

安宫牛黄丸对急性脑出血大鼠脑组织中一氧化氮合酶及单胺类神经递质的影响

杨文清¹ 任玉录² 郭克锋¹ 朱银星¹

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-745X(2009)01-0083-02

【摘要】 目的 探讨安宫牛黄丸对大鼠脑出血急性期脑组织中一氧化氮合酶(NOS)及单胺类神经递质的影响。方法 建立大鼠脑出血急性期模型,观察脑出血后4、24、72h脑组织中一氧化氮(NO)和NOS及海马和皮质区去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺(5-HT)的含量及不同治疗方案下其含量的变化。结果 模型动物损伤后4h脑组织中NO含量增加,NOS活性升高,与正常组相比有显著差异,72h达到高峰。安宫牛黄丸组72hNO含量和NOS活性明显低于模型组与小牛去蛋白血清组。脑出血后4h,模型组神经递质含量较正常组显著下降,以24h下降明显,72h又有回升并接近4h值;安宫牛黄丸组、小牛去蛋白血清组与模型组相比均有差异,但安宫牛黄丸组作用优于小牛去蛋白血清组。结论 安宫牛黄丸对脑出血急性期的大脑具有保护作用。

【关键词】 脑出血 一氧化氮 一氧化氮合酶 单胺类神经递质 安宫牛黄丸

The Effect of *Angong Bezoar Pill* for Nitric Oxide Synthase and Monoamine Neurotransmitter in Brain Tissue of Rats' Brain Hemorrhage Acute Stage

YANG Wen-qing¹, REN Yu-lu², GUO Ke-feng¹, et al

¹Tangdu Hospital Fourth Military Medical University(Xi'an 710038)

²Health Vocational Teachoical College Qinghai(Xinin 810000)

【Abstract】 Objective: To explore the effects of *Angong Bezoar Pill* for nitric oxide synthase and monoamine neurotransmitter in brain tissue of acute stage of rats' brain hemorrhage. **Methods:** To found the model of rats' brain hemorrhage acute stage. After brain hemorrhage 4, 24, 72h, the content and the change of nitrogen monoxidum, nitricoxide synthase in brain tissue and EA, DA, 5-HT in seahorse and cerebral cortex were observed. **Results:** After injury 4h, the content of NO increased. The activity of NOS heightened and 72h reached peak. The content of NO and the activity of NOS of *Angong Bezoar Pill* group degraded obviously, compared with serum of calf deproteinization and model group. After brain hemorrhage 4h, the content of monoamine neurotransmitter was degression, among the total 24h decreased most obviously. After 72h, the *Angong Bezoar Pill* group the content of monoamine neurotransmitter markedly heightened and the effect was better, compared with serum of calf deproteinization and model group. **Conclusion:** The *Angong Bezoar Pill* can protect brain tissue from rats' brain hemorrhage acute stage.

【Key words】 Brain hemorrhage; Nitric oxide; Nitricoxide synthase; Monoamine neurotransmitter; *Angong Bezoar Pill*

目前,脑血管病已经成为威胁人类死亡的前3位疾病,但脑血管病有其自身的发病特点,对其贵在早期预防,早期发现,早期治疗,早期康复。本实验拟通过复制大鼠脑出血急性期动物模型,并给予安宫牛黄丸治疗,观察其对大鼠脑出血急性期脑组织一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)含量及海马、脑皮质单胺类神经递质的影响,从而进一步阐明安宫牛黄丸的作用机理。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 实验动物:健康 Wister 雄性大鼠 63 只,体重

1 第四军医大学唐都医院(西安 710038)

2 青海卫生职业技术学院(西宁 810000)

300~350g,由第四军医大学实验动物中心提供,以标准饲料喂养并自由饮水。随机分为药物组、模型组、阳性对照组各 18 只,正常对照组 9 只。术前 12h 禁食、4h 禁水。(2) 主要药物、试剂与仪器 安宫牛黄丸产自北京同仁堂,用前用蒸馏水配置成 0.4g/kg。Ⅶ型胶原酶(Sigma 公司),肝素钠(12500u/2ml),在 1u/μl 的Ⅶ型胶原酶 1μl 中加入 6.25u/μl 肝素钠 1μl 配成 1u/μl 的肝素化Ⅶ型胶原酶溶液。动物脑立体定位仪(西安西北光电仪器厂);微量注射器(上海医用激光仪器厂),牙科钻(宁波医疗器械厂);X-TR 型电视显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法 (1) 脑出血模型制作及药物治疗:大鼠 1% 戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔麻醉,俯卧位固定在立体定向仪上,去除大鼠头背侧的皮毛,消毒,于头背侧作 0.5cm 纵行切口,暴露颅骨

和前窗,于前窗前 1.0 mm,中线右旁 3 mm 处用牙科钻钻一直径约 2 mm 的圆孔,不损伤硬脑膜。用微量注射器沿钻孔方向垂直进针,深 5.5~6.0 mm,接着缓慢匀速推注肝素化 VII 胶原酶 3 μ l^[1]入脑,整个注射过程控制在 5 min 内完成,注射后留针 10 min,缓慢退出微量注射器,缝合皮肤切口。保证整个手术操作过程中大鼠有自主呼吸并注意保暖。术后在保暖和通风环境下待动物苏醒。正常组仅注射等量 0.9% 氯化钠注射液,其余步骤与出血组完全相同。药物组分别于模型后 4、24、72h 安宫牛黄丸灌胃 2ml/100g 及甘露醇 2ml/100g 股静脉注入,阳性对照组模型后 4、24、72h 给予小牛去蛋白血清 (2ml/100g) 和甘露醇 2ml/100g 股静脉滴,模型组在造模型 4、24、72h 予灌胃 0.9% 氯化钠注射液(2ml/100g),正常组常规喂养。每组均于用药后 1h 后采集标本。(2)标本采集:大鼠断头取脑,用滤纸吸干表面的水分,去除小脑、嗅球、低位脑干,分离出海马和全脑皮质并称量,置入 5ml 组织匀浆器中,各加入 0.1 mol/L 冰冷高氯酸 1ml 和 0.05% EDTA-2Na 混合水溶液 1ml,冰浴下匀浆,4 $^{\circ}$ C 条件下 18000rpm 离心 10min,取上层清液 2ml 分装。其余脑组织置入匀浆器,加入含有 1% Tritonx100 50mmol/L 的 TBS 匀浆液(TBS:脑组织约为 1ml:300mg),低温 10000rpm 离心 30min,取上层清液 2ml 分装。将分离出的上层清液 -80 $^{\circ}$ C 冷冻待测。(3)含量测定:脑组织匀浆 NO 测定采用硝酸还原酶法,NOS 的测定采用比色法,均使用南京建成生物工程研究所试剂盒。步骤严格按照说明书进行。海马、脑皮质单胺类神经递质去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)和 5-羟色胺(5-HT)的测定采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法进行测定,按试剂盒

说明书进行操作,酶标仪在 450nm 处测吸光值。

1.3 统计学处理 应用 SPSS11.0 统计软件。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠脑组织中 NO、NOS 活性变化比较 见表 1。大鼠脑出血后 4h,损伤的脑组织中 NO 含量增加,NOS 的活性升高,与正常组相比有差异($P < 0.05$)。模型组 72h 时 NO 含量和 NOS 活性与正常组相比有显著差异($P < 0.01$);药物组 4h 后与模型组相比 NO 含量、NOS 的活性有明显下降($P < 0.01$),与阳性对照组相比亦具有统计学意义($P < 0.05$),其中以 24h 时 NO 含量、NOS 的活性下降幅度为大。

表 1 各组大鼠脑组织中 NO、NOS 活性变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NO(mol/L)			NOS(u/ml)		
		4h	24h	72h	4h	24h	2h
模型组	8	2.55 \pm 0.37*	5.09 \pm 0.71*	5.45 \pm 0.57**	0.93 \pm 0.12*	1.18 \pm 0.17*	1.84 \pm 0.05* Δ
药物组	8	1.83 \pm 0.25* Δ	1.52 \pm 0.23* Δ	1.50 \pm 0.19* Δ	0.85 \pm 0.07*	0.49 \pm 0.13 Δ	0.40 \pm 0.02 Δ
阳性对照组	8	2.32 \pm 0.18*	2.50 \pm 0.23*	2.10 \pm 0.27*	0.74 \pm 0.82*	0.86 \pm 0.12*	0.83 \pm 0.11*
正常对照组	9	0.71 \pm 0.14	0.75 \pm 0.13	0.72 \pm 0.12	0.13 \pm 0.04	0.13 \pm 0.01	0.13 \pm 0.03

与正常对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.01$ 。下同

2.2 各组大鼠脑组织海马和脑皮质中单胺类神经递质含量比较 见表 2。模型组中海马和全脑皮质组织中 5-HT 和 DA 的含量明显下降而 NE 含量显著增高,与正常组差异有显著性($P < 0.05$);其中 5-HT 和 DA 含量以 24h 时下降严重,药物组与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠海马、脑皮质单胺类神经递质含量的影响 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	NE			DA			5-HT		
		4h	24h	72h	4h	24h	72h	4h	24h	72h
模型组	8	88.37 \pm 62.56*	52.50 \pm 105.93*	90.90 \pm 77.11*	2.00 \pm 1.68*	1.25 \pm 3.52*	2.87 \pm 2.03*	6.25 \pm 5.56*	5.75 \pm 6.38*	10.54 \pm 2.42*
药物组	8	157.38 \pm 79.79* Δ	260.62 \pm 76.18* Δ	309.00 \pm 56.11 Δ	3.37 \pm 1.24*	5.63 \pm 4.26* Δ	8.00 \pm 3.31 Δ	9.63 \pm 6.17*	18.5 \pm 9.56* Δ	21.25 \pm 9.69 Δ
阳性对照组	8	90.35 \pm 67.26*	108.25 \pm 56.86*	237.37 \pm 50.96*	2.75 \pm 3.61*	3.13 \pm 77.26*	5.50 \pm 1.18*	7.55 \pm 2.27*	11.13 \pm 9.95*	15.50 \pm 7.01*
正常对照组	9	378.13 \pm 16.45	306.50 \pm 21.39	357.13 \pm 20.70	9.25 \pm 4.41	9.50 \pm 4.95	9.33 \pm 3.35	25.75 \pm 2.40	26.12 \pm 3.80	25.37 \pm 2.10

3 讨论

安宫牛黄丸主要用于中风、偏瘫,伴有高热昏迷者,并广泛应用于颅脑损伤意识障碍、幼儿重症肺炎、高热惊厥、中毒性痢疾、大脑发育不全等伴有高热、神昏、抽搐等急症的急救。NO 是一种具有多种生物活性的物质,一方面有松弛血管平滑肌、舒张血管、抑制血小板聚集等保护性作用;另一方面,在缺血性脑损害后,可以与超氧化自由基作用形成过氧化亚硝酸盐或者氧化产生亚硝酸阴离子,它们都有细胞毒性作用。内源性 NO 由 NOS 催化 L-精氨酸生成。在脑缺血早期主要表现为脑保护作用,而在缺血中后期,由于在疾病持续状态下,NOS 得以表达,产生大量 NO,造成严重的细胞毒性作用。因此,减少 NOS 的活性对脑组织可起到一定地保护作用^[1,2]。本实验显示,脑出血后 4h NO 的含量和 NOS 活性已较正常脑组织升高,在 24h 时其含量和活性达到最高,从中可见 NO 的含量随 NOS 活性增高而增加。安宫牛黄丸可降低大鼠出血的脑组织中 NOS 的活性,减少 NO 的含量,尤其是 24h 时效果明显。缺血损伤后脑组织中单胺类神经递质含量异常增高,向血液、脑脊液及邻近神经元扩散,使脑血管痉挛,脑循环血量下降及血管通透性增高,脑组织的缺血、缺氧^[3]。本实验显示,大鼠脑出血后 24h 海马区单胺类神经递质(5-HT、NE、DA)含量已较正常显著升高,此时大鼠的脑水肿亦

最为严重。实验表明,早期甘露醇静滴的同时给予安宫牛黄丸灌胃其海马区单胺类神经递质含量明显降低,其疗效明显高于甘露醇和小牛去蛋白血清注射液,72h 时其单胺类神经递质含量接近正常组,提示通过降低脑出血急性期脑组织中 NO 含量和降低 NOS 活性及单胺类神经递质含量可能是安宫牛黄丸治疗脑出血的机理之一。因此,我们建议在可能的情况下积极早期、短期服用安宫牛黄丸,可以明显减轻神经功能的缺损,为早期的功能恢复打下良好的基础。

参考文献

- Milushava E, Sperlagh B, Shikova L, et al. Non-synaptic release of [3H] noradrenaline in response to oxidative stress combined with mitochondrial dysfunction in rat hippocampal slices[J]. Neuroscienc, 2003, 120(3): 771~781
- Otsuka R, Adachi N, Hamami G, et al. Blockade of central histaminergic H2 receptors facilitates catecholaminergic metabolism and aggravates ischemic brain damage in the rat telencephalon[J]. Brain Res, 2003, 974(2): 117~126
- 张熠, 顾振纶, 蒋小岗. 夏天无总碱提取物对痴呆大鼠脑内 5-羟色胺和多巴胺含量的影响[J]. 苏州大学学报, 2004, 24(2): 134~136

(收稿日期 2008-08-27)