

参麦注射液对大鼠大脑皮质嘌呤含量的影响

黄陆平 何昕 戴勤学 陈双懂 陈思佳 王均炉

(温州医科大学附属第一医院麻醉科, 浙江 温州 325000)

【摘要】 目的 观察参麦注射液对大鼠大脑皮质嘌呤含量的影响,为参麦注射液的脑保护机制提供理论基础。**方法** 将 16 只 SD 大鼠按随机数字表法分成生理盐水对照组、参麦注射液组,每组 8 只。参麦注射液组大鼠腹腔注射参麦注射液 15 mL/kg,生理盐水对照组大鼠腹腔注射等体积生理盐水。给药后 24 h 处死大鼠,取大鼠脑组织匀浆后提取上清液,采用高效液相色谱法(HPLC)检测大鼠脑组织中三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、一磷酸腺苷(AMP)、腺苷以及肌酐的含量。**结果** 与生理盐水对照组比较,参麦注射液组大鼠脑组织 ATP、ADP、AMP、腺苷和肌酐含量均明显增加,差异均有统计学意义[ATP(ng/L): 31.62 ± 5.12 比 20.25 ± 4.53 , ADP(ng/L): 37.04 ± 6.72 比 25.12 ± 7.35 , AMP(ng/L): 87.82 ± 20.37 比 33.23 ± 10.34 , 腺苷(ng/L): 2.82 ± 0.15 比 1.12 ± 0.61 , 肌酐(ng/L): 11.72 ± 1.05 比 6.05 ± 2.55 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$]。**结论** 参麦注射液能提高大鼠大脑皮质的 ATP、ADP、AMP、腺苷以及肌酐的含量,这可能是其脑保护的作用机制。

【关键词】 参麦注射液; 大脑皮质; 嘌呤; 大鼠

The effect of Shenmai injection on purine content in rat's cerebral tissue Huang Luping, He Xin, Dai Qinxue, Chen Shuangdong, Chen Sijia, Wang Junlu. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Corresponding author: Wang Junlu, Email: wangjunlu973@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Shenmai injection on purine content in rat cerebral cortex in order to provide a theoretical basis concerning its brain protective mechanism. **Methods** Sixteen Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into two groups: normal saline control group and Shenmai injection group, with 8 rats in each group. Shenmai injection 15 mL/kg was injected intraperitoneally into the rats in Shenmai injection group, while in the normal saline group, an equal volume of normal saline was intraperitoneally injected. After the injection for 24 hours, the rats were sacrificed, and the cerebral cortex was removed on ice, homogenized and its supernatant was extracted; then high performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), adenosine and inosine contents in the supernatant of cerebral cortex. **Results** Compared with normal saline control group, ATP, ADP, AMP, adenosine and creatinine content in the cerebral cortex of Shenmai injection group were significantly higher, the differences being statistically significant [ATP (ng/L): 31.62 ± 5.12 vs. 20.25 ± 4.53 , ADP (ng/L): 37.04 ± 6.72 vs. 25.12 ± 7.35 , AMP (ng/L): 87.82 ± 20.37 vs. 33.23 ± 10.34 , adenosine (ng/L): 2.82 ± 0.15 vs. 1.12 ± 0.61 , creatinine (ng/L): 11.72 ± 1.05 vs. 6.05 ± 2.55 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$]. **Conclusion** Shenmai injection can elevate ATP, ADP, AMP, adenosine and creatinine contents in the cerebral cortex of rats, possibly that is the theoretical basis for brain protective mechanism of Shenmai injection.

【Key words】 Shenmai injection; Cerebral tissue; Purine; Rat

参麦注射液的主要成分是麦冬、人参。中医理论认为参麦注射液具有益气固脱、养阴生津、生脉之功效,是中医传统的急诊用药,目前已广泛运用于临床上治疗心血管、呼吸系统、神经系统疾病^[1]。脑血管疾病是严重危害人类健康的疾病,其中缺血性脑血管疾病约占脑血管病的 75%。目前急性缺血性脑血管疾病的药物治疗主要是发病后 3 h 内进行溶栓再灌注治疗以恢复血供^[2]。临床研究表明,参麦注射液能降低中风患者血液黏稠度、抑制血小板聚集、改善微循环,对急性缺血性中风具有神经保

护的作用^[3]。动物实验研究也表明,参麦注射液对局灶性脑缺血/再灌注(I/R)损伤大鼠也具有脑保护作用^[4],但其具体的保护机制并不明确。腺苷 A1 受体是嘌呤受体之一,主要分布在大脑皮质、海马等神经系统中,其受配体腺苷激活后可通过抑制谷氨酸盐等兴奋性神经递质达到神经保护的作用^[5]。本课题组前期研究表明,中枢神经系统腺苷 A1 受体介导了参麦注射液对脑 I/R 损伤大鼠的脑保护作用。但参麦注射液是如何影响中枢神经系统的腺苷 A1 受体而起到脑保护的作用并不明确。因此,本实验的科学假设是参麦注射液能够提高中枢神经系统的嘌呤物质(ATP、ADP、AMP、腺苷以及肌酐),进一步阐明参麦注射液的脑保护机制。

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.02.011

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81273926);浙江省温州市科技计划项目(Y20140122)

通讯作者:王均炉,Email: wangjunlu973@163.com

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器: 参麦注射液(正大青春宝药业有限公司); 高效液相色谱分析仪(美国 Aglient 1100 系统); 三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、磷酸腺苷(AMP)、腺苷和肌酐标准品(美国 Sigma 化学试剂公司); 磷酸二氢盐、磷酸氢二盐、高氯酸(HClO_4)、二甲苯和氢氧化钾(KOH)均为天津四友化学有限公司产品; 色谱柱(ODS2-C18, 4.6 mm $\times$ 200 mm, 5 μm , 伊力特), 高速低温离心机、高速匀浆机(常州市三盛仪器公司 FS-1A); 0.9% 生理盐水; 10% 水合氯醛。

1.2 实验动物分组: 健康成年雄性 SD 大鼠 16 只, 体质量(220 $\pm$ 10)g, 由温州医科大学动物实验室提供, 动物合格证号: 医动字第 2007000517442 号。于术前 1 周购买并饲养于 SPF 级动物房中。手术前 1 d 禁食、自由饮水。按随机数字表法分成生理盐水对照组和参麦注射液组, 每组 8 只。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 给药方法: 参麦注射液组大鼠腹腔注射参麦注射液 15 mL/kg, 生理盐水对照组大鼠注射等量生理盐水。

1.4 检测指标及方法: 于给药后 24 h, 采用水合氯醛(0.3 mg/kg, 腹腔注射)麻醉大鼠后断头, 在冰面上取大脑皮质, 并保存在 -80°C 的冰箱里待测。测定时取出标本按 10 mL/g 加入 0.4 mol/L HClO_4 , 高速匀浆后低温离心, 取出上清液用 KOH(4 mol/L)将 pH 值调成 6.0 ~ 7.0, 然后再次离心 15 min, 取上清液, 采用高效液相色谱法(HPLC)检测脑组织中嘌呤含量。根据前期实验结果得出检测腺苷和肌酐的流动相条件是 88 mmol/L NaH_2PO_4 + 12 mmol/L Na_2HPO_4 : 甲醇=85:15 (pH 值 6.0); ATP、ADP、AMP 的流动相条件是 88 mmol/L NaH_2PO_4 + 12 mmol/L Na_2HPO_4 : 甲醇=95:5 (pH 值 6.0), 流速 1.0 mL/min, 检测波长是 260 nm, 每次进液量为 20 μL 。采用 ATP、ADP、AMP、腺苷以及肌酐标准品确定出峰时间为 2.762、3.202、4.813、7.370、4.204 s; 同时将 ATP、ADP、AMP、腺苷及肌酐的标准品按浓度梯度(10、5、2.5、1.25、0.625 ng/L)溶解于双蒸水中。最

后根据 5 个标准浓度的峰面积, 绘制出 ATP 的标准曲线: 面积=34.05 $\times$ 浓度 + 6.13, $r=0.99989$; ADP 的标准曲线: 面积=36.6558 $\times$ 浓度 + 3.0694, $r=0.99993$; AMP 的标准曲线: 面积=50.9853 $\times$ 浓度 + 24.3499, $r=0.99870$; 腺苷的标准曲线: 面积=71.6888 $\times$ 浓度 + 20.5713, $r=0.99776$; 肌酐的标准曲线: 面积=45.0956 $\times$ 浓度 + 55.8249, $r=0.99326$ 。记录每个标本的 ATP、ADP、AMP、腺苷以及肌酐峰面积, 再将峰面积代入以上公式得出相应的浓度。

1.5 统计学方法: 使用 SPSS 17.0 统计软件分析数据, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 并采用成组设计 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表 1 结果显示, 与生理盐水对照组比较, 参麦注射液组大鼠大脑皮质 ATP、ADP、AMP、腺苷及肌酐含量均明显增加(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

参麦注射液的有效成分为麦冬皂苷、人参皂苷、麦冬黄酮、麦冬多糖和人参多糖, 方中人参大补元气, 麦冬养阴, 五脏六腑皆赖其充养^[6]。中医学理论认为: 缺血性脑病的病机以风、火、痰、瘀为标, 气血两虚为本。参麦注射液具有益气养阴的功效, 与中风后气血两虚病机相吻合^[5]。研究表明, 参麦注射液具有多种生物学功能, 尤其在神经保护方面, 能有效减轻脑水肿、调节兴奋性氨基酸递质的释放、抑制细胞凋亡、清除自由基^[6], 减少炎症因子释放^[7]。

嘌呤受体主要为 P1 受体和 P2 受体两大类, P1 受体又可分为 4 种亚型: 腺苷 A1、A2a、A2b、A3 受体; P2 受体又可分为 P2X 和 P2Y 受体^[8]。研究表明, 嘌呤受体主要分布于机体的神经元中以及其他组织中, 参与疾病的发展与转归, 如中风、血栓形成、肾功能衰竭、癌症、中枢神经系统疾病等。ATP 可以激动 P2 受体而减少神经组织中谷氨酸盐的释放达到神经保护的作用^[8]。腺苷可以激动腺苷 A1 受体也可以减少中枢神经系统谷氨酸盐的释放, 减少 Ca^{2+} 浓度以达到神经保护的作用^[9-10]。因此本实验采用大鼠腹腔注射参麦注射液, 24 h 后观察大鼠大脑皮质的 ATP、ADP、AMP、腺苷以及肌酐含量, 结果表

表 1 参麦注射液对大鼠大脑皮质嘌呤含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	ATP (ng/L)	ADP (ng/L)	AMP (ng/L)	腺苷 (ng/L)	肌酐 (ng/L)
生理盐水对照组	8	20.25 $\pm$ 4.53	25.12 $\pm$ 7.35	33.23 $\pm$ 10.34	1.12 $\pm$ 0.61	6.05 $\pm$ 2.55
参麦注射液组	8	31.62 $\pm$ 5.12 ^a	37.04 $\pm$ 6.72 ^a	87.82 $\pm$ 20.37 ^b	2.82 $\pm$ 0.15 ^a	11.72 $\pm$ 1.05 ^b

注: 与生理盐水对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

明,参麦注射液能增加大鼠大脑皮质中 ATP、ADP、AMP、腺苷及肌酐含量。

陈前芬等^[4]采用局灶性脑 I/R 损伤大鼠模型证实了参麦注射液能明显增加大鼠脑血流,减少脑细胞的缺血性损伤。Tabrizchi 和 Bedi^[11]的研究表明,增加腺苷能激动血管内皮表面的腺苷 A_{2a} 受体,扩张血管内径,增加血流量,缓解血管痉挛。故结合本研究的结果可以认为:参麦注射液对局灶性脑 I/R 损伤大鼠的脑保护机制之一是由参麦注射液诱导大脑皮质中的腺苷增加,激动了脑血管内皮表面的腺苷 A_{2a} 受体,引起脑血管的扩张,增加脑血流,减少脑细胞的死亡。本课题组前期的研究表明:腺苷 A₁ 受体介导了参麦注射液对脑 I/R 损伤大鼠的脑保护作用,因此参麦注射液的脑保护机制之二为参麦注射液能诱导大脑皮质中的腺苷增加,激动了神经元上的腺苷 A₁ 受体,减少中枢神经系统中谷氨酸盐的释放,从而达到脑保护的作用。另外,腹腔注射参麦注射液后,大脑皮质中 ATP 含量也增加,因此 ATP 激动 P₂ 受体产生的脑保护作用可能是参麦注射液脑保护作用第 3 个原因^[8]。增加的 ATP 能保持细胞膜上的 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性、稳定细胞膜、减少神经细胞的水肿可能也是参麦注射液神经保护的机制^[4,12]。

综上所述,参麦注射液能提高大鼠大脑皮质 ATP、ADP、AMP、腺苷以及肌酐含量,为参麦注射液的脑保护机制提供了新的理论基础。

参考文献

- [1] 白玉,张圣焱,王良荣,等.参麦注射液对外伤性脑损伤大鼠神经元细胞的保护作用[J].中国中西医结合急救杂志,2010,17(1):28-30.
- [2] Fujioka H, Kaneko H, Suzuki SS, et al. Hyperexcitability-associated rapid plasticity after a focal cerebral ischemia [J]. Stroke, 2004, 35(7): e346-e348.
- [3] Wu B, Liu M, Liu H, et al. Meta-analysis of traditional Chinese patent medicine for ischemic stroke [J]. Stroke, 2007, 38(6): 1973-1979.
- [4] 陈前芬,田鹤郎,杨卫东,等.参麦注射液对局灶性脑缺血再灌注局部脑血流和脂质过氧化的影响[J].中国病理生理杂志,1996,12(4):376,440.
- [5] 戴勤学,王雷雷,晁娟,等.百会穴注射腺苷 A₁ 受体激动剂对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑皮质的影响[J].中国中西医结合杂志,2012,32(3):390-393.
- [6] 王瑞,张琳静,师瑞,等.参麦注射液联合极化液对大鼠复苏后脑组织的影响[J].西南国防医药,2011,21(5):465-468.
- [7] 刘忠民,李南,于贺,等.参麦注射液对家兔心脏骤停后综合征影响的实验研究[J].中华危重病急救医学,2013,25(11):664-668.
- [8] Burnstock G. Introductory overview of purinergic signalling [J]. Front Biosci (Elite Ed), 2011, 3: 896-900.
- [9] Stone TW, Ceruti S, Abbracchio MP. Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration [J]. Handb Exp Pharmacol, 2009, (193): 535-587.
- [10] 王强,刘艳红,熊利泽,等.腺苷 A₁ 受体参与单次电针预处理诱导的脑急性缺血耐受[J].中国中西医结合急救杂志,2004,11(1):13-16.
- [11] Tabrizchi R, Bedi S. Pharmacology of adenosine receptors in the vasculature [J]. Pharmacol Ther, 2001, 91(2): 133-147.
- [12] 李建生,赵君玫,郭盛典,等.川芎嗪和参麦注射液对脑缺血/再灌注损伤老龄大鼠心肌组织 ATP 酶和自由基代谢的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2001,8(6):347.

(收稿日期:2014-08-12)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊对标注染色方法及放大倍数的有关要求

本刊从 2012 年 1 期起,论文图片说明中标注的染色方法及放大倍数,均使用“低倍放大”、“中倍放大”或“高倍放大”表示。图片放大倍数低于 200 倍为低倍,等于 200 倍为中倍,大于 200 倍为高倍,例如“HE 染色 ×40”将标注为“HE 染色 低倍放大”,不再标注具体放大倍数。

本刊对医学名词及术语的一般要求

医学名词应使用全国科学技术名词审定委员会公布的名词。尚未通过审定的学科名词,可选用最新版《医学主题词表(MeSH)》、《医学主题词注释字顺表》、《中医药主题词表》中的主题词。对没有通用译名的名词术语于文内第一次出现时应注明原词。中西药名以最新版本《中华人民共和国药典》和《中国药品通用名称》(均由中国药典委员会编写)为准。英文药物名称则采用国际非专利药名。在题名及正文中,药名一般不得使用商品名,确需使用商品名时应先注明其通用名称。中医名词术语按 GB/T 16751.1/2/3-1997《中医临床诊疗术语疾病部分/证候部分/治法部分》和 GB/T 20348-2006《中医基础理论术语》执行,腧穴名称与部位名词术语按 GB/T 12346-2006《腧穴名称与定位》和 GB/T 13734-2008《耳穴名称与定位》执行。中药应采用正名,药典未收录者应附注拉丁文名称。冠以外国人名体的征、病名、试验、综合征等,人名可以用中译名,但人名后不加“氏”(单字名除外,例如福氏杆菌);也可以用外文,但人名后不加“s”。文中应尽量少用缩略语。已被公知公认的缩略语可以不加注释直接使用,例如:DNA、RNA、HBsAg、CT、MRI 等。不常用的、尚未被公知公认的缩略语以及原词过长在文中多次出现者,若为中文可于文中第一次出现时写出全称,在圆括号内写出缩略语;若为外文可于文中第一次出现时写出中文全称,在圆括号内写出外文全称及其缩略语。不超过 4 个汉字的名词不宜使用缩略语,以免影响论文的可读性。