

参麦注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响

左霞 陈红英 陈德森 李英 王文杰 李贤玉

【摘要】 目的 研究参麦注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制。**方法** SD 大鼠 40 只随机分为对照组、模型组及参麦组,模型组及参麦组均经右侧颈动脉线栓大脑中动脉 Willis 环,阻断血流 30 分钟后再灌注 30 分钟,并反复 3 次的方法,建立大鼠脑缺血再灌注损伤的模型。采用尾静脉给药,每天 1 次,连续 6 天,对照组给予等体积生理盐水。观测缺血再灌注 0、30、60 分钟及 1 天、3 天、6 天共计 6 个时间点局部脑血流量(regional cerebral blood flow,RCBF)及脑电图(electroencephalogram,EEG)棘波振幅。并计算脑缺血再灌注前及 6 天后脑梗死范围。**结果** 参麦注射液组在第 3 天、6 天 2 个时点测得值显示 RCBF 显著升高、EEG 棘波波幅明显降低,显著降低再灌注 6 天后脑梗死范围,与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 参麦注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤有保护作用,作用机制可能与其具有抑制大鼠脑缺血再灌注后大脑异常放电,降低血管平滑肌细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性,松弛脑血管平滑肌改善微循环增加脑血流量有关。

【关键词】 参麦注射液; 大鼠脑缺血; 再灌注损伤; 局部脑血流; 脑电图; 梗死范围

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.04.006

Effects of Shenmai Injection on rats with cerebral ischemia reperfusion injury ZUO Xia, CHEN Hong-ying, CHEN De-sen, et al. No. 2 Department of Orthopedics, Shiyan Taihe Hospital affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

Corresponding author: LI Xian-yu, E-mail: cedseds1226@126.com

【Abstract】 Objective To study the protective effect and mechanism of Shenmai Injection on rats with cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into control group, model group and Shenmai Injection group. Model group and Shenmai Injection group were treated by right carotid artery thread embolism of middle cerebral artery Willis ring, blocking blood flow for 30 min and conducting reperfusion for 30 min. This method is repeated 3 times to construct rat models of cerebral ischemia reperfusion injury. Caudal vein administration was conducted, 1 times a day for 6 consecutive days. The control group was given normal saline with the same volume as model group and Shenmai Injection group. After ischemia reperfusion for 0, 30, 60 min and 1d, 3d, 6d, cerebral blood flow (regional cerebral time blood flow(RCBF)) and electroencephalogram (EEG) spike wave amplitude at 6 time spots were observed. Cerebral infarction range before and 6d after cerebral ischemia reperfusion was calculated. **Results** RCBF increased significantly and EEG spike wave amplitude decreased markedly in the 3rd day and 6th day in the Shenmai Injection group, which significantly reduced the cerebral infarction range after 6d of reperfusion. Compared with the model group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Shenmai Injection has protective effect on rats with cerebral ischemia reperfusion injury. The mechanism of action may be associated with the inhibition of abnormal discharge in the rat's brain after cer-

基金项目:湖北医药学院研究生启动基金(2008QDJ9)

作者单位:442000 湖北医药学院附属十堰市太和医院骨二科(左霞、陈红英、李英、王文杰);湖北医药学院机能实验室(陈德森),病理生理教研室(李贤玉)

作者简介:陈红英(1967 -),女,本科,主管护师。研究方向:临床药理学及外科护理。E-mail:951777718qq@.com

通讯作者:李贤玉(1979 -),女,硕士,讲师。研究方向:病理生理特点及临床药理学。E-mail:cdscds1226@126.com

erebral ischemia reperfusion, the reduction of enzyme activity of vascular smooth muscle cell membrane $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$, the relaxation of cerebrovascular smooth muscles, the improvement of microcirculation and the increase of cerebral blood flow.

【Key words】 Shenmai Injection; Cerebral ischemia; Reperfusion injury; Cerebral blood flow; Electroencephalogram; Infarction range

参麦注射液是以红参和麦冬为原料,辅以聚山梨等,采用现代特殊工艺科学配方提取的复方制剂。主要成分为人参皂甙、麦冬皂甙、麦冬黄酮及微量人参多糖和麦冬多糖等,具有益气固脱,养阴生津,生脉之功效^[1]。方中红参在补气之中具刚健温燥之性,最能振奋元气;麦冬可养阴润肺,益胃生津,清心除烦。二药合用制成参麦注射液,一温一凉,具有扩张血管、防治缺血再灌注损伤,提高心、脑供血不足等缺血耐性,临床用于治疗气阴两虚型之休克、冠心病、病毒性心肌炎、心脑血管缺血性疾病等^[2]。本实验采用大鼠缺血再灌注损伤模型,经尾静脉注射参麦注射液,观察其对大鼠缺血再灌注损伤的影响,探讨参麦注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护机制,为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠 30 只,体质量 160 ~ 210 g,雌雄不拘,由湖北省实验动物中心提供,实验动物设施使用许可证:SYXK(鄂)2011-0031;实验动物生产许可证:SCXK(鄂)2011-0008。

1.2 药品试剂及仪器

BL-420L 生物信号采集记录系统(成都市泰盟公司)。参麦注射液(大理药业股份有限公司,国药准字:Z20093647);电解式组织血流计(日本松下, FBR-1);TTC 染色剂(上海日初生物科技有限公司);精密电子天平(上海精密电子天平医疗器械公司,FA-1004);医学影像分析仪(日本 SNOY, X52-H)。栓线(将钓鱼线剪成长约 50 mm,并在 18 mm 处作标记,酒精消毒后置于生理盐水中备用)。

1.3 大鼠脑缺血再灌注损伤动物模型制备方法

将 40 只大鼠用随机数字表法随机分为 3 组:对照组、模型组及参麦组;模型组及参麦组参照文献^[3]用 3% 戊巴比妥钠(10 mg/100 g)经腹腔注射麻醉,仰卧固定于兔台,颈部正中切口,分离出右侧颈总动脉并找到颈总动脉入颅之翼腭动脉起始部,分离翼腭动脉并用微动脉夹夹闭,置另一微动脉夹同时夹闭右侧颈总动脉及颈内动脉主干远心端。

在颈外动脉近心端剪一 T 字小口,用制备好的栓线缓慢插入,此时将颈外动脉残端处丝线的松结拉紧,除去颈内动脉的动脉夹,继续将丝线沿着颈内动脉插入 18 mm 或有阻力感即阻塞了大脑中动脉 Willis 环,阻断血流 30 分钟后再灌注 30 分钟并反复 3 次后即可抽出丝线并除去微动脉夹。分层关闭颈部肌肉及皮肤,术后共有 39 只大鼠存活,术后 24 小时以局部脑血流量及脑电图幅度急剧下降,左侧前肢内收,提尾悬空不能伸展左侧前爪,行走向左侧转圈为入选标准,挑选其中 24 只大鼠符合脑缺血再灌注损伤动物模型入选标准,模型成功率为 64%。对照组手术同上但不插入栓线阻塞了大脑中动脉 Willis 环。3 组大鼠于术前 24 小时经尾静脉注射给药,参麦组大鼠按 2 mL/100 g 注射参麦注射液,1 次/天,对照组及模型组注射等量生理盐水,连续治疗 7 天。

1.4 局部脑血流量及脑电图测定

局部脑血流量(regional cerebral blood flow, RCBF)(mL/100 g·min)采用用日本生物医药公司生产的电解式组织血流计(FBR-1)测量。在大鼠的颅顶右侧皮下安置银丝电极,采用生物信号采集记录系统记录及脑电图(electroencephalogram, EEG)棘波波幅,测量 0、30、60 分钟及 1、3、6 天 6 个时点 EEG 波幅(参数设置:电压:2 mm,波宽:0.05 s,频率:100 Hz,速度:12 mm/div)。

1.5 组织学检查及脑梗死范围

模型组及参麦组大鼠于治疗 6 天后断头处死,迅速分离脑组织后滤纸吸干称重,-20℃冰冻 20 分钟,冠状面均匀切成 2 mm 厚脑片,37℃的 1% TTC 避光染色 30 分钟后用 4% 多聚甲醛固定。由于梗死区着色加深,精确剥离梗死部位,精密电子天平精确称量并记录重量,计算梗死范围[脑梗死率(%)=(梗死部位质量/脑总质量)×100%]。

1.6 统计学方法

统计分析软件使用 SPSS 17.0,不同时点大鼠脑缺血再灌注 EEG、RCBF 的影响采用重复测量方差分析对数据进行分析,大鼠脑缺血梗死范围采用两两比较 *t* 检验,实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表

示,检验水准为 0.05, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 参麦注射液对大鼠脑缺血再灌注 EEG 的影响

经 BL-420L 生物信号采集记录系统记录到大鼠脑缺血再灌注 0、30、60 分钟及 1、3、6 天 6 个时点 EEG 图形变化情况,见表 1。模型组及参麦组在阻塞了大脑中动脉 Willis 环术后 EEG 棘波波幅即刻均急剧上升,于 30 分钟即达峰值,而对照组 EEG 棘波波幅则无变化。模型组大鼠在脑缺血再灌注 6 天中 EEG 棘波波幅均保持在高水平,说明脑缺血再灌注损伤严重。参麦组 EEG 于 1 天后开始缓慢下降,至 6 天接近对照组水平,与模型组相比,经重复测量方差结果显示球形假设检验 $P<0.05$,故不服从球形假设,因此 $F=122.45$, $P<0.05$;多变量检验结果中时间和分组交互作用 $P<0.05$;LSD 两两比较结果见表 1,在脑缺血再灌注后 1、3、6 天 3 个时点 EEG 分别为 (53.29 ± 4.80 、 41.32 ± 3.30 、 32.52 ± 2.12),下降明显,与模型组比较, $P<0.05$,差异有统计学意义,说明参麦注射液能显著降低大鼠脑缺血再灌注后脑电图异位棘波波幅,抑制其异常放电;时间因素的作用随分组不同而不同,参麦组 1、3、6 天 3 个时点脑电图异位棘波波幅逐步下降,与模型组相比 $P<0.05$,差异有统计学意义。

2.2 参麦注射液对大鼠脑缺血再灌注 RCBF 的影响

BL-420L 生物信号采集记录系统记录数据,在 0 分钟对照组、模型组及参麦组 RCBF 数据基线比较无明显差异;模型组在栓塞 Willis 环后 RCBF 立即急剧下降,在 30 分钟降至最低点

(15.35 ± 1.47) mL/(100 mg·min),且恢复缓慢维持在低水平达 6 天,经方差分析检验, $F=39.33$, $P<0.05$,差异有显著性意义,与对照组比较,说明大鼠脑缺血再灌注造模是成功的。而参麦组在缺血再灌注后 RCBF 1 天开始逐渐升高,并于第 3 天就基本接近对照组的正常水平,6 天后达高峰,与模型组比较,经重复测量方差分析,重复测量方差结果显示球形假设检验 $P<0.05$,故不服从球形假设,因此 $F=106.696$, $P<0.05$;多变量检验结果中时间和分组交互作用 $P<0.05$;LSD 两两比较结果见表 2,在脑缺血再灌注后 3、6 天 2 个时点 RCBF 实测值分别为 (29.29 ± 0.97 、 30.51 ± 0.77),RCBF 明显升高,与模型组比较, $P<0.05$,差异有统计学意义,说明参麦注射液具有改善微循环增加脑血流量的作用。见表 2。

2.3 参麦注射液对脑缺血再灌注大鼠脑组织学形态学及脑梗死范围的影响

在治疗 6 天后,对照组脑组织病理图片显示脑组织着色均匀,神经细胞排列整齐,无坏死溶解现象;模型组脑组织病理图片梗死区着色加深,其脑组织神经细胞排列紊乱且部分溶合,有明显坏死灶;参麦组梗死区亦着色加深,但比模型组浅,梗死区域明显减少,仅有少部分脑组织神经胶质细胞溶合,细胞排列紊乱但明显好于模型组。模型组脑梗死范围为 (30.12 ± 2.73),参麦注射液组脑梗死范围 (12.01 ± 1.27),明显低于模型组,与模型组比较,经两两比较 t 检验, $t=2.329$, $P<0.05$,差异有显著性意义,提示参麦注射液具有扩张微动脉、减少脑梗死范围的作用。见表 3。

表 1 不同时段大鼠脑缺血再灌注 EEG 棘波波幅比较(mv) ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	0min	30min	60min	1d	3d	6d
对照组	30.31 ± 1.71	29.66 ± 1.58	29.97 ± 1.33	29.78 ± 0.94	30.59 ± 2.01	29.28 ± 1.57
模型组	29.47 ± 2.06	69.14 ± 4.45 ^a	73.37 ± 5.58 ^a	70.57 ± 5.30 ^a	65.87 ± 4.29 ^a	61.74 ± 4.72 ^a
参麦组	29.89 ± 2.20	70.24 ± 5.89 ^a	70.32 ± 6.57 ^a	53.29 ± 4.80 ^{ab}	41.32 ± 3.30 ^{ab}	32.52 ± 2.12 ^b

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$

表 2 不同时段大鼠脑缺血再灌注 RCBF 比较(RCBF = mL/100g·min) ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	0min	30min	60min	1d	3d	6d
对照组	36.54 ± 3.59	34.91 ± 3.30	35.79 ± 2.57	36.01 ± 3.14	35.78 ± 2.0	34.71 ± 2.40
模型组	18.56 ± 1.11 ^a	17.35 ± 0.97 ^a	17.26 ± 1.14	17.91 ± 1.24 ^a	21.68 ± 1.57 ^a	20.54 ± 1.37 ^a
参麦组	19.42 ± 1.07 ^a	17.78 ± 1.32 ^a	19.57 ± 1.51 ^a	24.21 ± 1.21 ^a	29.29 ± 0.97 ^{ab}	30.51 ± 0.77 ^b

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$

表 3 大鼠脑缺血梗死范围
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	坏死区 (g)	非坏死区 (g)	梗死范围 (%)
模型组	0.0441 \pm 0.0034	0.1122 \pm 0.0129	31.18 \pm 1.74
参麦组	0.0121 \pm 0.0050 ^a	0.1072 \pm 0.0081 ^a	17.01 \pm 1.35 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

3 讨论

急性脑梗死 (acute cerebral infarction, ACI) 即急性缺血性脑卒中,大多数是由于血管粥样硬化脱落的斑块栓塞脑血管引起急性血流障碍所致的局灶性脑缺血梗死及脑功能障碍,伴有急性脑功能缺损的一种缺血性脑血管病^[4],起病急,致残率和病死率较高,是临床常见的严重威胁人类健康的疾病。流行病学资料显示,中国每年大约有超过 200 万的脑卒中新发病例,每年死于脑卒中者约 100 万人^[5],故其防治成为当务之急。而参麦注射液在急性脑梗死及脑梗死恢复期已有广泛应用^[6]。

在急性缺血性脑卒中时,由于急性脑血管血流障碍,脑组织局部缺血缺氧,促进细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶大量释放,导致线粒体的结构及功能破坏,细胞能量代谢发生障碍并触发一系列酶促反应,加速细胞凋亡,实验室检查可见异常 RCBF 及 EEG,脑组织出现缺血坏死灶^[7]。本实验研究结果显示,在阻塞了大鼠大脑中动脉 Willis 环造成脑缺血再灌注后 RCBF 急剧下降并导致 EEG 棘波振幅急剧上升,经过尾静脉注射参麦注射液给药后,参麦组 RCBF 开始逐渐升高,EEG 波幅缓慢下降,至 6 天接近对照组水平,说明参麦注射液能显著增加 RCBF,降低大鼠脑缺血再灌注后脑电图异位棘波波幅,抑制其异常放电。组织学形态学及脑梗死范围亦证实脑组织神经胶质细胞溶合减少。由于参麦注射液增加了脑 RCBF 进而减少了其脑梗死面积。这与 Pina-

le^[8]报道的参麦注射液改善脑组织的能量代谢,改善脑灶缺血、水肿,促进脑神经细胞功能恢复,减轻缺血再灌注后脑组织损伤,减少脑梗死面积而对脑组织起到保护作用相一致。以上提示该药物可能具有改善细胞膜系统的钙运转能力,减少钙离子在线粒体内过多的堆积,促进细胞的能量代谢以恢复缺血再灌注受损的脑组织功能。

综上所述,本实验研究证实参麦注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用。

参 考 文 献

[1] Cheng J Y, Huang J C, Liu G Y, et al. Effect of shenmai injection on the expression of hippocampal c-fos gene of rats with ischemic cerebral injury[J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2005, 9 (32) : 228-229.

[2] 曹旭东,丁志山,陈建真,等. 参麦注射液药理及临床研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17 (3) : 104-106.

[3] 徐艳炜,孙莉,梁浩,等. 脑缺血中 12/15-脂氧合酶对过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 调节作用的初步探讨[J]. 中华神经科杂志, 2014, 47 (2) : 123-127.

[4] Felberg RA, Burgin WS, Grotta JC. et al. Neuroprotection and the ischemic cascade[J]. CNS Spectrums, 2000, 5 (3) : 52-58.

[5] 王婷,闫咏梅,曹影,等. 参麦注射液治疗中风 (恢复期) 瘀血闭阻证的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12 (2) : 148-149.

[6] 沈斌,董广佩,方久强,等. 早期运用参麦注射液联合大剂量纳洛酮治疗重型颅脑损伤疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, (22) : 2761-2762.

[7] 欧阳修河,尹睿,张颖,等. 参麦注射液对无创通气治疗慢性阻塞性肺病并严重呼吸衰竭的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26 (7) : 608-611.

[8] Spinale FG, Coker MI, Bond BR, et al. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: A potential therapeutic target [J]. Cardiovasc Res, 2000, 46 (2) : 225-238.

(收稿日期:2014-08-13)
(本文编辑:蒲晓田)

· 启事 ·

《环球中医药》杂志应用在线采编系统收稿

本刊 2014 年起启用在线期刊稿件采编系统。系统入口位于《环球中医药》杂志官方网站 www.hqzyy.com 首页。作者投稿,请首先在本刊网站在线注册账号,以该账号登陆稿件采编系统投稿,并可随时了解稿件编审进度。使用稿件采编系统十分方便作者和编辑的随时交流。同时本刊网站提供近年已刊文章的免费下载。此在线采编系统为本刊唯一收稿方式,本刊并未委托其他单位和个人代理收稿。

编辑部邮箱 hqzyy@163.com, hqzyy@126.com 仅供联络,请勿投稿。编辑部电话 010-65133322 转 5203 或 010-65269860。