

夏天无总碱抗实验性脑缺血的作用

胡雪勇¹, 孙安盛², 余丽梅², 吴芹²

(1 南昌铁路中心医院药剂科, 江西 南昌 330003; 2 遵义医学院药理学教研室, 贵州 遵义 563003)

[摘要] 目的: 观察夏天无总碱(*Corydalis ambailis* migo total alkaloids, COAMTA)对脑缺血/再灌注损伤的保护作用并对其机制作初步探讨。方法: 采用小鼠断头张口喘气模型、大鼠大脑中动脉缺血 2 h/再灌注 22 h 模型, 以神经病学评分、脑梗死范围及脑组织水含量变化, 观察 COAMTA 抗脑缺血/再灌注损伤的效应; 通过测定大鼠脑组织中一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的变化, 并采用原位末端标记法观察对神经细胞凋亡的影响以探讨药物作用的机制。结果: COAMTA 可延长小鼠张口喘气时间, 降低大鼠脑缺血/再灌注后神经病学评分及梗死范围, 降低脑组织 MDA 含量和 NOS 活性及升高 SOD 活性, COAMTA 还可抑制神经细胞凋亡。结论: COAMTA 对脑缺血/再灌注损伤有保护作用, 其作用机制与抑制 NOS 活性、提高 SOD 活性、减少神经细胞脂质过氧化损伤和抑制神经细胞凋亡有关。

[关键词] 夏天无; 脑缺血; 神经病学表现; 一氧化氮合酶; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

[中图分类号] R285.5; R743.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-1977(2005)01-0046-04

Effects of *Corydalis ambailis* migo total alkaloids on experimental cerebral ischemia

HU Xue-Yong¹, SUN An-Sheng², YU Li-Mei², WU Qin²

(1. Department of Pharmacy, Nanchang Railway Central Hospital, Nanchang, Jiangxi Province 330003, China; 2. Department of Pharmacology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province 563003, China)

ABSTRACT Objective: To observe the protective effects of *Corydalis ambailis* migo total alkaloids (COAMTA) on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats and to investigate its mechanism. **Methods:** The effects of COAMTA on decapitated gasping mouse model and rat model of middle cerebral artery ischemia (2 h)/reperfusion (22 h) were observed. The neurological scale, cerebral infarcted volume and cerebral water content subjected to cerebral middle artery ischemia/reperfusion in rats were recorded. The activities of nitric oxide synthase (NOS) and superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in the rats' brain were measured. Cell apoptosis in ischemic penumbral area was observed with light microscope in the method of terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL). **Results:** The average gasping time of the mice (6.0 mg/kg or 9.0 mg/kg COAMTA) was significantly prolonged, the cerebral infarcted volume and cerebral water content of the rats (5.0 mg/kg or 7.5 mg/kg COAMTA) were significantly decreased, as compared with the control groups. The average activity of SOD in cerebral tissue of the rats (5.0 mg/kg or 7.5 mg/kg COAMTA) was significantly higher than that of the control groups, meanwhile, the average activity of NOS and the content of MDA declined significantly. The cell apoptosis in ischemic penumbral area of the rats (5.0 mg/kg COAMTA) was significantly inhibited as compared with the control groups. **Conclusion:** COAMTA can facilitate the protection against cerebral ischemia/reperfusion damage. The mechanism is related to inhibiting the activity of NOS and lipoperoxidation, increasing the activity of SOD and decreasing the neuronal apoptosis.

KEY WORDS *Corydalis decumbens*; brain ischemia; neurologic manifestations; nitric oxide synthase; superoxide dismutase; malondialdehyde

J Chin Integr Med, 2005, 3(1):46-49

[基金项目] 贵州省自然科学基金资助项目(No.20003040)

[作者简介] 胡雪勇(1972-),男,硕士,主治医师. E-mail: huxueyongzmc@sina.com

Correspondence to: Prof. SUN An-Sheng. E-mail: anshengsun@yahoo.com.cn

现代医学研究表明,脑缺血损害的机制涉及细胞内钙超载,兴奋性氨基酸的毒性作用,自由基损害与凋亡等。中药夏天无为罂粟科植物伏生紫堇 [*Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers.] 的干燥块茎,具有活血祛瘀作用。所含总生物碱能增强小鼠对低压缺氧的耐受力,抑制二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 诱导的大鼠血小板聚集,具有抗炎及抗过氧化脂质等作用。其中的主要单体成分普鲁托品能扩张脑和下肢血管,并能抑制钙释放和细胞外钙内流^[1-5]。本研究采用灌胃给药,观察夏天无总碱 (*Corydalis ambailis* migo total alkaloids, COAMTA) 对动物脑缺血的影响,旨在为临床脑缺血寻找新型有效的药物治疗方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂 COAMTA 由贵州省重点化学实验室提供,用 0.1 mol/L HCl 溶解后以蒸馏水稀释,调 pH 6.5~7.0;尼莫地平 (nimodipine, Nim) 为山东新华制药股份公司产品 (批号:010625);丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 试剂盒,均购于南京建成生物工程公司。三苯基四唑氯化物 (triphenyltetrazolium chloride, TTC) 购于上海生物工程公司;DNA 末端原位标记染色 (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL) 试剂盒为华美生物工程公司提供。

1.1.2 仪器 721 分光光度计, BI-2000 图像分析系统, JY92-11 超声细胞粉碎机, FN202-2 型电热干燥箱等。

1.1.3 动物 昆明种小鼠由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供, SD 大鼠购于中国科学院上海实验动物中心 (清洁级)。

1.2 小鼠断头张口喘气时间实验 小鼠 50 只, 体重 18~22 g, 雌雄各半, 随机分为 5 组: 生理盐水组、尼莫地平组 (2.0 mg/kg) 及 COAMTA 不同剂量组 (分别为 3.0、6.0、9.0 mg/kg), 每组 10 只。实验前禁食不禁水 4 h, 灌胃给药 20 ml/kg 体重, 给药后 40 min 断头, 盲法记录张口喘气时间^[6]。

1.3 大鼠大脑中动脉缺血/再灌注实验

1.3.1 大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤模型的制备

SD 雄性大鼠 84 只, 体重 230~270 g, 随机分为 6 组: 假手术组、生理盐水组、尼莫地平组 (2.0 mg/kg) 和 COAMTA 不同剂量组 (分别为

2.5、5.0、7.5 mg/kg), 每组 14 只。参照 Nagasawa 等^[7] 的方法进行造模。于造模前灌胃给 COAMTA 10 ml/kg, 2 次/d, 共 5 次, 最后 1 次给药后 30 min 制模, 模型后 12 h 再给药 1 次。大鼠苏醒后按 Bederson 等^[8] 的方法进行神经病学评分。评分达 3 分, 且脑内蛛网膜下腔无出血作为模型成功标准, 选入实验组。各组动物于缺血 2 h/再灌注 22 h 后再进行神经病学评分。

1.3.2 大鼠脑梗死范围测定 各组随机取大鼠 7 只断头取脑, 去除嗅球、小脑、低位脑干, 冠状切分脑组织成 5 片, TTC 染色测量梗死面积^[9]。经染色后正常脑组织呈玫瑰红色, 而梗死组织呈白色, 取出后置 10% 甲醛液中避光保存。用 BI-2000 图像分析系统测出截面上梗死区域占非梗死区域面积的百分比。

1.3.3 大鼠脑含水量测定 每组剩余的 7 只大鼠断头取脑, 正中矢状切分左右大脑后分别称湿重, 100℃ 烤箱烘烤至恒重 (即干重), 按公式脑含水量 (%) = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100% 计算脑含水量。

1.3.4 大鼠缺血/再灌注后脑神经细胞凋亡的测定

另将 SD 雄性大鼠 30 只按 1.3.1 方法造模, 随机分为 5 组: 假手术组, 生理盐水组, 尼莫地平组 (2.0 mg/kg), COAMTA 不同剂量组 (分别为 5.0、7.5 mg/kg), 每组各 6 只。缺血 2 h/再灌注 22 h 后断头取脑, 选择缺血侧视交叉至漏斗柄部位脑组织固定、包埋, 制成 6 μm 厚切片, 按试剂盒操作说明进行 TUNEL 染色, 光学显微镜下观察神经细胞凋亡情况。在 400 倍光学显微镜下选择相邻的 10 个非重叠视野, 计数神经细胞总数和凋亡细胞数。

1.3.5 大鼠脑组织 NOS、SOD、MDA 含量测定

另将 SD 雄性大鼠 42 只按 1.3.1 方法造模、分组, 每组 7 只。缺血 2 h/再灌注 22 h 后断头取脑、称重, 按 1:10 加生理盐水, 超声细胞粉碎制成 10% 组织匀浆, 0℃ 冷冻, 以 15 000 r/min 离心 20 min, 取上清液置 -84℃ 低温冰箱中保存。采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD, 硫代巴比妥酸法测定 MDA, 比色法测定 NOS。

1.4 统计学方法 实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两小样本均数经方差齐性检验后, 采用 *t* 检验或 *t'* 检验。

2 结 果

2.1 COAMTA 对小鼠断头张口喘气时间的影响 生理盐水组断头喘气时间为 (18.1 ± 0.9) s; COAMTA 3.0 mg/kg 组喘气时间为 (18.6 ± 1.3) s, 与生理盐水组无明显差别; COAMTA 6.0、9.0 mg/kg 组喘气时间明显延长, 分别为 (19.4 ± 1.1) s、(19.8 ±

1.3)s,与生理盐水组比较有显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但不及尼莫地平组(24.4 ± 2.4)s。

2.2 COAMTA 对缺血 2 h 再灌注 22 h 大鼠神经病学评分的影响 大鼠缺血 2 h 再灌注 22 h 神经病学评分,假手术组大鼠均为 0 分,生理盐水组为(2.4 ± 0.8)分;COAMTA 5.0、7.5 mg/kg 剂量组与生理盐水组比较,均可显著降低神经病学评分($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但两剂量组之间差异无显著性,且均不及尼莫地平组。见表 1。

表 1 夏天无总碱对缺血/再灌注大鼠神经病学评分的影响

Tab 1 Effect of COAMTA on neurological scale of rats after cerebral ischemia/ reperfusion

Group	n	Score ($\bar{x} \pm s$)
Sham	14	0
NS	14	2.4 ± 0.8
Nim (2.0 mg/kg)	14	$0.5 \pm 0.5^{**}$
COAMAT (2.5 mg/kg)	14	2.1 ± 0.8
COAMAT (5.0 mg/kg)	14	$1.8 \pm 0.7^*$
COAMAT (7.5 mg/kg)	14	$1.6 \pm 0.6^{**}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs NS group; $P < 0.01$, vs Nim group

2.3 COAMTA 对缺血 2 h 再灌注 22 h 大鼠脑梗

死范围及梗死侧脑含水量的影响 假手术组未出现梗死灶;生理盐水组脑缺血范围较大;尼莫地平组、COAMTA 5.0、7.5 mg/kg 组脑缺血范围明显减少,与生理盐水组比较有显著性差异($P < 0.05$)。COAMTA 7.5 mg/kg 可明显降低脑含水量,但 COAMTA 减少脑缺血范围、降低脑含水量不及尼莫地平。见表 2。

2.4 COAMTA 对缺血 2 h 再灌注 22 h 大鼠缺血半暗带神经细胞凋亡的影响 脑缺血再灌注后生理盐水组神经细胞凋亡率为(24.5 ± 2.4)%,明显高于假手术组的(2.8 ± 0.8)%; COAMTA 5.0 mg/kg 组为(21.2 ± 2.3)%, COAMTA 7.5 mg/kg 组为(18.3 ± 1.9)%,明显低于生理盐水组($P < 0.05$),但不及尼莫地平组(9.7 ± 1.4)%。

2.5 COAMTA 对缺血 2 h 再灌注 22 h 大鼠脑组织中 NOS、SOD、MDA 的影响 与假手术组相比,生理盐水组 NOS 活性及 MDA 含量显著升高,SOD 活性显著降低($P < 0.01$); COAMTA 5.0、7.5 mg/kg 组与生理盐水组比较, NOS 活性和 MDA 含量明显降低, SOD 活性明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但 NOS 活性、MDA 含量降低及 SOD 活性升高不及尼莫地平组。见表 3。

表 2 夏天无总碱对缺血/再灌注大鼠脑梗死范围及脑含水量的影响

Tab 2 Effects of COAMTA on cerebral infarcted area and cerebral water content of rats after cerebral ischemia/ reperfusion

Group	n	Infarcted Area ($\bar{x} \pm s, \%$)	Water content ($\bar{x} \pm s, \%$)
Sham	7	0	77.2 ± 0.8
NS	7	41.9 ± 3.8	81.0 ± 1.0
Nim (2.0 mg/kg)	7	$20.9 \pm 3.3^{**}$	$78.0 \pm 0.9^{**}$
COAMAT (2.5 mg/kg)	7	40.6 ± 3.0	80.3 ± 1.0
COAMAT (5.0 mg/kg)	7	$37.8 \pm 2.9^*$	79.9 ± 0.9
COAMAT (7.5 mg/kg)	7	$36.3 \pm 3.1^*$	$79.6 \pm 1.0^*$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs NS group; $P < 0.05$, $P < 0.01$, vs Nim group; $P < 0.01$, vs sham group

表 3 夏天无总碱对缺血/再灌注大鼠脑组织中 NOS、SOD 和 MDA 的影响

Tab 3 Effects of COAMTA on activities of NOS and SOD and content of MDA in brain of rats after cerebral ischemia/ reperfusion

Group	n	NOS (kU/L)	SOD (nU/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
Sham	7	1.66 ± 0.09	50.44 ± 4.37	1.45 ± 0.09
NS	7	3.16 ± 0.11	31.87 ± 3.38	3.21 ± 0.18
Nim (2.0 mg/kg)	7	$1.67 \pm 0.12^{**}$	$49.97 \pm 3.16^{**}$	$1.58 \pm 0.51^{**}$
COAMAT (2.5 mg/kg)	7	3.06 ± 0.14	33.84 ± 2.35	3.06 ± 0.25
COAMAT (5.0 mg/kg)	7	$2.76 \pm 0.15^{**}$	$36.25 \pm 2.25^*$	$2.97 \pm 0.18^*$
COAMAT (7.5 mg/kg)	7	$2.30 \pm 0.15^{**}$	$41.28 \pm 1.90^{**}$	$2.76 \pm 0.19^{**}$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs NS group; $P < 0.05$, $P < 0.01$, vs Nim group; $P < 0.01$, vs sham group

3 讨 论

脑缺血损伤机制复杂,细胞内钙超载被认为是各型细胞凋亡和坏死的最后共同通路。缺血/再灌注状态下产生的 OH^- 、 H_2O_2 、 NO 等自由基在局部大量聚集,体内 SOD 活性减低,自由基诱导细胞膜脂质过氧化而使细胞膜受损,最终细胞死亡。文献报道^[3,10,11] COAMTA 及从中提取的有效成分具有较强的抗胆碱酯酶活性,可扩张血管,降低血压,对猫心肌缺血期和复灌期产生抗心律失常等作用,故对高血压偏瘫、脑梗死、脑血管痉挛及心肌梗死可能有益。我们的实验表明,COAMTA 6.0 和 9.0 mg/kg 均可延长小鼠张口喘气时间,但作用较尼莫地平弱。采用大鼠大脑中动脉缺血 2 h/再灌注 24 h 模型实验,结果显示 COAMTA 5.0 和 7.5 mg/kg 均可降低脑缺血/再灌注后梗死范围,改善神经病学症状,降低脑含水量,表明 COAMTA 对脑缺血损伤具有一定保护作用。缺血再灌注后脑细胞内钙积聚, Ca^{2+} 与钙调蛋白结合,从而激活 NOS,同时脑缺血/再灌注后 NOS 的表达也增加,导致 NO 的生成增加。生理水平的 NO 与学习记忆及神经突触的可塑性有关,而过量的 NO 可产生神经毒性^[12]。COAMTA 5.0 和 7.5 mg/kg 均可降低大鼠脑缺血 2 h 再灌注 22 h 后 NOS 活性和 MDA 含量,而增高 SOD 活性,表明 COAMTA 抗脑缺血损害的作用机制与减少自由基产生,减少过量的 NO 产生,增强 SOD 抗氧化损伤作用有关。凋亡是缺血性神经元死亡的形式之一,与坏死并存,通过抑制凋亡可减少脑梗死的体积和减轻缺血性神经元损伤^[13]。COAMTA 5.0 和 7.5 mg/kg 均可产生抗凋亡作用,表明 COAMTA 对缺血性脑损伤的保护涉及抗凋亡机制。

[参考文献]

1 中国药科大学.中药辞海[M].第2卷.北京:中国医药

科技出版社,1996.2019.

- 2 江西中医学院药理学系.夏天无生物碱的初步药理研究[J].中成药研究,1978,1(4):13-16.
- 3 王大元,程美璋,万春根,等.夏天无生物碱对麻醉犬脑循环与下肢循环的作用[J].中西医结合杂志,1986,6(8):447-479.
- 4 刘 恣,冯高阔.夏天无总碱对大鼠血小板功能的影响[J].中国药理学通报,1988,4(5):301-304.
- 5 Kim SR, Hwang SY, Jang YP, *et al*. Protopine from *Corydalis ternata* has anticholinesterase and anti-amnesic activities[J]. *Planta Med*, 1999, 65(3):218-221.
- 6 徐淑云,卞如濂,陈 修主编.药理实验方法学[M].第2版.北京:人民卫生出版社,1991.659.
- 7 Nagasawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke*, 1989, 20(8):1037-1043.
- 8 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.
- 9 张均田主编.现代药理实验方法[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998.1241.
- 10 徐丽华,顾振纶,蒋小岗,等.夏天无总碱中抗胆碱酯酶活性成分的研究[J].药学学报,2002,37(11):902-903.
- 11 吴 淞,沈岳良,胡和成,等.夏天无对复灌心血流动力学及心律失常的影响[J].中草药,1994,25(5):259-260.
- 12 刘 辉,陈俊抛.一氧化氮、一氧化氮合酶与脑缺血损伤[J].国外医学·生理病理科学与临床分册,1999,19(2):121-123.
- 13 Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 1993, 24(12):2002-2008.

[收稿日期] 2004-04-16 [本文编辑] 白玉金

《中西医结合学报》2004 年审稿人名单

(以姓氏汉语拼音字母为序)

陈 喆	陈长勋	陈生弟	杜 宁	何立群	何新慧	胡佳娜	李 柏
李东涛	李军祥	李照国	凌昌全	刘 平	刘 庆	彭亚军	秦万章
施建蓉	王文健	吴根诚	吴焕淦	吴银根	徐列明	徐振晔	殷 明
俞 建	俞超芹	岳小强	张 仁	张家庆	张锦生	张重华	赵伟康
周永明	朱德增	朱培庭					