

血竭提取物对急性心衰大鼠脑缺血耐受的作用研究

魏秋醉¹, 黄雪萍¹, 胡琼慧¹, 黎芳¹, 沈泽妃¹, 梁雪玲¹, 李根亮¹, 潘征², 王若琦^{2*} (1.右江民族医学院, 广西 百色 533000; 2.右江民族医学院临床学院心脏内科, 广西 百色 533000)

摘要: 目的 研究血竭提取物对大鼠急性心力衰竭(acute heart failure, AHF)致脑功能损伤的保护作用及其机制。方法 将 25 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、心衰模型组和血竭提取物干预组。空白对照组和心衰模型组每日生理盐水灌胃, 干预组按照血竭提取物浓度分为低剂量(300 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、中剂量(450 mg·kg⁻¹·d⁻¹)和高剂量(600 mg·kg⁻¹·d⁻¹)3 组, 每日灌胃。采用 Morris 水迷宫检测大鼠的空间学习记忆能力的变化; 检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量; HE 染色观察脑组织病理变化。结果 Morris 水迷宫试验中, 空白对照组和血竭提取物高、中剂量组的逃避潜伏期均短于心衰模型组, 运动平均速度和目标象限时间百分比均大于心衰模型组; 心衰模型组的 MDA 含量较空白对照组增加, SOD 活性反之; 血竭提取物干预组的 MDA 含量较心衰模型组下降, SOD 活性反之。结论 急性心力衰竭单次发作即可损伤脑功能, 血竭提取物可能通过抗氧化和清除氧自由基等对防治大鼠急性心力衰竭所致的脑功能损伤具有积极的保护作用。

关键词: 血竭提取物; 急性心力衰竭; 脑功能; Morris 水迷宫

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)15-1905-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.15.010

引用本文: 魏秋醉, 黄雪萍, 胡琼慧, 等. 血竭提取物对急性心衰大鼠脑缺血耐受的作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(15): 1905-1908.

Effect of Dragon's Blood Extract on Cerebral Ischemic Tolerance in Rats with Acute Heart Failure

WEI Qiuzui¹, HUANG Xueping¹, HU Qionghui¹, LI Fang¹, SHEN Zefei¹, LIANG Xueling¹, LI Genliang¹, PAN Zheng², WANG Ruoyi^{2*} (1.Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China; 2.Department of Cardiology, School of Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protective effect and mechanism of dragon's blood extract on brain function damage induced by acute heart failure(AHF) in rats. **METHODS** Twenty-five SD rats were randomly divided into blank control group, heart failure model group and dragon's blood extract intervention group. The blank control group and the heart failure model group rats were given normal saline daily by intragastric administration every day. The dragon's blood extract intervention group was divided into three groups according to the concentration of dragon's blood extract, the intervention group rats were given daily dragon's blood extract 300 mg·kg⁻¹·d⁻¹ in the low dose group, 450 mg·kg⁻¹·d⁻¹ in the medium dose group and 600 mg·kg⁻¹·d⁻¹ in the high dose group by intragastric administration respectively. The Morris water maze was used to detect the changes of spatial learning and memory ability of rats. The contents of superoxide dismutase(SOD) and malondialdehyde(MDA) were detected. HE staining were used to observe brain tissue pathological changes. **RESULTS** In the Morris water maze experiment, the escape latency of the blank control group and the high and medium dose groups of dragon's blood extract were shorter than that of the heart failure model group, and the average moving speed and target quadrant time percentage were greater than the heart failure model group. The content of MDA in the heart failure model group was increased compared with the blank control group, and the activity of SOD was opposite. The content of MDA in the dragon's blood extract intervention group was lower than that of the heart failure model group, and the activity of SOD was opposite. **CONCLUSION** A single episode of AHF can impair brain function. Dragon's blood extract may have a positive protective effect on the prevention and treatment of brain damage caused by AHF in rats through anti-oxidation and scavenging oxygen free radicals.

KEYWORDS: dragon's blood extract; acute heart failure; brain function; Morris water maze

心力衰竭是全身性疾病。多项研究证明^[1-2], 造成脑的解剖学和功能性异常, 脑功能的持续性慢性心力衰竭反复发作可以损伤脑组织和功能, 恶化, 会明显增加住院率及病死率, 使患者的预

基金项目: 广西中医药管理局自筹课题(GZZC2019144); 百色市科学研究与技术开发计划项目(20184717); 广西高校大学生创新创业训练计划项目(201610599042); 右江民族医学院 2018 年度校级科研课题(19)

作者简介: 魏秋醉, 女 Tel: 13877693927 E-mail: 2575219469@qq.com *通信作者: 王若琦, 男, 硕士, 副教授, 副主任医师, 硕导 Tel: 13977624133 E-mail: wangruoyi2002@163.com

后恶化。急性心力衰竭发作对脑组织和功能的影响以及药物干预等研究相对少见。血竭用于治疗心脑血管疾病可通过扩张冠状动脉、保护心肌以及调节血脂和血糖等多靶点、多方位的综合机制发挥心脑血管保护功能^[3]。本研究通过腹腔注射盐酸肾上腺素注射液制造大鼠急性心力衰竭模型,观察急性心力衰竭发作对脑组织和功能的影响,明确了血竭提取物预处理干预对大鼠脑功能和结构的作用,并且探索了可能的相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

SPF级SD大鼠25只,♂,体质量180~220 g,由长沙市天勤生物技术有限公司提供,生产许可证号:SCXK(湘)2014-0011。

血竭提取物(陕西省西咸新区沣西新城辉林生物制品经营部,批号:15100302);盐酸肾上腺素注射液[远大医药(中国)有限公司,批号:171016];总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)测试盒和丙二醛(malondialdehyde, MDA)测试盒(南京建成生物工程研究所,货号分别是A001-1和A003-1)。

Morris水迷宫系统、722型分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);TGL-16G离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 分组

25只SD大鼠实验室饲养1周后随机分为3大组,常规喂养。空白对照组和心衰模型组各5只,每日生理盐水灌胃。血竭干预组再分3个剂量组,每组5只,分别给予低剂量($300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)、中剂量($450\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)和高剂量($600\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)血竭提取物每日灌胃。各组均持续处理4周,第28天对心衰模型组和血竭干预组3个剂量组大鼠进行急性心力衰竭模型制作。造模方法为大鼠以剂量 $0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注入 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的盐酸肾上腺素注射液,大鼠出现明显呼吸困难、发绀、口鼻出现粉红色泡沫痰、肺部可闻及啰音时,每组随机选择1只大鼠进行解剖。综合临床表现和解剖发现肺部表面湿润、肺水肿明显,切面有大量粉红色液体为急性心力衰竭造模成功。

1.3 样本收集及处理

造模完成后,所有实验鼠持续5 d进行水迷宫

训练,保持池水温度 $21\sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$,每天记录水迷宫数据。实验完成后眼球采血 $3\sim 4\text{ mL}$,室温静置2 h后 $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,保留血清待测。脊髓脱臼法处死大鼠后开颅取脑组织。血清置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻保存;脑组织置于10%中性甲醛中固定。

1.4 数据检测与处理

1.4.1 Morris水迷宫试验 给予所有实验鼠2 d探索的试验和连续5 d隐蔽平台试验^[2,4]。根据试验结果评价实验鼠的学习、记忆能力的改变。隐蔽平台试验测试前,先让实验鼠在水池里自由游泳2 d,熟悉迷宫环境。在实验中,保持平台位置恒定、每日测定水迷宫的时间一致,保持水温 $21\sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。①逃避潜伏期:将大鼠在平台对侧象限面朝池壁轻放入水中,任其自由在池中游泳,记录大鼠找到并爬上平台的时间(即逃避潜伏期),规定每次训练的时间为300 s,大鼠找到平台后在平台上停留10~15 s。如大鼠在300 s内找不到平台,须将其引导至平台上,让其保持10~15 s(此时逃避潜伏期记为300 s)。②目标象限时间百分比:逃避潜伏期训练后第2天进行目标象限试验。撤去水下平台,记录大鼠在300 s内停留在目标象限(第四象限)的时间,计算时间百分比。

1.4.2 MDA与SOD水平测定 采用分光光度计检测各组大鼠血清中MDA、SOD。

1.4.3 病理形态学观察 所取脑组织按常规方法固定、包埋,制成厚切片,行HE染色观察各组脑组织的病理改变。

1.5 统计学处理

所得计量资料行 t 检验统计方法,记录所有数据,采用SPSS 17.0统计学软件对数据进行处理,实验中每组各种指标均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Morris水迷宫试验

根据实验鼠的运动轨迹进行逃避潜伏期的计算,可推算出随训练天数的增加,实验鼠的逃避潜伏期缩短,见图1。空白对照组和血竭提取物干预组的逃避潜伏期均短于心衰模型组,结果见表1。空白对照组和血竭提取物高、中剂量组的运动平均速度均大于心衰模型组,目标象限时间百分比均长于心衰模型组。结果见表2。

表 1 各组大鼠寻找平台的逃避潜伏期($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab. 1 Escape latency of rats in each group seeking platform($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
空白对照组	—	160.20±104.09	72.20±88.08	81.40±108.56	45.20±34.20	18.40±6.80
心衰模型组	—	229.00±73.56	146.60±121.26 ¹⁾	162.40±24.67 ¹⁾	132.40±106.26 ¹⁾	192.00±56.09 ¹⁾
血竭提取物低剂量组	300	138.00±96.08	115.60±112.24	69.20±51.51 ²⁾	40.40±35.64 ²⁾	74.60±89.58 ²⁾
血竭提取物中剂量组	450	203.00±132.85	98.80±74.17 ²⁾	126.20±110.42	126.80±107.80	66.20±65.69 ²⁾
血竭提取物高剂量组	600	98.40±73.22 ²⁾	73.60±121.81 ²⁾	54.80±46.13 ²⁾	99.40±116.88 ²⁾	34.20±20.90 ²⁾

注:与空白对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与心衰模型组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the heart failure model group, ²⁾ $P<0.05$.

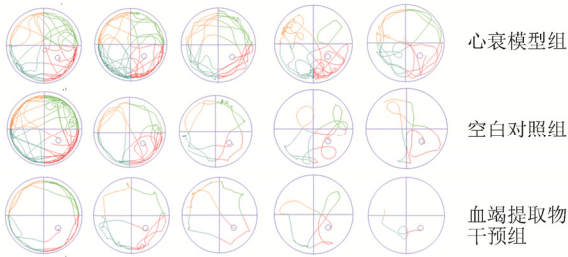


图 1 大鼠水迷宫试验运动轨迹图

Fig. 1 Movement trajectory of rats in water maze experiment

表 2 各组大鼠运动平均速度、目标象限时间百分比($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab. 2 Average speed of movement and percentage of target quadrant time of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	平均速度/mm·s ⁻¹	目标象限时间百分比/%
空白对照组	—	215.78±21.66	35.58±5.21
心衰模型组	—	162.41±31.42 ¹⁾	29.25±5.67 ²⁾
血竭提取物			
低剂量组	300	162.37±54.33	31.44±2.32 ²⁾
中剂量组	450	184.86±34.19 ²⁾	31.01±4.66
高剂量组	600	223.04±40.73 ²⁾	36.15±10.61 ²⁾

注:与空白对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与心衰模型组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the heart failure model group, ²⁾ $P<0.05$.

2.2 血清 SOD 与 MDA 变化

心衰模型组的 MDA 较空白对照组增加, SOD 较空白对照组下降($P<0.05$); 血竭提取物干预组的 MDA 较心衰模型组下降, SOD 较心衰模型组增加。结果见表 3。

2.3 组织病理学改变

在 HE 染色中, 心衰模型组与空白对照组比较, 可见脑组织间质血管周围间隙变大, 充血水肿。血竭提取物干预组与心衰模型组比较, 可见脑组织间质血管周围间隙轻度水肿, 间质水肿程度轻, 病理改变少。结果见图 2。

表 3 SOD 与 MDA 变化评价氧化和抗氧化状态($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab. 3 Evaluation of oxidation and oxidation state by changes of SOD and MDA($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SOD/U·g ⁻¹	MDA/nmol·g ⁻¹
空白对照组	—	376.61±31.80	13.09±6.31
心衰模型组	—	285.57±50.68 ¹⁾	19.53±11.49 ¹⁾
血竭提取物			
低剂量组	300	347.43±97.70 ²⁾	16.85±5.44 ²⁾
中剂量组	450	320.95±103.15 ²⁾	15.62±2.90 ²⁾
高剂量组	600	363.39±106.00 ²⁾	14.80±2.27 ²⁾

注:与空白对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与心衰模型组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the blank control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with the heart failure model group, ²⁾ $P<0.05$.

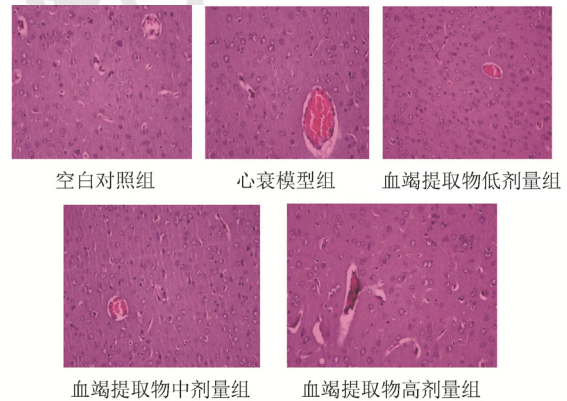


图 2 各组大鼠脑组织形态病理学 HE 染色(200×)

Fig. 2 HE staining of brain histopathology in rats in each group(200×)

3 讨论

急性心力衰竭累积全身重要脏器, 导致全球死亡率升高, 发病率升高和重复住院治疗的高负担^[4]。脑组织需氧量大, 对缺氧敏感, 急性心力衰竭可导致心排量急剧减少, 血液循环障碍, 导致脑部供血减少, 脑部严重缺血缺氧而出现损伤, 可伴有神经系统方面的意识障碍、学习记忆能力下降, 执行功能受损等症状, 严重者可发生心脑血管综合征^[5-8]。心力衰竭发作对脑组织和功能的不利影响被认为与心输出量降低、心血管高负担危险因素、神经激素和炎症机制等相关^[1,5]。

本研究结果显示,急性心力衰竭的发作可以导致大鼠脑功能和组织的明显损伤,可能与大鼠的脑容量相对比较小,对缺氧的耐受性比较差等有关,严重缺血即可导致不可逆的损伤,本研究中大鼠急性心力衰竭发作所致的脑损伤主要表现为水迷宫试验结果的异常和脑组织发生病理改变等。未干预治疗的急性心力衰竭大鼠表现为反应迟钝、活动量少、运动速度慢、灵活性降低、运动稳定性降低。Morris 水迷宫试验结果显示,心衰模型组大鼠逃避潜伏期明显延长,运动平均速度明显降低,目标象限时间百分比明显缩短,而血竭提取物干预能通过改善急性心力衰竭大鼠的空间学习记忆能力等而对脑损伤起到积极的保护作用。

脑组织中含有大量不饱和脂肪酸,容易受到活性氧的攻击,发生脂质过氧化反应。SOD 活力反应了机体清除氧自由基的能力,而 MDA 含量是反映细胞膜脂过氧化作用强弱的重要指标。急性心力衰竭发作可导致重要脏器的缺血、缺氧,氧化与抗氧化系统失衡,氧自由基产生增加,清除自由基能力下降,脂质过氧化反应增强,造成重要脏器的严重损伤^[9-11]。本研究结果显示,血竭提取物干预组大鼠的 MDA 含量较心衰模型组低,而 SOD 活性升高,表明血竭提取物可能通过抗氧化、清除氧自由基或抑制自由基等机制抑制脑组织的过度氧化应激而发挥对急性心力衰竭所致脑功能损伤的保护作用。

本研究的脑组织病理学改变显示,心衰模型组大鼠的脑组织间质血管周围间隙变大,充血水肿,病理改变较严重,而血竭提取物干预组大鼠的脑组织病理改变较心衰模型组轻。本研究结果提示,急性心力衰竭发作可以导致脑组织出现具有病理意义的结构改变,而血竭提取物的预处理干预可能同样通过抗氧化、清除氧自由基或抑制自由基等机制显著改善急性心力衰竭发作导致的脑组织病理损伤。

中药以其多靶点效应在治疗缺血性脑血管疾病中应用历史悠久、疗效确切^[12],尤其在缺血性脑卒中的预防和治疗方面具有独特的优势。血竭是民间传统的活血散瘀和止血药,被《本草纲目》誉为“活血圣药”,血竭成分中含有多种黄酮类化合物,具有很强的抗氧化作用,可减少自由基引起的损伤和预防过氧化脂质的形成等功能^[3,13-15]。本研究显示血竭提取物干预可能通过抗氧化和清除

氧自由基等对防治大鼠急性心力衰竭所致的脑功能损伤具有积极保护的作用。本研究结果提示临床上需要积极防范急性心力衰竭的发生,在治疗急性心力衰竭的同时需要加强对脑功能的保护,也为血竭提取物防治急性心力衰竭所致的脑功能损伤提供了实验依据。

REFERENCES

- [1] HAVAKUK O, KING K S, GRAZETTE L, et al. Heart failure-induced brain injury [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 69(12): 1609-1616.
- [2] WOO M A, PALOMARES J A, MACEY P M, et al. Global and regional brain mean diffusivity changes in patients with heart failure [J]. *J Neurosci Res*, 2015, 93(4): 678-685.
- [3] 王若琦, 张子龙. 血竭的心血管保护作用机制研究进展[J]. *国际中医中药杂志*, 2011, 33(12): 1140-1142.
- [4] MEBAZAA A, TOLPPANEN H, MUELLER C, et al. Acute heart failure and cardiogenic shock: a multidisciplinary practical guidance [J]. *Intensive Care Med*, 2016, 42(2): 147-163.
- [5] OGREN J A, FONAROW G C, WOO M A. Cerebral impairment in heart failure [J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2014, 11(3): 321-329.
- [6] KUMAR R, YADAV S K, PALOMARES J A, et al. Reduced regional brain cortical thickness in patients with heart failure [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126595. Doi:10.1371/journal.pone.0126595.
- [7] KIM W, KIM E J. Heart failure as a risk factor for stroke [J]. *J Stroke*, 2018, 20(1): 33-45.
- [8] KIM M S, KIM J J. Heart and brain interconnection-clinical implications of changes in brain function during heart failure [J]. *Circ J*, 2015, 79(5): 942-947.
- [9] KINGERY J R, HAMID T, LEWIS R K, et al. Leukocyte iNOS is required for inflammation and pathological remodeling in ischemic heart failure [J]. *Basic Res Cardiol*, 2017, 112(2): 19.
- [10] NIEMANN B, ROHRBACH S, MILLER M R, et al. Oxidative stress and cardiovascular risk: obesity, diabetes, smoking, and pollution part 3 of a 3-part series [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, 70(2): 230-251.
- [11] SANTOS C X, RAZA S, SHAH A M. Redox signaling in the cardiomyocyte: From physiology to failure [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016(74): 145-151.
- [12] XIANG L L, FENG Y, MIAO M S, et al. Effects of rose total flavonoids on cerebral ischemia reperfusion injury in mice [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2018, 35(1): 76-79.
- [13] PANG D R, SU X Q, ZHU Z X, et al. Flavonoid dimers from the total phenolic extract of Chinese dragon's blood, the red resin of *Dracaena cochinchinensis* [J]. *Fitoterapia*, 2016(115): 135-141.
- [14] WANG F F, HU L, WANG X H. Main flavonoids in Chinese dragon's blood and their DPPH free radical scavenging activities [J]. *J Yunnan Natl Univ Nat Sci Ed(云南民族大学学报 自然科学版)*, 2015, 24(3): 189-193.
- [15] 孙晶, 庞道然, 郑姣, 等. 龙血竭的药理、临床及质量控制研究进展[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2017, 17(11): 1445-1447.

收稿日期: 2018-10-23

(本文责编: 李艳芳)