

[文章编号] 1007-0893(2007)04-0204-04

## 三七三醇皂苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠血浆前列环素和血栓素 A<sub>2</sub> 水平的影响

陈健文<sup>1</sup> 邱灿华<sup>2</sup> 蓝秀健<sup>2</sup> 马仁强<sup>1</sup> 赖文珊<sup>1</sup> 周小石<sup>1</sup> 刘培庆<sup>1\*</sup>

(1. 中山大学药学院, 广东 广州 510080; 2. 中山大学中山医学院, 广东 广州 510080)

**[摘要]** 目的: 探讨三七三醇皂苷(PTS)对脑缺血再灌注损伤大鼠血浆中血栓素 A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 和前列环素 (PGI<sub>2</sub>) 水平的影响。方法: 将大鼠随机分成6组: 假手术组, 模型组, PTS 25、50、100mg/kg组和阳性对照药血栓通注射液(XST)组; 建立局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠模型, 于造模前分别尾静脉注射给药3d, 造模后6h和12h各给药1次, 造模24h后取血分离血浆, 用放免法测定血浆中TXA<sub>2</sub>和PGI<sub>2</sub>的稳定代谢产物TXB<sub>2</sub>和6-Keto-PGF1 $\alpha$ 的水平。结果: 造模后24h大鼠血浆中TXB<sub>2</sub>及TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF1 $\alpha$  (T/P)值明显升高 ( $P < 0.01$ ); PGI<sub>2</sub>则明显降低 ( $P < 0.01$ )。经三七三醇皂苷各剂量预防给药后, 大鼠血浆的TXB<sub>2</sub>含量及TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF1 $\alpha$  (T/P)值较模型组明显降低 ( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 6-Keto-PGF1 $\alpha$ 含量显著增高 ( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 并呈一定的量效依赖关系。结论: 三七三醇皂苷能通过降低TXA<sub>2</sub>合成, 升高PGI<sub>2</sub>, 调节TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>比值, 达到对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用。

**[关键词]** 三七三醇皂苷; 大鼠中动脉闭塞法; 脑缺血; 血栓素A<sub>2</sub>; 前列环素

**[中图分类号]** R743.31 **[文献标识码]** A

## Effects of PTS on Expression of Prostacyclin and Thromboxane A<sub>2</sub> Following Local Cerebral Ischemia-Reperfusion in Rats

CHEN Jian-wen<sup>1</sup>, QIU Can-hua<sup>2</sup>, LAN Xiu-jian<sup>2</sup>, MA Ren-qiang<sup>1</sup>,  
LAI Wen-shan<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-shi<sup>1</sup>, LIU Pei-qing<sup>1</sup>

(1. School of Pharmaceutical Science, Sun Yet-sen University, Guangdong Guangzhou 510080;  
2. Zhongshan Medical College of Sun Yet-sen University, Guangdong Guangzhou 510080)

**[Abstract]** Objective To study the effects of PTS on expression of prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub> after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. Methods Sprague dewley rats were divided into 6 groups randomly. They are treated with PTS at the dose of 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg, XST 0.45 mL/kg and normal saline injection respectively. The model of acute reperfusion injury after cerebral ischemia in rat was made by middle cerebral artery occlusion. 3 d before MCAO, PTS or normal saline injection or XST were injected via tail vein to the rats respectively. 6 h and 12 h after MCAO, the PTS, XST and saline were given via tail vein

**[收稿日期]** 2007-05-31

**[基金项目]** 广东省重点攻关基金(2003C30113)、中山大学实验室开放基金项目资助(KF200641)

**[作者简介]** 陈健文(1977-), 男, 广东省肇庆市人, 实验师, 主要从事心脑血管药理学研究以及新药研发。

**[\*通讯作者]** Tel: 020-87333078-807

to the rats respectively. Blood plasma was taken 24 h later. We observed the effect of PTS on TXB<sub>2</sub> and 6-Keto-PGF1 $\alpha$  via radioimmunoassay. Results The level of TXB<sub>2</sub> and the ratio of TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF1 $\alpha$  (T/P) in MCAO plasma increased significantly ( $P < 0.01$ ), while 6-Keto-PGF1 $\alpha$  decreased significantly ( $P < 0.01$ ). PTS could increase the generation of 6-Keto-PGF1 $\alpha$  and decrease the level of TXB<sub>2</sub> and T/P in MCAO plasma after treated with different dosages. Conclusion PTS has protective effect on ischemia brain injury by increasing the generation of 6-Keto-PGF1 $\alpha$ , decreasing the level of TXB<sub>2</sub> and improving the balance of TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> in blood plasma.

[ **Key Words** ] PTS; MCAO; Cerebral ischemia; Thromboxane A<sub>2</sub>; Prostacyclin

急性脑缺血再灌注损伤可引起严重的神经功能障碍, 甚至危及生命。脑缺血损伤在中医理论中属脑中风范畴, 在临床观察中发现脑缺血损伤以瘀者痰者多见, 由于先有瘀血存在于脑府之中, 后发展为由瘀积水, 由瘀化热进而由热灼津生痰, 逐步加重阻碍气机, 闭塞清窍, 从而出现一系列的体征和体征。基于如上理论, 我们在治疗脑缺血损伤时, 首先从瘀论治, 从痰论治<sup>[1]</sup>。

三七为五加科人参属植物三七 (*Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen) 的干燥根, 是我国特产的珍贵药材, 具有散瘀止血、消肿定痛的功效。研究表明三七有效成分能治疗脑血管意外后遗症<sup>[2]</sup>。三七三醇皂苷 (PTS), 主要活性成分人参三醇皂苷 Rg1 的含量达 60% 以上, Rg1、R1、Re 三者的含量约达 80%, 本实验室前期研究以及相关报道证实其对脑缺血有良好的保护作用<sup>[3, 4]</sup>。

目前为止的文献报道对三七三醇皂苷防治脑缺血的作用机制仍未十分明确, 尤其是对前列环素 (PGI<sub>2</sub>) 和血栓素 A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 在血液中水平的影响尚未清楚, 估计 TXA<sub>2</sub> 和 PGI<sub>2</sub> 平衡失调与缺血性脑中有着密切的关系。本课题主要着手这方面进行研究, 通过大脑中动脉栓塞法制备大鼠脑局灶缺血再灌注模型, 检测三七三醇皂苷对血浆中 PGI<sub>2</sub> 的稳定代谢产物 6-Keto-PGF1 $\alpha$  和 TXA<sub>2</sub> 的稳定代谢产物 TXB<sub>2</sub>, 为其作用机制进行进一步的探讨, 为临床用药提供一定的科学依据。

## 1 材料和方法

1.1 动物 体重 240~280 g 的健康雄性 SD 大鼠, 由中山大学实验动物中心提供, 合格证号:

2005A057。

1.2 药品和试剂 三七三醇皂苷由药学院药理毒理实验室提供, 纯度 80% 以上。TXB<sub>2</sub> 及 6-Keto-PGF1 $\alpha$  放免试剂盒, 购自中国人民解放军总医院科技开发中心放免研究所; 液体闪烁计数器 (FJ21072P), 西安 262 厂产品。其余试剂为国产分析纯。

1.3 分组和给药 SD 大鼠随机原则分成 6 组, 即假手术组、模型组、PTS 低 (25 mg/kg)、中 (50 mg/kg)、高 (100 mg/kg) 剂量组和血栓通注射液 0.45 mL/kg 组。药物用生理盐水配制成相应的浓度, 使给药体积均为 0.4 mL/100 g 大鼠。预先连续尾静脉注射给药 2 d, 每天 1 次, 造模前 0.5 h 进行第 3 次给药, 造模后 6 h 和 12 h 分别进行第 4、5 次给药, 即总共给药 5 次。模型组和假手术组大鼠给予注射生理盐水, 给药时间及体积同前。

1.4 造模方法 以 10% 水合氯醛 (3.5 mL/kg, 腹腔注射) 麻醉大鼠。将已麻醉的大鼠仰卧固定, 沿左颈侧作约 1.5 cm 皮肤切口, 分离出左侧颈总动脉 (CCA) 并穿缝线备用。再往上分离出颈外动脉 (ECA), 结扎之。不用分离及结扎翼突腭动脉 (PPA)。分离出颈内动脉 (ICA) 穿一缝线并轻拉起。将已分离的 CCA 结扎并轻拉起, 于 CCA 上剪一小口。然后将一端加热成圆珠状 (< 0.3 mm) 的直径为 0.205 mm 的尼龙线从小口插入, 缓缓推至前脑动脉 (约 20 mm) 再往回拉约 2 mm 即至大脑中动脉口, 长约 18 mm (自颈内分叉算起), 用缝线结扎 ICA 以固定尼龙线, 缺血 1 h 后将尼龙线轻轻拔出一部分, 实行再灌注 24 h, 造成大鼠局灶性脑缺血再

灌注损伤模型。手术完毕大鼠伤口滴加青霉素钠，腹腔注入少量青霉素钠。最后缝合皮肤，手术完毕回笼饲养，不进行再灌注操作。假手术组大鼠只分离出 CCA、ECA 和 ICA 并穿线，不结扎任何动脉及插线。

造模成功的标准：动物手术后有明显手术侧（即左侧）Horner 症（左侧眼睑下垂，眼球凹陷）及手术侧（即左侧）偏瘫体征（不能完全伸展左前肢，行走时向左侧倾倒或转圈）。依上述标准将能够存活 24 h 的大鼠确定为最后的实验对象，并进行行为学评分及快速断头取脑<sup>[3, 4]</sup>。

1.5 样本制备 将大鼠麻醉后，经腹腔静脉抽血约 3 mL 于 EDTA 抗凝离心管中，混匀，4℃ 离心 3 500 r/min，15 min，分离血浆，放于 -80℃ 保存。

1.6 测定血浆 PGI<sub>2</sub> 和 TXA<sub>2</sub> 以及计算其 T/P 比值 用放射免疫法。由于 PGI<sub>2</sub> 和 TXA<sub>2</sub> 生物半衰期分别为 3 min 和 30 s，目前尚难直接测定，故通过测定其稳定的代谢产物 6-Keto-PGF1 α 和 TXB<sub>2</sub> 来反映其浓度。按药盒说明书方法操作。取标准品 50 mL 加缓冲液 A 2 mL，浓度为 1 600 pg/mL 作为 S7；另取试管 6 支，编号 S1-S6，各加缓冲液 A 1 mL；由 S7 中取液 1 mL 加入 S6，依次倍比稀释。S1 至 S7 浓度分别为 25、50、100、200、400、800、1 600 pg/mL。测 TXB<sub>2</sub>：各试管加 <sup>125</sup>I TXB<sub>2</sub> 100 mL，混匀，放 4℃ 24 h 后，分别加 PR 试剂 500 mL；测 6-Keto-PGF1 α：各试管混匀，置 37℃ 6 h，各加 500 mL <sup>125</sup>I-6-Keto-PGF1 α。以上制备各管混匀，室温放置 15 min 后，4℃ 离心，3 500 r/min，20 min，任取其中 2 管测 cpm 数为 T 管。吸出上清液，测定各管沉淀 cpm。以 B/T 计算 NSB、So 结合百分率以 B/Bo 计算标准及待测样品结合百分率，用自动 C 计数器预先编程序直接绘出有关参数、标准曲线及样品浓度。

1.7 数据处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，组间采用单因素方差分析，统计软件为 SPSS 13.0 软件包。

## 2 实验结果

见表 1。与假手术组相比，脑缺血再灌注模型组

大鼠血浆中 TXB<sub>2</sub> 及 TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF1 α (T/P) 值明显升高 ( $P < 0.01$ )；PGI<sub>2</sub> 则明显降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较，PTS 各给药剂量组和阳性对照药血栓通注射液组 TXB<sub>2</sub> 及 TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF1 α (T/P) 值均明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )，且呈明显的剂量依赖关系；而 6-Keto-PGF1 α 则明显高于模型对照组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。表明 PTS 能剂量依赖性地抑制脑缺血再灌注模型大鼠血浆中 TXB<sub>2</sub> 的生成，同时增加 6-Keto-PGF1 α 在血浆中的含量，平衡 T/P 比值。PTS 高剂量组 (100 mg/kg) 的药效作用与血栓通注射液组相近。

表1 对脑缺血再灌注损伤大鼠血浆中TXB<sub>2</sub>和6-Keto-PGF1 α水平以及T/P比值的影响 (ρ<sub>B</sub>/ng · L<sup>-1</sup>)

组别	n	TXB <sub>2</sub>	6-Keto-PGF1 α	T/P
假手术组	10	172.84 ± 31.38	242.98 ± 26.58	0.71 ± 0.14
模型对照组	9	281.92 ± 71.11 <sup>#</sup>	141.00 ± 42.85 <sup>#</sup>	2.21 ± 0.91 <sup>#</sup>
PTS 25mg/kg	8	207.38 ± 57.86	171.43 ± 29.35 <sup>*</sup>	1.20 ± 0.20 <sup>*</sup>
PTS 50mg/kg	10	201.04 ± 38.19 <sup>*</sup>	191.41 ± 41.10 <sup>**</sup>	1.09 ± 0.32 <sup>**</sup>
PTS 100mg/kg	9	192.81 ± 46.55 <sup>**</sup>	208.80 ± 36.76 <sup>**</sup>	0.92 ± 0.18 <sup>**</sup>
血栓通组	8	191.58 ± 38.30 <sup>**</sup>	202.90 ± 42.37 <sup>**</sup>	1.00 ± 0.35 <sup>**</sup>

与假手术组比较，#  $P < 0.01$ ；与模型组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$ 。

## 3 讨论

在急性脑血管病中，缺血性脑血管疾病占 50%~70%，近年来发现发病后 48 h 内，绝大多数病人的缺血皮质已发生了再灌注。众所周知，脑缺血后的再灌注是神经功能恢复的基本条件，也是脑组织损伤加重的重要因素。目前，脑缺血再灌注损伤的病理生理是一个多环节、多因素、多途径损伤的酶促级联反应，这一重要概念在临床上已引起重视，认为其发生机制有以下几个方面：①钙超载；②血栓素与前列腺素系统失衡；③自由基介导的脂质过氧化。以上 3 方面是导致各种病理变化的共同途径。

近年来花生四烯酸 (AA) 在缺血性脑血管病中的作用日渐突出。PGI<sub>2</sub> 和 TXA<sub>2</sub> 均为 AA 的代谢产物。花生四烯酸在内皮细胞中经环氧合酶

(COX)作用后生成 PGI<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> 具有强烈的抑制血小板聚集和舒张血管的作用,对某些血栓与出血性疾病、动脉硬化的发病有重要的意义;而 TXA<sub>2</sub> 在血小板中血栓素合成酶的作用下,生成与 PGI<sub>2</sub> 生物效应相反的强血管收缩剂和血小板聚集诱导剂。在正常情况下,PGI<sub>2</sub> 和 TXA<sub>2</sub> 保持着动态平衡以维持对血管及供血的调节。PGI<sub>2</sub> 的生成、PGI<sub>2</sub> 水平、PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 比值对于心血管系统生理功能的稳定与调节<sup>[5-6]</sup>。而病理状态下花生四烯酸代谢异常,导致 PGI<sub>2</sub> 和 TXA<sub>2</sub> 的比例失调,血小板合成 TXA<sub>2</sub> 增多,血管内皮细胞生成 PGI<sub>2</sub> 受抑制,血小板呈现高凝状态,微血管收缩性增强等,是造成血小板聚集,血栓形成及血管痉挛的重要原因。由于 PGI<sub>2</sub> 和 TXA<sub>2</sub> 性质不稳定难以直接测定,故国内外测定 PGI<sub>2</sub> 的稳定代谢产物 6-Keto-PGF1 $\alpha$  和 TXA<sub>2</sub> 的稳定代谢产物 TXB<sub>2</sub> 作为判断 PGI<sub>2</sub> 和 TXA<sub>2</sub> 浓度的指标。

由于脑缺血激活磷脂酶 A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) 分解细胞膜上的磷脂,产生大量 AA,并进一步转化为 TXA<sub>2</sub> 和 PGI<sub>2</sub>,同时产生氧自由基。自由基激活环加氧酶使 TXA<sub>2</sub> 生成增加,并抑制 PGI<sub>2</sub> 合成酶活性,导致 PGI<sub>2</sub> 合成生成减少。这使得 TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> 平衡破坏,诱导血小板聚集和血管收缩,导致低灌注,加重缺血组织的损伤<sup>[7]</sup>。本实验表明大鼠缺血/再灌注后大鼠血浆中 TXB<sub>2</sub> 及 TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF1 $\alpha$  (T/P) 值明显升高 ( $P < 0.01$ ), PGI<sub>2</sub> 则明显降低 ( $P < 0.01$ ),也支持以上解释。

传统医学认为,三七乃活血化瘀之良药。现代药理研究证实其有抗自由基作用,同时还具有降低血黏度、抗血小板聚集、扩张血管、降低血脂和改善微循环及抗炎等作用<sup>[8]</sup>。三七能提高血浆 PGI<sub>2</sub> 与 TXA<sub>2</sub> 的比值,从而发挥抗血栓作用<sup>[9]</sup>,临床上,以三七或以三七为君药组方治疗缺血性心脑血管等疾病。目前已有文献报道三七皂苷对缺血再灌注损伤还有减轻钙超载、减轻脑水肿、促进再灌注时的神

经修复、减轻超微结构损伤和降低缺血再灌注期间死亡率等作用<sup>[9]</sup>。本研究结果显示三七三醇皂苷能明显降低血浆中 TXB<sub>2</sub> 及 TXB<sub>2</sub>/6-Keto-PGF1 $\alpha$  (T/P) 水平,升高 6-Keto-PGF1 $\alpha$  含量,并在一定范围内呈量效依赖关系。另外,已有动物实验证明通过阻断血栓素的专一活性治疗脑缺血是有效的<sup>[10]</sup>。邵凯隽等报道三七总皂甙能调节肺缺血再灌注损伤引起的 TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> 失衡<sup>[11]</sup>。故我们认为降低 TXA<sub>2</sub> 合成,升高 PGI<sub>2</sub>,调节 TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub> 比值是三七三醇皂苷对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用机制之一。

#### (参考文献)

- (1) 杨志刚,陈阿琴,俞颂东,等.三七药理研究新进展(J).上海中医药杂志,2005,39(1):33-37
- (2) 王频,毕建忠.三七皂甙治疗脑血管病的研究进展(J).中国老年学杂志,2006,26(2):275-277
- (3) 胡晓松,周德明.三七三醇皂苷对脑缺血再灌注大鼠的保护作用(J).中风与神经疾病杂志,2004,21(4):354-356
- (4) 刘宗超,吴官恩,赵克建,等.三七三醇皂苷对大鼠缺血/再灌注脑损伤保护作用的实验研究(J).中风与神经疾病杂志,2007,24(1):38-40
- (5) Vanags D, Rodgers SE, Lloyd JV, et al. The antiplatelet effect of daily low dose enteric -coated aspirin in man: a time course of onset and recovery (J). Thrombosis Research, 1990, 59(6):995-1005
- (6) Feelish M, Tepoel M, Zamora R, et al. Understanding the controversy over the identity of EDRF (J). Nature, 1994, 368(6466):62
- (7) 郑思榕,陈汝兴.破瘀通脉散对缺血性脑损伤的保护作用(J).医学理论与实践,1999,12(1):10-12
- (8) 张剑峰,张丹参.三七总皂苷药理作用研究进展(J).中医中药,2007,13(6):472-474
- (9) 贾乘,张林,程嘉艺.三七抑制大鼠血栓形成实验研究(J).中医学药刊,2001,19(2):172-173
- (10) 管阳太.缺血性脑损伤的脑保护剂瞻望(J).国外医学脑血管病分册,1993,1(2):81-83
- (11) 邵凯隽,王万铁,张晓隆,等.三七总皂甙对肺缺血再灌注损伤时氧化应激及TXA<sub>2</sub>/PGI<sub>2</sub>失衡的影响(J).温州医学院学报,2006,8(1):17-19