



## 研究报告

### Research Report

# 黄连水煎液对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

许朋<sup>✉</sup>, 牛宪立<sup>✉</sup>, 魏妮娜<sup>✉</sup>, 姬可平<sup>✉</sup>

遵义医学院, 遵义, 563000

<sup>✉</sup> 通讯作者: [jlhjx@sina.com](mailto:jlhjx@sina.com); <sup>✉</sup> 作者

植物药与药理学杂志, 2015 年, 第 4 卷, 第 2 篇

收稿日期: 2015 年 10 月 6 日

接受日期: 2015 年 10 月 18 日

发表日期: 2015 年 10 月 28 日

本文首次发表在《基因组学与应用生物学》(2015 年第 34 卷第 10 期 2152-2155 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

许朋等, 2015, 黄连水煎液对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用, 基因组学与应用生物学, 34(10): 2152-2155 ([10.13417/j.gab.034.002152](https://doi.org/10.13417/j.gab.034.002152))

引用格式(英文):

Xu et al., 2015, Protective Effects of Rhizoma Coptidis Decoction on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Mice, Genomics and Applied Biology, 34(10): 2152-2155 ([10.13417/j.gab.034.002152](https://doi.org/10.13417/j.gab.034.002152))

**摘要** 为了探究黄连水煎液对小鼠脑组织急性缺血再灌注损伤的保护作用, 我们将 50 只小鼠随机分为 5 组分别是: 假手术对照组、模型对照组(用玻璃分针分离两侧颈总动脉和迷走神经, 结扎法同时结扎颈总动脉, 造成小鼠急性脑组织缺血再灌注损伤)、黄连水煎液治疗组(25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL)。各治疗组分别灌胃给予上述浓度黄连水煎液, 模型对照组和假手术对照组给予生理盐水, 上述各组均灌胃 7 d; 在灌胃结束后, 断头取出脑组织, 制备脑组织匀浆, 测定脑组织中 Evan's 蓝含量及抗氧化酶(SOD)活性与丙二醛(MDA)含量的变化。结果表明: 缺血再灌注后小鼠脑组织 Evan's 蓝含量升高, SOD 活性降低, MDA 含量增高。用药后小鼠脑组织 Evan's 蓝含量降低, SOD 活性升高, MDA 含量降低。因此, 黄连水煎液能改善小鼠脑组织缺血区的血流量, 减轻急性脑缺血的损伤, 对脑缺血再灌注损伤有保护作用。

**关键词** 黄连, 脑缺血再灌注, SOD, MDA, 保护作用

## Protective Effects of Rhizoma Coptidis Decoction on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Mice

Xu Peng<sup>✉</sup>, Niu Xianli<sup>✉</sup>, Wei Nina<sup>✉</sup>, Ji Keping<sup>✉</sup>

Zunyi Medical College, Zunyi, 563000

<sup>✉</sup> Corresponding author, [jlhjx@sina.com](mailto:jlhjx@sina.com); <sup>✉</sup> Authors

**Abstract** In order to explore the protective effect of the decoction of rhizoma coptidis (*coptis chinensis* Franch) on mice with acute cerebral ischemia and reperfusion injury, 50 mice were divided to 5 groups respectively: sham operation control group, model control group (glass minute separation on both sides of the common carotid artery and the vagus nerve, ligation also by ligation of the common carotid artery, resulting in mice with acute cerebral ischemia reperfusion injury), coptis decoction treatment group (25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL). The treatment group were orally given the concentration of rhizoma coptidis decoction, model control group and sham operation control group was given normal saline, the groups were given gastric 7 d; after intragastric administration of the end, the broken out brain tissue, brain tissue homogenate was prepared, in brain tissues were determined by Evan's blue content and antioxidant enzyme (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content changes. The results showed that the content of Evan's blue in brain tissue increased, the activity of SOD was decreased, and the content of MDA increased. After treatment, the content of Evan's blue in brain tissue of mice decreased, SOD activity increased and MDA content decreased. Therefore, rhizoma coptidis decoction can improve the blood flow in the ischemic area of brain tissue in mice, and reduce the damage of acute cerebral ischemia.

**Keywords** Rhizoma coptidis, Cerebral ischemia reperfusion, SOD, MDA, Protective effect

脑血管疾病一直是世界范围内的高发疾病, 其病死率有逐年上升的趋势, 严重威胁着人类的健康。因此, 防治脑血管疾病的发生具有重要意义。脑血流流通不畅, 供应障碍, 引起脑组织缺血、缺氧性坏死或软化是脑缺血的主要病因(Kulik et al., 2008)。现代医学、生物学的研究在脑血管疾病的诊断、治疗和防治等方面都取得了较大的突破, 但脑血管疾病本身具有治愈率低、发病率高、并发症多、死亡率高和预后恢复差等特点(孙雅瑄等, 2010)。黄连作为抗菌药有着悠久的历史, 长期以来在临床上用于解热镇痛、抗细菌感染。近来研究发现黄连在治疗心脑血管疾病方面有应用价值, 如降血脂、血糖、抗心律失常、抗血小板聚集等药理作用(余园媛等, 2006)。尚鲜见其对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用的相关报道。



脑梗死的病理生理机制之一是脑缺血再灌注损伤(颜景峰等, 2010), 本实验通过结扎法同时结扎双侧颈总动脉, 制作小鼠脑组织急性缺血再灌注模型, 观察黄连水煎液对模型小鼠脑组织 SOD、MDA 及 Evan's 蓝含量的影响, 研究其对抗小鼠脑缺血再灌注损伤的机制。

## 1 结果与分析

### 1.1 脑组织 Evan's 蓝含量检测

Evan's 蓝属于一种常用的偶氮染料, 因其分子量大小与血浆白蛋白相近, 而且在血液中与血浆白蛋白有很高的亲和力, 据此, 在神经科学研究中常被用于示踪剂观察血脑屏障的完整性。

本研究中, 模型对照组小鼠脑组织 Evan's 蓝含量大幅升高, 说明脑组织受损严重, 模型制备成功, 黄连水煎液治疗组使 Evan's 蓝含量降低, 且各组之间存在差异, 中剂量组效果较好(表 1)。

表 1 脑组织 Evan's 蓝含量(n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Brain Evan's blue content (n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	含量( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )
Group	Content ( $\mu\text{g}/100\text{mg}$ )
假手术对照组	3.451 $\pm$ 2.584 $\Delta$
The control group	
模型对照组	11.045 $\pm$ 5.424*
Model group	
黄连水煎液治疗组(25 mg/mL)	9.784 $\pm$ 5.143 $\Delta$
The treatment group (25 mg/mL)	
黄连水煎液治疗组(50 mg/mL)	5.461 $\pm$ 3.256 $\Delta$
The treatment group (50 mg/mL)	
黄连水煎液治疗组(100 mg/mL)	4.397 $\pm$ 5.201 $\Delta$
The treatment group (100 mg/mL)	

注: 与假手术对照组相比, \* $p < 0.05$ ; 与模型对照组相比,  $\Delta p < 0.05$

Note: Compared with the control group, \* $p < 0.05$ ; Compared with model group,  $\Delta p < 0.05$

### 1.2 脑组织 SOD、MDA 含量检测

SOD 是肌肉组织内重要的抗氧化酶, 通过清除缺血组织氧自由基发挥保护作用, 主要作用机制是催化超氧阴离子歧化反应, 其被认为是活性氧防御的重要机制(程发峰等, 2010)。SOD 含量、活力的降低, 导致自由基的堆积, 后者在不饱和脂肪酸中发生一系列反应, 并以链式或链式支链反应的形式形成脂质过氧化物(Mami et al., 2011)。SOD 含量可判断组织损伤程度。脑组织急性缺血时, 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载, 自由基生成量增加, 清除能力下降, 作用于细胞膜和血液循环中的脂质, 使其发生脂质过氧化, 并最终分解为 MDA, 导致细胞膜和细胞功能的损伤, 并大量消耗抗氧化剂, 使 SOD 活力失偿性下降, 从而启动自由基连锁反应, 进一步破坏血管内皮的结构和功能, 甚至内皮细胞凋亡, 直接损伤脑组织。研究表明, 有效地清除自由基, 降低过氧化脂质的生成在脑血栓的治疗中具有重要的意义。

模型对照组小鼠脑组织受损严重, 出现 MDA 含量升高、SOD 含量降低的情况, 黄连水煎液治疗组使 MDA 含量降低, SOD 含量升高, 且各组效果较显著( $p < 0.05$ ) (表 2)。

## 2 讨论

本模型制备对于实验操作者的手法要求很高, 实验过程中有多处要注意的操作步骤。结扎暴露的双侧颈总动脉时, 不要损伤迷走神经, 不然, 会造成小鼠的死亡。精确的操作尽快分离肌肉与神经, 暴露双侧颈总动脉并结扎, 确保模型的成功率、稳定性、成活率。实验过程中如果出血, 不应盲目结扎法止血, 以免造成不必要的损伤, 用棉签压迫出血点, 大多数情况下可以减少出血。麻醉剂量应做到精确, 力争一次麻醉成功, 不可多次麻醉(韩蕾等, 2012)。同时, 手术过程中要密切关注动物的呼吸情况, 及时吸痰, 避免呼吸道分泌物增多出现的气道堵塞, 从而降低动物的死亡率。

脑缺血再灌注时, 各种损伤机制会导致血脑屏障的破坏, 从而使一些平时不能通过的大分子物质得以通过(程发峰等, 2010)。Evan's 蓝能与血浆蛋白结合, 正常时不能透过血脑屏障, 脑缺血再灌注时, 血脑屏障的通透性的增大, 脑组织中的 Evan's 蓝含量大幅升高, 因此, 测定 Evan's 蓝含量能反映出血脑屏障损伤程度及通透性的变化情况。初步研究表明: 黄连水煎液能降低脑缺血组织中的 Evan's 蓝含量, 提高脑缺血组织中 SOD 的



含量,降低 MDA 含量,有良好的抗自由基作用。在保护屏障的完整性维持、急性脑缺血损伤保护等方面有较好的作用。抗氧化酶 SOD 活力的高低直接反应了机体清除氧自由基的能力(雷军荣等, 2010)。MDA 是自由基膜过氧化脂质的一种重要的分解产物,含量可以反映机体内脂质过氧化的程度,常被用以作为脂质过氧化程度的检测指标,MDA 的高低间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度(韩辉等, 2012)。

表 2 脑组织 SOD, MDA 含量(n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 SOD, MDA content of brain tissue (n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	SOD 含量(U/mg prot) SOD content (U/mg prot)	MDA 含量(nmol/mg prot) MDA content (nmol/mg prot)
假手术对照组 The control group	24.15 $\pm$ 4.28	10.16 $\pm$ 4.14 $\Delta$
模型对照组 Model group	10.59 $\pm$ 5.62*	24.51 $\pm$ 4.41*
黄连水煎液治疗组(25 mg/mL) The treatment group (25 mg/mL)	15.14 $\pm$ 4.46 $\Delta$	15.24 $\pm$ 4.56 $\Delta$ *
黄连水煎液治疗组(50 mg/mL) The treatment group (50 mg/mL)	16.01 $\pm$ 3.92 $\Delta$ *	13.16 $\pm$ 3.88 $\Delta$
黄连水煎液治疗组(100 mg/mL) The treatment group (100 mg/mL)	20.57 $\pm$ 6.22 $\Delta$	13.18 $\pm$ 5.02 $\Delta$

注:与假手术对照组相比, \* $p < 0.05$ ; 与模型对照组相比,  $\Delta p < 0.05$

Note: Compared with the control group, \* $p < 0.05$ ; Compared with model group,  $\Delta p < 0.05$

### 3 材料与方 法

#### 3.1 实验材料

##### 3.1.1 药 物

黄连水煎液,取黄连 100 g,捣碎,浸泡 10 倍量体积份数的热水中,煮沸提取 3 次,每次 2 h,合并滤液稀释至 1 000 mL,即 100 mg/mL,另取该液适量分别用蒸馏水稀释至浓度为 50 mg/mL、25 mg/mL,备用。

##### 3.1.2 动 物

清洁级小鼠 50 只,雌雄各半,20~25 g,由遵义医学院实验动物中心提供。

##### 3.1.3 主要试剂

Evan's 蓝(2%)购于上海宝曼生物科技有限公司,丙二醛(MDA)、抗氧化酶(SOD)测定试剂盒,购于南京建成生物工程研究所。

##### 3.1.4 主要仪器

721 型分光光度计(上海分析仪器厂)、高速离心机(Thermo Fisher D-37520)、电子天平(LG-PABER)、酶标仪(Bio-rad680)。

#### 3.2 方 法

##### 3.2.1 小鼠急性脑组织缺血再灌注模型的制备与分组

给药将 50 只小鼠按体重随机分假手术对照组、模型对照组黄连水煎液治疗组(25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL) 5 组,每组 10 只,采用双侧结扎法制备模型。腹腔注射 7%水合氯醛 350 mg/kg 麻醉,无肌张反射后,固定四肢和头部使小鼠仰位躺在手术台上,颈部正中靠近气管部位开口(长度 1 cm 左右),玻璃分针分离两侧动脉和迷走神经,用手术线分别结扎 60 min 后,剪断手术线再灌注,缝合开口。假手术对照组,相同操作但不结扎,暴露 60 min 后缝合开口。模型制备成功 24 h 后分别给以黄连水煎液(25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL)药物干预,按体重 0.1 mL/10 g,1 次/d 灌胃给药,7 d 后取材进行相关指标检测。

##### 3.2.2 组织匀浆的制备

冰盘上取出全脑,分离嗅球、小脑和脑干,冷生理盐水洗去血迹,滤纸吸去多余水分(留出约 2 000 mg),称重后加 9 倍生理盐水制备 10%脑组织匀浆,匀浆液经 2 500 r/min 离心 5 min,取上清置-20℃冰箱冻存备用。

##### 3.2.3 Evan's 蓝标准曲线的制作



配制一系列浓度不同的 Even's 蓝标准溶液(0.002 mg/mL, 0.003 mg/mL, 0.004 mg/mL, 0.005 mg/mL, 0.006 mg/mL, 0.007 mg/mL, 0.008 mg/mL, 0.009 mg/mL, 0.010 mg/mL)分别测定其吸光度, 然后选取 Evan's 浓度(C)为横坐标, 选取吸光度值(A)为纵坐标, 绘成标准曲线(图 1)。

### 3.2.4 脑组织 SOD、MDA、Evan's 含量测定

取制备好的脑组织匀浆, 按 SOD、MDA 试剂盒说明书进行操作, 在酶标仪上 495 nm 处测各孔吸光值, 求得脑组织对应的 SOD、MDA 含量。

取已取好的组织 100 mg, 加 5 mL 甲酰胺制成匀浆, 加盖后于 60℃ 水浴箱孵育 48 h (韩蕾等, 2012), 3 500 r/min 离心 10 min, 得上清, 去沉淀。在 721 分光光度计上  $\lambda=625$  nm 处进行测定, 根据标准曲线比色, 求得 Evan's 蓝含量( $\mu\text{g}/100$  mg 湿重)。

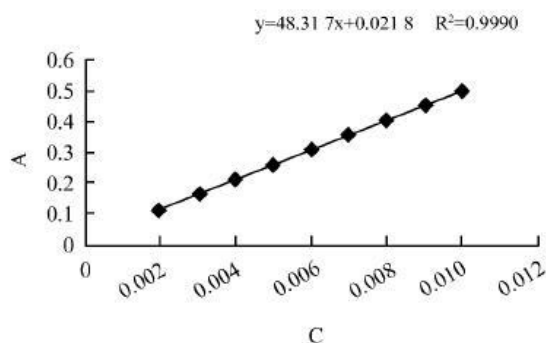


图 1 Even's 蓝标准曲线

Figure 1 Even's blue standard curve

## 作者贡献

许朋为遵义医学院药物化学专业在读研究生, 负责实验方案设计、论文撰写; 牛宪立负责动物实验实施; 魏妮娜负责论文数据处理及统计学分析; 姬可平负责实验、论文指导。

## 致谢

本研究由贵州省科学技术基金项目(黔科合 J 字 LKZ [2010] 40 号)资助。

## 参考文献

- Cheng F.F., Guo S.Y., Zhong X.G., Lu Y., Song W.T., and Wang Q.G., 2010, Qingkailing injection different dosage effect on serum SOD in MCAO mice, *Zhonghua Zhongyiyao Xuekan* (Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine), 10(28): 2059-2061 (程发峰, 郭少英, 钟相根, 鲁艺, 宋文婷, 王庆国, 2010, 清开灵注射液不同时间给药对 MCAO 小鼠血清 SOD 的影响, *中华中医药学刊*, 10(28): 2059-2061)
- Han H., Wu L.M., and Wang H., 2009, Effect of renshen chuanxiqing in injection on SOD activity, MDA concentration in serum and EAA concentration in brain tissue in rats with focal cerebral ischemia, *Chengdu Zhongyiyao Daxue Xuebao* (Journal of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine), 32(1): 76-78 (韩辉, 吴丽敏, 汪瀚, 2009, 人参川芎嗪注射液对局灶性脑缺血大鼠血清 SOD 活性, MDA 含量及脑组织氨基酸含量的影响, *成都中医药大学学报*, 32(1): 76-78)
- Han L., Huang W., Yu Y., and Zhou X.H., 2012, Protection effect of mulberry on cerebral ischemia-reperfusion injury in mice brain tissue, *Zhonghua Zhongyiyao Xuekan* (Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine), 30(9): 1945-1947 (韩蕾, 黄卫, 于滢, 周晓辉, 2012, 桑枝对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用, *中华中医药学刊*, 30(9): 1945-1947)
- Kulik T., Kusano Y., and Aronhime S., 2008, Regulation of cerebral vasculature in normal and ischemic brain, *Neuropharmacol*, 55(3): 282
- Lei J.R., Qin J., Zhang J., Huang K.M., Fu R., and Zhou Z.M., 2010, Effect of curcumin on rat cerebral ischemic injury inflammation and permeability of blood brain barrier, *Zhongguo Yaolixue Tongbao* (Chinese Pharmacological Bulletin), 26(1): 120-123 (雷军荣, 秦军, 张晶, 黄宽明, 付锐, 周章明, 2010, 姜黄素对大鼠缺血性脑损伤炎症反应和血脑屏障通透性的影响, *中国药理学通报*, 26(1): 120-123)
- Mami K., and Mitsuo S., 2011, Beneficial effects of follistatin in hepatic ischemia-reperfusion injuries in rats, *Dig. Dis. Sci.*, (56): 1075-1081
- Sun Y.X., Liu T., Dai X.L., Gao Z.L., Wei R., Zheng Q.S., and Zhang Z.F., 2010, Study on the effects of chitosan oligosaccharide on brain ischemia reperfusion injury in mice, *Zhongguo Yaolixue Tongbao* (Chinese Pharmacological Bulletin), 26(9): 1180-1184 (孙雅瑄, 刘婷, 戴雪伶, 高兆兰, 魏荣, 郑秋生, 张招峰, 2010, 壳寡糖抗小鼠脑缺血-再灌注作用研究, *中国药理学通报*, 26(9): 1180-1184)
- Yan J.F., Li J.P., and Kou J.P., 2010, Protective effect of ruscogenin on cerebral ischemia and anoxia in mice, *Zhongyao Xinyao Yu Linchuang Yaoli* (Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology), 7(21): 331-334 (颜景峰, 李金平, 寇俊萍, 2010, 鲁斯可皂苷元对小鼠脑缺血缺氧的保护作用, *中药新药与临床药理*, 7(21): 331-334)
- Yu Y.Y., Wang B.C., Peng L., Wang J.B., and Zeng C., 2006, Progress in pharmacological research of Rhizoma, *Chongqing Daxue Xuebao* (Ziran Kexueban) (Journal of Chongqing University (Natural Science Edition)), 29(2): 107-111 (余园媛, 王伯初, 彭亮, 王晶波, 曾辰, 2006, 黄连的药理研究进展, *重庆大学学报(自然科学版)*, 29(2): 107-111)