

补阳还五汤对脑缺血模型大鼠脑损伤的保护作用

尹天雷¹ 李雅² 李鹤白³ 指导老师:蔡光先¹

(1 湖南省中医药研究院,湖南省长沙市麓山路58号,410006; 2 湖南中医药大学; 3 世界中医药学会联合会)

摘要 目的:通过观察脑缺血模型大鼠脑组织 CAMP 反应元件结合蛋白 CREB 的表达及血液丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性,揭示补阳还五汤传统剂量或超微制剂对脑缺血大鼠模型脑的保护作用及机制。方法:建立脑缺血模型,分别于缺血1天及7天测定血液中 SOD 及 MDA 含量及用免疫组织化学法观察 CREB 的表达,以阳性细胞计数作为观察指标。结果:脑缺血后,MDA 明显增加,SOD 活性则明显降低,提示补阳还五汤能明显降低组织内的 MDA 和增加 SOD 活性,并上调 CREB 的水平,促进其活化表达。超微补阳还五汤以 1/2 传统生药剂量时即可达到传统补阳还五汤的效果,等剂量时效果明显增加。结论:复方超微补阳还五汤能通过降低组织内的 MDA 和增加 SOD 活性,并上调 CREB 的活化对大鼠脑缺血损伤进行保护,其作用优于传统补阳还五汤。

关键词 补阳还五汤/药理学; @ 超微化研究

Protection on Cerebral-Ischemia Caused Brain Injury in Rats by Yang-Tonifying Five-Returning Decoction

Yin Tianlei, Li Ya, Li Hebai, et al.

(Hunan Institution of Chinese Medicine, Changsha 410006)

Abstract Objectives: Through observing expression of cyclic AMP response element binding protein (CREB), and activity of MDA and SOD in Rats' brains with cerebral ischemia, protective effects and the mechanism of traditional Yang-Tonifying Five-Returning Decoction and its ultra-micro preparation were brought to light. **Methods:** Model of cerebral ischemia was established. At Day 1 and Day 7, concentration of SOD and MDA were detected, and expressions of CREB were observed using immunohistochemical method by counting positive cells. **Results:** In ischemic brains, MDA increased while activity of SOD decreased markedly, suggesting the decoction was able to bring down MDA level and increase SOD activity, at the same time raise level of CREB to promote activation expression. The ultra-micro preparation with half dosage of crude drugs could reach the same effect as traditional decoction. With same dosage, the ultra-micro preparation was remarkably better than traditional decoction form. **Conclusions:** The ultra-micro preparation of compound Yang-Tonifying Five-Returning Decoction is better than traditional decoction at protecting cerebral ischemia caused brain injury in rats through bringing down MDA level, improving SOD activity, and promoting CREB activation.

Key Words Yang-Tonifying Five-Returning Decoction/pharmacology; @ ultra-micro study

中药超微粉碎(又称中药微粉化)是随着现代粉体工程微粉化技术——超微粉体技术的发展而新兴的一门中药加工技术。超细粉体技术是一门跨学科、跨行业的高新技术,该技术引进中药加工领域产生了微米中药。中药超细粉体技术可使中药达到细胞级粉碎,能提高细胞破壁率,促进中药成分的溶出,从而提高中药的利用率与生物利用度^[1]。

经检索可知,近年来对中药超微的研究多是对超微工艺的研究以及对单味药中药的超微化研究,而从复方角度对其研究者相对较少。故本文选择能够反应神经元功能状态和神经元分化的 CAMP 反应元件结合蛋白(cAMP Response Element-Binding Protein, CREB)作为主要指标,同时观察丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性,对补阳还五汤对实验性脑缺血动物模型的影响进行研究,为中药复方超微研究提供一定的研究思路与实验依据。

万方数据

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 动物:健康清洁级 SD 大鼠,雄性,60 只,体重(330±20)g,购自上海必凯公司。

1.1.2 药品:由赤芍、川芎、当归尾、地龙、黄芪、桃仁、红花等组成,保持《医林改错》原方剂量比例不变。补阳还五汤传统剂量或超微制剂均来源于同一批药材,二者均由湖南省中药超微工程技术研究中心提供。

1.1.3 试剂:SOD 及 MDA 试剂盒购于南京建成生物科技公司;CREB 免疫组化染色采取 ABC 法,试剂盒及相应的抗体均购自武汉博士德生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 脑缺血模型的制作:采用栓线法制作局灶性大鼠脑缺血模型^[2]。在室温(22℃)条件下,10%的水合氯醛(3.5ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,仰卧于手术台上,固定。颈正中切开,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈

外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA),结扎 ECA 近端,分离 ICA 主干至翼腭动脉,不结扎。动脉夹夹闭 CCA 近心端,在 CCA 近动脉分叉处剪一小口,缓慢向 ICA 插入栓线(向内上方角度插入,否则易误入翼腭动脉),直到有阻力不能再插入为止,回抽少许,栓线插入深度为(18±1)mm。在 CCA 根部结扎,缝合皮肤,栓线末端留在皮肤外,缺血 2h 后抽出栓线即可造成再灌注模型。动物清醒后爬行时向左转圈(追尾现象),严重时向左跌倒,提尾时左前肢内收屈曲提示造模成功。假性手术组仅作皮肤切开和血管剥离,不做栓线处理,其余操作同其它组。

1.2.2 动物分组及给药:所有动物于动物清醒后按相应分组开始灌胃给药,给药剂量按动物与人体表面积折算,其中补阳还五汤传统汤剂组(保持《医林改错》原方剂量)每日灌胃 1.77g/d 浸膏粉,相当于成人每日剂量为 142.5g/d 的 2 倍;补阳还五汤超微低剂量组(药物剂量与传统汤剂组相同)每日灌胃 0.78g/d 浸膏粉,相当于成人每日剂量为 142.5g/d,补阳还五汤超微高剂量组,每日灌胃 1.56g/d 浸膏粉,相当于成人每日剂量为 142.5g/d 的 2 倍。假手术组及模型组用相应剂量蒸馏水 3ml,并分别连续给药 1 天、7 天后进行处死,每组每个时点处死 6 只并进行相应检测。

1.2.3 病理学观察:石蜡切片染色后光镜下观察缺血侧皮层半暗带区脑组织的病理学改变。

1.2.4 生化指标测定:用 10%的水合氯醛腹腔注射麻醉,迅速经腹主动脉取血,置肝素抗凝的离心管,离心(3600r·min⁻¹,4℃)分离血浆,测定血浆 SOD 及 MDA 含量。SOD 检测采用黄嘌呤氧化酶法,MDA 检测采用

硫代巴比妥酸法,测定按照试剂盒说明书进行。

1.2.5 CREB 免疫组化观察:将大鼠用 10%的水合氯醛腹腔注射麻醉后,迅速打开胸腔,暴露心脏,经左心室插管至升主动脉,剪开右心耳,快速灌入 100ml 左右的生理盐水,然后用 4%的多聚甲醛(0.1mol/L 磷酸盐缓冲液配制,pH7.2~7.4)进行灌注,先快后慢,进液总量约 250ml,灌注时间 20~30min,然后取脑,置于相同固定液中后固定,石蜡包埋。以视交叉和其后 4mm 处两点冠状切片,行 HE 染色及免疫组织化学染色(采用 ABC 法,按试验剂规定内容进行操作)。染色后在 400 倍光镜下随机取 3 个视野进行拍照,并用专业软件计算出阳性细胞数目(拍照及图像分析在湖南省中医药大学病理教室完成)。

1.3 数据处理:数据库选择 EPIDATA3.0 英文版,统计软件选择 SPSS10.0。计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述,各剂量组间的比较,当数据满足正态性与方差齐性,采用 LSD-t 检验;如果数据不满足上述条件则采用秩和检验。

2 结果

2.1 HE 染色(光镜下形态学观察)观察病理学改变:光镜下进行形态学观察,假手术组大鼠神经细胞形态正常,着色均匀,细胞核呈蓝色;模型组大鼠缺血中心区大量神经细胞排列紊乱,神经元数目减少,残留神经细胞萎缩,核固缩。补阳还五汤传统汤剂组及补阳还五汤超微组存在缺血脑组织病变;与模型对照组比较,缺血损伤减轻,存活神经元数目相对较多。

2.2 对实验性脑缺血大鼠脑组织 SOD 活性及 MDA 含量的影响:从表 1 可知,与假手术组比较,模型组脑

表 1 补阳还五汤对脑缺血大鼠脑组织 SOD 活性及 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	SOD(NU/mg·prot)		MDA(nmol/ml)	
	1 天	7 天	1 天	7 天
假手术组	327.25 ± 32.47	336.28 ± 28.72	3.45 ± 0.92	3.22 ± 0.82
模型组	247.25 ± 19.47 ⁽²⁾	262.48 ± 23.55 ⁽²⁾	6.27 ± 1.15 ⁽²⁾⁽³⁾	5.98 ± 1.03 ⁽²⁾⁽³⁾
传统汤组	307.24 ± 20.42 ⁽⁴⁾	299.47 ± 25.42 ⁽²⁾⁽³⁾	4.27 ± 1.27 ⁽³⁾	4.15 ± 1.05 ⁽³⁾
超微低剂量组	292.65 ± 24.78 ⁽⁴⁾	311.24 ± 29.46 ⁽³⁾	4.55 ± 1.02 ⁽³⁾	4.33 ± 1.12 ⁽³⁾
超微高剂量组	321.47 ± 29.42 ⁽⁴⁾	327.48 ± 24.42 ⁽⁴⁾	3.72 ± 1.11 ⁽⁴⁾	3.53 ± 0.76 ⁽⁴⁾

注:与假手术组比较,⁽¹⁾P<0.05、⁽²⁾P<0.01;与模型组比较,⁽³⁾P<0.05、⁽⁴⁾P<0.01。

表 2 补阳还五汤对脑缺血大鼠脑组织 CREB 免疫反应阳性细胞计数的影响

分组	大脑皮质阳性细胞计数(个)		海马阳性细胞计数(个)	
	1 天	7 天	1 天	7 天
假手术组	86.25 ± 8.27	65.52 ± 9.42*	25.32 ± 5.26	22.38 ± 7.47
模型组	156.47 ± 12.38 ⁽²⁾	115.37 ± 13.45 ^{(2)*}	46.37 ± 8.22 ⁽²⁾	31.25 ± 7.25 [#]
传统汤组	182.57 ± 15.47 ⁽²⁾⁽⁴⁾	176.48 ± 12.24 ⁽²⁾⁽⁴⁾	72.39 ± 7.25 ⁽²⁾⁽⁴⁾	42.15 ± 5.53 ^{(2)(4)*}
超微低剂量组	213.54 ± 22.36 ⁽²⁾⁽⁴⁾	199.42 ± 15.32 ⁽²⁾⁽⁴⁾	65.48 ± 4.38 ⁽²⁾⁽⁴⁾	39.47 ± 6.22 ^{(1)*}
超微高剂量组	233.48 ± 17.38 ⁽²⁾⁽⁴⁾	225.38 ± 11.27 ⁽²⁾⁽⁴⁾	82.27 ± 11.25 ⁽²⁾⁽⁴⁾	69.52 ± 5.88 ^{(2)(4)*}

注:与假手术组比较,⁽¹⁾P<0.05、⁽²⁾P<0.01;与模型组比较,⁽³⁾P<0.05、⁽⁴⁾P<0.01。7 天与 1 天比较,*P<0.05、[#]P<0.01。

组织 SOD 活性明显降低,MDA 含量明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,补阳还五汤传统汤组及补阳还五汤超微组均能明显升高脑组织中 SOD 活性,降低 MDA 含量。对不同剂量的补阳还五汤超微组的分析可知,低剂量组对增加 SOD 活性和降低 MDA 含量均略高于传统组,高剂量组效果明显高于传统组,但不同剂量组与传统组比较差异均未有统计学意义,经分析与本试验样本量相对较小有关。

2.3 CREB 免疫组化检测

2.3.1 CREB 免疫组化染色结果:在光镜下,实验大鼠缺血后各组均有阳性细胞表达。模型组可见少量阳性神经细胞的表达,但表达较弱;补阳还五汤传统汤组和超微低剂量组可见阳性细胞在皮质广泛分布,而在海马内分布相对较少;补阳还五汤超微高剂量组高倍镜下皮质内充满棕黄色阳性反应颗粒,阳性细胞为星形或多角形,与模型对照组比较有明显差异。

2.3.2 CREB 免疫组化染色阳性细胞计数:由表 2 可见,各组缺血后各时点均见有 CREB 免疫反应阳性细胞,且分布特点以皮质为多,海马内分布较少。经进一步分析,补阳还五汤传统汤组与超微汤组缺血 1 天及 7 天后试验大鼠皮质与海马内的阳性细胞数均多于假手术组及模型组,且补阳还五汤超微高剂量组明显优于补阳还五汤传统汤组。缺血 7 天后模型组阳性细胞有明显减少,与缺血 1 天比较差异有统计学意义;而补阳还五汤传统汤组及超微汤组皮质内阳性细胞减少幅度相对较小,与缺血 1 天比较未有明显差异,且高剂量组的海马内的阳性细胞数与缺血 1 天比较亦未有明显下降,明显优于补阳还五汤传统汤组。

3 讨论

中风又称脑血管意外或脑卒中,缺血缺氧及再灌注损伤造成神经元的不可逆损伤,是该病最终致围内死亡和致残的主要原因。故如何减轻脑组织损伤、保护神经细胞、降低致残率是治疗该病的重点。CREB 是位于细胞核内的转录因子,活化的 CREB 是在脑发育期决定神经元生存及分化的关键因素之一。近年来发现转录因子 cAMP 反应元件结合蛋白在中枢神经系统中起着关键作用,诸如促进神经细胞的存活^[3]、再生^[4]、分化等。且随着脑缺血分子机制的深入研究,发现急性脑缺血所致的损伤信号同时激活了内源性保护性机制。已有实验证明转录因子 CREB 在脑缺血性刺激下被活化磷酸化 CREB (pCREB),并可能参与了缺血性脑损伤的内源性保护机制^[5]。

补阳还五汤是清代著名医家王清任创立的益气活血之代表方剂,宗《内经》“疏其气血,令其条达,而致

和平”之旨,遣方用药别具风格,并广为流传,为近代医家治疗中风的常用方剂之一。经检索,近年来报道用补阳还五汤治疗缺血性中风均取得了较好的疗效,对其药理作用的报道证实了补阳还五汤具有改善脑循环、增加脑血流量、改善血液流变学、改善脑细胞能量代谢、抗氧化作用及抑制自由基的产生和灭活自由基、拮抗神经毒性作用、减轻炎症反应、促进神经干细胞增殖分化抑制神经细胞凋亡和调节神经递质或神经肽紊乱等多方面作用^[6]。

本实验研究表明,补阳还五汤能明显降低实验性脑缺血大鼠脑组织 MDA 含量,提高 SOD 活性,增加脑组织 CREB 的表达。提示补阳还五汤可能是通过清除氧自由基及提高抗氧化酶活性,并增加 CREB 的表达而增强脑损伤的内源性保护机制,从而对脑组织产生保护作用。同时本实验进一步证明,补阳还五汤超微组在与补阳还五汤传统 1/2 剂量时便具有相似的效果,并随着补阳还五汤超微用药的增加效果明显加强;达到与传统剂量相同时,其药理作用明显优于传统制剂,提示中药复方超微制剂在提高药物疗效,治疗疾病方面具有比传统药物更佳的优势。故应用补阳还五汤超微制剂可以用较少的生药达到与传统制剂相同的效果,可以节约原料药材,使中药服用、携带更加方便,更易使人接受。

故加强对中药超微复方制剂的研究对推进中医及中药的现代化事业不无裨益,也为我们以后对中药复方便代化研究提供了一个较新的探索思路。

参考文献

- 1 蔡光先,杨永华,李跃辉.超微粉体技术与中药饮片改革.世界科学技术-中医药现代化,2004,(2):67~70.
- 2 冯新红,沈霞,袁伟等.栓线法制作局灶性大鼠脑缺血再灌注模型的改进及效果.徐州医学院学报,2003,23(6):483~485.
- 3 Yang EunJin, Yoon Joo-Heon, Min Do Sik, et al. Kinase activates cAMP-responsive element-binding protein during the neuronal differentiation of immortalized hippocampal progenitor cells. J. Biol. Chem, 2004, 279(10):8903~8910.
- 4 Yuan Qi, Harley Carolyn W. Early odor preference learning in the Rat: bidirectional effects of cAMP response element-binding protein (CREB) and mutant CREB support a causal role for phosphorylated CREB. J. Neurosci, 2003, 23:4760~4765.
- 5 葛巍,沈霞,刘永海等.磷酸化 cAMP 反应元件结合蛋白在全脑缺血大鼠海马中的表达.中风与神经疾病杂志,2004,(3).
- 6 王敏,邓长青.补阳还五汤抗脑缺血作用的研究概况与展望.湖南中医药大学学报,2000,20(4):71~72.
- 7 Choi JS, Park HJ, Kim HY, et al. Phosphorylation of PTEN and Akt in astrocytes of the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. Cell Tissue Res, 2005, 319(3):359~366.

(2007-02-27 收稿)