

豨莶草总黄酮对大鼠脑缺血损伤的保护作用及其作用机制研究

娄月芬,李 盈,胡 滨(上海市第一人民医院分院药剂科,上海 200081)

【摘要】 目的 探讨豨莶草总黄酮对大鼠局灶性脑缺血损伤的影响及其作用机制。方法 将SD大鼠随机分为6组:假手术组、模型组、银杏叶片(50 mg/kg)组及豨莶草总黄酮低、中、高剂量(5、10、20 mg/kg)组。采用线栓法建立大鼠局灶性脑缺血模型。观察豨莶草总黄酮对大鼠神经行为、脑梗死面积和脑组织含水量的影响。测定大鼠脑组织中丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性。结果 豨莶草总黄酮可明显改善大鼠神经功能缺陷,减轻脑水肿,减少脑梗死面积,降低脑组织MDA含量,提高脑组织SOD及GSH-Px的活性。结论 豨莶草总黄酮有抗脑缺血损伤作用,作用机制可能与其抗氧化作用有关。

【关键词】 豨莶草总黄酮;脑缺血;抗氧化;丙二醛;超氧化物歧化酶;谷胱甘肽过氧化物酶

【中图分类号】 R965 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1006-0111(2013)01-042-03

【DOI】 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.01.012

Protective effect of total flavonoids in *Herba Siegesbeckiae* on cerebral ischemia in rats

LOU Yue-fen, LI Ying, HU Bin(Department of Pharmacy, Branch of Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200081, China)

【Abstract】 Objective To study the protective effect and possible mechanism of total flavonoids in *Herba Siegesbeckiae* on focal cerebral ischemia in rats. **Methods** Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into 6 groups: sham operation group, model group, total flavonoids of *Herba Siegesbeckiae* groups with low, moderate and high dose (5, 10, 20 mg/kg) and ginkgo leaf tablet group (50 mg/kg). Focal cerebral ischemia model was established by middle cerebral artery occlusion. The effects of *Herba Siegesbeckiae* total flavonoids on nervous behavior, cerebral infarct volume and the content of brain water were observed in rats. The activities of malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) in cerebral tissues were measured. **Results** total flavonoids of *Herba Siegesbeckiae* could improve the neurological function, reduce the cerebral infarct volume, the content of brain water and the activity of MDA, increase the activity of SOD and GSH-Px. **Conclusion** Total flavonoids of *Herba Siegesbeckiae* could alleviate focal cerebral ischemia injury, and the mechanism might be related to anti-oxidant effect.

【Key words】 *Herba Siegesbeckiae* total flavonoids; cerebral ischemia; anti-oxidant; MDA; SOD; GSH-Px

缺血性脑血管病是由于脑动脉管腔狭窄或堵塞,局部脑血流量减少或突然中断,造成该动脉供应区的脑组织供血、供氧、供能减少,继而引起继发性的血管内皮损伤和自主神经功能障碍的一种病理状态,临床表现以猝然昏扑、不省人事,或突然发生口眼歪斜、半身不遂、舌强言蹇、智力障碍为主要特征,以其高发病率、高致残率和高死亡率而严重危害着人类的身心健康。因此,寻找新型有效的药物防治脑缺血是目前医药界的研究热点。

豨莶草(*Herba Siegesbeckiae*)为我国常用中药,始载于唐代《新修本草》,是菊科植物豨莶 *Siegesbeckia orientalis* L.、腺梗豨莶 *Siegesbeckia pubescens* Makino 或毛梗豨莶 *Siegesbeckia glabrescens* Makino 的

干燥地上部分,具有祛风湿、利关节、解毒之功效,临床上主要用于风湿痹痛、腰膝酸软、四肢麻痹、半身不遂、高血压、风疹湿疮等症的治疗^[1]。豨莶草主要含有二萜类、倍半萜类和黄酮类成分^[2-4]。研究表明,豨莶草具有改善微循环^[5]、抗凝^[6]、抗血栓^[7]、抗炎^[8]等多种活性。

本实验通过比较豨莶草总黄酮对局灶性脑缺血大鼠脑组织含水量的影响,利用分光光度法测定局灶性脑缺血大鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)的含量,分析其对实验性大鼠局灶性脑缺血损伤的保护修复作用,并初步探讨其作用机制,为寻找、研发新的抗脑缺血损伤药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 豨莶草总黄酮(上海市第一人民医院分院药剂科提供);银杏叶片(贵州信邦制

【作者简介】 娄月芬(1974-),女,硕士,副主任药师。Tel: (021) 56663031-2105, E-mail: louyuefen@yahoo.com.cn.

药);氯化三苯基四氮唑(美国 Sigma 公司);丙二醛、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶试剂盒(南京建成试剂公司提供)。

1.2 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 180 只,体质量 280~320 g,均为清洁级,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。

1.3 动物分组及给药 将大鼠随机分成 6 组,每组 30 只,即假手术组、模型组、银杏叶片组(50 mg/kg)及豨莶草总黄酮低、中、高剂量(5、10、20 mg/kg)组。假手术组、模型组给予等容量的生理盐水。各组大鼠每日上午灌胃,给予生理盐水或相应药,每天给药一次,连续 7 d。

1.4 大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型的制备 末次给药后 1 h,参照 Zea 等^[9]的方法,采用线栓法制作左侧大脑中动脉阻塞脑缺血模型。大鼠称重后,按体重 300 mg/kg 腹腔注射 10% 水合氯醛 300 mg/kg 实施麻醉。仰卧位固定,腹侧颈部正中中线切开皮肤。沿胸锁乳突肌内缘分离肌肉和筋膜,分离到气管前肌后,沿右侧胸锁乳突肌腱向下分离,见到颈动脉鞘后可上拉钩。分离左侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA)。在颈外动脉距其始端约 2 mm 处剪 0.2 mm 小口,将栓塞线自颈外动脉小口插入,轻推栓塞线尾端,经颈总动脉分叉部沿颈内动脉将线缓慢地向颈内动脉入颅的方向推进约 20 mm,微遇阻力时停止,即阻断大脑中动脉,记录此时的时间。2 h 后缓慢地轻拉出栓塞线,栓塞 2 h,以大鼠麻醉苏醒后出现手术对侧肢体运动障碍,为模型制备成功的判断依据。假手术组只暴露和分离颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉,不栓塞大脑中动脉。

1.5 大鼠神经功能缺陷评分 大鼠脑缺血手术后 5 h,参照 Zea 等的五级评分法对大鼠进行神经功能缺陷评分。0 分:无明显神经功能缺陷症状,活动正常;1 分:不能完全伸展手术对侧前肢;2 分:行走时出现向手术对侧转圈;3 分:行走时身体向手术对侧倾倒;4 分:不能自发行走或处于昏迷。

1.6 脑梗死面积测定 神经功能行为缺陷评分后的大鼠,每组各取 10 只,迅速将其断头,取出完整脑组织,-20℃冰箱中速冻 20 min 左右后,冠状切成 1.5 mm 厚的脑片,于 2% TTC 溶液中 37℃水浴孵育 20 min。染色成功后,正常脑组织为鲜红色,梗死脑组织为白色,采用图像分析仪,计算脑梗死体积百分比。

1.7 脑组织含水量的测定 脑组织含水量用干湿重法测定。每组各取 10 只大鼠,断头取脑,称重,将脑组织放于 100℃烘箱中 24 h,取出测干重,计算脑

组织含水量。

$$\text{脑组织含水量} = [1 - (\text{干重}/\text{湿重})] \times 100\%$$

1.8 脑组织 MDA 含量及 SOD、GSH-Px 活性测定

每组各取 10 只大鼠断头取脑,去除嗅脑、脑干、小脑后,将大脑分别置于匀浆器中,按重量体积比加入 9 倍的生理盐水,制备成 10% 的脑组织匀浆,立即放入 -20℃冰箱中保存。按照南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书测定脑组织中 MDA 含量及 SOD、GSH-Px 活性。

1.9 统计学处理 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,两组间数据比较采用 Dunnett *t* 检验。

2 结果

2.1 豨莶草总黄酮对脑缺血大鼠神经功能缺陷评分的影响 从表 1 可以得知,脑缺血后,模型组和给药组大鼠显现出明显的神经功能缺陷。豨莶草总黄酮呈剂量依赖性地降低脑缺血大鼠神经功能缺陷评分,尤其是豨莶草总黄酮中、高剂量(10、20 mg/kg)组与模型组相比,有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 豨莶草总黄酮对大鼠神经功能缺陷评分影响($n=30$, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	神经功能评分(分)
假手术组	等体积	0.00 ± 0.00
模型组	等体积	3.21 ± 0.55 ¹⁾
豨莶草总黄酮低剂量组	5	2.50 ± 0.28
豨莶草总黄酮中剂量组	10	1.25 ± 0.52 ³⁾
豨莶草总黄酮高剂量组	20	0.35 ± 0.30 ²⁾
银杏叶片组	50	1.32 ± 0.40

¹⁾ $P < 0.01$, 与假手术组比较; ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.05$, 与模型组比较。

2.2 豨莶草总黄酮对脑缺血大鼠脑组织含水量和脑梗死面积的影响 从表 2 可以得知,脑缺血后,模型组和给药组大鼠显现出明显的脑水肿和脑组织梗死。豨莶草总黄酮剂量依赖性地降低脑缺血再灌注大鼠脑组织含水量和脑梗死面积,尤其是豨莶草总黄酮中、高剂量(10、20 mg/kg)组与模型组比,有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 豨莶草总黄酮对脑缺血大鼠 MDA、SOD、GSH-Px 活性的影响 脑缺血后,模型组 MDA 量明显增多,与假手术组比较差异有极显著性($P < 0.05$)。豨莶草总黄酮中、高剂量组的 MDA 含量减少,与模型组相比有显著差异($P < 0.05$)。模型组小鼠脑组织中 SOD、GSH-Px 活性低于假手术组。豨莶草总黄酮高剂量组与模型组比较,2 种抗氧化酶活性均增加,差异有极显著性。豨莶草

表 2 豨莶草总黄酮对脑缺血/再灌注大鼠脑组织含水量和脑梗死体积比的影响($n = 10 \bar{x} \pm s$)

组别	剂量(mg/kg)	脑组织含水量(%)	脑梗死体积比(%)
假手术组	等体积	78. 81 ± 0. 63	0. 00 ± 0. 00
模型组	等体积	81. 09 ± 1. 34 ¹⁾	43. 6 ± 3. 3 ¹⁾
豨莶草总黄酮低剂量组	5	79. 76 ± 1. 32	36. 3 ± 3. 1
豨莶草总黄酮中剂量组	10	79. 32 ± 1. 00 ³⁾	21. 5 ± 2. 9 ³⁾
豨莶草总黄酮高剂量组	20	78. 95 ± 1. 51 ²⁾	12. 7 ± 3. 6 ²⁾
银杏叶片组	50	79. 38 ± 0. 76 ³⁾	20. 5 ± 3. 6 ³⁾

¹⁾ $P < 0. 01$,与假手术组比较; ²⁾ $P < 0. 01$,³⁾ $P < 0. 05$,与模型组比较。

表 3 各组大鼠脑组织 MDA 含量及 SOD、GSH-Px 活性($\bar{x} \pm s n = 10$)

组别	剂量(mg/kg)	MDA(mol/mg)	SOD(mol/mg)	GSH-Px(U/mg)
假手术组	等体积	1. 3 ± 0. 5	213. 2 ± 13. 1	1 018. 9 ± 50. 7
模型组	等体积	5. 2 ± 0. 5 ¹⁾	124. 1 ± 12. 3 ¹⁾	680. 1 ± 46. 3 ¹⁾
豨莶草总黄酮低剂量组	5	4. 7 ± 0. 6	135. 5 ± 14. 3	700. 4 ± 43. 1
豨莶草总黄酮中剂量组	10	2. 5 ± 0. 3 ³⁾	166. 3 ± 13. 8 ³⁾	817. 4 ± 56. 6 ³⁾
豨莶草总黄酮高剂量组	20	1. 7 ± 0. 8 ²⁾	200. 2 ± 12. 4 ²⁾	991. 3 ± 51. 3 ²⁾
银杏叶片组	50	2. 6 ± 0. 8 ³⁾	170. 3 ± 11. 8 ³⁾	825. 7 ± 54. 3 ³⁾

¹⁾ $P < 0. 01$,与假手术组比较; ²⁾ $P < 0. 01$,³⁾ $P < 0. 05$,与模型组比较。

总黄酮各剂量组与模型组相比较,2 种抗氧化酶活性呈剂量依赖性的上升。

3 结论

脑缺血后,模型组大鼠出现明显的神经功能缺陷、脑水肿和脑组织梗死,脑组织中 MDA 含量升高,超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性降低。豨莶草总黄酮能够明显改善脑缺血大鼠的神经功能,减轻脑组织水肿,降低脑组织梗死面积,降低脑组织 MDA 含量,提高脑组织超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性。说明豨莶草总黄酮具有抗脑缺血损伤作用,该作用可能与其抗氧化作用有关。

4 讨论

脑缺血发病机制涉及脑组织能量代谢缓慢、兴奋性氨基酸毒性、自由基损伤、钙超载、神经细胞凋亡等多个环节,是一个复杂的病理过程,其中氧自由基的生成及脂质过氧化是脑缺血损伤的重要机制。测定 MDA、SOD、GSH-Px 活性或含量变化可以反映出机体自由基水平和脂质过氧化反应的强弱,可作为观察药物抗脑缺血损伤作用的有效指标。

本实验通过研究豨莶草总黄酮对大鼠脑缺血损伤的作用,发现豨莶草总黄酮能明显改善大鼠神经功能缺陷,减少脑梗死面积,改善脑组织水

肿,降低脑组织 MDA 含量,提高 SOD、GSH-Px 活性。因此,豨莶草总黄酮可能是一种防治脑缺血的潜在药物,具有重要的开发价值。但由于本实验仅采用一种动物模型进行研究,因此豨莶草对脑缺血损伤的保护作用仍需采用多种脑缺血动物模型进行进一步研究确认,其抗脑缺血作用的机制还有待于进一步研究。

【参考文献】

- [1] 中国药典 2010 版. 一部[S]. 2010: 345.
- [2] 高 辉,李平亚,李德坤,等. 腺梗豨莶的化学成分研究(I)[J]. 中草药,2002,33(6):495.
- [3] 高 辉,李平亚,李德坤,等. 腺梗豨莶的化学成分研究(II)[J]. 中草药,2003,34(7):597.
- [4] 欧志强,赵 朗,王 刊,等. 腺梗豨莶的化学成分研究[J]. 中国中药杂志 2009,34(21):2754.
- [5] 王 鹏. 豨莶草乙醇提取物改善微循环及止痒的研究[J]. 医药论坛杂志 2003,24(12):19.
- [6] 朱兰镇,李 伟. 豨莶草胶囊对大鼠血液流变学及凝血功能影响的研究[J]. 黑龙江医药 2010,23(2):191.
- [7] 俞桂新,金若敏,王峥涛,等. 豨莶草抗血栓有效组分筛选研究[J]. 上海中医药大学学报 2005,19(3):39.
- [8] 胡慧华,汤鲁霞,李小猛. 豨莶草生品和炮制品抗炎、抗风湿作用的实验研究[J]. 中国中药杂志 2004,29(6):542.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84.

[收稿日期]2012-05-16

[修回日期]2012-10-08