

实验研究

七十味珍珠丸对局灶性脑缺血大鼠脑组织中 SOD、CAT、MDA 的影响

甄丽芳¹ 罗远带² 黄福开² 胡贤达² 邵杰² 尚颖¹ 刘亚丽¹ 杜文兵¹

(1 南方医科大学中医药学院,广州,510515; 2 中国藏学研究中心北京藏医院,北京,100029)

摘要 目的:观察七十味珍珠丸对永久性大脑中动脉阻塞(Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion, PMCAO)大鼠脑组织中超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)及丙二醛(Maleic dialdehyde, MDA)含量的影响,初步探讨其脑保护作用机制。方法:取 SD 大鼠用线栓法制备 PMCAO 模型。观察七十味珍珠丸对大鼠脑梗死体积、脑组织中超 SOD、CAT 及 MDA 含量的影响。结果:与 PMCAO 模型组比较,七十味珍珠丸高、低剂量组大鼠脑梗死体积都有不同程度的减小($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),脑组织中 SOD、CAT 含量都有所升高,MDA 含量有不同程度下降($P < 0.01$)。结论:七十味珍珠丸可能通过有效地增强内源性抗氧化酶清除自由基的能力、减轻脑组织脂质过氧化损伤来实现脑保护作用的。

关键词 七十味珍珠丸;局灶性脑缺血损伤;氧化应激

Effect of Rannasangpei on the SOD, CAT and MDA in Brain Tissues of Rats with Local Cerebral Ischemia

Zhen Lifang¹, Luo Yuandai¹, Huang Fukai², Hu Xianda², Shao Jie², Shang Ying¹, Liu Yali¹, Du Wenbing¹

(1 College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2 Beijing Tibetan Hospital, China Tibetology Research Center, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To explore the effect of Rannasangpei on the SOD, CAT and MDA in the brain tissues of rats with permanent middle cerebral artery occlusion (PMCAO), and to study its cerebral protective mechanism. **Methods:** SD rats were made into local cerebral ischemic models with the method of permanent middle artery occlusion. The effects of Rannasangpei on the volume of cerebral infarction in rats and the changes of SOD, CAT and MDA contents in their brain tissues were observed. **Results:** The infarct volumes of rats in two Rannasangpei intervention groups were obviously decreased compared with the PMCAO model group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); compared with the PMCAO model group, the SOD and CAT contents in brain tissues of the rats in the high and low dose Rannasangpei groups were all significantly increased, the MDA contents were decreased in different degrees ($P < 0.01$). **Conclusion:** Rannasangpei has significant protective effect on cerebral ischemic injury in rats, and its protective mechanism may come from effectively enhancing ability of the endogenous antioxidant enzyme to scavenge the free radicals, and relieving lipid peroxidation damage of brain tissue.

Key Words Rannasangpei; Local ischemic injury; Oxidative stress

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.03.029

缺血性脑损伤病理过程涉及钙超载、氧化应激、炎症级联反应、兴奋性氨基酸毒性、神经元细胞凋亡等,越来越多的研究表明,氧化应激在缺血性脑损伤的病理生理机制中发挥了重要的作用。氧化应激是指机体在遭受各种有害刺激时,机体内自由基的产生和内源性抗氧化系统(超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、细胞色素氧化酶等)之间的严重失衡,导致氧自由基在机体蓄积而引起细胞毒性反应,从而导致组织损伤的过程^[1]。而自由基反应参与了脑缺血后神经细胞的损伤过程,是导致迟发性神经元损伤的核心环节。七十味珍珠丸(Rannasangpei)由金、银、珍

珠、蓝宝石、玛瑙、麝香、天然牛黄等 70 味天然动、植、矿物类药经煮、烧、泡等特殊的加工方法精制而成。含有较高的铁、镁、铜、铬、锌以及锰等微量元素^[2]。而这些微量元素参与构成了抗氧化系统中许多酶的活性中心,由此猜想七十味珍珠丸应该具有抗氧化损伤的作用。本次实验意在通过观察七十味珍珠丸对于局灶性脑缺血大鼠脑梗死体积、脑组织中 SOD、CAT 及 MDA 含量的影响来验证上述猜想是否成立。

1 材料与方法

1.1 实验药品 七十味珍珠丸由北京藏医院提供,批号:20130109。维脑路通片(曲克芦丁片)由亚宝药业

基金项目:国家重大财政专项“藏医心脑血管病临床研究及药物研发”(编号:1981020421)

作者简介:甄丽芳(1987.2—),女,研究生,研究方向:中西医结合脑病,E-mail:530539114@qq.com

通信作者:黄福开(1958.2—),男,研究生,副主任医师,院长,研究生导师,研究方向:中西医结合心脑血管病;E-mail:530539114@qq.com

集团股份有限公司生产,批号:20130701。

1.2 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 80 只,体重 230 ~ 250g,雌雄各半,由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号:44005900000285。

1.3 实验试剂 氯化三苯基四氮唑(TTC)购于 Sigma 公司。大鼠 SOD、CAT 及 MDA 的 ELISA 试剂盒均购自广州拓科达生物科技有限公司。

1.4 主要仪器 Thermo 酶标仪、2K-15 低温离心机等均由南方医科大学生命科学楼解剖教研室提供。

1.5 实验方法

1.5.1 动物分组、给药剂量及方式 购买 230 ~ 250 g SD 大鼠 80 只,随机分成两批,每批随机分成 5 组,即假手术组,PMCAO 模型组;七十味低剂量组(166 mg/kg · d);七十味高剂量组(664 mg/kg · d);维脑路通组(50 mg/kg · d),每组各 8 只大鼠。每天灌胃给药 1 次(按体表面积法),连续 14 d,于造模前 1 h 给药 1 次,给药剂量及途径同前。假手术组和 PMCAO 模型组用蒸馏水灌胃。

第一批:进行脑梗死体积检测(脑片 TTC 染色及脑梗死体积百分比计算)。第二批:测定大鼠脑组织中 CAT、SOD、MDA 的含量。

1.5.2 建立 PMCAO 模型 采用改良后的 Zea Longa 模型^[3]制作方法。实验动物以 10% 的水合氯醛(0.32 mL/100 g)腹腔麻醉后,仰卧固定于手术台上,颈部正中切开皮肤及浅筋膜,钝性分离胸锁乳突肌与胸骨舌骨肌,暴露右侧颈总动脉(Common Carotid Artery, CCA),沿着颈总动脉快速分离劲外动脉(External Carotid Artery, ECA)和颈内动脉(Internal Carotid Artery, ICA)。电凝联系 ECA 与 ICA 之间的动脉。在右 ECA 主干的远心端 1.5 cm 处结扎,提拉 ECA 残端的结扎线,用微型血管夹在 CCA 分出 ECA 处,将 ECA 临时夹闭,在血管夹与 ECA 残端之间结扎一道缝合线,不打紧。在 ECA 远心端死结与近心端活结之间开一小口,用制备好的直径为 0.21 mm 线栓沿 ECA 插入,扎紧缝合线,绑住线栓,同时松开微型血管夹。当线栓头端进到 ICA 与 ECA 的分叉处。剪断开口上端的 ECA,使线栓掉头进入右 ICA,避开翼腭动脉(Pterygopalatine Artery, PPA),待线栓标记点(距线栓顶端 18 mm 处做标记)进到分叉内,有阻挡感时,扎紧线栓,缝合切口。在插线的过程中要注意手感,当遇到阻力时不要用蛮劲插入,当线栓弯曲时要更换,手法要轻柔、迅速。假手术组:只是不插入线栓,其他步骤与上述步骤相同。模型成功标准:手术清醒后 Bederson 评分^[4] ≥ 1 分者,认为造模成功,可作为实验纳入患者。

1.6 观测指标

1.6.1 脑组织 TTC 染色及梗死体积测定 第一批各组大鼠手术 24 h 后断头处死,在生理盐水冰盘上快速剥离出脑组织,放于 -20 °C 冰箱冻至适当硬度,去除嗅球、小脑和低位脑干,其余以 2 mm 间隔行连续冠状切片共 6 片,放入 2% 氯化三苯基四氮唑(TTC)磷酸盐缓冲液中(pH = 7.4)中,37 °C 水孵育恒温箱内避光孵育 30 min 后,置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后观察,正常脑组织着玫瑰红色,梗死脑组织呈苍白色。将切片扫描入扫描仪中,保存图像。运行 Image Pro Plus 4.5 (IPP)图像处理软件,计算脑梗死面积及层面总面积,应用公式: $V = (A_1 + \dots + A_n)t$ (V:梗死体积或全脑体积,t:切片厚度,A:各切片梗死面积或总面积)计算出脑梗死体积及全脑体积,用脑梗死体积百分比(脑梗死体积/全脑体积)来表示脑组织坏死程度。

1.6.2 脑组织中 SOD、CAT 及 MDA 的测定 第二批各组大鼠手术 24 h 后断头处死,同时在冰上取脑,取新鲜右侧半脑组织,称重;用吸管吸取预冷的 10 倍于组织块重量的匀浆介质(冷 PBS pH = 7.4),加入玻璃匀浆管,眼科小剪刀剪碎组织块;将剪碎的组织倒入玻璃匀浆管中,放入冰水混合的大烧杯中,超声组织匀浆器制成 10% 的脑组织匀浆液,将匀浆液以 3 000 r/min,离心 20 min;取上清液,分装置 -20 °C 保存,按 ELISA 试剂盒说明书测定 CAT、SOD、MDA 的含量。

1.7 统计学处理 用 SPSS 13.0 版统计软件进行统计,数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单向方差分析,组间两两比较方差齐时用 LSD 检验,方差不齐时用 Dunnett's T3 检验。

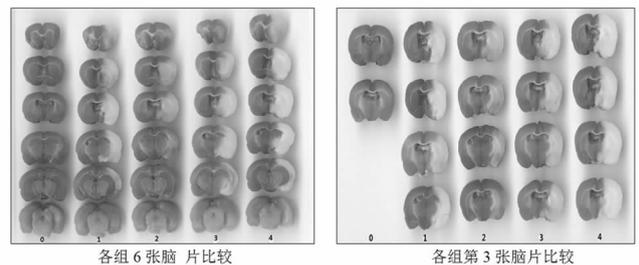


图 1 TTC 染色情况比较(0:假手术组;1:七十味低剂量组;2:七十味高剂量组;3:维脑路通组;4:PMCAO 模型组)

2 结果

2.1 各组脑梗死体积比较(见图 1、表 1) 假手术组大鼠脑梗死体积测定均为 0,即无梗死灶。而 PMCAO 模型组大鼠右半脑出现较大面积的白色梗死灶($P < 0.01$)。与 PMCAO 模型组比较,七十味高、低剂量组和维脑路通组大鼠脑梗死体积都有不同程度的减小($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。七十味高剂量组大鼠脑梗死

体积显著小于维脑路通组 ($P < 0.01$)。而七十味低剂量组大鼠脑梗死体积与维脑路通组相比无统计学意义。

2.2 各组 SOD、CAT 及 MDA 含量比较(见表 2、表 3)

与假手术组比较,PMCAO 模型组大鼠脑组织中 SOD、CAT 含量明显下降,而 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$)。与 PMCAO 模型组比较,七十味高、低剂量组和维脑路通组大鼠脑组织中 SOD、CAT 含量都有所升高,MDA 含量有不同程度下降 ($P < 0.01$),其中以七十味高剂量组更为显著。而七十味低剂量组大鼠脑组织

中 SOD、CAT 及 MDA 含量与维脑路通组相比差异均无统计学意义。

表 1 各组大鼠 PMCAO 后脑梗死体积的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	剂量(mg/kg·d)	脑梗死体积(%)
假手术组	8	蒸馏水	0.0000 ± 0.00000
PMCAO 模型组	8	蒸馏水	54.4700 ± 6.02040 ^Δ
七十味低剂量组	8	166	40.4550 ± 8.04193*
七十味高剂量组	8	664	27.4475 ± 7.27801** ^{ΔΔ}
维脑路通组	8	50	41.1325 ± 4.12638**

注:与假手术组比较,^Δ $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与维脑路通组比较,^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠 PMCAO 后脑组织中 SOD、CAT 及 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	剂量(mg/kg·d)	SOD(U/L)	CAT(U/L)	MDA(nmol/L)
假手术组	8	蒸馏水	139.1979 ± 3.18762	2.2063 ± 0.06126	1.9515 ± 0.04102
PMCAO 模型组	8	蒸馏水	100.9729 ± 3.47249 ^{▲▲}	1.5306 ± 0.07163 ^{▲▲}	2.8511 ± 0.09876 ^{▲▲}
七十味低剂量组	8	166	108.5886 ± 2.65902**	1.6415 ± 0.09413**	2.6368 ± 0.09393**
七十味高剂量组	8	664	122.5188 ± 2.94949** ^{ΔΔ}	1.9168 ± 0.07662** ^{ΔΔ}	2.3381 ± 0.08349** ^{ΔΔ}
维脑路通组	8	50	109.2335 ± 4.39312**	1.6794 ± 0.05102**	2.5708 ± 0.08805**

注:与假手术组比较,^{▲▲} $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$;与维脑路通组比较,^{ΔΔ} $P < 0.01$ 。

3 讨论

大脑中动脉(MCA)是人类脑卒中的好发部位,线栓法造成大脑中动脉闭塞(Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO)模型被认为是局灶性脑缺血的标准动物模型^[5]。由于大鼠脑血管解剖结构和功能与人类相近似,种内纯合性好,便于进行统计学处理,所以常被用做脑缺血的实验动物模型。其中永久性大脑中动脉阻塞(Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion, PMCAO)模型具有制作简单、成功率高、术后感染少、结果稳定等特点,入选为本次实验患者。

氯化三苯基四氮唑(TTC)是呼吸链中吡啶-核苷结构酶系统的质子受体,与正常组织中的脱氢酶反应而呈红色,而缺血组织因脱氢酶活性下降,不能反应而呈苍白色^[6]。本实验观察到假手术组大鼠冠状脑组织切面呈均一深红色,即无梗死灶。而 PMCAO 模型组脑组织 TTC 处理后均见到右侧半球自颞顶皮层至基底节区有较大面积的白色梗死灶 ($P < 0.01$),未缺血组织呈深红色,说明脑缺血造成了脑组织大面积坏死,坏死区与 MCA 支配的脑区一致,模型制作成功。与 PMCAO 模型组比较,七十味高、低剂量组大鼠脑梗死体积都有不同程度的减小 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),以七十味高剂量组更为显著,说明七十味珍珠丸可减小大鼠 PMCAO 后脑梗死体积,抑制缺血造成的脑损伤,具有较好的脑保护作用,其中高剂量作用显著。

自由基广泛存在于生物体内,正常情况下参与药物及毒物的降解,杀灭细菌,调节免疫功能,而体内存

在许多内源性抗氧化系统(超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶、细胞色素氧化酶等)可以清除自由基,使自由基的生成与清除处于动态平衡,对机体并无有害影响。由于脑缺血时产生大量自由基,远远超过自身内源性抗氧化系统的清除能力,导致大量毒性自由基在组织细胞内堆积,表现为:1)使脂质过氧化,破坏细胞膜;2)使蛋白质变性;3)使 DNA 突变;4)RNA 大分子损伤。

而 SOD 是体内重要的抗氧化酶,属于金属酶,当体内氧自由基(Oxygen Free Radicals, OFR)生成增多时,可与超氧阴离子反应生成过氧化氢,再由过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶转变为水,从而清除 OFR,保护细胞免受损伤^[7]。CAT 是一种酶类清除剂,是以铁卟啉为辅基的结合酶。它可促使自由基 H_2O_2 分解为分子氧和水,清除体内的 H_2O_2 ,从而使细胞免于遭受 H_2O_2 的毒害^[8],是生物防御体系的关键酶之一。MDA 是机体脂质过氧化反应的最终产物,其含量可以反映组织中自由基的含量和组织细胞受到自由基攻击即脂质过氧化反应的程度^[9]。

与假手术组比较,PMCAO 模型组大鼠脑组织中 SOD、CAT 含量明显下降,而 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$),说明脑缺血造成了自由基的堆积,引起脑组织脂质过氧化反应加强,消耗了过多的内源性抗氧化酶,氧化-抗氧化平衡被打破,机体抗自由基能力下降,脑组织损伤加重。与 PMCAO 模型组比较,七十味高、低

(下接第 354 页)

免疫,对实验性溃疡性结肠炎具有一定的治疗作用^[15]。从中不难发现:肥胖发病时,机体内具有促进胆汁分泌、促进脂肪消化吸收作用的胆汁酸含量会显著降低。

综上所述初步推测:过食高脂厚味会加重胆调节脂质代谢的负担,致使胆道功能紊乱,突出表现为胆汁分泌量减少,胆汁分泌不畅,并进一步可造成机体内中具有利胆、促进脂肪代谢作用的胆汁酸组分含量减少,长此以往,体内脂类长期代谢失衡,日久积聚,发为肥胖。此乃胆道不利为肥胖发病之中心环节的内在依据。本研究从实验角度初步揭示了胆道不利与肥胖发病的关联,随着后续对胆汁酸特性及作用机制的进一步探索,必将为肥胖的防治提供新的思路和方法。

参考文献

[1] 钱荣立. 肥胖与肝、胆疾病[J]. 实用内科杂志,1988,8(12):621-622.

[2] 缪敏,袁静义,黄童,等. 胆石症流行病学调查及其与脂肪肝、肥胖的关系[J]. 浙江医学,2007,29(1):88-89.

[3] 杨松,谈永飞,喻荣彬,等. 肥胖、血脂和胆石症关系的研究[J]. 镇江医学院学报,2000,10(4):655-656.

[4] 乔鸥,胡平海,孙志为,等. 肥胖与胆源性胰腺炎的关系[J]. 实用医学杂志,2010,26(22):4162-4164.

[5] 韩泽红,陈永鹏,朱智明,等. 肥胖患者血清总胆汁酸水平及其与脂肪肝、胆石症的关系[J]. 中华消化杂志,2001,21(2):123.

[6] 崔国兴. 女性胆石病与肥胖、血脂关系的研究[J]. 镇江医学院学报,2011,11(6):753-754.

[7] 方瑜,杨柏灿. 论胆在人体生命活动中的地位和作用—“凡十一脏取决于胆”探微[J]. 山东中医药大学学报,2010,34(2):110-113.

[8] ZK guo, MD Jensen. Accelerated intramyocellular triglyceride synthesis in skeletal muscle of high-fat-induced obese rats[J]. International Journal of Obesity,2003,27:1014-1019.

[9] Yang L, Xiong AZ, He YQ, et al. Bile acids metabonomic study on the CCl4- and r-naphthylisothiocyanate-induced animal models: quantitative analysis of 22 bile acids by ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chem Res Toxicol,2008,21:2280-2288.

[10] 李继珩,许东,牟晓红. 牛磺熊去氧胆酸结构及性质的研究[J]. 中国药科大学学报,1993,24(3):145-149.

[11] 袁晖,孙格非. 大鼠肝硬变门脉高压形成中和门奇静脉断流术后血甘氨酸和胰高糖素变化的研究[J/OL]. http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgpwjyylcz199901007.aspx,1997-01-05/1998-10-14.

[12] 陈念. 熊去氧胆酸治疗脂肪肝的研究进展[J]. 右江医学,2006,34(5):548-549.

[13] 刘欣媛,李培锋. 牛磺胆酸研究进展[J]. 包头医学院学报,2010,26(4):134-135.

[14] 惠永正. 中药天然产物大全[M]. 上海:上海科学技术出版社,2011:5739.

[15] 何娇. 猪胆粉中结合型胆甾酸的化学成分及生物活性研究[D]. 西安:西北大学,2012:94-112.

(2013-05-26 收稿 责任编辑:徐晖)

(上接第349页)

剂量组大鼠脑组织中 SOD、CAT 含量都有所升高,MDA 含量有不同程度下降(P<0.01),其中以七十味高剂量组更为显著;再加之,七十味珍珠丸所含的铁、镁、铜、铬、锌以及锰等微量元素参与构成了抗氧化系统中多种酶的活性中心(其中锌、铜作为 Cu/Zn-SOD 的辅基,在其合成与调节方面发挥重要作用;锰参与 Mn-SOD 的构成,在线粒体中发挥清除超氧阴离子自由基的作用;Fe³⁺为 CAT 的辅基,CAT 催化过氧化氢转变为水和氧气^[10]),从而说明七十味珍珠丸能够增强内源性抗氧化酶的活性,清除多余自由基,抑制脂质过氧化反应造成的脑损伤,以高剂量作用显著。

上述实验结果提示,七十味珍珠丸可减小局灶性脑缺血大鼠的脑梗死体积,具有较好的脑保护作用;其机制可能与其增强内源性抗氧化酶的活性,提高机体的抗氧化能力,减轻脑组织脂质过氧化损伤有关。

参考文献

[1] 王译晗,张霞,张婷慧,等. 转基因鼠在脑缺血氧化应激研究中的应用[J]. 中国比较医学杂志,2012,22(3):45-49.

[2] 吴启勋,冀兰,库进良,等. 抗缺氧藏药中微量及宏量元素的测定[J].

光谱学与光谱分析,2008,28(8):1938-1941.

[3] Ding Y, Yao B, Zhou Y, et al. Pre-reperfusion flushing of ischemic territory: A therapeutic study in which histological and behavioral assessments were used to measure ischemia-reperfusion injury in rats with stroke. J Neurosurg,2002,96:310-319.

[4] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. Stroke,1986,17(3):472-476.

[5] 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]. 中华脑血管病杂志,2013,7(3):142-152.

[6] 吴文娟,王成达,于向荣. 大鼠局灶性脑缺血再灌注 TTC 染色与 M 对弥散加权成像的相关性研究[J]. 中华神经医学杂志,2013,12(6):561-564.

[7] 马东明,卢斌,姜希娟,等. 银杏叶提取物对高胆固醇家兔模型过氧化损伤的影响[J]. 时珍国医国药,2012,23(3):585-586.

[8] 钟亮,张睿,纪晓军,等. 胡黄连苷 II 对大鼠脑缺血损伤后 H₂O₂ 含量和 CAT 活性的影响[J]. 中国医药科学,2013,3(9):20-22.

[9] 魏丽丽,陈虹,姜勇,等. 松果菊苷对局灶性脑缺血大鼠脂质过氧化损伤的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(1):36-37.

[10] 曹惠芝. 运动员铁营养与抗氧化能力[D]. 南京:江苏大学,2006.

(2013-12-10 收稿 责任编辑:王明)