

复方菖蒲益智汤对脑缺血再灌注损伤小鼠脑组织 Ca^{2+} -ATP 酶及 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性的影响

徐丽娟 许斐 臧春柳 赵层闪 刘学飞 杨丽静 田军彪

【摘要】 目的 观察复方菖蒲益智汤对小鼠脑缺血再灌注损伤早期脑组织中 Ca^{2+} -ATP 酶及 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性的影响。**方法** 实验小鼠随机分为假手术组、模型组、复方菖蒲益智汤高、低剂量组、尼莫地平对照组。采用夹闭双侧颈总动脉的方法制备脑缺血再灌注损伤模型小鼠,给药 14 天后进行神经功能损伤评分,并采用 HE 染色,光镜下观察海马区脑组织的病理形态学变化,测定脑组织 Ca^{2+} -ATP 酶及 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性。**结果** 各用药组小鼠海马区锥体细胞损伤程度、神经功能缺损程度比模型组均有所减轻,以复方菖蒲益智汤高剂量组效果最为明显,高剂量组小鼠的 Ca^{2+} -ATP 酶及 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性高于模型组、低剂量组及尼莫地平组 ($P<0.01$)。**结论** 复方菖蒲益智汤能够提高脑缺血再灌注小鼠脑组织 Ca^{2+} -ATP 酶及 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性,对于小鼠脑缺血再灌注损伤有保护作用。

【关键词】 脑缺血再灌注损伤; 复方菖蒲益智汤; Ca^{2+} -ATP 酶; Na^{+} - K^{+} -ATP 酶

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.11.001

Protective effect of Changpu Yizhi compound decoction on cerebral ischemia and reperfusion injury in mice XU Li-juan, XU Fei, ZANG Chun-liu, et al. Traditional Chinese Medicine Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050011, China

Corresponding author: TIAN Jun-biao, E-mail: jbt1965@sina.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of Changpu Yizhi compound decoction on the activity of Ca^{2+} -ATPase and Na^{+} - K^{+} -ATPase in brain tissue of mice in the early stage of cerebral ischemia and reperfusion injury. **Methods** Mice were randomly divided into sham operation group, model group, high and low doses of Changpu Yizhi compound decoction group and nimodipine control group. Cerebral ischemia and reperfusion injury (CIRI) mice model was prepared through blocking both side carotid arteries. After continuous medication for 14 days, neurological injury score was evaluated, and pyramidal cell morphology of the hippocampal region was observed under light microscope after HE staining. The activity of the Ca^{2+} -ATPase and Na^{+} - K^{+} -ATPase in the brain tissue was detected. **Results** Compared with the model group, the injury of hippocampal pyramidal cells of each medical group was alleviated and neurological function deficit was lowered, especially in the high dose group. The activity of the Na^{+} - K^{+} -ATPase and Ca^{2+} -ATPase in the high dose group was higher than that of the other groups except the sham operation group ($P<0.01$). **Conclusion** Changpu Yizhi compound decoction could enhance the activity of

基金项目: 河北省自然科学基金面上项目(H2013206393);河北省科技支撑计划(15277748D);河北省省级中医药类重大医学科研课题(zyzd2013004);河北省中医药管理局科研计划(2014039);河北省政府资助临床医学优秀人才培养和基础课题(361025)

作者单位: 050011 石家庄,河北省中医院脾胃病科(徐丽娟、刘学飞、杨丽静、田军彪);河北省晋州市人民医院脾胃病科(许斐);河北省唐县中医院脾胃病科(臧春柳);河北省衡水市中医院脾胃病科(赵层闪)

作者简介: 徐丽娟(1978-),女,硕士,主治医师。研究方向:神经及脑血管疾病诊治。E-mail:xlj_alice@126.com

通讯作者: 田军彪(1964-),博士,教授。研究方向:脑血管疾病中医药防治研究。E-mail:jbt1965@sina.com

the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ in mice with cerebral ischemia and reperfusion injury, indicated its protective effect on the injury.

【Key words】 Cerebral ischemia and reperfusion injury; *Changpu Yizhi* compound decoction; $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$

缺血性脑血管病是临床致残率极高的常见病、多发病,脑缺血可导致神经细胞损伤,而恢复血流灌注后,脑组织损伤反而进一步加重,甚至出现不可逆性脑损伤,通常称为脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI),而脑缺血再灌注损伤早期是抢救缺血半暗带神经细胞的关键时期^[1]。复方菖蒲益智汤是田军彪教授治疗缺血性脑血管病的经验方,具有化浊解毒、活血通络的功效,是在中医“浊毒”和“瘀血”理论指导下,针对中风主要病机“痰浊闭阻清窍,瘀毒损伤脑络”而精选的有效方剂^[2]。本实验旨在通过观察复方菖蒲益智汤对小鼠脑缺血再灌注损伤早期脑组织中 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 酶及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活性的影响,结合小鼠海马区锥体细胞形态学改变以及小鼠神经功能损伤程度来探讨本方在 CIRI 保护中的作用机理,为临床治疗提供客观理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及分组

SPF 级健康昆明小鼠 50 只,均为雄性,体质量 (25 ± 3) g,河北医科大学实验动物中心提供,许可证号:1202160。按照随机数字表法,将小鼠分为 5 组:假手术组、模型组、中药高剂量组(简称高剂量组)、中药低剂量组(简称低剂量组)、尼莫地平对照组(简称尼莫地平组),每组 10 只。

1.2 实验药品及仪器

对照药物:尼莫地平,规格为 20 mg/片,天津市中央药业有限公司生产,国药准字 H10910040。以蒸馏水溶解,配制成浓度为 0.78 mg/mL 的混悬液。

复方菖蒲益智汤(采用河北省中医院中药房所供饮片):石菖蒲 15 g、益智仁 15 g、当归 9 g、丹参 15 g、川芎 9 g、地龙 15 g、赤芍 15 g、茯苓 15 g、郁金 15 g、黄连 6 g、泽泻 6 g。上述饮片由制剂室水煎浓缩后 4℃ 保存。

主要试剂及仪器:苏木素-伊红染液, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶含量测定试剂盒, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$ 酶含量测定试剂盒,以上试剂均购自南京建成生物工程研究所。水合氯醛、酒精、生理盐水、高速冷冻离心机(上海安亭),半自动生化分析仪(Humalyzer)等均由河北医

科大学动物实验中心提供。

1.3 模型制备

小鼠饲养于室温 24℃ ~ 26℃ 的动物实验室(河北医科大学西校区),术前禁食 12 小时,自由饮水。在无菌实验室内行手术造模,采用微型动脉夹间断夹闭双侧颈总动脉法造成小鼠脑组织缺血再灌注损伤^[3]。将小鼠用 10% 水合氯醛以 0.3 mL/100 g 的剂量进行腹腔注射麻醉,取颈前正中纵行切口,长约 1 ~ 1.5 cm,暴露颈总动脉,钝性剥离双侧的颈总动脉,以微型动脉夹阻断双侧颈总动脉血流,10 分钟后松开动脉夹,恢复颈总动脉血液灌注 10 分钟,反复进行三次,再灌注 24 小时。其中假手术组分离颈总动脉后不进行动脉夹夹闭,余步骤与其余四组相同。术后给予保温、预防感染等措施,保证小鼠正常进食、饮水。

1.4 给药方法

造模成功后第 2 天开始给药,高剂量组按照 17.55 g/(kg · d) 的剂量灌服复方菖蒲益智汤中药液,低剂量组按照 8.78 g/(kg · d) 的剂量灌服中药液,尼莫地平组按照 0.03 g/(kg · d) 的剂量灌服尼莫地平液,假手术组、模型组按照 20 mL/(kg · d) 的剂量灌服生理盐水,每天 1 次,连续用药 14 天。

1.5 检测方法

术后 24 小时小鼠完全清醒后,以“5 分法”进行神经行为学评分^[4]。无神经缺损症状为 0 分;轻度局灶性神经功能缺损(不能完全伸展一侧前肢)为 1 分;中度局灶性神经功能缺损(爬行时向一侧转圈)为 2 分;重度局灶性神经功能缺损(行走时向一侧倾倒)为 3 分;意识水平降低,不能自主行走为 4 分;死亡为 5 分。1 ~ 3 分为有效模型。剔除死亡、无效模型,并遵循随机原则补充动物。

各组小鼠分别于给药 14 天后予 10% 水合氯醛以 0.40 mL/100 g 剂量腹腔注射麻醉,断头处死,立即在冰盘上取出脑组织,甲醛固定、脱水包埋、切片染色(苏木精-伊红 hematoxylin-eosin staining, HE),在 400 倍光镜下观察各组小鼠海马 CA1 区细胞形态学变化。

取右侧脑皮质组织与 4℃ 的生理盐水混合,制成 1% 匀浆,经高速离心机以 3000 rpm 离心处理后

取上清液进行 Ca^{2+} -ATP 酶、 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性测定。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,统计方法采用 Dunnett' T3 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠神经功能缺损评分

手术后 24 小时,与假手术组相比,其余四组小鼠的神经功能评分显著增高($P<0.05$),但小鼠神经功能评分无明显差异,造模成功。连续用药 14 天后,模型组小鼠神经功能评分明显高于各给药组($P<0.05$);中药低剂量组及尼莫地平组小鼠的神经功能评分均高于中药高剂量组($P<0.05$);尼莫地平组与中药低剂量组小鼠的神经功能评分无明显差异。见表 1。

表 1 各组小鼠神经功能缺损评分($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	术后 24 小时	用药 14 天
假手术组	-	-
模型组	2.61±0.22	2.41±0.22
中药高剂量组	2.52±0.17	1.51±0.17 ^a
中药低剂量组	2.30±0.21	2.23±0.28 ^{ab}
尼莫地平组	2.55±0.17	2.46±0.21 ^{ab}

注:与模型组比较,^a $P<0.05$;与中药高剂量组比较,^b $P<0.05$ 。

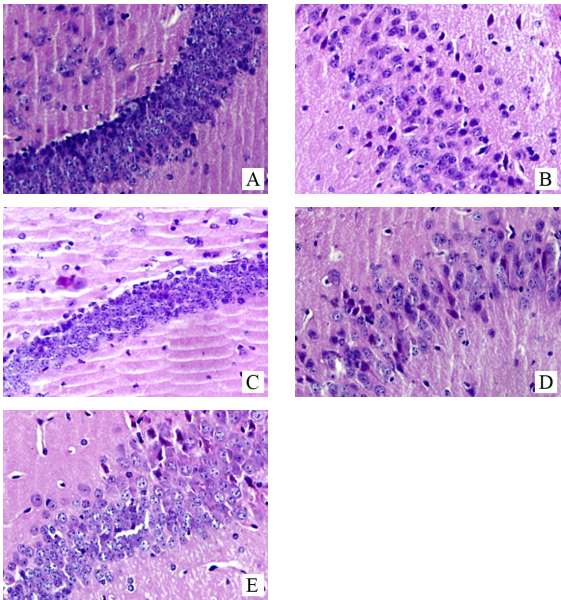
2.2 各组小鼠脑组织海马 CA1 区锥体细胞形态

光镜下观察 HE 染色切片可见:假手术组小鼠海马锥体细胞形态正常,核仁清晰,细胞质丰富,细胞排列整齐致密,层次清晰,未见胶质细胞增生,见图 1A。模型组小鼠海马形态正常的锥体细胞明显减少,且锥体细胞的细胞核固缩深染,层次稀疏,排列紊乱,有明显的细胞脱失,大量胶质细胞增生,神经纤维杂见,见图 1B。高剂量组海马形态正常的锥体细胞数量占绝大部分,偶见细胞核固缩深染及细胞脱失,细胞的排列较为整齐,但层次较假手术组有所减少,见图 1C。低剂量组、尼莫地平组海马正常形态的锥体细胞数量减少,较多细胞可见核固缩及深染,细胞层次疏松,间隙增大,可见少量细胞脱失,见图 1D、1E。

2.3 各组小鼠脑组织 Ca^{2+} -ATP 酶、 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶含量

与假手术组相比,其余四组小鼠脑组织中 Ca^{2+} -ATP 酶及 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶含量明显降低

($P<0.05$)。与模型组相比,各用药组小鼠脑组织中 Ca^{2+} -ATP 酶及 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶含量明显升高($P<0.05$)。与低剂量组及尼莫地平组相比,高剂量组的 Ca^{2+} -ATP 酶及 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶含量升高($P<0.05$)。见表 2。



注:A:假手术组;B:模型组;C:高剂量组;D:低剂量组;E:尼莫地平对照组

图 1 CIRI 小鼠海马区锥体细胞病理形态(HE×400)

表 2 各组小鼠脑组织 Ca^{2+} -ATP 酶及 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶含量($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	Na^{+} - K^{+} -AT 酶 (U/mgprot)	Ca^{2+} -ATP 酶 (U/mgprot)
假手术组	6.08±0.11	3.85±0.07
模型组	2.80±0.16 ^a	1.85±0.04 ^a
尼莫地平组	3.95±0.06 ^{bc}	2.67±0.06 ^{bc}
中药高剂量组	5.06±0.06 ^{ab}	3.26±0.04 ^{ab}
中药低剂量组	3.97±0.05 ^{bcd}	2.71±0.05 ^{bcd}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较:^b $P<0.05$;与中药高剂量组比较:^c $P<0.05$;与尼莫地平组比较:^d $P>0.05$ 。

4 讨论

现代医学认为临床治疗缺血性卒中时不仅要及时恢复大脑血液供应,还应尽量减轻 CIRI。针对 CIRI 发生机制的研究涉及细胞能量代谢障碍、钙超载、免疫炎症反应、凋亡基因启动、氧自由基大量释放、兴奋性氨基酸的神经毒性作用等多个方面,多因素综合作用下造成瀑布式级联反应,最终导致脑细胞水肿、坏死、凋亡^[5]。因为脑组织对缺血、缺氧的极度敏感,在脑缺血早期即可出现脑细胞氧化磷

酸化功能降低, ATP 合成障碍, 导致 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性的降低, 从而引起细胞内 Na^+ 、 Cl^- 潴留, 而 K^+ 大量外流, 同时出现细胞内 Ca^{2+} 转运失常, 导致胞浆内大量 Ca^{2+} 沉积于线粒体, 激活了细胞内多种降解酶释放, 引发细胞水肿、溶解、死亡等一系列损害, 发生细胞毒性脑水肿。国内外研究认为, 脑缺血再灌注后诸多因素共同导致的细胞内及细胞器内 Ca^{2+} 超载是脑组织细胞死亡的“共同通路”。

中医虽然没有关于 CIRI 的文字记载, 但 CIRI 是中风发病过程中出现的一个病理过程, 应归属于“中风”范畴; 传统认为中风之病机多由痰浊、瘀血蒙蔽清窍, 阻滞脉络而产生神识不清、肢体不遂、舌强语蹇等症状。笔者在中医“浊毒”理论指导下, 结合“瘀血”学说, 发现对中风病机的传统认识中, 仅强调了“痰浊”“瘀血”, 对“毒邪”致病认识不足, 治疗中不够重视。结合临床实践认为, 中风多发于老年人, 其脏腑虚衰, 脾失健运则痰浊内生, 阻滞气机, 气滞则血瘀, 《血证论》云“血在上则浊蔽而不明矣”, 瘀浊之为病, 蕴积日久而成毒, “浊”“瘀”“毒”互为因果, 损伤脏腑经络而百病丛生。对中风病而言, 其主要病机为“痰浊闭阻清窍, 瘀毒损伤脑络”。结合现代病理研究, 急性脑缺血中的“浊毒”是因缺血、缺氧、能量代谢障碍引起的一系列病理过程中产生的大量有害物质, 既是病因也是病理产物。临床上制定了化浊解毒、活血通络的治疗大法, 筛选出了复方菖蒲益智汤, 治疗中风、认知障碍等疗效肯定。方中以石菖蒲开窍豁痰、化浊醒神, 丹参、当归、赤芍活血化瘀, 川芎为血中气药, 配合郁金行气活血, 虫类药地龙可清热息风、通行经络, 茯苓、泽泻渗湿利水以化浊, 黄连清热燥湿以解毒, 益智仁温肾固精, 补益脑髓。现代药理研究表明, 石菖蒲的有效成份可以影响 CaMK II 信号通路, 调控凋亡基因表达, 减少神经细胞凋亡^[6]; 当归多糖可抑制 Cleaved caspase-3 及 bax 的表达, 同时增强 bcl-2 表达, 从而减少脑缺血再灌注损伤大鼠海马神经细胞的凋亡^[7]; 丹参酮 II A 可提高局灶性脑缺血急性期大鼠细胞核 p-CREB 和细胞 TORC1 的蛋白表达水平, 减少脑梗死体积, 在大鼠脑缺血急性期应用有脑保护作用^[8]; 此外复方菖蒲益智汤中采用的中药

川芎、赤芍、地龙等均有确切的改善脑组织代谢的作用, 可见中医传统理论指导下组方与现代医学经验亦相契合。

本实验观察了 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶在脑缺血再灌注损伤早期的含量变化, 实验结果证明, 复方菖蒲益智汤能够提高脑缺血再灌注损伤小鼠脑组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性, 且高剂量中药组疗效更佳, 该组小鼠海马区锥体细胞的受损程度、神经功能损伤亦较轻, 其机理可能与复方菖蒲益智汤改善了脑组织能量代谢水平以及抑制细胞内钙超载有关, 这为复方菖蒲益智汤临床应用提供了一定的客观理论依据, 但该方药亦存在调节炎症因子释放、抑制炎症反应等作用机制^[9], 仍有进一步研究的价值。

参 考 文 献

- [1] BODALIA, Hongbin, Michheal, et al. Loss of endoplasmic reticulum Ca^{2+} homeostasis: contribution to neuronal cell death during cerebral ischemia[J]. 中国药理学报, 2013, 34(1): 49-59.
- [2] 田军彪, 赵层闪, 高晶晶, 等. 化浊解毒活血通络方对脑缺血再灌注损伤大鼠血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, (9): 3341-3342.
- [3] Genovese T, Mazzon E, Paterniti I, et al. Neuroprotective effects of olprinone after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Neuroscience letters, 2011, 503(2): 93-99.
- [4] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [5] Philip M, Benatar M, Fisher M, et al. Methodological quality of animal studies of neuroprotective agents currently in phase II/III acute ischemic stroke trials[J]. Stroke, 2009, 40(2): 577-581.
- [6] 方永奇, 魏刚, 吴启端. 石菖蒲醒脑开窍作用物质基础及其作用机制研究[J]. 医学研究杂志, 2007, 36(9): 60.
- [7] 林国芳. 当归多糖对脑缺血再灌注损伤大鼠海马神经元的保护作用[J]. 中草药, 2015, (4): 558-561.
- [8] 刘玲玲, 刘红, 尹君玲, 等. 丹参酮 II A 对局灶性脑缺血大鼠急性期脑保护作用的相关研究[J]. 中国卒中杂志, 2014, (1): 20-25.
- [9] 田军彪, 臧春柳, 崔媛, 等. 复方菖蒲益智汤对脑缺血再灌注损伤小鼠 IL-1 β 及 TGF- β 1 表达水平的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, (7): 2309-2311.

(收稿日期: 2016-05-13)

(本文编辑: 禹佳)