

三七总皂苷联合牛磺酸对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用

方道硕*,彭明勇(成都大学附属医院药剂科,成都 610081)

中图分类号 R285;R743 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)47-4436-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.47.06

摘要 目的:研究三七总皂苷联合牛磺酸对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用。方法:复制大鼠中动脉缺血再灌注模型。90只SD大鼠随机分为正常对照(等容生理盐水)组、假手术(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、尼莫地平(40 mg/kg)组、三七总皂苷(240 mg/kg)组、牛磺酸(60 mg/kg)组与联合用药高、中、低剂量(三七总皂苷480、240、120 mg/kg+牛磺酸120、60、30 mg/kg)组。术前1h及再灌注开始1h后分别灌胃给药1次。测定大鼠神经缺损评分、脑梗死面积、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量,观察大鼠脑组织形态学。结果:与假手术组比较,模型组大鼠神经缺损评分显著增加,脑梗死面积显著增加,SOD活性显著减弱,MDA含量显著增加,大鼠大脑形态严重受损。与模型组比较,三七总皂苷组、牛磺酸组与联合用药高、中剂量组大鼠脑梗死面积显著减少,SOD活性显著增强,MDA含量显著减少,大鼠大脑形态学有一定改善,且联合用药高、中剂量组以上指标均好于三七总皂苷组、牛磺酸组。结论:三七总皂苷与牛磺酸联合用药可在一定程度缓解大鼠脑缺血再灌注引起的损伤,其机制可能与降低神经缺损评分、改善大脑形态学与调节生化指标有关。

关键词 三七总皂苷;牛磺酸;脑缺血再灌注;中动脉缺血

Protective Effects of *Panax notoginseng* Total Saponins Combined with Sulfuric Acid Against Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Model Rats

FANG Dao-shuo, PENG Ming-yong (Dept. of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Chengdu University, Chengdu 610081, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effects of *Panax notoginseng* total saponins combined with sulfuric acid against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. METHODS: Arteriae cerebri media ischemia-reperfusion injury model was induced. 60 SD rats were randomly divided into normal control group (constant volume of normal saline), sham operation group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), nimodipine group (40 mg/kg), *P. notoginseng* total saponins group (240 mg/kg), ethylamine sulfonic acid group (60 mg/kg), drug combination high-dose, medium-dose and low-dose groups (*P. notoginseng* total saponins 480, 240, 120 mg/kg+ethylamine sulfonic acid 120, 60, 30 mg/kg). They were given medicines intragastrically 1h before operation and 1h after reperfusion. The nerve defect score, cerebral infarction area, SOD activity and MDA content were determined, and the morphology of the brain was observed. RESULTS: Compared with sham operation group, neurological deficit score, cerebral infarction area and MDA content increased significantly in model group, while SOD activity decreased significantly; cerebral morphology of rats had badly damaged. Compared with model group, cerebral infarction area and MDA content decreased significantly in *P. notoginseng* total saponins group, ethylamine sulfonic acid group, drug combination high-dose and medium-dose groups, while SOD activity increased significantly; cerebral morphology of rats had certain improvement. Above index of drug combination high-dose and medium-dose groups were better than those of *P. notoginseng* total saponins group and ethylamine sulfonic acid group. CONCLUSIONS: *P. notoginseng* total saponins combined with ethylamine sulfonic acid can alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury to some extent, and its mechanism may be related to reduction of nerve defect score and improvement of cerebral morphology and adjustment of biochemical indexes.

KEY WORDS *Panax notoginseng* total saponins; Ethylamine sulfonic acid; Cerebral ischemia-reperfusion; Arteriae cerebri media ischemia

脑卒中可引起严重的神经功能障碍,甚至危及生命^[1],寻找有效的治疗药物及干预措施以促进脑卒中后中枢神经系统功能恢复,一直是心脑血管学科研究的重点之一。脑局灶性缺血再灌注大鼠病理、生理状态与人类脑卒中病理状态较为接近,因此常用作相关领域研究。近年来,有关中西药联合用于脑保护的研究越来越受到重视。三七是传统的活血化瘀中药,现代药理研究证实其在抗自由基作用的同时还能降低血液黏度、抗血小板聚集、扩张血管、改善微循环及抗血管粥样

硬化等作用^[2-5]。牛磺酸是牛黄的基本成分,有报道称其具有保护心脏细胞以及消炎、解毒等作用^[6]。本研究将上述两种药物联用,研究其对缺血再灌注大鼠的影响。

1 材料

1.1 仪器

BX2型荧光显微镜(日本Olympus公司);FSE型冰冻切片机(美国Thermo公司);Q型纯水器、小型超滤仪(美国Milipore公司);Specord50型紫外分光光度仪(德国Jena公司);3k30型离心机(美国Sigma公司);恒温水浴箱(上海沃晶电子科技有限公司);万分之一天平(上海精密科技仪器有限公司)。

* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:028-86437287。
E-mail: fds_coco@126.com

1.2 药品与试剂

三七总皂苷(批号:20110305,质量分数:95%)、牛磺酸(批号:20110724,质量分数:≥98%)原料药均购自南京泽朗医药科技有限公司;尼莫地平(山东新华制药股份有限公司,批号:20101209);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)测试盒购自南京建成生物技术有限公司。

1.3 动物

清洁级SD大鼠180只,♀♂兼半,体质量280~350g,由四川大学实验动物中心提供[实验动物使用许可证号:SCXK(川)2009-09]。饲养温度20~25℃,湿度60%~70%,自由摄食与饮水,昼夜节律(12h)循环。

2 方法

2.1 联用药物的制备

三七总皂苷与牛磺酸按4:1(m/m)比例制备,除菌、定量装于棕色管制瓶中,冷冻干燥,得成品,贮藏,备用。

2.2 复制模型

大鼠术前12h禁食不禁水,按Koizumi方法^[7]复制模型。插线选用进口高碳素钓鱼线,直径0.22~0.26mm,长度40~50mm,并在距前端15mm、20mm处作标记,以液态硅胶处理后置肝素盐水中浸泡,备用。将大鼠麻醉后仰卧固定于手术台上,采用颈部正中切口或选择右侧颈部切口,分离一侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉。结扎颈总动脉、颈外动脉及其分支动脉。分离颈内动脉至鼓泡处可见其颅外分支翼腭动脉,穿线沿起点结扎分支。在颈外动脉剪一小口,将制备好的尼龙线插入颈外动脉经颈总动脉分叉处进入颈内动脉,通过大脑中动脉起始端至大脑前动脉近端[插入深度平均约(18.5±0.5mm)],栓塞1h后外拉此尼龙线使其球端回至颈外动脉内,即可恢复大脑中动脉血供,再灌注持续24h。假手术除不进行栓塞外,其他操作均同上。

2.3 分组与给药

实验分为九组,即正常对照(等容生理盐水)组、假手术(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、尼莫地平(40mg/kg)组、三七总皂苷(240mg/kg)组、牛磺酸(60mg/kg)组与联合用药高、中、低剂量(三七总皂苷480、240、120mg/kg+牛磺酸120、60、30mg/kg)组。术前1h与再灌注开始1h后ig给药。

2.4 神经功能缺损评分^[8]

在复制模型前、复制模型后4、24、48h分别进行评分,评分标准:0分,无神经损伤症状;0.5分,竖毛,轻度运动低下;1分,前肢屈曲,运动障碍;2分,行动不协调,屈曲姿势,旋转运动;3分,偏瘫,不能站立行走;4分,痉挛,嗜睡;5分,死亡。本研究入选实验动物评分均为1~3分。

2.5 脑梗死面积、脑含水量测定^[9]

术后48h断头,快速剥出大鼠脑,用生理盐水洗净,放入冰箱冷藏5min后取出,平放于鼠脑垫上,脑切片器按2μm厚度,在距额极1、3、5、7mm处冠状切开大脑。将其放入盛有2%的氯代三苯基四氮唑(TTC)溶液中,置于37℃恒温箱中水浴孵育30min后,置于4%中性多聚甲醛溶液中固定,梗死部分呈白色,正常部分呈红色。取出平置于载玻片上,以刻度尺标记,电镜摄像,病理图像分析软件计算出脑梗死面积及占同侧大脑半球百分比。

2.6 脑组织形态学观察

术后48h,快速剥出大鼠脑,观察大体标本变化后立即置

于-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%酒精中固定30min后,行HE染色和吖啶橙荧光染色作光镜和荧光显微镜观察。

2.7 SOD活性与MDA含量测定

术后48h,快速剥出大鼠脑,制得脑匀浆。按照说明书方法测定SOD活性与MDA含量。

2.8 统计学方法

数据采用SPSS 12.0软件包统计分析,所有数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用方差分析,神经学评分采用 u 检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 三七总皂苷联合牛磺酸对模型大鼠神经功能缺损评分的影响

正常对照组与假手术组大鼠神经功能评分均为0分,表明大鼠一切正常;与假手术组比较,模型组神经功能评分显著升高($P < 0.01$);复制模型4h后各组神经功能评分几乎无差异,表明药物的保护作用还未发挥;复制模型24h后各用药组神经功能评分均略低于模型组,表明药物开始起效;复制模型48h后,与模型组比较,牛磺酸组与联合用药高、中剂量组神经功能评分显著减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),其中联合用药高、中剂量组效果好于单用药组。三七总皂苷联合牛磺酸对模型大鼠神经功能缺损评分的影响见表1。

表1 三七总皂苷联合牛磺酸对模型大鼠神经功能缺损评分的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Effects of *P. notoginseng* total saponins combined with ethylamine sulfonic acid on neurological function score of model rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量,mg/kg	神经功能评分			
		0h	4h	24h	48h
正常对照组		0	0	0	0
假手术组		0	0	0	0
模型组		0	1.840±0.837*	1.840±0.763*	1.570±0.725*
尼莫地平组	40	0	1.837±0.812	1.795±0.726	1.106±0.508 ^{##}
联合用药高剂量组	480+120	0	1.851±0.848	1.803±0.739	1.297±0.521 ^{##}
联合用药中剂量组	240+60	0	1.821±0.829	1.810±0.734	1.359±0.647 ^{##}
联合用药低剂量组	120+30	0	1.839±0.832	1.819±0.755	1.492±0.703
三七总皂苷组	240	0	1.829±0.824	1.825±0.804	1.429±0.604*
牛磺酸组	60	0	1.841±0.826	1.831±0.794	1.465±0.832*

与假手术组比较:* $P < 0.01$;与模型组比较:[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.05$;与三七总皂苷组/牛磺酸组比较:^Δ $P < 0.05$

vs.sham operation group:* $P < 0.01$;vs.model group:[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.05$;vs.*P. notoginseng* total saponins group/ethylamine sulfonic acid group:^Δ $P < 0.05$

3.2 三七总皂苷联合牛磺酸对模型大鼠脑梗死面积的影响

正常对照组与假手术组大鼠脑梗死面积为0,表明大鼠一切正常;与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死面积显著增加($P < 0.01$),表明模型大鼠脑病变面积较大;与模型组比较,三七总皂苷组、牛磺酸组与联合用药高、中剂量组脑梗死面积显著减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),表明用药后大鼠病变部位得到部分缓解,其中联合用药高、中剂量组效果好于单用药组。三七总皂苷联合牛磺酸对模型大鼠脑梗死面积的影响见表2。

3.3 三七总皂苷联合牛磺酸对模型大鼠脑组织形态学的影响

正常对照组与假手术组大鼠大脑半球外观正常;镜下见手术侧半球组织结构正常,神经元内细胞核呈黄色,细胞质呈

表2 三七总皂苷联合牛磺酸对模型大鼠脑梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Effects of *P. notoginseng* total saponins combined with ethylamine sulfonic acid on the volume of cerebral infarction in model rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	脑梗死面积, %
正常对照组		0
假手术组		0
模型组		38.71 ± 8.63*
尼莫地平组	40	14.45 ± 4.79**
联合用药高剂量组	480+120	19.83 ± 5.24***
联合用药中剂量组	240+60	24.65 ± 6.61***
联合用药低剂量组	120+30	30.38 ± 8.92
三七总皂苷组	240	27.42 ± 7.12*
牛磺酸组	60	28.07 ± 7.53*

与假手术组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ** $P < 0.05$; 与三七总皂苷组/牛磺酸组比较: $\Delta P < 0.05$

vs.sham operation group: * $P < 0.01$; vs.model group: # $P < 0.05$, ** $P < 0.05$; vs. *P. notoginseng* total saponins group/ ethylamine sulfonic acid group: $\Delta P < 0.05$

桔红色,清晰可见。模型组大鼠大体见额、颞顶部颜色苍白、肿胀,并向对侧移位,脑表静脉充血;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,星形细胞肿胀,血管扩张,神经元数量明显减少,缺血中心区组织疏松。三七总皂苷组、牛磺酸组与联合用药高、中剂量组大鼠大体见额颞顶部颜色略苍白,轻度肿胀,无移位;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,星形细胞轻度肿胀,血管扩张不明显,荧光显微镜见神经元轻度减少,缺血中心区组织疏松很轻。

3.4 三七总皂苷联合牛磺酸对模型大鼠SOD活性与MDA含量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠大脑匀浆SOD活性显著减弱,MDA含量显著增加,表明大鼠处于病理状态;与模型组比较,三七总皂苷组、牛磺酸组与联合用药高、中剂量组大鼠大脑匀浆SOD活性显著增强,MDA含量显著减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),表明异常生化指标得到部分改善,其中联合用药高、中剂量组效果好于单用药组。三七总皂苷联合牛磺酸对模型大鼠SOD活性与MDA含量的影响见表3。

4 讨论

随着对脑卒中研究的深入,人们愈加认识到脑卒中的病因病机不仅是气虚血瘀,还有一个内生浊毒的问题。大脑骤损,必然导致大脑功能严重失调,而生理代谢产生的有害物质和多种病理产物不能及时排除而蕴积于脑内,浊毒由之内生。浊毒积于体内,损伤大脑,大脑在此过程中又大量排出代谢物质使病理状态更加严重。因此,治疗脑卒中的关键在于通瘀排毒。三七总皂苷是活血化瘀要药三七的主要有效成分,牛磺酸是清热凉血解毒中药牛黄的主要有效成分之一,两者联合应用具有协同作用。

本研究采用大鼠大脑中动脉缺血再灌注损伤模型显示,联合用药高、中剂量组与模型组比较神经功能损伤评分明显减少,表明三七总皂苷与牛磺酸联用对模型大鼠有一定的保护作用。同时,设定了三七总皂苷和牛磺酸单用组,结果表明联合用药的效果好于单用药。模型组与假手术组比较,脑梗死面积比显著增加,表明阻断一侧脑损伤严重;联合用药高、

表3 三七总皂苷联合牛磺酸对模型大鼠SOD活性、MDA含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Effects of *P. notoginseng* total saponins combined with ethylamine sulfonic acid on SOD activity and MDA content of model rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	SOD,U/mg	MDA,mmol/mg
正常对照组		168.53 ± 11.27	4.85 ± 0.82
假手术组		167.69 ± 11.45	4.90 ± 0.83
模型组		117.38 ± 6.71*	14.67 ± 1.95*
尼莫地平组	40	160.79 ± 9.43**	6.23 ± 1.10**
联合用药高剂量组	480+120	152.85 ± 9.20**	7.08 ± 1.16***
联合用药中剂量组	240+60	136.44 ± 8.77*	8.28 ± 1.39**
联合用药低剂量组	120+30	126.52 ± 9.35	11.75 ± 1.54
三七总皂苷组	240	130.26 ± 9.03*	9.77 ± 1.41*
牛磺酸组	60	131.51 ± 8.94*	9.26 ± 1.29*

与假手术组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ** $P < 0.05$; 与三七总皂苷组/牛磺酸组比较: $\Delta P < 0.05$

vs.sham operationl group: * $P < 0.01$; vs.model group: # $P < 0.05$, ** $P < 0.05$; vs. *P. notoginseng* total saponins group/ ethylamine sulfonic acid group: $\Delta P < 0.05$

中剂量组与模型组比较,脑梗死面积比显著减少,表明三七总皂苷与牛磺酸联用减轻神经损伤可能与减少脑梗死面积有关;同时,设定了三七总皂苷和牛磺酸单用组,结果表明联合用药的效果好于单用药。联合用药组与模型组比较,病理形态学、SOD和MDA水平明显改善,推测三七总皂苷与牛磺酸联用治疗脑损伤可能与改善生化指标有关。

参考文献

- [1] Stapf C, Mohe JP. Ischemic stroke therapy[J]. *Annu Rev Med*, 2002(53): 453.
- [2] 胡军霞,海春旭,梁欣.三七醇提物对大鼠肝组织体内外抗氧化作用的研究[J]. *癌变·畸变·突变*, 2011, 23(3): 111.
- [3] 张春军,李志强,王淑秋.三七皂苷对动脉粥样硬化斑块稳定性的研究进展[J]. *牡丹江医学院学报*, 2012, 33(1): 285.
- [4] 詹合琴,李志平,沈志强.三七皂苷Rg₁对大鼠脑血流量和小鼠微循环的影响及作用机制[J]. *华西药学杂志*, 2006, 21(2): 65.
- [5] 陈国华,王春光,马洪胜,等.复方三七当归制剂对颈动脉粥样硬化斑块稳定性的影响[J]. *中医杂志*, 2012, 53(20): 345.
- [6] 杨虎,王金高,徐兴莉,等.牛磺酸对心血管疾病作用的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2006, 33(6): 12.
- [7] Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, et al. Experimental studies of ischemic brain edema: a new experimental model of cerebral embdsh in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area[J]. *Jpn J Stroke*, 1986, 8: 1.
- [8] 徐叔云,卞如濂,陈修. *药理实验方法学* [M]. 3版.北京:人民卫生出版社, 2002: 127.
- [9] Gotoh O, Asano T, Koide T, et al. Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rat[J]. *Stroke*, 1985, 16(1): 101.

(收稿日期:2013-09-28 修回日期:2013-10-20)