

补肾活血方对老龄大鼠脑缺血再灌注内皮素、降钙素基因相关肽代谢影响

李申影¹, 杨风杰², 孙星亮³, 李建生⁴, 赵君玫⁴, 郭胜典⁵

(1 河南省人民医院, 郑州 450003; 2 河南省卫生防疫站, 郑州 450003; 3 周口地区人民医院, 周口 466000; 4 河南中医学院, 郑州 450003; 5 河南省中药研究所, 郑州 450004)

摘要: 从内皮素(ET)、降钙素基因相关肽(CGRP)代谢方面研究补肾活血方益元活血丹对老龄大鼠脑缺血再灌注损伤防护作用机制。制作血管闭塞全脑缺血模型, 观察血浆与脑组织中 ET、CGRP 含量。结果显示, 益元活血丹大小剂量组血浆中 ET 水平低于老龄模型组($P < 0.01$); 血浆与脑组织中 CGRP 水平老龄模型组低于老龄对照组($P < 0.05$), 益元活血丹大、小剂量组高于老龄模型组($P < 0.05$)。提示益元活血丹能够调节 ET 与 CGRP 的代谢失衡, 对脑缺血损伤起到保护作用。

关键词: 内皮素; 降钙素基因相关肽; 脑缺血再灌注; 补肾活血方

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)02-0036-03

脑梗塞是老年人的常见病、多发病, 亦是导致老年人死亡和致残的主要疾病之一, 其发病死亡率明显高于青壮年患者, 而目前临床研究所选择对象的年龄界定不清, 难以科学的评定中医药治疗老年脑梗塞的疗效。由于老年脑血管和脑组织均存在不同程度的老化, 其病理变化应有自己的特点。用来自青年大鼠的实验研究结果来推断老年脑缺血损伤的病理变化和防治作用是不恰当的。因此, 本研究在中医理论指导下, 以老龄大鼠为实验对象, 观察具有补肾益元, 活血通络功效的中药益元活血丹对脑缺血再灌注老龄大鼠外周血与脑组织内皮素和降钙素基因相关肽代谢的影响, 为益元活血丹防治老年缺血性脑血管疾病的应用和探讨其作用机制提供依据。

1 材料

1.1 药物 益元活血丹由何首乌、黄精、沙苑子、肉苁蓉、三七、蒲黄等中药组成, 由河南中医学院一附院制剂室提供; 尼莫地平片, 每片 20mg, 由山东新华制药股份有限公司提供(批号 9712089); 内皮素(ET)、降钙素基因相关肽(CGRP)由南京建成生物工程研究所提供。

1.2 动物 SD 大鼠 40 只, 雌雄各半, 20~22 月龄, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。

1.3 仪器 721 型分光光度计, 上海第二分析仪器

厂出品; MP120-2 型电子天平, 上海第二天平仪器厂生产; 医用离心机, 北京医用离心机厂生产; DY89-1 电动玻璃匀浆机, 宁波新芝科器研究所生产。

2 方法

2.1 动物分组 将大鼠随机分为 5 组, 老龄假手术、老龄模型、益元活血丹大剂量(益元大剂量组)、益元活血丹小剂量(益元小剂量组)及尼莫地平组, 每组 18 只大鼠。

2.2 脑缺血再灌注模型 参照 Pulsinelli 四血管闭塞法制作全脑缺血再灌注模型^[1]。用 20% 乌拉坦按 0.5ml/100g 体重腹腔注射麻醉大鼠, 电灼凝固双侧椎动脉, 动脉夹夹闭双侧 CCA 造成全脑缺血 30min, 再灌流 60min。未昏迷或缺血后伴有癫痫(抽搐等并发症)的大鼠被弃除。老龄假手术组仅分离出翼小孔和双侧 CCA 穿线, 不进行电凝和夹闭处理。在施术过程中因麻醉及出血过多等原因导致动物死亡数量为 8 只, 占动物总数的五分之一。

2.3 给药方法 老龄假手术组: 实验前 2d 经胃灌注生理盐水, 每日 1 次, 分离翼小孔和双侧颈总动脉(CCA)穿线前 2h 加灌 1 次。老龄模型组: 造模前 2d 和造模期间经胃灌注生理盐水, 每日 1 次, 夹闭双侧 CCA 前 2h 加灌 1 次。尼莫地平组、益元大、小剂量组: 造模前 2d 和造模期间分别灌胃尼莫地平片剂 $6\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; 益元活血丹大剂量 $1.28\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和益元活血丹小剂量 $0.64\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。三用药组夹闭双侧 CCA 前 2h 加灌 1 次。

2.4 指标测定 取大鼠颈动脉血, 按比例与其它试

收稿日期: 2000-06-26

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目 No: 984022300

剂混匀(血:10% EDTA:抑肽酶=40ml:40ul:60ul),于4℃3000rpm离心10min,分离血浆,置-20℃待测ET、CGRP。取大鼠脑组织,用冷生理盐水冲洗,除去积血,称重,尽快放入0.1mol/L HAC 1ml中速冻后略作碾磨,然后在100℃水浴中煮沸10min,匀浆,3℃3000rpm离心15min,取上清液置-20℃保存待测实验指标。测定前用PBS五倍以上稀释,以调节pH。采用放射免疫法测定。

2.5 统计学方法 计量资料应用SPSS 8.0 for Windows,采用方差分析方法。所有数据以均数($\bar{x}$)±标准差(s)表示。

3 结果

3.1 益元活血丹对大鼠脑缺血再灌注血浆与脑组织ET的影响 老龄模型组血浆ET含量高于老龄假手术组($P < 0.05$),益元大剂量组低于老龄模型组($P < 0.05$),且接近老龄假手术组水平($P > 0.05$);尼莫地平组较老龄模型组无明显差异($P > 0.05$);老龄模型组脑组织ET含量高于老龄假手术组($P < 0.01$),尼莫地平组低于老龄模型组($P < 0.01$),并接近老龄假手术组水平($P > 0.05$)。见表1。

表1 益元活血丹对大鼠脑缺血再灌注血浆与脑组织ET的影响 ($\bar{x} \pm s; n = 8$)

组别	血浆 ET (pg/ml)	脑组织 ET (pg/mg)
老龄假手术组	223.10 ± 128.15	4.10 ± 1.16
老龄模型组	335.91 ± 47.93 [*]	7.94 ± 1.66 [*]
尼莫地平组	318.24 ± 91.00	2.60 ± 0.79 ^Δ
益元大剂量组	239.37 ± 65.62 ^Δ	7.65 ± 1.33
益元小剂量组	250.84 ± 98.22	7.43 ± 0.47

注:与模型组比较 $\Delta P < 0.05$, $\blacktriangle P < 0.01$;与假手术组比较 $\star P < 0.05$, $\star\star P < 0.01$ (下同)。

3.2 益元活血丹对大鼠脑缺血再灌注血浆与脑组织CGRP的影响 老龄模型组血浆CGRP含量较老龄假手术组有降低趋势,尼莫地平组和益元小剂量组高于老龄模型组($P < 0.05$),益元小剂量组接近老龄假手术组水平($P > 0.05$);老龄模型组脑组织CGRP低于老龄假手术组($P < 0.05$),益元大剂量组和益元小剂量组高于老龄模型组($P < 0.05$),且接近老龄假手术组水平($P > 0.05$),尼莫地平组较老龄模型组无明显差异($P > 0.05$)。见表2。

4 结果

ET是迄今所知体内最强的血管收缩因子,在中枢神经系统以下丘脑和纹状体含量最高,而CGRP是体内最强的舒血管活性多肽,在脑内亦有广泛的分布^[2]。两者作用相反,又呈相关性,正常情况下,

表2 益元活血丹对大鼠脑缺血再灌注血浆与脑组织CGRP的影响 ($\bar{x} \pm s; n = 8$)

组别	血浆 CGRP (pg/ml)	脑组织 CGRP (pg/mg)
老龄假手术组	193.80 ± 55.59	529.88 ± 11.43
老龄模型组	172.08 ± 37.25	419.53 ± 92.86 [*]
尼莫地平组	307.46 ± 198.41 ^Δ	491.39 ± 154.09
益元大剂量组	186.84 ± 126.05	561.02 ± 143.83 ^Δ
益元小剂量组	261.74 ± 63.15 ^Δ	531.98 ± 117.25 ^Δ

相对稳定,呈动态平衡。脑梗塞时平衡失控,引起强烈持久的相互拮抗^[3]。实验证明,CGRP不影响血浆ET的基础含量及基础释放,但能抑制病理条件下ET的大量释放^[4]。ET对脑血管和神经组织功能的影响机制在于收缩血管和参与调节脑血流^[5]。正常情况下在血循环中浓度很低,在缺血、缺氧和再灌注损伤时分泌增多^[6]。而CGRP能拮抗ET引起的脑血流量减少,使脑血流量暂时恢复。因此,脑梗塞后局部血管明显缺血,出现的应激反应和再灌注时自由基反应,均可引起ET合成与释放增多^[7]。升高的ET又反作用于病灶血管,使血管收缩,供血更差。研究证实脑梗塞患者脑脊液中CGRP含量显著降低,中枢神经组织CGRP分泌减少,外周ET升高以及舒、缩血管活性物质比例失调,可能是急性脑梗塞发生的重要环节。由于ET与CGRP相互拮抗,ET升高,使血浆CGRP水平下降,舒血管作用减弱。ET、CGRP出现的代谢失衡,使脑血管处于收缩状态,脑组织损伤加重^[8]。本课题研究显示模型组大鼠脑缺血再灌注时血浆和脑组织ET含量明显升高,CGRP含量降低,从而导致以ET占优势的ET与CGRP平衡失调,可能为老年脑梗塞发病的主要机制之一。因此,降低ET或和升高CGRP水平以调节ET与CGRP平衡,对保护脑缺血再灌注损伤具有重要意义。结果表明益元活血丹能够调节ET、CGRP代谢失衡可能与下列因素有关:改善血循环从而改善内皮组织缺血缺氧;血循环改善后,应激反应趋于缓解。ET合成与释放下降,CGRP水平升高,代谢失衡改善,病理性损伤减轻^[9]。提示益元活血丹调节ET与CGRP平衡异常的作用可能是该药防治老年脑梗塞的主要机制之一。

参考文献:

- [1] Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat[J]. Stroke, 1979, 10(2): 267-272.
- [2] 彭英,黄如训,王映红,等. 肾血管性高血压鼠及局

- 部脑缺血后下丘脑和血浆中 ET、CGRP 水平的动态变化[J]. 中华内科杂志, 1997, 36(21): 117—118.
- [3] 沈 君, 陈曼娥, 沈吉平, 等. CGRP、ET 活性应变效应与急性脑卒中关系的研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 1997, 14(3): 138—140.
- [4] 谭国勇, 姚兴海, 赵 东, 等. 降钙素基因相关肽对内皮素释放的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1994, 10(5): 545.
- [5] 韩荣河, 李 丹, 徐 谦. 内皮素与脑血管病[J]. 中风与神经疾病杂志, 1993, 10(4): 206—208.
- [6] 魏东宁, 庆忠王, 朱 克, 等. 急性缺血性脑血管病患者血浆内皮素 I 增高的临床意义[J]. 临床神经病学杂志, 1994, 7(6): 356.
- [7] 赵卫国, 孙青方, 张天赐, 等. SHR 在 MCAO 后脑组织 NOS 活性的变化[J]. 中风与神经疾病杂志, 1997, 14(4): 211—222.
- [8] 刘家琴, 时宏珍, 孙君江, 等. 脑梗塞患者内皮素、降钙素基因相关肽及部分细胞因子的含量测定[J]. 中华医学检验杂志, 1997, 2(5): 300—301.
- [9] 吴玉生, 姜立萍. 补阳还五汤对早期脑梗塞患者血浆内皮素、降钙素基因相关肽代谢失衡的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 18(7): 396—398.