

· 论著 ·

复方血栓通对脑缺血再灌注模型大鼠脑MDA和SOD的影响

1. 广东医科大学附属医院药学部 (广东 湛江 524001)

2. 广东医科大学附属医院神经外科 (广东 湛江 524001)

3. 广东医科大学附属医院神经内科 (广东 湛江 524001)

李朝晖¹ 马晓鹏¹ 吴万征¹ 尹延庆² 林力峰³

【摘要】目的 观察评价复方血栓通对脑缺血再灌注模型大鼠脑活性和丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的影响。**方法** 实验分为6组,即假手术组、模型组、复方血栓通高剂量组、复方血栓通中剂量组、复方血栓通低剂量组、阳性药华佗再造丸组。对各组大鼠采用可逆性大脑中动脉线栓法制备局灶性脑缺血再灌注模型,进行神经功能评分,并测定脑组织中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量。**结果** 假手术组与模型组比较,大鼠脑缺血再灌注损伤后脑组织MDA含量显著地降低($t=9.2476, P=0.0000$),脑组织SOD显著地增高($t=21.5083, P=0.0000$);各用药组与模型组比较,阳性药华佗再造丸和复方血栓通高、中、低剂量组均能显著地降低MDA活性(分别 $t=3.8193, 5.7638, 4.9027, 3.9261, P=0.0000$);阳性药华佗再造丸和复方血栓通高、中剂量组均能显著地升高SOD活性(分别 $t=14.2716, 16.0538, 15.0472, P=0.0000$);复方血栓通高剂量组升高SOD活性作用强于阳性药华佗再造丸组($t=7.4863, P=0.0000$),缺血后各组动物均出现神经功能损害症状,阳性药华佗再造丸和复方血栓通高、中、低剂量组神经功能缺损评分均明显的高于假手术组(分别 $t=3.1728, 6.4251, 5.0413, 3.9805, P=0.0000$);复方血栓通高剂量组神经功能缺损评分显著地低于模型组($t=6.9072, P=0.0000$)。**结论** 复方血栓通具有保护大鼠脑缺血再灌注损伤的作用,可以显著地增加脑组织SOD含量的活性,并有效的降低MDA水平减轻了脑缺血再灌注损伤,更好的发挥其对机体的保护作用。

【关键词】 复方血栓通; 脑缺血再灌注模型; MDA; SOD**【中图分类号】** R743.3; R453**【文献标识码】** A**DOI:** 10.3969/j.issn.1009-3257.2019.04.001

Effect of Compound Xueshuantong on MDA and SOD in Rats with Cerebral Ischemia Reperfusion

LI Chao-Hui, MA Xiao-Peng, WU Wan-Zheng, et al., Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, Guangdong Province, China

[Abstract] Objective To observe the effects of compound Xueshuantong on brain activity and malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. **Methods** The experiment was divided into 6 groups, namely sham operation group, model group, compound thrombus high dose group, compound thrombus middle dose group, compound thrombus low dose group, and positive drug Huajing rebuilding group. A reversible middle cerebral artery occlusion method was used to prepare a model of focal cerebral ischemia-reperfusion in each group. Neurological function scores were performed, and malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in brain tissue were measured. **Results** Compared with the model group, the MDA content in brain tissue of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury was significantly lower than that of the model group. ($t=9.2476, P=0.0000$). The SOD of brain tissue was significantly increased ($t=21.5083, P=0.0000$). Compared with the model group, the positive drug Huayu Zaizao Pill and the compound thrombus high, medium and low dose groups significantly reduced MDA activity(respectively. $t=3.1728, 6.4251, 5.0413, 3.9805, P=0.0000$). The neurological deficit score of the compound thrombus high dose group was significantly lower than that of the model group ($t=6.9072, P=0.0000$). **Conclusion** Compound Xueshuantong has the protective effect on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. It can effectively increase the activity of SOD in brain tissue and reduce the level of MDA. It can alleviate the cerebral ischemia-reperfusion injury and better protect its body.

[Key words] Compound Thrombus; Cerebral Ischemia-reperfusion Model; MDA; SOD

作者简介: 李朝晖, 男, 副主任药师, 主要从事临床药学研究

通讯作者: 吴万征

中风病也称脑卒中,现代医学称之为急性脑血管病,以局限性神经功能缺失为其共同特征,是一种因气血逆乱、血溢于脑所致的脑血管神经疾病,心、血、脉是血行周身的生理

基础,能够有效的维持脏腑气化活动的基本环节,心、血、脉失常是导致中风发病的病理基础,由气血逆乱、脑脉痹阻或血溢于脑并引起病人突然昏仆、半身不遂、肢体麻木等临床症状,是中风病患者中致死率最高的神经系统疾病之一,在当前成为世人瞩目的全球性健康问题^[1-3]。中风防重于治,中风难治,预防可行。复方血栓通胶囊(Compound Xueshuantong Capsule, CXC)是由丹参、三七、玄参、黄芪组成的一种中药制剂,对患者具有活血化瘀、益气养阴的功效,可以有效的抑制血栓形成,降低病人的氧化损伤,显著地降低病人的凝血时间,大大地促进血液微循环,提高了病人的外周血管和颈动脉血管的血流量^[4-5]。用线栓法阻断大鼠大脑中动脉制备的局灶性脑缺血模型是一种观察脑损伤较理想的动物模型^[6]。本研究采用可逆性大脑中动脉线栓法制备局灶性脑缺血再灌注大鼠模型,观察并分析了复方血栓通(CXC)对脑缺血再灌注模型大鼠脑活性和丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的影响,总结分析评价其抗脑缺血再灌注损伤的机制,现总结分析报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选择健康清洁级(Sprague-Dawley rats, SD)大鼠,雌雄各半,毛色纯白、具有光泽,活动度适中,SPF级,体重300g-350g,室内环境通风干燥,温度及湿度相对适宜。由广东省医学实验动物中心研究所提供,动物合格证号:SCXK(粤)2008-0002。

1.2 药物与试剂 复方血栓通胶囊:广东众生药业股份有限公司生产,批号:100606;华佗再造丸:广州奇星药业有限公司生产,批号:9338;MDA试剂盒:南京建成生物工程研究中心生产,批号:20100121;SOD试剂盒:南京建成生物工程研究中心生产,批号:20100422。

1.3 动物分组 选择100只SD大鼠,适应性饲养1周,随机取10只作为假手术组,其余90只随机分为模型组、复方血栓通高、中、低剂量组及阳性药华佗再造丸组,每组18只。再从各组中选择造模成功的大鼠

10只进行实验。

1.4 造模 参考Zea Longa等所进行研究的方法^[7]并给予创新改进,制备大鼠大脑中动脉局灶性脑缺血再灌注损伤模型。手术室室温应该保持在25℃左右,维持大鼠的体温在37℃。大鼠经水合氯醛(300mg/kg, ip)麻醉后并采取仰卧位,颈正中切口,钝性分离出左侧颈总动脉和颈外动脉,在颈外动脉发出大概在位置0.8cm处结扎。在颈外动脉下方小心分离出颈内动脉。将一端已加热成圆珠状的尼龙渔线插入颈总动脉,经颈总动脉分叉处,再进行把预先放入颈总动脉根部的丝线敷紧,将尼龙渔线并慢慢地由操作人员推入至大脑前动脉(约20mm)再往回拉2mm即至大脑中动脉口,缝合肌肉和皮肤。缺血1h后,将尼龙渔线抽出使动脉恢复再通,再灌24h。假手术组大鼠给予采取麻醉和血管分离术。

1.5 模型评价 可以根据Longa^[8]5分制法对上述造模大鼠麻醉完全清醒后进行神经功能评分,评分在1-3分的大鼠认为模型制作成功,纳入实验分组。评价标准如下:①0分:活动正常,无神经功能损伤;②1分:具有轻微神经功能缺损,提鼠尾离开地面30cm,不能完全伸展对侧前爪,右前肢表现为腕屈曲、肘屈曲、肩内旋或兼而有之者;③2分:中度局灶性神经功能缺损,爬行时出现向对侧转圈;④3分:行走时向右侧倾倒或轻推肩部时即向右侧倾倒,具有重度局灶性神经功能缺损;⑤4分:不能行走或意识下降及丧失;分值越高,表明动物行为障碍越严重。

1.6 给药方法 ①复方血栓通组:分别从术前15d开始以高剂量(125mg/kg)、中剂量(25mg/kg)、低剂量(5mg/kg)的药物灌胃,1次/d;②华佗再造丸组:从术前15天开始以25mg/kg剂量灌胃,1次/d;③模型组:按同样方法予以等量生理盐水;④假手术组:不做其他任何处理。

1.7 检测 将各组大鼠断头处死,在冰盘上立即进行取脑,并马上称取左侧大脑组织,放入玻璃匀浆管(玻璃匀浆管下端置于冰水混合物中)进行匀浆。将10%的组织匀浆在低温离心机中以3000r/min,离心10min,取上清液按照厂家试剂盒说明,采用酶联免疫吸附法进行脑组织MDA、SOD检测含量检测,运用TTC染色检测死亡率。

1.8 统计学分析 采用SPSS22.0软件包计算分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,各组大鼠脑组织对血清MDA、SOD含量、各组神经功能行为评分采用t检

验, 以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结 果

2.1 各组大鼠脑组织对血清MDA、SOD含量效果的影响

假手术组与模型组比较, 大鼠脑缺血再灌注损伤后脑组织 MDA 含量显著地降低($t=9.2476, P=0.0000$), 脑组织SOD显著地增高($t=21.5083, P=0.0000$); 各用药组与模型组比较, 阳性药华佗再造丸和复方血栓通高、中、低剂量组均能显著地降低MDA活性(分别 $t=3.8193、5.7638、4.9027、3.9261, P=0.0000$); 阳性药华佗再造丸和复方血栓通高、中剂量组均能显著地升高SOD活性(分别 $t=14.2716、16.0538、15.0472, P=0.0000$); 复方血栓通高剂量组升高 SOD 活性作用强于阳性药华佗再造丸组($t=7.4863, P=0.0000$), 见表1。

2.2 各组神经功能行为评分结果情况 缺血后各组动物均出现神经功能损害症状, 阳性药华佗再造丸和复方血栓通高、中、低剂量组神经功能缺损评分均明显的高于假手术组(分别 $t=3.1728、6.4251、5.0413、3.9805, P=0.0000$); 复方血栓通高剂量组神经功能缺损评分显著地低于模型组($t=6.9072, P=0.0000$), 见表2。

3 讨 论

表1 各组大鼠脑组织对血清MDA、SOD含量效果的影响 $[n(\bar{x} \pm s)]$

组别	n	MDA (nmol/mg)	SOD (U/mg)
模型组	10	4.6362 $\pm$ 0.1954	74.662/8 $\pm$ 1.1263
假手术组	10	1.8322 $\pm$ 0.0167*	95.5871 $\pm$ 2.7476*
复方血栓通高剂量组	10	1.7869 $\pm$ 0.0252*	117.6331 $\pm$ 0.3241*
复方血栓通中剂量组	10	2.1113 $\pm$ 0.0179*	114.3358 $\pm$ 0.2529*
复方血栓通低剂量组	10	2.6781 $\pm$ 0.1261*	99.3324 $\pm$ 0.1692*
阳性药华佗再造丸组	10	2.4467 $\pm$ 0.0295*	109.7655 $\pm$ 0.2156*

注: 与模型组比较* $P < 0.05$

表2 各组神经功能行为评分结果情况 $[n(\bar{x} \pm s)]$

组别	n	神经功能评分 (分)
模型组	10	2.796 $\pm$ 0.389
假手术组	10	0
复方血栓通高剂量组	10	1.017 $\pm$ 0.216*
复方血栓通中剂量组	10	1.039 $\pm$ 0.185*
复方血栓通低剂量组	10	1.049 $\pm$ 0.349*
阳性药华佗再造丸组	10	1.051 $\pm$ 0.403.

脑缺血性疾病具有高发病率、高致残率及高死亡率特点, 缺血性脑损伤是多种因素、多种机制共同参与的级联反应过程, 及时恢复缺血区的血流再灌注为该类疾病的首要治疗原则。兴奋性氨基酸毒性、钙超载、自由基反应(在激发缺血性神经元损伤所致的迟发性神经元死亡中起关键作用)、炎症和细胞凋亡将会引起缺血性脑损伤的重要环节, 炎症反应在脑缺血再灌注后所导致地脑组织损伤过程中扮演重要角色, 脑缺血再灌注损伤(Cerebral ischemia-reperfusion injury)是脑缺血后的血流恢复在脑缺血损伤的基础上并导致病人的二次损伤^[9-10]。氧化应激是缺血性脑中风极其重要的病理机制之一, 通过氧化应激损伤细胞大分子, 氧参与的代谢往往将会发生一些对细胞有毒害作用的副产物——氧自由基(Oxygen free radical, OFR), 活性氧所引发的连锁反应是脑组织缺血再灌注损伤的核心病理环节, 过量的氧自由基通过诸多环节能够容易引起脑组织神经元坏死或凋亡。SOD是体内主要的抗氧化酶之一, 是体内重要的OFR清除剂, 可以有效地消除过剩氧自由基及其衍生物, 这样就能够显著地保护细胞避免损伤, 在保护细胞免受OFR的毒害中发挥着显著地价值作用, 它能催化超氧阴离子自由基发生歧化反应^[11-12]。

随着年龄的增长, 体内SOD的含量呈下降趋势, 导致膜结构和功能的破坏, 而相对来说, 增长的自由基会破坏机体的平衡, 使机体产生各种疾病。脑缺血时病人的体内自由基的产生和清除自由基的动态平衡状态则将会严重的遭到破坏, 从而就会导致SOD减少。作为自由基清除剂的SOD, 具有阻断自由基的毒性作用, 在脑缺血、缺氧时的抗氧化作用非常显著, 因此保持体内适量的SOD是维护健康和延缓衰老的有效途径, 所以亦日益受到人们的重视^[13-14]。MDA是氧自由基与生物膜多聚不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的终产物之一, 其产生量与OFR的量相平行, MDA含量能够完全的反映机体脂质过氧化的速度和血管损伤程度以及氧自由基存在的水平^[15]。因此, 同时可以测定最能够反映氧自由基的水平, 而且还间接反映出细胞损伤的程度。复方血栓通

胶囊由三七(化瘀活血之功效,改善血管微循环,能够使血液的黏稠度降低,扩张血管,抑制动脉粥样硬化形成,降低血脂和胆固醇水平)、黄芪(补中益气活血,提高机体的免疫力,降低血液的黏度)、丹参(通过化瘀,加速血液流动,保护脑缺血和抗氧化的作用)、玄参(去火滋阴、清热解毒,扩张血管和加速血液循环而减轻炎症反应)主要成分组成,具有抗炎、降血糖等作用,因此,复方血栓通能够有效的减少自由基的产生,减轻脂质过氧化反应,表现出良好的抗氧化损伤作用^[16-17]。

本研究结果表明,假手术组与模型组比较,大鼠脑缺血再灌注损伤后脑组织MDA含量显著地降低($t=9.2476$, $P=0.0000$),脑组织SOD显著地增高($t=21.5083$, $P=0.0000$);各用药组与模型组比较,阳性药华佗再造丸和复方血栓通高、中、低剂量组均能显著地降低MDA活性(分别 $t=3.8193$ 、 5.7638 、 4.9027 、 3.9261 , $P=0.0000$);阳性药华佗再造丸和复方血栓通高、中剂量组均能显著地升高SOD活性(分别 $t=14.2716$ 、 16.0538 、 15.0472 , $P=0.0000$);复方血栓通高剂量组升高SOD活性作用强于阳性药华佗再造丸组($t=7.4863$, $P=0.0000$),缺血后各组动物均出现神经功能损害症状,阳性药华佗再造丸和复方血栓通高、中、低剂量组神经功能缺损评分均明显的高于假手术组(分别 $t=3.1728$ 、 6.4251 、 5.0413 、 3.9805 , $P=0.0000$);复方血栓通高剂量组神经功能缺损评分显著地低于模型组($t=6.9072$, $P=0.0000$)。综上所述,复方血栓通具有保护大鼠脑缺血再灌注损伤的作用,可以显著地增加脑组织SOD含量的活性,并有效的降低MDA水平,减轻了脑缺血再灌注损伤,更好的发挥其对机体的保护作用。

参考文献

- [1] 王建伟,郭蓉娟,王嘉麟,等.中风病气虚血瘀证用药规律文献研究[J].中医杂志,2018,59(1):69-73.
- [2] 邴秀阳,孙善美,宋鲁成.中风从五脏论治[J].山东中医药大学学报,2018,42(4):300-302.
- [3] 丁元庆.基于心主血脉理论对中风发病机制的探讨[J].山东中医杂志,2018,37(1):1-3.
- [4] 杜军辉,李蓉,刘宋芳,等.复方血栓通治疗糖尿病视网膜病变对患者氧化应激水平与视网膜中央动脉血流的影响[J].世界中西医结合杂志,2018,13(2):221-224.
- [5] 杨玉玲.复方血栓通注射液联合低分子肝素钠治疗脑梗死的疗效分析[J].中国合理用药探索,2018,15(2):33-35.
- [6] 郑晓影,赵淑敏,陈萌,等.局灶性脑缺血再灌注模型大鼠脑SOD和MDA的变化[J].承德医学院学报,2009,26(1):12-14.
- [7] Enrique Z L, Philip P W, Sara C, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.
- [8] 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.
- [9] 闫安,谢云亮.当归多糖对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织氧化应激水平及炎症因子表达的影响[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(2):123-127.
- [10] 张翠香,刘建勋,李丹,等.冠脉通片对大鼠脑缺血再灌注模型神经行为、小胶质细胞活化和SOD与MDA表达的影响[J].中华中医药杂志(原中国医药学报),2015,30(2):401-404.
- [11] 孙庆燕,张娟,殷婧婧.血清超氧化物歧化酶与同型半胱氨酸水平与心血管疾病的相关性探讨[J].中国医药指南,2018,16(4):78-79.
- [12] WANG L, LIU H, ZHANG L, et al. Neuroprotection of dexmedetomidine against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats: involved in inhibition of NF- κ B and inflammation response[J]. Biomol Ther (Seoul), 2017, 25(4):383-389.
- [13] HE Y, XIAO Y, YANG X, et al. SIR T6 inhibits TNF- α -induced inflammation of vascular adventitial fibroblasts through ROS and Akt signaling pathway[J]. Exp Cell Res, 2017, 357(1):88-97.
- [14] 董亮,何永志,王远亮,等.超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展[J].中国农业科技导报,2013,15(5):53-58.
- [15] 宫健伟,叶蕾,张秀丽,等.地黄饮子对脑缺血再灌注模型大鼠血清、脑组织SOD, CAT和GSH-Px及MDA的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(14):247-250.
- [16] 李军,申华,杨洁,等.复方血栓通胶囊联合胞二磷胆碱治疗青光眼视神经萎缩的疗效观察[J].临床和实验医学杂志,2018,17(5):506-509.
- [17] 马京平.复方血栓通胶囊联合羟苯磺酸钙治疗早期糖尿病性视网膜病变[J].国际眼科杂志,2018,18(2):305-308.

【收稿日期】 2018-11-24