

藏药诃子提取物对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用及其机制研究^Δ

任丹君^{1,2*}, 丁一², 丁笑刚², 翟文杰³, 刘文星², 刘天龙², 李建光^{1#}(1.新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2.空军军医大学第一附属医院药剂科, 西安 710032; 3.晋中市第一人民医院药剂科, 山西 晋中 030600)

中图分类号 R285;R743 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)24-3392-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.24.18

摘要 目的:探讨藏药诃子提取物对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用及其机制。方法:将40只雄性SD大鼠随机分为假手术组、模型组和诃子提取物低、中、高剂量组(20、50、100 mg/kg),每组8只。除假手术组外其余各组大鼠均采用改良Longa线栓法复制大脑中动脉阻塞再灌注模型。造模成功2 h后,各给药组大鼠均灌胃相应药物,假手术组和模型组大鼠均灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续7 d。采用流式细胞仪测定各组大鼠外周血内皮祖细胞(EPCs)水平;采用改良Garcia法进行神经功能学评分;采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色法测定各组大鼠脑梗死体积百分比;采用苏木精-伊红染色法观察大鼠脑组织病理学变化;采用Weidner法测定大鼠脑组织梗死区域微血管密度(MVD);采用酶联免疫吸附法测定大鼠脑组织梗死区域血管内皮细胞生长因子(VEGF)、血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR2)、一氧化氮(NO)水平。结果:与假手术组比较,模型组大鼠外周血EPCs水平和神经功能学评分均显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);脑组织中可见明显的梗死区域,细胞排列紊乱,部分细胞核固缩、溶解,胞体缩小;脑梗死体积百分比显著提高($P<0.01$);脑组织梗死区域MVD显著下降,VEGF、VEGFR2、NO水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,诃子提取物中、高剂量组大鼠外周血EPCs水平和神经功能学评分均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);脑组织梗死区域明显缩小,坏死细胞明显减少;脑梗死体积百分比显著下降($P<0.05$);脑组织梗死区域MVD、VEGF、VEGFR2、NO水平均显著升高($P<0.05$)。结论:诃子提取物对模型大鼠脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用,可促进其神经功能恢复和脑微血管形成,并可缩小其脑梗死体积;其机制可能与上调VEGF、VEGFR2、NO的表达有关。

关键词 藏药;诃子;提取物;脑缺血再灌注损伤;大脑中动脉阻塞再灌注模型;大鼠;血管新生;保护作用;机制

Study on Protective Effects and Its Mechanism of the Extract from Tibetan Medicine *Terminalia chebula* against Cerebral Ischemia-reperfusion Injury Model Rats

REN Danjun^{1,2}, DING Yi², DING Xiaogang², ZHAI Wenjie³, LIU Wenxing², LIU Tianlong², LI Jianguang¹(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Dept. of Pharmacy, Jinzhong First People's Hospital, Shanxi Jinzhong 030600, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the protective effects and its mechanism of the extract from Tibetan medicine *Terminalia chebula* against cerebral ischemia-reperfusion injury model rats. METHODS: Totally 40 male SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, *T. chebula* extract low-dose, medium-dose and high-dose groups (20, 50, 100 mg/kg), with 8 rats in each group. Except for sham operation group, middle cerebral artery occlusion reperfusion model was induced by modified Longa suture-occluded method in other groups. Two hours after modeling, administration groups were given relevant medicine intragastrically; sham operation group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, once a day, for consecutive 7 d. The levels of EPCs in peripheral blood of rats were detected by flow cytometry. The modified Garcia method was used for neurological function score. TTC staining was used to detect the volume percentage of cerebral infarction in rats. HE staining was used to observe the histopathological changes of brain tissue. The MVD of cerebral infarction area was detected by Weidner assay. The levels of VEGF, VEGFR2 and NO in cerebral infarction area were determined by ELISA. RESULTS: Compared with sham operation group, EPCs level in peripheral blood and neurological function score were decreased significantly in model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). There were obvious infarction area, disordered arrangement of cells, pyknosis and lysis of some nucleus, cell body shrinkage, and significant increase in the volume percentage of cerebral infarction

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603385);陕西省自然科学基金基础研究计划项目(No.2017JM8006)

* 药师, 硕士研究生。研究方向:中药药效物质基础。电话:029-84775475-8411。E-mail:xjrdj@outlook.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:药物分析、中药药效物质基础。电话:0991-4365007。E-mail:yaya12_30@126.com

($P<0.01$); MVD decreased significantly in cerebral infarction area, while the levels of VEGF, VEGFR2 and NO increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with model group, EPCs levels in peripheral blood and neurological function scores were increased significantly in *T. chebula* extract medium-dose and high-dose groups ($P<0.05$ or $P<0.01$);

infarction area of cerebral tissue was significantly reduced, necrotic cells were significantly reduced, and the volume percentage of cerebral infarction was significantly decreased ($P<0.05$); the levels of MVD, VEGF, VEGFR2 and NO in cerebral infarction area were significantly increased ($P<0.05$). CONCLUSIONS: *T. chebula* extract shows certain protective effect on cerebral ischemia-reperfusion injury, and can promote the recovery of neurological function and the formation of cerebral microvessels and reduce the volume of cerebral infarction. The mechanism of it may be associated with the expression up-regulation of VEGF, VEGFR2 and NO.

KEYWORDS Tibetan medicine; *Terminalia chebula*; Extract; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Middle cerebral artery occlusion reperfusion model; Rats; Angiogenesis; Protective effect; Mechanism

近年来,脑血管疾病已成为危害人类健康的重大疾病之一,其中缺血性脑卒中是人类致残、致死的重要原因^[1]。治疗性血管新生在缺血性疾病的发生、治疗及预后中均发挥着重要的作用,是目前医学研究的热点^[2]。血管新生一方面可为缺血区域提供大量生长因子以增加微血管循环;另一方面亦可促进神经及突触再生,并为突触可塑性的调控提供营养和氧气,因而被认为是缺血性脑卒中后康复的核心治疗策略^[3]。相关研究证实,中药及民族药在脑缺血性疾病的治疗中发挥着举足轻重的作用^[4-5]。诃子为使君子科植物诃子(*Terminalia chebula* Retz.)或绒毛诃子(*T. chebula* Retz. var. *tomentella* Kurt.)的干燥成熟果实。在藏药经典著作《晶珠本草》中,诃子被称为“藏药之王”,有“补隆”之效^[6],且藏医“补隆养血”与治疗性血管新生理论相似^[7]。现代医学研究发现,诃子提取物具有抗氧化、促进血管新生等作用,已有研究初步证实诃子提取物的脑保护作用^[8]。对于诃子有效成分在心脑血管疾病中的研究多集中在其抗氧化、抗炎、调节血脂等^[9-11]作用上,然而其是否能通过促进血管新生这一机制来发挥脑保护作用却鲜有报道。本课题组前期研究发现,诃子中多酚类活性成分鞣花酸可改善动脉粥样硬化^[12];其另一种多酚类活性成分柯里拉京可调控核因子E2相关因子2(Nrf2)及血管内皮细胞生长因子(VEGF)通路,发挥抗氧化、抗炎、促血管新生的作用,缓解大鼠脑缺血再灌注损伤^[9]。基于以上背景,本研究通过建立脑缺血再灌注[即大脑中动脉阻塞(MCAO)再灌注]损伤大鼠模型,观察诃子提取物对模型大鼠脑组织的保护作用,进一步探讨其通过调控VEGF/血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR2)通路和调节一氧化氮(NO)水平进而抗脑缺血再灌注损伤的可能机制,为诃子提取物用于脑缺血再灌注损伤的防治提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

HX-100E型小动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司);COOLPIX S1型照相机(日本Nikon公司);IX71-Dtr/2型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);SCIENTZ-10N型冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司);403756PK5Re型线栓(美国Docol公司);037-003型大鼠脑槽(北京华越洋生物科技股份有限公司);HM340E型石蜡切片机(德国Zeiss公司);Multiskan GO型全波长酶标

仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);5804R型低温冷冻离心机(德国Eppendorf公司,离心半径:16.8 cm);FACSCalibur型流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 药材与试剂

诃子粉[购于西安金绿生物工程技术有限公司,批号:20150401,规格:10:1(生药质量:诃子粉质量)],经空军军医大学第一附属医院文爱东教授鉴定为使君子科植物诃子(*T. chebula* Retz.)果实的粉末。

VEGF、VEGFR2检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号分别为20151104、EK1525);NO检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20151109);异硫氰酸荧光素标记的CD31抗体(FITC-CD31)、藻红蛋白标记的CD34抗体(PE-CD34)、FITC标记的葡聚糖(FITC-D)(美国Abcam公司,批号分别为2530-1、553729、952964);牛血清白蛋白(BSA,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号:03J10150);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色剂、PE标记的大鼠抗小鼠免疫球蛋白G(PE-IgG)二抗、FITC标记的大鼠抗小鼠免疫球蛋白G(FITC-IgG)二抗(美国Sigma公司,批号分别为32016D0、20172537、20171508);多聚甲醛(国药集团化学试剂有限公司);苏木精染料(上海化学试剂总厂试剂三厂);伊红染料(武汉博士德生物工程有限公司);10%水合氯醛(空军军医大学第一附属医院药剂科配制);磷酸盐缓冲液(PBS,空军军医大学第一附属医院药剂科配制,pH 7.4);其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

SPF级雄性SD大鼠40只,7~8周龄,体质量250~300 g,由空军军医大学实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCXK(军)2012-007]。所有大鼠均分笼饲养,环境温度为24~26℃,湿度为60%~70%;造模前均禁食、不禁水12 h。

2 方法

2.1 诃子提取物的制备

参考文献[13]制备诃子提取物。称取诃子粉适量,用适量60%乙醇加热回流提取3次,合并提取液浓缩至约药材量的一半,再加入等体积的95%乙醇,搅拌均匀,静置12 h后,滤过,滤渣用60%乙醇洗涤,合并滤液与洗液,减压回收乙醇,冷冻干燥后即得诃子提取物(每1 g提取物由2 g诃子粉制得),备用。

2.2 MCAO再灌注模型的建立

参照改良 Longa 线栓法^[14-15]复制 MCAO 再灌注损伤模型。大鼠术前禁食 12 h 后,腹腔注射 10% 水合氯醛 (3 mL/kg) 麻醉,以仰卧位固定,沿颈正中中线作纵行切口,分离皮下组织,结扎颈总动脉近心端和颈外动脉远心端,将线栓沿颈总动脉分叉部约 4 mm 处插入颈总动脉,直至有轻微阻力为止,造成右侧大脑 MCAO;缺血 1.5 h 后,拔出线栓实现再灌注(当大鼠清醒后,出现对侧上肢重于下肢的瘫痪症状即视为造模成功)^[16]。假手术组大鼠除不插入线栓外,其余操作同上。

2.3 分组与给药

将 40 只大鼠随机分为假手术组、模型组和诃子提取物低、中、高剂量组 (20、50、100 mg/kg,以提取物质量计,剂量设置参考文献^[17-18]),每组 8 只。按“2.2”项下方法造模成功 2 h 后,各给药组大鼠均灌胃相应药物(以生理盐水为溶剂),假手术组和模型组大鼠均灌胃等体积生理盐水,每天 1 次,连续 7 d。

2.4 外周血内皮祖细胞(EPCs)水平的测定

于给药后 1、3、7 d 采集大鼠内眦静脉丛血 1 mL,以 2 000 r/min 离心 20 min,采用 Ficoll 密度梯度离心法提取外周血中的单核细胞层,重悬于适量 0.5% BSA 中,混匀;依次加入 FITC-CD31、PE-CD34 抗体(分别为 10、2 μ L),同时以 PE-IgG、FITC-IgG 二抗(各 10 μ L)为阴性对照,振荡混匀后,于室温下避光孵育 10 min,加入 0.5% BSA 2 mL,混匀;以 1 500 r/min 离心 10 min,用 0.5% BSA 清洗,弃去上清液,将沉淀重悬于适量 0.5% BSA 中,用流式细胞仪测定各组大鼠外周血中 EPCs 水平(每 20 万个外周血单核细胞中检出 FITC-CD31 和 PE-CD34 双标记的即被认为是 EPCs)。

2.5 神经功能学评分

于给药后 7 d 采用改良 Garcia 法^[19]对大鼠进行神经功能学评分,包括自主运动(0~3 分)、鼠笼攀援(1~3 分)、前肢对称性(0~3 分)、活动对称性(0~3 分)、触摸触须反应(1~3 分)、触摸双侧躯干反应(1~3 分)等 6 项,总分为 18 分,分数越低表明神经功能损伤越严重。

2.6 脑梗死体积百分比的测定

采用 TTC 染色法测定各组大鼠的脑梗死体积。经神经功能学评分后断头处死各组大鼠,并将其大脑置于脑槽中,制备冠状切片(2 mm),置于 2% TTC 染色剂中,于 37 $^{\circ}$ C 下避光染色 30 min。将染色后的脑组织置于 4 $^{\circ}$ C、4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后,拍照,采用 Image Pro Plus 7.0 软件处理并计算脑梗死体积[正常脑组织染色后呈红色(非苍白区),梗死脑组织因未着色而呈白色(苍白区);脑梗死面积为对侧正常脑组织半球面积与患侧正常脑组织面积的差值,总脑梗死体积为各脑切片梗死面积之和乘以切片厚度(2 mm),脑梗死体积百分比为总脑梗死体积与全脑体积的比值]^[20]。

2.7 脑组织病理学观察

取大鼠脑组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后,常规脱水、石蜡包埋、切片(5 μ m),经苏木精-伊红

(HE)染色后,置于荧光倒置显微镜下观察各组大鼠脑组织的病理学变化。

2.8 脑组织梗死区域微血管密度(MVD)的测定

取大鼠脑组织(处死前已注射 FITC-D)置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后,常规脱水、石蜡包埋、切片(5 μ m),参照 Weidner 法^[21]测定大鼠脑组织梗死区域的 MVD。寻找梗死区域内 5 个血管密集区,于 200 倍荧光倒置显微镜下计算该区域内被染成绿色的微血管数目。每份切片均选取 5 个高倍视野计数,取其平均值。

2.9 脑组织梗死区域微血管新生相关因子的测定

于冰浴中切取大鼠脑组织梗死区域适量,去除脑膜和血液,加入 4 $^{\circ}$ C PBS 适量,匀浆约 1 min,制成 10% 脑组织匀浆。匀浆于 4 $^{\circ}$ C 下、以 3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)以全波长酶标仪测定脑组织中 VEGF、VEGFR2、NO 水平,严格按照检测试剂盒说明书操作。

2.10 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计分析。采用 Shapiro-Wilk 检验和 Levene 检验进行正态性和方差齐性分析,符合正态分布且方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠外周血 EPCs 水平比较

与假手术组比较,模型组大鼠各时间点外周血 EPCs 水平均显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,诃子提取物中、高剂量组大鼠各时间点外周血 EPCs 水平均显著提高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且该指标于给药后 3 d 达到峰值,给药后 7 d 有所下降;而诃子提取物低剂量组大鼠各时间点外周血 EPCs 水平与模型组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表 1。

表 1 各组大鼠外周血 EPCs 水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 1 Comparison of EPCs levels in peripheral blood of rats among different groups($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	给药后 1 d	给药后 3 d	给药后 7 d
假手术组	55.2 \pm 6.7	60.0 \pm 5.6	52.3 \pm 5.5
模型组	24.0 \pm 3.1 [*]	34.0 \pm 4.0 [*]	32.0 \pm 5.0 [*]
诃子提取物低剂量组	26.2 \pm 2.8	37.3 \pm 3.8	35.1 \pm 4.6
诃子提取物中剂量组	36.0 \pm 5.4 [*]	89.0 \pm 6.3 [*]	40.0 \pm 4.7 [*]
诃子提取物高剂量组	40.0 \pm 6.3 [*]	106.0 \pm 3.7 ^{***}	55.0 \pm 8.3 [*]

注:与假手术组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{***} $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, ^{*} $P < 0.05$; vs. model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{***} $P < 0.01$

3.2 各组大鼠神经功能学评分比较

与假手术组比较,模型组大鼠神经功能学评分显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,诃子提取物中、高剂量组大鼠神经功能学评分均显著提高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而诃子

提取物低剂量组大鼠神经功能学评分与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),详见表2。

表2 各组大鼠神经功能学评分和脑梗死体积百分比比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Tab 2 Comparison of neurological function scores and the volume percentage of cerebral infarction of rats among different groups($\bar{x}\pm s, n=8$)

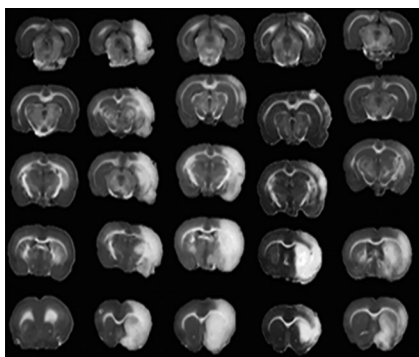
组别	神经功能学评分	脑梗死体积百分比, %
假手术组	17.67±0.52	0
模型组	8.33±1.21*	43.16±4.75*
诃子提取物低剂量组	8.83±1.17	37.05±5.79
诃子提取物中剂量组	13.00±0.89 [#]	29.75±3.69 [#]
诃子提取物高剂量组	14.33±1.21 ^{##}	22.63±3.05 [#]

注:与假手术组比较, * $P<0.01$;与模型组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, * $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

3.3 各组大鼠脑梗死体积百分比比较

假手术组大鼠脑组织中未见梗死区域,而模型组可见明显的梗死区域,且其脑梗死体积百分比假手术组显著提高,差异有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,诃子提取物中、高剂量组大鼠脑梗死区域明显缩小,且其脑梗死体积百分比均显著下降,差异均有统计学意义($P<0.05$);而诃子提取物低剂量组大鼠脑梗死区域虽有所缩小,但其脑梗死体积百分比与模型组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),详见图1、表2。鉴于上述结果,本研究以诃子提取物中、高剂量组大鼠为对象进行后续的机制研究。



假手术组 模型组 诃子提取物低剂量组 诃子提取物中剂量组 诃子提取物高剂量组

图1 各组大鼠脑组织TTC染色结果

Fig 1 TTC staining results of cerebral tissue in rats of each group

3.4 各组大鼠脑组织病理学变化情况比较

假手术组大鼠脑组织中神经细胞及毛细血管形态正常、结构完整,未出现明显的病理学改变;模型组大鼠脑组织梗死区域周围细胞排列较紊乱,部分细胞核固缩、溶解,胞体缩小;与模型组比较,诃子提取物中、高剂量组大鼠脑组织梗死区域明显缩小,坏死细胞明显减少,详见图2。

3.5 各组大鼠脑组织梗死区域MVD比较

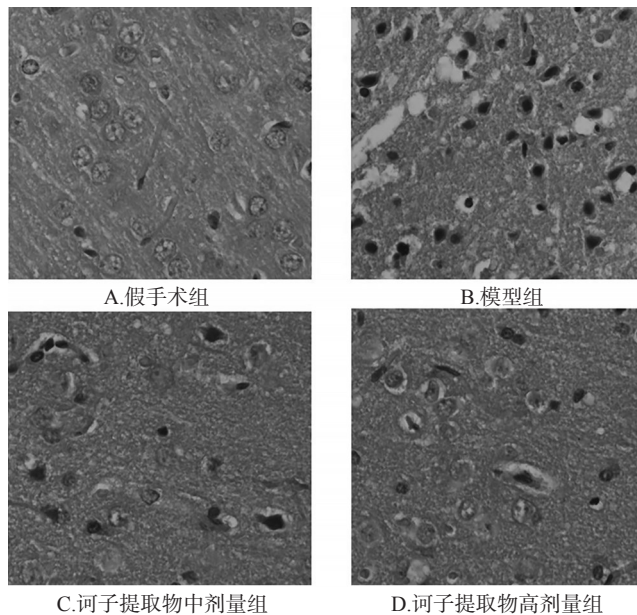


图2 各组大鼠脑组织病理学显微观察结果(HE染色, ×400)

Fig 2 Pathological microscopic observation results of cerebral tissue in rats of each group (HE staining, ×400)

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织梗死区域MVD显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,诃子提取物中、高剂量组大鼠脑组织梗死区域MVD均显著提高,差异均有统计学意义($P<0.05$),详见表3。

表3 各组大鼠脑组织梗死区域MVD及VEGF、VEGFR2、NO水平比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

Tab 3 Comparison of MVD, VEGF, VEGFR2 and NO levels in cerebral infarction area of rats among different groups($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	MVD	VEGF, pg/g	VEGFR2, pg/g	NO, nmol/mg
假手术组	15.07±2.17	11.48±1.84	8.45±1.99	1.92±0.15
模型组	6.99±1.10*	14.07±2.23*	18.95±2.98*	3.03±0.41**
诃子提取物中剂量组	15.26±3.09 [#]	22.96±2.93 [#]	25.98±2.99 [#]	3.93±0.32 [#]
诃子提取物高剂量组	19.02±4.14 [#]	31.04±3.69 [#]	37.16±4.08 [#]	5.19±0.53 [#]

注:与假手术组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较, [#] $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$

3.6 各组大鼠脑组织梗死区域VEGF、VEGFR2、NO水平比较

与假手术组比较,模型组大鼠脑组织梗死区域VEGF、VEGFR2、NO水平均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,诃子提取物中、高剂量组大鼠上述指标均显著升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),详见表3。

4 讨论

血管新生对缺血区域脑组织微血管循环的改善、缺

血组织的保护和神经功能的恢复均具有重要意义^[22]。治疗性血管新生与传统藏医“补隆养血”、中医“益气生脉”理论均密切相关^[23]。在藏医理论中,缺血性脑病为“隆血两虚”,属“脉雍”,其治法强调“血”“隆”“脉”三者结合,通过“补隆养血”的方法达到治疗脑卒中的目的^[24]。诃子作为“藏药之王”,有补隆养血、益气生脉之功效,由其组成的藏药方剂三果汤也广泛应用于心脑血管等疾病的治疗^[25]。近年来有研究发现,藏药方剂三果汤^[25-26]及诃子提取物^[27]在脑缺血再灌注模型中可发挥脑血管保护作用,但这种保护作用与脑梗死区域血管新生的相关性及其分子作用机制鲜有报道,因此本研究对诃子提取物上述保护作用的机制进行了初步探讨。由于本课题组前期已初步证实了诃子提取物及其药效成分的脑保护作用^[9-11],本研究主要针对其促血管新生作用及可能机制进行探索,故未增设阳性对照药物组。

本研究结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠外周血EPCs水平显著下降,神经功能学评分显著下降,且脑组织中可见明显的梗死区域,脑梗死体积百分比显著提高,提示大鼠发生了脑缺血再灌注损伤,MCAO模型复制成功。与模型组比较,诃子提取物中、高剂量组大鼠外周血EPCs水平均显著升高,且于给药后3 d达到峰值,同时其神经功能学评分显著提高,脑梗死体积百分比显著降低,提示诃子提取物对大鼠脑缺血再灌注损伤具有一定的保护作用,并可在用药早期促进EPCs的大量分化、增殖。随后本研究又以中、高剂量的诃子提取物为对象,考察了其对大鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的可能机制。

MVD是反映血管新生能力的有效指标,其值与新生毛细血管丰富度成正比^[22]。本研究结果显示,中、高剂量的诃子提取物可显著提高大鼠脑组织梗死区域的MVD,提示其可改善该区域血流量,促进神经细胞功能的恢复。VEGF在新生血管的生长过程中发挥着至关重要的作用,研究表明脑缺血再灌注损伤后,VEGF活化可诱导VEGFR表达上调,刺激血管内皮细胞增殖,促进新血管生成,并能在内皮细胞内诱导抗凋亡蛋白表达,从而维持内皮细胞的形态、保持血管功能的完整性^[28-29]。VEGFR2主要在血管内皮细胞中表达,是VEGF的特异性膜受体,是一种具有高亲和力的酪氨酸激酶受体^[30]。来自内皮的NO是众多血管生长因子的下游介质,具有增加分泌促血管生成介质并促进内皮细胞增殖、迁移的作用,是诱导新血管生成所必需的物质^[31]。本研究结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠VEGF、VEGFR2、NO水平均显著升高,提示MCAO模型建立后脑组织相关因子的表达会呈应激性升高;与模型组比较,诃子提取物中、高剂量组大鼠上述指标均进一步显著升高,表明诃子提取物可通过上调脑组织梗死区域的VEGF、VEGFR2、NO的表达来促进其微血管新生和神经功能恢复。这提示诃子提取物促血管新生的作用可能与上调VEGF、VEGFR2、NO的表达有关。

综上所述,本研究初步证实了诃子提取物可提高脑缺血再灌注损伤模型大鼠外周血EPCs水平、神经功能学评分和梗死区域MVD,减小其脑梗死体积,对其缺血再灌注损伤具有一定的保护作用;其机制可能与上调血管新生相关因子(VEGF、VEGFR2、NO)的表达有关。本研究为藏药诃子防治脑缺血性疾病提供了实验依据。后续本课题组将进一步探讨其具体药效成分,深入挖掘其作用机制,并开展药动学、药效学研究。

参考文献

- [1] KIM AS, JOHNSTON SC. Global variation in the relative burden of stroke and ischemic heart disease[J]. *Circulation*, 2011, 124(3): 314-323.
- [2] 徐芳琴, 郭超, 卞涛, 等. 丹红注射液对大鼠脑缺血/再灌注损伤治疗时间窗的影响[J]. *中成药*, 2016, 38(9): 1887-1892.
- [3] ERGUL A, ALHUSBAN A, FAGAN SC. Angiogenesis: a harmonized target for recovery after stroke[J]. *Stroke*, 2012, 43(8): 2270-2274.
- [4] 常丽萍, 张秋燕, 韩建科, 等. 通心络超微粉对缺血性脑卒中大鼠微血管新生影响的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(7): 1015-1018.
- [5] DING Y, CHEN M, WANG M, et al. Neuroprotection by acetyl-11-keto- β -boswellic acid, in ischemic brain injury involves the Nrf2/HO-1 defense pathway[J]. *Sci Rep*, 2014. DOI: 10.1038/srep07002.
- [6] 张吉仲, 杨学军. 藏药诃子归经的实验研究[J]. *江西中医学院学报*, 2007, 19(2): 81-82.
- [7] 黄福开, 仁旺. 藏医补隆养血法和降隆吸血法对治疗脑中中风后遗症疗效观察[J]. *首都医药*, 1999, 6(5): 51.
- [8] GAIRE BP, KIM H. Neuroprotective effects of Fructus Chebulae extracts on experimental models of cerebral ischemia[J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(1): 69-75.
- [9] LIU W, SHANG P, LIU T, et al. Gastroprotective effects of chebulagic acid against ethanol-induced gastric injury in rats[J]. *Chem Biol Interact*, 2017. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.09.019.
- [10] DING Y, REN D, XU H, et al. Antioxidant and pro-angiogenic effects of corilagin in rat cerebral ischemia via Nrf2 activation[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(70): 114816-114828.
- [11] 李斌, 李鑫, 范源. 诃子药理作用研究进展[J]. *药学研究*, 2015, 34(10): 591-595.
- [12] DING Y, ZHANG B, ZHOU K, et al. Dietary ellagic acid improves oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis: role of Nrf2 activation[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 175(3): 508-514.
- [13] 王金华, 孙芳云, 袁东亚, 等. 诃子乙醇提取物的抗氧化作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(5): 124-126.
- [14] 范瑞娟, 罗亚非, 孙玉凤. 新式线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型的建立[J]. *中国民族民间医药*, 2014, 23(2): 26-27.
- [15] DING Y, CHEN M, WANG M, et al. Posttreatment with

土家族药三百棒的HPLC指纹图谱研究^Δ

文德鉴^{1,2*}, 丁慧云¹, 斯琴¹, 尹衡¹, 涂星^{1,2}, 袁丽君¹, 袁林^{2,3} (1. 湖北民族学院医学院, 湖北恩施 445000; 2. 风湿病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北恩施 445000; 3. 湖北民族学院附属民大医院, 湖北恩施 445000)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)24-3397-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.24.19

摘要 目的: 建立三百棒药材的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱。方法: 采用HPLC法, 色谱柱为SinoChrom ODS-BP, 流动相为乙腈-0.75%冰醋酸溶液(梯度洗脱), 流速为1.0 mL/min, 检测波长为275 nm, 柱温为30 ℃, 进样量为10 μL。以岩白菜素为参照, 绘制10批药材样品的HPLC图谱, 采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A)》进行相似度评价, 确定共有峰。结果: 10批药材样品的HPLC图谱有14个共有峰, 其中4批药材样品的相似度均大于0.90。结论: 所建HPLC指纹图谱可为三百棒药材的质量控制提供依据。

关键词 三百棒; 指纹图谱; 高效液相色谱法; 岩白菜素

Study on HPLC Fingerprint of Tujia Medicine *Toddalia asiatica*

WEN Dejian^{1,2}, DING Huiyun¹, SI Qin¹, YIN Heng¹, TU Xing^{1,2}, YUAN Lijun¹, YUAN Lin^{2,3} (1. School of Medical Science, Hubei University for Nationalities, Hubei Enshi 445000, China; 2. Hubei Provincial Key Lab of Occurrence and Intervention of Rhumatic Disease, Hubei Enshi 445000, China; 3. Minda Hospital of Hubei University for Nationalities, Hubei Enshi 445000, China)

11-keto-β-boswellic acid ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury: Nrf2/HO-1 pathway as a potential mechanism[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 52(3): 1430-1439.

[16] 康涛, 张洪. 经颈总动脉和经颈外动脉制作大鼠MCAO模型的比较[J/CD]. *中华脑血管病杂志: 电子版*, 2013, 7(3): 29-33.

[17] 黄耀广, 陈小雪, 陈秀英. 诃子、西青果和毛诃子的含量比较研究[J]. *西北药学杂志*, 2017, 32(2): 154-157.

[18] SILAWAT N, GUPTA VB. Chebulic acid attenuates ischemia reperfusion induced biochemical alteration in diabetic rats[J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(1): 23-29.

[19] 徐晓琳, 马重阳, 王雪茜, 等. 牛黄中胆酸类成分改善大鼠脑缺血再灌注损伤及调节内质网应激作用比较[J]. *药物评价研究*, 2017, 40(1): 11-19.

[20] 王荣亮, 刘小蒙, 张营, 等. 大鼠局灶性脑缺血后神经功能评分与脑梗死体积相关性分析[J]. *首都医科大学学报*, 2013, 34(1): 69-74.

[21] 卫国, 段佳林, 殷英, 等. 丹参素和羟基红花黄色素A促血管新生及抗大鼠心肌梗死作用研究[J]. *时珍国医国药*, 2016, 27(11): 2576-2578.

[22] 张梦泽, 李国坤, 赵欣童, 等. 血管新生的分子机制与相关疾病[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(9): 1718-1722, 1728.

[23] 殷英, 卫国, 王艳华, 等. 丹红注射液促进心梗模型大鼠缺血性心肌血管新生[J]. *中成药*, 2016, 38(9): 1893-1897.

[24] 俄旦措. 藏医治疗中风的临床观察[J]. *中国民族民间医药*, 2011, 20(16): 11.

[25] CHANG CL, LIN CS. Phytochemical composition, antioxidant activity, and neuroprotective effect of Terminalia chebula Retzius extracts[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012. DOI: 10.1155/2012/125247.

[26] 项朋志, 余洪, 刘琼, 等. 藏药大三果抗氧化活性研究[J]. *化学与生物工程*, 2013, 30(11): 27-30.

[27] PARK JH, JOO HS, YOO KY, et al. Extract from Terminalia chebula seeds protect against experimental ischemic neuronal damage via maintaining SODs and BDNF levels[J]. *Neurochem Res*, 2011, 36(11): 2043-2050.

[28] 向本旭, 刘婷婷, 孙芳玲, 等. VEGF相关信号通路在血管新生中的研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(12): 81-86.

[29] 庄钦, 毛威. 丹参多种活性成分调节血管新生机制的研究概述[J]. *浙江中医药大学学报*, 2014, 38(4): 506-510.

[30] 凌博. 高切高脂通过VEGF-VEGFR2信号通路调控血管新生参与动脉粥样斑块形成[D]. 重庆: 重庆大学, 2015.

[31] WANG M, CHEN M, DING Y, et al. Pretreatment with β-boswellic acid improves blood stasis induced endothelial dysfunction: role of eNOS activation[J]. *Sci Rep*, 2015. DOI: 10.1038/srep15357.

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81360672)

* 副教授, 硕士。研究方向: 民族药资源开发与利用。电话: 0718-8437479。E-mail: 361197956@qq.com

(收稿日期: 2018-02-11 修回日期: 2018-09-06)

(编辑: 张元媛)