

葛根素对脑缺血 再灌注损伤的保护作用

林捷¹, 涂强² (1. 荆州第三人民医院, 湖北 荆州 434000; 2. 荆州第一人民医院, 湖北 荆州 434000)

摘要:目的 研究葛根素对脑缺血 再灌注损伤的保护作用。方法 本实验采用大鼠右侧大脑中动脉阻塞 (MCAO) 2 h, 再灌注 24 h 模型, 每组最终保证 8 只成活大鼠。MCAO 前, 药物组大鼠分别腹腔注射葛根素 25, 50, 100 mg·kg⁻¹, 尼莫地平 0.7 mg·kg⁻¹, 1 次·d⁻¹, 连续 7 d。操作后, 分别用 Longa's 法、红四氮唑 (TTC) 染色法及干燥失重法来评价大鼠的神经功能状态、脑梗塞面积及脑水肿。结果 与模型组比较, 葛根素 50, 100 mg·kg⁻¹ 可明显减少大鼠 MCAO 后脑梗塞面积, 降低脑水肿的程度及改善神经功能症状, 具有显著性差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 葛根素对大鼠脑缺血 再灌注损伤具有保护作用。

关键词: 葛根素; 大鼠; 脑缺血 再灌注

中图分类号: R965.1; R931.6 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2008)08-0688-03

Protective effects of puerarin on cerebral ischemia - reperfusion injury in rat

LIN Jie¹, TU Qiang² (1. Jingzhou Third Hospital, Jingzhou 434000, China; 2. Jingzhou First hospital, Jingzhou 434000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Research the protective effects of puerarin on cerebral ischemia - reperfusion injury in rats. **METHODS** In this study, cerebral ischemia - reperfusion injury model was made by 2 hours of middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by 24 hours of reperfusion in rats' right cerebral. There were 8 rats alive every group after making model. Rats were pretreated with puerarin 25, 50, 100 mg·kg⁻¹, nimodipine 0.7 mg·kg⁻¹ once a day for 7 days and then subjected to MCAO. We examined neurological infarction sizes by 2, 3, 5 - triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining technique, the cerebral water contents measuring by wet/dry weighing method, the neurological deficit scores grading on a scale of 0-4. The effects of puerarin at the dosage of 25, 50 and 100 mg·kg⁻¹ were compared respectively with nimodipine 0.7 mg·kg⁻¹ and model group. **RESULTS** Puerarin 50 and 100 mg·kg⁻¹ could obviously decrease infarction volumes, neurological deficit scores and cerebral water contents after MCAO ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ vs. model group). **CONCLUSION** Puerarin could protect against the cerebral ischemia - reperfusion injury in rats.

KEY WORDS: puerarin; rats; cerebral ischemia - reperfusion

脑血管病是临床常见疾病, 脑缺血是脑血管病最主要的病种, 死亡率仅次于恶性肿瘤。目前治疗方法着重于尽可能地恢复血流, 防止或减轻缺血蔓延; 改善缺血脑组织的代

谢, 减轻脑组织的缺血 再灌注损伤, 阻止细胞死亡的蔓延。研究表明: 葛根素可扩张脑血管, 增加脑血流量, 改善大脑氧供^[1-3], 保护动脉血管内皮细胞, 阻止动脉粥样硬化, 防止血

作者简介: 林捷, 女, 主管药师 Tel: 15927748206 E-mail: tkhswe9886@163.com

栓形成^[4]。大鼠双侧颈内动脉和椎动脉在脑底部形成基底动脉环,分为大脑前、中、后动脉,在软脑膜中分支后进入脑实质。阻断支配脑组织的脑实质血管,可模拟与人脑卒中相近似的病理模型^[5]。临床上脑血管阻塞多发生在脑动脉的某一分支,尤以大脑中动脉最为常见。大脑中动脉栓塞模型的制作方法有很多,本实验拟采用国内外常用的线栓法建立大鼠右侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)局灶性脑缺血再灌注模型^[6],分别用 Longa's 法^[7]、红四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色法及干燥失重法评价神经功能状态,脑梗塞面积及脑水肿程度,确定葛根素对脑缺血再灌注损伤是否具有保护作用。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 药物及试剂 葛根素注射液(Puerarin Injection):广东燕塘生物化学药业有限公司,纯度为98%。尼莫地平粉剂:山东新华制药股份有限公司生产,用5%羧甲基纤维素钠配置成均匀的混悬液。水合氯醛:中国医药上海化学试剂公司。红四氮唑:中医药集团上海化学试剂公司,用0.1 mol·L⁻¹, pH 7.4的PBS配置,避光低温保存。其它试剂均为市售分析纯。

1.1.2 动物 Sprage-Dawley大鼠,雄性,体重250~300 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

1.1.3 仪器 超速冷冻离心机:上海手术器械厂。电热恒温干燥箱:上海跃进医疗器械厂。AE200精密电子天平:瑞士METTLER公司产品。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及给药 Sprage-Dawley大鼠,随机分成伪手术组、模型组、尼莫地平组0.7 mg·kg⁻¹、葛根素组25、50、100 mg·kg⁻¹,共6组。各组动物均腹腔注射(ip)等容积药物(每100 g体重1 mL),1次·d⁻¹,连续7 d,末次给药后30 min依法制备脑缺血再灌注模型。每组模型保证8只成活大鼠。伪手术组、模型组腹腔注射等容量生理盐水。

1.2.2 大鼠右侧MCAO局灶性脑缺血再灌注模型的制作 末次给药后30 min,大鼠称重,腹腔注射10%水合氯醛

(350 mg·kg⁻¹)使大鼠麻醉,仰卧固定于手术台。以改进Longa等^[8-9]的方法制备右侧大脑MCAO模型。颈部皮肤用碘酒消毒后,作正中皮肤切口,钝性分离皮下组织和肌肉,避免损伤甲状腺及甲状旁腺。分离右侧颈总动脉及其分支颈外和颈内动脉,并穿线备用,沿颈内动脉继续向颅内方向分离至翼腭动脉分叉处,结扎翼腭动脉、颈外动脉和颈总动脉。在颈总动脉分叉处剪一小口,沿颈内动脉向颅内插一直径约为0.28 mm的尼龙线,以颈总动脉分叉处为标记,插入深度约为18~22 mm。当感到轻微阻力时,即达到了较细的大脑前动脉。将尼龙线与颈内动脉一并结扎。缝合皮下筋膜及皮肤,即为大脑中动脉梗塞模型。伪手术组除不插尼龙线阻塞血管外,其余步骤同上。术中严格控制室温在23~25℃。

1.2.3 神经功能评分^[10] 大鼠缺血2 h再灌注24 h后,观察其行为学变化,神经症状按Longa评分。评分标准:无神经损伤,1分;向左打圈,2分;行走时向左侧倾倒,3分;不能自行行走,意识昏迷,4分。

1.2.4 TTC染色及脑梗塞体积的测定 缺血2 h再灌注24 h后,断头取脑,左右脑分开,取右脑,除去小脑和低位脑干、嗅球,立即称湿重。然后将右前脑沿冠状面切成厚度基本相同的5片,脑片置于1.5 mL 2% TTC溶液中避光孵育20 min。将脑片置于10%的甲醛中固定。分离苍白区(梗死区)和非苍白区(正常区),参考文献方法^[5],计算梗死百分比。计算公式:梗死百分比(%) = 苍白区重量 / (苍白区重量 + 非苍白区重量) × 100%

1.2.5 脑组织含水量的测定 将染色的脑组织烘干(105℃, 24 h),称重,按干湿重法^[9],求出脑组织含水量。脑组织含水量计算公式:脑组织含水量(%) = (脑湿重 - 脑干重) × 100%

1.2.6 统计学处理 所有数据均应用SPSS 11.5统计分析软件包进行处理;多组间均数比较应用ANOVA法进行方差分析,两两间比较应用Student-Newman-Keuls法进行q检验。数据应用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。P < 0.05, P < 0.01分别表示差异有显著性和差异极显著性。

2 结果

表1 葛根素对大鼠脑缺血再灌注损伤后脑梗塞体积、神经功能评分和脑组织含水量的影响($\bar{x} \pm s$, n = 8)

分组	剂量 / mg·kg ⁻¹	梗塞体积 (w/w) / %	神经功能评分	脑组织含水量 (w/w) / %
伪手术组	-	0.00 ± 0.00	0.000 ± 0.000	1.95 ± 0.40
模型组	-	24.47 ± 3.08 ¹⁾	2.413 ± 0.525 ¹⁾	16.59 ± 3.16 ¹⁾
尼莫地平组	0.7	21.72 ± 2.00 ²⁾	2.063 ± 0.354 ²⁾	14.69 ± 2.36
葛根素组	25	18.44 ± 1.84 ³⁾	1.325 ± 0.243 ³⁾	13.21 ± 2.59 ²⁾
	50	16.15 ± 2.68 ³⁾	1.175 ± 0.271 ³⁾	12.34 ± 3.35 ³⁾
	100	14.48 ± 2.06 ³⁾	0.975 ± 0.175 ³⁾	11.20 ± 2.27 ³⁾

注:1) P < 0.01 vs 伪手术组; 2) P < 0.05, 3) P < 0.01 vs 模型组

3 讨论

模型组大鼠MCAO缺血2 h再灌注24 h后,脑梗塞范围、神经评分及脑组织含水量(%)分别为24.47 ± 3.08、2.413 ± 0.525及16.59 ± 3.16,与伪手术组相比明显增高,具有统计学差异(P < 0.01)。预先给予葛根素50、100 mg·kg⁻¹或尼莫地平0.7 mg·kg⁻¹后,脑梗塞范围、脑组织

含水量(%)明显降低,与模型组相比具有显著差异(P < 0.05或P < 0.01)。低葛根素剂量组脑组织含水量与模型组相比,差异无统计学意义(P > 0.05)。阳性对照药尼莫地平也能减轻大鼠的脑缺血再灌注损伤,但尼莫地平组脑组织含水量与模型组相比,差异无统计学意义(P > 0.05)。

Longa's法制作右侧大脑MCAO局灶性脑缺血模型,其病

理学机制与临床上脑卒中相似。本实验采用大鼠大脑MCAO的局灶性脑缺血再灌注模型,以尼莫地平作为阳性对照药,研究三种剂量葛根素对大鼠脑缺血2 h再灌注24 h后神经功能症状、脑梗死体积及脑水肿的作用。结果表明:在缺血前给予葛根素 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 预防性治疗的大鼠,脑梗死体积及脑水肿程度降低最为明显,其次葛根素 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,其药理作用表现在大鼠的脑神经功能症状得到明显改善、脑梗死面积缩小、脑水肿程度降低,且在本实验的用药范围内呈剂量依赖性。尼莫地平治疗组也能减轻大鼠的脑缺血再灌注损伤,但减轻程度不如葛根素显著。

本研究发现,葛根素可剂量依赖性地改善缺血再灌注损伤的大鼠脑神经功能症状、缩小脑梗死面积、降低脑水肿程度,提示葛根素对大鼠脑缺血再灌注损伤具有保护作用。若进行大鼠死亡率分别与缺血再灌注时间相关性的试验,可进一步优化本试验。

参考文献

- [1] LIU Q, WANG L, LU Z, *et al.* Effect of puerarin on coronary collateral circulation in dogs with experimental acute myocardial infarction [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1999, 24(5): 304-306.
- [2] SHI R L, ZHANG J J. Protective effect of puerarin on vascular endothelial cell apoptosis induced by chemical hypoxia in vitro [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2003, 38(2): 103-107.
- [3] ZHAO Z, YANG X, ZHANG Y. Clinical study of puerarin in

treatment of patients with unstable angina [J]. Chin J Integr Tradit Chin West Med(中国中西医结合杂志), 1998, 18(5): 282-284.

- [4] WANG L, ZHAO A, WANG F, *et al.* Protective effect of puerarin on acute cerebral ischemia in rats [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 1997, 22(12): 752-754.
- [5] HOU S T, MACMANUS J P. Molecular mechanisms of cerebral ischemia-induced neuronal death [J]. Int Rev Cytol, 2002, 221: 93-148.
- [6] KATO H, KOGURE K. Biochemical and molecular characteristics of the brain with developing cerebral infarction [J]. Cell Mol Neurobiol, 1999, 19(1): 93-108.
- [7] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] SIRTORI C R. Aescin. Pharmacology, Pharmacokinetics and therapeutic profile [J]. Pharmacol Res, 2001, 44(3): 183-193.
- [9] SHEN Y W, ZHU Z F, ZHANG J C. Observation on the effect of β -sodium aescin in intracerebral hemorrhage [J]. Hebei Med(河北医学), 1999, 5: 9-11.
- [10] GUILLAUME M, PADIOLEAU F. Venotonic effect, vascular protection, anti-inflammatory and free radical scavenging properties of horse chestnut extract [J]. Arzneim - Forsch / Drug Res, 1994, 44(1): 25-35.

收稿日期: 2007-08-29