

银杏蜜环口服溶液减轻脑缺血再灌注大鼠脑梗死的实验研究

宋文婷¹ 刘建勋¹ 姚明江¹ 王光蕊¹ 王益民² 王 勇² 徐 立²

(1 中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京, 100091; 2 西安步长中医心脑血管病医院, 西安, 710082)

摘要 目的: 评估银杏蜜环口服溶液对缺血再灌注损伤大鼠脑组织的保护作用, 从神经功能评分、脑梗死范围及抗氧化能力探讨银杏蜜环口服溶液保护受损脑组织的药效。方法: 首先建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型, 将大鼠随机分为假手术组、模型组、金纳多组、银杏叶提取物组、天麻蜜环菌素片组、天麻蜜环菌粉组、银杏蜜环口服溶液 618 mg/kg 组、银杏蜜环口服溶液 309 mg/kg 组共 8 组。除假手术组只分离血管不进行缺血外, 其他组大鼠均以线栓阻塞大脑中动脉, 1.5 h 后再灌注, 造成缺血再灌注损伤模型。缺血同时经十二指肠给予各受试药物, 假手术和模型组按 3 mL/kg 体积给予生理盐水。于 6 h、24 h 进行神经功能评分, 末次神经行为评分后取血检测血清中 SOD、MDA、GSH-Px 水平; 取脑后 TTC 染色, 计算脑梗死范围。结果: 与模型组比较, 银杏蜜环口服溶液组大鼠脑梗死范围显著缩小; 大鼠 24 h 神经功能评分提高; 血清 SOD 及 GSH-Px 活力增强, MDA 水平降低, 且优于银杏叶提取物组和天麻蜜环菌组。结论: 银杏蜜环口服溶液可减小缺血再灌注大鼠脑梗死范围, 减轻神经功能损伤, 其抗氧化作用有可能起到神经保护的作用。

关键词 银杏蜜环口服溶液; 缺血再灌注; 脑梗死; 神经功能评分; 抗氧化能力

Study on Yinxing Mihuan Oral Solution in Alleviating Ischemia/reperfusion Injury on Focal Cerebral Infarction Model Rats

Song Wenting¹, Liu Jianxun¹, Yao Mingjiang¹, Wang Guangrui¹, Wang Yimin², Wang Yong², Xu Li¹

(1 Institute of Basic Medical Sciences of Xiyan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Beijing 100091, China; 2 Xi'an Buchang Traditional Chinese Cardio-Cerebrovascular Disease Hospital, Xi'an 710082, China)

Abstract Objective: To evaluate the protective effects of Yinxing Mihuan Oral Solution on brain tissues of ischemia/reperfusion injury model rats, and to explore the pharmaceutical effect in protecting injured brain tissue from neurological deficit score, cerebral infarction range and anti-oxidant effect. **Methods:** Rats ischemia/reperfusion model was established by nylon thread insertion into middle cerebral artery, and then the model rats were randomized into 8 groups of sham operation group, model group, gintonin group, ginkgo leaf extraction group, gastrodia tuder halimasch tablet group, gastrodia tuder halimasch powder group, Yinxing Mihuan Oral Solution 618 mg/kg group and Yinxing Mihuan Oral Solution 309 mg/kg group. The sham group was only subjected to carotid artery separation without occlusion. Rats in other groups was blocked middle cerebral artery by a thread plug, and reperfusion after 1.5 h, resulting in ischemia-reperfusion injury model. At the same time, drugs were administrated from duodenum with a dose of 3 mL/kg respectively. Sham group was given saline at the same volume instead. Neurological deficit scores were taken one-side blinded 6 h and 24 h after ischemia onset. After the second time of scoring, the rats were sacrificed, and blood sample were taken for serum level examination of SOD, MDA and GSH-PX. Brain was taken for TTC staining to calculate cerebral infarction range. **Results:** Yinxing Mihuan Oral Solution groups had a significant reduce in cerebral infarction area and MDA level of serum, while a significant increase in 24 h neurological deficit score and serum level of SOD and GSH-PX compared with model group, which was also better than the results of ginkgo leaf extraction group and gastrodia tuder halimasch group. **Conclusion:** Brain infarction area due to ischemia/reperfusion of rats was reduced by Yinxing Mihuan Oral Solution, with increased neurological deficit scores. The results suggest the brain protective efficacy of Yinxing Mihuan Oral Solution might be related to its anti-oxidative effect.

Key Words Yinxing Mihuan Oral Solution; Ischemia/reperfusion; Cerebral infarction; Neurobehavioral scores; Anti-oxidant effect

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.01.008

基金项目: 国家自然科学基金项目(81603617); 国家科技重大专项“重大新药创制”(2017ZX09301018)

作者简介: 宋文婷(1982.02—), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 脑血管药理学研究, E-mail: wenting_song1@163.com

通信作者: 徐立(1960.08—), 女, 学士, 研究员, 研究方向: 脑血管药理学研究, E-mail: xuli230@126.com

银杏蜜环口服溶液由银杏叶提取物、天麻蜜环菌粉组成。其主要组分银杏叶提取物可改善脑部及周边血液循环,天麻蜜环菌可镇静安神。银杏蜜环口服溶液上市后,广泛用于缺血性脑血管疾病、慢性脑低灌注、老年性高血压等脑部疾病,可改善血压、血流和脑缺血症状^[1-5];也广泛应用于心绞痛的临床治疗^[6-7],可改善心肌缺血的症状。

本课题组前期实验研究证明银杏蜜环口服溶液可保护缺氧复氧的血管内皮细胞,其保护作用可能是通过作用 p38 MAPK 调节 eNOS/NO 信号途径实现的^[8]。然而银杏蜜环口服溶液对于实验动物脑梗死的保护作用尚未见报道。故本研究采用大鼠局灶性脑缺血再灌注模型,研究银杏蜜环口服溶液的脑保护及抗氧化作用,并比较其全方和主要组分的药效,探讨组分间的协同作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD 种大鼠,雄性,220 ~ 240 g,由维通利华(北京)实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2012-0001。合格证号:11400700161146。

1.1.2 药物 1)银杏蜜环口服溶液(邳崧天银制药有限公司生产,批号:160312);2)银杏叶提取物(邳崧天银制药有限公司生产,批号:160402);3)天麻蜜环菌粉(邳崧天银制药有限公司生产,批号:20151027);4)金纳多(银杏叶提取物片,德国威玛舒培博士药厂生产,批号:5260613);5)天麻蜜环菌片(江苏神华药业有限公司生产,批号:20160602)

1.1.3 试剂与仪器 氯化-2,3,5-三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride, TTC),国药集团化学试剂有限公司,用 0.2 mol/L PBS(pH 7.2)配成 1.2% 浓度,低温避光保存;水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司,批号 20131027);SOD、GSH-PX、MDA 试剂盒(南京建成生物工程研究所提供,批号分别为:20161216,20161216,20161217),尼龙栓线(北京西浓科技有限公司 2432-100 型)。多媒体彩色病理图文分析系统,国产 MPIAS-500 型。超声破碎仪,美国 SONICS VCX150PB 型。超速离心机,日本 HITACHI 55P-72 型。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 动物随机分配入各组中:假手术组,模型组,金纳多 18 mg/kg 组,银杏叶提取物(银提)9 mg/kg 组,天麻蜜环菌素片(蜜环菌片)600 mg/kg 组,天麻蜜环菌粉(蜜环菌粉)300 mg/kg 组,银杏蜜环口服溶液 618 mg/kg(银蜜高剂量)组,

银杏蜜环口服溶液 309 mg/kg(银蜜低剂量)组,共 8 组,每组 10 只。用 4% 水合氯醛麻醉大鼠(1 mL/100 g),以恒温电热毯将动物体温维持在 37 ℃,动物仰卧位固定,沿颈部中线切开皮肤及皮下组织,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)及颈外动脉(ECA),结扎 ECA 与 CCA,夹闭 ICA 远心端,于 ECA 与 ICA 分叉处作一“V”字形切口,插入直径为 0.24 mm 的尼龙线栓,松开动脉夹,继续插入尼龙线至稍有阻力后略回撤,线栓插入深度为(20 ± 2)mm 左右,尼龙线外留约 1 cm,缝合颈部切口,插线的末端固定于切口外。1.5 h 后轻轻提拉线头至略有阻力,表明线的头端已抽出颈内动脉,实现再灌注,剪断插线皮外段。模型成功的标志:动物麻醉清醒后出现缺血侧 Horner's 征及对侧以前肢为主的偏瘫,无此症状的弃去不用,其余回笼饲养,并保持体温。

1.2.2 给药方法 在插入线栓(缺血)后经十二指肠给予各受试药物。除银杏蜜环口服溶液 618 mg/kg 组外,各给药组均按 3 mL/kg 体积给予受试药物,假手术和模型组按 3 mL/kg 体积给予生理盐水。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 神经行为学评分 采用单盲法观察大鼠神经行为学,以 Longa 5 分制评分标准^[9]:无神经损伤症状,0 分;不能完全伸展左侧前爪,1 分;向非缺血侧转圈,2 分;行走时向非缺血侧倾倒,3 分;不能自发行走,意识昏迷,4 分。于缺血后 6 h、24 h 各进行 1 次评分。

1.2.3.2 脑梗死范围 动物进行末次神经行为评分后,称体质量,以 4% 水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,离心分离血清 -80 ℃ 冻存;随后迅速断头取脑,置于冰浴台上,从前往后作冠状位切片,平均切成 5 个脑片(第四脑片先切 0.5 mm 薄片液氮冻存),将大脑切片浸泡于 1.2% TTC 磷酸缓冲液中,37 ℃ 恒温避光孵育约 10 min,正常脑组织染为玫瑰红色,脑梗死区不染色(白色),将脑片浸泡于 10% 福尔马林溶液中固定 4 h。福尔马林固定的脑片按脑的前后顺序整齐排列,经摄像头采样(固定采样高度),用多媒体彩色病理图文分析系统计算大鼠全脑面积及脑梗死面积,以梗死面积/全脑面积表示脑梗死范围。

1.2.3.3 血清 SOD、GSH-PX 活力以及 MDA 水平检测 按照说明书进行检测。

1.3 统计学方法 剔除死亡、蛛网膜下腔出血及不缺血的实验动物,各组数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。除行为学数据外,采用 SPSS 16.0 统计学软件对数据进行统计学分析,以 One-way ANOVA 进行统计。

神经功能评分以 SPSS 16.0 统计学软件对非参数检验中 Kruskal-wallis test 和 Mann-Whitney test 统计。

2 结果

2.1 对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑梗死范围、神经行为学的影响 缺血再灌注 24 h, 模型组大鼠术侧局部缺血严重, 形成明显的梗死灶。与模型组比较, 金纳多组、银杏叶提取物组及银杏蜜环口服溶液 309 mg/kg 和 618 mg/kg 剂量组脑梗死范围均显著减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。缺血后 6 h, 模型组动物可见明显的神经功能损伤, 主要表现为左肩内收、屈曲, 前肢无力, 向非缺血侧转圈, 行走时向非缺血侧倾倒等。与模型组比较, 所有给药组均未表现出明显的改善神经症状的作用。缺血后 24 h, 与模型组比较, 金纳多组、银杏叶提取物组、天麻蜜环菌片组及银杏蜜环口服溶液 309 mg/kg 和 618 mg/kg 剂量组均有明显改善神经症状的作用, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 1, 图 1~2。

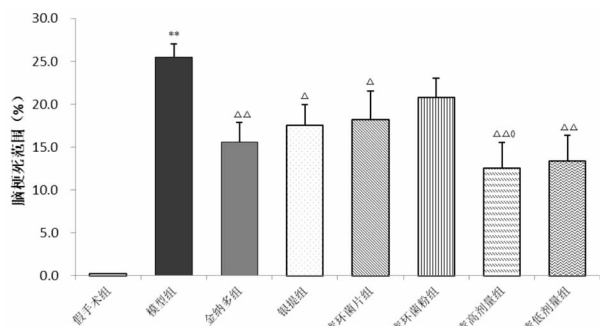


图 1 银杏蜜环口服溶液对 MCAO 大鼠脑梗死范围的影响

注:与假手术组(正常对照组)比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与金纳多组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;与银杏叶提取物比较, $\square P < 0.05$, $\square\square P < 0.01$;与天麻蜜环菌片比较, $\blacksquare P < 0.05$, $\blacksquare\blacksquare P < 0.01$;与天麻蜜环菌粉比较, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$

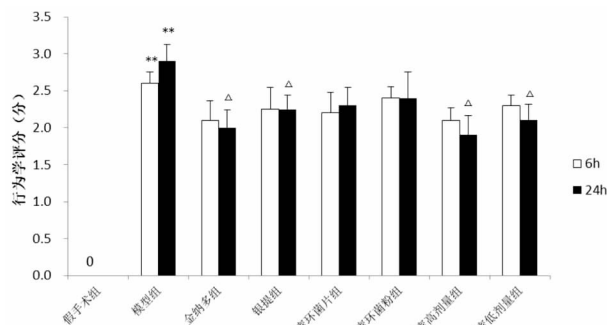


图 2 银杏蜜环口服溶液对 MCAO 大鼠行为学的影响

注:与假手术组(正常对照组)比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与金纳多组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;与银杏叶提取物比较, $\square P < 0.05$, $\square\square P < 0.01$;与天麻蜜环菌片比较, $\blacksquare P < 0.05$, $\blacksquare\blacksquare P < 0.01$;与天麻蜜环菌粉比较, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$

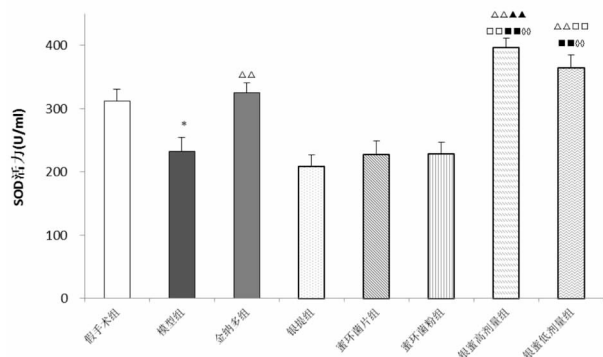


图 3 银杏蜜环口服溶液对 MCAO 大鼠 SOD 活力的影响

注:与假手术组(正常对照组)比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与金纳多组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;与银杏叶提取物比较, $\square P < 0.05$, $\square\square P < 0.01$;与天麻蜜环菌片比较, $\blacksquare P < 0.05$, $\blacksquare\blacksquare P < 0.01$;与天麻蜜环菌粉比较, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$

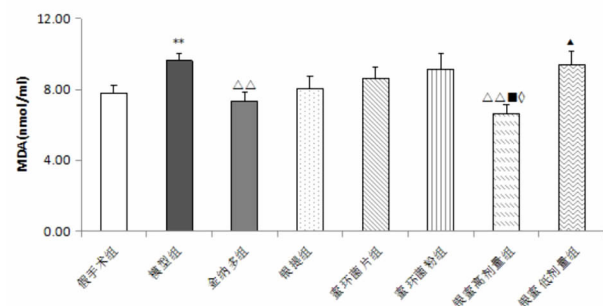


图 4 银杏蜜环口服溶液对 MCAO 大鼠 MDA 水平的影响

注:与假手术组(正常对照组)比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与金纳多组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;与银杏叶提取物比较, $\square P < 0.05$, $\square\square P < 0.01$;与天麻蜜环菌片比较, $\blacksquare P < 0.05$, $\blacksquare\blacksquare P < 0.01$;与天麻蜜环菌粉比较, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$

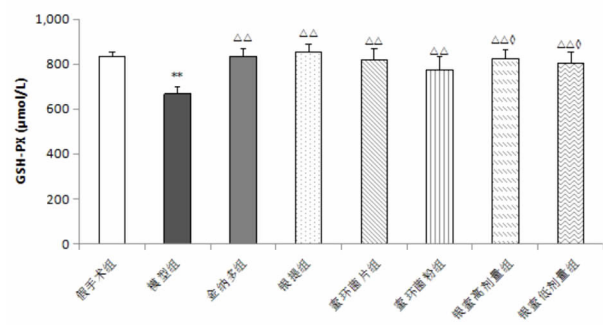


图 5 银杏蜜环口服溶液对 MCAO 大鼠血清 GSH-PX 的影响

注:与假手术组(正常对照组)比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与金纳多组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$;与银杏叶提取物比较, $\square P < 0.05$, $\square\square P < 0.01$;与天麻蜜环菌片比较, $\blacksquare P < 0.05$, $\blacksquare\blacksquare P < 0.01$;与天麻蜜环菌粉比较, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$

蜜环口服溶液 618 mg/kg 组 SOD 活力显著强于 18 mg/kg 及 9 mg/kg 组,与天麻蜜环菌比较,银杏蜜环口服溶液 618 mg/kg 组梗死范围明显小于 600 mg/kg 组, SOD 活力显著强于 600 mg/kg 和 300 mg/kg 组, MDA 显著低于 600 mg/kg 和 300 mg/kg 组, GSH-Px 活性显著高于 300 mg/kg 组。

与银杏叶提取物比较,银杏蜜环口服溶液 309 mg/kg 组 SOD 活力显著高于 9 mg/kg 组;与天麻蜜环菌比较,银杏蜜环口服溶液 309 mg/kg 组 SOD 活力显著高于 600 mg/kg 和 300 mg/kg 组, GSH-Px 活性显著高于 300 mg/kg 组。

银杏蜜环口服溶液的主要组分包括银杏叶提取物和天麻蜜环菌,既往文献表明银杏叶提取物和天麻蜜环菌均具有一定的抗氧化作用^[12-15]。本研究发现银杏叶提取物和天麻蜜环菌均具有不同程度的抗氧化作用,而银杏蜜环口服溶液组在治疗脑梗死药效和抗氧化作用方面均显著优于相同剂量下的银杏叶提取物组和天麻蜜环菌组,表明银杏蜜环口服溶液对脑梗死大鼠的抗氧化作用优于单一组分,2 种组分间具有协同增效作用,还需进一步进行配伍研究。

参考文献

- [1]周欣满,宋宝林.银杏蜜环口服液治疗缺血性脑血管疾病疗效观察[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(23):163.
- [2]杨媛.银杏蜜环口服液联合苯磺酸氨氯地平治疗老年高血压的疗效观察[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(1):116.
- [3]孔伟.银杏蜜环口服液对于脑缺血性疾病治疗的临床探究

[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(54):73-74.

- [4]李广宣.银杏蜜环口服溶液治疗风痰瘀血证脑梗死临床研究[J].中医学报,2013,28(5):737-738.
- [5]江承平,吴碧华.银杏蜜环口服液联合氟桂利嗪治疗慢性脑供血不足的临床观察[J].中国医院药学杂志,2010,30(1):57-60.
- [6]闫洁,袁森.银杏蜜环口服溶液联合阿司匹林肠溶片和氯吡格雷治疗冠心病心绞痛的疗效观察[J].现代药物与临床,2016,31(10):1575-1578.
- [7]彭丽岚,龚举贤.银杏蜜环口服液治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病心绞痛疗效观察[J].四川中医,2017,35(4):192-193.
- [8]韩笑,徐立,刘建勋等.银杏蜜环口服溶液作用 p38 MAPK 调节 eNOS/NO 信号途径保护人脐静脉内皮细胞缺氧复氧损伤[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(23):79-84.
- [9]Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [10]Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). Recommendations for Standards Regarding Preclinical Neuroprotective and Restorative Drug Development[J]. Stroke, 1999, 30(12):2752.
- [11]Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, et al. Update of the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable Preclinical Recommendations[J]. Stroke, 2009, 40(6):2244-2250.
- [12]李无双,周燕.银杏叶提取物抗氧化作用的研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(26):37-38.
- [13]刘馨雨,郑咏秋,刘建勋.银杏叶有效成分抗脑缺血再灌注损伤作用的机制研究进展[J].世界中医药,2013,8(10):1142-1146.
- [14]杜刚,田孟华,高路,等.蜜环菌菌素抗氧化作用初步研究[J].云南化工,2017,44(1):14-17.
- [15]翟凤艳,张方鹏,崔明洋,等.蜜环菌提取物抗氧化及抑菌活性研究[J].河南科技学院学报:自然科学版,2013,41(3):71-74.

(2017-12-20 收稿 责任编辑:张文婷)

(上接第 35 页)

- [2]Aggarwal M, Aggarwal B, Rao J. Integrative Medicine for Cardiovascular Disease and Prevention[J]. Med Clin North Am, 2017, 101(5): 895-923.
- [3]毕颖斐,毛静远,王贤良,等.中医药防治冠心病临床优势及有关疗效评价的思考[J].中医杂志,2015,56(5):437-440.
- [4]曲文彦,吕晓濛,赵娜,等.中医药治疗冠心病作用机制概述[J].辽宁中医药大学学报,2016,18(3):66-68.
- [5]张璇,张林亭,张霞.芪龙胶囊对急性脑梗死患者的疗效观察[J].中华老年心脑血管病杂志,2011,13(5):435-437.
- [6]孙晋营,刘书珍,王军强,等.芪龙胶囊治疗冠心病不稳定型心绞痛疗效观察[J].中国中医药科技,2014,21(6):663.
- [7]张琼,苗青,王伟.芪龙胶囊治疗中风病中经络(气虚血瘀证)的临床研究[J].中药新药与临床药理,2001,12(2):77-79.
- [8]李磊,任建勋,林治荣,等.丹酚酸 A 不同给药途径对犬急性心肌梗死影响[J].中国中药杂志,2016,41(5):910-916.
- [9]刘卫红,周明学,李思耐,等.脑心同治理论对临床的指导意义

[J].世界中医药,2017,12(2):241-242.

- [10]赵涛,赵步长,贾力夫,等.“脑心同治”理论研究进展[J].中医临床研究,2015,16(27):8-10.
- [11]陈迪,唐仕欢,卢朋,等.基于数据科学的脑心同治机制研究[J].中国中药杂志,2015,40(21):4288-4296.
- [12]高轩,李永秋,高海凤,等.芪龙胶囊对慢性脑供血不足患者脑血流速度及血液流变学的影响[J].中华老年心脑血管病杂志,2008,10(8):627-627.
- [13]张琼,苗青,王伟.芪龙胶囊治疗中风病中经络(气虚血瘀证)的临床研究[J].中药新药与临床药理,2001,12(2):77-79.
- [14]赵秋实,王大杰,孙剑萍,等.ST 段抬高指数回落对急性 ST 段抬高型心肌梗死患者左心室功能的预测价值[J].实用心电学杂志,2015,24(6):440-442.
- [15]黄磊,张雯,孙帅军,等.补心软脉颗粒对麻醉犬急性心肌梗死的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(10):99-103.

(2017-12-20 收稿 责任编辑:张文婷)