

黄连解毒汤有效部位对动物脑缺血缺氧的保护作用

吴彦³, 孙建宁¹, 于绍坤¹, 石任兵² (1. 北京中医药大学中药药理系, 北京 100102; 2. 北京中医药大学中药化学系, 北京 100102; 3. 北京维健生物科技有限公司, 北京 100176)

摘要:目的 研究黄连解毒汤有效部位(HLJDTAF)对小鼠的抗缺氧作用及对多发脑梗死大鼠能量代谢的影响。方法 通过小鼠常压耐缺氧、小鼠亚硝酸钠中毒和断头试验, 观察黄连解毒汤有效部位连续灌胃给药 4d 对缺氧的保护作用, 同时观察该药对血细胞的影响; 采用大鼠多发性脑梗死模型观察 HLJDTAF 对模型大鼠脑组织乳酸(LA)、乳酸脱氢酶(LDH)、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$ ATP 酶的影响。结果 HLJDTAF 865, 433, 216 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可明显延长小鼠常压密闭状态下的存活时间(与对照组比较 $P < 0.05$); 216 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可明显延长小鼠亚硝酸钠中毒缺氧存活时间(与对照组比较 $P < 0.05$); HLJDTAF 865, 433, 216 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可明显延长正常小鼠断头张口喘气时间(与对照组比较 $P < 0.05$; $P < 0.01$), 433 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可提高小鼠血液中血红蛋白含量, 同时升高白细胞和淋巴细胞数量(与对照组比较 $P < 0.05$); HLJDTAF 610, 305 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组可显著降低多发性脑梗塞大鼠脑组织中 LA 含量, 提高 LDH 活性, 提高 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP 酶活性, 153 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 也可提高 LDH 与 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP 酶活性(与模型组比较 $P < 0.05$; $P < 0.01$)。结论 HLJDTAF 可提高小鼠耐缺氧能力, 同时改善多发脑梗死大鼠脑组织能量代谢障碍, 这可能是其脑保护作用的机制。

关键词: 多发性脑梗塞; 能量代谢; 缺氧

中图分类号: R743.3; R289

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2004)06-0451-04

The effect of Huanglian Jiedutang active fraction on energy metabolism of multiple cerebral infarction rats and on hypoxia mice

WU Yan³, SUN Jian-ning¹, YU Shao-kun¹, SHI Ren-bing² (1. Department of TCM Pharmacology, Beijing University of Chinese Medicine; 2. Department of TCM Chemistry, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 3. Beijing Vital Care Biotech Inc., Beijing 100176, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protection action of Huanglian Jiedutang active fraction(HLJDTAF) on the hypoxia mice and effect on energy metabolism of multiple cerebral infarction(MCI) rats. **METHOD** By the ways of oxygen lack in normal atmosphere, NaNO_2 poisoning and decapitation of mice, the effect of HLJDTAF on the hypoxia and hemocyte were observed; MCI vehicle was used to observe the effect of HLJDTAF on lactic acid(LA), lactic dehydrogenase(LDH), $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$ ATPase in encephalon. **RESULTS** HLJDTAF 865, 433, 216 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ could significantly prolong the living time of normal atmosphere, NaNO_2 poisoning and decapitation of mice ($P < 0.05$; $P < 0.01$ vs control), 433 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ could increase the ferrohemoglobin, leucocyte and lymphocyte in mice ($P < 0.05$ vs control). HLJDTAF 610, 305 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ could decrease the content of LA and increase the activity of LDH, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$ ATPase in MCI rats encephalon. **CONCLUSION** HLJDTAF has certain protective action for hypoxia mice and ameliorate the energy metabolism in MCI rats encephalon, which may be the mechanism of its cerebral protective effect.

KEY WORDS: multiple cerebral infarction(MCI); energy metabolism; hypoxia

黄连解毒汤源于唐·王焘《外台秘要》,由黄连、黄芩、黄柏和栀子组成,为清热解毒代表方。近年中日两国对黄连解毒汤煎剂及其提取物用于脑血管病的基础研究与临床报道较多^[1-3],均提示本方治疗缺血性脑血管病有良好前景。我们根据所建立的中药复方有效部位筛选富集模式与方法,运用大孔吸附树脂技术制备了黄连解毒汤治疗脑中风的部位(HLJDTAF),并对其药效药理进行了研究,前期工作表

明该有效部位对多种脑缺血损伤都有很好的保护作用,本实验拟从该有效部位对多发性脑梗塞大鼠能量代谢的影响及对缺氧小鼠的保护作用探讨其脑保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

黄连解毒汤有效部位(HLJDTAF),由北京中医药大学中药学院中药化学系提供,按处方配伍的生药粉碎后用水进

作者简介:吴彦,男,31岁,助理研究员,主要从事中药抗心脑血管疾病研究,电话:(010)88648630-812;E-mail:wu-yan2003@hotmail.com。现联系地址:北京市丰台区靛厂新村甲287号,北京维健生物科技有限公司,邮编:100039。

行提取,提取液过滤,滤液静置,高速离心得到沉淀(I);滤液上大孔吸附树脂,稀醇洗脱部分,真空浓缩干燥,得到固体(II)。将I与II进行均匀混合,即得有效部位,总得率7.6%。将所得有效部位的化学成分进行分离分析,其主要由生物碱类,黄酮类,环稀醚萜类成分所组成。利用分光光度法分别测定生物碱类,黄酮类,和环稀醚萜类成分的含量,用HPLC测定其指标性成分小檗碱,黄芩苷,栀子苷的含量。有效部位(群)的总含量高于55%,指标性成分(群)的总含量高于25%。给药前用0.5%CMC混悬。黄连解毒汤流浸膏(HLJDTE),由北京中医药大学中药学院中药化学系提供,组方:黄连9g,栀子9g,黄柏6g,黄芩6g,制备成每毫升相当于原药材1g的流浸膏;牛黄清心丸(NHQXW),同仁堂集团公司产品,批号:20021021;硫酸庆大霉素,烟台只楚药业有限公司产品,批号000208; α -氰基丙烯酸烷基酯(医用胶),北京瞬康医用胶有限公司产品;乳酸脱氢酶(LDH);乳酸(LA); $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATP 酶}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} \text{ATP 酶}$ 试剂盒均购自南京建成生物工程公司;亚硝酸钠,国产分析纯。

1.2 实验动物

SD大鼠,6~8月龄体重350~450g;合格证号:SCXK11-00-0008;ICR小鼠:18~22g,合格证号:SCXK(京)2002-0003,均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.3 实验仪器

CELLY-VER220型全自动血球计数仪,法国HYCEL产品;722型紫外分光光度计,上海第三分析仪器厂产品。

1.4 小鼠常压密闭性缺氧存活时间测定^[4]

实验动物随机分6组,即对照组,HLJDTAF 865 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;433 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;216 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;HLJDTD 6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;NHQXW2.4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。预先灌胃给药3d,1d剂量分上下午两次给与。对照给与等体积0.5%CMC。第4天上午给药后1h进行实验。将小鼠放入容量为250mL,底部备有钠石灰的缺氧瓶内,动物适应10min后,将瓶盖盖上,造成密闭性缺氧,记录动物死亡时间,从盖瓶盖到动物停止呼吸的持续时间作为缺氧的存活时间。

1.5 小鼠亚硝酸钠中毒缺氧存活时间测定^[5]

分组与给药同前。于末次灌胃后1h,各组小鼠均ip2%亚硝酸钠200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (0.1mL $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),并立即记录小鼠的存活时间。

1.6 小鼠急性脑缺血缺氧张口喘气时间测定^[6]及血象测定

分组与给药同前。于末次灌胃后1h,用大剪刀在耳下部快速断头,记录喘气时间。收集血液用全自动血球计数仪测定动物红细胞数量,血红蛋白含量,白细胞数量,淋巴细胞数量,中间细胞数量及粒细胞数量等指标。

1.7 同源血粉所致大鼠多发性脑梗死模型的制备及该模型脑匀浆LDH, LDH, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATP 酶}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} \text{ATP 酶}$ 测定

分组与给药:实验动物随机分7组:假手术组,模型对照

组;HLJDTAF大剂量610 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;305 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;153 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;HLJDTD 4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;NHQXW1.6 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。HLJDTAF研细后用0.5%CMC配制。动物给药2d,每日剂量分上下午两次给与,假手术组和模型组给与同体积CMC。第3天晨再给药一次后进行造模。

同源血块制备:在该批大鼠中取一只,颈总动脉放血,血液37度放置48h至完全干燥,将干燥血块置研钵中研细,过75目筛,所得干燥细小块备用,造模时用生理盐水配成3%混悬液。

多发性脑梗死模型造模:将大鼠水合氯醛麻醉,常规消毒后颈正中切口,分离暴露右侧颈总动脉,颈内动脉,颈外动脉,翼腭动脉。首先在颈外动脉与颈内动脉分枝处近端以无损伤动脉夹夹闭暂时阻断血流,然后以动脉夹阻断翼腭动脉。之后以动脉夹暂时夹闭颈总动脉,用1mL玻璃注射器吸取3%血块生理盐水混悬液0.5mL由颈总动脉穿刺缓慢注射使血块进入颈内动脉,抽出针头时在穿刺处涂抹少量医用胶堵住伤口,立即打开颈总动脉恢复血流供应使血块完全被冲入颈内动脉,确认颈总动脉和颈内动脉无出血后,打开颈外动脉和翼腭动脉恢复血流供应。逐层缝合肌肉与皮肤,腹腔注射庆大霉素。大鼠回笼饲养并与实验当晚和次日晨各给药一次。

取材:造模后次日末次给药后1h,将大鼠断头处死,于冰盘上迅速分离大鼠右侧脑,去除溴球与低位脑干,称重后,以生理盐水1:9在冰水浴中匀浆制成10%脑匀浆,每个标本分装几份后,低温冰箱冻存备用。

生化指标测定:取出匀浆化冻后4000r/min得到匀浆上清液,按照试剂盒说明书所示方法,采用发色底物法分别测定LDH活性,LD含量, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATP 酶}$ 和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} \text{ATP 酶}$ 活性。

2 结果

2.1 HLJDTAF对小鼠常压密闭性存活时间的影响

HLJDTAF 865, 433, 216 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 连续4d给药可明显延长小鼠常压密闭状态下的存活时间(与对照组比较 $P < 0.05$)。结果见表1。

2.2 HLJDTAF对小鼠亚硝酸钠中毒缺氧存活时间的影响

HLJDTAF 216 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 连续4d给药可明显延长小鼠亚硝酸钠中毒缺氧存活时间(与对照组比较 $P < 0.05$; $P < 0.01$)。结果见表1。

2.3 HLJDTAF对小鼠急性脑缺血缺氧张口喘气时间血象的影响

HLJDTAF 865, 433, 216 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 连续4d给药可明显延长正常小鼠的断头张口喘气时间(与对照组比较 $P < 0.05$; $P < 0.01$)。结果见表1。HLJDTAF 433 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 连续4d给药后小鼠血液中血红蛋白含量明显增高,同时白细胞和淋巴细胞数量也有所升高(与对照组比较 $P < 0.05$)。结果见表2。

表 1 HLJDTAF 对小鼠缺氧存活时间的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect of HLJDTAF on living time in hypoxia mice($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量 (mg•kg ⁻¹)	常压密闭缺氧存活时间 (min)	亚硝酸钠中毒缺氧存活 时间(min)	断头张口喘气时间 (s)
对照组	13	-	37.61 ±6.87	17.89 ±2.79	20.39 ±0.77
HLJDTAF	10	865	48.00 ±13.57 ¹⁾	22.40 ±10.30	21.25 ±0.75 ²⁾
	10	433	44.10 ±7.14 ¹⁾	19.68 ±4.14	22.86 ±4.11 ¹⁾
	10	216	48.10 ±11.06 ¹⁾	21.13 ±3.67 ¹⁾	21.58 ±0.79 ²⁾
	10	6000	46.30 ±10.62 ¹⁾	19.14 ±3.07	21.57 ±1.09 ²⁾
HLJDTD	10	6000	46.30 ±10.62 ¹⁾	19.14 ±3.07	21.57 ±1.09 ²⁾
NHQXW	10	2400	45.80 ±9.70 ¹⁾	20.73 ±2.53 ¹⁾	21.46 ±1.10 ¹⁾

注 :与对照组比 :¹⁾ *P* < 0.05 ,²⁾ *P* < 0.01

Note : ¹⁾ *P* < 0.05 ,²⁾ *P* < 0.01 compared with vehicle group

表 2 HLJDTAF 对小鼠血象的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of HLJDTAF on hemocyte in mice($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量 (mg•kg ⁻¹)	红细胞数 (1 × 10 ¹² •L ⁻¹)	血红蛋白 (g•L ⁻¹)	白细胞 (1 × 10 ⁹ •L ⁻¹)	淋巴细胞 (1 × 10 ⁹ •L ⁻¹)
对照组	13	-	3.62 ±0.47	122.67 ±10.72	3.73 ±2.86	2.93 ±1.63
HLJDTAF	12	865	3.84 ±0.46	129.55 ±7.47	6.41 ±4.65	4.18 ±2.53
	14	433	3.86 ±0.74	131.27 ±8.20 ¹⁾	6.14 ±2.66 ¹⁾	4.54 ±1.93 ¹⁾
	12	216	3.60 ±0.52	124.60 ±12.81	4.22 ±1.40	3.39 ±1.04
	14	6000	3.69 ±0.37	132.44 ±5.81 ²⁾	6.60 ±1.72 ¹⁾	5.00 ±0.80 ²⁾
HLJDTD	14	6000	3.69 ±0.37	132.44 ±5.81 ²⁾	6.60 ±1.72 ¹⁾	5.00 ±0.80 ²⁾
NHQXW	13	2400	4.32 ±0.72 ²⁾	123.39 ±13.12	7.83 ±2.77 ²⁾	5.69 ±1.21 ²⁾

注 :与对照组比 :¹⁾ *P* < 0.05 ,²⁾ *P* < 0.01

Note : ¹⁾ *P* < 0.05 ,²⁾ *P* < 0.01 compared with vehicle group

2.4 HLJDYAF 对多发性脑梗死大鼠脑匀浆 LA 含量、LDH 活性、Na⁺-K⁺ATP 酶活性及 Ca²⁺-Mg²⁺ATP 酶活性的影响。

造模后 24h,模型大鼠脑组织中 LA 含量明显增加,LDH,Na⁺-K⁺ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺ATP 酶活性明显降低(与对照组比 *P* < 0.05 ; *P* < 0.01),显示能量代谢出现异常。

表 3 HLJDTAF 对多发性脑梗死大鼠脑匀浆 LD 含量、LDH 活性、Na⁺-K⁺ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺ATP 酶活性影响的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effect of HLJDTAF on content of LA, activity of LDH, Na⁺-K⁺ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺ATPase in MCI rats encephalon($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	剂量 (mg•kg ⁻¹)	LD 含量 (mmol•g(pro) ⁻¹)	LDH 活性 (μ•g(pro) ⁻¹)	Na ⁺ -K ⁺ ATP (mmolPi•mg(pro) ⁻¹ •h ⁻¹)	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ ATP (mmolPi•mg(pro) ⁻¹ •h ⁻¹)
假手术	10	-	0.31 ±0.05 ¹⁾	1.89 ±0.23 ¹⁾	1.07 ±0.22 ²⁾	1.35 ±0.29 ²⁾
模型	9	-	0.38 ±0.05	1.70 ±0.12	0.66 ±0.25	0.85 ±0.27
HLJDTAF	10	610	0.31 ±0.06 ¹⁾	1.86 ±0.18 ¹⁾	0.99 ±0.37 ¹⁾	0.98 ±0.33
	9	305	0.29 ±0.04 ²⁾	1.92 ±0.27 ¹⁾	0.92 ±0.24 ¹⁾	0.80 ±0.25
	9	153	0.36 ±0.08 ¹⁾	1.99 ±0.32 ¹⁾	1.04 ±0.29 ²⁾	0.94 ±0.27
	9	4000	0.40 ±0.19	1.80 ±0.35	0.98 ±0.36 ¹⁾	0.92 ±0.21
HLJDTD	9	4000	0.40 ±0.19	1.80 ±0.35	0.98 ±0.36 ¹⁾	0.92 ±0.21
NHQXW	10	1600	0.34 ±0.03	1.85 ±0.15 ¹⁾	0.96 ±0.36	0.85 ±0.37

3 讨论

脑缺血损伤时因为血流供应的减少而出现供氧减少而出现明显缺氧。缺氧对机体是一种劣性刺激,影响机体的氧化功能,最终导致机体的脑等重要器官缺氧,引起氧供能力不足而死亡。小鼠在密闭容器中受缺氧因素损害,主要反应在心和脑缺氧。由于常压耐缺氧为非特异性缺氧,实验结果显示 HLJDTAF 显著地延长了小鼠的存活时间,说明 HLJDTAF 对心脑缺氧缺血有改善作用。在断头实验中,脑血液供应中断,但脑中原有的血和营养物质尚能使脑功能维持一段时间,表现在小鼠规律地喘气,而实验数据反映出

HLJDTAF 610,305 mg•kg⁻¹ 组可显著降低多发性脑梗塞大鼠脑组织中 LA 含量,提高 LDH 活性,提高 Na⁺-K⁺ATP 酶活性;153 mg•kg⁻¹ 也可提高 LDH 与 Na⁺-K⁺ATP 酶活性(与模型组比较 *P* < 0.05 ; *P* < 0.01)。但 HLJDTAF 各剂量组对 Ca²⁺-Mg²⁺ATP 酶活性无明显影响。结果见表 3。

HLJDTAF 能明显延长小鼠的喘气时间,说明其能减少脑耗能耗氧。亚硝酸钠为一种氧化剂,进入体内可以使血红蛋白中的二价铁氧化成三价铁,丧失携带氧的能力,使组织缺氧^[6],HLJDTAF 能一定程度延长中毒后小鼠存活时间。说明该药在血红蛋白携氧能力下降的情况下仍可以提高缺氧的耐受力。HLJDTAF 对常压缺氧,亚硝酸盐中毒和急性脑缺血缺氧均有明显的拮抗作用,提示该药可能具有提高机体的血氧利用率,降低机体的耗氧量,增加动物血管动静脉血氧量,从而提高组织利用氧的能力,促进对动物心脑等重要器官的供氧需求。减少因缺氧造成的氧供能力不足所致的

动物死亡,这对机体是一种有益的应激效应,此种效应可有效的降低组织细胞的氧化过程。另外,通过对小鼠外周血象的观察发现:HLJDTAF能提高血液中血红蛋白含量,并使白细胞数、淋巴细胞数有所增加。因此,HLJDTAF耐缺氧作用可能与药物能提高机体血氧利用率、增加心脑血管血流量提高血供、改善细胞代谢、促进免疫,从而改善机体缺氧状态有关。至于其具体的药效机制,有待深入研究。

脑缺血后最早受影响的是能量代谢耗竭。脑内ATP的贮存是有限的,一旦血流供应中止,5~7 min后ATP贮库耗竭,脑组织神经细胞不能进行主动过程(如转运、合成等)^[7]。本研究结果表明,在多发性脑梗死后24h后,脑组织 Na^+ - K^+ ATP酶, Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP酶活性均降低,说明缺血24h后,脑组织能量代谢障碍,细胞的主动转运功能受抑。HLJDTAF防止缺血24h后脑组织 Na^+ - K^+ ATP酶活性的降低,但对 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATP酶无明显影响。脑缺血、缺氧时,细胞无氧酵解增强,产生大量的乳酸。本研究结果表明,在脑缺血24h后,脑匀浆LA含量显著增加,而LDH活性显著降低。HLJDTAF可明显抑制这种损伤型变化。因此HLJDTAF对缺血后脑组织的能量代谢具有一定的改善作用。由此推测这可能是HLJDTAF抗脑缺血损伤的作用机

制之一。

综上所述,HLJDTAF的脑保护作用可能与其通过不同渠道改善机体脑组织利用氧的能力,改善缺氧状态及对脑缺血损伤后能量代谢状态的纠正有关。

参考文献

- [1] 陈光亮,张秀荣,王钦茂.黄连解毒汤药理研究进展[J]. 2001,20(5):67.
- [2] 张国华,马建兵.黄连解毒汤药理研究进展[J]. 浙江中医杂志,1999;(1):39.
- [3] 泉山隆男.黄连解毒汤胶囊治疗脑中风后遗症的效果[J]. 日本医学介绍,1997;18(2):90.
- [4] 徐叔云,卡如谦,陈修.药理实验方法学[M]:第2版.北京:人民卫生出版社,1994:103.
- [5] 李仪奎主编.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,1991,243:155.
- [6] 金惠铭.病理生理学[M].第5版.北京:人民卫生出版社,2000:81.
- [7] Recinska M, Silver I A3. ATP and brain function [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1989, 9:25.