

synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling[J]. Journal of Cell Science, 2005, 118(16): 3759-3768.

[18] Lu Huixia, Xu Xinsheng, Zhang Mei, et al. Combinatorial protein therapy of angiogenic and arteriogenic factors remarkably improves collateralogenesis and cardiac function in pigs [J]. Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(29): 12140-12145.

[19] 王延琳, 杨向红, 柳爱华, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对大鼠心脏微血管内皮细胞血管形成及血管内皮生长因子受体 1 的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(11): 963-966.

(编辑:)

心脉隆注射液对大鼠局灶性脑缺血的保护作用

李会仙, 谢文波, 张延婷, 王修波, 周凤汝, 刘晓波, 沈磊(大理大学药学与化学学院, 云南 大理 671000)

摘要: 目的 探讨心脉隆注射液(XML)对大鼠局灶性脑缺血的保护作用。方法 采用线栓法制备大鼠永久性大脑中动脉阻塞模型, 观察 XML 对大鼠神经行为、脑梗塞面积、脑组织含水量、脑组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性和丙二醛(MDA)含量以及脑组织病理变化的影响。结果 与缺血模型组比较, XML 可改善缺血大鼠神经行为, 减少脑梗塞面积, 降低脑含水量, 升高 SOD 和 GSH-PX 活性, 降低 MDA 含量, 减轻缺血所致的脑组织损伤。结论 XML 对大鼠局灶性脑缺血有较好的保护作用, 能提高缺血大鼠的抗氧化能力。

关键词: 心脉隆注射液; 局灶性脑缺血; 抗氧化能力

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2016)04-

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2016. 04.0

Protective Effect of Xinmailong injection on Focal Cerebral Ischemia in Rats

LI Huixian, XIE Wenbo, ZHANG Yanting, WANG Xun, ZHOU Fengru, LIU Xiaobo, SHEN Lei (College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali, 671000)

Abstract: Objective To study the protective effect of XML on focal cerebral ischemia in rats. Methods Permanent middle cerebral artery occlusion models were established by inserting nylon thread. The effects of XML on neurotic behavior, cerebral infarct volume, cerebral water volume, the activities of SOD and GSH-PX, the content of MDA, and the pathologic change of brain were observed. Results Compared with the ischemic model group, XML improved ischemic rats' neurotic behavior, decreased the cerebral infarct volume and water volume, increased SOD and GSH-PX activities, decreased MDA content, and reduced cerebral injury after ischemia. Conclusion XML has the protective effect on cerebral ischemia and enhances the anti-oxidation ability in rats.

Key words: XML; Focal cerebral ischemia; Anti-oxidation ability

心脉隆注射液(Xinmailong injection, XML)是从美洲大蠊体内提取的生物活性物质, 其主要成分为核苷类化合物和氨基酸。近年研究^[1]表明, 心脉隆注射

液在心血管系统具有广泛的药理活性, 尤其对于缺血缺氧心肌具有保护作用, 并主要用于心力衰竭。对于中枢神经系统也有影响, 如促进神经干细胞增值、分

收稿日期: 2016-04-26

作者简介: 李会仙, 女, 本科, 研究方向: 药学。Email: 2738811855@qq.com。通讯作者: 沈磊, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 神经药理学。Email: scort20009@163.com。

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金重点项目(2013Z156); 大理大学博士基金项目(KYBS201411); 大理大学大学生科研基金项目(KYSX2015099)。

化^[2]，抗衰老等^[3]。但目前没有研究探讨心脉隆注射液对缺血性脑疾病的作用。本文通过建立永久性大鼠大脑中动脉阻塞模型(permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAO)来初步探讨心脉隆注射液对缺血损伤脑组织产生的作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠，雄性，体质量 250~300 g，湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供，动物合格证号：SCKX(湘)2011-0003。

1.2 药物与试剂 心脉隆注射液(Xinmailong injection, XML)，云南腾药制药股份有限公司，批号：150344；尼膜地平注射液(Nimodipine, Nim)，德国拜耳医药保健股份公司产品，批号：BXGSSP1；注射用灯盏花素(Breviscopine, Bre)，昆明龙津药业股份有限公司产品，批号：20150508-2，用生理盐水配制成相应浓度；氯化三苯基四氮唑(TTC)，如吉生物科技有限公司产品，批号：150326；~~20030801~~，蛋白质(考马斯亮蓝法)测试盒(批号：20160328)，超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(批号：20160325)，丙二醛(MDA)测试盒(批号：20160325)，谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒(批号：20160323)，均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器 JR-30 鼠恒温实验台，成都泰盟软件有限公司；电子天平，北京赛多利斯仪器系统有限公司；EMP-168G 半自动生化分析仪，深圳市思普电子有限公司；台式高速冷冻离心机，上海市离心机械所；台式干燥箱，重庆万达有限公司。

1.4 方法

(pMCAO)

1.4.1 大鼠大脑中动脉阻塞脑缺血模型的制备 ~~(pMCAO)~~ 取雄性 SD 大鼠 256 只，按体质量随机分为 8 组，每组 32 只，分别为假手术组、缺血模型组、心脉隆注射液组(5, 2.5, 1.25, 0.6 mg·kg⁻¹)、尼膜地平注射液组(0.4 mg·kg⁻¹)和灯盏花素组(1 mg·kg⁻¹)。大鼠以水合氯醛 300 mg·kg⁻¹ 腹腔注射麻醉，仰卧固定于 37 ℃ 的恒温实验台，参照文献方法^[4]制备 pMCAO 模型。在 pMCAO 30 min 后从大鼠尾静脉注射各组药物，假手术组和缺血模型组大鼠从尾静脉注射等量生理盐水；假手术组大鼠麻醉后，仅暴露颈内外动脉分叉，不闭塞大脑中动脉。每组大鼠分为 4 部分进行实验，一部分用于行为学评分和梗死率测定，一部分用于脑含水量测定，一部分用于生化指标测定，最后一部分用于脑组织病理检查。

1.4.2 神经行为学评分 pMCAO 24 h 后参照 Bederson

法^[5]对大鼠的行为缺陷进行评分，满分为 4 分，分数越高，动物行为障碍越严重。评分标准如下：0 分，未观察到神经症状，行为正常；1 分，提尾悬空时，动物手术对侧前肢表现为腕肘屈曲，肩内旋，肘外展，紧贴胸壁；2 分，推动物手术侧肩向对侧移动时，阻力降低；3 分，动物行走时整个躯体向手术对侧转圈；4 分，动物软瘫，不能自发行走。

1.4.3 脑组织梗死率的测定 pMCAO 24 h 后断头处死大鼠，取出大脑，间隔 2 min 连续作 5 个冠状切片。将脑切片置于含有 1 % TTC 的磷酸缓冲溶液中，于 37 ℃ 水浴避光孵 30 min 染色。然后，将染色好的脑片分离出苍白区(梗塞区)和非苍白区(正常区)，计算梗死率(%)= 苍白区质量 / (苍白区质量 + 非苍白区质量) × 100 %。

1.4.4 脑组织含水量的测定 pMCAO 24 h 后断头处死大鼠，取出大脑，沿中线分成左右半球，分别称湿重。之后将脑组织置于 100 ℃ 烘箱烘干，分别称左右半球干质量，并计算脑组织含水量(%)=(1 - 脑组织干质量 / 脑组织湿质量) × 100 %。最后，用左右半球含水量的差值进行各组间的比较。

1.4.5 生化指标的测定 pMCAO 24 h 后断头处死大鼠，取出大脑，以预冷的生理盐水制成 10 % 匀浆，1000 r·min⁻¹ 离心 10 min，弃沉淀，取上清，按照南京建成生物制品研究所试剂盒说明书测定脑组织中 SOD、GSH-PX、MDA 的含量。

1.4.6 观察脑组织病理切片 pMCAO 后 24 h 断头处死大鼠，取出大脑于 10 % 甲醛溶液中固定，取脑冠状切面制片，HE 染色后光镜下观察其大脑皮层细胞形态学改变。根据病变程度分别标记为“-”、“+”、“++”、“+++”。

1.5 统计学处理 数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。所有数据经 SPSS13.0 统计学软件处理，总体差异比较使用方差分析，组间比较使用 LSD 法。神经行为评分应用非参数秩和检验中的 Mann-Whitney U 法。

2 结果

2.1 心脉隆注射液对 pMCAO 大鼠神经行为学评分、脑含水量和脑梗塞面积的影响 与假手术组比较，pMCAO 24 h 后，大鼠行为障碍明显，神经行为评分显著升高，差异有统计学意义($P < 0.01$)；缺血侧出现脑水肿，与非缺血侧的脑含水量差值明显增加($P < 0.01$)；缺血侧还可见由于脑梗塞后产生的大范围苍白区。与缺血模型组比较，XML 5, 2.5, 1.25 mg·kg⁻¹、尼莫地平组和灯盏花素组显著减少缺血大

鼠的神经行为学评分, 差异有统计学意义($P < 0.01$); XML 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、尼莫地平组和灯盏花素组明显减轻脑含水量($P < 0.01$), 而 XML 其他剂量各组对脑水肿状况改善不明显; XML 5, 2.5, 1.25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、尼莫地平组和灯盏花素组均可不同程度地减少脑梗塞体积, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 结果见表 1。

表 1 XML 对 pMCAO 大鼠神经行为学评分、脑含水量和脑梗塞面积的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Bederson 评分	脑含水量差值 / %	梗塞体积比 / %
假手术组	8	-	0	-0.02 ± 0.8	0
缺血模型组	7	-	$3.0 \pm 0.6^{\#}$	$3.3 \pm 0.4^{\#}$	$33.9 \pm 8.1^{\#}$
XML 组	6	0.6	2.2 ± 0.8	2.9 ± 0.9	25.6 ± 7.0
	7	1.25	$1.8 \pm 0.4^{**}$	2.4 ± 0.7	$22.4 \pm 9.2^{*}$
	8	2.5	$1.6 \pm 0.5^{**}$	2.5 ± 0.9	$17.7 \pm 3.0^{**}$
	6	5	$1.3 \pm 0.5^{**}$	$1.8 \pm 0.9^{**}$	$17.7 \pm 11.0^{**}$
Nim 组	7	0.4	$1.3 \pm 0.8^{**}$	$1.6 \pm 1.0^{**}$	$15.1 \pm 6.8^{**}$
Bre 组	6	1	$1.6 \pm 0.5^{**}$	$1.9 \pm 0.6^{**}$	$18.6 \pm 7.2^{**}$

注: 与假手术组比较, $^{\#}P < 0.01$; 与缺血模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

2.2 心脉隆注射液对 pMCAO 大鼠脑组织 SOD、GSH-PX 活性和 MDA 含量的影响 与假手术组比较, pMCAO 24 h 后, 大鼠脑组织中 SOD、GSH-PX 活性均显著降低, MDA 含量显著升高, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。与缺血模型组比较, XML 5, 2.5, 1.25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、尼莫地平组和灯盏花素组均显著增加缺血大鼠脑组织中的 SOD 活性, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); XML 5, 2.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、尼莫地平组和灯盏花素组均明显增加缺血大鼠脑组织中的 GSH-PX 活性($P < 0.05$, $P < 0.01$); XML 5, 1.25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、尼莫地平组和灯盏花素组均显著降低缺血大鼠脑组织中的 MDA 的含量, 差异有统计学意

义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 结果见表 2。

表 2 XML 对 pMCAO 大鼠脑组织 SOD、GSH-PX 活性和 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	GSH-PX/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$
假手术组	8	-	152.6 ± 2.8	371.7 ± 79.5	3.49 ± 0.54
缺血模型组	8	-	$100.5 \pm 9.1^{\#}$	$177.0 \pm 63.8^{\#}$	$7.28 \pm 0.77^{\#}$
XML 组	7	0.6	114.0 ± 19.3	245.4 ± 94.1	6.64 ± 1.07
	8	1.25	$125.3 \pm 23.2^{*}$	270.7 ± 76.1	$5.55 \pm 1.26^{*}$
	7	2.5	$128.9 \pm 10.9^{**}$	$298.7 \pm 49.0^{*}$	5.98 ± 0.61
	7	5	$132.1 \pm 17.5^{**}$	$322.0 \pm 89.8^{**}$	$5.67 \pm 0.77^{*}$
Nim 组	7	0.4	$121.2 \pm 7.9^{*}$	$390.9 \pm 109.4^{**}$	$5.07 \pm 1.31^{**}$
Bre 组	8	1	$135.3 \pm 28.2^{**}$	$329.3 \pm 126.2^{**}$	$4.76 \pm 1.94^{**}$

注: 与假手术组比较, $^{\#}P < 0.01$; 与缺血模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

2.3 XML 对 pMCAO 大鼠大脑皮层细胞形态学的影响 假手术组大鼠共 8 例, 脑组织皮层神经元均基本正常, 核居中, 少有神经元变性(-); 缺血模型组大鼠共 8 例, 有 7 例可见神经元变性、坏死、胞体肿胀(++ ~ +++)、细胞核出现不同程度的深染、固缩; XML 0.6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 共 8 例, 有 6 例可见神经元仍然呈现水肿状态(++ ~ +++), 核深染、固缩情况有一定程度减轻; XML 1.25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 共 8 例, 有 5 例可见神经元变性、坏死(++ ~ +++), 核深染、固缩情况有一定程度改善; XML 2.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 共 8 例, 有 5 例可见神经元变性、坏死(+ ~ +++), 而对核深染、固缩情况也有一定程度的改善; XML 5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 共 8 例, 有 4 例可见神经元轻度变性(+ ~ ++), 但核固缩和胞体肿胀程度明显减轻; 尼莫地平组共 8 例, 有 4 例可见神经元轻度变性(+ ~ ++), 神经元数目较模型组增多; 灯盏花组中共 8 例, 有 6 例可见神经元变性(+ ~ +++), 核固缩和胞体肿胀程度有一定程度减轻。结果见图 1。

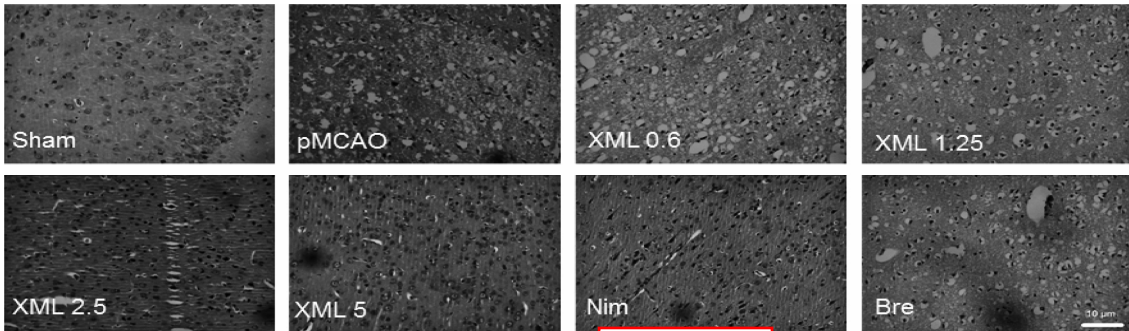


图 1 XML 对 pMCAO 大鼠大脑皮层细胞形态学的影响(HE, 10 μm)

Figure 1

3 讨论

大鼠大脑中动脉阻塞致脑缺血法是研究缺血性脑血管疾病常用的模型之一^[6]，我们在此模型上评价了心脉隆注射液对脑缺血的影响。脑缺血缺氧损伤组织后，能量缺陷导致血脑屏障的内皮细胞受损，释放大炎症介质，促使毛细血管通透性增高，形成血管源性脑水肿，而能否减轻缺血后脑水肿是衡量治疗药物疗效的主要指标^[7]。以往研究表明，XML 可改善心力衰竭患者的血管内皮功能，减轻肺水肿，而本研究表明，XML 能一定程度地减轻缺血大鼠的脑水肿发生，尽管这种作用不明显（仅在使用最高剂量的 XML 才产生）。同时，XML 还能剂量依赖性地改善缺血后大鼠的神经行为缺陷，减少脑梗塞体积，部分恢复或者阻止神经元变性、坏死，减轻细胞核固缩、深染状态，减少缺血软化灶的形成，且 5、2.5 mg·kg⁻¹ 的 XML 产生的保护作用类似 0.4 mg·kg⁻¹ 尼莫地平，而优于常用于缺血性脑中风的中药单体 1 mg·kg⁻¹ 的灯盏花素，这些作用均表明 XML 对缺血性脑损伤大鼠有较好的保护作用 and 开发前景。

缺血性脑中风是一个复杂的病理过程，并与很多损伤性机制相关，如能量耗竭、细胞内钙超载、兴奋性氨基酸毒性、细胞因子释放、脂质细胞激活、细胞凋亡和炎症反应等^[8]。其中，自由基过量会超过机体的清除能力，造成连锁反应引起神经组织损伤^[9]。本实验中，XML 可以增加 SOD（体内清除自由基的酶类成分）和 GSH（体内清除自由基的非酶类成分）活性，从而增加机体清除自由基能力，同时减少 MDA（可间接反应自由基的含量）的增多，减轻过量自由基的蓄积，有利于保护脑组织。这些发现与 XML 保护自由基损伤后的心肌细胞的作用相一致，从而进一步表明 XML 具有较好的抗氧化能力，这可能有利于其对大鼠缺血性脑中风的保护作用。XML 的原料为美洲大蠊，而美洲大蠊的主要成分是肽类物质^[10]。多肽类物质（如大豆肽、肌肽等）、氨基酸类（如咖啡因）已被发现有较好的抗氧化活性，其抗氧化活性主要通过暴露于肽链两端的氨基酸表现^[11]。因此，在制备 XML 的过程中，产生的多个较短的肽段可能是其表现抗氧化活性的关键。两个阳性对照药物中，抗氧化能力最好的是 1 mg·kg⁻¹ 的灯盏

花素，而 5 mg·kg⁻¹ 的 XML 稍弱于灯盏花素。

心脉隆注射液对于心力衰竭的预防和治疗得到了患者的普遍认可，尤其是促进损伤细胞（如心肌内皮细胞^[12]和神经干细胞^[2]）的增生是其优于其他药物的特点。本文则用 pMCAO 模型验证了 XML 对缺血性脑损伤有一定的保护作用，为其在这些方面的临床应用提供了重要的实验依据。但是 XML 促进缺血脑组织恢复的具体机制以及药物干预后的远期效果仍需进一步研究。

参考文献：

- [1] 唐晓鸿. 心脉隆注射液药理作用和治疗心力衰竭临床研究进展[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(6): 461-464.
- [2] 满潇潇, 于君, 王晓云, 等. 心脉隆注射液对新生 SD 大鼠海马神经干细胞增殖分化的影响[J]. 山东大学学报(医学版), 2012, 50(6): 46-50.
- [3] 彭芳, 刘晓波, 方春生, 等. 心脉龙注射液对大鼠缺氧-复氧心肌细胞内游离钙离子及脂质过氧化物的影响[J]. 中国药业, 2003, 12(1): 33-35.
- [4] 沈磊, 张鸽, 吴玉林. 淫羊藿总黄酮对局部缺血大鼠的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(4): 266-269.
- [5] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
- [6] Goto S, Sampei K, Alkayed NJ, et al. Characterization of a new double-filament model of focal cerebral ischemia in heme oxygenase-2-deficient mice[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003, 285(1): 222-230.
- [7] 刘亚敏, 夏鑫华, 赵光锋, 等. 麝香配伍冰片对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑含水量及血脑屏障通透性的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2007, 24(6): 498-501.
- [8] Kaur H, Prakash A, Medhi B. Drug Therapy in Stroke: From Preclinical to Clinical Studies[J]. Pharmacology, 2013, 92(5-6): 324-334.
- [9] Manning NW, Campbell BC, Oxley TJ, et al. Acute Ischemic Stroke: Time, Penumbra, and Reperfusion[J]. Stroke, 2014, 45(2): 640-644.
- [10] 满红霞, 黄丽, 那凯歌, 等. 药用昆虫美洲大蠊化学成分及其药理作用的研究进展[J]. 抗感染药学, 2014, 11(5): 403-407.
- [11] 蒋海萍, 廖丹葵, 童张法. 抗氧化活性肽的研究进展[J]. 广西科学, 2015, 22(1): 60-64.
- [12] 张文静, 王琳琳, 宋树英. 心脉隆注射液对动脉粥样硬化大鼠血管内皮细胞的保护作用[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2012, 28(2): 79-81.

(编辑: 宋威)