

阿魏酸对小鼠脑缺血再灌注损伤及大鼠血液流变性的影响

姜科声¹, 赵飞², 阮琴¹, 胡燕月¹, 陈勤¹, 余袁龙¹ (1. 浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004; 2. 浙江大学生命科学院, 杭州 310027)

摘要: **目的** 观察阿魏酸对小鼠脑缺血再灌注损伤、大鼠血液流变性的影响。 **方法** 用结扎双侧颈总动脉法, 造成小鼠脑缺血再灌注模型; 观察阿魏酸 ($0.8, 1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 对小鼠全脑缺血 30min 及再灌注 60min 后超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性、MDA 含量的影响。大鼠皮下注射肾上腺素 ($0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 共 2 次, 间隔 4h, 在第一次注射后 2h 将大鼠浸入 4℃ 冰水 5min, 造成血瘀模型, 观察阿魏酸 ($50 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 对血黏度的影响。 **结果** 阿魏酸 ($0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 可显著提高脑组织 LDH 活性、可明显降低 MDA 含量、可显著提高 SOD 活性; 阿魏酸 ($1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 可显著降低 MDA/SOD 比值; 对大鼠血黏度无明显影响。 **结论** 预防性应用阿魏酸对小鼠脑缺血再灌注损伤有一定程度的保护作用, 对大鼠血液流变性无明显影响。

关键词: 阿魏酸; 脑缺血再灌注; 乳酸脱氢酶; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 血黏度

中图分类号: R965.3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)03-0185-04

The effects of ferulic acid on cerebral ischemia reperfusion damage in mice and blood rheometric test in rats

基金项目: 浙江省教育厅项目 (20010073)

作者简介: 姜科声 (1964 -), 男, 浙江江山人, 实验师, 从事生理学、药理学实验教学与研究。

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effects of ferulic acid (FA) on cerebral ischemia reperfusion injury in mice and blood rheometric test in rats. **METHODS** Cerebral ischemia-reperfusion pattern of the mice were made by clipping bilateral common carotid arteries for 30 minutes, but not in the sham operation group. After 1 hour's reperfusion, the mice were killed. The activity of superoxide dismutase (SOD) and lactic dehydrogenase (LDH) and content change of malondialdehyde (MDA) in brain tissue were measured. The blood stasis model of rats were made by hypodermic injecting adrenin, then blood viscosity of rats were measured. **RESULTS** Mice treated with FA ($0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) had obviously higher LDH activity, lower MDA content and higher SOD activity in brain tissue. The blood viscosity was not change obviously in rats treated with FA. **CONCLUSION** The preventive administration of FA has an apparent protection against cerebral ischemia reperfusion injury in mice, but has not apparent effects on blood rheometric test in rats.

KEY WORDS: ferulic acid (FA); cerebral ischemia reperfusion; LDH; SOD; MDA; blood viscosity

阿魏酸(ferulic acid)是中药当归、川芎等的有效成分之一,具有改善血液循环、抗凝血并能抑制血小板聚集,有明显的抗血栓作用;抑制巨噬细胞活化、抑制花生四烯酸(AA)代谢、拮抗组胺、降低血管通透性、抗氧化和清除自由基等广泛药理作用。同时还有抗菌、抗炎、镇痛、保肝、调节内分泌、改善微循环和抗疲劳等功能^[1-8]。阿魏酸钠不仅对急性肝损伤有保护作用,而且阿魏酸钠在体内有抗肝纤维化作用,可望用于肝纤维化的防治^[9]。本实验研究阿魏酸对小鼠脑缺血再灌注损伤及大鼠血液流变性的影响,以期阿魏酸治疗心、脑血管疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

阿魏酸,上海试剂一厂,批号 2002-06-01。戊巴比妥钠(25g/瓶),上海行知化工厂,批号 921019。SOD, LDH 和考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒,南京建成生物工程研究所提供。肾上腺素, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 天津金耀氨基酸有限公司。肝素钠, 中国医药上海化学试剂公司, 1 g/瓶 。其余试剂皆为国产分析纯。

实验动物, ICR 小鼠, 雌雄各半, 体重 $28 \sim 30 \text{ g}$; SD 大鼠, 雌雄各半, 体重 $(300 \pm 50) \text{ g}$, 浙江省实验动物中心提供。

PRECIL LB5-N6B 型血液黏度计、LB5-F200B 型微量速测血浆黏度计; 北京普利生仪器有限公司。SYSMEX KX-21 三分类血细胞分析仪; 厂商为 SYSMEX(日本)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脑缺血再灌注模型 取 24 只 ICR 小鼠随机分为 4 组, 两给药组分别灌胃阿魏酸 $0.8, 1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 阿魏酸用 0.5% CMC 悬浮, 使灌胃体积为 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 对照组及假手术组灌服等量生理盐水, 连续 7d。末次给药 1h 后, 各组动物除假手术组外, 均按文献方法^[10]稍加改良建立脑缺血再灌注模型。用 20% 乌拉坦按 $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量腹腔注射麻醉动物, 颈部正中切口, 用玻棒小心分离迷走神经, 用动脉夹夹闭双侧颈总动脉 30min, 放开动脉夹恢复脑供血, 再灌注 60min 后快速断头开颅取脑, 于 -4°C 生理盐水中洗净血渍,

用吸水纸吸干后投入液氮速冻, -75°C 冰箱保存待测。

1.2.2 脑组织 LDH, SOD 活性及 MDA 含量的测定 分离并称取左侧大脑 0.14g, 按重量体积比 1:10 ($1 \text{ g}: 10 \text{ mL}$) 用 4°C 生理盐水配制成 10% 脑组织匀浆。再按 1:9 用 4°C 生理盐水稀释成 1% 脑组织匀浆, 3000 r/min 离心 10min。SOD, LDH 活性和蛋白含量用试剂盒测定 (1% 匀浆); MDA 含量用 TBA 比色法测定 (10% 匀浆)。

1.2.3 血液流变性试验 SD 大鼠 40 只, 随机分成 4 组, 每组 10 只, 雌雄各半, 各组动物编号称重。①为空白对照组, ②为血瘀模型组, ③为阿魏酸低剂量组, ④为阿魏酸高剂量组。①②两组每天用 0.5% CMC 灌胃 ($5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 连续 7d。阿魏酸低剂量组 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和高剂量组 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 用 0.5% CMC 悬浮, 使灌胃体积为 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 连续 7d^[11]。于第 7 天除空白组外, 其余各组均造模, 即皮下注射肾上腺素 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 共 2 次, 间隔 4h, 在第一次注射后 2h 将大鼠浸入 4°C 冰水 5min, 处置后禁食, 自由饮水^[12-13]。第 8 天所有动物眼眶和心脏取血 2mL, 取 1mL 用肝素抗凝, 分别测其高切变率 (230 s^{-1})、中切变率 (46 s^{-1})、低切变率 (5.78 s^{-1}) 下的全血黏度; 取肝素抗凝血液 1mL 以 $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10min, 取上层血浆, 测其 120 s^{-1} 切变率下的血浆黏度; 0.3mL 用 EDTA 抗凝, 进行血常规、血红蛋白的测定及血小板的黏附试验^[14-17]。

1.2.4 统计学处理 全部数据用均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 阿魏酸对小鼠脑组织 LDH 和 SOD 活性及 MDA 含量的影响

缺血组与假手术组比较, 缺血 30min 再灌注 1h, 小鼠脑组织中 LDH 活性下降, 但无显著差异。小鼠脑组织中 SOD 活性显著下降, MDA 含量无显著差异, MDA/SOD 比值显著升高。阿魏酸 $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 极显著提高缺血小鼠脑组织中的 LDH 活性, 极显著提高缺血小鼠脑组织中的 SOD 活性, 显著降低缺血小鼠脑组织中的 MDA 含量, 极显著降低缺血小鼠

脑组织中的MDA/SOD比值。阿魏酸1.6g·kg⁻¹显著降低缺血小鼠脑组织中的MDA/SOD比值。结果见表1,表2。

表1 阿魏酸对脑缺血再灌注小鼠脑组织中LDH活性的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of FA on LDH activity of brain tissue in cerebral ischemia reperfusion mice($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	动物数 (只)	LDH (U·mg Prot ⁻¹)
假手术组		6	107.8±5.4
模型组		6	99.7±8.3
阿魏酸	0.8	6	118.0±1.7**
阿魏酸	1.6	6	103.1±11.7

注:与模型组比较,** $P<0.01$

Note:compared with the model,** $P<0.01$

表3 阿魏酸对大鼠全血黏度和血浆黏度的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of FA on blood viscosity and the plasma viscosity in rats($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/kg)	全血黏度(mPa·s)			血浆黏度 (mPa·s)
		低切	中切	高切	
对照组		18.18±5.58	8.24±1.68	5.50±0.84	1.24±0.09
模型组		31.1±10.84**	12.18±2.71**	8.18±1.83**	1.53±0.09**
阿魏酸	50	26.63±5.50*	10.64±1.84*	7.59±1.20**	1.49±0.13**
阿魏酸	200	29.50±6.71*	10.50±1.11**	7.61±0.60**	1.54±0.07**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note:compared with the control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

由表3说明造模对照组和阿魏酸组的血黏度和血浆黏度跟空白对照组比较有显著差异,而造模对照组的血黏度和血浆黏度与阿魏酸组比较差异不显著。

阿魏酸对大鼠全血还原黏度,大鼠红细胞刚性指数和红细胞聚集指数及红细胞变形指数均无明显影响,表略。

3 讨论

随着对脑缺血再灌注损伤的研究不断深入,积极寻找能有效地治疗缺血性脑血管疾病的药物已成为目前临床亟待解决的问题。抗氧化药物治疗脑缺血尤其是脑缺血再灌注损伤的疗效,是目前国内外均一致认同、肯定的。已有证明,川芎具有清除自由基、抗脂质过氧化的作用。

大量实验资料证明,氧自由基与脑缺血再灌注损伤有关。自由基的损伤机制系通过作用于细胞膜上不饱和脂肪酸及细胞内各种酶,使细胞膜发生脂质过氧化反应,使质膜破坏和功能障碍。本实验结果显示,对照组小鼠脑组织MDA较假手术组差异不明显,SOD活性显著下降,而MDA/SOD比值对照组明显高于假手术组。可以认为,脑缺血再灌注过程中,小鼠自由基清除酶活性降低,消除自由基的防御功能减弱,使自由基与清除自由基酶之间的平衡失调,脂质过氧化引起的损伤加重,将使脑组织更易受到自由基的损伤。而阿魏酸能够降低脑组织MDA含量和提高SOD活性,降低MDA/SOD的比值,从而改善自由基与清除自由基酶之间的平衡,抑制自由基的损伤及其引起的脂质过氧化反应,

表2 阿魏酸对脑缺血再灌注小鼠脑组织中SOD活性、MDA含量及MDA/SOD比值的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of FA on SOD activity, MDA content and MDA/SOD ratio of brain tissue in cerebral ischemia reperfusion mice($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g/kg)	SOD [U·mg(prot ⁻¹)]	MDA [nmol·mg(prot ⁻¹)]	MDA/SOD
假手术组		130.3±25.7	2.3±0.2	0.018±0.006
模型组		89.9±13.9	2.2±0.2	0.025±0.005▲
阿魏酸	0.8	151.7±10.3**	1.8±0.1*	0.012±0.001**
阿魏酸	1.6	109.9±8.2	2.0±0.1	0.018±0.002*

注:与假手术组比较,▲ $P<0.05$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note:compared with the sham-operated group,▲ $P<0.05$; compared with the model,* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.2 阿魏酸对大鼠血黏度的影响

对脑组织起保护作用。

脑缺血小鼠LDH活性降低的可能机制为:①缺血脑细胞内LDH释放入血增多^[18];②O₂可使LDH活性中心NDAH失活^[19]。川芎具有拮抗细胞内Ca²⁺超载和清除氧自由基作用,从而减轻细胞膜的损害,减少LDH从细胞内漏出,提高缺血小鼠脑组织中LDH活性。与实验结果相符。

本实验结果表明,阿魏酸对小鼠脑缺血再灌注损伤有一定程度的保护作用。与傅颖君等^[20]报道的结果一致。

造模对照组的全血黏度、血浆黏度跟空白对照组比较,有显著差异,而造模对照组的全血黏度、血浆黏度和阿魏酸组比较,差异不显著,说明阿魏酸对全血黏度和血浆黏度的影响不大,且造模成功。给大鼠造模即进行皮下注射肾上腺素和冰浴是为了迅速复制血液流变性呈黏、浓、凝、聚状态得到具有较高黏度的血液模型。全血黏度是代表血液流动阻力的主要参数,当血液流动阻力增高时,全血黏度值增高。全血黏度受红细胞压积、红细胞聚集性、红细胞变形性、血浆成分和血管舒缩状态等因素的综合影响,而其中以红细胞压积的影响最大,红细胞压积越高,全血黏度越大。全血还原黏度是指全血黏度与红细胞压积之比,旨在消除红细胞压积的影响。指标中聚集指数代表红细胞聚集性的大小,刚性指数反映红细胞变形性的大小^[12-13]。我们通过计算并比较发现,阿魏酸对这几项指标均没有多大影响,说明阿魏酸对血黏度的影响很小。

参考文献

- [1] Zhang ZH, Yu SZ, Li GS, *et al.* Influence of sodium ferulate on human netrophil-derived oxygen metabolites [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2001, 17: 515-517.
- [2] Zhou JY, Fan Y, Han ZF, *et al.* Influence of ferulic acid sodium on the enhance of endothelial permeability induced by histamine [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2000, 16: 664-666.
- [3] Liu SP, Dong WD, Wu DF, *et al.* Effects of sodium ferulate on nitric oxide synthase and cyclooxygenase in colon of colitis rats [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2003, 19: 571-574.
- [4] Xie L, Yang LH, Li XH. Resarch on the pharmacologic effects of Angelica Sinensis. *Res Traditional [J]*. *Chin Med*, 2000, 16: 56-58.
- [5] Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, *et al.* Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 2161-2168.
- [6] 少平,董卫国,罗和生.等.阿魏酸钠抗大鼠乙酸性结肠炎损伤的作用[J].世界华人消化杂志,2004,12(1):108-111.
- [7] 尚刚伟. RP-HPLC 测定正常人口服复方川芎汤剂后血清中游离的阿魏酸[J].中国药学杂志,1997,32(12):761-764.
- [8] 许仁溥,许大申.阿魏酸应用开发[J].粮食与油脂,2000,(6):7-9.
- [9] 计一平.阿魏酸钠抗肝纤维化体内作用研究[D].第二军医大学,2001.
- [10] 刘家兰,李德清,段先宇.竹节人参提取物对大鼠和小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].湖北民族学院学报·医学版,2002,19(1):35.
- [11] 马雪瑛,王敏,林成仁.等.救心滴丸对血液流变性和血栓形成的影响[J].中药新药与临床药理,2002,13(6):366-368.
- [12] 杨华蓉,陈嘉钰,蔡绍晖.等. MB 注射液对大鼠血液流变学的影响[J].华西医科大学学报,2000,31(2):230.
- [13] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1996.992-1011.
- [14] 施新猷.现代医学-实验动物学[M].北京:人民军医出版社,307-316.
- [15] Van Herck H, Baumans V, Van der Craats NR, *et al.* Histological changes in the orbital region of rats after orbital puncture [J]. *Laboratory Animals*, 1992, 26: 53-58.
- [16] Gerhard Vogel H, Wolfgang H. 药理学实验指南-新药发现和药理学评价[M].杜冠华,李学军,张永祥,等译.北京:科学出版社
- [17] Harkness J. The viscosity of human blood plasma: Its measurment in health and disease [J]. *Biorheology*, 1971, 8: 171-179.
- [18] 孙光春,陶成.牛磺酸对大鼠脑缺血损伤的保护作用[J].贵阳医学院学报,2000,25(4):357.
- [19] 王云姣,谭秀娟,蔡宏伟,等.浅低温对犬全脑缺血再灌注后脑内 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATP}$ 酶及脂质过氧化的影响[J].湖南医科大学学报,1998,23(1):8.
- [20] 傅颖君,何明.阿魏酸钠对心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用及其机制[J].药学报,2004,39(5):325.

收稿日期:2005-01-12