

文章编号: 1003-2754(2004) 04-0354-03

三七三醇皂苷对脑缺血再灌注大鼠的保护作用

胡晓松¹, 周 东², 周德明¹

摘 要: 目的 通过对局灶性脑缺血大鼠不同再灌注时段的动态观察, 探讨三七三醇皂苷(PTS)对大鼠局灶性脑缺血/再灌注动物模型的神经行为学和脑梗死体积的保护作用。方法 采用改良的线栓法制备大脑中动脉阻塞(MACO)2h, 再灌注不同时间段(3h、6h、12h、24h、48h、72h、7d)的大鼠短暂局灶性脑缺血模型, 动物随机分假手术组、生理盐水对照组、三七三醇皂苷(PTS)组。用 Zea Longa 5分制评分和 TTC 染色法评价神经行为学和脑梗死体积。结果 神经行为学评分除72h 组有明显改善外, 其余各组与生理盐水对照组比较无显著性差异。脑梗死体积除再灌注3h、6h 外, 其余各组与生理盐水组比较差异均有显著性意义。结论 三七三醇皂苷对大鼠局灶性脑缺血及再灌注损伤有一定的保护作用。

关键词: 三七三醇皂苷; 脑梗死体积; 神经行为学; 缺血再灌注; 大鼠

中图分类号: R 743.3

文献标识码: A

Protective effects of PTS on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats HU Xiao-song, ZHOU Dong, ZHOU De-ming. (Department of Anatomy, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Objective To study the protective effects of PTS on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** The model of acute reperfusion injury after cerebral ischemia in rats was made by middle cerebral artery occlusion 6d before operation and 2h pre occlusion, the rats received intraperitoneally PTS (50 mg/kg) or normal saline injection respectively, then all the animals were allowed 2h ischemia and sacrificed after different durations of reperfusion (3h, 6h, 24h, 48h, 72h, 7d). The neurological deficit grades and the volume of the cerebral infarction were estimated by 2% TTC staining and Zea Longa's method. **Results** The data showed non-significant differences on the neurological deficit scores between the control and PTS-treated groups (50 mg/kg) except for at 72h after reperfusion. The cerebral infarct sizes of the forebrain in the PTS-treated groups except for (3h and 6h) of reperfusion reduced significantly compared with the control groups. **Conclusion** PTS possesses cerebral protective effects against ischemia-reperfusion injury.

Key words PTS; Infarct cerebral volume; Behavior; Ischemia-Reperfusion; Rat

脑缺血是一种临床上常见且预后不良的病症。保护细胞膜功能和避免缺血梗死区扩大, 以及促进半暗带神经元形态和功能恢复、减轻由于脑缺血所致的神经功能异常, 是对缺血性脑血管疾病采取处理措施的主要目的。近年来, 中药在脑缺血治疗中的作用逐渐得到重视, 三七为五加科人参属植物三七 *Panax notoginseng* (Burk) Chen FH 的干燥根, 具有散瘀止血、消肿定痛的功效。目前临床用三七有效成份治疗脑血管意外后遗症已取得一些疗效^[1, 2]; 另外, 有关三七活性成分三七总皂苷(PNS)或其单体的实验报道亦较多, 均证实了其对缺血性脑损伤的保护作用^[3, 4]。三七三醇皂苷(PTS)为三七类新药, 其主要活性成份 Rg1 的含量达60%以上, Rg1、R1、Re 三者的含量约达80%。本实验通过预防性给予 PTS 后, 动态观察对 MCAO 大鼠脑梗死体积及神经行为学评分变化的影响, 以进一步明确其脑保护作用

用和作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备及分组 健康雄性 SD 大鼠, 体重250~300g, 由四川大学实验动物中心提供。采用改良的线栓法制备动物脑缺血再灌注模型。大鼠术前12h 禁食不禁水, 以5%水合氯醛腹腔内注射麻醉(6ml/kg), 置仰卧位, 于颈部行长约25.0mm 常规纵行切口。暴露并钝性游离右侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)及颈外动脉(ECA), 结扎 CCA 近心端、ECA 近分叉部及 ICA 分支翼腭动脉(PPA)。在 CCA 上距其末端约3.0mm 处剪一小口, 用长6cm、直径0.26mm 尼龙线沿 ICA 方向插入约

收稿日期: 2004-01-17; 修订日期: 2004-06-14

作者单位: (1 四川大学基础与医学院人体解剖学教研室, 四川成都 610041; 2 四川大学华西医院神经内科, 四川成都 610041)

19. 0 ± 0.5 mm, 然后于 ICA 近心端结扎该动脉, 并全层缝合切口。缺血2h 后拔出阻塞线约10mm 实现再灌注。动物分组: (1) 三七三醇皂苷(由成都华神药业股份有限公司提供) 预防治疗(PTS) 组, 于术前6d 按50mg/kg 腹腔注射给药, 每天一次, 术前2h 再给药一次。(2) 生理盐水对照组, 药物由生理盐水代替; (3) 假手术组: 只插线10mm 左右, 不行其它条件干预。(1)、(2) 每组又分3h、6h、12h、24h、72h、7d 时间组, 每个时间组各5只, (3) 组3只。

1.2 神经病学评分 评分参照 Zea Longa 5分制标准^[5]: 即0分: 无神经损伤症状; 1分: 不能完全伸展对侧前爪; 2分: 向对侧转圈; 3分: 向对侧倾倒; 4分: 不能自发行走, 意识丧失。动物清醒2h 后进行模型筛选, 0分者剔除, 神经病学评分在取材前进行。

1.3 脑梗死体积百分比测定 大鼠脑缺血2h 后, 按预定再灌注时间点, 用生理盐水经主动脉快速冲洗至右心耳流出液变清亮后, 迅速断头取脑(摒弃蛛网膜下腔出血者), 立即置于-20℃ 冰箱冷冻10min, 用脑切片器按2mm 厚度, 在距额、枕极2mm 间冠状切开大脑。将脑片浸入37℃ 的2% 四氮唑红(2, 3, 5-Triphenyl tetrazolium chloride, TTC) 染色10min, 取出置于4% 多聚甲醛液中固定2h。正常组织染成深红色, 梗死灶呈白色。将固定的脑片按切片顺序排列。用数码相机拍照脑片前后两面后输入计算机, 根据各切片厚度计算出前脑体积和梗死体积的近似值, 得出 TTC 苍白区(梗死区) 占前脑体积的百分比。

1.4 统计学方法 数值用均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm s$) 表示, 脑梗死体积结果行方差分析(组间比较用 q

检验), 神经行为学评分用 Kruskal-Wallis 方法检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 神经行为学改变 再灌注术后大鼠多于1h 内清醒, 假手术组动物均活动正常, 无神经功能缺损症状, 神经行为学评分均为0分, PTS 组和生理盐水组入选动物神经行为学评分均在1~3 分之间。再灌注早期大鼠神经功能缺损症状较重, 于再灌注48h 后症状有所减轻。7d 时, 部分大鼠已无明显神经功能缺失症状(见表1)。经统计分析, 除再灌注72h 组外, 其余各时间组 PTS 组和生理盐水组之间差异无统计学意义。

2.2 梗死灶的演变 TTC 染色结果表明, 假手术组脑片均红染, 无白色梗死灶形成。生理盐水组再灌注3h 时即可见明显梗死灶, 多位于嗅沟上方的颞叶皮质和尾壳核(见图1, 约 Bregma + 0.8 mm), 再灌注6h 时梗死灶范围明显扩大, 可见较大的尾壳核和颞顶叶皮质梗死灶的融合(见图2, 约 Bregma + 0.6 mm)。至再灌注24h 梗死体积已达高峰, 并持续至72h。再灌注7d 时生理盐水组梗死灶仍存在(见图3, 约 Bregma + 0.8 mm), 皮质梗死灶未见明显缩小或消失, 但梗死体积较24h 时已有较大程度的减小。

PTS 组, 再灌注3~6h 组较之对照组无明显差异, 12h 组梗死体积较对照组即可见已有明显缩小($P < 0.05$), 至24h 梗死灶扩大不显著, 72h~7d 组脑梗死体积均较对照组有显著性差异($P < 0.01$)。至7d 时, 虽依然可见梗死灶, 但皮质梗死灶已明显减小或消失(见图4, 约 Bregma + 0.8 mm), 脑梗死体积同比下降达35.9% 左右。

表1 神经行为学评分($\bar{X} \pm s$)

组别	再灌注时间						
	3h	6h	12h	24h	48h	72h	7d
生理盐水组	2.0 $\pm$ 0.71	1.8 $\pm$ 0.40	1.6 $\pm$ 0.55	1.4 $\pm$ 0.55	1.2 $\pm$ 0.45	1.0 $\pm$ 0.71	0.6 $\pm$ 0.55
PTS 预防组	1.8 $\pm$ 0.45	1.6 $\pm$ 0.55	1.4 $\pm$ 0.55	1.2 $\pm$ 0.45	1.0 $\pm$ 0.71	0.6 $\pm$ 0.55*	0.4 $\pm$ 0.55

与生理盐水组比较 * $P < 0.05$

3 讨论

从本研究结果看, PTS 各组神经行为学与相应生理盐水组比较大多数无明显改善, 其原因主要有: (1) Zea Longa 5分制评分指标内容较少, 某些神经功能缺损症状无从表述, 且分值差距较小又是整数; (2) 脑梗死范围可随体重、年龄、入线深度的微小变化而呈现差异, 从而影响评分; (3) 实验动物未损伤脑区的神经代偿能力及侧支循环等方面存在差异。

另外, 据本实验观察, 成模动物神经功能缺失症状在再灌注后3h 内最重, 部分评分在2分的大鼠清醒后即烦躁不安, 掘地动作频繁, 抬头征明显, 此类大鼠多数在24h 内死亡; 评分在3~4 分者, 精神萎靡, 出现竖毛征, 并多于12h 内死亡, 尸检结果表明二者均多系蛛网膜下腔出血所致。显然, 若此类实验动物在规定再灌注时间点依然存活并对其进行评分或取材无疑将增加实验结果的偏差。

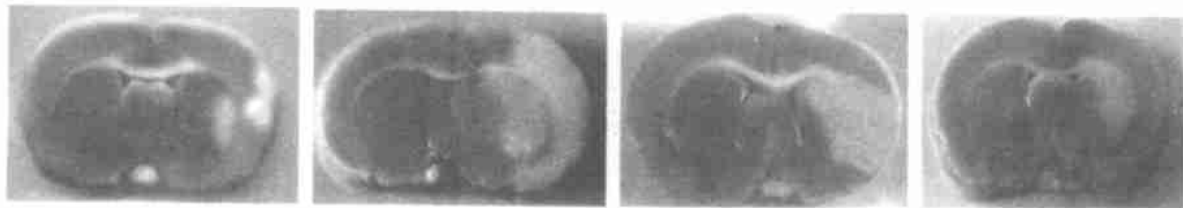
TTC 与完整的线粒体氧化酶系反应, 诱发产生深红色、光脂溶性的 Formazan 而使正常组织染色, 缺血组织的线粒体损伤, 不能诱导染色反应而呈白色, 容易鉴别^[6]。本实验采用目前已被国内外学者普遍采用的 TTC 作为梗死区域的检测标记^[7,8], 观察的脑梗死灶呈苍白色与 MCA 支配的脑区域一致, 未缺血部分呈红色, 证实模型制作成功。根据对梗死体积测定的结果发现, 除再灌注早期 3~6h 外, 其余各时间段 PTS 组较生理盐水组梗死范围均有明显减小。结果经统计学分析有显著性差异, 表明即使神经行为学上无明显改善, 但脑梗死体积却有明显的缩小, 也提示神经行为学表现与脑实际梗死体积之间无明显相关关系。结果显示再灌注 24h 内梗死灶扩大迅速, 并达高峰, 再灌注 12~24h, PTS 组梗死体积增大 15.8%, 较之生理盐水组 (39.8%) 差异显著 ($P < 0.05$)。表明该药对缓解梗死体积扩大方面有一定的作用。值得一提的是脑梗死 36h 后, 由于炎性细胞的侵入, 用线粒体完整的细胞代替损伤的神经元而可被 TTC 染色^[9,10], 故此在实验中所测定的脑梗死体积 (苍白色) 缩小并非完全由脑组织形态修复所致, 当然梗死体积缩小至少可以说明神经修复正在积极的进行。

众所周知, 脑缺血后的再灌注是神经功能恢复的基本条件, 也是脑组织损伤加重的重要因素。脑缺血再灌注损伤的病理生理是一个多环节、多因素、多途径损伤的酶促级联反应。已知导致再灌注损伤的因素包括自由基、脂质过氧化、细胞内 Ca^{2+} 超载、兴奋性递质的神经毒性效应及炎性损害等多重病理机制。本实验通过对大鼠短暂脑缺血再灌注损伤的动态观察, 证实该药可有效减小脑梗死体积。三七是传统中药之一, 现代药理研究证实其有抗自由基作用, 同时还具有降低血粘度、抗血小板聚集、扩张血管、降低血脂和改善微循环及抗炎等作用^[11]。另据报道, Rg1 还能增强纤溶系统活性, 促进血管内皮一氧化氮的释放而发挥抗血栓作用^[12], 因而有助于 Rg1 对缺血后软脑膜微循环的改善, 保护血脑屏障。另外, 三

七皂苷对缺血再灌注损伤还有减轻钙超载、减轻脑水肿、促进再灌注时的神经修复、减轻超微结构损伤和降低缺血再灌注期间死亡率等作用^[13], 因此推测, PTS 减小脑梗死体积、发挥脑保护作用的机制可能与上述众多因素有关。

[参考文献]

- [1] 容兆宇. 血栓通治疗缺血性中风量效关系探讨[J]. 中国中医急症, 2000, 9(3): 130
- [2] 李辉, 张华明, 彭芳, 等. 通舒胶囊对脑缺血的保护作用[J]. 中国新药杂志, 2002, 11(9): 698-700
- [3] 韩金安, 胡威夷. 三七总皂苷对缺血性脑损伤的保护作用的研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16: 506-507
- [4] 姜开余, 钱曾年. 三七总皂苷对沙土鼠脑缺血再灌注损伤的作用[J]. 中成药, 1995, 17(7): 32-33
- [5] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20: 84
- [6] Formazan K, Puschmann S, Schaper J, et al. The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction[J]. Virchow Archiv, 1981, 393: 287-297
- [7] Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, et al. Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats[J]. Stroke, 1986, 17(6): 1304-1308
- [8] Goldlust EJ, Paczynski RP, He YY, et al. Automated measurement of infarct size with scanned image of triphenyl tetrazolium chloride-stained rat brains[J]. Stroke, 1996, 27: 1657-1662
- [9] Benzi G, Moretti A. Is there a rationale for the use of acetylcholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease[J]? Eur J Pharmacol, 1998, 346(1): 1-30
- [10] Kato K, Hayako H, Ishihara Y, et al. TAK-147, an acetylcholinesterase inhibitor, increases choline acetyltransferase activity in cultured rat septal cholinergic neurons[J]. Neuroscience Letters, 1999, 260(1): 5-8
- [11] 侯安会. 三七的临床运用和实验研究概要[J]. 中医药信息, 1999, 6(1): 21-24
- [12] 徐陪亮, 刘宛斌, 饶曼人. 三七皂苷 Rg1 对实验性血栓形成的影响及其机制探讨[J]. 药学报, 1997, 32(7): 502-505
- [13] 张英鸽, 刘天培. 人参皂甙对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1994, 8(1): 12-18



从左至右, 分别为图1~图4, 示脑梗死灶的演变, TTC 染色