

体包括 β -OHB、乙酰乙酸 (AcAc) 和丙酮, 其中 β -OHB 占 78%, AcAc 占 20%, 丙酮占 2%^[1]。目前血酮体测定采用硝基氢氰酸盐法, 只能测定 AcAc 和丙酮, 又因丙酮在人体的含量少且对该法的敏感性差, 故实际上所测的酮体只是反应 AcAc 的含量。肝脏是产生酮体的唯一器官, 且 AcAc 与 β -OHB 可在肝脏内相互转换, 即 $\text{AcAc} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\beta\text{-羟丁酸脱氢酶}} \beta\text{-OHB} + \text{NAD}^+$, 本文中 β -OHB 与酮体呈显著正相关, 说明 β -OHB 测定值与病人的临床表现一致, 对糖尿病酮症酸中毒的诊断有重要意义^[1,2], 而且由于 β -OHB 测定是定量测定, 血酮体测定是定性测定, 故 β -OHB 应可更精确更灵敏地反应糖尿病酮症酸中毒的程度。AcAc 和 β -OHB 是酸性物质, 随着血中浓度的增加, 导致机体代谢性酸中毒, 表现在 PH 值和 CO_2CP 下降, 故与 CO_2CP 呈负相关性, 但本文只显示 β -OHB 与 CO_2CP 呈负相关趋势, 可能与所取样本少有关。AG 是指血清中主要阳离子 Na^+ 与主要阴离子 Cl^- 、 HCO_3^- 浓度之和的差值, $\text{AG} = \text{Na}^+ - (\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-) = \text{未测阴离子} - \text{未测阳离子}$, 未测定的带阴电荷的物质主要是无机酸 (如磷酸、硫酸)、有机酸值 (如 AcAc、乳酸、 β -OHB) 和白蛋白, 未测定的阳离子主要为

K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 和带阳电荷的免疫球蛋白, 影响 AG 的物质很多, 可能单一的 β -OHB、AcAc、 CO_2CP 与 AG 的关系不大, 故与之无相关性。本文结果说明, β -OHB 与临床表现一致, 可作为常规指标供指导临床诊断和治疗使用。

表1 KET、 β -OHB、 CO_2CP 、AG 的相关系数(r)

	KET	β -OHB	CO_2CP	AG
KET		0.795 *	-0.416 **	0.178
β -OHB			-0.295 ***	0.217
CO_2CP				-0.249

* $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ *** $P = 0.052$

参考文献:

- [1] 徐锋. 血清 D-3 羟丁酸测定在糖尿病酮症酸中毒中的应用 [J]. 上海医学检验杂志, 1999, 14(2): 74-75.
- [2] 易斌, 魏桂芬, 唐银. 血清 β -羟丁酸测定方法的建立及其在糖尿病酮症酸中毒中的意义 [J]. 湖南医科大学学报, 2001, 26(2): 185.

文章编号: 1006-6233(2006)06-0523-03

丹参水溶性成分对中枢神经系统缺血缺氧的保护

汤佩莲¹, 何飞武², 潘甜美²

(1. 广东药学院门诊部, 广东 广州 510224

2. 广东省医学实验动物中心, 广东 广州 510180)

摘要: 目的与方法: 探讨丹参水溶性成分对中枢神经系统缺氧保护的作用和机理。以小鼠急性脑缺氧实验、耐化学性缺氧实验和全脑缺血动物模型三种不同的脑损伤方式, 观察丹参水溶性成分对中枢神经系统缺血缺氧状态的影响。结果与结论: 丹参水溶性成分能增加脑组织的耐缺氧能力、提高机体的血氧利用率, 降低机体的耗氧量和降低自由基损伤等多个途径而实现对中枢神经系统的保护。

关键词: 丹参水溶性成分; 中枢神经系统; 保护

中图分类号: R944.1

文献标识码: B

Study of the Protective Effects on the Ischemic and Anoxic Central Nerve System of Danshen's Hydrosoluble Compositions

TANG Pei-lian, et al

(The Clinic of Guangdong Pharmaceutical University,
Guangdong Guangzhou 510224, China)

Abstract: Objective and Method: To study the effects and the mechanisms of Danshen's hydrosoluble compositions on the ischemic and anoxic central nerve system. Experimental modles includes three means of injury on brain of mouse suffering from acute cerebral ischemia, mouse tolerant to ischemia reduced by

chemical and global brain ischemic animals. We observe the effects of Danshen's hydrosoluble compositions on the ischemic and anoxic central nerve system. **Result and Conclusion:** Danshen's hydrosoluble compositions can improve the tolerance to anoxia of brain markedly, increase the utility of oxygen in body blood, decrease the oxygen consumption in organism, relieve the damage of free radicles and so on. By those means Danshen's hydrosoluble compositions protect the central nerve system.

Key words: Danshen hydrosoluble composition; Central nerve system; Protective

丹参为唇形科鼠尾草属多年生草本植物,干燥的根。具有活血凉血、祛瘀止痛、安神除烦的功效^[1]。丹参水溶性成分,文献报道其有抗心肌缺血、改善微循环、抗炎等作用^[2],但有关其对中枢神经系统缺血的保护作用的报道比较少。因此,我们通过一系列的动物实验,观察其对中枢神经系统的在缺血、缺氧及再灌注情况下的保护作用,探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药物:生药材丹参(购自广州致信中药饮片有限公司),丙二醛(MDA)测试盒(南京建成生物科技公司);超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(南京建成生物科技公司)。

1.2 主要仪器:GD-350S3 射频双极电凝器(上海泰益医疗器械设备有限公司);JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝仪器研究所);电动匀浆器(美国 Glas-Col 公司);UV-4501S 紫外可见分光光度计(天津港东科技发展有限公司)。

1.3 实验动物:清洁级雄性 BALB/c 小鼠 120 只,体重 18~22g;清洁级雄性 SD 大鼠 60 只,体重 300±10g,由广东药学院动物实验室提供。

2 方法

2.1 丹参水溶性成分提取工艺^[3]:精称丹参原生药粗粉 150g,加水 12 倍回流提取两次,每次提取时间为 1.5h;合并提取液、过滤。醇沉(50% 乙醇溶液),静置过夜,过滤,回收乙醇,得浓缩液。加水、稀盐酸调节 pH=2,用醋酸乙酯萃取 4 次(分别为 80ml、80ml、60ml、60ml),合并萃取液,回收醋酸乙酯,得干膏。

2.2 用注射用水溶解丹参水提取物,制成含量为 1g/10ml 注射液。

2.3 小鼠急性脑缺氧实验^[4]:取 60 只小鼠,随机分成正常对照组、丹参低剂量组和丹参高剂量组 3 组,每组 20 只。低剂量组给药量为 0.5ml/kg,高剂量组给药量为 1.0ml/kg,对照组给予生理盐水比较。静脉给药 30min 后快速断头处死,记录断头后张口喘息时间。

2.4 小鼠耐化学性缺氧实验^[5]:取小鼠 60 只,随机分成 3 组,分组及给药方法、剂量同上。给药后 30min,各组小鼠腹腔注射亚硝酸钠 0.2g/kg,造成化学性缺氧模型,观察并记录每只小鼠自注药后到死亡得时间即存活时间。

2.5 大鼠全脑缺血再灌注后海马 MDA 含量、SOD 活力测定

2.5.1 全脑缺血动物模型:参考 Pulsinelli^[6] 四血管闭塞法制作全脑缺血模型。大鼠随机分成假手术组、模型生理盐水组和模型丹参组 3 组,每组 20 只。丹参组于缺血前 10min 腹腔注射丹参(15ml/kg 体重),生理盐水组在缺血前 10min 腹腔注射同等容积生理盐水。

符合一下条件的大鼠入选缺血模型组:①动脉夹闭 60s 内,大鼠翻正反射消失;②持续双侧瞳孔开大,角膜反射消失;③肛温监测,稳定在 37±0.3℃;④脑电图呈接近基线的低平的电波

动或近似直线。

手术前晚大鼠禁食,自由饮水,戊巴比妥钠(40mg/kg 体重)腹腔注射大鼠进行麻醉。将大鼠仰卧固定在手术台上,作颈前正中切口,切开皮肤及皮下组,仔细分离出双侧颈总动脉,并分别套以丝线(仅用作标记,不结扎),术中注意不损伤血管及血管周围的迷走神经和颈交感干。将颈前切口缝合后再将大鼠俯卧位固定于手术台上,作颈后正中切口,分离肌肉后暴露双侧第一颈椎横突上的翼孔,用双极电凝器插入翼孔烧灼,永久阻断双侧椎动脉,缝合切口。24h 后于动物清醒状态下将大鼠直接仰卧固定于手术台上,拆开颈前正中切口缝线,用动脉夹同时钳夹双侧颈总动脉 15min 后松开动脉夹,剪断丝线,确认双侧颈总动脉再灌后关闭切口。手术过程中进行持续肛温监测,并用白炽灯照射的方法使大鼠肛温稳定在 36.7~37.3℃ 范围内。

假手术组动物仅灼烧双侧椎动脉,但不夹闭双侧颈总动脉,其余步骤同缺血组。正常组大鼠不予任何处理。

2.5.2 海马组织的样本制备:实验动物均于 3h、12h、24h、72h、7d 快速断头处死(每组 4 只),于生理盐水冰面上快速取出大脑,置于冰生理盐水中快速冲洗,用滤纸吸干水分,生理盐水冰面上快速分离取出双侧海马组织,并迅速置入冻存管,快速液氮冷冻后再置于 -70℃ 冰箱待测。

2.5.3 MDA 含量检测:测定时取出海马样本,低温环境下电子天平精确称重,再置入 EP 管中,取 9 倍重量的生理盐水,超声波细胞粉碎机制成 10% (重量/体积)的组织匀浆。严格按照试剂盒说明书操作。

方法:硫代巴比妥酸法。公式:组织 MDA 含量 = (测定管吸光度 - 空白管吸光度) / (标准管吸光度 - 标准空白管吸光度) × 标准品浓度 (10nmol/ml) ÷ 蛋白含量 (mgprot/ml)。

2.5.4 SOD 活性检测:测定时取出海马样本,低温环境下电子天平精确称重,再置入 EP 管中,取 9 倍重量的生理盐水,超声波细胞粉碎机制成 10% (重量/体积)的组织匀浆。严格按照试剂盒说明书操作。方法:黄嘌呤氧化酶法。公式: [(对照管吸光度 - 测定管吸光度) / 对照管吸光度] ÷ 50% × (反应液总体积/取液量) ÷ 组织中蛋白含量

2.6 统计学处理:实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用 spss10.0 软件对数据中各组之间进行 one-way ANOVA 统计学分析。

3 结果

3.1 小鼠急性脑缺氧实验:结果显示,正常小鼠断头后呼吸时间在 21s 左右,不同剂量的丹参水溶性成分(0.5ml/kg, 1.0ml/kg)均可延长断头小鼠的呼吸时间,与正常对照组比较差异显著(P < 0.05 或 P < 0.01)。

3.2 小鼠耐化学性缺氧实验:结果显示,不同剂量的丹参水溶性成分(0.5ml/kg, 1.0ml/kg)均可延亚硝酸钠中毒小鼠的生存

时间,与空白对照组比较差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表1 丹参水溶性成分对小鼠断头呼吸的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(ml/kg)	呼吸时间(s)
正常对照组	-	21.03 ± 1.51
丹参低剂量组	0.5	22.72 ± 1.77 *
丹参高剂量组	1.0	24.02 ± 1.92 **

与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 大鼠海马 MDA 含量变化:结果显示:各采样时相 MDA 含量①与假手术组比较,模型生理盐水组 MDA 含量均明显升高

表3 大鼠海马 MDA 含量变化($\bar{x} \pm s$) (nmol/mgprot)

组别	3h	12h	24h	72h	7d
假手术组	3.92 ± 0.46	4.48 ± 0.64	4.40 ± 0.90	5.04 ± 1.26	4.0 ± 0.32
模型 NS 组	6.08 ± 0.45##	8.60 ± 0.94##	6.94 ± 0.85##	6.68 ± 0.51#	4.88 ± 0.46##
模型丹参组	5.20 ± 0.76 **	6.76 ± 0.39 *	5.60 ± 0.56 *	4.96 ± 0.52 **	4.0 ± 0.68 *

与假手术组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 NS 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.4 大鼠海马 SOD 活性检测:结果显示:各采样时相 SOD 活性:①与假手术组比较,模型生理盐水组 SOD 活性明显降低,至

($P < 0.01$), 12h 达到高峰并随再灌注时间的延长而逐渐降低, 7d 时仍高于假手术水平;②模型丹参组可显著降低各采样时相 MDA 的含量,并于再灌注 72h 降至假手术组水平。

表2 丹参水溶性成分对小鼠化学性缺氧死亡时间的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 0.5 (ml/kg)	呼吸时间(s)
正常对照组	-	19.69 ± 1.97
丹参低剂量组	0.5	21.11 ± 1.56 *
丹参高剂量组	1.0	22.37 ± 1.99 **

与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

7d 时 SOD 活性回升至假手术组水平;②模型丹参组可显著提升各采样时相 SOD 活性,并于 72h 达假手术组水平。

表4 大鼠海马 SOD 活性变化($\bar{x} \pm s$) (NUI/ mgprot)

组别	3h	12h	24h	72h	7d
假手术组	61.32 ± 4.80	56.64 ± 6.37	59.0 ± 6.82	55.8 ± 3.77	58.4 ± 3.54
模型 NS 组	49.2 ± 3.03#	39.4 ± 2.41#	44.6 ± 3.65#	49.4 ± 4.40#	56.0 ± 3.54
模型丹参组	54.2 ± 3.19 *	45.4 ± 4.98 *	52.2 ± 4.49 *	55.2 ± 4.09 *	61.4 ± 4.28

与假手术组比较: # $P < 0.01$; 与 NS 组比较: * $P < 0.01$

4 讨论

4.1 丹参的水溶性成分:丹参的化学成分主要分为脂溶性和水溶性两类。水溶性成分主要是原儿茶醛、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 A、B、C、D、E、F、G 等^[7]。

4.2 丹参水溶性成分对脑缺血缺氧刺激的保护作用:缺血缺氧对机体是一种劣性刺激,影响机体的氧化供能,导致机体心、脑等重要器官能量衰竭而死亡。断头造成脑血供应中断,但脑中原有的血和营养物质尚能使脑功能维持一段时间,丹参的水溶性成分可使脑组织耐缺氧能力增强,脑功能维持时间延长,从而延长小鼠喘息时间。小鼠亚硝酸钠致死实验中,丹参的水溶性成分能延长小鼠的生存时间,提示其可能具有提高机体的血氧利用率,降低机体的耗氧量,从而提高组织利用氧的能力,延长因缺氧造成的氧供能力不足的动物的生存时间。即丹参的水溶性成分对组织代谢具有调节及保护作用。

4.3 丹参水溶性成分对神经细胞生物氧化的保护:氧化应激是缺血性脑损伤的重要机制。DNA 是细胞内氧自由基最主要的攻击对象。因此认为,脑缺血再灌注后的氧化损伤可促使细胞凋亡。本研究结果显示,与生理盐水组对比,丹参组使海马组织 SOD 活性增强,MDA 含量降低,减轻了自由基的损伤。因而证明丹参的抗凋亡作用通过降低自由基损伤而实现。

综上所述,丹参水溶性成分的神经营养作用可通过增加脑

组织的耐缺氧能力、提高机体的血氧利用率,降低机体的耗氧量和降低自由基损伤等多个途径而实现。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上)[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002. 478-482.
- [2] 杨春欣. 丹参素的药理研究进展[J]. 中国药理学通报, 1997, 13(4):298-301.
- [3] 张荣泉,王德仁,张蓉. 丹参水溶性成分提取工艺研究[J]. 中药材,2001,24(11):818-819.
- [4] 李卫平,明亮,张艳,等. 黄芪多糖耐缺氧作用的实验研究[J]. 安徽医科大学学报,1995,30(3):184-185.
- [5] 张明霞,赵惠,胡拥军,等. 红花对小鼠抗应激能力的影响[J]. 中国中医药信息杂志,1999,6(1):26-27.
- [6] Pulsinelli WA, Buchan AM. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation[J]. Stroke, 1988, 19(7):913-4.
- [7] 中国医学科学院药物研究所. 中草药现代研究[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1996. 472.