

# 腺苷 A1 受体介导参麦注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠脑保护作用的影响

鲁华荣<sup>1</sup> 宋胜文<sup>2</sup> 韩琨元<sup>2</sup> 刘海鹏<sup>2</sup> 陈双懂<sup>2</sup> 王均炉<sup>2</sup> 戴勤学<sup>2</sup>

**摘要** **目的** 观察腺苷 A1 受体(adenosine A1 receptor, A1R)是否介导参麦注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用。**方法** 采用大脑中动脉阻塞法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)建立脑缺血再灌注损伤模型。将 60 只模型制备成功大鼠按随机区组原则分为模型组、参麦组、参麦加 A1R 拮抗剂(1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine, DPCPX)组、A1R 拮抗剂对照组和二甲基亚砜溶剂对照组,每组 12 只,另设假手术组 12 只。在大鼠脑缺血即刻时,参麦组大鼠腹腔注射参麦注射液 15 mL/kg,模型组和假手术组大鼠腹腔注射等量的生理盐水;参麦加 A1R 拮抗剂组大鼠在注射参麦注射液前 30 min 腹腔注射 DPCPX 1 mg/mL;A1R 拮抗剂对照组、二甲基亚砜溶剂对照组大鼠分别在脑缺血即刻前 30 min 给予腹腔注射 DPCPX (1 mg/kg)和二甲基亚砜(1 mL/kg)。再灌注 24 h 时评估大鼠的神经行为学评分,检测脑梗死体积以及脑梗死半暗带区 Bcl-2 蛋白表达量。**结果** 与假手术组比较,模型组大鼠神经行为学评分、梗死体积和 Bcl-2 蛋白表达量均增加( $P < 0.05$ );与模型组比较,参麦组大鼠行为学评分和梗死体积明显减少,Bcl-2 蛋白表达量增加(均  $P < 0.05$ );与参麦组比较,参麦加 A1R 拮抗剂组大鼠行为学评分升高,梗死体积明显增加,Bcl-2 蛋白表达量明显减少(均  $P < 0.05$ )。**结论** A1R 拮抗剂能部分逆转参麦注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠的行为学评分,梗死体积和 Bcl-2 蛋白表达的改善作用,A1R 可能介导了参麦注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠的脑保护作用。

**关键词** 参麦注射液;腺苷 A1 受体;脑缺血再灌注损伤;脑保护

Adenosine A1 Receptor Mediated Neuroprotection of Shenmai Injection on Rat Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury: an Experimental Study LU Hua-rong<sup>1</sup>, SONG Sheng-wen<sup>2</sup>, HAN Kun-yuan<sup>2</sup>, LIU Hai-peng<sup>2</sup>, CHEN Shuang-dong<sup>2</sup>, WANG Jun-lu<sup>2</sup>, and DAI Qin-xue<sup>2</sup> <sup>1</sup> Department of Anesthesiology, People's Hospital of Jiangshan City, Zhejiang (324100); <sup>2</sup> Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang (325000)

**ABSTRACT** **Objective** To observe whether adenosine A1 receptor (A1R) mediated neuroprotection of Shenmai Injection (SI) on rat cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** The focal cerebral I/R model was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO). Totally 60 successfully modeled rats was divided into 5 groups according to randomized block principle, i.e., the model group, the SI group, the SI + A1R antagonist (1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine, DPCPX) group, the A1R antagonist control group, and the dimethyl sulfoxide (DMSO) control group, 12 in each group. Besides, a sham-operation group was set up ( $n = 12$ ). SI at 15 mL/kg was peritoneally injected to mice in the SI group immediately after cerebral I/R. Equal volume of normal saline was injected to mice in the model group and the sham-operation group. DPCPX at 1 mg/mL was peritoneally injected to mice in the A1R antagonist control group 30 min before peritoneal injecting SI. DPCPX at 1 mg/kg and DMSO at 1 mL/kg were peritoneally injected to mice in the A1R antagonist control group and the DMSO control group 30 min immediately before cerebral I/R. Rats' neurobehavioral scores were assessed after 24 h reperfusion. The volume of cerebral infarction and Bcl-2 protein expression of cerebral infarction penumbra were also detected. **Results** Compared with the sham-operation group, neurobehavioral scores, the volume of cerebral infarction,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273926);浙江省温州市科技计划项目(No. Y20140122)

作者单位:1. 浙江省江山市人民医院麻醉科(浙江 324100) 2. 温州医科大学附属第一医院麻醉科(浙江 325000)

通讯作者:戴勤学, Tel: 0577-88069458, E-mail: 653091408@qq.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.09.1109

and Bcl-2 protein expression increased (all  $P < 0.05$ ). Compared with the model group, neurobehavioral scores and the volume of cerebral infarction obviously decreased, but Bcl-2 protein expression increased in the SI group (all  $P < 0.05$ ). Compared with the SI group, neurobehavioral scores increased, the volume of cerebral infarction was obviously enlarged, and Bcl-2 protein expression was obviously reduced in the A1R antagonist control group (all  $P < 0.05$ ). Conclusions SI's neurobehavioral scores could be partially reversed in the A1R antagonist control group, the volume of cerebral infarction and Bcl-2 protein expression improved. A1R might possibly mediate neuroprotection of SI on MACO mice.

**KEYWORDS** Shenmai Injection; adenosine A1 receptor; cerebral ischemia/reperfusion injury; cerebral protection

脑血管疾病是严重危害人类健康的常见疾病之一,其中最为常见的是缺血性脑血管疾病。中医学认为,缺血性脑血管疾病的病机以风火痰瘀为标,以气阴两虚为本。参麦注射液是中医传统的急症用药,具有益气养阴功效,与缺血性脑血管疾病之后的“气阴两虚”的病机演变相吻合。有研究提示,参麦注射液对大鼠具有神经保护作用<sup>[1,2]</sup>,但是有关于参麦注射液神经保护的机制研究比较少见。在中枢神经系统中,腺苷 A1 受体(adenosine A1 receptor, A1R)主要分布在大脑皮质、海马等神经结构中,其与配体腺苷结合后对脑缺血性、缺氧性脑损伤具有神经保护作用<sup>[3]</sup>。有研究表明,参麦注射液可以增加体内的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)水平<sup>[4]</sup>,而 ATP 通过酶降解反应生成腺苷<sup>[5]</sup>。因此本实验观察 A1R 是否介导参麦注射液对脑缺血再灌注损伤大鼠脑保护作用。

## 材料与方法

**1 动物** 健康成年雄性 SD 大鼠 72 只, SPF 级, 体重(230 ± 20) g, 由温州医科大学动物实验中心提供, 合格证号: 2007000521445。于实验前 3 天购买并饲养动物房中, 术前 1 天禁食、自由饮水。

**2 试剂及仪器** A1R 拮抗剂腺苷受体阻断剂(1, 3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine, DPCPX)、二甲基亚砜(美国 Sigma 公司, 批号: 2013YE246396); 兔抗 Bcl-2 抗体(购自美国 Bioworld Technology 公司, 批号: SY20134321); 免疫组化试剂盒(北京中山生物技术公司, 批号: VF20136521); 0.9% 氯化钠溶液; 线头直径为(0.32 ± 0.02) mm 的尼龙线栓(北京沙东生物技术有限公司); Olympus BX4.TF 显微镜。

**3 动物模型制备** 参照文献<sup>[6]</sup>, 大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型采用血管内线栓法制备。将 62 只大鼠制备 MCAO 模型, MCAO 2 h 后, 全过程大鼠无死亡。采用 Longa EZ 等<sup>[7]</sup>的方法对大鼠行为学进行评分, 0 分剔除

(2 只大鼠评分为 0 分, 剔除实验), 1 分以上造模成功, 视为观察对象, 并监测大鼠肛温保持在(37 ± 0.2) °C。

**4 动物分组及给药** 将 60 只造模成功的大鼠按随机区组法分为模型组、参麦组、参麦加 A1R 拮抗剂组、A1R 拮抗剂对照组、二甲亚砜溶剂对照组, 每组 12 只, 另设 12 只为假手术组。在大鼠脑缺血即刻, 参麦组大鼠腹腔注射参麦注射液 15 mL/kg<sup>[1]</sup>, 模型组和假手术组大鼠注射等量的生理盐水。将 DPCPX 溶解于二甲亚砜, 参麦加 A1R 拮抗剂组大鼠在注射参麦注射液前 30 min 腹腔注射 DPCPX 1 mg/mL。A1R 拮抗剂对照组、二甲亚砜溶剂对照组大鼠分别在脑缺血即刻前 30 min 腹腔注射 DPCPX (1 mg/kg) 和二甲亚砜 (1 mL/kg)。

## 5 检测指标及方法

**5.1 行为学评分** 参照文献<sup>[7]</sup>。脑缺血再灌注 24 h 时, 采用单盲法进行大鼠神经行为学评分。无功能障碍为 0 分; 不能完全伸展左侧前肢为 1 分; 向左侧旋转为 2 分; 向左侧倾倒是 3 分; 无自主活动伴意识抑制为 4 分。

**5.2 梗死体积数** 取 36 只(每组 6 只)大鼠在再灌注 24 h 处死, 取出脑组织后用脑磨具切成 6 片大约 2 mm 的脑切片, 浸泡在 2% 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyl tetrazole chloride, TTC)溶液中染色 30 min。染成红色部分为正常脑组织, 染成白色部分为脑梗死组织, 并采用相机拍照存储。梗死体积数据通过 Image-Plus 6.0 软件获得, 梗死体积(%) = 梗死侧的梗死体积/正常侧体积 × 100%。

**5.3 Bcl-2 蛋白积分光密度** 再灌注 24 h, 剩余 36 只(每组 6 只)大鼠麻醉后打开胸腔暴露心脏, 用生理盐水和 4% 多聚甲醛经心脏进行全身灌注固定脑组织并制成切片, 采用免疫组织化学方法检测 Bcl-2 蛋白表达量。实验操作步骤按照免疫试剂盒说明书。在显微镜下采用单盲法对梗死半暗带区随机抽取 5 个视

表 1 各组大鼠神经行为学评分比较

组别	n	神经行为学评分(分)					中位数(范围)
		0	1	2	3	4	
假手术	12	12	0	0	0	0	0(0~0)
模型	12	0	0	2	8	2	3(2~4)*
参麦	12	7	3	2	0	0	1(0~2) <sup>△</sup>
参麦加 A1R 拮抗剂	12	0	1	5	5	1	2.5(1~4) <sup>▲</sup>
A1R 拮抗剂对照	12	0	1	4	5	2	2.5(1~4)
二甲亚砷溶剂对照	12	0	0	3	8	1	3(2~4)

注:与假手术组比较,\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与参麦组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$

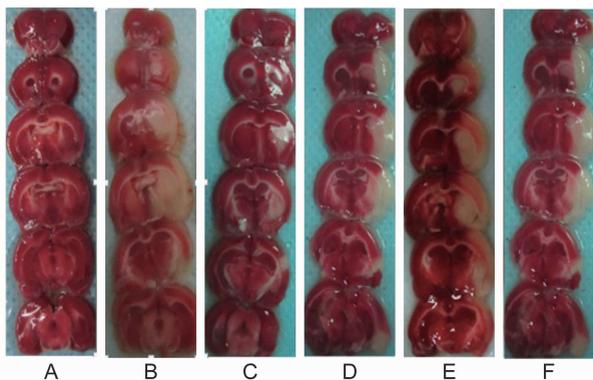
野,用 Image-Plus 6.0 软件对图片进行计算,测出 Bcl-2 蛋白积分光密度值( IOD )。

6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。神经功能学评分采用非参数秩和检验 Kruskal-Wallis 方法检验,若组间比较存在差异,用 Nemenyi 方法进行两两比较。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1 各组大鼠神经行为学评分比较(表 1) 与假手术组比较,模型组神经行为学评分增高( $P < 0.01$ );与模型组比较,参麦组大鼠神经行为学评分明显减低( $P < 0.05$ ),A1R 拮抗剂对照组和二甲亚砷溶剂对照组差异均无统计学意义( $P > 0.05$ );与参麦组比较,参麦加 A1R 拮抗剂组大鼠神经行为学评分明显增高( $P < 0.05$ )。

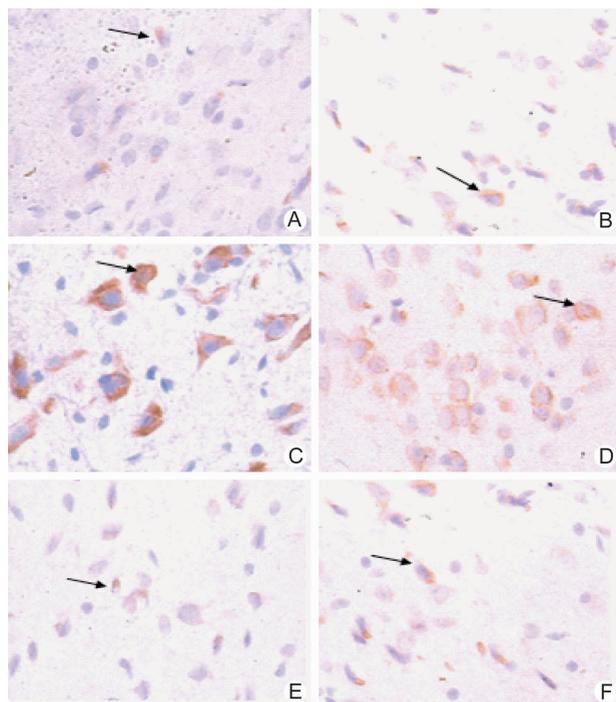
2 各组大鼠脑梗死体积比较(图 1,表 2) 与假手术组比较,模型组脑梗死体积增加( $P < 0.05$ );与模型组比较,参麦组大鼠脑梗死体积明显减少( $P < 0.05$ );与参麦组比较,参麦加 A1R 拮抗剂组大鼠脑梗死体积明显增加( $P < 0.05$ )。



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为参麦组;D 为参麦加 A1R 拮抗剂组;E 为 A1R 拮抗剂对照组;F 为二甲亚砷溶剂对照组

图 1 各组大鼠脑梗死体积比较 (TTC 染色,  $\times 400$ )

3 各组大鼠脑梗死半暗带区 Bcl-2 蛋白表达比较(图 2,表 2) 染成棕黄色的细胞是 Bcl-2 蛋白表达阳性细胞。与假手术组比较,模型组 Bcl-2 蛋白 IOD 明显增加( $P < 0.05$ );与模型组比较,参麦组大鼠 IOD 值明显增加( $P < 0.05$ );与参麦组比较,参麦加 A1R 拮抗剂组大鼠 IOD 值明显减少( $P < 0.05$ )。



注:A 为假手术组;B 为模型组;C 为参麦组;D 为参麦加 A1R 拮抗剂组;E 为 A1R 拮抗剂对照组;F 为二甲亚砷溶剂对照组;黑色箭头所示为阳性细胞

图 2 各组大鼠脑梗死再灌注 24 h Bcl-2 蛋白表达比较 (免疫组化,  $\times 400$ )

### 讨 论

据临床观察提示参麦注射液治疗急性脑梗死疗效显著<sup>[8]</sup>。而动物实验研究也表明参麦注射液能显著提高脑梗死再灌注损伤大鼠的脑血流量,减少氧自由基,改善脑细胞能量代谢,减轻脑细胞缺血性损伤<sup>[1,2]</sup>。

表 2 各组大鼠脑梗死体积百分比和  
脑组织 Bcl-2 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	脑梗死体积 (%)	Bcl-2 蛋白 (IOD 值)
假手术	6	0.0 ± 0.0	625 ± 142
模型	6	63.1 ± 10.2*	1 812 ± 189*
参麦	6	22.9 ± 9.8 <sup>△</sup>	3 820 ± 653 <sup>△</sup>
参麦加 A1R 拮抗剂	6	55.1 ± 9.3 <sup>▲</sup>	2 413 ± 425 <sup>▲</sup>
A1R 拮抗剂对照	6	62.4 ± 10.2	2 012 ± 329
二甲亚砜溶剂对照	6	59.5 ± 9.4	1 987 ± 525

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ;与参麦组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$

本研究将以中枢神经系统的 A1R 为研究切入点,以大鼠神经行为学、大脑梗死体积及梗死半暗带区 Bcl-2 蛋白表达量为指标,评价 A1R 在参麦注射液的神保护中的作用。

脑梗死中后神经功能的改善是脑缺血治疗中非常关心的问题,在动物实验中,神经行为学评分是神经功能的一个客观指标。在本实验研究中发现:参麦组大鼠神经行为学评分与模型组大鼠比较有明显改善,说明参麦注射液能改善 MCAO 大鼠的神经学行为。参麦加 A1R 拮抗剂组大鼠的神经行为学评分与参麦组大鼠比较,评分增加,说明 DPCPX 能部分逆转参麦注射液改善 MCAO 大鼠神经行为学的作用。脑梗死体积的变化是脑缺血再灌注损伤的常用指标,本实验研究发现:与模型组比较,参麦组大鼠脑梗死体积明显减少,说明参麦注射液能明显减少 MCAO 大鼠脑梗死体积。而参麦加 A1R 拮抗剂组大鼠的脑梗死体积与参麦组大鼠比较明显增加,说明 DPCPX 能部分逆转参麦注射液减少 MCAO 大鼠脑梗死体积的作用。现代医学认为,早期、快速的抢救梗死半暗带区是改善和治疗中风患者病情的关键<sup>[9]</sup>,Bcl-2 蛋白在细胞凋亡/抗凋亡中有重要作用,其功能与延长细胞寿命,减少细胞凋亡有关<sup>[10]</sup>。本实验研究发现:与模型组比较,参麦组大鼠梗死半暗带区 Bcl-2 蛋白表达量明显增加,而参麦加 A1R 拮抗剂组大鼠梗死半暗带区 Bcl-2 蛋白表达量与参麦组大鼠比较明显减少,说明 DPCPX 能部分逆转参麦注射液提高 MCAO 大鼠梗死半暗带区 Bcl-2 蛋白表达。上述各指标中,二甲亚砜溶剂对照组、A1R 拮抗剂对照组与模型组大鼠之间比较,差异均无统计学意义,说明二甲基亚砜与 DPCPX 这两种物质对实验结果均无影响。

腺苷是中枢神经系统中广泛存在的神经递质之一,A1R 是一种抑制型 G 蛋白偶联受体,其被腺苷激活后能减少神经系统中谷氨酸盐等释放从而达到神经保护的作用<sup>[3]</sup>。参麦注射液的有效成分为麦冬皂苷、

人参皂苷、麦冬黄酮、麦冬多糖和人参多糖。有实验研究表明参麦注射液可以加速 ATP 合成,提高  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活性,减少神经细胞水肿达到神经保护的作用<sup>[4]</sup>。从本实验的结果可以推测出参麦对神经保护作用的另一机制:参麦能加速脑组织中 ATP 的合成,增加的 ATP 能通过酶降解反应使 ATP 的代谢产物腺苷含量增加<sup>[5,11]</sup>,从而激活了 A1R 达到脑保护的作用。如果能采用高效液相色谱法技术检测出脑组织中腺苷含量,将进一步证实该推测。

综上,参麦注射液对 MCAO 大鼠具有脑保护作用,而 DPCPX 能部分逆转参麦的脑保护作用。因此,A1R 可能部分介导了参麦对 MCAO 大鼠的脑保护作用。

## 参 考 文 献

- [1] 白玉,张圣恭,王良荣,等. 参麦注射液对外伤性脑损伤大鼠神经元细胞的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17(1): 28-30.
- [2] 陈前芬,田鹤郎,杨卫东,等. 参麦注射液对局灶性脑缺血再灌注局部脑血流和脂质过氧化物的影响[J]. 中国病理生理杂志, 1996, 12(4): 1440-1441.
- [3] 王宏法,夏洪莲,秦金玲,等. 腺苷脱氢酶介导电针百会穴对脑缺血再灌注大鼠脑保护效应的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(2): 235-239.
- [4] 王瑞,张琳静,师瑞,等. 参麦注射液联合极化液对大鼠复苏后脑组织的影响[J]. 西南国防医药, 2011, 21(1): 465-468.
- [5] Zimmermann H. Ectonucleotidases in the nervous system [J]. Novartis Found Symp, 2006, 276(12): 113-128.
- [6] 梁冬冬,王宏法,张明晓,等. 百会穴局部腺苷 A1 受体对电针诱导脑缺血耐受的作用[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(7): 524-527.
- [7] Longa EZ, Weinstein PR, Carson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] Wu B, Liu M, Liu H, et al. Meta-analysis of traditional Chinese patent medicine for ischemic stroke [J]. Stroke, 2007, 38(6): 1973-1979.
- [9] Sandu N, Cornelius J, Filis A, et al. Ischemic tolerance in stroke treatment [J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2009, 7(10): 1255-1261.
- [10] 戴勤学,王雷雷,晁娟,等. 百会穴注射腺苷 A1 受体激动剂对脑缺血再灌注损伤大鼠大脑皮质的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(3): 433-436.
- [11] 黄陆平,何昕,戴勤学,等. 参麦注射液对大鼠大脑皮质腺苷含量的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2015, 22(2): 154-156.

(收稿:2013-11-03 修回:2015-05-20)