

· 基础研究 ·

葛根及川芎合用对缺血再灌注大鼠保护作用的研究

黄安安, 高 丽

(遵义医学院附属医院, 贵州遵义 563000)

摘要:目的 研究葛根及川芎合用对缺血再灌注大鼠的保护作用,为临床提供数据参考。方法 选取 120 只 SD 大鼠分为正常对照组,假手术组,模型组,葛根联合川芎高、中、低剂量组,葛根组,川芎组。正常对照组、假手术组、模型组均给予等体积生理盐水灌胃;葛根联合川芎高、中、低剂量组分别给予 8、4、2 g/kg 葛根及川芎灌胃;葛根组给予 4 g/kg 葛根灌胃;川芎组给予 4 g/kg 川芎灌胃。灌胃时间为再灌注 0、6 h 时。测定脑组织含水量,神经功能缺损评分及脑组织肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)的含量。结果 模型组与正常对照组比较大鼠脑组织含水量、神经功能缺损评分及 TNF- α 、IL-6 的含量明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。葛根联合川芎高、中剂量组及葛根组、川芎组与模型组比较大鼠脑含水量及 TNF- α 、IL-6 的含量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 葛根及川芎合用对缺血再灌注大鼠可起到保护作用,其机制可能与降低脑组织含水量、改善神经功能以及降低脑炎症因子含量有关。

关键词:葛根;川芎;脑缺血;再灌注损伤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.34.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)34-3621-02

The proective effect of Puerarialobata and rhizoma Chuanxiong on ischemia reperfusion rats

Huang An'an, Gao Li

(The Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract:Objective To study Puerarialobata and Rhizoma Chuanxiong combination on ischemia reperfusion in rats and the protective effect, and provide reference data for clinical. **Methods** 120 SD male rats were divided into normal control group, sham operation group, model group, Puerarialobata and Chuanxiong in high, medium and low dose group, Puerarialobata group and Chuanxiong group. Normal control group, sham operation group, model group were given equal volumes of saline lavage; Puerarialobata and Chuanxiong high, medium and low dose group were given 8 g/kg, 4 g/kg, 2 g/kg kudzu vine root and Rhizoma Chuanxiong gavage; Puerarialobata group was given 4 g/kg kudzu gavage; Chuanxiong group was given 4 g/kg Chuanxiong gastric perfusion. Gastric lavage for reperfusion 0 h, 6 h. Detecting the water content of brain, neural function defect score and brain tumor necrosis factor, interleukin6 content. **Results** In the model group and normal control group comparison of rat brain water content, neural function defect score and tumor necrosis factor, interleukin 6 were significantly increased ($P < 0.01$). Puerarialobata + Rhizoma Chuanxiong high and medium dose group and Puerarialobata group, Chuanxiong group compared with the model group rats brain water content and tumor necrosis factor, interleukin 6 were significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The root and Rhizoma Chuanxiong combination on ischemia reperfusion rats may play a protective role, its mechanism may be associated with brain water content, improve the nerve function and reduces brain inflammation factor content.

Key words: puerarialobata; rhizoma Chuanxiong; brain ischemia; reperfusion injury

葛根为豆科植物野葛的干燥根,习称野葛。其化学成分主要包括有葛根素、黄豆苷和黄豆苷元。川芎为伞形科植物川芎的干燥根茎,其化学成分主要包括川芎嗪、阿魏酸和藁本内酯类化合物。二者在临床上常联合用于治疗心脑血管疾病,本研究建立大鼠脑缺血再灌注模型,采用两药联用探讨其对心脑血管的保护作用,为临床用药提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料 选取清洁级 SD 大鼠,雌雄合用,体质量(200 ± 20)g,购自重庆医科大学动物实验中心。葛根及川芎购自遵义医学院附属医院中药房,经鉴定为豆科植物野葛的干燥根及伞形科植物川芎的干燥根茎。葛根及川芎水提液由本实验室自制,即将药材分别粉碎后加水浸润 1 h,然后分别加水 8 倍、6 倍煎煮 2 次,第 1 次 2 h,第 2 次 1 h,抽滤,合并滤液,浓缩到 500 mL,相当于原药材 0.4/mL,0~5 °C 冷藏备用。

1.2 仪器与试剂 采用全自动酶标仪 MK3(美国 THERMO 公司);低温离心机 3K15(德国 SIGMA 公司);烘箱 Z91-2290-81[艾普瑞(上海)精密光电有限公司];天平 FA1004N(上海天

普分析仪器有限公司)。肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒购自南京建成生物工程技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 复制模型 根据 Borti 等^[7]方法制作大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)型,腹腔注射 10% 水合氯醛(350 mg/kg)以麻醉大鼠,分离、结扎并切断右侧颈外动脉,由颈外动脉残端沿颈总和颈内动脉缓慢插入头端膨大的尼龙鱼线约 18 mm,阻塞大脑中动脉入口造成缺血。缺血 3 h 后拔出栓线进行 24 h 再灌注。假手术组仅分离颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉但不插线。

1.3.2 分组与给药 选取 120 只 SD 大鼠分为正常对照组(等容生理盐水)、假手术组(等容生理盐水)、模型组(等容生理盐水)、葛根联合川芎高、中、低剂量组(8、4、2 g/kg)、葛根组(44 g/kg)、川芎组(4 g/kg)。灌胃给药,灌胃时间为再灌注 0、6 h 时。

1.3.3 脑组织含水量的测定 灌注 24 h 后,分别腹腔注射

10% 水合氯醛(350 mg/kg)麻醉大鼠,迅速断头取脑,称质量,记录。将脑组织置于 80 ℃ 烤箱内烘烤 48 h,称干质量,记录,按 Ellis 公式计算含水量:脑组织含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100 %。

1.3.4 神经功能评分 灌注 24 h 后,参照 Bederson 等^[3]分级方法观察大鼠神经行为学变化,进行行为学评分。0 级:无神经功能缺失症状;1 级:提尾时病灶对侧肢体屈曲;2 级:除 1 级征象外伴有向病灶对侧的侧推阻力下降;3 级:除 1、2 级征象外伴有活动时向瘫痪侧旋转征象。

1.3.5 脑组织中 TNF-α 及 IL-6 的测定 灌注 24 h 后,取大鼠脑组织,准确称质量,按质量(g)与体积(mL)为 1:9 的比例加 9 倍体积的 PBS,冰水中匀浆,3 000 r/min 离心后取上清液待测。酶标仪分别在 492 nm 及 450 nm 波长下测定 TNF-α 及 IL-6 的含量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行 *t* 检验,数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用 *t* 检验,用 Spearman 等级相关分析相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 葛根及川芎合用对模型大鼠脑组织含水量的影响 模型组与正常对照组比较大鼠脑组织含水量明显增加($P < 0.01$)。葛根联合川芎高、中剂量组及葛根组、川芎组与模型组比较大鼠脑组织含水量明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。4 g/kg 葛根联合川芎降低模型大鼠脑组织含水量的功效等同与 4 g/kg 葛根或川芎单一用药时的功效;8 g/kg 葛根联合川芎降低模型大鼠脑组织含水量的功效优于与 4 g/kg 葛根或川芎单一用药时的功效($P < 0.05$),结果见表 1。

表 1 葛根及川芎合用对模型大鼠脑组织含水量的影响

组别	<i>n</i>	剂量(g/kg)	脑组织含水量(%)
正常对照组	15	—	74.38±0.32**
假手术组	15	—	75.04±0.36
模型组	15	—	85.17±0.53
葛根联合川芎高剂量组	15	8	75.42±0.47**#
葛根联合川芎中剂量组	15	4	79.49±0.41*
葛根联合川芎低剂量组	15	2	83.53±0.49
葛根组	15	4	79.32±0.39*
川芎组	15	4	78.87±0.61

** : $P < 0.05$,与模型组比较; * : $P < 0.01$,与模型组比较; # : $P < 0.05$,与单一用药组比较; — : 表示无数据。

2.2 葛根及川芎合用对模型大鼠神经功能评分的影响 模型组与正常对照组比较大鼠神经功能缺损评分明显上升($P < 0.01$)。葛根联合川芎高、中剂量组及葛根组、川芎组与模型组比较大鼠脑组织含水量明显下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。4 g/kg 葛根联合川芎改善模型大鼠神经功能缺损状态的功效等同与 4 g/kg 葛根或川芎单一用药时的功效;8 g/kg 葛根联合川芎改善模型大鼠神经功能缺损状态的功效优于 4 g/kg 葛根或川芎单一用药时的功效($P < 0.05$),结果见表 2。

2.3 葛根及川芎合用对 TNF-α 及 IL-6 的影响 模型组与正常对照组比较,TNF-α 及 IL-6 含量明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。葛根联合川芎高、中剂量组及葛根组、川芎组与模型组比较,TNF-α 及 IL-6 含量明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。4 g/kg 葛根联合川芎改善 TNF-α

及 IL-6 水平等同于 4 g/kg 葛根或川芎单一用药时的效果;8 g/kg 葛根联合川芎改善 TNF-α 及 IL-6 水平明显优于 4 g/kg 葛根或川芎单一用药时的效果,差异有统计学意义($P < 0.05$),结果见表 3。

表 2 葛根及川芎合用对模型大鼠神经功能评分的影响

组别	<i>n</i>	剂量(g/kg)	神经功能缺损评分
正常对照组	15	—	0.10±0.29**
假手术组	15	—	0.20±0.26
模型组	15	—	2.70±0.54
葛根联合川芎高剂量组	15	8	1.70±0.60**#
葛根联合川芎中剂量组	15	4	2.20±0.40*
葛根联合川芎低剂量组	15	2	2.50±0.50
葛根组	15	4	2.10±0.48*
川芎组	15	4	2.20±0.54*

* : $P < 0.05$,与模型组比较; ** : $P < 0.01$,与模型组比较; # : $P < 0.05$,与单一用药组比较; — : 表示无数据。

表 3 葛根及川芎合用对 TNF-α 及 IL-6 的影响

组别	<i>n</i>	剂量(g/kg)	TNF-α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
正常对照组	15	—	764±121**	64±2.88**
假手术组	15	—	780±107	71±3.05
模型组	15	—	1 183±142	117±9.62
葛根联合川芎高剂量组	15	8	827±116**	78±7.19**
葛根联合川芎中剂量组	15	4	925±126*	92±8.67*
葛根联合川芎低剂量组	15	2	1 090±168	109±10.13
葛根组	15	4	912±107*	95±8.61*
川芎组	15	4	926±115*	94±6.89

* : $P < 0.05$,与模型组比较; ** : $P < 0.01$,与模型组比较; # : $P < 0.05$,与单一用药组比较; — : 表示无数据。

3 讨 论

缺血性脑血管病在缺血和再灌注早期伴随着细胞因子、黏附分子表达并促使缺血性损伤向炎性损伤转变及脂质过氧化、神经细胞凋亡^[4-12]。本实验中大鼠缺血再灌注 24 h 后,TNF-α 及 IL-6 含量明显较正常对照组增加,用药后有所改善,单用葛根或川芎(4 g/kg)降低模型大鼠 TNF-α 及 IL-6 水平的效果与葛根(2 g/kg)联合川芎(2 g/kg)合用相同,但弱于相同剂量下两药合用的效果。

有研究表明,葛根与川芎均能改善缺血再灌注大鼠神经功能状态^[13]。本研究发现,在缺血再灌注 24 h 后,大鼠出现神经功能障碍,模型大鼠神经功能缺损评分明显升高,脑组织含水量明显增加,经药物干预后情况有所改善,单用葛根或川芎(4 g/kg)降低模型大鼠神经功能缺损评分及脑组织含水量的效果与葛根(2 g/kg)联合川芎(2 g/kg)合用相同,但弱于相同剂量下两药合用的效果。

本研究显示,经药物干预的模型大鼠,TNF-α、IL-6 含量明显减低,神经功能缺损评分及脑含水量降低。说明改善缺血再灌注大鼠状态以葛根及川芎合用为好,且效果好于单一味药的使用。

(下转第 3631 页)

学 6 项血清酶项目的参考区间调查显示,除两种方法内男性 CK 高于女性,其余项目男性组与女性组均无统计学差异($P > 0.05$),可建立共同的参考区间。本研究结果显示,6 项血清酶项目干化学与湿化学结果均有显著性差异($P < 0.05$),但相关性除 ALT 和 GGT 较差外,其余 4 项相关性均较好,说明两种方法是具有可比性。由于方法学的差异,本地区两种方法间除 AST 和 GGT 的参考区间差异较小外,其他 4 项的参考区间差异均较明显,因此,方法的不同很可能导致参考区间的不一致,所以应对主流仪器和试剂分别建立参考区间^[11]。由于美国强生和贝克曼公司均未提供血清酶项目的儿童参考区间(仅提供成人的参考区间),本调查结果分别与厂家及参考书提供的成人参考区间比较,差异均较大^[5]。本研究结果与国内外文献^[6-7]报道的年龄相近儿童参考区间比较,仍然有不同程度的差异。

因此,盲目引用成人或其他地区儿童的参考区间并不恰当,容易导致本地区临床相关儿童疾病的误诊和漏诊。这也证明了建立本地区健康儿童干化学和湿化学血清酶项目参考区间的重要性和必要性。

参考文献:

- [1] 魏有仁. 参考值的几个基本问题[J]. 中国实验诊断学, 1997, 1(1): 44-46.
- [2] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 2 版. 上海: 上海科技文献出版社, 2007: 212.
- [3] Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in

the Clinical Laboratory[S]. Approved Guideline-Third Edition C28-A3, 2010.

- [4] 曾洁, 陈文祥, 申子瑜. 参考区间研究现状概述[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(6): 570-572.
- [5] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 《全国临床检验操作规程》[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 406-423.
- [6] 田致洲, 杨国辉, 吕秀霞, 等. 威海地区 2~6 岁健康儿童心肌酶正常参考值调查分析[J]. 中国中西医结合儿科学, 2009, 1(6): 574-575.
- [7] Brinkworth RS, Whitham E, Nazeran H. Establishment of paediatric biochemical reference intervals[J]. Ann Clin Biochem, 2004, 41(4): 321-329.
- [8] 陈建波, 程雅婷, 史林飞, 等. 广东地区儿童全血铅、锰、锌、铜、铁参考区间的调查分析[J]. 广东微量元素科学, 2009, 16(3): 27-31.
- [9] 徐文波, 向秀华, 山德生. 建立实验室健康儿童肾功能三项正常参考值的意义[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(16): 3038-3040.
- [10] 李凤敏, 戴军, 陈玉霞, 等. 兰州市小于 18 岁健康儿童心肌酶谱参考值趋势性分析[J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(13): 1022-1024.
- [11] 钟堃, 王治国, 王薇, 等. 全国临床常规生化检验项目参考区间调查研究分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 273-274.

(收稿日期: 2012-06-09 修回日期: 2012-08-22)

(上接第 3622 页)

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 38.
- [2] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-87.
- [3] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurological examination [J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
- [4] 蔡飞, 李彩蓉, 癸基颯, 等. 茶黄素对大鼠脑缺血再灌注炎症细胞因子的影响[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(1): 23-25.
- [5] Coert BA, Anderson RE. A comparative study of the effects of two nitric oxide synthase inhibitors and two nitric oxide donors on temporary focal cerebral ischemia in the wistar rat [J]. J Neurosurg, 1999, 90(2): 332-338.
- [6] 张敬伟. NO, SOD 与缺血性脑血管病的关系[J]. 中国误诊学杂志, 2005, 5(5): 900-902.
- [7] Borti RW, Illiams AJ, Moffett JR, et al. Quantitative real-time RTPCR analysis of inflammatory gene expression as-

sociated with ischemia-reperfusion brain injury[J]. Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(9): 1068-1079.

- [8] Li Y, Chopp M, Jiang N, et al. In situ detection of DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1995, 28(1): 164-168.
- [9] Danton GH, Dietrich WD. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke [J]. Neuropathol Exp Neurol, 2003, 62(2): 127-137.
- [10] Gillardon F, Lenez C, Waschke KF, et al. Altered expression of bcl-2, Bcl-x, bax and c-fos colocalizes with DNA fragmentation and is chemically cell damage following middle cerebral artery occlusion in rats [J]. Mol Brain Res, 1996, 40(2): 254-261.
- [11] 廖维清, Wiegand F, Dirnagl U. 脑缺血损伤的病理生理机制-损伤级联反应[J]. 国外医学: 脑血管病分册, 1998, 6(4): 197-202.
- [12] Endres M, Kaps M, Moskowitz MA. Apoptosis and ischemic infarct [J]. Nervenarzt, 1998, 69(6): 6459-6467.
- [13] 赵喜庆, 吉训明, 石文建, 等. 丹参 川芎 当归抗脑缺血再灌注损伤的作用 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(10): 172-173.

(收稿日期: 2012-06-09 修回日期: 2012-08-22)