

# 健脑益智胶囊不同纯化工工艺对脑缺血再灌注模型大鼠脑组织炎症反应的影响

郭东艳 范 妤 赵晓平<sup>1</sup> 覃鸿恩 (陕西中医学院 陕西 咸阳 712046)

**〔摘要〕** 目的 研究不同纯化工工艺制备的健脑益智胶囊对脑缺血再灌注损伤大鼠炎症反应和神经元凋亡的影响。方法 120 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、原药液组、醇沉组、壳聚糖组、膜分离组 给药组提前给药 1 w(给药剂量按健脑益智胶囊内容为  $0.6 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , 给药体积为  $1 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。建立大鼠中动脉缺血(MCAO)再灌注损伤模型,尼氏染色后观察大鼠缺血侧大脑皮质神经元形态变化;检测缺血侧脑组织白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 和细胞间黏附分子(ICAM)-1的含量;免疫组化法检测脑组织中凋亡相关蛋白 Fas、FasL 的表达。结果 不同纯化工工艺制备的健脑益智胶囊均能保护神经结构,减轻神经元损伤,显著降低脑组织中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 的含量,下调 Fas、FasL 蛋白的表达,其中醇沉组改善作用更为明显。结论 健脑益智胶囊通过抑制炎症反应,阻断神经细胞凋亡,实现神经保护作用。

**〔关键词〕** 健脑益智胶囊;脑缺血再灌注损伤;炎症因子;凋亡

**〔中图分类号〕** R285.5 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1005-9202(2017)03-0538-03; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2017.03.007

健脑益智胶囊由水蛭、葛根、郁金、石菖蒲、白茅根等药味组成,具有豁痰开窍、活血化瘀、通脉益智的功效,临床上主要用于预防和治疗外部颅脑损伤、缺血性脑损伤、脑震荡及脑水肿等脑部疾病<sup>[1-4]</sup>。为了提高健脑益智胶囊质量,降低临床服药量,本实验拟在前期提取工艺研究的基础上<sup>[5]</sup>,考察不同纯化工工艺制备的健脑益智胶囊对大鼠脑缺血再灌注模型炎症反应的影响。

## 1 材料与方 法

**1.1 药品** 葛根(批号:121101;产地:广西)、白茅根(批号:130401;产地:陕西)、郁金(批号:130101;产地:广西)、石菖蒲(批号:130401;产地:四川),以上饮片均购自西安盛兴中药饮片有限责任公司,经陕西中医学院王继涛老师鉴定,分别为葛根为葛根豆科植物野葛(Willd.)的干燥根,白茅根为禾本科植物白茅(Nees)的干燥根茎,郁金为姜科植物温郁金的干燥块根,石菖蒲为天南星科植物石菖蒲的干燥根茎;葛根素对照品(供含量测定用,批号:110752-201313)来源于中国食品药品检定研究院;壳聚糖(69047438,生化试剂 BR,国药集团化学试剂有限公司)。甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水,其他试剂为分析纯。

**1.2 仪器** UV-2550 紫外可见分光光度计(日本岛津),L-520 型离心机(湖南赛特湘仪离心机有限公司),恒温水浴锅(HH-2 型,北京科伟永兴仪器有限公司),梅特勒电子天平(GB204 瑞士),生物显微镜(Leica DM4000B,德国徕卡公司),GQ76 管式离心机(上海市离心机机械研究所有限公司),PFT-A500 电子天平(福州华志科学仪器有限公司)。

**1.3 实验试剂** 白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 和细胞间黏附分子(ICAM)-1 试剂盒均购于南京建成生物工程研究所;Fas、FasL 一抗、SABC 试剂盒均购于武汉博士德生物工

程有限公司。

**1.4 实验动物** 雄性 SD 大鼠 120 只,体重 300~350 g,饲养环境为 SPF 级,购于西安交通大学动物实验中心,动物合格证号:SCXK(陕)2013-003。

## 1.5 方 法

**1.5.1 不同纯化工工艺健脑益智胶囊的制备** 按处方比例称取白茅根、葛根、郁金和石菖蒲,其中郁金、石菖蒲两味药材加入 10 倍量的水,浸泡 2 h,提取挥发油 6 h,收集挥发油和水溶液备用;药渣与白茅根、葛根两味加入 10 倍量水,煎煮 2 次,每次 2 h,水煎液和蒸馏后的水溶液合并,过滤,即得水提液。将水提液分成 4 等份,一份备用,其余 3 份进行醇沉<sup>[6]</sup>、壳聚糖<sup>[7]</sup>和膜分离<sup>[8]</sup>三种工艺处理,另将挥发油分成四等份,分别加入原水提液及三种不同精制工艺后的溶液中,混匀。按处方比例称取水蛭,分成两份,一份粉碎,过 40 目筛,用 60%乙醇回流提取 1 h,提取 2 次,滤过,滤液浓缩至无醇味,分成 4 等份,分别加入上述四种溶液中,混匀;取另一份水蛭,粉碎,过 100 目筛,分成 4 等份,分别加入上述四种溶液中,混匀、干燥、粉碎、填充、即得不同纯化工工艺制备的健脑益智胶囊。

**1.5.2 动物分组与给药** 120 只大鼠随机分成 6 组,即假手术组、模型组、原药液组、醇沉组、壳聚糖组、膜分离组,每组 20 只。给药组提前给药 1 w,给药剂量按健脑益智胶囊内容为  $0.6 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,给药体积为  $1 \text{ ml} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

**1.5.3 大鼠脑缺血再灌注损伤模型的制备** 将经 1.5.2 方法处理后的大鼠提前禁食 12 h,照常给水。参照 Zea Longa 改良法建立左侧大脑中动脉缺血(MCAO)模型:大鼠称重后腹腔注射 10%水合氯醛 3 ml/kg 麻醉,于颈部偏右侧切口,分离右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)和颈内动脉(ICA),结扎右 CCA 近心端、ECA 及其分支动脉。分离右侧 ICA,沿 ICA 向下分离翼颌动脉,根部结扎该动脉分支。在 CCA 近心端备线,另一端加动脉夹,在距离颈动脉分叉 0.5 cm 处剪开一小口,将处理后的渔线经 ECA 插入 ICA 进入大脑中动脉分支处,以阻断大脑中动脉所有血流来源。缺血 1.5 h 后,拔出渔线,再灌注 48 h。假手术组只做动脉分离暴露,不插拴线,其余步骤相同。

基金项目:陕西省科技厅资助项目(No.2011KTCL03-02)

<sup>1</sup> 陕西中医学院附属医院

第一作者:郭东艳(1973-),女,教授,博士,主要从事中药提取工艺及其药效学研究。

手术过程中大鼠保持体温在 37℃ 左右。

**1.5.4 尼氏染色检测脑组织病理学变化** 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉后,快速断头取出大脑,置于 10% 甲醛溶液中固定,包埋切片,脱蜡至水后,0.1% 甲苯胺蓝染色 10 min,脱水、透明、封片,显微镜下观察并拍照,观察神经元胞体内尼氏体变化。正常细胞不同程度的含有尼氏体,经甲苯胺蓝染色后呈蓝色,细胞凋亡后,胞质内尼氏体减少甚至消失。

**1.5.5 ELISA 法检测大鼠脑组织中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 的含量** 取备用血清,严格按照 ELISA 试剂盒说明操作,测定 450 nm 吸光度值,制定标准曲线。标准及检测标本均采用复孔,复孔测定的吸光度值取均值减去零标准孔吸光度值的均值作为该浓度标准浓度或检测标本的测定值,进一步通过标准曲线和稀释倍数计算出浓度。

**1.5.6 免疫组化法检测缺血侧脑组织 Fas、FasL 表达水平** 大鼠灌注固定后,取缺血侧脑组织,常规固定、脱水、石蜡包埋后,制作标本切片,采用免疫组化 SABC 法染色,DAB 显色,光镜( $\times 400$ )下观察阳性细胞个数。每张切片随机取大脑皮质 5 个不重叠视野计数阳性细胞,计数不分细胞种类。

**1.6 统计学方法** 采用 SPSS13.0 软件进行单因素方差分析。

## 2 结果

**2.1 不同纯化工艺健脑益智胶囊对脑缺血再灌注后大鼠脑组织病理变化的影响** 缺血侧大脑皮质尼氏染色后光学显微镜下观察神经元胞体内尼氏体变化,结果显示:假手术组神经元胞体内尼氏体清晰可辨,呈紫蓝色斑块状,数量多,体积大;模型组尼氏体明显减少呈细颗粒状,染色浅,部分神经元内尼氏体消失;与模型组比较,不同纯化工艺制备的健脑益智胶囊预处理组尼氏体明显增多,体积增大,紫蓝色染色清晰。膜分离组尼氏体数量较少。见图 1。

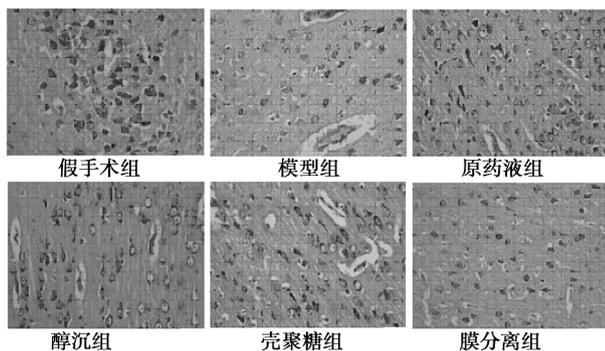


图 1 各组大鼠脑组织尼氏染色(甲苯胺,  $\times 200$ )

**2.2 不同纯化工艺健脑益智胶囊对脑缺血再灌注大鼠脑组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 ICAM-1 的影响** 脑缺血再灌注 48 h 后脑组织中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 水平均显著升高( $P < 0.01$ ),健脑益智胶囊不同纯化工艺组均能降低脑组织中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 的表达( $P < 0.05$ ),其中醇沉组对 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的表达抑制作用更为明显( $P < 0.01$ )。见表 1。

**2.3 不同纯化工艺健脑益智胶囊对脑缺血再灌注大鼠脑组织 Fas、FasL 表达的影响** 与假手术组比较,模型组 Fas、FasL 蛋白

表达水平明显增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,健脑益智胶囊不同纯化工艺组均能减低 Fas、FasL 蛋白的表达( $P < 0.05$ )。见表 2。图 2。

表 1 健脑益智胶囊对脑缺血再灌注大鼠脑组织 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

组别	IL-1 $\beta$ (pg/mg)	TNF- $\alpha$ (pg/mg)	ICAM-1 (ng/mg)
假手术组	3.37 $\pm$ 0.77	2.42 $\pm$ 0.53	18.32 $\pm$ 2.32
模型组	8.18 $\pm$ 1.55 <sup>1)</sup>	7.10 $\pm$ 1.29 <sup>1)</sup>	26.56 $\pm$ 5.32 <sup>1)</sup>
原药液组	5.65 $\pm$ 1.08 <sup>2)</sup>	4.76 $\pm$ 1.02 <sup>2)</sup>	21.65 $\pm$ 3.12 <sup>2)</sup>
醇沉组	4.43 $\pm$ 0.87 <sup>3)</sup>	4.04 $\pm$ 0.52 <sup>3)</sup>	20.31 $\pm$ 3.76 <sup>2)</sup>
壳聚糖组	4.93 $\pm$ 1.14 <sup>2)</sup>	4.28 $\pm$ 0.71 <sup>2)</sup>	20.34 $\pm$ 3.12 <sup>2)</sup>
膜分离组	6.05 $\pm$ 1.27 <sup>2)</sup>	5.03 $\pm$ 1.21 <sup>2)</sup>	21.72 $\pm$ 3.43 <sup>2)</sup>

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

表 2 健脑益智胶囊对脑缺血再灌注大鼠脑组织 Fas、FasL 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

组别	Fas	FasL
假手术组	10.35 $\pm$ 2.78	15.37 $\pm$ 2.12
模型组	32.80 $\pm$ 3.33 <sup>1)</sup>	28.33 $\pm$ 3.65 <sup>1)</sup>
原药液组	23.16 $\pm$ 3.74 <sup>2)</sup>	17.28 $\pm$ 1.30 <sup>2)</sup>
醇沉组	18.67 $\pm$ 2.12 <sup>2)</sup>	10.65 $\pm$ 1.38 <sup>2)</sup>
壳聚糖组	24.03 $\pm$ 3.37 <sup>2)</sup>	13.97 $\pm$ 2.57 <sup>2)</sup>
膜分离组	24.54 $\pm$ 3.60 <sup>2)</sup>	21.13 $\pm$ 2.94 <sup>2)</sup>

与假手术组比较:1)  $P < 0.01$ ;与模型组比较:2)  $P < 0.01$

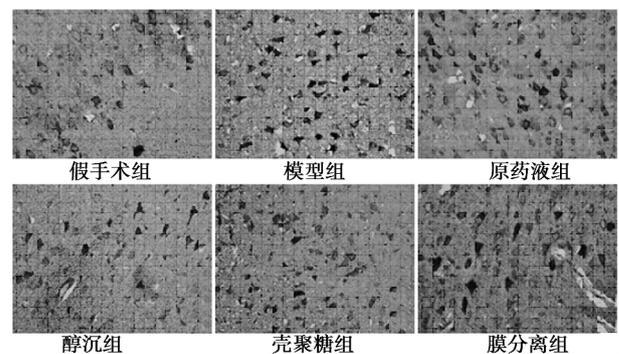


图 2 大鼠大脑皮质中 Fas 的阳性表达( $\times 400$ )

## 3 讨论

脑缺血及再灌注损伤的病理生理机制复杂,目前认为存在多种机制相互作用形成的复杂调控网络,包括炎症损害、自由基损伤、氧化应激、兴奋性氨基酸毒性、细胞内钙超载等,直接或间接导致神经细胞凋亡或死亡,导致神经功能障碍。大量研究表明炎症反应与脑缺血再灌注损伤关系密切。在炎症反应中,有许多炎症因子参与,IL-1 和 TNF- $\alpha$  是由单核/巨噬细胞产生的单核因子<sup>[9]</sup>。IL-1 可以协助白细胞迁移和刺激内皮细胞的各种反应,通过激活血管内皮细胞而增强内皮细胞黏附分子(ECAM)表达,增强白细胞与内皮细胞的黏附,破坏血脑屏障的通透性,加重脑组织损伤;同时 TNF- $\alpha$  与细胞膜上的死亡受体结合,细胞膜死亡受体结合,激活 Fas/FasL 凋亡蛋白,导致细胞凋亡<sup>[10,11]</sup>。本实验结果显示:健脑益智胶囊不同纯化工艺组

均能降低脑缺血再灌注大鼠脑组织中炎性细胞因子 IL-1、TNF- $\alpha$  和 ICAM-1 的含量,下调凋亡蛋白 Fas/FasL 的表达,说明健脑益智胶囊通过降低炎性因子与黏附分子的含量抑制炎症反应,阻断神经细胞凋亡,实现脑缺血再灌注后的神经保护功能。

#### 4 参考文献

- 1 张宝丽,范小璇,赵晓平.健脑益智胶囊对基底节区脑出血术后的疗效观察(J).陕西中医学院学报,2007;30(5):10-1.
- 2 范小璇,赵晓平,梁格婷.健脑益智胶囊对外伤性脑出血患者 IgG-CSF 的影响(J).中国中医急症,2011;20(10):1552-4.
- 3 周振国,范小璇,赵晓平,等.健脑益智胶囊对颅脑损伤大鼠血浆 NPY 含量的影响(J).现代中西医结合杂志,2012;21(31):3437-9.
- 4 畅涛,赵晓平,周振国.健脑益智胶囊治疗脑震荡疗效观察(J).辽宁中医药大学学报,2008;10(11):120-1.
- 5 赵晓平,吕杨,范小璇,等.健脑益智胶囊提取工艺研究(J).陕西中医学院学报,2013;36(5):83-5.

- 6 郭东艳,覃鸿恩,赵晓平,等.健脑益智胶囊水提部位精制工艺研究(J).陕西中医学院学报,2014;37(5):66-9.
- 7 杨伟平,郭东艳,覃鸿恩,等.壳聚糖澄清剂对健脑益智胶囊水提部位的纯化工艺研究(J).现代中医药,2014;34(6):70-2.
- 8 郭东艳,覃鸿恩,赵晓平,等.ZrO<sub>2</sub> 无机陶瓷膜微滤技术精制健脑益智胶囊水提部位的研究(J).现代中医药,2014;34(5):69-72.
- 9 袁立霞.当归拈痛汤对类风湿性关节炎作用机理及配伍的实验研究(D).哈尔滨:黑龙江中医药大学,2006.
- 10 王军,张红霞,贾士奇,等.生姜对全脑缺血再灌注大鼠脑组织炎性细胞因子和黏附分子含量的影响(J).医药论坛杂志,2011;32(15):12-4,18.
- 11 刘永刚,李芳君,王婧,等.银杏内酯 B 对大鼠脑缺血-再灌注损伤炎症反应的影响(J).中药材,2010;33(4):578-80.

(2015-08-28 修回)

(编辑 苑云杰/曹梦园)

## 环氧合酶-2 选择性抑制剂塞来昔布防治大鼠创伤性异位骨化的机制

曾荣东 柳明忠 陈巧凤 陈小青 许志通 张志珊<sup>1</sup> 郑锦阳<sup>2</sup> 连涛<sup>3</sup>  
(福建医科大学附属泉州市第一医院骨科,福建 泉州 362000)

**【摘要】** 目的 探究环氧合酶(Cox)-2 选择性抑制剂塞来昔布对大鼠创伤性异位骨化的防治机制。方法 创伤性异位骨化大鼠予塞来昔布治疗,分别采取喂食 2、6、10 w 的不同方案,治疗后观察各组肢体的皮温、肿胀程度及 X 线表现,并通过实时定量 PCR 及 Western 印迹实验,检测跟腱组织骨形态发生蛋白(BMP)-4 的表达含量。结果 塞来昔布组皮温、肿胀程度、新骨形成均显著低于对照(生理盐水处理)组( $P < 0.05$ )。同时,随着塞来昔布处理时间的延长,皮温均明显降低、肿胀程度及新骨形成情况均明显减轻;实时定量 PCR 及 Western 印迹检测显示:与对照组比较,塞来昔布组跟腱组织 BMP-4 的表达明显下调,并且随着时间的延长,BMP-4 的表达也相应下调。结论 塞来昔布可通过降低大鼠跟腱组织 BMP-4 的表达以干预异位骨化。

**【关键词】** 塞来昔布;异位骨化;骨形态发生蛋白(BMP)-4

**【中图分类号】** R683.13 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9202(2017)03-0540-03; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2017.03.008

异位骨化(HO)是一种非肿瘤性反应性病变,病理特征表现为局部纤维组织增生、钙化及化生,伴有异位新骨形成<sup>(1)</sup>,可导致该关节活动受限、强直、功能丧失。基因和自由基清除剂治疗还没有应用于临床,有待进一步的深入研究<sup>(2)</sup>。非甾体类抗炎药(NSAIDs)是目前临床公认的预防 HO 最有效的药物,但是约 30% 的患者因胃肠道反应而不能耐受<sup>(3)</sup>。有研究发现选择性环氧合酶(Cox)-2 抑制剂,如塞来昔布、美洛昔康等用于预防 HO 同样有效,且胃肠道反应小<sup>(4)</sup>。间充质细胞和骨形态发生蛋白(BMP)是诱导 HO 的主要活性介质<sup>(5)</sup>。林霖<sup>(6)</sup>直接注射骨形态发生蛋白(BMP)-4 重组腺病毒在裸鼠肌肉内成功诱导 HO,提示 BMP-4 与 HO 发生关系密切。本研究探讨 COX-2 选择性抑制剂预防大鼠 HO 的作用及使用疗程。

### 1 资料与方法

**1.1 实验动物、试剂** 60 只 SD 级体重(100±10)g 大鼠,雌雄各半,随机分为 6 组各 10 只,均购于上海斯莱克动物实验中心。塞来昔布(美国 Gibco 辉瑞公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒,蛋白裂解液,蛋白酶抑制剂(碧云天公司),多克隆抗体(美国 Santa 公司)。

**1.2 创伤性 HO 模型制备** 大鼠以 2% 氯胺酮 80~100 mg/kg 腹腔注射麻醉后,固定于手术台上,手术区域脱毛,碘伏消毒手术部位,无菌手术刀片沿大鼠右跟腱纵行切开 1 cm 皮肤切口,显露跟腱止点,垂直切口方向横行切断近止点部跟腱,术后全层缝合切口。

**1.3 治疗** 术后第 1 天开始给药,塞来昔布各亚组予塞来昔布 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 喂食 2、6、10 w,对照组各亚组喂食 2 ml 生理盐水 2、6、10 w。各组均每天灌胃 1 次,术后第 1 周隔天观察 1 次,1 w 后每周观察 1 次。

**1.4 治疗结果评定** ①在术后第 10 周后观察各组肢体的皮温、肿胀程度,并在麻醉状态下摄右后肢侧位 X 线片,观察新骨形成情况。皮温计平均值。肿胀程度:肿胀位于损伤点计 1

基金项目:福建省自然科学基金资助项目(No.2016J01610)

1 检验科 2 病理科 3 影像科

第一作者:曾荣东(1970-)男,副主任医师,主要从事骨科疾病研究。