

三七中人参三醇皂苷对脑缺血的保护作用

向秋玲¹, 陈健文², 马仁强², 李靖², 李承², 朱建铭², 曹伟伟²
(中山大学 1.中山医学院; 2.药学院, 广东广州 510080)

摘要:【目的】研究三七中人参三醇皂苷(PTS)对脑缺血的保护作用。【方法】将48只SD大鼠随机分为:假手术组、大脑中动脉栓线法局灶性脑缺血(MCAO)模型组、PTS低(25 mg/kg)、中(50 mg/kg)、高(100 mg/kg)剂量组和血栓通注射液(0.45 mL/kg)组,通过行为学评分、脑含水量、脑梗塞范围和组织病理学检查等指标观察PTS对局灶性脑缺血的保护作用。同样将60只昆明小鼠随机分为:假手术组、不完全全脑缺血模型组、PTS低(25 mg/kg)、中(60 mg/kg)、高(120 mg/kg)剂量组和血栓通注射液(0.45 mL/kg)组,通过检测脑指数和脑伊文思蓝含量观察PTS对不完全全脑缺血的保护作用。【结果】对于大鼠,与模型组比较,PTS中、高剂量组均明显降低术后24 h大鼠行为学评分,减轻缺血侧脑半球水肿程度($P < 0.01$);PTS低、中、高剂量组的缺血脑梗塞范围($19.0\% \pm 4.5\%$ 、 $16.4\% \pm 3.9\%$ 、 $16.4\% \pm 3.7\%$)明显低于模型组($23.5\% \pm 3.4\%$, $P < 0.05$),缺血脑组织的病理改变也得到明显的改善,提示PTS对大鼠局灶性脑缺血有明显的保护作用。对于小鼠,PTS各剂量组的脑指数和脑伊文思蓝含量较模型组显著降低($P < 0.05$),提示PTS可通过抑制脑血管通透性的增加,从而降低脑指数,减轻脑水肿。【结论】PTS对大鼠大脑中动脉栓线法局灶性脑缺血(MCAO)损伤、小鼠不完全全脑缺血损伤均具有明显的保护作用。

关键词:三七; 人参三醇皂苷; 局灶性脑缺血; 不完全全脑缺血

中图分类号:R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-3554(2008)06-0705-05

Protective Effect of Panaxatriol Saponins on Cerebral Ischemia

XIANG Qiu-ling¹, CHEN Jian-wen², MA Ren-qiang², LI Jing², LI Cheng²,
ZHU Jian-ming², CAO Wei-wei²

(1. Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
2. School of Pharmaceutical Science, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To observe the anti-cerebral ischemia effects of Panaxatriol Saponins (PTS). 【Methods】SD rats ($n = 48$) were divided into six groups: sham group, MCAO (middle cerebral artery occlusion) model group, low-dose-PTS (25 mg/kg), middle-dose-PTS (50 mg/kg), high-dose-PTS (100 mg/kg) groups or Xueshuantong injection (0.45 mL/kg) group. We observed the anti-cerebral ischemia effects of PTS in MCAO rats through ethology scores, brain water content, cerebral infarction scope and histopathology examination. Similarly, Kunming mice ($n = 60$) were divided into sham group, imcompleted global brain ischemia model group, low-dose-PTS (25 mg/kg), middle-dose-PTS (50 mg/kg), high-dose-PTS (100 mg/kg) group or Xueshuantong injection (0.45 mL/kg) group. We observed the protection effects of PTS to imcompleted global brain ischemia through cerebral index and Evans blue content of brain. 【Results】To the rats, ethology scores and degrees of encephaledema significantly decreased in middle-dose-PTS and high-dose-PTS group ($P < 0.01$). Cerebral infarction scopes of low-dose-PTS, middle-dose-PTS, and high-dose-PTS group ($19.0\% \pm 4.5\%$, $16.4\% \pm 3.9\%$, $16.4\% \pm 3.7\%$) were significantly lower than the model group ($23.5\% \pm 3.4\%$, $P < 0.05$). PTS improved the pathological changes of cerebral ischemia of MACO rats. To the imcompleted global brain ischemia mice, PTS reduced cerebral index by

收稿日期: 2007-11-10

基金项目: 广东省重点攻关基金(2003C30113); 中山大学实验室开放基金(KF200727)

作者简介: 向秋玲(1978-), 女, 湖南永顺人, 博士, 讲师, 从事心脑血管研究; 陈健文, 通讯作者, 从事心脑血管药理学研究, E-mail:

chenjw@mail.sysu.edu.cn

down-regulating the increase of vasopermeability ($P < 0.05$). 【Conclusion】 PTS have protective effects on the focal cerebral ischemia of MACO rats or incompleting global brain ischemia mice.

Key words: panax pseudo-ginseng; panaxatriol saponins; focal cerebral ischemia; incompleting global brain ischemia

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2008, 29(6): 705-709]

脑缺血是一种临床上常见且预后不良的病症,可导致脑卒中等严重后果,直接原因是供应特定脑组织区域的脑血流被阻断或减少。三七为五加科人参属植物三七的干燥根,具有散瘀止痛、消肿定痛的功效。近年来临床用三七治疗脑血管意外后遗症有效^[1-2],许多药理实验也证实三七的活性成分——三七总皂苷(panaxnotoginsengsaponins, PNS)对缺血性脑损伤有明显的保护作用^[3-4]。有研究表明,PNS由静脉内注入永久性大脑中动脉闭塞大鼠后,能减少脑梗塞体积^[5]。人参三醇皂苷(panaxatriol saponins, PTS)注射液是从三七中提取出人参三醇皂苷后经一定工艺制成,它对脑缺血的作用尚不明确。因此,本文通过建立大鼠大脑中动脉栓线法局灶性脑缺血(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型、小鼠不完全全脑缺血模型,观察PTS对脑缺血的保护作用。

1 材料和方法

1.1 试剂和溶液

PTS(注射用),由中山大学药学院药理毒理实验室提供,纯度80%以上;血栓通注射液由广东永康药业有限公司提供;氯代三苯基四氮唑(红四氮唑),由Fluka公司提供。其余常用药物和试剂均为国产分析纯产品。

1.2 MCAO大鼠造模及分组

清洁级雄性SD大鼠(240~280g),合格证号为2004A089,由中山大学实验动物中心提供。将大鼠用100g/L水合氯醛3.5mL/kg腹腔注射麻醉,分离右侧颈内动脉,颈总动脉分叉处插入4-0尼龙线,进入颈内动脉并入颅至大脑前动脉,阻断大脑中动脉所有血流来源。假手术组除不插线外,其余步骤同上。造模成功的标准:动物手术清醒后有明显手术对侧(即左侧)Horner症(左侧眼睑下垂,眼球凹陷)及手术对侧(即左侧)偏瘫体征(不能完全伸展左前肢,行走时向左侧倾倒或转圈)。依上述标准将能够存活24h的大鼠确定为最后的实验对象,并进行行为学评分后,快速取右脑,

去掉嗅球、小脑和低位脑干,冰冻25min。然后冠状切两刀,将全脑切成3片。第1刀位于视交叉,第2刀在漏斗部。将脑前部用于脑含水量测定,中部用于脑梗死面积测定,后部用于病理组织学检查。

大鼠按随机原则分成6组,分别为假手术组(Sham,给予生理盐水)、MCAO模型组(Model,给予生理盐水)、PTS低剂量组(PTS-L, 25mg/kg)、PTS中剂量组(PTS-M, 50mg/kg)、PTS高剂量组(PTS-H, 100mg/kg)和阳性对照药血栓通注射液(XSTI, 0.45mL/kg)。药物用生理盐水配制成相应的浓度,使给药体积均为0.4mL/100g大鼠。总共给药5次:造模前2d预先腹腔注射给药,每天1次;造模前0.5h静脉注射给药1次;造模后4h和10h分别进行第2、3次腹腔注射给药。模型组和假手术组大鼠给予生理盐水,给药时间及体积同上。

1.3 MCAO大鼠神经行为学评分

MCAO大鼠术后24h按Bederson的方法对动物的行为进行神经行为学分级评分(0-4级)。标准如下:0级:未观察到神经症状(0分);1级:提尾悬空时,动物的手术对侧前肢表现为腕肘屈曲,肩内旋,肘外展,紧贴胸壁(1分);2级:将动物置于光滑平面上,推手术侧肩向对侧移动时,阻力降低(2分);3级:动物自由行走时向手术对侧环转或转圈(3分);4级:软瘫,肢体无自发活动(4分)。

1.4 MCAO大鼠脑含水量测定

神经行为学评分后,快速断头取鼠大脑。取左侧半脑前半部分分别称湿质量,置120℃烤箱烘干至恒质量,按公式计算脑组织含水量:脑组织含水量质量分数(%)=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

1.5 MCAO大鼠脑梗塞范围的测定

将各只大鼠中部脑片迅速置于10g/L红四氮唑中,避光,37℃温孵30min,其间每隔10min摇动一次,染色后以40g/L多聚甲醛固定。染色结果:正常组织呈红色,梗塞组织呈白色。将全脑片称重后,剪下白色梗死区,称质量,计算脑梗死区质量百分比。

1.6 MCAO 大鼠脑组织病理学检查

取脑于视交叉处行冠状切面并取脑后半部分放入 40 g/L 多聚甲醛中保存超过 48 h,每个组织块均酒精梯度脱水,石蜡包埋,切片部位统一为前部,切片厚约 4 μm ,每个标本各切 2 片,进行苏木精-伊红染色,光镜下观察脑组织病理学变化。

1.7 急性不完全脑缺血模型建立及各组脑指数和脑血管通透性的测定

清洁级昆明种小鼠,体质量 18 ~ 22 g,雄性,合格证号为 2004A087,由中山大学实验动物中心提供。小鼠按随机原则分成 6 组,每组 10 只,分别为对照组(Model,给予生理盐水)、假手术组(Sham,给予生理盐水)PTS 低剂量组(PTS-L, 25 mg/kg)、中剂量组(PTS-M, 60 mg/kg)、高剂量(PTS-H, 120 mg/kg)和阳性对照药血栓通注射液(XSTI, 0.45 mL/kg)组。造模前每组分别尾静脉给药,每天 1 次,连续 3 d。之后将小鼠麻醉分离其双侧颈总动脉,各组经尾静脉注射 10 g/L 伊文思蓝溶液 100 mg/kg (0.2 mL/10 g),并分别在注射 10 min 后结扎双侧颈总动脉。结扎后 3 h 断头取出脑组织,称质量后分别浸于甲酰胺溶液中,置恒温箱中温育 72 h,离心取上清浸出液比色。计算脑组织内伊文思蓝含量,建立伊文思蓝吸光值与浓度的标准曲线,以此反映给药对脑血管通透性的影响。脑指数(g/kg) = 100 × 脑质量(g)/体质量(g);伊文思蓝含量($\mu\text{g/g}$) = 4(mL) × ρ ($\mu\text{g/mL}$)/脑质量(g)。

1.8 统计学处理

实验数据用表示,组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 PTS 对 MCAO 大鼠行为学评分的影响

与假手术组比较,MCAO 模型组术后 24 h 的行为学评分显著增加。与模型组比较,PTS 低、中、高剂量组和 XSTI 组的 MCAO 大鼠术后 24 h 的行为评分均明显降低,有统计学差异($P < 0.05$)。提示本实验 MCAO 大鼠缺血性脑中风症状显著,PTS 注射给药可显著改善局灶性脑缺血损伤大鼠的神经损伤症状(表 1)。

2.2 PTS 对 MACO 大鼠脑组织含水量的影响

假手术组大鼠脑含水量较低,模型组脑含水量显著高于假手术组($P < 0.01$);PTS 中、高剂量组、阳性对照药组均显著低于模型对照组(与模

型组比较 $P < 0.01$)。以上结果提示,PTS 中、高剂量组可显著降低脑缺血损伤脑组织的含水量,减轻缺血侧脑半球水肿程度(表 1)。

2.3 PTS 对 MACO 大鼠脑梗塞范围的影响

本实验中模型组脑缺血 24 h 后大鼠脑组织梗塞程度明显。PTS 低、中、高 3 个剂量组和血栓通注射液组给药后,均能使脑梗塞面积百分比显著下降($P < 0.05$)。提示 PTS 对大鼠局脑缺血引起的脑梗死有显著抑制作用(表 1)。

2.4 PTS 对 MCAO 大鼠脑组织形态学变的影响

脑梗塞术后 24 h 的 MCAO 大鼠脑组织的病灶侧脑表面苍白、无光,脑表面血管较对侧充血,位于嗅束和大脑下静脉之间的一段大脑中动脉颜色变暗。经药物防治组可见充血脑组织缺血程度减轻。假手术组无明显缺血性改变。

各组脑组织病理学改变如下。假手术组(Sham):神经元的大小和形态结构基本正常,无明显水肿。神经细胞的胞浆丰富,核膜清楚,核仁清晰。神经胶质细胞核仁清晰,脑浆透亮或淡染,小血管、毛细血管周围间隙极小;有 2 例脑细胞呈轻度变性。模型组(Model):脑组织病变区域,间质疏松,明显水肿,水肿区域的神经细胞、神经胶质细胞、小血管及毛细血管周围间隙明显变宽,多数细胞肿胀变形、着色加深,尼氏小体消失,胞浆、胞核界线明显不清,部分胞核固缩明显成三角形,核膜结构模糊,核仁不清或消失。可见有脑组织毛细血管充血,有少量红细胞外漏至脑组织,可见炎症细胞浸润。PTS 低剂量组(PTS-L):比模型组病变略有改善,脑组织神经细胞、神经胶质细胞、小血管及毛细血管周围间隙中度变宽,细胞肿胀,染色加深,尼氏小体消失,少数细胞核固缩,核膜模糊,核仁不清。可见炎症细胞浸润。PTS 中剂量组(PTS-M):比模型组病变有较明显的改善,脑组织神经细胞、神经胶质细胞、小血管及毛细血管周围间隙略变宽,部分细胞轻度或中度肿胀,胞核和胞浆有些不清,核仁比较模糊。PTS 高剂量组(PTS-H):比模型组病变有明显的改善,脑组织神经细胞、神经胶质细胞、小血管及毛细血管周围间隙略变宽,部分细胞轻度或中度肿胀,胞核和胞浆有些不清,核仁比较模糊,偶见尼氏小体。阳性对照药血栓通注射液组(XSTI):脑组织病理形态改善,其神经细胞、神经胶质细胞、小血管及毛细血管周围间隙轻度增宽,神经细胞肿胀较模型组明显减轻(图 1)。

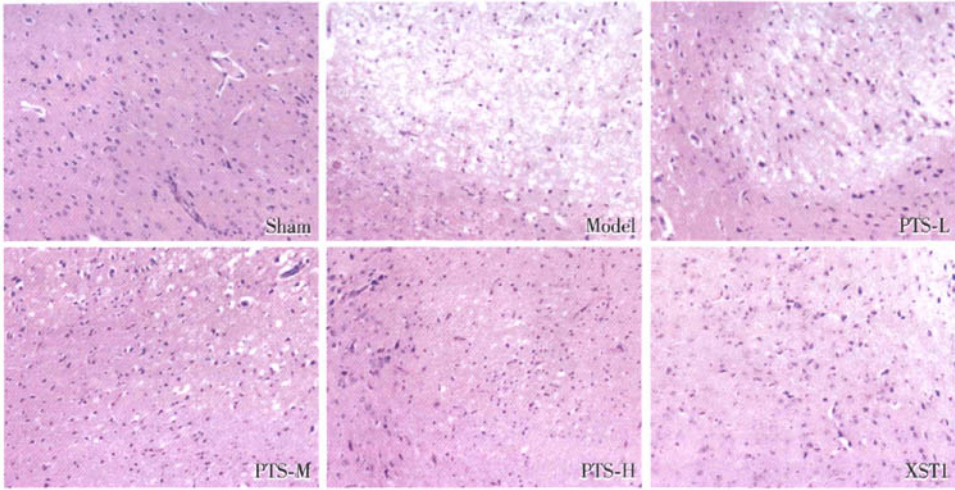


图 1 PTS 对 MCAO 大鼠脑组织形态学的影响

Fig.1 The pathological examination of ischemic brain tissue in rats ($\times 200$)

2.5 PTS 对急性不完全脑缺血小鼠脑指数和脑血管通透性的影响

模型组的脑指数和脑伊文思蓝含量较假手术组显著升高;与模型对照组比较,PTS 低、中、高剂

量组脑指数和脑伊文思蓝含量显著降低 ($P < 0.05$)。提示 PTS 可以通过抑制小鼠全脑缺血引起的脑血管通透性增加,从而降低脑指数,减轻脑水肿(表 1)。

表 1 PTS 对脑缺血相关指标的影响

Table 1 Effect of PTS on cerebral ischemia index ($n = 10$)

Group	Abnormal behavior	Water content of brain (%)	Cerebral infarction zone (%)	Brain exponential (g/kg)	Content of EB ($\mu\text{g/g}$)
Sham	0.25 ± 0.15	77.9 ± 1.2	1.2 ± 1.7	12.5 ± 0.5	5.7 ± 1.4
Model	$2.91 \pm 0.74^{1)}$	$80.2 \pm 1.2^{1)}$	$23.5 \pm 3.4^{1)}$	$14.6 \pm 0.6^{1)}$	$11.5 \pm 1.7^{1)}$
PTS-L	$2.10 \pm 0.70^{2)}$	79.4 ± 1.3	$19.0 \pm 4.5^{2)}$	$14.0 \pm 0.4^{2)}$	$9.5 \pm 0.4^{2)}$
PTS-M	$1.85 \pm 0.44^{3)}$	$78.6 \pm 0.9^{3)}$	$16.4 \pm 3.9^{3)}$	$13.5 \pm 0.5^{3)}$	$8.6 \pm 2.0^{3)}$
PTS-H	$1.61 \pm 0.67^{3)}$	$78.1 \pm 1.1^{3)}$	$16.4 \pm 3.7^{3)}$	$13.2 \pm 0.4^{3)}$	$8.4 \pm 2.6^{3)}$
XST	$1.68 \pm 0.26^{3)}$	$78.5 \pm 1.0^{3)}$	$15.3 \pm 5.5^{3)}$	$13.2 \pm 0.5^{3)}$	$8.1 \pm 1.9^{3)}$
<i>F</i>	16.725	6.804	153.136	11.084	21.210
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

1); $P < 0.01$ vs sham index; 2); $P < 0.05$; 3); $P < 0.01$ vs model index

3 讨论

缺血性脑中风是由于脑供血动脉的闭塞、狭窄、血黏度增高、严重动脉硬化及不明原因的血管炎性病变所导致的脑血栓形成以及脑栓塞等因素造成,若在短时间内不能及时消除,则形成严重缺血的梗死中心^[6]。本研究通过 MCAO 模型首先明

确了 PTS 对缺血性脑中风防治作用和对脑水肿的影响,再通过建立小鼠急性不完全脑缺血模型,观察 PTS 对脑指数与脑伊文思蓝含量的影响来探讨 PTS 对脑血管通透性的影响。

3.1 MCAO 大鼠局灶性脑缺血模型的应用

1982 年 Koiozumi 首次报道采用栓线阻断中动脉复制局灶性脑缺血模型,1986 年 Bederson 进一步改良该模型,使梗死率达到 100%^[5]。但不同

实验室对应用该法制备的模型成功率、梗死体积,动物死亡率均有区别,研究者认为这与动物的品系和体重,尼龙线大小、精细、插入的深度均有关系^[7]。本研究选用 240 ~ 280 g SD 大鼠适应性饲养 3 天后,参照 Bederson 法插入 4-0 尼龙线 17 ~ 20 mm 复制 MCAO 大鼠模型,观察 PTS 对缺血性脑中风的防治作用。本研究在阻断大脑中动脉后 24h 对各组动物进行神经行为学评分、脑组织含水量和梗死区重量百分比测定、病理学检查。实验结果表明,模型组偏瘫体征典型,脑水肿情况明显,脑梗死面积广泛,均表明本实验模型建立成功。而低、中、高剂量的 PTS 组能剂量依赖性地改善以上情况,证实了 PTS 对缺血性脑中风的防治作用。

3.2 PTS 改善缺血性脑水肿的可能机制

文献资料表明^[8-9]大脑中动脉阻断 6 h 后脑含水量即开始升高,24 ~ 72 h 为水肿的高峰期。缺血性脑水肿是脑血管病的严重病理改变之一,同时又是加重脑缺血的原因^[10]。缺血性脑水肿常为混合性脑水肿,即细胞毒性和血管源性间质性脑水肿合并出现。由于缺血缺氧致使脑组织能量耗竭,细胞膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ 泵功能障碍, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性降低,导致离子稳态失衡,再者由于脑缺血造成的炎性介质的释放使脑血管的通透性增加,透过血管壁进入组织的液体增加^[11]。对缺血性脑水肿的发生机制说法众多,现比较倾向于兴奋性氨基酸的神经毒性、自由基损伤、 Ca^{2+} 超载、炎症因子作用和水通道蛋白表达增加等^[12-13]。本研究中 MCAO 损伤模型实验结果表明,假手术组大鼠脑含水量较低,模型组脑含水量显著高于假手术组;PTS 中、高剂量组均显著低于模型对照组,提示 PTS 中、高剂量组可显著降低脑缺血损伤脑组织的含水量,减轻缺血侧脑半球水肿程度。另外,我们通过小鼠双侧颈总动脉结扎的不完全全脑缺血模型实验证明,与模型对照组比较,PTS 各组脑指数和脑伊文思蓝含量显著降低,提示 PTS 可以通过抑制小鼠全脑缺血引起脑血管通透性增加,从而降低脑指数,减轻脑水肿。

综上所述,PTS 能明显改善 MCAO 大鼠的偏瘫体征,缩小脑内梗死面积,缓解脑水肿;PTS 可以通过抑制小鼠全脑缺血引起脑血管通透性增加,从而降低脑指数,减轻脑水肿。本实验结果对 PTS 的临床应用提供了有力的实验依据和理论支持。

参考文献:

- [1] 胡志浩,张志耘.三七总皂苷对心脑血管的药理作用研究[J].天津药学,2006,18(6):51-55.
- [2] 李花,邓常清,陈北阳,等.三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注后 Caspase 表达的影响[J].中国药理学通报,2006,22(2):189-193.
- [3] 张峰,李晓红.大鼠局灶性脑缺血再灌注后肿瘤坏死因子表达的变化及三七总皂苷的作用研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2007,5(7):597-599.
- [4] 唐映红,张淑萍,梁燕,等.三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注后白细胞介素-1 β 和其相关因子及半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶表达的影响[J].中西医结合学报,2007,5(3):328-332.
- [5] Kimura Y, Sumiyoshi M, Kawahira K, et al. Effects of ginseng saponins isolated from Red Ginseng roots on burn wound healing in mice [J]. Br J Pharmacol, 2006, 148(6):860-870.
- [6] 卢锡林,吴婉玲,郑民樱,等.缺血性卒中患者 C 反应蛋白水平与颈动脉粥样硬化关系的研究[J].中山大学学报:医学科学版,2007,28(3s):221-222.
- [7] 吴浩,苏万东,吉训明,等.大鼠局灶性脑缺血模型建立的研究进展 [J]. 中国脑血管病杂志,2005,2(5):237-240.
- [8] Simard JM, Kent TA, Chen M, et al. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications [J]. Lancet Neurol, 2007, 6(3): 258-68.
- [9] Lee KR, Colon GP, Betz L, et al. Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin [J]. J Neurosurg, 1996, 84(1):91-96.
- [10] 杨淞然,华平,苏嵩欣,等.脑梗死后再次缺血性卒中与脑出血患者微血管病变及预后的比较[J].中山大学学报:医学科学版,2006,27(3):346-349.
- [11] Muir KW, Tyrrell P, Sattar N, et al. Inflammation and ischaemic stroke [J]. Curr Opin Neurol, 2007, 20(3): 334-342.
- [12] Dempsey RJ, Baskaya MK, Dogan A. Attenuation of brain edema, blood-brain barrier breakdown, and injury volume by ifenprodil, a polyamine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, after experimental traumatic brain injury in rats [J]. Neurosurgery, 2000, 47(2): 399-404.
- [13] Smith WS. Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective [J]. J Vasc Interv Radiol. 2004, 15(1 Pt 2):S3-12.

(编辑 孙慧兰)