

实验研究

益气解毒方基于线粒体保护的抗缺血性脑卒中研究

杨若聪^{1,2} 田朋朋² 吴传鸿³ 段飞鹏⁴ 陈修平³ 张丽红⁵ 闫智勇¹ 李韶菁²

(1 西南交通大学生命科学与工程学院,成都,610031; 2 中国中医科学院中药研究所,北京,100700; 3 澳门大学,澳门,519000;

4 北京中医药大学中药学院,北京,100029; 5 成都中医药大学临床医学院,成都,610075)

摘要 目的:基于线粒体呼吸功能,研究益气解毒方对缺血性脑卒中的保护作用。方法:采取大鼠中脑动脉闭塞模型(Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO),造模前 15 min 给予益气解毒方及相应拆方,造模 12 h 后,取材,提取脑组织线粒体,检测线粒体三态呼吸速率、四态呼吸速率、磷氧比、呼吸控制率、氧化磷酸化率等指标,评价益气解毒方对缺血性脑卒中的保护效果。此外,通过主成份分析(Principal Component Analysis, PCA)和变量重要性指标(Variable Importance in Projection, VIP),评价益气解毒方各组分在抗缺血性脑卒中的作用效果。结果:益气解毒方能改善缺血性脑卒中病理过程中线粒体呼吸相关的各项指标,益气解毒方各拆方对缺血性脑卒中也有较好的改善作用。PCA 结果显示,与各拆方组比较,益气解毒方全方的治疗效果最好;在各拆方组中,人参皂苷和黄连素配伍后的效果最好。VIP 分析结果显示,益气解毒方基于保护线粒体呼吸功能来改善缺血性脑卒中的病理过程中,黄连素的贡献度最大。结论:益气解毒方能够显著降低缺血性脑卒中病理过程中所造成机体损伤,其机制可能与保护线粒体功能有关。

关键词 益气解毒方;脑卒中;线粒体

Study on Effects of Yiqi Jiedu Fang on Mitochondrial Metabolism-related Energy Function in Ischemic Stroke RatsYang Rucong^{1,2}, Tian Pengpeng², Wu Chuanhong³, Duan Feipeng⁴, Chen Xiuping³,Zhang Lihong⁵, Yan Zhiyong¹, Li Shaojing²

(1 School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3 University of Macau, Macao 519000, China; 4 School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 5 School of Clinical Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China)

Abstract Objective: To study the effects of Yiqi Jiedu Fang on mitochondrial energy metabolism related functions in ischemic stroke rats, and to explore the possible protective mechanisms of Yiqi Jiedu Fang on ischemic stroke through intervening the mitochondrial energy metabolism disorder. **Methods:** Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) was used. Yiqi Jiedu Fang and its separated formulas were given 15 min prior to MCAO. After 12 h of modeling, mitochondria were extracted. Indexes of mitochondrial three-state respiration rate, four-state respiratory rate, phosphorus-oxygen ratio, respiratory control rate, oxidative phosphorylation rate and other indicators were determined. The protective effect of Yiqi Jiedu Fang on ischemic stroke was evaluated. In addition, the effect of each component of Yiqi Jiedu Fang on anti-ischemic stroke was evaluated by Principal Component Analysis (PCA) and Variable Importance in Projection (VIP). **Results:** Yiqi Jiedu Fang can improve the mitochondrial respiration related indexes during the pathological process of ischemic stroke. The separated formula of Yiqi Jiedu Fang also has a better effect on ischemic stroke. PCA results showed that compared with other separated formula groups, Yiqi Jiedu Fang group had the best treatment effect. In each separated formula groups, the compatibility of Radix et Rhizoma Ginseng, Fructus Gleditsiae and berberine had the best treatment effect. The results of VIP analysis showed that berberine had the largest contribution to the pathological process of ischemic stroke based on the protection of mitochondrial respiratory function. **Conclusion:** Yiqi Jiedu Fang can significantly reduce the pathological damage caused by ischemic stroke, whose mechanism may be related to the protection of mitochondrial function.

Key Words Yiqi Jiedu Fang, Stroke, Mitochondrial

中图分类号:R255.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.11.042

基金项目:国家自然科学基金项目(81274133,81303261);国家科技重大专项(重大新药创制)资助项目(2012ZX09103201-055)

作者简介:杨若聪(1992.02—),男,硕士研究生,研究方向:中药药理学,E-mail:yangruocong@163.com

通信作者:闫智勇(1971.11—),男,博士,教授,研究方向:中药药理学研究,E-mail:yzyihy@home.swjtu.edu.cn;李韶菁(1974.03—),女,博士,副研究员,研究方向:中药组效关系和分子药理学研究,E-mail:shaolingli2004@126.com

近年来,随着人们生活水平的提高和生活压力的增大,脑卒中的发病率呈现迅速上升的趋势^[1]。在成年人的发病人群中,脑卒中是一种具有极高的高致死率且预后较差^[2-3],给社会 and 患者家庭造成极大的负担^[4-6]。据统计,在 2010 年,全球范围内脑卒中的新增患者病例为 3 300 万人,其中 509 万患者死亡,1 020 万人因为脑卒中丧失生活自理能力^[8],这使脑卒中成为仅次于缺血性心脏病的第 2 大致死性疾病。然而,目前尚缺乏治疗脑卒中的特效药^[9]。

能量代谢紊乱是脑卒中主要病理过程之一,能量代谢紊乱的严重程度及是否能够及时得到纠正,会直接影响到患者的预后情况。作为细胞中最重要的能量供应细胞器,线粒体的功能在脑卒中的病理过程中,受到了严重的影响^[10]。如何及时消除线粒体功能的紊乱状态,成为能否保护并减少缺血状态下细胞损伤的关键。因此,能否及时保护脑卒中病理过程中线粒体的功能,对于脑卒中后的恢复,有重要的意义^[11]。

益气解毒方是由人参、黄连、栀子等 3 味中药组成,是基于“毒损脑络”的病机,采用扶正祛邪的治法治疗中医脑病的经验方,临床应用中具有较为显著的治疗效果。为进一步探讨益气解毒方抗脑缺血、治疗缺血性中风的作用及配伍机理,本实验中分别选取人参、黄连、栀子的主要有效成分人参总皂苷(Ginsenosides, G)、黄连素(Berberine, B)、栀子苷(Jasminoidin, J)及 3 者按照临床用药比例组合而成的益气解毒方(YJ)作为研究对象,以探讨其对局灶性脑缺血脑组织线粒体功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康 Sprague Dawley (SD) 大鼠 (SPF-VAF 级), 体重 250 ~ 260 g, 雄性, 购于军事医学科学院动物中心, 许可证号: SCXK-(军) 2012-0004; SCXK-(京) 2014-0013。置于温度 (25 ± 2) °C 饲养室, 动物均自由饮水进食。

1.1.2 药物 选取银杏叶提取物 (EGb761) 作为阳性对照药, 购于德国威玛舒培博士药厂。人参总皂苷, 人参皂苷 Rg、Re、Rd 总含量 ≥ 40.55% ± 2.10%, 购于南京泽朗医药科技有限公司; 黄连素, 纯度 ≥ 95.18%, 购于咸阳航空一六八生物工程有限公司; 栀子苷, 纯度 ≥ 99.68%, 购于宝鸡市方晟生物开发有限公司。全部实验用药物均用纯水配制。

1.1.3 试剂与仪器 L-谷氨酸, L-苹果酸, ADP-Na, BSA 购自美国 Sigma 公司; Na2EDTA, TrisBase, 购自

美国 Amresco 公司; 水合氯醛, 购自中国国药集团; 蔗糖, 购自北京北化精细化学有限责任公司; BCA 蛋白定量试剂盒, 购自中国普利莱生物技术公司; L-谷氨酸, L-苹果酸, ADP-Na 分别配制成 1 000 × 储液, -20 °C 保存; 线粒体分离保存介质: 由蔗糖 (250 mmol/L)、Na2EDTA (0.5 mmol/L)、Tris-HCl (10 mmol/L)、BSA (0.1%) 配制而成, pH = 7.1, 4 °C 储存。SUNRISE 酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); 782 Oxygen System (英国 Strathkelvin 公司); 组织匀浆器 (涿州市琦瑞玻璃制品厂); 微量加样器 (20、200、1000 μL) (德国 Eppendorf 公司); 台式高速冷冻离心机 (长沙湘仪仪器有限公司); 万级天平 (型号: FA2204B, 上海精密科学仪器有限公司); 实验室 pH 计 STARTER2100 (奥豪斯仪器 (上海) 有限公司); 数显恒温搅拌恒温水箱 (型号: HH-60, 常州国华电器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将 SD 大鼠分为假手术组、模型组、阳性药组 (银杏叶提取物, EGb7614 mg/kg)、益气解毒方 (YJ) 高、中、低 (25、5、1 mg/kg) 剂量组和人参总皂苷 (G)、黄连素 (B)、栀子苷 (J) 剂量组 (25、5 mg/kg)、人参总皂苷-黄连素 (GB) 剂量组 (25、5 mg/kg)、人参皂苷-栀子苷 (GJ) 剂量组 (25、5 mg/kg)、黄连素-栀子苷 (BJ) 剂量组 (25、5 mg/kg), 每组 8 只。各给药组均在手术前 15 min 灌胃给药, 假手术组和模型组给予等量生理盐水。

1.2.2 给药方法 采用大鼠中动脉栓塞 (MCAO) 模型。假手术组不进行线栓, 仅行术前麻醉以及血管分离; 其余各组均复制 MCAO 模型。参照 LongaEZ^[12] 建立的大鼠大脑中动脉内线栓阻断方法, 对 SD 大鼠行大脑中动脉闭塞手术, 建立大鼠局灶性脑缺血模型, 10% 的水合氯醛腹腔注射 (400 mg/kg) 对大鼠进行麻醉。将大鼠仰卧固定, 75% 乙醇消毒颈部皮肤, 于正中切口, 分离并暴露右侧颈总动脉, 并在近心端夹闭颈总动脉, 继续分离出颈外和颈内动脉, 结扎颈外动脉, 在颈总动脉距分叉处 1.5 cm 处剪一小口, 用制备好的 5 cm 鱼线沿颈总动脉插入颈内动脉。当进入颈总动脉分叉处以上的鱼线长度为 2 cm 时, 停止并结扎开口上下的颈总动脉。整个手术过程室温保持在 (22 ± 2) °C。术后 12 h, 先对各组大鼠进行神经功能学评分后, 脱颈处死后取脑, 进行体外线粒体悬液的制备。

1.2.3 检测指标与方法 1) 神经功能学评分: 参照 Bederson 等^[13] 的 5 级评分法 (0 ~ 4 分), 分数越高,

说明大鼠神经行为损伤越严重。2) 神经行为学评分后, 取大鼠缺血侧脑组织制备脑线粒体悬液。为了保持线粒体活性, 整个操作应保持低温, 将缺血侧脑称重, 加入 4 ℃ 预冷的线粒体分离介质冲洗 2 次 (W: V = 0: 1), 以去除皮层表面血管。制备质量体积分数为 20% 的脑匀浆液, 后进行梯度离心。将所得的线粒体悬液进行蛋白质定量, 统一定量为 10 mg/kg。

线粒体呼吸活性测定取新鲜的线粒体悬液, 采用 Clark 氧电极法测定线粒体呼吸活性, 采用 782 Oxygen System 进行实验。反应总体积 1.0 mL, 反应温度 25 ℃。校准电极后依次加入反应体系、L-谷氨酸、L-苹果酸、ADP-Na, 观察并记录氧耗曲线。测定线粒体三态呼吸速率 (State 3 Respiration Rate, V3)、线粒体 4 态呼吸率 (State 4 Respiration Rate) 及线粒体磷氧比 (Oxidative Phosphorylation Efficiency, ADP/O), 并且按照如下公式计算各参数值: $RCR = V3/V4$, $OPR = V3 \times ADP/O$ (nmol ATP/min/mg Protein)。且所得指标进行主成分分析和 VIP 分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析, 数据以平均值 $\pm$ 标准差反映, 采用单因素方差分析进行组间差异分析, PCA 用 SPSS 17.0 进行分析, VIP 分析采用 SIMCA-P 13.0 进行。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能学评分 大鼠行 MCAO 手术后 24 h, 模型组神经行为学评分与假手术组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 表示 MCAO 手术对大鼠产生了明显的损伤; 与模型组比较, 益气解毒高、中、低剂量组, 人参皂苷和黄连素配伍高、低剂量组, 黄连素和栀子苷配伍高、低剂量组, 人参皂苷和栀子苷配伍高剂量组, 黄连素高剂量组, 栀子苷高剂量组、阳性药组结果具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表明益气解毒方总方高、中、低剂量及各单个组分高剂量给药均可改善局灶性脑缺血引起的肢体行动障碍。结果见图 1。

2.2 对线粒体呼吸的影响 与假手术组 (Sham) 比较, 模型组 (Model) 各呼吸指标明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 表明大鼠行 MCAO 手术后, 线粒体呼吸速率受到影响。在 ADP/O 的检测中, EGb761 明显高于模型组 ($P < 0.01$); YJ 高、中剂量组均明显高于模型组 ($P < 0.01$), 低剂量组与模型组比较没有明显的差异; GB 配伍、BJ 伍、GJ 配伍的高剂量组均明

显高于模型组 ($P < 0.01$), 各配伍的低剂量组均没有明显的效果; G 高、低剂量组, B 高剂量组, 与模型组比较, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$), B 低剂量组、J 高、低剂量组没有明显效果。结果见图 2 (A)。在 RCR 检测中, EGb761 明显高于模型组 ($P < 0.01$); YJ 高剂量组高于模型组 ($P < 0.05$), 益气解毒方中、低剂量组没有明显效果; B 和 J 配伍组高于模型组 ($P < 0.05$), B 和 J 配伍低剂量组、G 和 B 配伍高、低剂量组、G 和 J 配伍高、低剂量组均没有明显的差异; G、B、J 各高、低剂量组差异无统计学意义。结果见图 2 (B)。在 OPR 的检测中, EGb761 明显高于模型组 ($P < 0.01$); YJ 高、中剂量组高于模型组 ($P < 0.01$), 益气解毒方低剂量组具有较为明显的效果 ($P < 0.05$); G 和 B 配伍高剂量组较模型组差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$), 其他各两两配伍组无明显效果; B 高剂量组较模型组差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$), G 低剂量组较模型组差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$), 其他各单方组没有明显效果。结果见图 2 (C)。在 V3 的检测中, EGb761 明显高于模型组 ($P < 0.01$); YJ 高、中、低剂量组均明显高于模型组 ($P < 0.01$); G 和 B 配伍组、B 和 J 配伍组及 G 和 J 配伍高剂量组均高于模型组 ($P < 0.01$), 人参总皂苷和 B 配伍、B 和 J 配伍及 G 和 J 配伍低剂量组效果不明显; G 高、低剂量组, B 高剂量组均高于模型组 ($P < 0.01$), B 低剂量组, J 高、低剂量组无明显效果。结果见图 2 (D)。在 V4 的检测中, EGb761 明显高于模型组 ($P < 0.01$); YJ 高、中、低剂量组均明显高于模型组 ($P < 0.01$); B 高剂量、低剂量组明显高于模型组 ($P < 0.01$); 其余各组均无明显效果。结果见图 2 (E)。

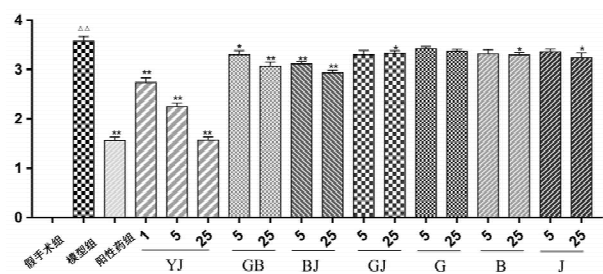


图 1 神经行为学评价图

注: 益气解毒方及有效成分对 MCAO 大鼠模型神经行为学治疗效果评价。评价用 $\text{mean} \pm \text{SDM}$ 值表示, 数据用单因素方差分析法 (one-way ANOVA) 进行分析。图中 Δ 、 $\Delta\Delta$ 分别表示假手术组比较, 模型组差异有统计学意义, 即 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$; 图中 *、** 分别表示同模型组比较, 各观察组差异有统计学意义, 即 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 。

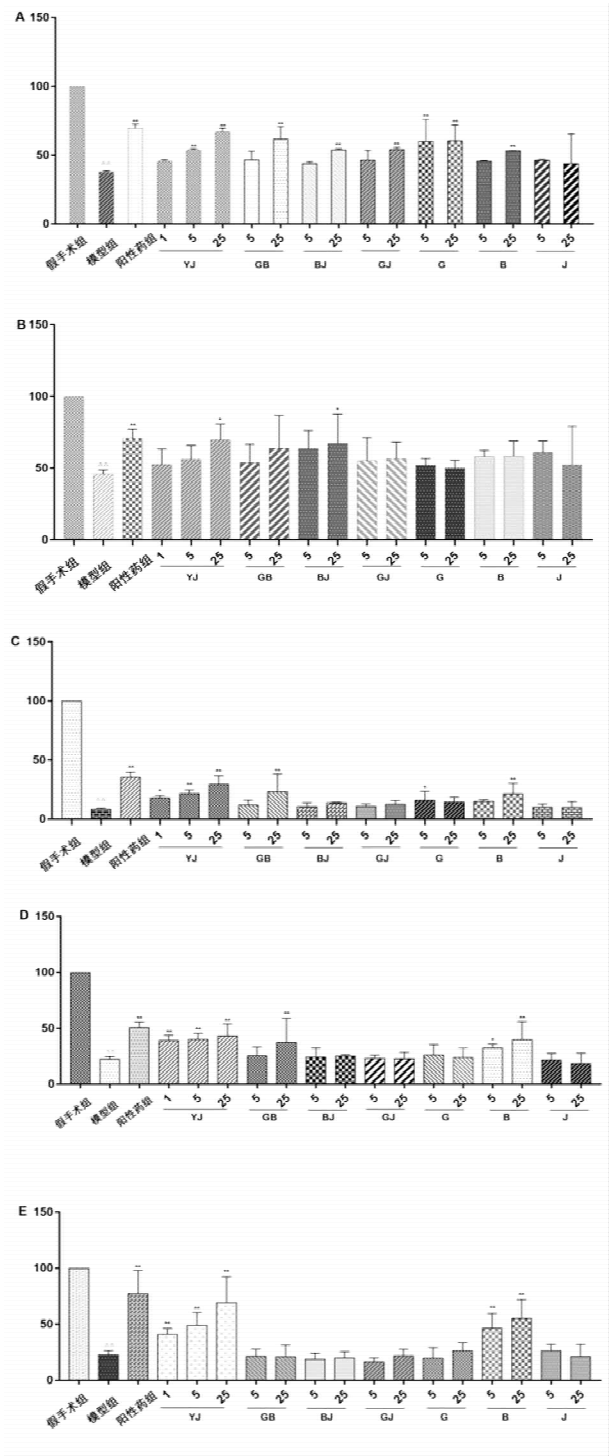


图2 益气解毒方保护线粒体紊乱效果

注:益气解毒方及有效成分对MCAO大鼠脑内线粒体功能的治疗效果评价。(A)ADP/O值;(B)RCR值;(C)OPR值;(D)V3值;(E)V4值。数据结果用mean±SDM值表示(n=8),数据用单因素方差分析法(one-way ANOVA)进行分析。图中[△]、^{△△}分别表示假手术组比较,模型组差异有统计学意义,即P<0.05、P<0.01;图中*、**分别表示同模型组比较,各观察组差异有统计学意义,即P<0.05、P<0.01。图中计量单位为mg/kg

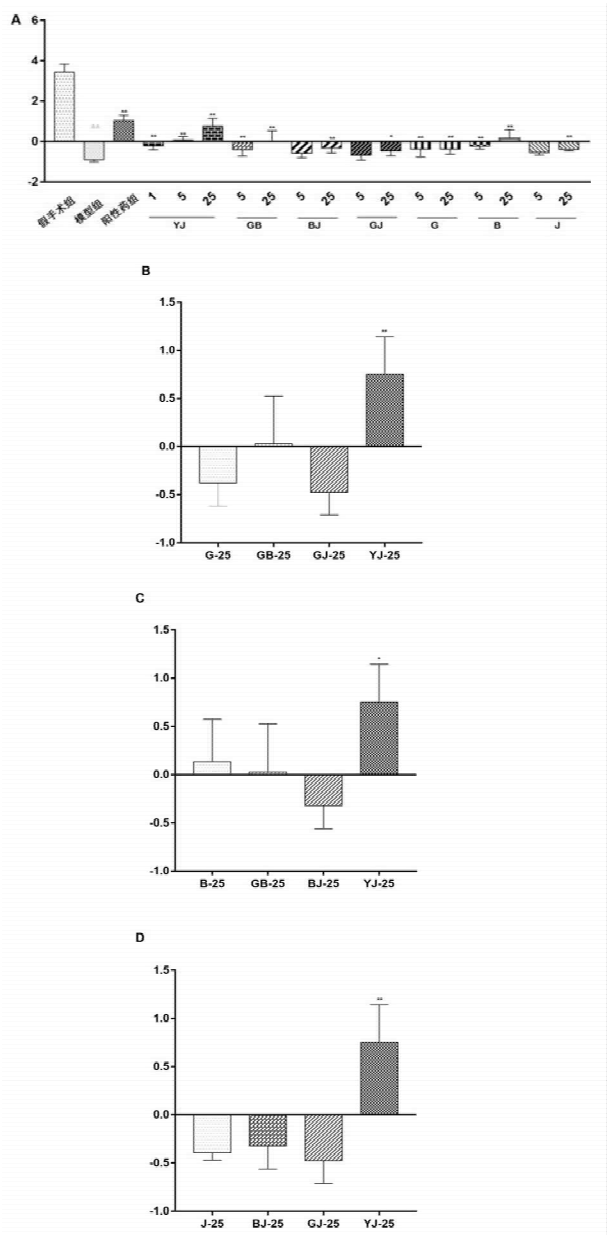


图3 益气解毒方组方PCA分析结果

注:图中采用主成分分析(PCA)的方法对益气解毒方配伍分析。(A)线粒体功能的主成份分析结果;(B)对G、GB、GJ及YJ各组的主成份分析结果;(C)对B、GB、BJ及YJ各组的主成份分析结果;(D)对J、BJ、GJ及YJ各组的主成份分析结果。以上数据用mean±SD值表示(n=8),并且用单因素方差法进行分析(one-way ANOVA),图中[△]、^{△△}分别表示假手术组比较,模型组差异有统计学意义,即P<0.05、P<0.01;图中*、**分别表示同各组同G、B、J3个成分观察组比较,治疗效果差异有统计学意义,即P<0.05、P<0.01

2.3 PCA分析与VIP分析 PCA结果显示,模型组与假手术比较,差异有统计学意义,说明MCAO模型对动物造成了明显的损伤。EGb761组,YJ全方高、中、低剂量组,G和B配伍高、低剂量组,B和J配伍高剂量组,G高、低剂量组,B高、低剂量组,J高剂量

组相较于模型组,均有明显的差异($P < 0.01$)。此外,YJ 高剂量组较各两两组方高剂量组和各单方高剂量组,均具有较为明显的效果($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),证明 YJ 方整体的治疗效果最为理想。见图 3。

VIP 结果显示,在益气解毒方整个组方中,G 和 B 的 VIP 值大于 1,在整个组方保护线粒体的作用中,为主要的贡献成分。见图 4。

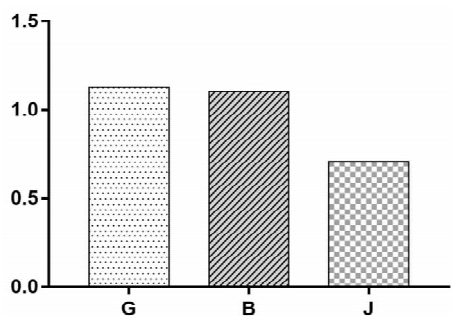


图 4 益气解毒方成分 VIP 分析结果

3 讨论

脑是机体能量代谢最快的器官之一,但脑中对能量和氧的储存能力并不高,因此,维持脑部组织的正常运行,需要足够的氧气和血流量。在脑卒中的病理过程中,局部供血、供氧被中断,缺氧造成线粒体功能紊乱和线粒体结构损伤,影响能量的生成,导致细胞的凋亡,造成严重损伤^[14]。

益气解毒方(人参、黄连、栀子)是根据中医脑病的症候特点,不同于传统中风治疗“活血化瘀”,而针对“毒损脑络”的关键病机,应用益气加解毒的全新治法,采用辨证施治,扶正与解毒并举治疗脑病的临床经验方^[15]。研究结果表明,益气解毒方能够通过保护线粒体呼吸及能量代谢的相关通路,减少脑卒中期间线粒体紊乱的相关损伤,降低细胞的凋亡情况。其中,在所有给药组中,益气解毒方全方效果最佳;两两组方中,黄连素和人参皂苷配伍总体效果最好;单方给药中,黄连素的治疗效果最好。并且,通过 PCA 和 VIP 分析发现,在基于线粒体的保护效果中,人参皂苷和黄连素为全方最为有效的成分。

参考文献

- [1] Douglas VC, Johnston CM, Elkins J, et al. Head computed tomography findings predict short-term stroke risk after transient ischemic attack [J]. Stroke, 2003, 34(12): 2894-2898.
- [2] Hankey, GJ. Secondary prevention of recurrent stroke [J]. Lancet Neurol, 2014, 13(2): 178-94.
- [3] Hardie K, Hankey GJ, Jamrozik K, et al. Ten-year risk of first recurrent stroke and disability after first-ever stroke in the Perth Community Stroke Study [J]. Stroke, 2004, 35(3): 731-735.
- [4] Sachdev PS, Brodaty H, Valenzuela MJ, et al. The neuropsychological profile of vascular cognitive impairment in stroke and TIA patients [J]. Neurology, 2004, 62(6): 912-919.
- [5] Samsa GP, Matchar DB. How strong is the relationship between functional status and quality of life among persons with stroke? [J]. J Rehabil Res Dev, 2004, 41(3A): 279-282.
- [6] Streifler JY, Eliasziw M, Benavente OR, et al. Prognostic importance of leukoaraiosis in patients with symptomatic internal carotid artery stenosis [J]. Stroke, 2002, 33(6): 1651-1655.
- [7] Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. Lancet, 2014, 383(9913): 245-254.
- [8] Hankey G J. Stroke [J]. Lancet, 2016, 389(10069): 641-654.
- [9] Hafez S, Coucha M, Bruno A, et al. Hyperglycemia, acute ischemic stroke, and thrombolytic therapy [J]. Transl Stroke Res, 2014, 5(4): 442-453.
- [10] Zhao L, Peng F, Guan B, et al. Whether Metal Element-Containing Herbal Formula Angong Niu Huang Pill Is Safe for Acute Brain Disorders? [J]. Biol Trace Elem Res, 2015, 166(1): 41-48.
- [11] Zhu XL, Xiong LZ, Wang Q, et al. Therapeutic time window and mechanism of tetramethylpyrazine on transient focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Neurosci Lett, 2009, 449(1): 24-27.
- [12] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [13] Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications [J]. Neurobiol Dis, 2004, 16(1): 1-13.
- [14] Xia T, Jiang C, Li L, et al. A study on permeability transition pore opening and cytochrome c release from mitochondria, induced by caspase-3 in vitro [J]. FEBS Lett, 2002, 510(1-2): 62-66.
- [15] 朱丽, 高健, 吴传鸿, 等. 益气解毒方对大鼠局灶性脑缺血氧化应激的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 171-173.

(2017-01-09 收稿 责任编辑:王明)