①大鼠被提尾悬起时,脑血管闭塞对侧前肢呈屈曲、抬高、肩内收、肘关节伸直等;②基本同 0 级。严重(II 级):①同 I 级;②检查方法同上,脑血管闭塞对侧侧向推动阻力明显降低。本组入选对照组大鼠和治疗组大鼠均于给药前及末次给药后评级。

2.2 脑电记录 3 组动物均在末次灌胃后断头前,分别在大鼠额、顶、枕部位左右两侧对称地安放头皮电极各 1 个,参考电极安放在鼻骨正中。记录闭塞侧大脑中动脉供血区和非供血区及对侧相应部位脑电变化。

2.3 血清 MDA GSH-PX GSH 水平的测定 于末次灌胃后 1d,3 组动物各取 8 只,经腹主动脉取血静置,分离血清,用比色法分别测定 MDA、GSH-PX、GSH 含量,操作均按试剂盒说明书要求进行,计算公式如下:

$$\text{血清 MDA 含量 (nmol/L)} = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{测定空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{标准空白管吸光度}} \times \text{样本测试前稀释倍数} \times 10 \text{nmol/L}$$

$$\text{血清 GSH-PX 含量 (酶活力单位)} = \frac{\text{非酶管 OD 值} - \text{酶管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{标准管浓度 (20}\mu\text{mol/L)} \times \text{稀释倍数}$$

$$\text{血清 GSH 含量 (mg/L)} = \frac{\text{测定管 OD 值} - \text{测定空白管 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{标准空白管 OD 值}} \times \text{标准管浓度 (0.5mmol/L)} \times \text{GSH 分子量 (307)}$$

2.4 脑组织形态学改变 于末次灌胃后 1 天,将 3 组动物各取 6 只断头迅速取脑,观察大体标本变化后立即置恒冷箱 -20℃ 冰冻切片,切片厚 6μm,每隔 6 张取 2 张分别放入冰冻固定液和 95% 乙醇中固定 30min 后行 HE 染色和吖啶橙荧光染色做光镜和荧光显微镜观察。

2.5 局部脑血流量(rCBF)测定 本实验以测定前

额皮层局部脑血流量为准,3 组动物各取 6 只,于末次用药后 48h 内测量,用 10% 水合氯醛麻醉后剪去头部皮肤,暴露颅骨,将大鼠固定在脑立体定位仪上,以前囟为原点,向右侧旁开 2mm,向前 3mm,钻开颅骨,剥去硬脑膜及软脑膜,将测量电极插入皮层,深 2mm,参比电极置于颈后部皮下。同一组内所有动物脑血流的测量由同一根电极完成,电解时间为 3s,由血流仪所带专用软件计算出结果。

## 3 统计学处理

计量资料采用 *t* 检验或 *q* 检验,计数资料采用  $\chi^2$  检验,组间分级比较采用 Ridit 分析,所有计量资料均采用均数 ± 标准差表示。

## 4 结果

4.1 养血清脑颗粒对神经症状的影响 见表 1。

表 1 养血清脑颗粒对 3 组大鼠神经系统症状的影响

	n	治疗前			治疗后		
		0 级	I 级	II 级	0 级	I 级	II 级
假手术组	20	20	0	0	20	0	0
对照组	20	0	12	8	5	10	5
治疗组	20	0	13	7	13	6	1

Ridit 分析,治疗前实验大鼠神经系统症状,对照组与治疗组间无显著差异,  $P > 0.05$ ,但与假手术组有显著差异,  $P < 0.01$ ;治疗后治疗组与对照组的神经系统症状具有显著差异,  $P < 0.05$ ,提示养血清脑颗粒可显著改善模型大鼠神经系统症状。

4.2 脑电改变 对照组阻断大脑中动脉侧额顶区(供血区)脑电图波幅重度降低,频率明显减慢;治疗组阻断侧额顶区脑电图波幅轻度降低,频率仅轻度减慢,两组间比较差异显著。而假手术组双侧额顶区脑电图均无明显改变。3 组手术侧枕区(非大脑中动脉供血区)和对侧的脑电图无明显变化。

4.3 养血清脑颗粒对实验大鼠血清 MDA GSH-PX GSH 含量的影响 见表 2。

表 2 末次用药后大鼠血清 MDA GSH-PX GSH 的含量( $\bar{X} \pm S$ )

	n	MDA	GSH-PX	GSH
		(c/nmol·ml <sup>-1</sup> )	(酶活力单位)	(μg·mg <sup>-1</sup> ·L <sup>-1</sup> )
假手术组	8	10.60 ± 2.66	193.75 ± 12.81	248.36 ± 9.62
对照组	8	12.97 ± 1.28 <sup>1)</sup>	174.30 ± 12.85 <sup>2)</sup>	231.50 ± 8.77 <sup>2)</sup>
治疗组	8	11.82 ± 1.23 <sup>3)</sup>	188.98 ± 12.29 <sup>4)</sup>	246.56 ± 9.01 <sup>3)</sup>

注:对照组与假手术组比较,1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.01$ ;治疗组与对照组比较,3)  $P < 0.01$ , 4)  $P < 0.05$ 。

表 2 提示 MCAO 大鼠 MDA 显著高于假手术组, GSH-PX、GSH 显著低于假手术组;治疗组 MDA 显著低于对照组, GSH-PX 显著高于对照组,养血清脑颗粒可降低实验大鼠 MDA 含量,升高 GSH-PX 和 GSH 水平。

4.4 脑组织形态学观察 ①假手术组:大脑半球外观正常。镜下见手术侧半球组织结构正常,荧光显微镜见神经元内细胞核呈黄色,细胞质呈橘红色,清

晰可见。②对照组:大体见额颞顶部颜色苍白,脑表面静脉充血。镜下见尾状核、感觉运动区皮质、海马的神经细胞呈不同程度的缺血性改变,核深染固缩,胞体皱缩,星形细胞有轻度增殖,血管扩张。荧光显微镜见神经元数量明显减少,缺血中心区组织疏松。

③治疗组:大体见额颞顶部颜色略苍白。镜下见尾状核、海马、感觉运动区皮质神经细胞仅有轻度缺血性改变,尤以后者为轻,星形细胞增殖明显,血管扩张不明显。荧光显微镜见神经元仅轻度减少,缺血中心区组织疏松较轻。

4.5 养血清脑颗粒对实验大鼠前额皮层局部脑血流量(rCBF)的影响 见表3。

表3 实验性大鼠前额皮层(rCBF)的变化( $\bar{X} \pm S$ )

	n	rCBF值[qv/ml·(min·100g) <sup>-1</sup> ]
假手术组	6	122.9 ± 13.1
对照组	6	80.4 ± 8.1 <sup>1)</sup>
治疗组	6	109.6 ± 13.5 <sup>2)</sup>

注:与假手术组比较 1)  $P < 0.05$ , 与对照组比较, 2)  $P < 0.05$ 。

说明梗塞后对照组大鼠 rCBF 降低明显,治疗组经中药治疗后,其脑血流量(rCBF)虽未增加至假手术组的水平,但与对照组相比,改善较为显著,说明养血清脑颗粒能够增加梗塞区以外的脑局部血流量。

## 5 讨论

祖国医学认为,中风病的发生,病机较为复杂,主要责之于肝肾阴亏,气血失和,以致阴亏于下,肝阳鸱张,阳化风动,气血逆乱,痰生血阻,蒙蔽清窍,临床以缺血性中风最为常见。根据这一病机特点,在制成 MCAO 大鼠脑缺血模型基础上,笔者选用天津天士力公司生产的养血清脑颗粒,观察了该药对模型大鼠脑损伤的保护作用,疗效满意。本方具有滋阴补血、平肝潜阳、活血通络之功用,体现了对中

风病机的治疗。现代药理研究证明<sup>[2-4]</sup>,方中药味均有不同程度的抑制血小板聚集、抗血栓形成、抑制自由基连锁反应、降脂、扩张血管、改善微循环、提高机体耐缺氧能力等作用,推测养血清脑颗粒治疗缺血性脑血管病可能与上述药理作用有关。

实验表明,治疗组神经缺损症状显著减轻,局部脑血流量较对照组明显增加,脑电图的抑制性变化也有较好的改善。脑组织形态学观察,缺血区星形细胞增殖明显,神经元数量较对照组仅轻度减少,由于星形细胞在神经元的营养代谢、可塑性变化等方面发挥作用,故认为养血清脑颗粒具有增强星形细胞活性、促进脑损伤修复的作用。

自由基损伤也是造成缺血性脑损伤的重要因素,研究显示,模型大鼠血清丙二醛(MDA)含量增高,谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)含量降低,而养血清脑颗粒可降低 MDA 含量,提高 GSH、GSH-PX 水平。由此推论,本药对缺血性脑血管病的治疗机制之一与其抗自由基损伤密切相关。

综上所述,养血清脑颗粒对缺血性脑血管病的治疗机制是多方面的,而增强星形细胞活性、保护神经元缺血性损害、改善脑血流量及抗自由基损伤是其主要机制之一。

## 参考文献:

- [1] Bederson JB, Pitts LH, Nishimura MC, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17:472.
- [2] 王浴生,薛春生. 中药药理与应用[M]. 北京:人民卫生出版社, 1983. 235.
- [3] 阴健. 中药现代研究与临床应用[M]. 北京:中医古籍出版社, 1995. 193.
- [4] 李希新,苏明廉. 当代中药临床应用[M]. 济南:济南出版社, 1994. 473.

编辑:刘 劲

## The Mechanism Study of Yangxueqingnan Granules in Protecting Nerve Function of MCAO Model Rats

WANG Zhong-lin

(The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, Shandong, China)

**Abstract:** Objective: To study the mechanism of Yangxueqingnan Granules in protecting injured cerebrum of MCAO rats. Methods: Pure bred healthy white rats of 22 months were chosen and cerebral ischemia models were induced by blocking the middle cerebral artery with thread. The treating group were fed with Yangxueqingnan Granules. The stomachs of control group and sham-operative group were filled with equal amount of physiological saline. Results: In treating group, the symptoms of defect of nerve function of model rats were relived significantly, EEG of the frontal and parietal lobe in blocked side that had descendent amplitude and low frequency was improved. The observation of cerebral histomorphology indicated that astrocyte multiplied notably and the neurons only decreased little in ischemia area contrasted with the control group. The CBF was also remarkably improved. The content of GSH and GSH-PX in the blood increased while that of MDA reduced as a result of depression. Conclusion: There are many respects about Yangxueqingnan Granules in protecting ischemia cerebrum and one of the main mechanisms of treating ischemia cerebral damage is to enhance astrocyte activity, protect neurons from ischemia damage and improve CBF and counter free radical damage.

**Key words:** Yangxueqingnan Granules; MCAO model; experimental study