

• 论著 •

脑泰方提取物对局灶性脑梗死大鼠血浆纤溶活性的影响

陈 懿¹, 葛金文², 邓冰湘¹

(湖南中医学院①生理教研室, ②科技处, 湖南 长沙 410007)

【摘要】 目的:通过观察脑泰方提取物对局灶性脑梗死大鼠血浆纤溶系统活性的影响, 阐述脑泰方治疗局灶性脑梗死的作用机制。**方法:**将 33 只大鼠称重编号, 按完全随机法分为正常对照组 7 只(灌胃生理盐水)、假手术组 7 只(灌胃生理盐水)、模型组 7 只(灌胃生理盐水)、脑复康组 6 只(灌胃质量分数为 2.8% 的脑复康溶液, 每日剂量 0.28 g/kg)和脑泰方提取物组 6 只(灌胃脑泰方提取物, 每日剂量 2.8 g/kg 浸膏粉); 通过神经功能缺失体征评分及脑组织病理形态学改变判定模型的成功, 检测各组血浆组织型纤溶酶原激活物(t-PA)及其抑制物(PAI)活性。**结果:**模型组大鼠血浆 t-PA 活性明显低于正常对照组, PAI 活性明显高于正常对照组; 脑泰方提取物组血浆 t-PA 活性和 t-PA/PAI 比值明显升高, PAI 活性基本恢复到正常对照组水平; 脑泰方提取物和脑复康的作用基本一致。**结论:**脑泰方提取物能影响脑梗死大鼠血浆纤溶系统; 其作用机制之一可能与保护血管内皮细胞功能、改变纤溶活性有关。

【关键词】 脑梗死; 局灶性; 动物模型; 脑泰方; 脑复康; 纤溶活性

中图分类号: R285.5; R255.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-9691(2006)02-0070-04

Effects of Naotaifang extracts (脑泰方提取物) on plasma fibrinolytic activity in rats with focal cerebral infarction CHEN Yi¹, GE Jin-wen², DENG Bing-xiang¹. 1. Department of Physiology, 2. Department of Science and Technology, Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China

【Abstract】 Objective: To observe the effect of Naotaifang extracts (脑泰方提取物) on plasma fibrinolytic activity of focal cerebral infarction in rats, and investigate the mechanisms of Naotaifang extracts in treatment of focal cerebral infarction. **Methods:** Thirty-three rats were weighted and put in order, then they were randomly divided into normal control group ($n=7$), sham-operated group ($n=7$), model group ($n=7$), Naofukang (脑复康) group ($n=6$) and Naotaifang extracts group ($n=6$). The normal control group, sham-operated group and model group were given normal saline infused into stomach. Naofukang group was given $0.28 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of 2.8% Naofukang solution infused into stomach. Naotaifang extracts group was given $2.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of Naotaifang extract powder. Neural function defect score and cerebral pathophysiology were used to assess the success of the model establishment. The levels of tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor (PAI) were detected in all the groups. **Results:** The activity of t-PA in model group was lower than that in the normal control group, while PAI was higher. In Naotaifang extracts group, the activity of t-PA and the ratio of t-PA/PAI increased significantly, PAI recovered to the normal level. The effect of Naofukang was similar to that of Naotaifang extracts. **Conclusion:** Naotaifang can influence plasma fibrinolytic activity in rats with focal cerebral infarction by improving vascular endothelial function and fibrinolytic activity.

【Key words】 focal cerebral infarction; animal model; Naotaifang; Naofukang; fibrinolytic activity

本实验拟将月桂酸钠溶液注入大鼠颈内动脉, 建立局灶性脑梗死动物模型^[1]。用益气活血方脑泰方提取物(NTE)进行灌注治疗, 观察 NTE 对局灶性脑梗死大鼠血浆纤溶系统的影响。

基金项目: 湖南省杰出中青年科技基金资助项目(00JZY2145)

通讯作者: 葛金文, 教授, 博士研究生导师 (Email: cmgjlw@tom.com)

作者简介: 陈 懿(1975-), 女(汉族), 湖南永兴人, 医学硕士, 讲师, 主要从事生理学教学及心脑血管疾病的基础研究 (Email: cheniyi075@yahoo.com.cn)。

1 材料与方法

1.1 实验材料: 月桂酸钠, 化学纯, 购自上海医药集团上海化学试剂公司, 批号: F20010815; NTE(由黄芪、川芎、地龙等药物组成, 经水煎、醇提后制成浸膏粉)由湖南中医学院药学院制剂教研室提取, 1 g 浸膏粉含生药 4 g; 脑复康片(乙酰胺吡咯烷酮片, nootropil tablets)由黑龙江哈慈药业有限公司生产, 批号: F20010815; 组织型纤溶酶原激活物(t-PA)及其抑制物(PAI)试剂盒(批号: 010809)购

自上海太阳生物制品公司;聚乙烯导管。主要仪器设备:酶标仪(Labsystem MK3,芬兰);自动高速冷冻离心机(GL20A,湖南仪器仪表总厂离心机厂)。

1.2 实验动物:SD 大鼠 33 只,体重 220~300 g,鼠龄 7~8 个月,雌雄不限,由湖南中医学院实验动物中心提供,动物合格证号为医动字第 20-002 号。

1.3 模型制备:大鼠用质量分数为 1%的戊巴比妥钠按 2.5 ml/kg 腹腔注射麻醉。将麻醉大鼠仰卧固定于手术台上,在颈部正中偏左做一纵向切口,钝性分离出左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉、枕动脉和翼腭动脉;结扎颈外动脉远心端、大分支和枕动脉,夹闭左颈总动脉和翼腭动脉;在颈外动脉近心端剪一“V”型切口,逆行插入动脉导管,将配制好的月桂酸钠溶液由导管缓慢匀速推送至颈内动脉;推送完毕,让导管在切口处停留一段时间后拔出,结扎切口,松开动脉夹,清洗伤口,缝合皮肤,术后消炎。在整个手术过程中应保持室内温度(25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,大鼠肛温 $36 \sim 37^{\circ}\text{C}$,呼吸通畅。

1.4 动物分组及处理:将 33 只大鼠称重编号,按完全随机法分为正常对照组(7 只);生理盐水灌胃;假手术组(7 只);生理盐水灌胃;模型组(7 只);生理盐水灌胃;脑复康组(6 只);质量分数为 2.8%的脑复康溶液灌胃,剂量 $0.28 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$;NTE 组(6 只);NTE 浸膏粉灌胃,剂量 $2.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。每日 1 次,每次灌胃容量 10 ml/kg,连续 3 周;于最后一次用药后 1 h 麻醉大鼠,手术造成脑梗死模型,6 h 后取血标本,留血浆待用。

1.5 观察指标

1.5.1 神经功能缺失体征评分:手术前,对所有动物训练有关评分的动作 3 d。术后 6 h,参考 Bederson 等^[2]对栓塞后大鼠的评分标准进行神经功能缺失评分。将大鼠尾巴悬挂,离地面约 1 m,观察其前肢的屈曲情况;正常大鼠前肢会伸向地面。①大鼠前肢伸向地面,无其他症状,计为 0 分;②大鼠受损脑半球对侧前肢屈曲,且其姿势变化从轻微腰部屈曲、肘部肩部有一定程度内收,到腰、肘完全屈曲及肩内旋,计为 1 分;③将大鼠放在一张柔软的塑料纸上,提起尾巴,在其肩部施加一个柔和的力量,大鼠对外力促使其朝着患病一侧滑行的抵抗能力减弱,计为 2 分;④大鼠意识清楚,向右侧作追尾运动或倒向右侧,计为 3 分;⑤伴有意识障碍,无自发活动,计为 4 分;⑥死亡,计为 5 分。整个测试过程约需 3~5 min。

1.5.2 脑组织病理形态学变化:断头取脑后,用生理盐水轻轻将脑冲洗数遍,置体积分数为 10%的甲

醛固定 24 h,脱水,固定,石蜡包埋,常规切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察脑组织形态变化。

1.5.3 血浆 t-PA、PAI 活性检测:t-PA、PAI 活性测定采用发色底物法。颈动脉采血 4 ml 按 9:1 比例置于含质量分数为 3.8%的枸橼酸钠溶液塑料管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 $1\,690 \times g$ 离心 15 min,取血浆 200 μl ,加等体积酸化液混匀供测 t-PA,另取 200 μl 供测 PAI,按试剂盒说明书操作,血浆 t-PA 和 PAI 活性分别以 U/L 和 AU/L 表示(25 $^{\circ}\text{C}$ 、20 min 内抑制 1 个国际单位 t-PA 的 PAI 酶量称作 1 个 AU);同时计算 t-PA/PAI 比值,以判断纤溶活性。

1.6 统计学处理:采用 SPSS 10.0 统计软件包进行数据处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组样本均数间比较,方差齐时用 F 检验,两两之间比较用 q 检验,方差不齐用秩和检验;计数资料用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能缺失体征评分:正常对照组和假手术组大鼠神经功能体征正常,缺失体征评分为 0 分;模型组大鼠神经功能缺失体征明显,平均缺失体征评分为 (3.00 ± 0.82) 分;脑复康组和 NTE 组大鼠神经功能缺失体征明显改善,平均缺失体征评分分别为 (1.80 ± 0.45) 分和 (2.00 ± 0.63) 分,与模型组比较差异均有显著性(P 均 < 0.05);脑复康组和 NTE 组之间大鼠神经功能缺失体征评分基本一致,差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 脑组织病理形态学观察:正常脑组织血管周围间隙无增宽,皮质神经细胞排列有序,细胞核、核仁、染色质清楚,胞浆着色均质,无变性、坏死(彩色插页图 1);海马区锥体细胞 4~6 层,形态正常,细胞核、核仁、染色质清楚,胞浆着色均质,核膜完整,无肿胀(彩色插页图 2)。模型组术后 6 h 可见大脑皮质及海马区细胞肿胀明显,胞浆疏松,组织间隙增宽,部分细胞核固缩、破裂(彩色插页图 3,图 4)。脑复康组和 NTE 组脑组织损伤较轻,海马区可见部分细胞核固缩,染色质着色加深,大脑皮质小灶性坏死,皮质部血管周围炎性细胞浸润(彩色插页图 5~8);两药组之间脑组织病理形态学变化差异不明显。

2.3 血浆 t-PA、PAI 活性(表 1):与正常对照组和假手术组比较,模型组动物术后 6 h t-PA 活性明显下降($P < 0.05$),PAI 活性显著升高($P < 0.01$),t-PA/PAI 比值显著下降($P < 0.01$);脑复康组和 NTE 组 t-PA 活性和 t-PA/PAI 比值明显升高,较模型组差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),

与正常对照组和假手术组比较虽有较大幅度升高,但差异均无显著性(P 均 >0.05);PAI 活性基本恢复到正常对照组水平,但较模型组比较显著下降(P 均 <0.01);两药物间 t-PA、PAI 及 t-PA/PAI 比值基本一致,差异均无显著性(P 均 >0.05)。

表 1 各组血浆 t-PA、PAI 活性变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes of plasma t-PA and PAI activity in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	t-PA 活性(U/L)	PAI 活性(AU/L)	t-PA/PAI
正常对照组	7	6.2 $\pm$ 1.3	7.2 $\pm$ 0.3	0.86 $\pm$ 0.19
假手术组	7	5.9 $\pm$ 0.8	7.5 $\pm$ 0.5	0.79 $\pm$ 0.11
模型组	7	3.8 $\pm$ 0.6*	8.5 $\pm$ 0.4**	0.44 $\pm$ 0.06**
脑复康组	6	8.4 $\pm$ 2.0**	7.7 $\pm$ 0.5**	1.11 $\pm$ 0.30**
NTE 组	6	7.2 $\pm$ 1.7**	7.1 $\pm$ 0.7**	1.03 $\pm$ 0.28**

注:与正常对照组和假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;
与模型组比较:** $P<0.05$,** $P<0.01$

3 讨论

人体的纤溶系统中,纤溶酶的转化主要依赖于血浆游离的 t-PA 和 PAI 活性。t-PA 是由血管内皮细胞合成的一种丝氨酸蛋白酶,能激活纤溶酶原转变为纤溶酶,同时特异性地结合于纤维蛋白凝块上,加强纤溶效应。PAI 是 t-PA 的抑制物,血管内皮细胞、平滑肌细胞与血小板等均能合成 PAI。血小板是 PAI 重要的贮存库^[3,4]。正常情况下 t-PA 与 PAI 处于动态平衡状态,两者在人体纤溶系统的调节中起着保护血管完整性和畅通血管通道的作用,一旦其平衡失调,可能导致出血或血栓形成。许多研究发现,急性脑梗死患者血浆 t-PA 和 PAI 活性有明显改变。本实验结果显示,模型组大鼠血浆 t-PA 活性明显低于正常对照组,PAI 活性明显高于正常对照组,可能原因是:①血管因月桂酸钠注入而受损,内皮细胞合成 t-PA 的能力下降;②急性期自身溶栓机制的启动消耗大量 t-PA^[5];③血管内皮损伤后,血小板的功能增强,而血小板本身含有高浓

度的 PAI 被释放进入血液。

中医学认为:脑梗死多因年老气虚、无力推动血行,气滞血瘀,血阻经络、脑窍而成,但痰、瘀可以互阻,临床上气虚血瘀患者亦有表现为舌紫苔腻、脉细滑、眩晕、耳鸣等症状。因此,气虚血瘀为病机根本,益气活血为其主要治法。来自临床的证据表明,该法对脑缺血引起的脑损伤具有明显的保护作用^[6]。益气活血中药脑泰方中选用黄芪为君药,借其力专、性走,周行全身,大补脾胃元气,令气旺则血活,血活则瘀除,以治其本;川芎活血行气,气行则血行,是为臣药;地龙等药通经活络,化痰熄风,均为佐药,诸味配合,共奏益气活血通络,祛风化痰之效。

本研究结果发现,NTE 组血浆 t-PA 活性和 t-PA/PAI 比值明显升高,PAI 活性基本恢复到正常对照组水平。说明 NTE 能影响脑梗死大鼠血浆纤溶系统。其作用机制之一可能与保护血管内皮细胞功能,改变纤溶活性有关。说明 NTE 和脑复康的作用基本一致。

参考文献:

- [1]陈懿,邓冰湘,葛金文,等.一种基于血管内皮细胞损伤的局灶性脑梗死大鼠模型[J].中国血栓与止血学杂志,2003,9:25-27.
- [2]Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion; evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17: 472-476.
- [3]李家增,贺石林,王鸿利.血栓病学[M].北京:北京科学出版社,1998:64-77.
- [4]史卫国,王津文,毕建亭.葛根素对急性冠状动脉综合征患者胰岛素抵抗及纤溶活性的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2004,11:307-310.
- [5]Toni D, Fiorelli M, Zanette E M, et al. Early spontaneous improvement and deterioration of ischemic stroke patients: a serial study with transcranial Doppler ultrasonography [J]. Stroke, 1998, 29: 1144-1148.
- [6]贺运河,郝晓元,葛金文,等.脑泰方治疗气虚血瘀型脑梗死临床研究[J].中国中医急症,2001,10:319-320.

(收稿日期:2005-11-03 修回日期:2006-03-10)

(本文编辑:李银平)

• 消息 •

关于召开第 2 届机械通气高层研讨班的通知

由天津市呼吸机治疗研究中心、《中国危重病急救医学》杂志社联合承办的国家级 I 类继续教育项目(项目编号:2006-03-02-085)第 2 届机械通气高层研讨班定于 2006 年 6 月 2—5 日在天津召开,将对慢性阻塞性肺疾病(COPD)、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性心源性肺水肿(ACPE)等机械通气与脱机问题的诸多环节进行讨论,并邀请国内外专家进行专题报告,并进行实际操作,就“机械通气与脱机指南”(初稿)邀请国内专家进行研讨,欢迎国内从事 ICU、呼吸及相关专家,有一定基础的临床医师参加,参加者授予国家级继续教育学分 10 分,学习班预计为期 4 d,会务费(含资料费)600 元。

报名办法:将姓名、单位、职务、职称、地址、邮编、电话寄至天津市第三中心医院,天津呼吸机治疗研究中心徐磊收,邮编 300170。电话:022-84112612,84112268;Email: yzhqin@yahoo.com.cn。报名截止日期:2006 年 4 月 30 日。

(天津市呼吸机治疗研究中心 中国危重病急救医学杂志社)

脑泰方提取物对局灶性脑梗死大鼠血浆纤溶活性的影响

(正文见70页)

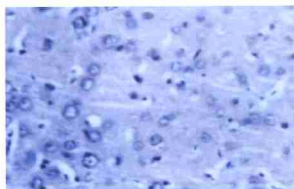


图1 正常对照组大鼠皮质 (HE, $\times 250$)
Figure 1 Cerebral tissue of rats in normal control group (HE, $\times 250$)

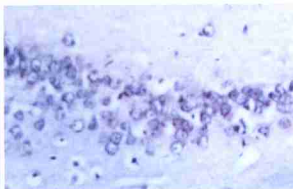


图2 正常对照组大鼠海马区组织 (HE, $\times 250$)
Figure 2 Hippocampal tissue of rats in normal control group (HE, $\times 250$)

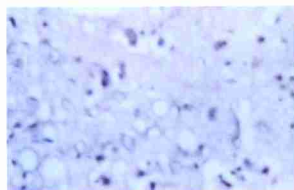


图3 模型组术后6h大鼠皮质 (HE, $\times 250$)
Figure 3 Cerebral cortex of rats 6 hours after operation in model group (HE, $\times 250$)

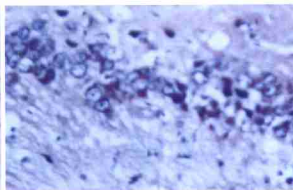


图4 模型组术后6h大鼠海马区组织 (HE, $\times 250$)
Figure 4 Hippocampal tissue of rats 6 hours after operation in model group (HE, $\times 250$)

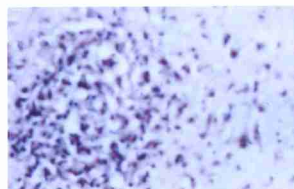


图5 脑康复组大鼠皮质 (HE, $\times 250$)
Figure 5 Cerebral cortex of rats in Naofukang group (HE, $\times 250$)



图6 脑康复组大鼠海马区组织 (HE, $\times 250$)
Figure 6 Hippocampal tissues of rats in Naofukang group (HE, $\times 250$)

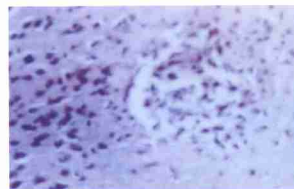


图7 NTE组大鼠皮质 (HE, $\times 250$)
Figure 7 Cerebral cortex of rats in Naotailang group (HE, $\times 250$)

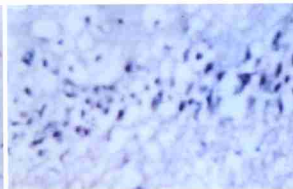


图8 NTE组大鼠海马区组织 (HE, $\times 250$)
Figure 8 Hippocampal tissues of rats in Naotailang group (HE, $\times 250$)