

## · 论 著 ·

## 复元醒脑汤对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用研究

李 莉<sup>1</sup>, 冯晶晶<sup>1</sup>, 李铁军<sup>1,2</sup>, 章越凡<sup>3</sup> (1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 上海市浦东新区浦南医院药剂科, 上海 200125; 3. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的** 探讨复元醒脑汤对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。**方法** 将 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、复元醒脑汤低、中、高(5.5、11、22 g/kg)剂量组。采用线栓法建立大鼠脑缺血再灌注损伤模型,缺血 2 h 再灌注 24 h,对各组大鼠进行神经功能缺失评分, TTC 染色测定脑梗死体积, HE 染色观察脑组织病理变化, Nissl 染色观察脑组织中尼氏小体的变化, Tunnel 染色观察脑组织中神经细胞的凋亡情况。测定血清中的超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)的水平。**结果** 与模型组相比,复元醒脑汤低、中、高剂量组均可明显改善大脑中动脉缺血再灌注损伤大鼠的神经行为障碍; TTC 染色结果显示,复元醒脑汤低、中、高剂量组大鼠脑梗死体积明显减小; HE 结果显示给药组改善脑组织病理结构, Nissl 染色结果表明给药组尼氏小体形态数量得到改善, Tunnel 染色阳性细胞数减少, 细胞凋亡率下降; 与模型组相比,复元醒脑汤可提高脑缺血再灌注大鼠血清中 SOD 的水平,降低 MDA 水平。**结论** 复元醒脑汤对大鼠大脑脑缺血再灌注损伤具有保护作用。

**[关键词]** 复元醒脑汤; 缺血再灌注损伤; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

**[中图分类号]** R256.29 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)01-0034-06

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.01.007

## Protective effects of Fu-Yuan-Xing-Nao decoction for focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats

LI Li<sup>1</sup>, FENG Jingjing<sup>1</sup>, LI Tiejun<sup>1,2</sup>, ZHANG Yuefan<sup>3</sup> (1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. Department of Pharmacy, Punan Hospital of Pudong New Area, Shanghai 200125, China; 3. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the protective effect of Fu-Yuan-Xing-Nao decoction (FYXND) on rats with middle cerebral ischemia reperfusion injury. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham, ischemia-reperfusion, and low, middle, high FYXND dose (5.5, 11, 22 g/kg) groups. Rats model was induced by 2 h of middle cerebral artery occlusion and 24 h reperfusion. The neurological deficit score of each group was evaluated. The infarct size was measured by the 2,3,5-triphenyltetra-zolium(TTC) chloride staining assay. The pathological changes of brain tissue were observed by HE staining assay. The changes of Nissl bodies were observed by Nissl staining. Tunnel staining was used to observe the apoptosis of neurons in brain. Serum levels of superoxide dismutase (SOD) and Malondialdehyde (MDA) were measured. **Results** Compared with the model group, neurological outcomes were improved in all three groups of low, middle and high FYXND dose (5.5, 11, 22 g/kg). Significantly reduced infarct brain volume was observed with TTC staining in all three FYXND groups. The results from HE staining assay indicated that the pathological structure of brain tissue was improved in the treatment groups. The numbers and morphology of Nissl corpuscles in the treated group were also improved based on the results of Nissl staining. Both the Tunnel staining positive cells and the rate of apoptosis were decreased. Compared with the model group, FYXND increased the rat serum SOD level and decreased the MDA level. **Conclusion** FYXND has protective effects on cerebral ischemia reperfusion injury in rats.

**[Key words]** Fu-Yuan-Xing-Nao decoction; ischemia reperfusion injury; SOD; MDA

**[基金项目]** 浦东新区卫生系统重要薄弱学科建设资助(PWZbr2017-16)

**[作者简介]** 李 莉, 硕士研究生, Tel: 18326182673, Email: lili009071@163.com

**[通讯作者]** 李铁军, 副教授, 研究方向: 心脑血管药理, Tel: (021) 20302289, Email: ltj204@163.com

脑卒中是导致人类死亡的第二大常见原因,也是致残的主要原因,其中,缺血性脑卒中占脑卒中的80%<sup>[1]</sup>。而脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)是引发多种脑血管疾病后遗症的重要病理机制。CIRI 是指缺血脑组织在恢

复血液灌注后,脑组织进一步损伤。现代研究认为CIRI是大多数缺血性脑血管疾病的主要病理生理过程,其发生机制尚不明确,目前临床尚缺乏有效的治疗脑缺血的药物<sup>[2]</sup>。

中医药在该病的治疗上积累了丰富经验,传统中医药具有从整体出发、辨证论治和多环节综合治疗的优势。复元醒脑汤由人参、水蛭、制天南星、大黄、三七五味中药组成,临床上用于治疗急性缺血性脑卒中,与单纯常规的西医治疗相比,复元醒脑汤联合常规西医治疗能更好地改善糖尿病合并脑梗死患者的神经功能缺损情况,提高患者的日常生活能力,改善病情<sup>[3]</sup>。目前对其作用机制的研究多与糖尿病脑梗死大鼠结合,复元醒脑汤对糖尿病脑梗死大鼠术后神经体征缺损具有明显的改善作用,降低其脑组织含水量和血-脑屏障通透性,提高脑血流量;提高脑组织中SDF-1、CXCR4、VAGF蛋白的表达;提高内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)的增殖、迁移能力,修复受损的血管内皮细胞,加快神经功能修复<sup>[4,5]</sup>。对于CIRI的研究还未见报道,笔者通过构建大鼠CIRI模型,观察复元醒脑汤对CIRI的保护作用,并从氧化应激角度初步探讨其作用机制,为复元醒脑汤的应用提供一定的理论基础。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,体重(260±20)g。实验动物在术前饲养1周适应环境,室温(25±2)℃,相对湿度40%~70%,8:00—20:00自动照明。大鼠自由进食,所有实验动物均符合实验动物伦理学要求。

### 1.2 实验仪器

全自动酶标仪(Thermo Multiskan MK3, 美国)。

### 1.3 药物与试剂

复元醒脑汤:人参200g、制天南星180g、三七300g,共680g;用70%乙醇回流2次,过滤合并滤液,减压浓缩,回收乙醇至无乙醇味。人参、制天南星、三七等用乙醇回流后的药渣与水蛭240g、大黄180g,加水煎煮2次,第一次加入10倍量水煎煮1.5h,过滤;第二次加入8倍量水煎煮1h,过滤。合并水煎液和回收乙醇后的醇提液,过滤,减压浓缩得到复元醒脑浸膏,1g浸膏相当于生药6.63g。

超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);2,3,5-氯化三苯基

四氮唑(TTC, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, Sigma);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司);甲醛溶液(国药集团化学试剂有限公司);0.9%氯化钠注射液(浙江天瑞药业有限公司);尼氏染色液(碧云天生物科技有限公司);苏木素伊红(HE, 碧云天生物技术有限公司);TUNEL试剂盒(罗氏生物技术有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物模型的制备

采用线栓法制备大鼠CIRI模型<sup>[6]</sup>。大鼠适应性饲养后进行试验。将大鼠用10%水合氯醛300mg/kg腹腔注射麻醉,仰卧位固定,颈正中切口,分离、结扎左侧颈总动脉(CCA)近心端、颈外动脉(ECA)及其分支动脉,根部结扎该分支。分离左侧颈内动脉(ICA),沿颈内动脉向下分离翼腭动脉,在颈内动脉近端备线、远端放置动脉夹,颈总动脉分叉切口,插入栓线,其深度为18mm,栓线进入颈内动脉,入颅至大脑前动脉,阻断大脑中动脉(MCA)所有血流来源。撤掉动脉夹,扎紧备线,外留1cm长线头,缝合皮肤。脑缺血2h后,无需再次麻醉和切开皮肤,轻轻提拉所留线头至有阻力时提示栓线头端已至颈总动脉切口处,血流再通即再灌注。假手术组除不插线处理外,其余步骤同上。术后保持环境温度(25±2)℃,将大鼠放入笼中饲养观察。

### 2.2 分组与给药

将大鼠随机分为假手术组、模型组、复元醒脑汤低、中、高(5.5、11、22g/kg)剂量组,每组20只。给药组大鼠在脑缺血后15min灌胃给药1次,假手术组和模型组给予生理盐水。

### 2.3 神经功能缺损评分

缺血2h再灌注24h后存活大鼠,参考经典Zea Longa评分标准进行神经行为学评分<sup>[7]</sup>。0分:无神经功能受损体征,活动正常;1分:不能完全伸展对侧前爪;2分:行走时向对侧转圈;3分:向对侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失。评分结果1~4分为有效模型。

### 2.4 TTC染色

腹腔注射10%水合氯醛(300mg/kg)麻醉大鼠,腹主动脉放血处死,迅速断头取脑。脑组织取出后立即放入-20℃低温冰箱快速冷冻20min,去除嗅球、小脑和低位脑干,由前向后冠状面切片,每片大约2mm,均匀切6片。将脑组织切片放入含1%TTC溶液的玻璃器皿中,TTC溶液浸没脑组织切

片,在37℃恒温培养箱中避光染色15 min后,将脑组织切片翻面继续染色15 min。正常脑组织染色呈红色,脑梗死灶染色呈苍白色。将完成染色的脑切片置于4%多聚甲醛溶液中固定4 h。将经固定后的脑组织切片由前到后排列,用扫描仪进行扫描,然后通过Image-Pro Plus软件统计脑梗死面积。计算脑梗死比例(脑梗死比例% = 梗死区面积/全脑面积×100%)。

### 2.5 脑组织病理形态观察

#### 2.5.1 HE染色

腹腔注射10%水合氯醛麻醉大鼠后,用4%多聚甲醛心脏灌注后取全脑,放入4%的多聚甲醛溶液中固定,并通过常规脱水、石蜡包埋切片、HE染色,封片后置于光学显微镜下观察脑组织形态变化。

#### 2.5.2 尼氏染色

取包埋好的组织进行切片并脱蜡,在37℃的环境中用尼氏染色液进行染色,用PBS缓冲液冲洗2次,再用95%乙醇冲洗;换用新鲜的95%乙醇脱水2次,再用二甲苯透明2次;封片后置于光学显微镜下观察尼氏体。

#### 2.5.3 TUNEL染色

取包埋好的组织进行切片,切片厚度为5 μm,将脱蜡和水化后的样本用磷酸盐缓冲液漂洗2次,用TUNEL细胞凋亡试剂盒进行染色,封片后置于光学显微镜下观察凋亡细胞。

### 2.6 血清SOD、MDA测定

随机选取复元醒脑汤中剂量(11 g/kg)组大鼠10只,腹腔注射10%水合氯醛麻醉大鼠后,腹主动脉取血,室温静置30 min后,3 500 r/min离心10 min,取血清。按照SOD和MDA试剂盒中说明书操作,对血清中SOD、MDA含量变化进行检测。

### 2.7 统计学处理

实验数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用GraphPad Prism软件进行统计处理,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验差异的显著性。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 对大鼠神经功能缺损评分的影响

术后各组大鼠均出现不同程度的运动功能障碍,提起鼠尾可见其右前肢内收,行走时向右偏或向右转圈,严重者出现不能自主运动,向右侧倾倒。与模型组比较,复元醒脑汤低、中、高(5.5、11、22 g/kg)剂量组大鼠神经功能评分明显降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),提示复元醒脑汤可改善脑缺血

再灌注大鼠的行为障碍。结果见图1。

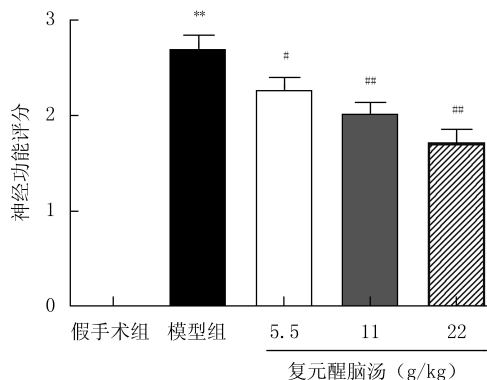


图1 复元醒脑汤对大鼠神经功能缺损评分的影响

n=20; \*\*  $P < 0.01$ ,与假手术组比较; #  $P < 0.05$ ,##  $P < 0.01$ ,与模型组比较

### 3.2 对大鼠脑梗死体积的影响

假手术组大鼠脑组织正常,TTC染色呈红色,缺血再灌注大鼠脑组织梗死区域TTC染色呈白色,典型图见图2。与假手术组比较,模型组梗死面积百分比明显增加( $P < 0.01$ )。与模型组相比,给药组梗死面积百分比显著降低( $P < 0.01$ )。结果见图3。

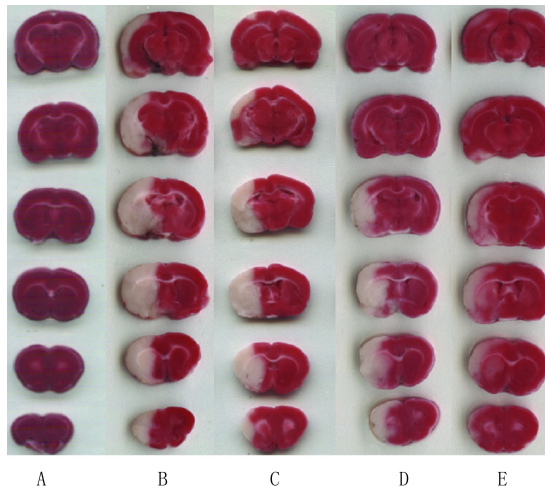


图2 大鼠大脑切片TTC染色图

A.假手术组;B.模型组;C.低剂量组(5.5 g/kg); D.中剂量组(11 g/kg);E.高剂量组(22 g/kg)

### 3.3 对大鼠血清中SOD、MDA水平的影响

与模型组相比,复元醒脑汤中剂量(11 g/kg)组SOD水平明显上升( $P < 0.01$ ),MDA水平降低( $P < 0.05$ )。结果见图4。

### 3.4 脑组织病理形态学变化

#### 3.4.1 HE染色结果

假手术组大鼠脑组织显微结构正常,神经细

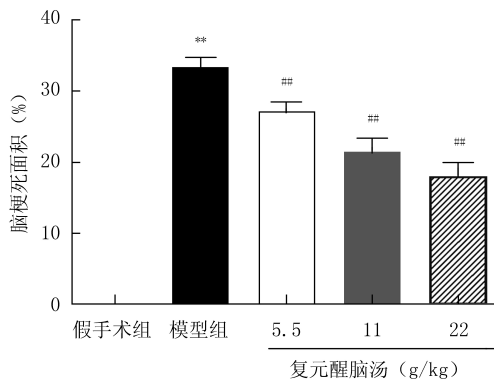


图3 复元醒脑汤对大鼠脑梗死面积百分比的影响

n=20; \* P<0.01, 与假手术组比较;  
## P<0.01, 与模型组比较

胞结构完整,形态正常,排列整齐,细胞质饱满,细胞核清晰。模型组细胞体积变小,细胞核出现皱缩。给药组细胞显微结构损伤程度减轻。典型图见图5。

### 3.4.2 尼氏染色结果

假手术组大鼠大脑组织皮层神经元排列整齐,核仁清晰,细胞核周围尼氏体颗粒较大;模型组大鼠可见神经元周围间隙扩大,细胞形态不完整,细胞皱缩较严重,且尼氏体的数量减少,形态皱缩。给药组细胞形态得到改善,且高剂量组改善较为明显。典型图见图6。

### 3.4.3 TUNEL 染色结果

假手术组细胞结构正常,没有见到凋亡的细胞,

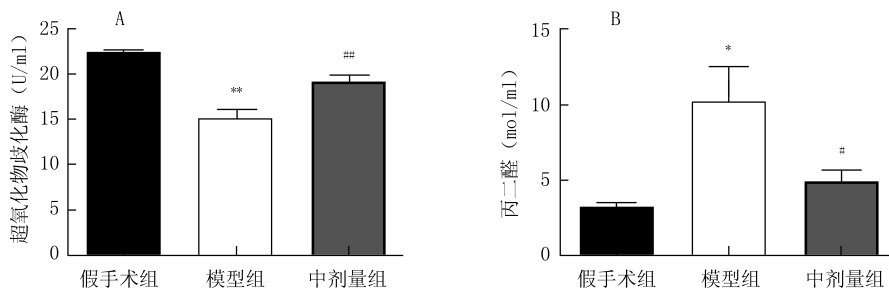


图4 大鼠血清中SOD和MDA的水平

n=10; \* P<0.05, \*\* P<0.01, 与假手术组比较;  
# P<0.05, ## P<0.01, 与模型组比较; A.SOD的活性; B.MDA的含量

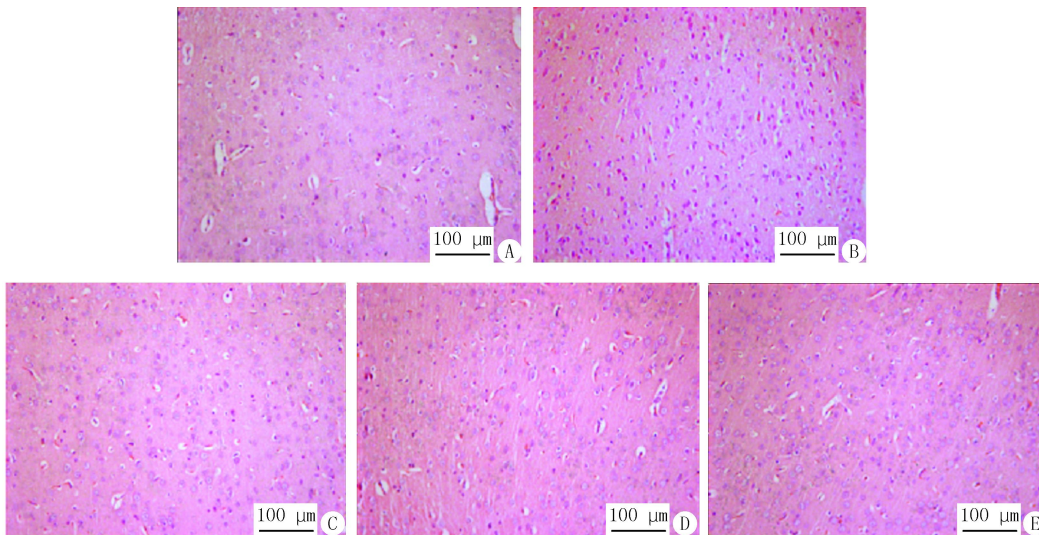


图5 HE检测大鼠脑缺血后大脑皮层神经细胞的显微结构改变(200×)

A.假手术组;B.模型组;C.低剂量组(5.5 g/kg);D.中剂量组(11 g/kg);E.高剂量组(22 g/kg)

模型组大鼠脑缺血皮层区可见到大量被染成褐色的凋亡细胞,褐色细胞越多表明凋亡的细胞越多,给药组被染成褐色的凋亡细胞数量较模型组减少。典型图见图7。

## 4 讨论

通过本实验发现复元醒脑汤低、中、高3个剂量均可显著改善大鼠急性CIRI模型的神经缺损症



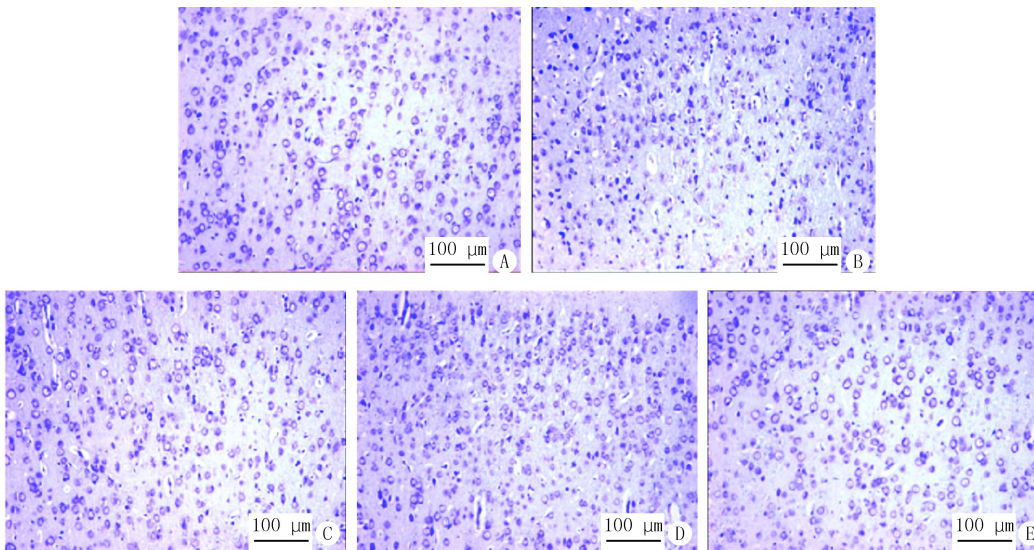


图6 尼氏染色观察大鼠大脑皮层区细胞形态(200×)

A.假手术组;B.模型组;C.低剂量组(5.5 g/kg);D.中剂量组(11 g/kg);E.高剂量组(22 g/kg)

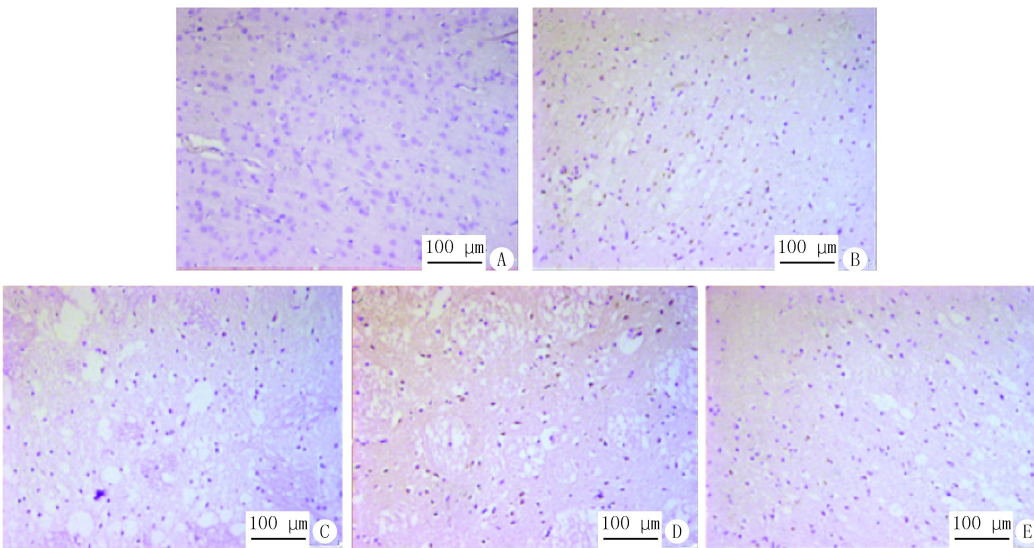


图7 TUNEL染色检测大鼠脑缺血组织细胞凋亡情况(200×)

A.假手术组;B.模型组;C.低剂量组(5.5 g/kg);D.中剂量组(11 g/kg);E.高剂量组(22 g/kg)

状,减小脑梗死面积,对 CIRI 具有保护作用,且复元醒脑汤给药方式简单、剂型方便,利于在临床推广应用。

CIRI 的机制复杂,主要是大脑中动脉阻塞引起的一系列病理变化。SOD 作为体内的主要抗氧化酶之一,其在体内的含量及活性可提示机体内抗氧化系统的强度。而 MDA 是机体内细胞膜脂质过氧化的产物,其在体内的含量在一定程度上表明氧化应激造成的损害程度<sup>[8,9]</sup>。笔者检测了大鼠血清中 SOD 的活性以及 MDA 的含量,发现复元醒脑汤对 CIRI 的保护作用可能与氧化应激有关。提示对复元醒脑汤作用机制的进一步研究可以从氧化应激方

面着手,对作用机制的进一步研究也对临床用药有一定的指导作用。王立平等<sup>[10]</sup>的研究结果显示,复元醒脑汤可改善糖尿病合并脑梗死患者的神经缺损,联合西药治疗腔隙性脑梗死可降低患者血清中 IL-6、TNF-α 和 NO 水平。复元醒脑汤改善糖尿病合并脑梗死大鼠的神经缺损,改善脑组织病理结构,降低脑组织含水量,缓解脑水肿。改善 EPCs 细胞的功能,促进局部神经及血管再生,从而实现保护作用<sup>[11,12]</sup>。已有的报道是对糖尿病合并大鼠 CIRI 的保护作用。

本实验通过病理图片对复元醒脑汤的脑缺血再灌注保护作用进行研究,尼氏染色是观察缺血脑组

织内神经元尼氏体的经典实验方法,可以清楚辨认出尼氏体、尼氏体轴突、细胞核及核仁。实验结果显示,脑缺血模型组与假手术组比较,大脑皮层尼氏体数量减少,核深染固缩,排列紊乱;复元醒脑汤组与模型组相比,大鼠大脑皮层尼氏体数量增多,细胞核只有少量固缩,细胞排列较整齐,尼氏体形态有所改善。HE染色结果显示,脑缺血模型组与假手术组相比,神经元细胞核固缩、致密、损伤严重;而复元醒脑汤组神经元显微结构损伤程度与模型组比较明显减轻。TUNEL染色检测结果显示,复元醒脑汤能够显著降低缺血诱导的神经细胞凋亡。以上结果表明,复元醒脑汤可以保护大鼠脑缺血诱导的神经元损伤及凋亡,发挥脑缺血神经保护作用。

复元醒脑汤成分复杂,发挥保护作用的机制也较为复杂,本实验从病理切片染色和血清检测出发,对其作用机制进行了初步研究,也为其临床应用提供了一定的科学依据。

#### 【参考文献】

[1] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, *et al.* Heart disease and stroke statistics—2015 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2015, 131(4):e29-322.  
[2] Mozaffarian D. Dietary and policy priorities for cardiovascular disease, diabetes, and obesity: a comprehensive review [J]. *Circulation*, 2016, 133(2):187-225.

[3] 耿 赟,方邦江,马智慧,等.复元醒脑汤治疗急性缺血性中风的临床研究[J].*中国中医急症*,2014,23(11):1970-1972.  
[4] 赵 平,沈俊逸,魏俊平,等.复元醒脑汤对糖尿病脑梗死大鼠脑组织梗死体积的影响[J].*上海中医药大学学报*,2013,27(5):66-69.  
[5] 陈 森,王 宏,方邦江.复元醒脑汤治疗糖尿病合并脑梗死的机制研究[J].*中国急救医学*,2013,33(7):654-657.  
[6] Woodruff TM, Thundiyil J, Tang SC, *et al.* Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke [J]. *Mol Neurodegener*, 2011, 6(1):11.  
[7] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Cummins Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84-91.  
[8] Maki T, Hayakawa K, Pham L D, *et al.* Biphasic mechanisms of neurovascular unit injury and protection in CNS diseases [J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2013, 12(3):302-315.  
[9] Ayuso MI, Gonzalo-Gobernado R, Montaner J. Neuroprotective diets for stroke[J]. *Neurochem Int*, 2017, 107:4-10.  
[10] 王立平,刘翠梅,张 红.复元醒脑汤联合西药治疗腔隙性脑梗死疗效及对 IL-6、TNF- $\alpha$  和 NO 的影响[J].*现代中西医结合杂志*,2015,24(29):3207-3208.  
[11] 方邦江,周 爽,沈俊逸,等.复元醒脑汤对糖尿病脑梗死大鼠脑组织血流量及含水量影响的实验研究[J].*老年医学与保健*,2012,18(6):381-385.  
[12] 沈俊逸,方邦江,凌 丽,等.复元醒脑汤对糖尿病脑梗死大鼠内皮祖细胞功能的作用研究[J].*中国中西医结合急救杂志*,2016,23(4):412-416.

[收稿日期] 2017-07-30 [修回日期] 2017-09-27

[本文编辑] 李睿旻