

绞股蓝总皂苷对光化学诱导大鼠大脑中动脉栓塞性脑缺血损伤的保护作用*

朱炳阳 唐小卿 黄红林 陈剑雄 廖端芳 余 麟(衡阳 421001 衡阳医学院心肺药理研究室)

摘要 目的: 研究绞股蓝总皂苷(Gyp)对栓塞性脑缺血损伤的保护作用。方法:应用光化学诱导大鼠大脑中动脉栓塞模型,观察 Gyp 预防性给药后脑组织超氧化物歧化酶(SOD)活力,脂质过氧化产物 TBARS,钠、钾、钙和水的含量以及缺血区范围的变化。结果:Gyp 能缩小光化学反应后的缺血区面积,降低 TBARS 含量,提高 SOD 活性,降低缺血区 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 H_2O 含量,升高 K^+ 水平。结论:Gyp 对栓塞性脑缺血损伤具有保护作用。

关键词 绞股蓝总皂苷;光化学反应;脑缺血性损害

* 湖南省自然科学基金资助课题,NO:9420933;湖南省教委资助课题,NO:1191206

Protective effect of gypenosides on brain ischemia induced by photochemical occlusion of middle cerebral artery in rats

Zhu Bingyang (Zhu BY) , Tang Xiaoqing (Tang XQ) , Huang Honglin (Huang HL) , et al (Division of Cardiopulmonary Pharmacology , Hengyang Medical College , Hengyang 421001)

ABSTRACT **OBJECTIVE:**To study the protective effects of gypenosides(Gyp) on brain ischemia . **METHOD:**The middle cerebral arteries occlusion(MCAO) induced by photochemical reaction in rats were used .The changes of the contents of Na^+ , Ca^{2+} , H_2O and TBARS ,SOD activity and the infarct areas were monitored . **RESULTS:**Gyp reduced the infarct areas induced by photochemical reaction and decreased the contents of Na^+ , Ca^{2+} , H_2O and TBARS significantly ,but the content of K^+ and SOD activity were increased . **CONCLUSION:**Gyp inhibited MCAO induced brain ischemia and brain edema . **KEY WORDS** gypenosides ,photochemical reaction ,cerebral ischemia

脑栓塞、脑卒中是危害人类健康的常见病,临床上脑栓塞多发生在大脑动脉某一分枝,尤以大脑中动脉最常见。我们曾在血栓诱导剂诱导大鼠栓塞性脑缺血模型上,探讨了绞股蓝总皂苷(gypenosides ,Gyp) 的抗血栓形成的作用,对栓塞性脑缺血具有一定的保护作用^[1]。我们新近又建立了光化学诱导大鼠大脑中动脉脑栓塞模型^[2],这种模型具有脑栓塞定位准确,易把握栓塞程度的优点。本研究应用此模型,探讨 Gyp 的抗脑缺血作用。

1 材料和方法

1.1 实验试剂、药品与器材

绞股蓝总皂苷由湖南省医药工业研究所提供。三苯基四氮唑(TTC,瑞士 Fluka 公司产品) 配成2%的生理盐水溶液,避光保存。玫瑰红 B(Sigma 公司产品) 生理盐水溶解,浓度为0.3%,避光保存。脑血栓形成仪(本室自制) 。

1.2 实验动物

选用健康 Wistar 大鼠,雌雄不拘,体重(250 ± 50) g ,随机分组,每组6只。

1.3 实验方法与分组

1.3.1 光化学诱导大鼠大脑中动脉栓塞模型^[2] 参照 Coyloc 法^[2],并加以改进。动物麻醉后手术暴露左侧颞弓缘与颞骨融合处,嵌一中心含一直径为0.5cm窗孔的铝片,以便光束透照于颅骨表面。大鼠左侧立体定位光照大脑中动脉30min后移至饲养笼喂养,6h后处死取脑组织。

1.3.2 实验分组 ①单纯梗塞组:舌下静脉注射玫瑰红 B 30mg/kg 体重;②假手术组:舌下静脉注射等量生理盐水。以上均循环5min后,用本室自制脑血栓形成仪照射颅骨表面30min;③Gyp组:分两个剂量组(100mg·kg⁻¹/d 和 200mg·kg⁻¹/d) 于实验前4天每天腹腔注射 Gyp,然后依单纯梗塞组行手术处理和光照。

1.3.3 梗塞区与对侧区的确定 光照处理后脑组织用 TTC 染色,正常组织呈鲜红色,完全梗塞区不着色。完全梗塞区的右侧半球对应区为对侧区。

1.4 检测指标

1.4.1 脑组织梗塞范围的计算 脑组织 TTC 染色后,计不着色区面积为梗塞区面积,其范围用占同侧半球面积百分比

表示。

1.4.2 脑组织中 TBARS 含量及 SOD 活力测定 光化学反应6h后,取梗塞区脑组织制成10%匀浆,按硫代巴比妥酸法^[4]测定脂质过氧化产物 TBARS 含量(nmol·g⁻¹);采用邻苯三酚法^[5]测定 SOD 活力(U·mg⁻¹) 。

1.4.3 脑组织中 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 H_2O 含量测定 梗塞区脑组织称其湿重后烘干至恒重,按水%=(湿重-干重)/湿重×100%计算水含量。用浓硝酸湿片法消化脑组织干样,原子吸收光谱法测定 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 含量(umol·g⁻¹) 。

1.5 统计处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,t 检验。

2 结果

2.1 Gyp 对脑组织梗塞范围的影响

光照6h后,假手术组无梗塞,其它各组均有不同程度的梗塞。单纯梗塞组的梗塞区面积约占同侧半球面积(20.9 ± 4.3) %(n = 6) ,Gyp 能缩小梗塞面积(见表1) 。单纯梗塞组与 Gyp 组的对侧区均未见梗塞。

2.2 Gyp 对脑缺血 TBARS 含量及 SOD 活力变化的影响

光学化学反应后6h,梗塞区脑组织脂质过氧化产物 TBARS 含量显著增高,同时伴随着 SOD 活力的明显降低。Gyp 能减少 TBARS 含量,提高 SOD 活性(见表1) 。

表1 Gyp 对光化学诱导大鼠中动脉梗塞后梗塞区面积及其 SOD 活性与 TBARS 含量的影响/ n = 6

组别	梗塞面积/ %	SOD/ U·mg ⁻¹	TBARS/ nmol·g ⁻¹
假手术组	0	0.67 ± 0.08	20.4 ± 3.9
单纯梗塞组	20.9 ± 4.3	0.35 ± 0.19 ^{*1}	56.0 ± 4.4 ^{*2}
Gyp 100mg·kg ⁻¹	10.5 ± 2.9 ^{*2}	0.68 ± 0.14 ^{*2}	37.5 ± 8.1 ^{*2}
Gyp 200mg·kg ⁻¹	8.7 ± 2.9 ^{*2}	0.72 ± 0.13 ^{*2}	23.5 ± 8.1 ^{*2}

注:与假手术组比较,*¹ P < 0.01 ;与单纯梗塞组比较,*² P < 0.01

2.3 脑缺血组织中 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 H_2O 含量变化

光化学反应后6h,梗塞区脑组织中水含量明显增高,脑组织明显水肿,电解质紊乱, Na^+ 明显增高, K^+ 降低, Ca^{2+} 含量显著升高。Gyp 降低脑组织水含量,降低 Na^+ 、 Ca^{2+} ,升高 K^+ 水平(见表2) 。

表2 Gyp 对光化学诱导大鼠中动脉栓塞后梗塞区脑组织中 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 及 H_2O 含量的变化/ $n=6$

组 别	$\text{H}_2\text{O}/\%$	$\text{Na}^+/\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	$\text{K}^+/\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	$\text{Ca}^{2+}/\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$
假手术组	79.09 $\pm$ 0.55	490.7 $\pm$ 181.3	343.8 $\pm$ 32.2	81.1 $\pm$ 12.3
单纯梗塞组	90.17 $\pm$ 2.61 ^{*1}	734.8 $\pm$ 117.8 ^{*1}	254.4 $\pm$ 52.3 ^{*1}	183.3 $\pm$ 35.0 ^{*1}
Gyp 100mg $\cdot\text{kg}^{-1}$	86.10 $\pm$ 1.61 ^{*2}	437.0 $\pm$ 78.3 ^{*2}	477.7 $\pm$ 80.5	52.9 $\pm$ 16.5 ^{*2}
Gyp 200mg $\cdot\text{kg}^{-1}$	86.47 $\pm$ 1.25 ^{*2}	318.3 $\pm$ 26.1 ^{*2}	453.9 $\pm$ 71.4 ^{*2}	46.0 $\pm$ 11.4 ^{*2}

注:与假手术组比较,^{*1} $P<0.01$;与单纯梗塞组比较,^{*2} $P<0.01$

3 讨 论

在所有组织细胞生物膜中,脑组织含不饱和脂肪酸最多,最容易发生脂质过氧化反应,对缺血缺氧最敏感。因而普遍认为自由基造成的脂质过氧化是缺血性脑组织损伤的重要发病机制^[6]。本实验发现大鼠光化学诱导大脑中动脉栓塞后 6h,脑组织 TBARS 含量明显增多,SOD 等自由基清除酶活性降低。

实验结果显示光化学反应 6h 后,脑组织 Ca^{2+} 含量显著增高,脑组织出现钙超载。 Ca^{2+} 超载在脑缺血损伤的病理生理过程起着重要的作用,是神经细胞死亡的“最后共同通路”^[7]。钙超载可干扰氧化磷酸化过程,抑制能量代谢,促使胞膜结构分解,破坏神经元骨架,还可激活血小板,形成微血栓,增加梗死范围。我们还发现在光化学反应 6h 后脑组织水含量显著增加,并随缺血时间延长而加重。这可能与脑缺血缺氧后,氧化磷酸化能力下降,ATP 合成减少,使 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 泵功能降低,从而导致 Na^+ 滞留, K^+ 内流减少,并造成电压依赖性 Ca^{2+} 通道开放,引起钙超载,钙超载又可使血管内皮细胞收缩而致血管源性脑水肿有关,其机制可能与 Ca^{2+} 超载致神经元损害的机制类似^[8]。我们以前的实验显示,Gyp 能有效地抑制血栓诱导剂诱导的大鼠脑栓塞形成,降低栓塞性脑缺血所造成的脑血管通透性增加,对抗脑组织的脂质过氧化^[1]。此外,Gyp 还能对抗氧自由基所致脑基底动脉痉挛,并保护脑血管内皮依赖性舒张功能^[9]。本实验在定位更精确的光化学诱导大鼠大脑中动脉栓塞脑缺血模型上进一步证实 Gyp 能防止脑栓塞形成,减轻栓塞性脑缺血所造成的脑组

织损伤,尤其能减轻因缺血而引起的水、电解质紊乱,为临床应用 Gyp 防治脑栓塞、脑卒中提供了实验依据。

参考文献

- 1 廖端芳,鹿宁,陈剑雄,等.绞股蓝总皂苷的抗氧化损伤作用Ⅱ.对自由基损伤脑血管的影响.衡阳医学院学报,1993,21(3):239.
- 2 陈剑雄,曾恒,唐小卿,等.光化学诱导大鼠中动脉栓塞后脑组织中水、阳离子及脂质过氧化物含量的变化.衡阳医学院学报,1996,24(4):262.
- 3 Coyle P. Middle cerebral artery occlusion in the young rat. Stroke, 1982, 13(6): 855.
- 4 Ohkawa H, Ohishi N, Yagio K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Analyst Biochem, 1979, 2: 351.
- 5 Mardund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the antoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem, 1974, 47(3): 469.
- 6 Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. Stroke, 1990, 23: 1086.
- 7 吴卫平. 钙离子与脑缺血损害. 见蒲传强等主编. 脑血管病学. 北京:人民军医出版社, 1994: 111.
- 8 Akopov SE, Grigorion GS, Cabrielian ES. Cerebral blood flow and effects of cerebrospinal fluid on calcium transport in patients with cerebral infarction. Stroke, 1994, 25(3): 608.
- 9 陈剑雄,廖端芳,唐小卿,等.绞股蓝总皂苷对氧自由基所致脑血管痉挛的保护作用.中草药,1997,28(4):219.